

UNIVERZITET CRNE GORE

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Vijeću Prirodno-matematičkog Fakulteta

PREDMET: Izvještaj komisije o magistarskom radu pod nazivom „Učestalost i genetska struktura infektivne larve crva iz klase Nematoda, rod Anisakis, u odabranim komercijalno važnim ribljim vrstama akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora“ kandidatkinje Tamare Mitrović, specijaliste biolog-ekolog.

Na LXXXII sjednici Vijeća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta Crne Gore, imenovana je Komisija za pregled i ocjenu magistarskog rada pod naslovom „Učestalost i genetska struktura infektivne larve crva iz klase Nematoda, rod Anisakis, u odabranim komercijalno važnim ribljim vrstama akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora“ kandidatkinje Tamare Mitrović. Na osnovu pregledanog rada i uslova utvrđenih Zakonom o visokom školstvu i Statutom Univerziteta Crne Gore, podnosimo sljedeći

IZVJEŠTAJ

Analiza magistarskog rada:

Rad je prikazan na 71 stranici i sadrži sledeća poglavlja: Sažetak, Abstract, Uvod, Ciljevi istraživanja, Materijali i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak i Literatura. U radu se nalazi 17 slika i 10 tabela i 1 prilog. Poglavlje Literatura sadrži 139 referenci.

Postavljeni ciljevi rada:

Anisakis je rod parazitskih valjkastih crva koji u svom životnom ciklusu ima stadijum koji uključuje ribe i morske sisare. Infektivan je za ljude i izaziva bolest anisakijazu. Iz tog razloga podaci o zastupljenosti i precizna identifikacija vrste parazitske nematode roda Anisakis u komercijalnim ribljim vrstama je važna i sa zdravstvenog i sa ekonomskog aspekta. Ciljevi ovoga rada bili su utvrđivanje dinamike populacije parazitskih nematoda *Anisakis* spp. u odabranim

komercijalno važnim vrstama riba akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora u svrhu proširenja dosadašnjih saznanja o ovim parazitima u Jadranskom moru, zatim molekularna identifikacija vrsta parazitskih crva u odabranim komercijalno važnim vrstama riba akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora i uvrđivanje genetske strukture populacije najbrojnije vrste, *A. pegreffii*.

Primijenjene metode:

U cilju ostvarivanja prethodno navedenih zadataka, prikupljanje jedinki oslića, barbuna i šnjura od strane ribara obuhvatilo je regione crnogorskog primorja, od Herceg Novog do Ulcinja, bez posebnog posvećivanja pažnje sezonskoj dinamici. Zatim je vršeno uzorkovanje crva iz ribljih vrsta i numerička analiza po domaćinu. Crvi su se nakon uzimanja pincetom stavljali u 96% etanol i držali na 4 stepena do momenta analize. Morfološka identifikacija parazita roda *Anisakis* je odrađena korišćenjem svjetlosnog mikroskopa pod uvećanjima 40, 100 i 200x. Jedinke parazita su kalupljene između dvije staklene pločice zbog bolje vizuelizacije. Razvojni stadijumi određivani su prema Grabdinom (1976) opisu pripadajućih morfoloških osobina. Statističke mjere dinamike populacija izračunate su u programu Quantitative Parasitology 3.0 (Rózsa i sar., 2000; Reiczigel i Rózsa, 2005) i dobijeni su podaci o prevalenciji, intenzitetu i srednjoj abundanci vrste. Molekularna analiza je obuhvatila: 1. Izolacija DNK koja je vršena metodom alkalne lize uz korišćenje proteinaze K. Koncentracija i čistoća DNK provjerene su na spektrofotometru; 2. Lančanom reakcijom polimeraze umnožio se fragment mitohondrijske DNK, lokus citohrom oksidaze podjedinice 2 (*cox*), dužine oko 600 parova baza. Zatim se uz pomoć F i R primer-a, Premix Ex Taq Hot Start Version i nuclease free water napravio master mix koji je zajedno sa produktom izolacije DNK izmiješan u eppendorf tubicama. PCR je obavljen u Eppendorf uređaju za PCR; 3. Dužina (broj parova baza) i prisutnost umnoženih PCR produkata provjerena je elektroforezom na 1 % agaroznom gelu. Gel je napravljen uz pomoć agaroze i TE pufera, zatim ohlađen i izliven u posudu, zatim su umetnuti češljici. Nakon hlađenja gela u komorice je uz pomoć mikropipeta unesen PCR produkt. Nakon elektroforeze rezultat je provjeren uz pomoć UV transiluminatora; 4. 1. Pročišćavanje je odrađeno pomoću komercijalnog kita QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), slijedeći uputstva iz protokola proizvođača. Pročišćeni PCR produkti poslani su u laboratoriju „MacroGen Europe“, Holandija, na sekvenciranje zajedno s

uzvodnim prajmerom. Sekvenciranje je obavljeno na aparatu ABI 3100 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems), korištenjem kita ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit. Analiza dobijenih sekvenci mitohondrijske DNK obukvatala je 1. Analizu genetske raznovrsnosti i struktura haplotipova vrste *Anisakis sp.* Nukleotidne sekvence fragmenta mitohondrijske DNK poravnate se pomoću algoritma Clustal W (Thompson i sar., 1994) implementiranog u programu MEGA X (Tamura i sar., 2011). Tačnost sekvenci je provjerena u BioEdit 7.2 Software-u pregledom na hromatogramu. Pogrešno očitana nukleotidna mjesta ručno su korigovana. Genetska raznovrsnost određena je u programima DnaSP 6.0 (Librado i Rozas, 2009) i Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i sar., 2005) procjenom broja haplotipova (H), polimorfnih mjesta (S), raznovrsnosti haplotipova (h, genetička raznolikost; Nei, 1987), nukleotidne raznovrsnosti (π ; Nei, 1987) i srednjeg broja razlika između parova nukleotidnih sekvenci (k, Tajima, 1983); 2. Filogenetska analiza vrsta roda *Anisakis* napravljena je BI analizom (Larget i Simon, 1999) i na sekvencama crva roda *Anisakis* izolovanih ovim istraživanjem zajedno sa sekvencama preuzetim iz GenBank baze podataka fragmenta COII, koristeći MRBayes v3.2.7 program (Huelsenbeck i Ronquist, 2001). Dobijeno stablo vizualizovano je korišćenjem FigTree programa.

Dobijeni rezultati:

U poglavlju Rezultati predstavljani su rezultati morfološke, numeričke, molekularne i filogenetske analize populacija vrste roda *Anisakis sp.* Istraživanja na ovom rodu su u prošlosti rađena na području Crne Gore, ali je ovo prva molekularna analiza odrađena na ovim prostorima. Rezultati ovog rada su pokazali da je valjkasti crv roda *Anisakis* registrovan u svim uzorcima jedinki oslića i šnjura, dok je pronađen u samo tri uzorka izolovana iz barbuna, što navodi na činjenicu da barbun predstavlja znatno manji rizik po ljudsko zdravlje u poređenju od ostale dvije vrste. Prisustvo crva u uzorku oslića, koji je sadržao 200 riba (61.0%), bilo je manje nego u istom uzorku šnjura (87.5%). Analizom epidemioloških podataka pokazano je da je populacija šnjura imala nešto nižu disperziju i manje odstupanje od uniformne distribucije, za razliku od populacije oslića. Od ukupno 53 sekvence analizom genetske raznovrsnosti *A. pegreffii* utvrđeno je 39 polimorfnih mjesta (17 su bili singletoni sa dvije moguće varijante) i 28 haplotipova. Najveći dio haplotipova (20) činili su jedinstveni haplotipovi. Računanjem genetskih indeksa raznovrsnosti dobijena je visoka vrijednost ukupne raznovrsnosti haplotipova: $h = 0,893 \pm 0,038$ i niska vrijednost nukleotidne raznovrsnosti $Pi = 0,00680$. Rezultati AMOVA analize ukazivali su na

nepostojanje genetske razlike između populacije parazita odvojenih prema vrsti domaćina, te da se ukupan postotak varijacije nalazio unutar samih populacija. Na osnovu rezultata Tajiminog D testa i Fuovog Fs, te rezultata SSD i HRI testa hipoteza o neutralnoj evoluciji je odbačena za sve populacije. Rezultatima BI analize utvrđeno je da sve sekvence pripadaju grupi *Anisakis* tipa I, jer i *A. pegreffi* i *A. simplex* pripadaju navedenoj grupi.

Pionirsko istraživanje parazita roda *Anisakis* na molekularnom nivou otvara novo poglavlje u nauci u Crnoj Gori. Kako je konzumiranje ribe i proizvoda mora po glavi stanovnika u Crnoj Gori vrlo niska, može se pretpostaviti da opšte znanje građana o mogućnosti prisustva ovog (potencijalno značajnim na ljudsko zdravlje) parazita nije na zavidnom nivou. Buduća istraživanja bi trebalo fokusirati na vrste od privredne važnosti, sa sprovođenjem istraživanja na većem broju jedinki svake vrste i naglaskom na sezonsku dinamiku, kako bi se omogućio što tačniji i detaljniji uvid u prirodni ciklus ove vrste, odnosno što precizniji podaci za širu javnost. Ovakva istraživanja bi trebalo popularizovati u svrhu poboljšanja informisanosti stanovništva Crne Gore o prisustvu ovih parazita, o pravilnom načinu pripremanja i konzumiranja ribe, čime se smanjuje mogućnost zaraze, te indirektan uticaj *Anisakisa* na polje ribarstva i ekonomije.

Zaključak i predlog Komisije:

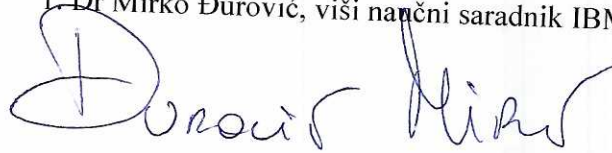
Nakon pregledanog magistarskog rada, analize rezultata i značaja ostvarenih istraživanja, Komisija konstatuje da rad zadovoljava sve uslove naučno-istraživačkog rada. Zadata tema ovog rada je naučno aktuelna, na savremeni način obrazložena, a istraživanje je dalo rezultate koji sveobuhvatno prikazuju zadate ciljeve. Prikazano istraživanje je dalo značajne rezultate o vrsti roda *Anisakis*, iz tri vrste riba crnogorskog dijela Jadranskog mora. Dobijeni rezultati su ukazali na značaj daljih, detaljnijih istraživanja u ovoj oblasti.

Na osnovu izloženog, Komisija predlaže Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta u Podgorici, da rad kandidatkinje Tamare Mitrović, pod naslovom: „Učestalost i genetska struktura infektivne larve crva iz klase Nematoda, rod *Anisakis*, u odabranim komercijalno važnim ribljim vrstama akvatorijuma crnogorskog dijela Jadranskog mora“ prihvati kao magistarski rad i odobri javnu usmenu odbranu.

Podgorica, 28.08.2023. god.

Komisija:

1. Dr Mirko Đurović, viši naučni saradnik IBMK, Kotor, član



2. Dr Miloje Šundić, docent, PMF član



3. Dr Dragana Milošević Malidžan, redovni profesor, PMF, mentor

