J. Fd Hyg. Safety
Vol. 23, No. 4, pp. 314~318 (2008)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

고래회충 검출을 위한 육안검사법과 중합효소연쇄반응-제한효소절편길이다형성의 비교

강주희 · 이민화 · 이강범 · 최창순*
중앙대학교 생활과학대학 식품영양학과

Comparison of Macroscopic Inspection and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) for the Detection of Anisakis simplex complex

Ju-Hee Kang, Min Hwa Lee, Kang-Bum Lee, Changsun Choi*
Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Chung-Ang University
(Received November 20, 2008/Revised November 29, 2008/Accepted December 2, 2008)

ABSTRACT -This research aimed to compare the detection methods of *Anisakis simplex* in Sea fish by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and macroscopic inspection. We examined 18 *Trichiurus lepturus*, 11 *Scomber japonicus*, and 65 *Todarodes pacificus* collected from the retail markets in the areas of Uljin, Kyuonggi province and Seoul. As the result of examinations, we found that detection rate of *Anisakis simplex* by macroscopic observation was 89% in *Trichiurus lepturus*, 90.9% in *Scomber japonicus*, 32.3% in *Todarodes pacificus*. The detection rate of *Anisakis simplex* by PCR-RFLP was 77.7% in *Trichiurus lepturus*, 81.8% in *Scomber japonicus*, 26.1% in *Todarodes pacificus*. We could conclude that PCR-RFLP method of *Anisakis simplex* was more specific rather than macroscopic observation.

Key Words: *Anisakis simplex* complex, Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), *Trichiurus lepturus, Scomber japonicus, Todarodes pacificus*

서 론

고래 회충(*Anisakis simplex*)은 고래회충과(Family Anisakidae)에 속하는 선충류의 일종으로 고래회충유충증(Anisakiasis)를 일으키는 병원체로 알려져 있다. 고래 회충의 유충은 유백색을 띄며, 1～2 mm 안팎의 둘레와 10～20 mm정도의 크기이다. 고래 회충의 충란은 0.05mm × 0.05mm의 크기로 육안확인이 어려울 정도로 작고, 종에 따라서 그 크기가 다양하다[1].

고래회충은 복잡한 생활사를 가지고 있다. 해수로 유출된 유충은 크릴새우와 같은 작은 갑각류에 감염을 일으키고, 감염된 갑각류 생물들은 상위 포식자인 해산 어류 및 포유류에 포식되게 된다. 이러한 먹이사슬 구조에서 고래회충은 다양한 종류의 해산어류(고등어, 아지, 갈치, 도미, 대구, 오징어, 청어 등)를 중간 숙주로 이용하며 소화관이나 근육에서 3기 유충형태로 감염하게 된다. 이후 고래, 돌고래, 바다사자 등과 같은 해양포유류와 같은 종숙주에 감염되는 경우 고래 회충은 성충으로 발달하고 유충 및 충란을 배출하게 된다. 사람은 고래 회충에 감염된 갑각류, 해산 어류, 포유류를 부적절하게 조리하여 섭취하거나, 생으로 섭취하는 경우 고래회충유충증을 일으키게 되는 것이다[1].

고래회충유충증은 고래 회충에 감염된 해산 어류를 충분히 조리하여 섭취하지 못 한 경우 또는 생식한 경우 섭취 후 3～6시간이내 구토, 설사, 복부팽만, 두드러기, 발열 등의 증상을 동반한 급성위장염을 일으키는 것이 특징이다. 고래회충증의 감염초기에는 흰 실같이 보이는 고래 회충이 위벽을 뚫고 복강으로 이동하면서 복통을 유발시키고 십이지장, 공장 및 충수돌기로 이동하여 장아니사키스증을 일으킨다[1].

고래회충유충증은 1960년 네덜란드 과학자인 Van Thiel[2]

*Correspondence to: Changsun Choi, D.V.M., Ph.D. Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Chung-Ang University, 72-1, Nae-ri, Daeduk-myun, Ansung-si, Kyounggi-do, Republic of Korea
Tel: 82-31-670-4589, Fax: 82-31-676-8741
E-mail: cchoi@cau.ac.kr

에 의하여 최초로 보고된 이후 미국, 캐나다, 포르투갈, 이탈리아, 일본, 한국, 중국 등에서 발생보고가 있었다[3-4]. 고래회충유충증은 어류를 생식하는 문화를 가진 아시아권 국가에서 다발하는 것으로 보고되었는데, 특히 회(sashimi), 초밥(sushi)등과 같이 해산어류를 생식하는 문화가 발달한 일본의 경우 500여건 이상의 고래회충유충증이 사람에게 발생한 것으로 보고되기도 하였다. 그러나 아시아 국가뿐만 아니라 북미, 유럽권 국가를 포함한 전세계 국가에서 고래회충유충증이 지속적으로 보고되고 있어 식품안전성 분야의 중요한 문제로 대두되고 있다[2-4].

국내에서는 1971년 고래 회충 유충에 의한 편도선염 발생보고 이후 현재까지 240여건의 감염 사례가 보고되었다[4-5]. 국내에서 발생한 고래회충유충증은 고래회충과의 유충인 *Anisakis* spp., *Terranova* spp., *Contracaecum* spp., *Raphidascaris* spp. 등에 의하여 발생하였다고 보고된 바 있다. 특히 고래 회충에 의한 감염사례가 다수 보고된 바 있으며, 시판 어류에서도 고래 회충과 물개 회충(*Pseudoterranova decipiens*)등이 검출보고도 있었다[1, 6-7].

기존에 사용되는 고래 회충 검사법에는 숙련된 검사자에 의한 육안검사법이 광범위하게 활용되어 왔다. 육안검사법은 식품 또는 환자로부터 분리 및 확인된 유충을 크기 및 형태적 특징을 바탕으로 확인하는 검사법으로써 국내에서 보고된 고래회충유충증의 대부분이 이 검사법에 의하여 확인 보고되었다. 그러나 고래회충유충증을 일으킬 수 있는 다양한 선충류가 보고됨에 따라서 검사자의 숙련도에 과도하게 의존하는 육안검사법의 문제점과 제한점이 대두되었다. 최근에는 이러한 단점을 극복하기 위하여 분자유전학적 검사법을 활용한 고래 회충 검사법 개발이 활발히 진행되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내 어시장에서 판매되고 있는 해산 어류에 감염되어 있는 고래회충 유충을 육안검사법과 중합효소연쇄반응-제한효소절편길이다형성(Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) 검사법으로 검출하고, 고래 회충 검출에 대한 특이도를 비교 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

고래 회충 육안검사법

고래 회충 유충의 감염 여부를 조사하기 위하여 총 94마리의 해산 어류를 2007년 9월부터 10월까지 수집하여 검사에 사용하였다. 어종별로는 갈치 18마리, 고등어 11마리, 오징어 65마리였으며, 서울, 경기도, 울진 등의 어시장 또는 소매시장에서 구매하여 육안검사에 사용하였다. 폭 0.5~1mm × 15~20mm 길이를 가지는 유충을 육안으로 확인하여 채취하였으며 고래 회충의 유충과 특징이 동일한 개체를 분자생물학적 검사에 사용하였다(Table 1).

Anisakis 유충의 DNA 추출

육안검사법에 의하여 확인된 고래회충의 유충을 새로운 eppendorf tube에 옮겨 담고, 500 ul Phosphate-Buffered Saline(PBS)를 첨가하여 세척 후 제거한 다음 500 ul 0.1N NaOH를 첨가하고 steal floating rack에 결합하여 10분간 끓는 물에 가열 후 냉각하였다. Phenol(Bioneer, Daejeon, Korea) 500 ul를 첨가한 후 vortex시키고 5분 후, microcentrifuge (VS-15000N, Vision, Kyounggi, Korea)에 넣고 14,000 rpm에서 30분간 원심분리 하였다. 상층액을 새로운 eppendorf tube로 옮기고 Phenol:Chloroform(1:1)을 동량 첨가하고 5~10초간 vortex 했다. 5분 후 microcentrifuge (VS-15000N, Vision, Kyounggi, Korea)에 넣고 7500 rpm으로 10분간 원심분리했다. 상층액을 분리하여 새로운 tube로 옮겼다. 전체 volume의 1/10 용량으로 3 M sodium acetate(Duksan, Kyungki, Korea)를 첨가하고 전체 volume의 2~2.5배 용량으로 100% ethanol(Duksan, Kyungki, Korea)을 첨가한 다음 -20도 냉동조건에서 하룻밤 침전하였다. 4도로 냉각된 원심분리기에서 14,000 rpm 30분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 이후 상층액을 조심스럽게 제거하고, 70% ethanol 500 ul를 첨가하여 14,000 rpm 30분간 DNA washing을 수행하였다. 원심이 끝난후 상층액을 조심스럽게 버리고 10~15분간 air dry를 실시하였다.

30~50 ul 멸균수 또는 TE buffer를 첨가하여 DNA를 부유하였다.

Table 1. Sampling sites and fish species for the detection of *Anisakis simplex* complex

	No. of samples	Fish market (Uljin)	Retail market (Anyang)	Fish market (Ansung)	Retail market (Seoul)
Trichiurus lepturus	16/18[a] (88.9%)	-	8/9 (88.9%)	8/9 (88.9%)	-
Scomber japonicus	10/11 (90.9%)	-	10/11 (90.9%)	-	-
Todarodes pacificus	21/65 (32.3%)	0/30 (0.0%)	6/10 (60.0%)	-	15/25 (60.0%)
Total no. of samples	47/94 (50.0%)	0/30 (0.0%)	24/30 (80.0%)	8/9 (88.9%)	7/25 (60.0%)

[a]No. of positive samples / No. of total samples

중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)

고래 회충을 확인하기 위한 중합효소연쇄반응 검사법에 대한 선행연구가 일부 이루어진 바 있다. 본 연구에서는 ITS-1, 5.8S ribosomal DNA, ITS-2 등을 포함한 전체 internal transcribed spacer (ITS)를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하였다[8-9]. 고래 회충에 특이적인 DNA를 증폭하기 위한 프라이머와 PCR mixture 조성은 다음과 같다.

D.W. 13 μl와 10×PCR buffer 2 μl dNTP 2 μl(bioneer, Daejeon, Korea) 를 넣고 Primer A (5'-GTC GAA TTC GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3')와 Primer B (5'-GCC GGA TCC GAA TCC TGG TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3')[14] 그리고 Taq Polymerase (bioneer) 1 μl와 고래 회충 유충으로부터 추출한 DNA template를 2 μl를 혼합하여 준비하였다. PCR 반응조건은 denaturation 94℃ 5분, amplification 94 °C 30초, 55 °C 30초, 72 °C 30초씩 35회 반응시킨 후 extension 72 °C 10분으로 DNA를 증폭하였다.

제한효소절편길이다형성(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)

중합효소연쇄반응에서 얻어진 DNA fragment를 제한효소절편길이다형성 분석에 사용하였다. DNA product 8 ul와 10X reaction buffer 1 ul, *Hin*fI 또는 *Hha*I(10U; Bioneer, Daejeon, Korea) 1 ul를 혼합하고 37 °C조건에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 산물은 0.1% Ethidium bromide를 첨가한 1% agarose gel(Qbiogene, CA, U.S.A)로 100V에서 60분간 전기영동을 실시하였고 UV 영상분석기를 통해 분절의 크기를 확인하였다.

결과 및 고찰

Anisakis 유충의 육안검사

시중에서 판매되고 있는 갈치, 고등어, 오징어에 대한 고래 회충 감염정도를 육안검사법으로 조사하였는데, 총 94마리의 개체 중에 47마리(50.0%)의 개체에서 고래 회충으로 추정되는 유충이 관찰되었다(Table 1). 대부분의 고래 회충 유충은 어체의 소화기 장기에 부착된 형태로 발견되었고 일부는 소화기 장기의 내부에서 관찰되었으며, 근육에 이행한 경우는 관찰할 수 없었다.

오징어 65마리를 대상으로 육안검사를 수행한 결과 총 21마리에서 고래 회충으로 추정되는 유충이 발견되어 32.3%의 감염률을 보였다. 이 중에서 어시장에서 가져온 개체에서는 Anisakis 유충이 발견되지 않았으며 경기도 안양시장과 서울 반포시장에서 획득한 샘플은 60%의 감염률을 보였다. 우 등[10]은 선행연구에서 다양한 종류의 해산어류를 대상으로 아니사키스 유충의 감염 실태를 조사하였는데, 11개의 오징어 검체를 대상으로 육안검사를 실시하여 총 6개체(54.5%)가 감염되어 있다고 보고하였으며, 조사대상 어류 중에서 가장 낮은 감염률을 보였다고 하였다. 본 연구에서도 오징어를 대상으로 한 아니사키스 유충 검출 빈도가 갈치, 고등어에 비하여 상대적으로 낮았는데, 우 등의 선행연구 결과와 유사한 경향을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

고등어 검체에 대한 육안검사법을 수행한 결과 총 11개체 중에서 10개체에서 Anisakis 유충이 발견되어 90.9%의 감염률을 보였다. 우 등[10]의 연구조사에 의하면 고등어 20개의 샘플 중 20개가 감염되어 100%의 감염률을 보였으며 이는 본 실험과 마찬가지로 상당히 높은 감염률을 보이고 있음을 확인할 수 있었다.

육안검사에 사용한 18개의 갈치 검체의 경우 총 16개체에서 아니사키스 유충이 검출되어 88.9%의 감염률을 보였다. 갈치 검체는 대형마트와 경기도 안양시장에서 수집되었는데 육안검사법에 의한 고래 회충 유충의 검출율은 각각 88.9%로 동일하게 조사되었다. 우[10] 등이 수행한 선행연구에서도 갈치의 감염률은 100%라고 보고함으로써, 본 연구 결과와 유사한 양상을 확인할 수 있었다.

고래 회충에 대한 육안검사법에서 고등어 또는 갈치의 감염률이 오징어보다 더 높음을 확인할 수 있었다. 특히 오징어의 경우 어시장에서 직접 구매한 가검물에서는 고래 회충의 감염을 확인할 수 없었으나 대형마트와 같은 소매시장에서 판매되는 경우 고래 회충 유충의 발견 빈도가 상대적으로 높은 양상을 관찰할 수 있었다. 이는 유통경로에 의한 감염이라고는 볼 수 없으나, 유통 단계가 길어짐에 따라서 고래 회충 유충이 소화기 내강 또는 근육 장기로의 이동이 증가하여 검출빈도가 높아지는 것으로 추정하였다. 따라서 소매시장에서 구입한 고등어, 갈치 등을 섭취할 경우 고래 회충의 감염 또는 검출 빈도가 높으므로, 해산어류의 섭취시 내장을 제거하고 충분한 가열 조리를 하는 것이 고래회충유충증 예방을 위하여 필요할 것으로 보인다.

고래 회충 유충의 PCR-RFLP

육안검사법에서 고래 회충 유충으로 확인된 개체를 대상으로 DNA를 추출하고 아니사키스 종에 특이적으로 반응하는 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 중합효소연쇄반응 결과에서 고래회충의 유전자 중 ITS-1, 5.8S rDNA subunit, ITS-2 region을 포함하는 Internal transcribed spacer에서 약 1,000bp 길이의 특이적인 DNA 분절을 확인하였다. 육안검사에서 고래 회충으로 추정되는 유충 47개체 중에서 40개체가 PCR 양성반응을 보임으로써 추정된 개체대비 85%가 고래 회충으로 확인되었으며, 총 검체수 대비 43%의 해산어류에서 고래 회충 유충이 검출되었다(Table 2).

중합효소연쇄반응에서 양성반응을 보인 40개의 PCR

product를 제한효소 *Hin*fI과 반응시킨 제한효소절편길이다형성 분석에서는 370, 300, 250 bp 크기를 가지는 3개의 분절이 확인되었으며, *Hha*I과 반응시킨 결과에서는 550, 430 bp의 2개 분절이 확인되었다. *Hin*fI과 *Hha*I을 이용한 제한효소절편길이다형성 분석 결과에 따르면 본 연구에서 검출된 고래 회충의 유충은 *Anisakis simplex* complex 중에서 *Anisakis pegreffii*인 것으로 확인할 수 있었다[8-9]. 일본과 이탈리아에서는 *A. pegreffii*에 의한 감염 환자가 발생한 것으로 보고된 바 있으나, 국내에서는 아직 보고된 바가 없다[11-12]. 그러나 국내에서 판매되는 어류에 *A. pegreffii*의 존재가 확인됨으로써 식품위생학적측면 및 공중보건학적 측면에서도 관심을 기울일 필요가 있을 것으로 사료된다.

어종별로 살펴보면 갈치는 육안관측에서는 88.9%의 감염률을 보였으나 중합효소연쇄반응에서는 77.7%의 양성율을 보였다. 고등어의 경우 육안관측에서는 90.9%에서 아니사키스 유충이 검출되었으나, 중합효소연쇄반응에서는 81.8%에서만 고래 회충의 유충으로 확인되었다. 오징어의 경우 육안검사법과 중합효소연쇄반응 검사법에서 각각 32.3%, 26.1%가 고래 회충 감염을 보이는 것으로 확인되어 두 검사법 간의 검출율이 상이한 것으로 확인되었다.

본 연구에서 수행된 고래 회충 육안검사법과 중합효소연쇄반응 검사법을 비교하였을 때 육안검사법에 의한 검출률이 보다 높게 나타났다. 그러나 고래 회충의 경우 *Anisakis pegreffii*, *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis simplex* C를 포함하여 *Anisakis simplex* complex라고 통칭하며, 그 밖에 *Anisakis typica*, *Anisakis ziphidarum*, *Anisakis physeteris*, *Anisakis schupakovi* 등 형태적 특성이 매우 유사한 종들이 다수 존재하기 때문에 육안검사를 전적으로 신뢰하기는 어려운 점이 있었다[1,4,7]. 또한 *Anisakis* spp.는 10～29 mm의 길이와 0.44～0.54 mm의 폭의 선충이며, 길이 25～50 mm, 폭 0.3～1.2 mm의 *Pseudoterranova* spp.는 형태학적 특성이 매우 유사한 것으로 알려져 있다[13].

Anisakis spp.와 *Pseudeterranova* spp.는 식도(esophagus)-위(ventriculus)-장관(intestine)의 배열상태에 따라서 구분되나, 검사자의 숙련도 및 검사조건에 따라 검출율 및 감별율이 저하될 수 있는 문제점이 있었다. 따라서 Anisakis 유충의 특이적 DNA를 증폭하여 검사하는 PCR 검사결과가 신뢰도 측면에서는 더 높다고 할 수 있다.

Table 2. Comparison of detection of *Anisakis* spp. by macroscopic inspection and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

Species	Macroscopic obsevation	PCR-RFLP
Trichiurus lepturus	16/18 (89.0%)	14/18 (77.7%)
Scomber japonicus	10/11 (90.9%)	9/11 (81.8%)
Todarodes pacificus	21/65 (32.3%)	17/65 (26.1%)

고래 회충에 대한 육안검사법과 중합효소연쇄반응 검사법의 검출률 차이는 다음과 같은 이유로 설명될 수 있을 것이다. Im 등은 의하면 고래 회충(*Anisakis simplex*)뿐만 아니라 고래회충과(Family Anisakidae)에 속하는 *Anisakis* type II., *Contracaecum* type A, *Pseudoterranova decipiens* (물개회충) 등이 국내에서 발생하는 고래회충유충증의 원인체이며, 광어, 우럭, 도미, 우럭, 고등어 등과 같은 해산어류에서 검출되는 유충의 종류도 다양하다고 보고한 바 있다[1]. Szostakowska등도 발트해 연안에서 포획된 어류를 대상으로 한 PCR 검사에서 *A. simplex*, *Hysterothylacium auctum*, *Contracaecum osculatum*, *C. rudolphi* 등과 같이 고래 회충과 유사한 선충의 존재를 보고하였다[14].

Szostakowska 등의 연구에서 사용된 Nemspec18SF와 NC2 primer는 Anisakid 속에 속하는 선충의 18S ribosomal DNA를 일반적으로 증폭하므로 특이성이 떨어지는 제한점이 있었다. 그러나 본 연구에서 사용된 중합효소연쇄반응은 고래회충과에 속하는 다른 유충들과는 반응하지 않기 때문에 음성반응을 보인 것으로 추정할 수 있었다. 따라서 중합효소연쇄반응에서 고래 회충 유충이 아닌 것으로 판명된 개체의 경우 어류에서 자주 검출되는 *Pseudoterranove decipiens, Anisakis physeteris* (향유고래회충) 등과 같은 종의 기생충으로 추정되며 이에 대한 추가적인 연구조사가 필요하다고 생각된다.

감사의 말씀 (Acknowledgement)

본 연구는 2007학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

요약 및 정리

본 연구에서는 일상생활에서 쉽게 접할 수 있는 해산어류 3종(갈치, 고등어, 오징어)에서 발견되는 고래 회충의 유충을 육안검사법으로 조사하고, 중합효소연쇄반응-제한효소절편길이다형성 검사법과의 검출률을 비교조사하였다. 오징어의 경우 32.3%의 감염률을 보였으며, 갈치와 고등어는 각각 88.9%와 90.9%로 높은 감염률을 보였다. 중합효소연쇄반응을 이용한 고래 회충의 유전자 검출에서는 분리된 유충의 85%가 고래 회충으로 확인되었으며, 총 검사대상 어류를 기준으로 43%가 고래 회충에 감염된 것으로 판명되었다. 또한 *Hin*fI과 *Hha*I을 이용한 중합효소연쇄반응-제한효소절편길이다형성 분석 결과에 따르면 고래 회충 중에서 *Anisakis pegreffii* 인 것으로 확인할 수 있었다. 결과적으로 해산 어류 또는 고래회충유충증의 검출시 육안검사법과 더불어 분자생물학적 검출법을 활용하면 그 특이도와 민감도를 높일 수 있는 것으로 조사되었다.

참고문헌

1. Im, K. I., Shin, H. J., Kim, B. H., Moon, S. I.: Gastric anisakiasis cases in cheju-do, Korea. *Korean J. Parasitol*. **33**, 179-186 (1995).
2. Van Thiel, P. H., Kuipers, F. C., Raskam, R. T.: A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndroms in man. *Trophic Geographic Medicine*, **2**, 97-113, (1960).
3. Yokogawa, M., Yoshimura, H.: Clinicopathologic studies on larval anisakiasis in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **16**, 723-728 (1967).
4. Kim, C. H., Chung, B. S., Moon, Y. I., Chun, S. H. : A case report on human infection with Anisakis sp. in Korea. *Korean J. Parasitol*., **9**, 39 (1971).
5. Cho, S. Y., Chi, J. G., Kim, I. S.: A case human anisakiasis in Korea. *Seoul J Med.* **21**, 203-208 (1980).
6. Lee, A. H., Kim, S. K., Choi, K. Y.: A case of human infection with the larva of Terranova type A. *Korean J. Parasitol*. **19**, 463-467 (1985).
7. Sohn, W. M., Seoul, S. Y.: A human case of gastric anisakiasis by Pseudoterranova decipiens larva. *Korean J. Parasitol*. **32**, 53-56 (1994).
8. D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Brandonisio, O., Lucarelli, G., Doronzo, F., Paggi, L. Diagnosis of a case of gastric anisakidosis by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Parassitologia*, **41**, 591-593 (1999).
9. Zhu, X., Gasser, R. B., Podolska, M, Chilton, N. B. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol*. **28**. 1911-1921 (1998).
10. Woo, H. C., Kim, J. A.: The Infection Status and Identification of Anisakid Larvae in Marine Fish Caught from the sea Near Cheju Island, *Kor. J. Vet. Publ. Hlth* **24**, 690-696 (2000).
11. Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitology Int*. **56**, 211-215 (2007).
12. Umehara, A., Kwakami, Y., Matsui, T., Araki, J., Uchida, A. Molecular identification of Anisakis simplex sensu stricto and Anisakis pegreffii (nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitology Int*. **55**, 267-271 (2006).
13. Sakanari, J. A., McKerrow, J. H. Anisakiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**, 278-284 (1989)
14. Szostakowska, B., Myjak, P., Kur, J. Identification of aniskid nematodes from the Southern Baltic Sea using PCR-based methods. *Mol. Cell. Probes*. **16**, 111-118 (2002).