

시험관내에서 이버멕틴, 도라멕틴, 에타놀에 대한 아니사키스 유충의 운동성 억제효과

전재형 · 지차호*

충북대학교 수의과대학 및 동물의학연구소
(게재승인: 5월 22일)

Larval migration inhibition activity of ivermectin, doramectin and ethanol against *Anisakis simplex in vitro*

Jae-Hyung Jeon, Cha-Ho Jee*

College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

(Accepted: May 22, 2007)

Abstract : This experiment has been investigated in order to examine larval migration inhibition activity of ivermectin, doramectin and ethanol against *Anisakis simplex* (*A. simplex*) *in vitro*. *A. simplex* larvae were obtained from the mackerel acquired from the fish market of Cheongju. They were divided into many groups and placed in culture dishes (40 larvae each) containing RPMI-1640, in the absence or presence of different concentrations of ivermectin, doramectin and ethanol. Ivermectin had a complete inhibition of larval migration at 72 h in all groups (10-300 µg/ml). Ethanol reduced the migration of the larvae, its maximum activity being at high doses (7.5%, 10% ethanol) when it was 100% efficacy at 4 h. Doramectin had no efficacy *in vitro*. Being needed that further studies with ivermectin and doramectin, it is recommended that *in vivo* test with laboratory animals should be carried.

Key words : *Anisakis simplex*, doramectin, ethanol, ivermectin, larval migration inhibition (LMI)

서 론

고래회충과(Family Anisakidae)는 고래, 돌고래, 물개 등의 해산 포유동물을 종숙주로 하고 고등어, 명태, 대구, 붕장어, 광어 등과 같은 해산어류나 오징어 등의 두족류를 제2중간 숙주로 하는 선충류이다. 고래회충 유충은 형태에 따라 *Anisakis* I, II 형, *Contracaecum* A, B, C, D형, *Raphidascaris*형 그리고 *Pseudoterranova* A, B 형으로 분류된다 [21].

아니사키스증(Anisakiasis)은 아니사키스 3기 유충에 의해 감염된 해산어류나 두족류를 생식 할 때나 설 익혀 먹을시 인체 감염으로 이어진다. 인체로 들어온 유충

은 성충까지 성장될 수는 없고 유충상태로 위나 장점막을 뚫어 복부에 통증을 일으킨다. 위장에서 호산구성 육아종을 형성하고 오심, 구토를 나타내기도 하며, 위궤양, 위암 등으로 진전될 수 있다. 또, 죽은 충체나 충체의 대사산물이 알레르기 반응을 일으키기도 한다 [28].

고래회충 유충(*Anisakis* larvae)에 의한 인체감염은 1960년 Van Thiel 등 [30]에 의해 네델란드에서 처음 보고된 이후, 스페인 [23], 아이슬란드 [27], 러시아 [4], 이탈리아 [25], 일본 등 [13] 세계 각지에서 보고되고 있다. 특히 일본에서 아니사키스증의 보고가 많은데, 이는 일본인의 생식습관과 관련이 있을 것으로 생각되며, 전 세계적으로 일식문화의 보급이 늘면서 바닷물고기의 생

이 논문은 2006년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었음.

*Corresponding author: Cha-Ho Jee

College of Veterinary Medicine and Research Institute of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
[Tel: +82-43-261-2985, Fax: +82-43-267-3150, E-mail: chjee@cbnu.ac.kr]

식으로 아니사키스 인체 발병률이 더욱 증가 할 것으로 예상된다. 국내에서는 1971년 김 등 [20]의 보고 이후 240례가 보고되었으나 실제 감염은 더 많을 것으로 추정된다 [3, 8, 15, 17].

Ivermectin은 1979년 Burg 등 [5]에 의해 토양세균인 *Streptomyces avermitilis*의 발효 산물로 추출된 avermetin B1의 합성유도체이다. 개, 고양이, 말, 소, 양 및 돼지에 기생하는 내, 외부 기생충에 대해 효과적으로 사용되고 있으며, 구충기전은 선충류와 절족동물의 신경계통에 작용하여 억제성 신경전달물질인 GABA의 분비를 촉진시켜 신경전달을 방해하여 충체를 마비, 사멸시킨다고 한다 [1, 2, 7]. Doramectin은 ivermectin과 같은 기전으로 작용하며, 내, 외부 기생충 구제에 쓰이는 종합 구충제로써 위, 장관내의 기생충감염에 효과가 있다고 한다 [26]. Ethanol은 1가 알코올로서 세포막을 변형시키든지, 세포내 단백질을 응고시킴에 의해 살균효과를 나타낸다. 선충류인 *Caenorhabditis elegans*을 사멸시키는 효과가 있다고 한다 [29]. 우리나라의 식생활 습관으로 회를 먹을 때 소주나 기타 알코올성 음료를 곁들여 먹는 경우가 많아 ethanol을 사용하여 아니사키스 유충에 대한 효과를 알아보고자 하였다.

유충 운동성 억제 실험(larval migration inhibition bioassays)은 구충제의 효과를 평가하기 위해 고안된 방법 [9, 11, 31] 으로서 양에서 위장관내에 감염된 항기생충제의 효과를 알아보기 위해서도 사용되었다 [10, 19]. 본 실험은 아니사키스 3기 유충에 대한 ivermectin, doramectin, ethanol의 약효를 알아보기 위해 시험관내에서 유충 운동성 억제 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

청주시 수산시장에서 구입한 고등어의 내장을 분리하여 소화액(증류수 1l, 펩신 20g, Hcl 14ml)을 첨가하여 37°C에 12시간 반응시킨 후 핀셋을 사용하여 아니사키스 L₃를 분리하였다. 채취한 아니사키스 유충은 생리식염수로 2~3번 세척하였다. 선충류의 유충을 실험에 사용할 때 차아염소산 나트륨용액(sodium hypochlorite)을 사용하기도 하지만 아니사키스 유충은 생리식염수로 세척하면 탈초(exsheathment)하게 된다. 실험 시작 전에는 증류수로 세척하였다. 배지로는 RPMI 1640(GIBCO BRL, USA)을 사용하였다 [14].

약물로는 ivermectin(300, 200, 100, 50, 20, 10 µg/ml)을 희석하여 사용하였고 doramectin을 같은 농도로 희석하여 사용하였다. 에타놀은 99.9%의 ethyl alcohol을 증류수로 희석하여 사용하였다. 유충의 운동성을 평가하

기 위하여 스테인레스 철판(1 mm × 1 mm per well)을 실험에 사용하였다.

실험 방법

1) Ivermectin, doramectin 에 의한 아니사키스 L₃의 운동성 억제 효과

고등어 내장에서 아니사키스 3기 유충을 분리하여 사용하였다. 한 군당 아니사키스 L₃ 40마리씩 RPMI 1640(GIBCO BRL, USA) 배지 40ml가 들어있는 페트리디쉬에 넣었다. 대조군에는 약물을 첨가하지 않았고, 다른 군에는 ivermectin(300, 200, 100, 50, 20, 10 µg/ml)을 농도별로 첨가하여 실험하였다. 배양기의 온도를 37°C로 유지하고 95% O₂와 5% CO₂의 상태로 내부공기를 조성하였다. 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72시간 후 철판이 장착된 용기에 부어 2시간 후에 통과한 마리수를 관찰하였다.

Doramectin도 ivermectin과 같은 농도와 방법으로 실험하였다.

2) Ethanol에 의한 아니사키스 L₃의 운동성 억제 효과
대조군과 99.9%의 ethyl alcohol을 희석하여 1%, 1.5%, 2.5%, 3.5%, 5%, 7.5%, 10%로 만들어 사용하였다. 0, 4, 8, 12, 24, 72, 120시간 후 위와 같은 방법으로 2시간 후에 철판을 통과한 마리수를 관찰하였다.

결과의 판정

철판을 통과한 유충의 마리수와 철판에 남아있는 유충 수를 계산하였다. 이것을 대조군과 비교해 봄으로써 약물의 효과를 평가하였다. 유충의 운동성 억제 실험(larval migration inhibition: LMI)은 다음 공식을 적용하여 구할 수 있다.

$LMI(\%) = 100 \times (A - B) / A$, A = RPMI 1640 배지에 약물을 첨가하지 않은 대조군에서 철판을 통과한 마리수, B = RPMI 1640 배지에 약물을 첨가 했을 때 철판을 통과한 마리수

결 과

Ivermectin, doramectin의 유충운동성 억제효과

Ivermectin을 첨가 후 즉시 관찰하였을 때는 10, 20, 50, 100, 200, 300 µg/ml 모두 유충운동성 억제율이 0%로 나타났다. 4시간 후 10 µg/ml에서 7.5%, 20 µg/ml에서 12.5%, 50 µg/ml에서 10%의 유충운동성 억제율을 보였으며 모든 군에서 유충운동성 억제효과가 나타났다(Fig. 1). 8시간 후 100 µg/ml에서 50%, 200 µg/ml에서 55%, 300 µg/ml에서 57.5%의 유충운동성 억제율을 나타내었다. 24시간 후 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml,

Table 1. Larval migration inhibition (LMI) activity of ivermectin ($\mu\text{g/ml}$) on third stage of *Anisakis simplex* larvae cultured in RPMI-1640

Ivermectin ($\mu\text{g/ml}$)	Time (h)						
	0	4	8	12	24	48	72
10	0(0/40)*	7.5(3/40)	12.5(5/40)	12.5(5/40)	37.5(15/40)	70(28/40)	100(40/40)
20	0(0/40)	12.5(5/40)	17.5(7/40)	27.5(11/40)	52.5(21/40)	80(32/40)	100(40/40)
50	0(0/40)	10(4/40)	40(16/40)	60(24/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)
100	0(0/40)	17.5(7/40)	50(20/40)	70(28/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)
200	0(0/40)	17.5(7/40)	55(22/40)	77.5(31/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)
300	0(0/40)	17.5(7/40)	57.5(23/40)	85(34/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)

Percentage LMI = $100 \times (A - B)/A$, in which A = the number of larvae which migrated through the mesh in the negative control wells, and B = the number of larvae which migrated through the mesh in the test wells (ivermectin).

*($N_r / N_m + N_r$): N_m = number of larvae migrating through mesh, N_r = number of larvae retained through mesh.

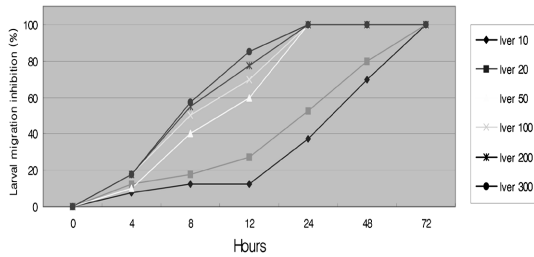


Fig. 1. Larval migration inhibition activity of ivermectin ($\mu\text{g/ml}$) on third stage of *Anisakis simplex* larvae cultured in RPMI-1640.

300 $\mu\text{g/ml}$ 에서 100%의 유충운동성 억제효과를 나타내었다. 그리고 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 37.5%, 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 52.5%의 유충운동성 억제효과를 나타내었다. 72시간 후에는 ivermectin을 첨가한 모든 군에서 100%의 유충운동성 억제효과를 나타내었다(Table 1).

Doramectin을 첨가한 군에서는 유충운동성 억제효과가 ivermectin 첨가군보다 미약하게 나타났다(Table 2).

Table 2. Larval migration inhibition (LMI) activity of doramectin ($\mu\text{g/ml}$) on third stage of *Anisakis simplex* larvae cultured in RPMI-1640

Doramectin ($\mu\text{g/ml}$)	Time (h)							
	0	4	8	12	24	48	72	96
10	0(0/40)*	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	2.6(3/40)	2.6(3/40)
20	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	2.6(3/40)	5.3(4/40)
50	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	2.6(3/40)	2.6(3/40)
100	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	5.3(4/40)	5.3(4/40)
200	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	5.3(4/40)	7.9(5/40)
300	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)	5.3(4/40)	7.9(5/40)

Percentage LMI = $100 \times (A - B)/A$, in which A = the number of larvae which migrated through the mesh in the negative control wells, and B = the number of larvae which migrated through the mesh in the test wells (doramectin).

*($N_r / N_m + N_r$): N_m = number of larvae migrating through mesh, N_r = number of larvae retained through mesh.

Ethanol의 유충운동성 억제효과

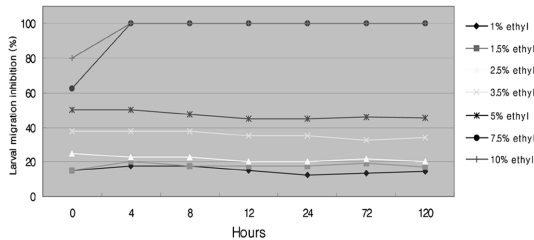
아니사키스 유충을 ethanol(1%, 1.5%, 2.5%, 3.5%, 5%, 7.5%, 10%) 군에서는 반응 후 즉시 관찰하였을 때 유충운동성 억제효과를 나타내었다(Table 3). 1% ethanol에서 15%의 억제효과를 1.5%, 2.5%, 3.5% ethanol에서 각각 15%, 25%, 37.5%의 유충운동성 억제효과를 나타내었다. 그리고 5%, 7.5%, 10% ethanol에서 50%, 62.5%, 80%의 유충운동성 억제효과를 나타내어 아니사키스 유충의 반수 이상에서 운동성이 억제된 것을 확인할 수 있었다. 4시간 후 5% ethanol에서 50%의 억제효과를 7.5%, 10% ethanol에서 100%의 유충운동성 억제 효과를 보였다. 72시간 후에는 1% ethanol에서 13.5%, 1.5% ethanol에서 18.9%, 2.5% ethanol에서 21.6%, 3.5% ethanol에서 32.4%의 유충운동성 억제효과를 나타내었다. 그리고 120시간 후 시험에서도 1%, 1.5%, 2.5%, 3.5%, 5% ethanol군에서는 유충운동성 억제율은 50%이하로 나타났다(Fig. 2).

Table 3. Larval migration inhibition (LMI) activity of ethanol on third stage of *Anisakis simplex* larvae cultured in RPMI-1640

Ethanol (%)	Time (h)						
	0	4	8	12	24	72	120
1	15(6/40)*	17.5(7/40)	17.5(7/40)	15(6/40)	12.5(5/40)	13.5(8/40)	14.3(10/40)
1.5	15(6/40)	20(8/40)	17.5(7/40)	17.5(7/40)	17.5(7/40)	18.9(10/40)	17.1(11/40)
2.5	25(10/40)	22.5(9/40)	22.5(9/40)	20(8/40)	20(8/40)	21.6(11/40)	20(12/40)
3.5	37.5(15/40)	37.5(15/40)	37.5(15/40)	35(14/40)	35(14/40)	32.4(15/40)	34.3(17/40)
5	50(20/40)	50(20/40)	47.5(19/40)	45(18/40)	45(18/40)	45.9(20/40)	45.7(21/40)
7.5	62.5(25/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)
10	80(32/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)	100(40/40)

Percentage LMI = $100 \times (A - B)/A$, in which A = the number of larvae which migrated through the mesh in the negative control wells, and B = the number of larvae which migrated through the mesh in the test wells (ethyl alcohol).

*($N_r / N_m + N_r$): N_m = number of larvae migrating through mesh, N_r = number of larvae retained through mesh.

**Fig. 2.** Larval migration inhibition activity of ethanol on third stage of *Anisakis simplex* larvae cultured in RPMI-1640.

고 찰

인체에 감염된 아니사키스증은 급성의 통증을 일으킬 경우 외과적으로 수술하는 방법이 주로 이용되었었다 [24]. 그러나 아니사키스 유충이 장내에 있는 상태에서 조기에 진단이 이루어질 경우, 구충제가 증상완화에 큰 효과를 발휘할 수 있을 것이다. 그래서 아니사키스 유충에 대한 구충효과를 알아보기 위하여 ivermectin, doramectin, ethanol을 사용하여 시험관내에서 실험을 실시하였다. ivermectin을 투여한 군의 경우 72시간이 지난 후 모든 군에서 아니사키스 유충의 운동성이 억제된 것으로 나타났다(Fig. 1).

그러나, Dziekonska-Rynko 등 [12]에 의한 시험에서는 ivermectin과 48시간 반응 후에 아니사키스 유충이 모두 사멸하였다고 한다. 본 시험에서는 ivermectin 50 µg/ml 이상을 투여한 군에서는 24시간 후에 아니사키스 유충의 운동성이 모두 억제되었다.

Ethanol이 첨가된 군에서는 7.5% 이상의 ethanol에서만 100% 유충 운동성 억제효과를 나타내었다(Fig. 2). 5% 이하의 ethanol에서는 120시간이 지난 후에도 50%

이하의 유충 운동성 억제 효과를 나타내었다. 이것은 ethanol이 휘발성이 강해서 지속적인 효과를 나타내지 못한 것으로 사료된다. 또, Kriger 등 [22]에 의한 선충류를 이용한 시험에서 *Panagrellus redivivus*는 ethanol에 노출되었을 때 운동성이 일시적으로 줄어들었다가 다시 증가하는 양상을 나타내는 것을 관찰했었다. 그리고 이것은 *Panagrellus redivivus*가 ethanol에 노출되었을 때 ADH의 합성량을 증가시켜 알코올 저항성을 갖게 된 것으로 보고한 바 있다. Cain 등 [6]에 의한 시험에서 아니사키스 유충이 alcohol dehydrogenase를 생산한다고 알려져 있어 본 시험에서도 5% 이하의 ethanol에서는 아니사키스가 ADH의 합성량을 늘려 알코올에 저항성을 가지게 된 것으로 보인다.

Doramectin을 투여한 시험에서는 이 약물은 피하주사는 물론 근육주사도 가능할 수 있게 제조되어 약물이 혈중에 오래 남아있게 하여 약효를 장시간 지속시킬 목적으로 만들어졌다. 근육부종을 줄이기 위하여 유성부형제로 구성되어 있기에 배지와 유성이 혼합되어 시험관내 실험에서는 아니사키스 유충의 운동성을 억제시키는 효과가 낮은 것으로 추정된다. 그러나 doramectin은 ivermectin과 같은 구충기전으로 구충효과를 나타내는 특성이 있고, 아니사키스는 내부 장기 어디라도 이동이 가능하므로 시험관내 효과가 아닌 생체내 효능(*in vivo*)에서는 효과가 있을 것으로 기대되며 추후에 시험해야 할 필요성이 대두된다.

현재까지 아니사키스증의 치료에 albendazole을 하루에 두 번씩 3일간 사용하여 장관내의 아니사키스를 효과적으로 치료한 사례가 있고 [16], thiabendazole도 아니사키스증 치료에 효과가 있는 약물로 추천되고 있는 실정이다 [18].

시험관내 실험에서 ethanol은 아니사키스 유충의 움직

임을 억제할 수 있고 ethanol 7.5%(v/v)이상에서는 수 시간만에 완전히 사멸시키는 것으로 나타났다. ivermectin도 아니사키스 유충의 운동성을 억제하는 효과를 나타내었다. doramectin은 시험관내 시험에서 효과를 나타내지는 못했지만, 생체내 실험에서는 효과가 있을 것으로 기대된다. Doramectin과 ivermectin의 생체내(*in vivo*) 추가실험의 필요성이 대두되므로 실험동물(mice, rats)을 대상으로 실험을 해보아야 할 것이다.

결 론

Ivermectin, doramectin, ethanol을 사용하여 아니사키스 유충에 운동성 억제효과가 있는지를 알아보려고 시험관내에서 실험을 실시하였다. 청주 수산시장에서 고등어의 내장에서 아니사키스 유충을 분리하여 ivermectin, doramectin, ethanol을 희석하여 농도에 따라 한 시험군당 40마리의 아니사키스 유충을 사용하였으며, RPMI-1640을 배지로 사용하였다. 시험물질의 효능평가 방법으로는 유충의 운동성 억제(larval migration inhibition) 효과를 이용하였다. ivermectin이 첨가된 배지의 경우 24시간 후 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml에서 100%의 유충운동성 억제효과가 있었다. 72시간 후에는 모든 농도군 배지에서 아니사키스는 움직임이 멈추었다. ethanol도 아니사키스 유충의 운동성을 억제시키는 효과를 보였는데 7.5%, 10% ethanol군에서는 4시간 후 모든 아니사키스 유충이 움직임을 멈추었다. Doramectin은 양성부형제로 구성되어 있어 시험관내 실험에서는 효과를 나타내지 못했다. Doramectin과 ivermectin을 사용하여 실험동물을 대상으로 생체내(*in vivo*) 실험을 해보아야 할 필요성이 대두된다.

참고문헌

1. 대한수의사회. Avermectin류 내외부 구충제에 대한 최신연구동향. 대한수의사회지 1994, **30**, 365-376.
2. 류관동, 최진규, 이문한. Ivermectin의 임상약리학. 대한수의사회지 1994, **30**, 588-591.
3. 전계식. 위 아니사키스 증에 관한 문헌적 고찰. 자연과학연구소논문지 2000, **5**, 33-37.
4. Besprozvannykh VV, Ermolenko AV, Kamnev VD. Peter-the-Great Gulf fishes are a source of human invasion of the nematode *Anisakis simplex* (the family Anisakidae). Med Parazitol(Mosk) 2004, **3**, 21-24.
5. Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong YL, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Omura S. Avermectin, a new family of

- potent anthelmintic agents: Producing organism and fermentation. Antimicrob Agents Chemother 1979, **15**, 361-367.
6. Cain GD, Raj RK. *Anisakis*, *Phocanema*, *Contracaecum*, and *Sulcascaris* spp.: electrophoresis and thermostability of alcohol and malate dehydrogenases from larvae. Exp Parasitol 1980, **49**, 56-67.
7. Campbell WC, Fisher MH, Stapley EO, Albers-Schonberg G, Jacob TA. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. Science 1983, **221**, 823-828.
8. Cho SY, Chi JG, Kim IS. A case of human anisakiasis in Korea. Seoul J Med 1980, **21**, 203-208.
9. d'Assonville JA, Janovsky E, Verster A. *In vitro* screening of *Haemonchus contortus* third stage larvae for ivermectin resistance. Vet Parasitol 1996, **61**, 73-80.
10. Douch PGC, Harrison GBL, Buchanan LL, Greer KS. *In vitro* bioassay of sheep gastrointestinal mucus for nematode paralyzing activity mediated by substances with some properties characteristic of SRS-A. Int J Parasitol 1983, **13**, 207-212.
11. Douch PGC, Morum PE. The effects of anthelmintics on ovine larval nematode parasite migration *in vitro*. Int J Parasitol 1994, **24**, 321-326.
12. Dziekonska-Rynko J, Rokicki J, Jablonowski Z. Effects of ivermectin and albendazole against *Anisakis simplex in vitro* and guinea pigs. J Parasitol 2002, **88**, 395-398.
13. Fujino T, Ooiwa T, Ishii Y. Clinical, epidemiological and morphological studies on 150 cases of acute gastric anisakiasis in Fukuoda Prefecture. Jpn J Parasitol 1984, **33**, 73-92.
14. Iglesias L, Valero A, Benitez R, Adroher FJ. *In vitro* cultivation of *Anisakis simplex*: pepsin increases survival and moulting from fourth larval to adult stage. Parasitology 2001, **123**, 285-291.
15. Im KI, Yong TS, Shin HJ, Kim BH, Moon SI. Gastric anisakiasis in Korea-with review of 47 cases. Yonsei Rep Trop Med 1990, **21**, 1-7.
16. Ioli A, Leonaldi R, Gangemi C, Lo Giudice L, Bottari M, Petithory JC. Apropos of 1 case of anisakiasis contracted in Sicily. Bull Soc Pathol Exot 1998, **91**, 232-234.
17. Jin SJ, Suk DS. A case of human gastric anisakiasis in Korea. Inje Med J 1984, **5**, 359-367.
18. Jira J. Medical Helminthologie. p. 491, Galen, Prague, 1998.
19. Jones WO, Emery DL, McClure SJ, Wagland BM.

- Changes in inflammatory mediators and larval inhibitory activity in intestinal contents and mucus during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 1994, **24**, 519-525.
20. **Kim CH, Chung BS, Moon YI, Chun SH.** A case report on human infection with *Anisakis* sp. in Korea. *Kisaengchunghak Chapchi* 1971, **9**, 39-43.
 21. **Koyama T, Kobayashi A, Kumada M, Komiya Y, Oshima T, Kagei N, Ishii T, Machida M.** Morphological and taxonomical studies on Anisakidae larvae found in marine fishes and squids. *Jpn J Parasitol* 1969, **18**, 466-487.
 22. **Kruger F, Burke D, Samoiloff MR.** Induction of the alcohol-metabolizing pathway in the nematode *Panagrellus redivivus*: phenotypic effects. *Biochem Genet* 1977, **15**, 1181-1191.
 23. **López-Serrano MC, Gomez AA, Daschner A, Moreno-Ancillo A, de Parga JMS, Caballero MT, Barranco P, Cabaas R.** Gastroallergic anisakiasis: findings in 22 patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2000, **15**, 503-506.
 24. **Oshima T.** *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent areas. In: Morishita K, Komiya Y, Matsubayashi H (eds.). *Progress of Medical Parasitology* in Japan. pp. 301-393, Meguro Parasitological Museum, Tokyo, 1972.
 25. **Pampiglione S, Rivasi F, Criscuolo M, De Benedittis A, Gentile A, Russo S, Testini M, Villan M.** Human anisakiasis in Italy: a report of eleven new cases. *Pathol Res Pract* 2002, **198**, 429-434.
 26. **Papich MG.** *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*. p. 180, Saunders, North Carolina, 2002.
 27. **Skirnisson K.** *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) larvae reported from humans in Iceland after consumption of insufficiently cooked fish. *Laeknabladid* 2006, **92**, 21-25.
 28. **Smith JW, Wootten R.** *Anisakis* and anisakiasis. *Adv Parasitol* 1978, **16**, 93-163.
 29. **Thompson G, de Pomerai DI.** Toxicity of short-chain alcohols to the nematode *Caenorhabditis elegans*: a comparison of endpoints. *J Biochem Mol Toxicol* 2005, **19**, 87-95.
 30. **van Thiel P, Kuipers FC, Roskam RT.** A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop Geogr Med* 1960, **12**, 97-113.
 31. **Wagland BM, Jones WO, Hribar L, Bendixsen T, Emery DL.** A new simplified assay for larval migration inhibition. *Int J Parasitol* 1992, **22**, 1183-1185.