



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ANISAKIDAE E RAPHIDASCARIDIDAE: PESQUISA, IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E
MOLECULAR EM CARAPAU (*Trachurus trachurus*) CAPTURADO EM ÁGUAS
PORTUGUESAS

PATRÍCIA PEREIRA LOPES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutora Isabel Maria Soares
Pereira da Fonseca de Sampaio

Doutor Fernando Ribeiro Alves
Afonso

Dra. Maria João Faísca Gargaté
Lopes da Costa

ORIENTADOR

Dra. Maria João Faísca Gargaté
Lopes da Costa

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de
Carvalho

2018

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ANISAKIDAE E RAPHIDASCARIDIDAE: PESQUISA, IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E
MOLECULAR EM CARAPAU (*Trachurus trachurus*) CAPTURADO EM ÁGUAS
PORTUGUESAS

PATRÍCIA PEREIRA LOPES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutora Isabel Maria Soares
Pereira da Fonseca de Sampaio

Doutor Fernando Ribeiro Alves
Afonso

Dra. Maria João Faísca Gargaté
Lopes da Costa

ORIENTADOR

Dra. Maria João Faísca Gargaté
Lopes da Costa

CO-ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de
Carvalho

2018

LISBOA

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria João Gargaté, a minha orientadora, que foi incansável e que, em conjunto com o Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, fizeram um grande esforço para que a realização do meu estágio no INSA fosse uma realidade. Gostaria de agradecer ainda à Dra. Maria João Gargaté pela confiança que sempre depositou em mim, pela sua boa disposição, flexibilidade e pensamento positivo que contagiava todos à sua volta. Recordo também o apoio e motivação constantes durante o estágio, assim como agradeço pela revisão e críticas construtivas relativamente ao presente trabalho.

À restante equipa do LNR de Infecções Parasitárias e Fúngicas do INSA, nomeadamente à Dra. Anabela Vilares, Dra. Tânia Reis, Dra. Susana Martins, Dra. Idalina Ferreira e Assunção António, que prescindiram de algum do seu precioso tempo para me apoiar sempre com muita amabilidade e paciência. São sem dúvida uma excelente equipa de profissionais com quem tive o privilégio de estagiar e que vou recordar para sempre com muito carinho. Gostaria ainda de deixar uma palavra de apreço à Dra. Emma López, Dra. Cláudia Júlio, Dr. Pedro Pechirra, Dra. Patrícia Conde e Dra. Mariana Neto.

Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, o meu co-orientador, pelos conselhos e palavras amigas, esclarecimentos e revisão do presente trabalho. Agradeço profundamente pela sua total entrega na defesa dos interesses dos alunos e pelo seu empenho em nos ajudar a fazer o melhor trabalho possível, com a máxima exigência e rigor. Não posso de igual forma esquecer a forma com que se debateu para que este projeto fosse concretizável. É indubitavelmente um modelo de integridade para mim e a humildade com que partilha os seus conhecimentos e experiência com os alunos alimenta a nossa motivação em aprender.

Agradeço ao presidente e coordenador do DDI do INSA, nomeadamente, Dr. Fernando de Almeida e Doutor Jorge Machado, assim como ao Prof. Doutor Luís Tavares, que na qualidade de presidente da FMV-UL, autorizaram a realização do meu estágio no INSA.

À Docapesca, em especial ao Sr. José Paulino, chefe de exploração da lota de Peniche e aos pescadores pela generosidade em ceder a amostra para este estudo e pela receptividade com que me recebiam em cada visita. Agradeço ainda ao Sr. José Paulino pela boa vontade e interesse que sempre manifestou em me ajudar, simpatia e tempo dispensado durante a colheita da amostra.

Durante a minha curta passagem pelo Laboratório de Parasitologia da FMV-UL, quero agradecer aos meus colegas de laboratório, Antonio Salinero, Ana Figueiredo, Francisco Evangelista, Isabel Torres, Nunzio Sarnino e Rita Reis, pela agradável e animada companhia que proporcionaram. Agradeço também à Vitória Daniel pelo apoio que me deu escutando os meus anseios durante a escrita desta dissertação.

Ao Dr. Tiago Gomes, pelos prontos e preciosos esclarecimentos, fundamentais para o início deste trabalho de investigação.

Aos meus colegas de curso, em particular os colegas da turma D e, durante o último ano, os colegas da turma A, que me acompanharam nesta caminhada. De uma forma especial, gostaria de agradecer à Ana Cristina Vítor, Raquel Santos, Sónia Sebastião, Ana Rita Silva Santos, Fábio Santos, Marco Saavedra, Catarina Montalvão, Joana Luís, Ana Catarina Sozinho e Inês Santos. Tenho a felicidade de poder dizer que para além de colegas, são grandes amigos que fiz durante o curso, com quem pude partilhar vários momentos e que sem a sua companhia não teria sido a mesma coisa. São excelentes pessoas e não tenho dúvida que também serão excelentes profissionais!

À minha madrinha de curso Cristina Estevens, pela amizade, aconselhamento e apontamentos facultados, que contribuíram para o meu sucesso a nível académico.

A todos os professores e funcionários da FMV-UL com quem tive o privilégio de aprender e de me cruzar durante o meu percurso académico por esta faculdade.

À minha mãe, Maria Elvira Pereira de Matos Louro Lopes, cujos valores e exemplo de vida são uma inspiração para mim e me transformaram no que eu sou. Em todos os momentos difíceis sempre se soube levantar e nunca baixou os braços. O seu amor incondicional e a força que me deu e à minha irmã, mesmo quando lhe faltavam forças, é impossível de ser traduzido em palavras.

À minha irmã gémea, Sílvia Pereira Lopes, por todo o apoio que sempre me deu ao longo da nossa vida. Mesmo seguindo percursos académicos muito distintos, nunca me deixou de ajudar no que podia e sem o seu apoio não estaria neste momento a escrever esta dissertação e não teria sido possível sequer fazer este curso. Sou uma sortuda e estou extremamente grata por ter como irmã e como companheira de batalhas.

A toda a minha restante família, em particular a minha avó Maria Emília Matos Pereira e primos: Catarina Vital Lopes, André Filipe Louro de Matos e Alexandra Sofia Louro de Matos, muito obrigada por todo o carinho que me dão!

Aos meus entes queridos que já não se encontram entre nós, nomeadamente ao meu pai António Manuel Tavares Lopes, avô José Maria de Matos Louro, avô Manuel Lopes e tio Paulo Augusto Tavares Lopes. Apesar de para alguns a passagem aqui na terra ter sido muito curta, a vossa capacidade de sorrir para os outros e generosidade serão para sempre lembradas por muita gente e é a certeza do amor que sentiam por mim que me ajuda a levantar e a caminhar todos os dias.

Resumo

Anisakidae e Raphidascarididae: pesquisa, identificação morfológica e molecular em carapau (*Trachurus trachurus*) capturado em águas portuguesas

As larvas de terceiro estágio (L3) das famílias Anisakidae e Raphidascarididae são parasitas com potencial zoonótico que são encontrados com muita frequência nas vísceras e musculatura de vários peixes. Como tal, é crucial o conhecimento sobre a prevalência e a distribuição destes parasitas nos peixes com importância comercial, assim como efetuar uma identificação precisa das espécies de anisquídeos presentes, pois cada espécie tem um diferente grau de patogenicidade para a saúde humana e animal. Existem já vários estudos publicados em revistas com revisão por pares onde é realizada a identificação genética de vários anisquídeos encontrados em peixes capturados em águas portuguesas. Contudo, que seja do conhecimento dos autores do presente trabalho, este é o primeiro estudo nacional que correlaciona morfometria com análise molecular subsequente das mesmas L3 de *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii*. Uma vez que estas duas espécies são as mais frequentemente associadas a casos humanos de doença e, embora a identificação com recurso a técnicas moleculares seja o ideal, nem sempre é possível executar esse tipo de técnicas, motivo pelo qual neste trabalho se conjuga as duas técnicas de forma a contribuir para que a distinção com base em características morfológicas seja mais fácil. No presente estudo, 116 carapaus (*Trachurus trachurus*) capturados em águas portuguesas foram analisados quanto à presença de L3 de anisquídeos, tendo sido colhidas no total 3148 larvas. Dentro desse total de L3 obtidas, apenas 30% foram colhidas durante a inspeção visual dos peixes, o que demonstra que esse método é pouco eficaz na deteção destes parasitas. Foi encontrada uma prevalência de 84,5% de peixes infetados e a intensidade e abundância média foram, respetivamente, de 32,1 e 27,1 parasitas por hospedeiro. A caracterização morfológica e identificação molecular de 196 L3 escolhidas aleatoriamente a partir da amostra total de parasitas revelou a presença de apenas uma L3 de *Hysterothylacium aduncum*, sendo as restantes L3 de *Anisakis* spp. Obteve-se uma frequência relativa de 62,9% de *A. pegreffii* e 37,1% de *A. simplex* (s.s.). Entre estas duas espécies crípticas, os resultados da análise da morfometria revelaram que existem diferenças significativas entre o comprimento do ventrículo e o comprimento do esófago, podendo estas medidas ser utilizadas para distinguir ambas as espécies na análise morfológica.

Palavras-chave: Anisakidae, Raphidascarididae, *Hysterothylacium aduncum*, *Anisakis* spp., *Trachurus trachurus*, Portugal.

Abstract

Anisakidae and Raphidascarididae: A morphological and molecular survey in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) caught in Portuguese waters

Third stage larvae (L3) of the Anisakidae and Raphidascarididae families are parasites with zoonotic potential which are very frequently found in the viscera and musculature of several fishes. Consequently, it is crucial to know the prevalence and distribution of these parasites in fish of commercial importance, as well as perform an accurate identification of the species of anisakids that are present since each species has a different degree of pathogenicity for human and animal health. Several studies have already been published in peer review journals where genetic identification of many species of anisakids found in fish caught in Portuguese waters was carried out. However, to the extent of the authors' knowledge of the current work, this is the first national study which correlates morphometry with a subsequent molecular analysis of the same L3 of *A. simplex* (s.s.) and *A. pegreffii* larvae. Since these two species are the most frequently linked species to the human disease and, although genetic identification is better, it is not always possible to perform this kind of technique, this research conjugated both techniques, in order to contribute for easier distinction by morphological characteristics. In the present study, 116 horse mackerel (*Trachurus trachurus*) caught in Portuguese waters were analyzed for the presence of L3 of anisakids, and 3148 larvae were collected. Within that total of retrieved L3, only 30% have been collected during the visual inspection of fish, which shows that is not a very effective method for detecting these parasites. A prevalence of 84,5% of infected fish was observed and the mean intensity and mean abundance were, respectively, 32,1 and 27,1 parasites per fish. The morphological characterization and molecular identification of 196 L3 randomly chosen from the total sample of parasites revealed the presence of just one L3 of *Hysterothylacium aduncum*, with the remaining being L3 of *Anisakis* spp. A relative frequency of 62,9% of *A. pegreffii* and 37,1% of *A. simplex* (s.s.) was obtained. Between these two sibling species, morphometry analysis results revealed that there are significant differences between the length of the ventricle and the length of the oesophagus, and as such these measurements can be used to distinguish both species in the morphological analysis.

Keywords: Anisakidae, Raphidascarididae, *Hysterothylacium aduncum*, *Anisakis* spp., *Trachurus trachurus*, Portugal.

ÍNDICE GERAL

I. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR	1
II. INTRODUÇÃO	3
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1. Nematodes das famílias Anisakidae e Raphidascarididae	6
1.1. Taxonomia	6
1.1.1. Género <i>Anisakis</i>	6
1.1.2. Género <i>Pseudoterranova</i>	7
1.1.3. Género <i>Contracaecum</i>	8
1.1.4. Género <i>Hysterothylacium</i>	8
1.2. Ciclo de vida dos anisaquídeos.....	9
1.3. Distribuição geográfica e pelos hospedeiros definitivos a nível mundial.....	11
1.4. Distribuição de anisaquídeos pelas águas marítimas, de água doce e produções de aquacultura portuguesas.....	14
1.5. Fatores que afetam a distribuição dos anisaquídeos.....	16
1.5.1. Fatores abióticos.....	16
1.5.2. Fatores bióticos.....	17
1.5.3. Fatores antropogénicos.....	18
1.6. Métodos de deteção de parasitas nos produtos da pesca.....	19
1.6.1. Inspeção visual	19
1.6.2. Transiluminação.....	20
1.6.3. Prensagem e UV.....	20
1.6.4. Digestão artificial.....	21
1.6.5. Novos métodos de deteção.....	21
1.7. Métodos de identificação de anisaquídeos.....	21
1.7.1. Identificação morfológica.....	21
1.7.2. Métodos bioquímicos: Eletroforese de enzimas <i>multilocus</i> (MEE).....	24
1.7.3. Métodos moleculares	24
2. Doença causada pelos nematodes das famílias Anisakidae e Raphidascarididae	26
2.1. Nomenclatura da doença	26
2.2. Doença nos mamíferos marinhos.....	26
2.3. Doença nos peixes.....	27
2.4. Doença no homem.....	28
2.4.1. Definição e particularidades da doença.....	28
2.4.2. As diferentes formas clínicas da doença	29
2.4.3. Dados epidemiológicos da doença e caracterização do risco para a saúde.....	31
2.4.4. Diagnóstico e tratamento	35
2.4.5. Alergia a <i>Anisakis simplex</i>	36
3. Enquadramento legislativo	40
4. Métodos de inativação de anisaquídeos no pescado	42
5. Medidas de controlo no setor da pesca.....	44
6. Métodos de controlo em aquacultura	45
7. Medidas de prevenção para o consumidor.....	47
IV. ANISAKIDAE E RAPHIDASCARIDIDAE: Pesquisa, identificação morfológica e molecular em carapau (<i>Trachurus trachurus</i>) capturado em águas portuguesas	50
1. Objetivos do estudo	50
2. Material e métodos	50
2.1. Breve descrição da espécie em análise: carapau (<i>Trachurus trachurus</i>).....	51
2.2. Colheita da amostra de carapaus.....	52
2.3. Processamento das amostras.....	53
2.3.1. Exame visual e necrópsia	54
2.3.2. Digestão artificial e colheita das larvas de anisaquídeos.....	56

2.4. Caracterização morfológica das larvas de anisquídeos.....	58
2.5. Caracterização molecular das larvas de anisquídeos.....	60
2.5.1. Extração e purificação do DNA das larvas	61
2.5.2. Amplificação do DNA: PCR <i>multiplex</i>	62
2.5.3. Visualização em gel de agarose	63
2.5.4. Sequenciação e leitura de sequências.....	64
2.6. Análise estatística	64
3. Resultados.....	65
3.1. Análise epidemiológica de nematodes das famílias Anisakidae e Raphidascarididae em carapau de águas portuguesas.....	65
3.2. Resultados da análise morfológica e identificação molecular das larvas de anisquídeos	69
4. Discussão	74
V. CONCLUSÕES	84
VI. PROPOSTAS PARA INVESTIGAÇÕES FUTURAS	85
VII. BIBLIOGRAFIA	87
ANEXO 1	101
ANEXO 2	103
ANEXO 3	105
ANEXO 4	119

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Anisakis simplex</i>	9
Figura 2. Esquema simplificado da metodologia adotada	51
Figura 3. Pesagem e medição do comprimento total de um exemplar de carapau, à esquerda e direita respetivamente.....	53
Figura 4. Imagens da pesquisa macroscópica de parasitas	55
Figura 5. Etapas da digestão artificial, cujas etapas de A a I foram discriminadas previamente	58
Figura 6. Tina de eletroforese utilizada no estudo.....	63
Figura 7. Transiluminador utilizado no estudo.....	64
Figura 8. Colheita de larvas da cavidade abdominal.....	67
Figura 9. Revelação por eletroforese dos produtos de PCR das larvas sequenciadas.....	70
Figura 10. Principais parâmetros morfológicos das larvas de anisquídeos observadas microscopicamente	73

Lista de tabelas

Tabela 1. Distribuição geográfica do género <i>Anisakis</i> spp. a nível mundial.....	12
Tabela 2. Distribuição geográfica do complexo <i>Pseudoterranova decipiens</i> a nível mundial	13
Tabela 3. Distribuição geográfica do complexo <i>Contracaecum osculatum</i> (s.l.) a nível mundial	13
Tabela 4. Produtos da pesca e mamíferos marinhos das águas portuguesas infetados com anisquídeos	15
Tabela 5. Resumo das características morfológicas das principais L3 de anisquídeos.....	23
Tabela 6. Alergénios de <i>Anisakis simplex</i>	39
Tabela 7. Tratamentos para inviabilização das larvas de anisquídeos no pescado.....	43
Tabela 8. Distribuição e composição da amostra	53
Tabela 9. Caracterização da amostra	56
Tabela 10. Tamanho esperado dos fragmentos ITS (bp) para cada espécie obtidos com os <i>primers</i> indicados.....	62
Tabela 11. Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados.....	63
Tabela 12. Caracterização da amostra quanto ao parasitismo	66
Tabela 13. Frequência, intensidade e abundância do parasitismo por lote e amostra total ..	68
Tabela 14. Relação entre variáveis	69
Tabela 15. Medições de algumas características morfológicas em larvas L3 de anisquídeos	71
Tabela 16. Comparação entre vários estudos de prevalência e intensidade média parasitária em carapau proveniente de águas Ibéricas	74
Tabela 17. Comparação de prevalências de infeção por <i>Anisakis</i> spp. e <i>H. aduncum</i> , frequências relativas de <i>A. pegreffi</i> e <i>A. simplex</i> (s.s.) com diferentes autores	79
Tabela 18. Dados morfométricos de larvas L3 de anisquídeos deste estudo em comparação com os reportados noutros estudos	82

Lista de abreviaturas e símbolos

%	Percentagem
®	Marca registada
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
AESA	<i>Agencia Española de Seguridad Alimentaria</i>
Bp	Pares de base
CE	Comunidade Europeia
cm	Centímetro
COX	Citocromo oxidase
e.g.	<i>exempli grati</i> (por exemplo)
E.U.A.	Estados Unidos da América
EF1	<i>Elongation Factor 1</i>
DGRM	Direção Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos
DGS	Direção-Geral da Saúde
DNA	deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EUMOFA	<i>European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
g	Gramma
i.e.	<i>id est</i> (isto é)
ICES	International Council for the Exploration of the Sea (Conselho Internacional para a Exploração do Mar)
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
INSA	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISS	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (espaçador transcrito interno)
kg	Quilograma
kU/L	Quilo unidades por litro

L	Litro
L3	Larva de terceiro estágio
LNR	Laboratório Nacional de Referência
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mtDNA	DNA mitocondrial
n	Tamanho da amostra
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nm	Nanómetro
°C	Grau Celsius
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (técnica de polimerização em cadeia)
rDNA	DNA ribossómico
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
rpm	Rotações por minute
rRNA	RNA ribossómico
sp.	Uma espécie
spp.	Várias espécies
UE	União Europeia

I. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

No âmbito do protocolo existente entre a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL) e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), foi efetuado o estágio curricular da autora, que decorreu no período entre 2 de outubro de 2017 e 29 de março de 2018. O objetivo principal foi desenvolver um trabalho de investigação do interesse não só da comunidade académica como também de saúde pública, que se materializa nesta dissertação de mestrado.

O trabalho experimental decorreu no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do INSA, sob orientação da Dra. Maria João Gargaté e algumas atividades foram realizadas nas instalações da FMV-UL, sob orientação do Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho.

Concretamente, no INSA as principais atividades relacionadas com o tema de investigação foram:

- Execução e validação de um protocolo laboratorial para a extração de DNA de larvas de anisacuídeos;
- Adaptação e realização de um protocolo de amplificação genética por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) *multiplex* do Laboratório de Referência Europeu para parasitas, o *Istituto Superiore di Sanità* (ISS), Roma, Itália, para identificação de larvas de anisacuídeos;
- Realização de eletroforese em gel de agarose e análise de imagem em transiluminador;
- Análise bioinformática, com recurso aos programas Chromas® e BioEdit®, de sequências de fragmentos de DNA ribossomal de larvas de anisacuídeos obtidas através de PCR após purificação e sequenciação pelo método de Sanger;
- Comparação das sequências de fragmentos de DNA ribossomal das larvas de anisacuídeos obtidas com as existentes no GenBank® do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Paralelamente ao objetivo principal do estágio, isto é, desenvolver um trabalho de investigação, também foram realizadas outras atividades no INSA, que permitiram à autora desta dissertação aprender técnicas de biologia molecular, realizar a pesquisa de helmintes em amostras de água, observar metodologias do diagnóstico pré e pós natal da Toxoplasmose congénita com observação de quistos de *Toxoplasma gondii* no cérebro de ratos, bem como desenvolver competências fundamentais para o sucesso do presente trabalho de investigação e para o futuro profissional. Foi ainda possível assistir ao lançamento da plataforma *online* INSaFLU, criada para ajudar na prevenção e controlo da gripe; assistir a uma reunião da Rede Nacional de Vigilância Laboratorial e Clínica de Infecções Congénitas (TORCHnet).

A autora teve oportunidade de frequentar o curso “Malária: diagnóstico microscópico de A a Z”, o qual concluiu com sucesso e com a classificação final de 17 valores.

Em relação às atividades de estágio desenvolvidas na FMV-UL, estas estiveram relacionadas com o tema de investigação. Mais concretamente, foram realizadas todas as necrópsias dos carapaus gentilmente cedidos pela lota de Peniche para o estudo, assim como foram efetuadas as digestões artificiais para recuperação das larvas de anisquídeos existentes nos peixes. Todos os espécimes de parasitas foram colhidos, conservados em frascos etiquetados e posteriormente identificados morfológicamente também na FMV-UL.

II. INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório da *Food and Agriculture Organization* (FAO) sobre as estatísticas da pesca e aquacultura referente ao ano de 2009 existe o hábito crescente de consumo de peixe em todo o mundo (FAO, 2011). Os dados divulgados no relatório anual do *European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products* (EUMOFA) em 2017 apontam no mesmo sentido, referindo que o consumo mundial *per capita* de pescado passou de 16,1 Kg em 2001 para 19,7 Kg em 2013, o que corresponde a um aumento de 22%. Na União Europeia, Portugal regista o maior consumo de pescado entre todos os estados membros desde 2001, apesar de ter sofrido um ligeiro decréscimo, passando de um consumo *per capita* de 57,5 Kg em 2001 para 55,9 Kg em 2015. Não obstante, no ano de 2015, os portugueses consumiram mais do que 30 Kg de pescado *per capita* em relação à média da União Europeia, cujo valor de pescado consumido registado nesse ano foi de 25,1 Kg *per capita* (EUMOFA, 2017).

O peixe tem valiosas qualidades nutricionais sendo, tal como a carne, uma excelente fonte de proteína de elevado valor biológico. Além disso, os peixes também são fonte importante de selénio, zinco, iodo, ferro, entre outros minerais necessários ao nosso organismo. Fornecem-nos igualmente várias vitaminas do complexo B e, no caso dos peixes gordos, também são fonte de vitamina A e D. A maioria dos peixes tem baixo teor de gordura e a maior parte da gordura que os peixes apresentam na sua constituição é uma gordura polinsaturada saudável, o ómega-3. Nomeadamente, o ácido eicosapentaenoico (EPA) e o ácido docosahexaenoico (DHA), que desempenham um papel importante no desenvolvimento cerebral, na regulação da pressão arterial, na função renal, coagulação sanguínea, reações inflamatórias e imunitárias (*European Food Safety Authority* [EFSA], 2012; *Food and Drug Administration & Environmental Protection Agency* [FDA & EPA], 2017). A maioria das recomendações dietéticas de instituições europeias recomenda o consumo no mínimo de duas porções de peixe por semana para crianças, adolescentes e adultos, de forma a assegurar o fornecimento de nutrientes essenciais, em particular ómega-3, vitamina D, iodo e selénio (EFSA, 2014). É recomendado também para a população em geral e especialmente para mulheres grávidas, que pensam engravidar ou que estão a amamentar, assim como para crianças de tenra idade, a opção pelo consumo de peixes com baixos níveis de mercúrio (e.g., sarda, arenque, pescada, sardinha, bacalhau) (FDA & EPA, 2017). O peixe é, de facto, um componente importante na dieta humana e nos países em desenvolvimento, para além de ser uma fonte de alimento é também um importante meio de subsistência (FAO, 2015).

Atualmente, apesar de o setor da aquacultura estar em crescimento, o setor das pescas continua a dominar no abastecimento de pescado para a população mundial (FAO, 2015). No

que concerne aos portos de pesca nacionais, os portos de Sesimbra, Peniche e Matosinhos são os mais importantes (EUMOFA, 2016).

De acordo com as estimativas da Direção Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos (DGRM), no ano de 2017, estima-se que tenham sido descarregados nos portos nacionais cerca de 19.000 toneladas de carapau, 19.000 toneladas de cavala e 14.000 toneladas de sardinha. Estas espécies são indubitavelmente as mais capturadas e das mais consumidas pelos portugueses. Num inquérito realizado no âmbito de um projecto de investigação com o tema “The consumption of seafood in Portugal – preferences, knowledge and public perception” com um total de 200 indivíduos entrevistados, ficou bem patente uma clara preferência pelos consumidores portugueses por pescado proveniente das pescas, sendo o carapau, a sardinha, o bacalhau, a pescada e o polvo as espécies mais frequentemente referidas a nível de consumo de pescado. Adicionalmente, no mesmo trabalho de investigação também se verificou uma nítida preferência entre os consumidores nacionais pelo consumo de pescado fresco, isto é, mantido apenas refrigerado até ao seu consumo e os grelhados e os cozidos foram referidos como os métodos de eleição na confeção do pescado. É ainda de referir que, nesse mesmo estudo, foi observada uma relação estatisticamente significativa entre o consumo de carapau e a idade, assim como entre o consumo de carapau e o nível de escolaridade, verificando-se uma tendência para indivíduos com menor grau de escolaridade e com mais idade de consumirem uma maior quantidade de peixe desta espécie. Do mesmo modo, em relação ao consumo de sardinha também foi observada uma relação estatisticamente significativa entre o seu consumo e a idade, verificando-se que os maiores consumidores desta espécie têm uma idade superior a 65 anos (Fernandes, 2017). Dentro da União Europeia, o carapau, a cavala e a sardinha são espécies igualmente muito consumidas e estão na lista das 15 principais espécies capturadas pela União Europeia em 2013, sendo que o arenque é a espécie que ocupa o topo da lista (União Europeia, 2016).

Salvo algumas exceções, como as típicas conservas de anchova em salmoura algarvias, o consumo de sardinha “a pingar no pão”, o peixe-espada grelhado com as vísceras ou o carapau assado com as vísceras, em Portugal, tradicionalmente, não existia o hábito de consumir peixe insuficientemente cozinhado e o hábito de consumir peixe cru não era comum (Ramos, 2011). Nos últimos anos, por influência da globalização, verificou-se a aquisição de novos hábitos alimentares entre os portugueses, que incorporaram especialidades típicas de outros países na sua alimentação. Nomeadamente, devido à crescente popularidade da cozinha japonesa entre os portugueses, verificou-se um aumento do número de restaurantes tradicionais japoneses em Portugal, assim como um crescente número de preparações caseiras deste tipo de cozinha (Ramos, 2011; Miguéis, Santos, Saraiva & Esteves, 2015). Com a introdução destes novos

hábitos de consumo de pescado, que se baseiam na ingestão de peixe cru, aumenta o risco de exposição a parasitas como os da família Anisakidae (*Anisakis* spp., *Pseudoterranova* spp. e *Contracaecum* spp.) e os da família Raphidascarididae (*Hysterothylacium* spp.), que têm sido identificados como os parasitas mais abundantes nos peixes marinhos em todo o mundo (Baptista-Fernandes et al., 2017; Santos, Castro, Cavaleiro, Rangel & Palm, 2017; Vericimo et al., 2017). Estes parasitas constituem um problema de saúde pública emergente, pois provocam uma doença no homem conhecida por anisaquidíase. Simultaneamente, têm também impacto económico, devido aos potenciais efeitos negativos que provocam na confiança do consumidor e aos problemas de comercialização associados a produtos de pesca infetados (Bao et al., 2017). Neste contexto, torna-se de capital importância a realização de estudos, como a presente investigação, de forma a avaliar a prevalência de peixes infetados com estes nematodes, bem como proceder à identificação precisa das espécies presentes, uma vez que dentro destas famílias de nematodes, existem parasitas com diferentes graus de patogenicidade para a saúde humana e veterinária.

O carapau, *Trachurus trachurus*, foi a espécie escolhida para a realização deste estudo, pois é uma das espécies mais abundantes nas águas marítimas portuguesas, além de ser uma das espécies mais consumidas pelos portugueses, o que torna fundamentais os estudos parasitológicos neste peixe. Adicionalmente, sendo o carapau um peixe com baixo valor comercial, este perfil ajudou à opção por esta espécie para o presente estudo, pois é adquirida com maior facilidade do que outras espécies como a sardinha, que tem maior valor comercial.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Nematodes Anisakidae e Raphidascarididae

Os nematodes das famílias Anisakidae e Raphidascarididae, consistem num grupo numeroso de parasitas amplamente distribuído a nível mundial, que depende do ecossistema aquático e de vários hospedeiros intermediários, paraténicos e definitivos (Cavallero et al., 2017).

1.1. Taxonomia

Segundo a base de dados *NCBI Taxonomy Browser (National Center for Biotechnology Information [NCBI], n.d.)*, os nematodes das famílias Anisakidae e Raphidascarididae com importância para a medicina humana e veterinária enquadram-se da seguinte forma na classificação taxonómica:

Filo: Nematoda

Classe: Chromadorea

Ordem: Ascaridida

Superfamília: Ascaridoidea

Família: Anisakidae

Género: *Anisakis* (Dujardin, 1945)

Género *Contracaecum* (Railliet et Henry, 1913)

Género: *Pseudoterranova* (Krabbe, 1878)

Família: Raphidascarididae

Género: *Hysterothylacium* (Ward et Magath, 1917)

1.1.1. Género *Anisakis*

Apesar dos anisakuídeos serem conhecidos em peixes marinhos desde o século XIII, só em meados do século XIX é que os nematodes que provocam lesões nos estômagos dos cetáceos foram agrupados por Félix Dujardin num género designado por *Anisakis*. Inicialmente, as formas larvares dos primeiros casos humanos descritos na Holanda foram identificadas como *Eustoma rotundatum*, posteriormente essa designação foi alterada para *Anisakis marina* e, por fim, foi alterada para *Anisakis simplex* (Abollo, Gestal & Pascual, 2001; Measures, 2014).

Até ao momento, foram identificadas nove espécies pertencentes ao género *Anisakis* em todo o mundo. De acordo com a última revisão taxonómica baseada em técnicas moleculares, este género divide-se em quatro grupos distintos: (1) o primeiro grupo, designado por complexo de espécies crípticas *Anisakis simplex* ou *Anisakis simplex sensu lato* (s.l.), é constituído por três espécies, *Anisakis simplex sensu stricto* (s.s.), *Anisakis pegreffii* e *Anisakis berlandi* (= *Anisakis*

simplex sp. C); (2) o segundo grupo inclui as duas espécies crípticas *Anisakis ziphidarum* e *Anisakis nascetti* (= *A. simplex* sp. A ou *A. simplex* sp.); (3) o terceiro grupo compreende o complexo *Anisakis physeteris* (*Anisakis physeteris*, *Anisakis brevispiculata* e *Anisakis paggiae*); e, por último, (4) o quarto grupo é composto exclusivamente por *Anisakis typica* (Abattouy et al., 2016; Mattiucci, Paoletti, & Webb, 2009; Mattiucci, Cipriani, Paoletti, Levsen & Nascetti, 2017).

A diferenciação das espécies crípticas, como *Anisakis simplex* (s.s.) e *Anisakis pegreffii*, por vezes não é tão clara em zonas de simpatria, ou seja, zonas onde a distribuição geográfica das duas espécies se sobrepõe, tal como acontece ao longo das costas da Península Ibérica e do Japão. Nestas zonas de simpatria é possível encontrar híbridos F1 entre estas duas espécies, além de encontrar espécimes das duas espécies a infetar simultaneamente o mesmo hospedeiro (Costa et al., 2016; Abattouy et al., 2016). As espécies crípticas ou irmãs (em inglês, “*sibling species*”) são espécies que são morfologicamente idênticas, mas estão reprodutivamente isoladas e só com a aplicação de técnicas moleculares é possível fazer a sua identificação (Mattiucci, Paoletti, Cipriani, Webb, & Nascetti, 2015a; Abattouy et al., 2016). A hibridação pode ocorrer naturalmente entre membros de duas espécies estreitamente relacionadas, formando-se híbridos F1 (Abattouy et al., 2016). Recentemente, híbridos adultos de *A. pegreffii* e *A. simplex* (s.s) foram recuperados de um golfinho-riscado (*Stenella coeruleoalba*) que arrojou na costa Siciliana (Costa et al., 2016). Contudo, vários estudos sugerem que, mesmo que a hibridação ocorra entre *A. pegreffii* e *A. simplex* (s.s.) em algumas zonas de simpatria, a descendência, isto é, os híbridos F1, parecem ter uma aptidão reduzida (e.g., Abollo, Paggi, Pascual & D’Amelio, 2003; Marques, Cabral, Busi & D’Amelio, 2006; Mattiucci et al., 2008; 2016). Mattiucci et al. (2016) apontam algumas hipóteses: (1) provavelmente a descendência F1 é infértil, mesmo que atinja o estágio adulto; (2) a seleção natural pode não favorecer a sobrevivência dos híbridos, bem como (3) podem existir alguns mecanismos de isolamento reprodutivo pós-cruzamento que não permitam o retrocruzamento de híbridos F1 com as espécies parentais. Consequentemente, as duas espécies mantêm a sua identidade. De acordo com os mesmos autores, a frequência atual de hibridação entre estas duas espécies nas águas atlânticas espanholas parece ser cerca de 5% e, no seu estudo, foi demonstrado que a hibridação não ocorre fora das áreas de simpatria das duas espécies crípticas.

1.1.2. Género *Pseudoterranova*

Dentro do género *Pseudoterranova*, atualmente são reconhecidas seis espécies pertencentes ao complexo *Pseudoterranova decipiens* e mais duas espécies que não fazem parte desse complexo de espécies, nomeadamente *Pseudoterranova kogiae*, no cachalote pigmeu e

Pseudoterranova ceticola, no cachalote anão. O complexo *Pseudoterranova decipiens* é constituído pelas seguintes espécies: *Pseudoterranova decipiens* (s.s.) (= *P. decipiens* sp. B), *Pseudoterranova krabbei* (= *P. decipiens* sp. A), *Pseudoterranova bulbosa* (= *P. decipiens* sp. C), *Pseudoterranova azarasi* (= *P. decipiens* sp. D), *Pseudoterranova cattanni* e *Pseudoterranova decipiens* sp. E (Measures, 2014; Timi et al., 2014; Mattiucci et al., 2017).

Os parasitas nematodes do estômago das focas foram descritos pela primeira vez por Harald Krabbe em 1878 como *Ascaris decipiens*. A espécie foi depois colocada dentro e fora de outros géneros, *Porrocaecum*, *Terranova*, *Phocanema* e, finalmente, foi incluída no género *Pseudoterranova* (Measures, 2014).

1.1.3. Género *Contraecum*

Atualmente, este género compreende cerca de 50 espécies, a maioria das quais parasita no seu estado adulto pinípedes e aves piscívoras (ictiófagas) (Mattiucci & Nascetti, 2008). Até ao momento, foram reconhecidos cinco membros do complexo *Contraecum osculatum* (s.l.), que parasitam na sua fase adulta exclusivamente pinípedes: três espécies que parasitam os pinípedes das zonas do Ártico (*C. osculatum* sp. A, *C. osculatum* sp. B e *C. osculatum* (s.s.)) e duas espécies que parasitam os pinípedes da Antártida (*C. osculatum* sp. D e *C. osculatum* sp. E) (Mattiucci & Nascetti, 2008; Mattiucci et al., 2017). Entre as espécies que parasitam na sua forma adulta aves piscívoras estão *C. pelagicum*, *C. australe*, *C. rudolphii* (A, B e C), *C. septentrionale*, *C. chubutensis*, *C. micropapillatum*, *C. bioccai*, *C. gibsoni* e *C. overstreeti* (Garbin et al., 2013).

1.1.4. Género *Hysterothylacium*

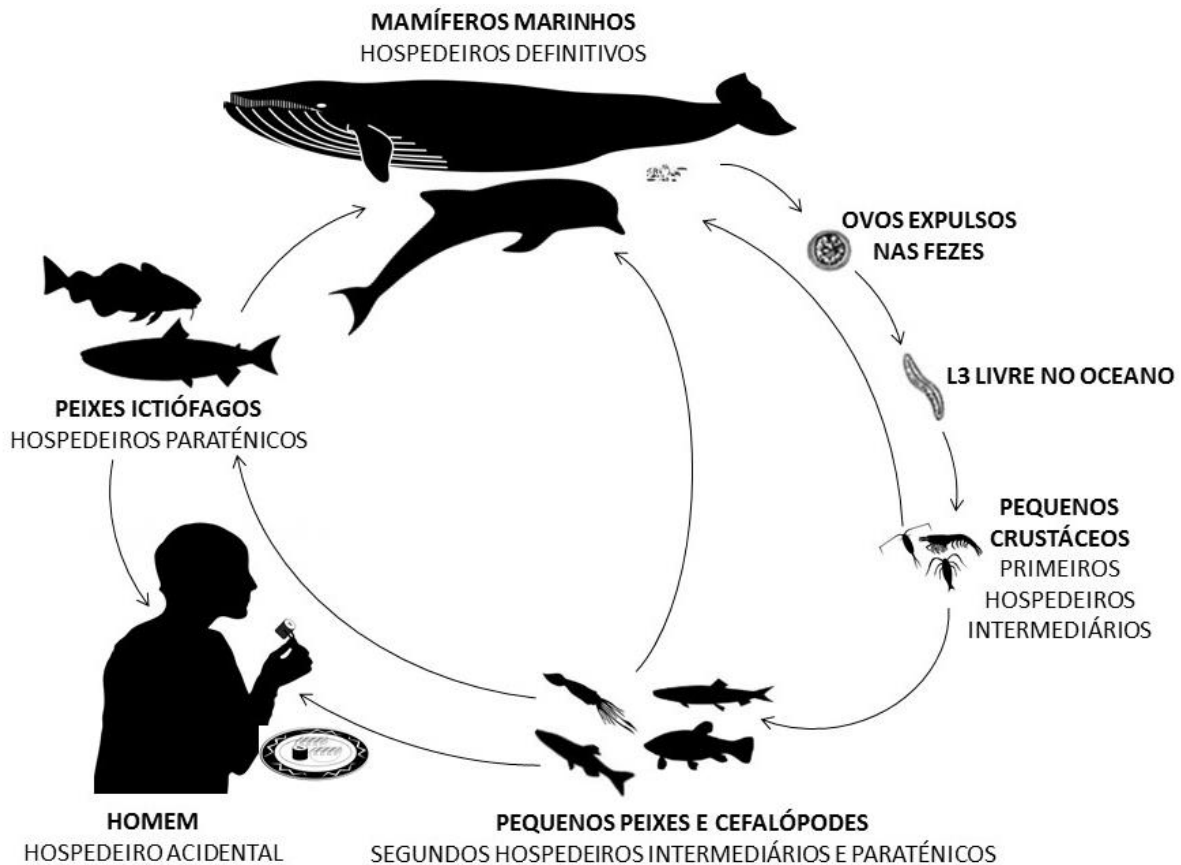
O género *Hysterothylacium*, anteriormente designado por *Thynnascaris* spp., compreende mais do que 59 espécies e é considerado uma das espécies de parasitas mais ubiqüitária em peixes do Atlântico Norte. No passado, as espécies pertencentes a este género foram consideradas membros do género *Contraecum* spp. Dentro do género *Hysterothylacium*, a espécie *Hysterothylacium aduncum* é uma espécie de parasita extremamente comum no Norte do Atlântico e mar Mediterrâneo, que aparenta não ter muita especificidade de hospedeiro, tanto na forma adulta como nas formas larvares. Provavelmente esta espécie poderá tratar-se de um complexo de espécies, contudo são necessários mais estudos nessa matéria (Keskin, Koyuncu & Genc, 2015; Abdel-Ghaffar et al., 2015).

1.2. Ciclo de vida dos anisquídeos

O ciclo de vida dos nematodes anisquídeos é heteroxeno, dependente do ecossistema aquático e de vários hospedeiros intermediários, paraténicos e definitivos de diferentes níveis da cadeia alimentar (Gazzonis et al., 2017). São por isso ciclos complexos, que envolvem quer estádios de vida livre quer estádios parasitários e compreendem quatro estádios larvares e um estágio adulto (Petrie, Wootten, Bruno, MacKenzie & Bron, 2007).

Uma vez que os ciclos biológicos dos quatro géneros com maior importância clínica (*Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium*) são semelhantes e o género *Anisakis* tem sido o mais frequentemente associado a casos de doença humana, de seguida, será descrito o ciclo de vida dos nematodes desse género em pormenor (Vericimo et al., 2017; Cavallero et al., 2018).

Figura 1. Ciclo de vida de *Anisakis simplex* (adaptado de Measures, 2014).



O ciclo de vida de *Anisakis* spp. encontra-se representado na Figura 1. Este ciclo envolve principalmente cetáceos (e.g., baleias, golfinhos ou botos/toninhas) como hospedeiros definitivos. Dentro do estômago do mamífero hospedeiro, as fêmeas de *Anisakis* spp. produzem

ovos que são libertados no mar juntamente com as fezes do hospedeiro. É necessário um período de desenvolvimento no mar antes das larvas eclodirem a partir dos ovos. A maioria da literatura especializada refere uma evidência de que ocorram duas mudas durante o desenvolvimento do ovo, eclodindo uma larva no estado L3 (e.g. Measures, 2014; Baptista-Fernandes et al., 2017; Mathison & Silva, 2018). Contudo, alguma bibliografia especializada refere que apenas ocorre uma muda dentro do ovo e que após a ingestão pelo primeiro hospedeiro intermediário é que ocorre uma segunda muda para L3 (e.g., Castellanos, Tangua & Salazar, 2017; Vericimo et al., 2017). Independentemente do número de mudas dentro do ovo, é consensual que, após a eclosão, as larvas são ingeridas pelos primeiros hospedeiros intermediários obrigatórios que, no caso de *Anisakis* spp. são eufasídeos e copépodes (pequenos crustáceos, vulgarmente designados de *krill*) e, é dentro destes que as larvas se tornam infeciosas (L3). Os invertebrados infetados são posteriormente ingeridos por segundos hospedeiros intermediários, como pequenos peixes pelágicos (e.g., capelim, cavala e arenque) ou cefalópodes (e.g., lulas), que por sua vez são ingeridos por grandes peixes predadores pelágicos, como o cantarilho, salmão ou pescadas prateadas, que podem acumular um grande número de larvas infetantes. Numerosas espécies de peixes, que alojam larvas L3 maioritariamente nas vísceras e cavidade corporal, mas também nos músculos, são hospedeiros paraténicos nestes ciclos de vida, adquirindo a infeção alimentando-se de hospedeiros intermediários ou de outros hospedeiros paraténicos (Cruz, Barbosa & Saraiva, 2007; Measures, 2014). Por fim, o ciclo completa-se quando a larva L3 infetante é ingerida pelos hospedeiros definitivos (essencialmente cetáceos). No caso dos golfinhos, focas e leões-marinhos, a infeção ocorre pela ingestão de peixes marinhos e cefalópodes, enquanto no caso das baleias são infetadas pela ingestão de crustáceos planctónicos (*krill*). No hospedeiro definitivo ocorrem duas mudas (de L3 a adulto) antes de os nematodes anisacídeos atingirem a sua maturidade sexual, produzirem ovos e um novo ciclo ser iniciado (Baptista-Fernandes et al., 2017). Os seres humanos podem tornar-se um hospedeiro acidental, isto é, as larvas não se conseguem desenvolver, nem completar o seu ciclo de vida dentro do homem e, por isso, o ser humano é considerado um hospedeiro fundo-de-saco e, portanto, sem importância na transmissão da doença (Measures, 2014; Bao et al., 2015, 2017).

O ciclo de vida de *Pseudoterranova* spp. é similar, mas envolve invertebrados bentónicos como primeiros hospedeiros intermediários, tais como os anfípodes (vulgarmente designados por *scud*, um nome de origem norueguesa) que ingerem as larvas fixas à areia ou às rochas pelas suas caudas; peixes bentónicos (e.g. o peixe-chato e o bacalhau) como segundos hospedeiros intermediários e principalmente os pinípedes (e.g. focas e leões marinhos) e muito raramente alguns cetáceos como hospedeiros definitivos (Measures, 2014). Deste modo, *Anisakis* spp.

tem um ciclo de vida essencialmente pelágico, dado o tipo de hospedeiros envolvidos, enquanto *Pseudoterranova* spp. tem um ciclo de vida mais bentónico (Wootten, Yoon & Bron, 2010; Measures, 2014). Assim como, *Pseudoterranova* spp. é mais abundante em águas costeiras, enquanto que *Anisakis* spp. é mais abundante em alto-mar. Estas características provavelmente são um reflexo das diferenças nos hospedeiros preferenciais destas duas espécies, dado que os pinípedes predam principalmente espécies de peixes bênticos e são mais abundantes nas águas costeiras, enquanto os cetáceos, apesar de também serem encontrados nas águas costeiras, são também abundantes em alto-mar, onde existem em abundância os principais primeiros hospedeiros de *Anisakis simplex*, nomeadamente eufasídeos (EFSA, 2010; Mattiucci et al., 2017).

As espécies do género *Contracaecum* apresentam aves piscívoras e pinípedes como hospedeiros definitivos. No ciclo de vida das espécies de *C. osculatum* da região do ártico, os copépodes parecem atuar como primeiros hospedeiros intermediários, vários peixes atuam como segundos hospedeiros intermediários ou paraténicos e, por fim, várias espécies de pinípedes são os seus hospedeiros definitivos (Mattiucci et al., 2015b).

Os nematodes anisaquídeos das espécies do género *Hysterothylacium* spp. completam o seu ciclo de vida em várias espécies de peixes. Geralmente, os peixes dos níveis baixos da cadeia alimentar atuam como hospedeiros intermediários ou paraténicos, enquanto os grandes peixes predadores, como o bacalhau-do-atlântico, são os seus hospedeiros definitivos. Dentro dos intestinos dos hospedeiros definitivos as larvas L3 desenvolvem-se até ao estado adulto e produzem os ovos que são depois libertados com as fezes (Measures, 2014; Ghadam, Banaii, Mohammed, Suthar & Shamsi, 2018).

1.3. Distribuição geográfica e pelos hospedeiros definitivos a nível mundial

A distribuição geográfica de um parasita é o resultado da conjugação das distribuições geográficas dos vários hospedeiros que fazem parte do seu ciclo de vida. Assim, um parasita com elevada especificidade de hospedeiro, terá uma menor distribuição geográfica, que estará provavelmente limitada à distribuição geográfica dos seus hospedeiros, enquanto um parasita com pouca especificidade de hospedeiros, é exetável que tenha uma ampla distribuição geográfica (Santos et al., 2017). No entanto, é preciso não esquecer o impacto das actividades humanas nos ecossistemas marinhos e, conseqüentemente, na biodiversidade e distribuição de espécies. As actividades de navegação são, por exemplo, uma fonte de contaminação e de introdução de novas espécies em ecossistemas marinhos, quer através da descarga das águas de lastro utilizadas para estabilizar as embarcações no mar e que podem transportar cerca de 7000 espécies marinhas que são assim libertadas num ecossistema marinho onde não existiam

previamente, quer através da libertação de espécies não indígenas que se incrustaram nos cascos das embarcações durante a navegação entre terminais portuários (Domingos et al., 2017).

Como se pode observar na tabela 1, o complexo *Anisakis simplex* possui baixa especificidade de hospedeiro definitivo, o que contrasta com o complexo *Anisakis physeteris*, que tem sido encontrado exclusivamente em cachalotes (*Physeter catodon*). Na tabela 1, também é possível verificar que *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* parecem ter uma distribuição geográfica diferente, contudo em algumas regiões do mundo a sua distribuição geográfica sobrepõe-se.

Tabela 1. Distribuição geográfica do género *Anisakis* spp. a nível mundial (adaptado de Mattiucci & Nascetti, 2008).

Espécie	Hospedeiros definitivos	Distribuição Geográfica
<i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	<i>Balaenoptera acutorostrata</i> ; <i>Delphinus delphis</i> ; <i>Globicephala melaena</i> ; <i>Lagenorhynchus albirostris</i> ; <i>Orcinus orca</i> ; <i>Pseudorca crassidens</i> ; <i>Stenella coeruleoalba</i> ; <i>Delphinapterus leucas</i> e <i>Phocoena phocoena</i> .	Entre 35°N e o Círculo Polar Ártico, oceano Atlântico e Pacífico Ocidental e Oriental. Limite a sul no NE do Oceano Atlântico são as águas do Estreito de Gibraltar. Ocasionalmente presente nas águas ocidentais do Mar Mediterrâneo devido à migração de espécies de peixes pelágicos do Oceano Atlântico para o mar de Alborão. Vive em simpatria com <i>A. pegreffii</i> nas costas Ibéricas, no mar de Alborão e nas águas japonesas. Vive em simpatria com <i>A. berlandi</i> na zona do oceano Pacífico Oriental.
<i>A. pegreffii</i>	<i>Delphinus delphis</i> ; <i>Stenella coeruleoalba</i> ; <i>Tursiops truncatus</i> e <i>Caperea marginata</i> .	Espécie predominante no mar Mediterrâneo. O seu limite a norte no oceano Atlântico são as águas da costa Ibérica. Amplamente distribuído na região austral (30°N- 55°S). Encontrado na China e Japão.
<i>A. berlandi</i>	<i>Globicephala melaena</i> ; <i>Lissodelphis borealis</i> e <i>Pseudorca crassidens</i> .	Este do Pacífico, costa do Canadá e Chile, Nova Zelândia e Costa Atlântica Sul Africana.
<i>A. typica</i>	<i>Globicephala macrorhynchus</i> ; <i>Stenella coeruleoalba</i> ; <i>Tursiops truncatus</i> ; <i>Sotalia fluviatilis</i> ; <i>Stenella attenuata</i> ; <i>Stenella longirostris</i> e <i>Steno bredanensis</i> .	Entre 30° a Sul e 35° a Norte, em águas quentes e tropicais, Mar Mediterrâneo oriental (costa do Chipre), águas centrais portuguesas do Atlântico Nordeste, costa norte de África e Mar da China.
<i>A. ziphidarum</i>	<i>Mesoplodon densirostris</i> ; <i>Mesoplodon europaeus</i> e <i>Ziphius cavirostris</i> .	Sul do oceano Atlântico (costa sul africana), mar Mediterrâneo e águas das Caraíbas.

Tabela 1. Distribuição geográfica do género *Anisakis* spp. a nível mundial (adaptado de Mattiucci & Nascetti, 2008) (continuação).

Espécie	Hospedeiros definitivos	Distribuição Geográfica
<i>A. nascetti</i>	<i>Mesoplodon grayi</i> , <i>M. layardii</i> e <i>M. bowdoini</i> (Nova Zelândia) e <i>M. mirus</i> e <i>M. layardii</i> (África do Sul).	Costa da Nova Zelândia e África do Sul
<i>A. physeteris</i>	<i>Physeter catodon</i>	Mar Mediterrâneo e oceano Atlântico.
<i>A. brevispiculata</i>	<i>Kogia breviceps</i>	Costa Ibérica e da África do Sul.
<i>A. paggiae</i>	<i>Kogia breviceps</i> e <i>Kogia sima</i>	Flórida e África do Sul.

Na tabela 2 e 3 é possível observar a distribuição geográfica dos complexos *Pseudoterranova decipiens* e *Contracaecum osculatum* (s.l.) conhecida até ao momento.

Tabela 2. Distribuição geográfica do complexo *Pseudoterranova decipiens* a nível mundial (adaptado de Mattiucci & Nascetti, 2008)

Espécie	Hospedeiros definitivos	Distribuição Geográfica
<i>P. krabbei</i>	<i>Phoca vitulina</i> e <i>Halichoerus grypus</i>	Apenas encontrado no Atlântico Nordeste.
<i>P. decipiens</i> (s.s.)	<i>Zalophus californianus</i> , <i>Phoca vitulina richardsii</i> , <i>Phoca vitulina</i> , <i>Halichoerus grypus</i> , <i>Cystophora cristata</i> e <i>Mirounga angustirostris</i>	Regiões árticas e subárticas, incluindo atlântico nordeste e costa atlântica e do pacífico do Canadá. Encontrado em infeções mistas com <i>P. krabbei</i> e <i>P. bulbosa</i> no Atlântico Nordeste e com <i>P. bulbosa</i> nas águas atlânticas do Canadá.
<i>P. bulbosa</i>	<i>Erignathus barbatus</i>	Mar de Barents e da Noruega, costa atlântica do Canadá e mar do Japão.
<i>P. azarasi</i>	<i>Eumetopias jubatus</i> , <i>Zalophus californianus</i> , <i>Phoca vitulina richardsii</i> , <i>Erignathus barbatus</i>	Norte do Oceano Pacífico (Mar do Japão e da ilha Sakhalin).
<i>P. decipiens</i> E	<i>Leptonychotes weddellii</i> e <i>Chaenocephalus aceratus</i>	Antártida e águas subantártidas.
<i>P. cattani</i>	<i>Otaria byronia</i>	Costa Chilena.

Tabela 3. Distribuição geográfica do complexo *Contracaecum osculatum* (s.l.) a nível mundial (adaptado de Mattiucci & Nascetti, 2008)

Espécie	Hospedeiros definitivos	Distribuição Geográfica
<i>C. osculatum</i> A	<i>Erignathus</i>	Mar da Noruega e de Barents, costa atlântica do Canadá e mar do Japão (entre 40° e 80° a norte).
	<i>Barbatus</i> e <i>Halichoerus</i>	
<i>C. osculatum</i> B	<i>Grypus</i>	Nordeste e noroeste do Oceano Atlântico e águas do norte do Oceano Pacífico.
	<i>Phoca vitulina</i> , <i>Pagophilus Groenlandicus</i> , <i>Erignathus Barbatus</i> , <i>Eumetopias Jubatus</i> , <i>Halichoerus Grypus</i> e <i>Cystophora Cristata</i>	

Tabela 3. Distribuição geográfica do complexo *Contracaecum osculatum* (s.l.) a nível mundial (adaptado de Mattiucci & Nascetti, 2008) (continuação).

Espécie	Hospedeiros definitivos	Distribuição Geográfica
<i>C. osculatum</i> (s.s.)	<i>Halichoerus grypus</i>	Vive em simpatria com <i>C. osculatum</i> B nas águas da Islândia e é a única espécie do complexo <i>C. osculatum</i> presente no mar Báltico.
<i>C. osculatum</i> D	<i>Leptonychotes weddellii</i>	Vivem em simpatria nos mares da Antártida (Mar de Weddell e mar de Ross).
<i>C. osculatum</i> E		

1.4. Distribuição de anisacuídeos pelas águas marítimas, de água doce e produções de aquacultura portuguesas

O espaço marítimo nacional é um território de grande dimensão, que abrange as zonas marítimas adjacentes a Portugal continental e aos arquipélagos dos Açores e da Madeira. Como tal, a biodiversidade de espécies piscícolas é elevada. Em Portugal continental é possível observar também várias espécies de cetáceos. Entre as espécies de golfinhos, a mais frequentemente observada na costa continental portuguesa é o golfinho-comum-de-bico-curto (*Delphinus delphis*) e entre as espécies de baleias, a mais comum na costa continental portuguesa é a baleia-comum (*Balaenoptera physalus*). De uma forma geral, as espécies observadas ao longo da costa portuguesa são semelhantes às observadas ao longo da restante costa da Península Ibérica (Brito, Vieira, Sá & Carvalho, 2009; DGRM, 2018). Em Portugal continental, ao largo da costa de Peniche e de Sesimbra, num estudo realizado por Vieira, Carvalho e Brito (2009), registou-se a ocorrência de várias espécies de cetáceos, que incluíam o golfinho-comum-de-bico-curto (*Delphinus delphis*), o golfinho-roaz (*Tursiops truncatus*), o golfinho-riscado (*Stenella coeruleoalba*), a toninha-comum (*Phocoena phocoena*) e a baleia-anã (*Balaenoptera acutorostrata*). Tal como observado anteriormente, todos estes cetáceos são hospedeiros definitivos preferenciais de *Anisakis* spp.

Em relação à presença de pinípedes na costa continental portuguesa, esta tem um carácter irregular e esporádico, uma vez que não existem colónias de reprodução no continente. Quando são avistados pinípedes em Portugal continental, normalmente são juvenis de foca-cinzenta (*Halychoerus grypus*) e foca-comum (*Phoca vitulina*), com predomínio da primeira espécie quanto ao número de observações nos últimos anos. Pelo contrário, no arquipélago da Madeira, a foca-monge-do-mediterrâneo ou lobo-marinho (*Monachus monachus*) reproduz-se em grutas marinhas situadas nesse arquipélago, sendo essa a única colónica de pinípedes que se conhece ocorrer em território nacional (Silva, Brito, Santos & Barreiros, 2009; DGRM, 2018).

Na tabela 4 é possível observar as espécies até agora identificadas em Portugal como estando infetadas com anisacuídeos. No entanto, nessa tabela, deve ser feita a ressalva de que as espécies de peixes encontradas infetadas com anisacuídeos em água doce de Portugal

Continental são espécies de peixes diádromas (i.e., são peixes que migram entre a água doce e a água salgada) e, portanto, a infeção ocorreu no ambiente marinho ou em águas estuarinas (caso da enguia-europeia, *Anguilla anguilla*). No que concerne aos peixes encontrados até ao momento infetados em sistemas de aquacultura portuguesas, deve-se também referir que esses peixes infetados eram espécies de peixes que cresceram em ambiente selvagem e invadiram os sistemas de aquacultura.

Tabela 4. Produtos da pesca e mamíferos marinhos das águas portuguesas infetados com anisacídeos (Adaptado de Ferreira, 2013; Eiras, 2016; Mattiucci et al., 2017; Santos et al., 2017).

	Hospedeiro	Espécies de anisacídeos
	Cetáceos: <i>Delphinus delphis</i> , <i>Globicephala melaena</i> e <i>Stenella coeruleoalba</i>	<i>Anisakis simplex</i> (s.s.) e <i>Anisakis pegreffii</i> .
Águas costeiras de Portugal continental	Peixes: <i>Alosa alosa</i> , <i>Aphanopus carbo</i> , <i>Arnoglossus imperialis</i> , <i>Arnoglossus laterna</i> , <i>Belone belone</i> , <i>Citharus linguatula</i> , <i>Conger conger</i> , <i>Dicentrarchus labrax</i> , <i>Dicologlossa cuneata</i> , <i>Halobatrachus dydactylus</i> , <i>Helicolenus dactylopterus</i> , <i>Lepidorhombus boscii</i> , <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> , <i>Lophius piscatorius</i> , <i>Lophius</i> spp., <i>Merluccius merluccius</i> , <i>Microchirus azevia</i> , <i>Microchirus boscanion</i> , <i>Microchirus variegatus</i> , <i>Micromesistius poutassou</i> , <i>Molva dypterygia</i> , <i>Mugil cephalus</i> , <i>Pagellus bogaraveo</i> , <i>Platichthys flesus</i> , <i>Pleuronectes platessa</i> , <i>Pomatoschistus microps</i> , <i>Sardina pilchardus</i> , <i>Scomber colias</i> , <i>Scomber scombrus</i> , <i>Scorpena scrofa</i> , <i>Solea kleinii</i> , <i>Solea lascaris</i> , <i>Solea senegalensis</i> , <i>Solea solea</i> , <i>Solea</i> sp., <i>Spondyliosoma cantharus</i> , <i>Trachurus picturatus</i> , <i>Trachurus trachurus</i> , <i>Trigla lucerna</i> , <i>Trisopterus luscus</i> e <i>Zeugopterus regius</i> (= <i>Phrynorhombus regius</i>).	<i>Anisakis</i> sp.; <i>Anisakis simplex</i> (s.l.); <i>Anisakis simplex</i> (s.s.); <i>Anisakis pegreffii</i> ; <i>Anisakis simplex</i> (s.s.) x <i>Anisakis pegreffii</i> ; <i>Anisakis ziphidarum</i> ; <i>Anisakis physeteris</i> ; <i>Anisakis typica</i> ; <i>Hysterothylacium</i> sp.; <i>Hysterothylacium aduncum</i> ; <i>Hysterothylacium gadi</i> ; <i>Hysterothylacium magnum</i> ; <i>Hysterothylacium reliquens</i> e <i>Raphidascaaris acus</i> .
Águas costeiras da Madeira	Peixes: <i>Aphanopus carbo</i> , <i>Boops boops</i> , <i>Centrophorus squamosus</i> , <i>Conger conger</i> , <i>Diplodus vulgaris</i> , <i>Helicolenus dactylopterus</i> , <i>Pagellus bogaraveo</i> , <i>Scomber japonicus</i> , <i>Serranus atricauda</i> , <i>Thalassoma pavo</i> e <i>Trachurus picturatus</i>	<i>Anisakis</i> sp.; <i>Anisakis simplex</i> (s.l.); <i>Anisakis simplex</i> (s.s.); <i>Anisakis pegreffii</i> ; <i>Anisakis ziphidarum</i> ; <i>Anisakis physeteris</i> ; <i>Anisakis brevispiculata</i> ; <i>Hysterothylacium</i> sp.; <i>Hysterothylacium fabri</i> ; <i>Pseudoterranova ceticola</i> .
Águas costeiras dos Açores	Peixes: <i>Aphanopus carbo</i> , <i>Helicolenus dactylopterus</i> e <i>Pagellus bogaraveo</i> .	<i>Anisakis</i> sp.; <i>Anisakis simplex</i> (s.l.); <i>Anisakis simplex</i> (s.s.); <i>Anisakis simplex</i> (s.s.) x <i>Anisakis pegreffii</i> ; <i>Anisakis physeteris</i> e <i>Contraecaecum</i> sp.

Tabela 4. Produtos da pesca e mamíferos marinhos das águas portuguesas infetados com anisquídeos (Adaptado de Ferreira, 2013; Eiras, 2016; Mattiucci et al., 2017; Santos et al., 2017) (continuação).

Hospedeiro	Espécies de anisquídeos
Água doce de Portugal Continental	Peixes: <i>Alosa alosa</i> , <i>Alosa fallax</i> , <i>Anguilla anguilla</i> e <i>Salmo trutta fario</i> <i>Anisakis simplex</i> (s.l.); <i>Anisakis pegreffii</i> ; <i>Contracaecum</i> sp. e <i>Raphidascaris acus</i> .
Sistemas de aquacultura	Peixes: <i>Mugil cephalus</i> e <i>Pleuronectes platessa</i> <i>Hysterothylacium aduncum</i> e <i>Raphidascaris</i> sp.

1.5. Fatores que afetam a distribuição dos anisquídeos

1.5.1. Fatores abióticos

A temperatura média da superfície do mar, a distância à costa, a profundidade, a salinidade e a disponibilidade em nutrientes foram apontadas como as principais variáveis abióticas que afetam a ocorrência e abundância de anisquídeos numa zona de pesca (Kuhn, Cunze, Kochmann & Klimpel, 2016; Cipriani et al., 2018a).

Adicionalmente às variáveis abióticas que caracterizam um ecossistema marinho, existem também fenómenos oceanográficos que podem criar condições favoráveis ao aumento dos níveis de parasitismo. O *upwelling* ou afloramento costeiro é um fenómeno oceanográfico induzido pelo campo do vento que ocorre, entre outros locais, ao longo de toda a costa atlântica da Península Ibérica e consiste num movimento ascendente, junto à costa, de águas subsuperficiais mais frias e ricas em nutrientes (Hermida et al., 2012; Domingos et al., 2017; Levsen et al., 2018a). Este aporte de nutrientes junto à costa vai atrair vários hospedeiros de anisquídeos dos diversos níveis tróficos, favorecendo assim a transmissão de parasitas entre os hospedeiros (Kuhn, et al. 2016, Levsen et al., 2018a).

Quanto ao efeito da sazonalidade na intensidade do parasitismo, em alguns estudos verificou-se que esse efeito existia para algumas espécies de peixes (Podolska & Horbowy, 2003; Madrid, Galán-Puchades & Fuentes, 2012; Abattouy, Lopez, Maldonado, Benajiba & Martín-Sánchez, 2014). Estas variações sazonais podem estar associadas com as flutuações que se verificam ao longo do ano nas condições ambientais que indiretamente influenciam a migração de mamíferos marinhos (hospedeiros definitivos), a quantidade de ovos excretados no mar e a população de eufasídeos infetados no zooplâncton (Adroher, Valero, Ruiz-Valero & Iglesias, 1996; Mladineo & Poljak, 2014). Por outro lado, existem autores que defendem que, de forma geral, as infeções parasitárias nos peixes não variam sazonalmente, uma vez que a invasão

dos tecidos e órgãos dos peixes pelos parasitas é irreversível e, por isso, os parasitas vão-se acumulando gradualmente durante a vida do hospedeiro (McClelland, 2002).

1.5.2. Fatores bióticos

Diversos estudos encontraram uma correlação positiva entre o comprimento (idade) e o peso dos peixes com a prevalência e abundância parasitária (Borges, 2008; Madrid et al., 2012; Abattouy et al., 2014; Gomes, 2014; Ichalal et al., 2015; Molina-Fernández et al., 2015; Cipriani et al., 2018a,b; Levsen et al., 2018b). Esta correlação pode ser uma consequência direta do tempo que o peixe esteve a alimentar-se das presas infetadas até ser capturado, pois já foi verificado em vários estudos a acumulação destes parasitas ao longo da vida dos peixes (Bao et al., 2015; Cipriani et al., 2018b; Levsen et al. 2018b). Segundo Olson (1987), o aumento dos níveis de parasitismo com a idade reflete o longo tempo de vida das larvas de anisquídeos, que possivelmente vivem tanto tempo quanto o seu peixe hospedeiro. As diferenças na intensidade parasitária também podem ser explicadas pela ecologia alimentar de cada espécie e pelas alterações ontogenéticas ao longo do ciclo de vida dos peixes quanto às preferências alimentares (Costa, Pontes, Mattiucci & D'Amélio, 2003; Pascual, Rodríguez, Pierce, Hastie & González, 2018). A título ilustrativo deste último aspeto, sabe-se que a dieta do carapau-negrão varia com o comprimento do peixe; peixes com menos de 25 cm de comprimento alimentam-se predominantemente de copépodes, enquanto os peixes com mais de 25 cm de comprimento alimentam-se preferencialmente de cefalópodes e, no estudo de Costa, Khadem, Silva, Moreira & D'Amélio (2013), verificou-se que os espécimes de carapau-negrão com menos de 20 cm não se encontravam infetados com *Anisakis* spp. Noutros estudos também se verificou que os peixes de um nível trófico mais elevado acumulam mais parasitas (Abollo et al., 2001; Pascual et al., 2018).

O forte teor em lípidos nos músculos de determinados peixes, como a sarda, pode ser favorável à preferência das larvas de anisquídeos por se alojar nos músculos em detrimento da cavidade abdominal, ou seja, a composição do hospedeiro pode ser um fator que afeta a distribuição das larvas em menor ou maior número na musculatura (Levsen et al., 2018a). Contudo, atualmente ainda não existe evidência empírica suficiente quanto à capacidade das larvas de anisquídeos conseguirem alimentar-se ativamente e se desenvolverem dentro dos peixes que são os seus hospedeiros (Levsen et al., 2018a).

Outra explicação para a distribuição das larvas nos hospedeiros, pode ter a ver com os seus comportamentos alimentares ou a distância migratória para as larvas infetantes dentro dos mesmos (Cruz et al., 2007). Deste modo, espécies piscívoras como a pescada e o bacalhau adultos estão geralmente mais gravemente infetados com larvas de anisquídeos, em comparação com os peixes que se alimentam exclusivamente de plâncton como a sardinha, a

anchova e o capelím. Para além de temperaturas de armazenamento acima de 2°C, o comportamento de migração *post-mortem* para a musculatura dos peixes também é facilitado por uma distância muito curta de migração entre os órgãos viscerais e a musculatura dos peixes, como acontece em peixes pequenos como a anchova e a sardinha (Levsen et al., 2018b).

O sexo do peixe não parece estar significativamente associado com o grau de parasitismo ou a probabilidade de o peixe estar parasitado (Costa et al., 2003; Silva & Eiras, 2003; Borges, 2008; Abattouy et al., 2014).

Por fim, a capacidade de sobrevivência das larvas de anisacídeos também depende do sistema imunitário do peixe. O sistema imunitário do peixe hospedeiro, na tentativa de isolar as larvas e evitar a sua subsequente migração, produz cápsulas melanizadas que rodeiam a larva de forma a suprimir a sua vitalidade e a capacidade de invadir os tecidos do hospedeiro. Este sistema defensivo pode igualmente explicar a grande diferença entre a intensidade parasitária observada nos músculos e vísceras de muitas espécies de peixes estudadas. Além disso, a observação de um grande número de cápsulas melanizadas a rodear as larvas de anisacídeos na musculatura dos peixes é um sinal de que ocorreu migração *intra-vitam* (em vida), pois significa que o sistema imunitário do hospedeiro desenvolveu uma resposta a essa invasão larvar (Bernardi et al., 2011; Pascual et al., 2018).

1.5.3. Fatores antropogénicos

Existe uma prática corrente entre os pescadores dos países no sul da Europa de eviscerar os peixes a bordo das embarcações e, de seguida, descartar as vísceras no mar. Essas vísceras muitas vezes encontram-se extremamente infetadas com larvas de anisacídeos e, uma vez no mar, podem constituir fonte de alimento para peixes, cetáceos e aves marinhas, que podem assim ficar infetados (Abollo et al., 2001; Cipriani et al., 2018a,b). Além disso, os mamíferos marinhos, como hospedeiros definitivos, vão permitir também que o parasita se propague e se mantenha no ecossistema (Cipriani et al., 2018a). Esta prática parece estar relacionada com a necessidade de remover rapidamente as vísceras dos peixes extremamente infetadas com larvas de anisacídeos, cuja presença se não fossem atempadamente removidas, iria comprometer o valor comercial do peixe ao desembarque (Cipriani et al., 2018b). Este costume no sector da pesca pode, deste modo, contribuir para o agravamento da prevalência de larvas de anisacídeos nas zonas de pesca (Abollo et al., 2001).

1.6. Métodos de deteção de parasitas nos produtos da pesca

No sector da pesca e na indústria de transformação do pescado, os métodos atualmente utilizados são a inspeção visual e a transiluminação (ver Regulamento CE nº 2074/2005). Resultados recentes mostram que estes procedimentos são insuficientes para garantir a ausência de larvas de anisacídeos nos produtos de pesca que chegam ao mercado (Cipriani et al., 2015). Como tal, o desenvolvimento de novas tecnologias para a deteção de larvas de anisacídeos em pescado, que possam ser aplicadas em larga escala, sejam fáceis de aplicar, rápidas, sensíveis e específicas o suficiente para garantir a segurança do consumidor, tem despertado o interesse do sector da pesca e da comunidade científica, uma vez que estes parasitas são responsáveis por perdas económicas significativas neste sector da indústria e há um crescente alarmismo por parte da sociedade devido ao aumento do número de casos de doença relacionados com o consumo de pescado contaminado com estes parasitas (Cavallero et al., 2017; Pascual et al., 2018).

Segundo Llarena-Reino, González, Vello, Outeiriño e Pascual (2012), não existe uma relação significativa entre o número de larvas presentes no trato digestivo e as larvas presentes na musculatura e, portanto, independentemente do método utilizado, as larvas devem ser sempre pesquisadas nos dois locais.

1.6.1. Inspeção visual

A inspeção visual consiste num exame visual, não destrutivo, dos peixes e produtos da pesca, que deve ser realizado por pessoas qualificadas em condições de iluminação adequadas (Regulamento CE nº 2074/2005).

Na inspeção visual as larvas de *Pseudoterranova* spp., devido à sua maior dimensão (10 a 60 mm de comprimento) e coloração amarela a avermelhada, são mais fáceis de identificar à vista desarmada do que as larvas de *Anisakis* spp., que são comparativamente menores em dimensão (10 a 40 mm de comprimento) e a sua coloração transparente ou esbranquiçada faz com que muitas vezes sejam difíceis de detetar, principalmente na musculatura branca do peixe (Longshaw, 2012a,b; Measures, 2014). Tal como as larvas de *Hysterothylacium* spp., as larvas de *Pseudoterranova* spp. podem migrar do peixe após a sua morte, saindo pela abertura anal, boca ou brânquias, pelo que estes dois anisacídeos podem ser confundidos entre si (Measures, 2014). No salmão, o ânus protundido e avermelhado pode indicar infeções histozóicas (nos tecidos) desta região por *Anisakis* spp. (Longshaw, 2012a).

Hysterothylacium spp. é um nematode relativamente grande no estado adulto, quando comparado com os outros anisacídeos. As fêmeas adultas deste parasita podem atingir um comprimento de quase 8 cm e os machos em geral são de menores dimensões em relação às

fêmeas (Berland, 1991). No estudo de Costa et al. (2013), as larvas de *Hysterothylacium* spp. encontradas em espécimes de garoupa apresentavam um comprimento total compreendido entre 10 a 25 mm.

Ao exame visual as larvas de *Contracaecum* spp. apresentam uma cor castanho-esverdeada, por vezes com laivos de vermelho e medem entre 7 a 30 mm de comprimento (Smith & Wootten, 1984; Dixon, 2006).

As larvas de anisquídeos podem encontrar-se encapsuladas ou livres nos tecidos, dependendo do hospedeiro que infetam, temperatura ou tempo de infeção (i.e., se a infeção ocorreu há muito ou pouco tempo) (Measures, 2014).

1.6.2. Transiluminação

A transiluminação é um processo não destrutivo de deteção de nematodes em filetes de peixe utilizado nas indústrias de transformação de pescado. Neste método, os filetes de peixe são fatiados segundo uma espessura pré-determinada e são colocados sobre mesas iluminadas. A luz projetada das mesas ao atravessar o filete permite que os trabalhadores observem os parasitas (sombas escuras na musculatura) e os removam com a ajuda de uma pinça. A eficácia deste método depende de vários fatores como a espessura do filete, o número de larvas de anisquídeos presentes, o tamanho dos parasitas, intensidade da luz utilizada e a experiência e fadiga do observador (EFSA, 2010; Measures, 2014).

1.6.3. Prensagem e UV

O método de prensagem e irradiação UV utiliza a fluorescência das larvas de anisquídeos congeladas e baseia-se na inspeção visual sob luz UV de filetes ou vísceras de peixes previamente prensados e totalmente congelados. Tal como muitos outros microrganismos eucariotas, os nematodes anisquídeos acumulam lipofuscina (pigmento auto-fluorescente) dentro das células. Quando há lise celular, a lipofuscina é libertada e após excitação das larvas com luz ultravioleta, estas ficam mais brilhantes do que os tecidos dos peixes em volta. Qualquer larva de anisquídeo que esteja presente aparece assim como um ponto fluorescente na amostra. Contudo, o brilho depende de vários fatores, como a espécie de anisquídeo envolvida, o seu tamanho e idade, o grau de encapsulamento e, possivelmente, se o ciclo de congelação-descongelação afetou a integridade das larvas. Atualmente, o método de prensagem e irradiação UV e o método de digestão artificial são os mais eficazes na deteção de larvas de anisquídeos e, por isso, cada vez mais estas técnicas são utilizadas, principalmente em estudos científicos de larga escala (Levsen et al., 2018b).

1.6.4. Digestão Artificial

O método de digestão artificial foi descrito pela primeira vez por Smith e Wotten em 1975 e envolve a preparação de uma solução de digestão, que digere os tecidos que envolvem o nematode, deixando-o intacto (Brooker, Shinn, Wootten & Bron, 2012).

A digestão com pepsina constitui um instrumento valioso para a detecção de nematodes anisaquídeos na musculatura dos peixes. Quando aplicada a filetes de peixe frescos, esta técnica mantém os parasitas vivos e disponíveis para identificação usando metodologias moleculares. Além disso, permite também a recuperação de parasitas mortos provenientes de amostras congeladas. A única limitação do método de digestão é que é moroso e difícil de adotar na indústria, devido ao grande número de amostras de peixe que são necessárias analisar a nível industrial (Cipriani et al., 2015).

1.6.5. Novos métodos de detecção

Para responder às necessidades da indústria do pescado, um grupo de investigadores desenvolveu uma técnica proteómica capaz de detetar em menos de duas horas a presença de anisaquídeos, através da descoberta de um marcador proteico que é mensurável a partir de espectrometria de massa (Carrera, Gallardo, Pascual, González & Medina, 2016). Outro grupo de investigadores, validou também recentemente um kit comercial “PATHfinder *Anisakis/Pseudoterranova* DNA detection assay”, baseado na técnica de PCR *multiplex* em tempo real para a detecção qualitativa de *Anisakis* e *Pseudoterranova*, utilizando a sonda TaqMan e os *primers* específicos para a amplificação do fragmento ITS do DNA nuclear (Cavallero et al., 2017). Este kit está disponível em dois formatos: um formato que permite a realização de 50 reações e outro que permite a realização de 100 reações de PCR *multiplex* em tempo real (Generon, 2018).

1.7. Métodos de identificação de anisaquídeos

1.7.1. Identificação morfológica

Morfologicamente, os anisaquídeos caracterizam-se por apresentar um corpo cilíndrico, não segmentado, pontiagudo nas extremidades, revestido por uma cutícula que apresenta estriações finas e transversais (Borges, 2008). Possuem um tubo digestivo completo, simples, constituído por uma abertura bucal com dente larvar, esófago (estrutura muscular), ventrículo (estrutura glandular, que em função do género pode apresentar um apêndice ventricular posterior), intestino (com ceco intestinal anterior em alguns géneros) e ânus (Moravec, 1994; Borges, 2008). O sistema excretor é assimétrico e composto por uma glândula, cujo ducto

excretor corre para um poro excretor que, dependendo do género, se localiza próximo dos lábios ou próximo do anel nervoso (Moravec, 1994; Borges, 2008).

Para diferenciar os quatro géneros com maior interesse em saúde pública (*Anisakis* spp., *Pseudoterranova* spp., *Contraecum* spp. e *Hysterothylacium* spp.) faz-se a observação de cada larva, com a ajuda de um microscópio ótico, de três regiões principais: extremidade anterior, região ventricular e extremidade posterior. Na tabela 5, encontram-se resumidas as principais diferenças e esquemas ilustrativos das estruturas que permitem identificar cada uma das formas larvares de terceiro estágio (L3).

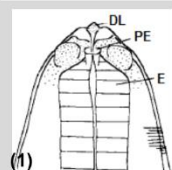
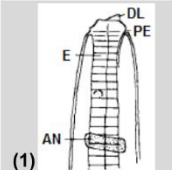
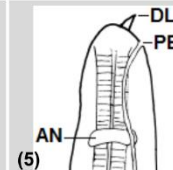
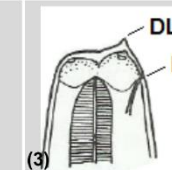
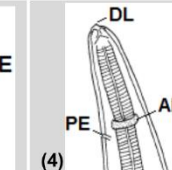
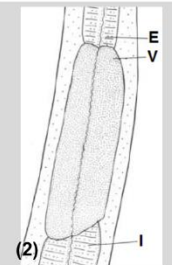

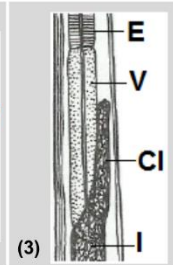
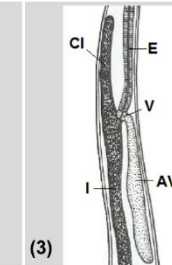
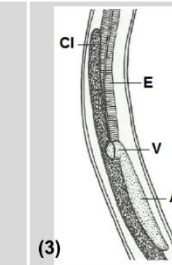
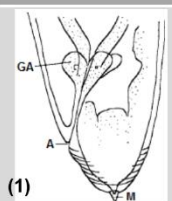
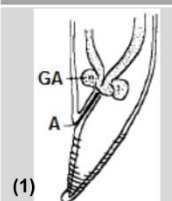
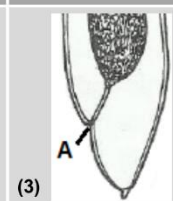
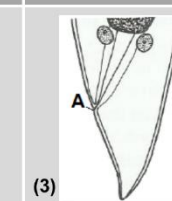
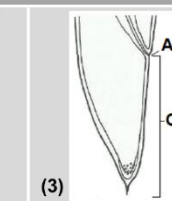
Com base exclusivamente em características morfológicas, as larvas de *Anisakis* spp. apenas conseguem ser identificadas em dois tipos, tipo I e tipo II. As larvas do tipo I têm um ventrículo longo e um *mucron* na extremidade da cauda, enquanto as larvas do tipo II têm um ventrículo curto e uma extremidade da cauda desprovida de *mucron* (Berland, 1961). Atualmente, com a utilização de técnicas moleculares, conseguiu-se identificar que as larvas de *Anisakis* do tipo I correspondem às larvas de *Anisakis simplex* (s.l.), *Anisakis typica*, *Anisakis ziphidarum* e *Anisakis nascetti*. Por sua vez, as larvas de *Anisakis* do tipo II correspondem às larvas de *Anisakis physeteris*, *Anisakis brevispiculata* e *Anisakis paggiae* (Mattiucci & Nascetti, 2008).

As larvas de *Hysterothylacium* spp. são difíceis de identificar morfológicamente e dada a sua similitude com as larvas de *Contraecum* spp. e *Iheringascaris* spp., são por vezes incorretamente classificadas como pertencendo a estes últimos géneros (Borges, Cunha, Santos, Monteiro-Neto & Santos, 2012).

Num estudo realizado no âmbito de um projeto internacional, o HOMISIR, que visava clarificar a estrutura das populações (*stocks*) de carapau (*Trachurus trachurus*) nas águas europeias, verificou-se que as larvas de *Anisakis* spp. e *Hysterothylacium aduncum* são os marcadores biológicos mais eficazes para este tipo de finalidade (Mackenzie et al., 2008).

Além disso, como já foi referido anteriormente *H. aduncum* é uma espécie extremamente comum no Norte do Atlântico e mar Mediterrâneo (Abdel-Ghaffar et al., 2015). Como tal, na tabela 5 encontra-se a referência específica às características morfológicas de larvas de *H. aduncum*.

Tabela 5. Resumo das características morfológicas das principais L3 de anisacídeos. Tabela elaborada pela autora com figuras retiradas dos trabalhos de: (1) Berland (1961); (2) Smith (1983); (3) Moravec (1994); (4) Guo, Xu, Zhang, Hu e Li (2014); (5) Longshaw (2012b).

	<i>Anisakis</i> tipo I	<i>Anisakis</i> tipo II	<i>Pseudoterranova</i> spp.	<i>Contracaecum</i> spp.	<i>Hysterothylacium aduncum</i>
Extremidade Anterior					
	Similar, exceto o poro excretor de <i>Hysterothylacium aduncum</i> localizado ao nível do anel nervoso e nos restantes localiza-se ao nível da base dos lábios.				
Região Ventricular					
	Ventrículo alongado e junção ventrículo-intestino oblíqua.	Ventrículo curto e junção ventrículo-intestino horizontal.	Ventrículo alongado com ceco intestinal anterior presente.	Ventrículo pequeno, apêndice ventricular posterior e ceco intestinal anterior presentes.	
Extremidade Posterior					
	Cauda arredondada com <i>mucron</i> .	Cauda longa e cônica sem <i>mucron</i> .	Cauda arredondada com <i>mucron</i> .	Cauda cônica sem <i>mucron</i> .	Cauda cônica que termina num bulbo levemente arredondado com a "cactus-tail" no interior.

Legendas: B: boca; E: esófago; V: ventrículo; A: ânus, DL: dente larvar; PE: poro excretor; AN: anel nervoso; I: intestino; CI: ceco intestinal; AV: apêndice ventricular; GA: glândulas anais; M: *mucron*; C: cauda.

Devido à existência de numerosas espécies crípticas e à ausência de estruturas sexuais desenvolvidas que permitam uma identificação inequívoca, a identificação das larvas do terceiro estágio larvar ao nível da espécie, só pode ser confirmada recorrendo a técnicas moleculares (Mattiucci & Nascetti, 2008). Contudo, atualmente, a chave de identificação morfológica (*sensu* Berland, 1961) continua a ser utilizada em alguns estudos, nos quais se combina a caracterização morfológica com uma identificação genética (Cipriani et al., 2018b).

1.7.2. Métodos bioquímicos: Eletroforese de enzimas *multilocus* (MEE)

Esta metodologia baseia-se no princípio de que, apesar de catalisarem a mesma reação, as isoenzimas são proteínas que diferem na sua sequência de aminoácidos entre os diferentes grupos de anisquídeos e, por isso, têm diferentes pesos moleculares e cargas elétricas, o que as tornam uma ferramenta útil como marcadores genéticos para identificar espécies conhecidas ou fazer a descrição de novas espécies (Seesao et al., 2017; Cipriani et al., 2018b). Após a extração das enzimas intracelulares dos organismos a serem identificados, através de uma corrida num gel de eletroforese horizontal em condições não desnaturantes, é possível fazer a separação das isoenzimas de acordo com a sua carga elétrica, peso molecular e conformação (Seesao et al., 2017; Levsen et al., 2018b). Este método requer o processamento individual de cada amostra, que pode ser obtida de espécimes frescos ou congelados e é necessária a comparação em simultâneo com um espécime de referência que esteja bem identificado. Apesar destas limitações, por ser uma técnica de baixo custo e pouco morosa, já foi possível identificar a nível de espécie um grande número de anisquídeos e em conjunto com as metodologias baseadas em PCR e a sequenciação genética, permitiram um avanço considerável no conhecimento relativamente à diversidade de espécies existentes e a sua composição em termos genómicos (Kuhn, Hailer, Palm & Klimpel, 2013; Seesao et al., 2017).

1.7.3. Métodos moleculares

As técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas para identificar nematodes Anisakidae obtidos de amostras de peixes ou mamíferos quer a partir de amostras frescas ou congeladas, como acontece na técnica de eletroforese de enzimas *multilocus*, quer a partir de amostras preservadas em álcool ou formaldeído (Seesao et al., 2017). São técnicas que permitem não só fazer a discriminação entre espécies de anisquídeos, como também permitem identificar genótipos recombinantes como os híbridos F1 de *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* (Meloni et al., 2011). Para isso, é fundamental a identificação e seleção de uma região de DNA adequada (marcador genético), de forma a obter resultados seguros na identificação molecular (Seesao et al., 2017).

Vários genes foram selecionados e utilizados para a identificação de nematodes através de PCR ou por técnicas baseadas em PCR, assim como para sequenciação genética. De uma forma geral, têm sido utilizadas sequências de DNA nuclear e mitocondrial como marcadores genéticos.

O DNA ribossómico nuclear eucariótico (rDNA) é uma família multigénica que consiste em repetições em *tandem* de genes intercalados com espaçadores transcritos e não transcritos. As sequências de rDNA exibem um padrão de evolução concertada, que é o termo utilizado para

descrever um comportamento evolutivo incomum nas famílias multigênicas cujos genes mostram muitas semelhanças entre si dentro de um conjunto e dentro de uma espécie, mas que acumulam diferenças entre espécies. Como consequência da evolução concertada, vários estudos têm demonstrado que a região ITS (ITS, 5.8S e ITS2) do rDNA fornece marcadores genéticos úteis para a identificação precisa de anisacídeos (Abollo et al., 2003; Farjallah et al., 2008). Além destes marcadores nucleares, um novo marcador nuclear baseado na análise de sequências do *locus* do DNA nuclear que codifica o factor de alongamento EF1 α -1 foi recentemente utilizado e demonstrou capacidade em identificar corretamente as duas espécies crípticas *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii*, devido à existência de diferenças nucleotídicas em determinadas posições fixas neste segmento de DNA (Cipriani et al., 2018b).

Entre as sequências de DNA mitocondrial (mtDNA), as mais frequentemente utilizadas são as sequências da citocromo oxidase 2 (mtDNA *cox 2*) (Valentini et al., 2006; Mattiucci et al., 2014; Cipriani et al., 2015, 2018b), mas também já foram utilizadas em estudos para identificar anisacídeos as sequências da pequena subunidade do RNA ribossômico (rRNA) (Nadler et al., 2005; Mattiucci et al., 2014), assim como da citocromo oxidase 1 (mtDNA *cox 1*) do genoma mitocondrial (Cross et al., 2007; Keskin et al., 2015).

Apesar do mtDNA necessitar da utilização de outras características para a identificação das espécies híbridas de anisacídeos e para a determinação do seu grau de hibridização, é particularmente útil para identificar as espécies parentais envolvidas na produção de híbridos, uma vez que a maioria dos genomas mitocondriais são herdados da parte materna, representando, deste modo, o conjunto de genes que não são sujeitos à recombinação sexual (Abollo et al., 2003).

Para além das vantagens já referidas, as técnicas moleculares baseadas em PCR são técnicas que necessitam de apenas pequenas quantidades de amostra e, ao contrário da identificação morfológica, podem ser aplicadas em amostras de parasitas danificadas ou fragmentadas (D'Amelio et al., 2000; Mattiucci et al., 2015a).

De entre as várias técnicas baseadas em PCR, existe a técnica de PCR-*multiplex* que já permitiu a identificação de várias espécies de nematodes pertencendo ao género *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium* ou *Contracaecum* presentes em várias espécies de peixes de valor comercial. Nesta técnica são utilizados vários *primers forward* específicos de cada espécie direcionados para amplificar uma região do DNA específica, por exemplo, a região ITS do DNA nuclear e um único *primer reverse* universal para todas as espécies. Os produtos finais amplificados específicos de cada espécie são de tamanhos diferentes, o que possibilita assim a sua identificação. A técnica de PCR-*multiplex* permite um ganho de tempo, uma vez que a

presença de várias espécies de anisaquídeos pode ser rastreada numa única corrida (Seesao et al., 2017).

A sequenciação de alguns genes de DNA é útil para a identificação das diferentes espécies de *Anisakis*, incluindo as espécies irmãs ou crípticas. As sequências de genes nucleares e mitocondriais estão disponíveis para quase todas as nove espécies reconhecidas dentro do género *Anisakis* (Mattiucci et al., 2015a).

2. Doença causada pelos nematodes das famílias Anisakidae e Raphidascarididae

2.1. Nomenclatura da doença

Devido à grande controvérsia quanto à terminologia das doenças parasitárias e à utilização indiscriminada dos sufixos -ose e -íase, numa tentativa de normalizar a grafia das doenças parasitárias em Medicina Veterinária, num acordo internacional entre especialistas nomeados pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP), publicado na revista *Veterinary Parasitology*, com o título de *Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases* (SNOAPAD), foi estabelecido que apenas se deve utilizar o sufixo -ose associado ao nome do género do agente etiológico para designar a doença causada por esse parasita nos animais (Kassai et al., 1988). Por oposição, normalmente em Medicina Humana é utilizado preferencialmente o sufixo -íase na grafia das doenças parasitárias (Jacobs, Fox, Gibbons & Hermosilla, 2015). Como tal, neste trabalho optou-se por utilizar o sufixo -ose na grafia da doença nos animais e o sufixo -íase na grafia da doença nos humanos.

2.2. Doença nos mamíferos marinhos

Existem evidências que sugerem que alguns hospedeiros definitivos diferem no grau de suscetibilidade aos parasitas, no número de parasitas que contêm em si (intensidade parasitária), na capacidade dos parasitas em crescer e se reproduzir neles e nas suas respostas à infeção por *Anisakis* spp. ou *Pseudoterranova* spp. Por exemplo, alguns cetáceos como a baleia-anã e baleia-branca ou beluga podem conter um grande número de *A. simplex* de tamanho considerável e elevada taxa de oviposição, enquanto nos golfinhos marinhos e nos botos (toninhas) a intensidade da infeção geralmente é baixa, normalmente são larvas ou adultos de pequenas dimensões com uma taxa de oviposição comparativamente menor (Measures, 2014).

No trato gastrointestinal dos hospedeiros definitivos, os anisaquídeos são normalmente inofensivos, mesmo quando estão presentes em grande número, contudo já foram reportadas lesões graves em alguns hospedeiros. Geralmente, os anisaquídeos fixam-se nas mucosas em

grupos compostos por dezenas a centenas de nematodes e essa fixação pode provocar úlceras ou erosões no local de fixação (Measures, 2014).

Nos cetáceos, nematodes adultos de *Anisakis* spp. são encontrados principalmente no primeiro compartimento do estômago que se designa por estômago anterior ou mecânico, por vezes no estômago glandular ou fúndico (segundo compartimento) e raramente no estômago pilórico (terceiro estômago). Os parasitas no intestino são indicativos de migrações aberrantes, infeções debeladas pelo sistema imunitário do hospedeiro ou do envelhecimento dos parasitas com o decorrer da parasitose. Nos pinípedes, parasitas adultos de *Pseudoterranova* spp. e *Contracaecum* spp. são encontrados no seu único estômago, pois são monogástricos (Dailey, 2001; Measures, 2014). Tanto a presença de larvas de *Anisakis* spp., como de *Pseudoterranova* spp, pode provocar inflamação do estômago (gastrite) e do intestino (enterite). Em casos extremos, os parasitas podem perfurar a parede intestinal e entrar na cavidade corporal, causando hemorragias, infeções bacterianas secundárias, inflamação da parede gástrica, intestinos e órgãos adjacentes (peritonite), podendo conduzir à morte do animal (Measures, 2014).

O diagnóstico de infeção por anisacídeos normalmente é efetuado através da observação de ovos nas fezes (Dailey, 2001).

Em golfinhos em cativeiro, geralmente faz-se um tratamento profilático de rotina com ivermectina ou febendazol, para prevenir a formação de grandes cargas parasitárias (Dailey, 2001).

2.3. Doença nos peixes

Existem evidências em estudos que indicam que as larvas de *Hysterothylacium aduncum* são capazes de provocar elevadas taxas de mortalidade nas larvas de peixes infetadas (Balbuena, Karlsbakk, Kvenseth, Saksvik & Nylund, 2000; Rello, Adroher & Valero, 2008). No estudo de Balbuena et al. (2000), foram apontadas algumas razões para essas elevadas taxas de mortalidade verificadas nas larvas de arenque, provocadas por larvas desse parasita. Nomeadamente, (1) as migrações das larvas de anisacídeos nas larvas dos peixes podem afetar órgãos vitais como o coração e o cérebro e, (2) as larvas de *H. aduncum* que penetram na musculatura podem prejudicar a capacidade de natação das larvas de peixes, sendo fatal para esses organismos delicados. Do mesmo modo, em relação às larvas de *Anisakis* spp., também já foi verificado que podem matar os peixes jovens, de pequena dimensão, quando os seus órgãos vitais são danificados pela migração das larvas desse género de parasita (Measures, 2014). Pelo contrário, apesar de se ter encontrado elevadas frequências de infeção com larvas de anisacídeos em algumas espécies de peixes adultos, este elevado índice de

parasitismo parece ter baixa patogenicidade para estes, uma vez que independentemente dos peixes estarem muito ou pouco parasitados, o parasitismo não mostrou ter um impacto negativo na condição corporal dos peixes examinados (Ichalal et al., 2015; Cipriani et al., 2018a).

Contudo, apesar das larvas de anisquídeos parecerem causar patologia pouco expressiva em peixes adultos, uma doença conhecida por *red-vent syndrome* (RVS) tem sido associada a infecções maciças com larvas de *Anisakis* spp. em salmão-do-atlântico selvagem. Esta doença tem sido reportada no Atlântico Norte e caracteriza-se pelo aparecimento de petéquias acompanhadas de eritema em torno da abertura anal no caso de infecções leves ou um edema pronunciado, hemorragia, erosão da camada exterior da pele, perda de escamas e dermatite no caso de infecções graves por *Anisakis* spp. Desconhecem-se ainda as causas desta doença, mas a RVS pode ser um sinal externo de peixes extremamente parasitados. Contudo, foi apenas estabelecida uma fraca correlação entre a intensidade de larvas de *Anisakis* spp. em infecções no salmão-do-atlântico selvagem com o RVS, sugerindo que outros fatores podem estar envolvidos nesta síndrome, como o estado imunitário, *stress*, temperatura da água e momento das infecções. Níveis elevados de infecções têm sido observados em salmões adultos que retornam à água-doce para desovar e, aparentemente, após a desova, as lesões resultantes do RVS no salmão-do-atlântico tendem a melhorar. Atualmente, não existem ainda evidências de que o RVS provoque mortalidade ou impeça a desova do salmão, contudo mais estudos são ainda necessários para o provar (Measures, 2014).

No caso de *Hysterothylacium* spp., não parece ser um verdadeiro parasita para os seus hospedeiros definitivos, pois acredita-se que penetra e fragmenta a comida ingerida pelo hospedeiro, acelerando assim o processo de digestão. Se essa hipótese estiver correta, trata-se assim de um caso de mutualismo (Berland, 1991).

2.4. Doença no homem

2.4.1. Definição e particularidades da doença

A anisquíase, no sentido estrito, refere-se à doença zoonótica transmitida ao homem pela ingestão acidental de larvas de terceiro estágio larvar viáveis do género *Anisakis* (família Anisakidae), contidas em produtos da pesca que são consumidos crus ou insuficientemente cozinhados (Carmo, Marques, Bispo & Serra, 2017; Bao et al., 2017; Cipriani et al., 2018b). Por outro lado, anisquidíase é um termo mais amplo para definir a doença zoonótica provocada no homem pelas larvas dos nematodes da família Anisakidae e Raphidascarididae, vulgarmente conhecidos por anisquídeos (Measures, 2014; Picó-Durán, Pulleiro-Potel, Abollo, Pascual & Muñoz, 2016). Contudo, verifica-se frequentemente a utilização do termo anisquíase para definir a doença humana causada tanto por larvas de *Anisakis* spp., como por larvas de

anisaquídeos dos outros géneros (e.g., EFSA, 2010; Pravettoni, Primavesi & Piantanida, 2012; Brooker, Wootten, Shinn, & Bron, 2016; Castellanos, et al., 2017).

De entre os vários géneros de anisaquídeos, os géneros *Anisakis* e *Pseudoterranova*, em particular, os complexos de espécies de *Anisakis simplex* e *Pseudoterranova decipiens*, são apontados como os principais agentes etiológicos de anisaquidíase. As larvas do género *Contraecum* da mesma família e as larvas do género *Hysterothylacium* da família Raphidascarididae raramente têm sido associadas a doença nos humanos (Cavallero et al., 2015, 2017; Picó-Durán et al., 2016). Inclusivamente, as larvas de *Hysterothylacium* spp. são frequentemente consideradas não patogénicas para os seres humanos e não existem evidências de que consigam sobreviver à temperatura corporal humana (Adroher et al., 1996; Cavallero et al., 2015). Num estudo verificou-se que 16°C é a temperatura ótima para a sobrevivência das larvas de *H. aduncum in vitro* e que as larvas desse nematode apenas conseguem sobreviver durante algumas horas a uma temperatura de 37°C (Adroher et al., 1996). De facto, aparentemente só foram registados dois casos de anisaquidíase provocada por *H. aduncum* em todo o mundo. O primeiro caso foi reportado por Yagi et al. (1996) e o segundo caso foi reportado por González-Amores, Clavijo-Frutos, Salas-Casanova e Alcain-Martínez (2015). Em ambos os casos, assim que as larvas foram expelidas ou removidas dos pacientes, estes deixaram de ter sintomas.

A infeção por estes helmintes tem algumas particularidades em relação às infeções provocadas por outros helmintes. Geralmente, as infeções por helmintes não são acompanhadas por reações de hipersensibilidade, apesar da sua presença no organismo humano estar associada com a produção de níveis elevados de IgE e, normalmente, induzem doenças de carácter crónico, mesmo nos casos em que uma elevada carga parasitária está presente. Isto acontece porque os helmintes desenvolveram mecanismos de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, de forma a garantir a sua sobrevivência. As exceções incluem infeções por *Echinococcus granulosus* (a rotura traumática ou cirúrgica de quistos hidáticos pode levar a um choque anafilático que pode ser fatal) e a anisaquidíase (Audicana, Ansotegui, de Corres, & Kennedy, 2002; Audicana & Kennedy, 2008). A anisaquidíase é peculiar, na medida em que o parasita não está adaptado a viver nos seres humanos e por isso a infeção é normalmente transitória, além de que em 90% dos casos basta apenas uma larva para provocar a doença (Audicana & Kennedy, 2008).

2.4.2. As diferentes formas clínicas da doença

Após a ingestão acidental das larvas de anisaquídeos, estas podem permanecer no lúmen do trato gastrointestinal sem penetrar nos tecidos, causando uma infeção normalmente

assintomática ou com ligeiros sintomas digestivos, que acabam por passar com as larvas sendo naturalmente expulsas pelo organismo, através da tosse, vómito ou defecação, após umas horas, dias ou semanas o consumo do produto da pesca infetado ter ocorrido e é dessa forma que, muitas vezes, os indivíduos afetados se apercebem da presença do parasita. A esta forma da doença chama-se, por isso, forma não invasiva, ou luminal (Mattiucci et al., 2015a; Lymbery & Walters, 2014; Measures, 2014).

Na generalidade da literatura, dentro das formas invasivas de anisacuídase (i.e., com penetração da larva na parede do trato gastrointestinal), consideram-se quatro formas clínicas de doença nos humanos, dependendo da localização e da gravidade das lesões provocadas pelas larvas destes parasitas (Audicana & Kennedy, 2008; Pravettoni et al., 2012; Colombo, Cattaneo, Castelletti & Bernardi, 2016). As quatro principais formas clínicas de doença nos humanos são: a forma gástrica, a forma intestinal, a forma ectópica (ou extra-gastrointestinal) e a forma alérgica. Sendo que, em relação à forma alérgica, até ao momento, *A. simplex* (s.l.), principalmente *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii*, foram as únicas espécies identificadas como agentes etiológicos de reações alérgicas mediadas por IgE e, por isso, a alergia a *A. simplex* (s.l.) será abordada mais em pormenor num tópico mais à frente (Audicana & Kennedy, 2008; Ramos, 2011; Bao et al., 2015; Casti et al., 2017).

Os sintomas de anisacuídase gástrica ou intestinal surgem quando as larvas perfuram as mucosas gástrica ou intestinal pela ação do seu dente larvar e das enzimas proteolíticas (proteases) que produzem, causando lesões erosivas e/ou hemorrágicas na zona afetada e ao mesmo tempo induzem uma resposta inflamatória essencialmente local, que pode levar a uma infiltração maciça de eosinófilos e à formação de granulomas no trato gastrointestinal, caso as larvas não sejam removidas do organismo (Ichalal et al., 2015; Audicana & Kennedy, 2008; Nieuwenhuizen, 2016). Os sintomas da anisacuídase gástrica aguda surgem imediatamente nas primeiras horas seguintes à ingestão das L3 viáveis, geralmente entre uma a doze horas após o consumo do produto da pesca infetado e caracterizam-se por uma dor epigástrica súbita e intensa, náuseas, vómitos, diarreia e febre ligeira. Caso a doença não seja diagnosticada, nem tratada, pode evoluir para uma situação crónica, com sintomas muito semelhantes aos de uma úlcera, tumor gástrico, gastrite aguda ou colecistite (Pravettoni et al., 2012; Lymbery & Walters, 2014; Measures, 2014; Baptista-Fernandes et al., 2017). Os sintomas da anisacuídase intestinal aguda são menos específicos, semelhantes às síndromes do abdómen agudo, como obstrução intestinal, apendicite ou peritonite e caracterizam-se por um quadro de distensão e dor intensa no quadrante inferior abdominal, em especial, no quadrante inferior abdominal direito, que pode ser constante ou intermitente, acompanhado de náuseas, vómitos, febre, diarreia ou obstipação e sangue oculto nas fezes, tendo início normalmente um a sete dias após a ingestão

acidental do parasita (Pravettoni et al., 2012; Lymbery & Walters, 2014; Measures, 2014; Castellanos et al., 2017). A infecção intestinal ocorre principalmente no íleo terminal e é menos frequente ocorrer no jejuno ou cólon. Raramente podem surgir complicações como obstrução intestinal e estenose no íleo resultantes de uma inflamação muito intensa, invaginação intestinal por alterações na motilidade intestinal, perfuração intestinal e consequentemente pneumoperitoneu (Pravettoni et al., 2012).

Por vezes, alguns indivíduos apresentam sintomatologia digestiva associada com uma reação alérgica de hipersensibilidade do tipo I, que se manifesta por urticária, angioedema ou anafilaxia, em resposta à infecção parasitária. Esta forma de apresentação até ao momento foi associada apenas à presença de larvas vivas de *Anisakis simplex* (s.l.) e, como tal, é conhecida por anisaquíase gastroalérgica (Ramos, 2011).

Ocasionalmente, pode ocorrer uma forma ectópica de anisaquidíase, na qual as larvas perfuram completamente a parede gastrointestinal e migram para a cavidade abdominal, podendo localizar-se em diferentes órgãos e tecidos (*larva migrans visceralis*), tais como a faringe, a língua, pulmão, cavidade peritoneal, gânglios linfáticos, tecidos subcutâneos ou pâncreas (Lymbery & Walters, 2014; Nieuwenhuizen, 2016; Casti et al., 2017; Baird, Morishima & Sugiyama, 2017). Uma vez que as larvas podem migrar para diferentes locais, a gravidade das lesões que provocam varia consoante o local em que se alojam. Geralmente quando as larvas se alojam no peritoneu ou tecidos subcutâneos, formam granulomas eosinofílicos ou abscessos, que podem ser confundidos com tumores (Lymbery & Walters, 2014).

Independentemente da forma clínica de anisaquíase (i.e., doença parasitária provocada por larvas vivas de *Anisakis* spp.), o indivíduo pode ficar sensibilizado e desenvolver uma reação alérgica numa futura exposição ao parasita ou a componentes do parasita (alergénios) (Audicana & Kennedy, 2008).

2.4.3. Dados epidemiológicos da doença e caracterização do risco para a saúde

O primeiro caso humano de anisaquidíase foi reportado na Holanda na década de 60 do século XX (Van Thiel, 1962). Desde então, até ao ano de 2010, foram registados aproximadamente 20.000 casos de anisaquidíase em todo o mundo, mais de 90% dos quais ocorridos no Japão, onde o consumo de peixe cru é comum, sendo os restantes provenientes maioritariamente da Espanha, Holanda e Alemanha (EFSA, 2010).

A incidência de casos continua a aumentar a nível mundial, sendo que num estudo realizado no Japão, no ano de 2013, foi efetuada uma estimativa de aproximadamente 7000 casos de anisaquíase a ocorrer anualmente nesse país (*National Institute of Infectious Diseases* [NIID], 2017), o que é um número consideravelmente superior à estimativa de 2000 casos por ano referidos anteriormente por Audicana et al. (2002). Mais recentemente, também Bao et al.

(2017) efetuaram uma estimativa de 7700 a 8320 casos por ano em Espanha que necessitaram de intervenção médica e, adicionalmente, estimaram que 0,66 *Anisakis* spp. são consumidos por refeição de anchova crua ou marinada nesse país.

Para este crescente número de casos de anisacuídiase que se tem observado em todo o mundo têm sido atribuídas diversas razões: (1) aumento da prevalência de parasitismo nos peixes, que pode afetar entre 40 a 80% das capturas, dependendo da espécie e origem dos peixes; (2) aumento das populações de mamíferos marinhos (hospedeiros definitivos destes parasitas) como resultado de medidas de conservação de espécies e a sua coexistência com os produtos da pesca nas zonas de pesca; (3) aumento do interesse em consumir pratos exóticos feitos à base de peixe cru ou pouco cozinhado, especialmente em muitos países ocidentais; (4) utilização de utensílios de cozedura de alimentos mais rápidos (e.g., micro-ondas, particularmente na cozedura de grandes peças de pescado, visto que a profundidade de aquecimento destes equipamentos de cozinha é limitada, é mais difícil garantir um aquecimento uniforme e a superfície do alimento aquece mais rapidamente do que o seu centro térmico) e uma tendência crescente para não cozinhar em demasia os alimentos; (5) os benefícios reconhecidos da dieta mediterrânica (caraterizada em parte pelo alto consumo de peixe) para prevenir doenças cardíacas e, conseqüentemente, a crescente procura por produtos da pesca; e (6) melhores métodos e capacidade de diagnóstico (e.g., identificação molecular dos parasitas removidos por endoscopia ou de granulomas extraídos cirurgicamente) (Audicana & Kennedy, 2008; Espiñeira, Herrero, Vieites & Santaclara, 2010; Cipriani et al., 2015; González-Amores et al., 2015; Bao et al., 2017).

Embora o consumo de peixe cru seja habitual tanto na China como no Japão, existe uma grande diferença a nível de prevalência de casos de anisacuídiase entre estes dois países asiáticos. Num estudo citado por Audicana e Kennedy (2008), é sugerido que essa diferença se deve ao facto de os chineses, ao contrário dos japoneses, consumirem o peixe no final das refeições, quando o estômago já está repleto. Outra diferença encontrada reside nos condimentos vegetais utilizados nos pratos tradicionais chineses feitos à base de peixe cru. Na cozinha tradicional chinesa esses pratos são tradicionalmente condimentados com folhas de perila (erva aromática da família das mentas) ou gengibre e esta particularidade já levou vários autores a investigar os efeitos biocidas destes produtos naturais (Audicana & Kennedy, 2008; Pravettoni et al., 2012).

Foi também recentemente reportado que diferentes espécies de *Anisakis* spp. apresentam diferentes capacidades de migração para a parte muscular do peixe que, por norma, corresponde à parte edível. Este facto acarreta um maior potencial zoonótico para as espécies com maior capacidade de migração. Apesar de ambas as espécies do género *Anisakis* serem

zoonóticas, *A. simplex* (s.s.) tem demonstrado em vários estudos maior propensão para invadir a musculatura do peixe do que *A. pegreffii* e, até agora, *A. physteris* não foi identificado na musculatura de nenhum peixe nem foi notificado nenhum caso de anisakuíase como resultante de uma infeção por esta espécie (Cipriani et al, 2018b).

Em Portugal, no ano de 2017, foram notificados pela primeira vez dois casos de anisakuíase gástrica. O primeiro caso, tratava-se de um indivíduo do sexo masculino de 32 anos que apresentava dor epigástrica, vómitos e febre moderada, desde uma semana. Durante a anamnese revelou ter consumido *sushi* recentemente. Foi efetuada uma endoscopia, na qual se observou a presença de um parasita filiforme fixado à mucosa gástrica, que se confirmou tratar-se de *Anisakis* spp. Após a remoção do parasita, os sintomas do paciente cessaram imediatamente (Carmo et al., 2017). O segundo caso era relativo a um indivíduo do sexo feminino de 43 anos, admitida nas urgências com sintomas de náuseas, dor epigástrica, astenia e tremores que apareceram subitamente e hipotensão (67/45 mmHg). No exame físico, observaram a presença de erupção cutânea generalizada, mas mais intensa nos membros inferiores. Não apresentava antecedentes pessoais de alergias de qualquer tipo, sendo apenas digno de registo o consumo de peixe-espada-preto grelhado nas 24 horas que antecederam o aparecimento dos sintomas. O exame endoscópico revelou uma mucosa gástrica edemaciada, provocada por uma infeção massiva de larvas de *Anisakis* spp. em múltiplos locais. No total, foram extraídas por aspiração endoscópica desta paciente 140 larvas viáveis (Baptista-Fernandes et al., 2017).

Em Espanha (o país que parece ter a maior incidência reportada na Europa) e na Itália, são referidas as preparações caseiras de peixe gordo (sardinhas e anchovas), como as principais fontes de infeção humana, pois são geralmente consumidos crus tendo apenas sido submetidos a uma marinada prévia insuficiente para inviabilizar as larvas de anisakuídeos. Por oposição, apesar de estas preparações tradicionais também poderem ser consumidas em restaurantes, normalmente o que é consumido em estabelecimentos públicos nesses países é de origem industrial, que é normalmente preparado a partir de peixe congelado e com base em receitas de marinada previamente testadas laboratorialmente quanto à capacidade de inviabilização de possíveis larvas de anisakuídeos presentes no pescado. Mais ainda, desde 2006 em Espanha a legislação obriga a que todos os restaurantes que servem pescado cru ou insuficientemente cozinhado congelem previamente o pescado antes de ser servido ao consumidor (Cavallero et al., 2015; Bao et al., 2017).

A maioria dos casos de anisakuíase está associada à ingestão acidental de larvas do género *Anisakis* spp. (Petrie et al., 2007). Dentro deste género, *A. simplex* (s.s.) é o responsável por quase todos os casos humanos notificados no Japão, ao passo que a sua espécie críptica, *A.*

pegreffiii, é responsável pela maioria dos casos humanos notificados no sul da Europa (Cavallero et al., 2018). Para além destas diferenças em termos epidemiológicos em relação aos agentes etiológicos de doença, também se verifica que no Japão a anisaquíase gástrica é muito mais comum (95% dos casos) do que a anisaquíase intestinal, enquanto na Europa se verifica o inverso. Contudo, as evidências empíricas existentes até ao momento não permitem tirar uma conclusão segura quanto às diferenças observadas, já que estas diferenças podem dever-se a algum viés de notificação e a diferenças nos métodos de diagnóstico entre diferentes países. No Japão, a utilização de técnicas endoscópicas está mais disseminada e há uma maior consciência da doença tanto a nível da classe médica como da sociedade em geral (Audicana et al., 2002; Pravettonii et al., 2012).

A prevalência de neoplasia gástrica é igualmente elevada no Japão e isso pode ser sugestivo de que uma infeção por *Anisakis* spp. pode predispor ao desenvolvimento de uma neoplasia gástrica, contudo as evidências ainda são muito limitadas (Audicana & Kennedy, 2008). Em alguns estudos citados recentemente por Cavallero et al. (2018) foram também observadas larvas de *Anisakis* spp. na mesma localização de tumores gastrointestinais.

Estudos epidemiológicos no Japão indicam que a anisaquíase é mais frequente em populações costeiras (particularmente onde as pessoas estão envolvidas na indústria da pesca) e em homens com idades compreendidas entre os 20 e 50 anos (Audicana et al., 2002).

A pseudoterranovíase não é comum no Sul do Japão e Europa, mas é mais frequente nos Estados Unidos e Canadá, tendo também sido relatada na Coreia e em países da América latina, como o Chile e o México. Os principais transmissores da pseudoterranovíase parecem ser o bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephala*) e o alabote-do-pacífico (*Hippoglossus stenolepis*) no Japão e cantarilhos-do-norte (*Sebastes* sp.) nos Estados Unidos (Audicana & Kennedy, 2008; Measures, 2014). Estas diferenças podem ser explicadas pelas grandes populações de pinípedes existentes na costa Atlântica e do Pacífico da América do Norte, assim como no norte do Japão e pelas diferenças culturais existentes nos hábitos alimentares (Measures, 2014). Adicionalmente, o facto deste parasita ser de maiores dimensões comparativamente com *Anisakis* spp., faz com que possa ser mais facilmente removido do estômago por endoscopia ou expelido mais frequentemente com a tosse, o que contribui também para que um maior número de casos de pseudoterranovíase sejam registados nestas regiões. Por outras palavras, o risco de subnotificação de casos é menor em comparação com os casos de doença provocados por larvas de *Anisakis* spp., ainda que uma maior prevalência de pseudoterranovíase seja exetável em regiões onde existem grandes populações de hospedeiros definitivos de *Pseudoterranova* spp. (Measures, 2014).

Como se pode verificar pelo acima referido, a transmissão desta doença nos humanos está particularmente associada às tradições de consumo de pescado cru ou insuficientemente cozinhado. Existem vários pratos tradicionais feitos à base de pescado cru que são considerados de alto risco para a transmissão de anisacuídase, incluindo o *sushi* e *sashimi* japonês, *bagoong* filipino, arenque salgado ou fumado holandês, *gravlax* escandinavo, *lomi-lomi* e *palu* havaiano, *ceviche* sul-americano e *boquerones* em vinagre em Espanha (anchovas em conserva).

2.4.4. Diagnóstico e tratamento

Como os sintomas de anisacuídase não são patognomónicos e a ocorrência de surtos é rara, não havendo transmissão entre pessoas, esta doença muitas vezes é mal diagnosticada (e.g. é diagnosticada como um tumor gastrointestinal, úlceras, obstrução ou inflamação como doença de Crohn, apendicite e síndrome abdominal aguda) (Measures, 2014, Bao et al., 2017). Consequentemente é subnotificada, na medida em que vários casos não chegam a ser notificados também porque a infeção muitas vezes é autolimitante e mesmo que o indivíduo apresente sintomas leves a moderados, à semelhança de uma gastroenterite bacteriana e viral, a infeção acaba por se resolver com o paciente expelindo o parasita (por vómitos ou com as fezes) ou então o sistema imunitário consegue neutralizá-lo e destruí-lo, por exemplo através da formação de granulomas. Como tal, muito provavelmente as pessoas não procuram ajuda médica especializada, porque como os sintomas acabam por passar, atribuem como causa uma possível intoxicação alimentar ou alergia ao pescado (Measures, 2014; Baird et al., 2017; Bao et al., 2017) e só os casos mais graves, que necessitam de intervenção médica, é que acabam por ser diagnosticados (Bao et al., 2017).

Pelos motivos supracitados, o diagnóstico de anisacuídase é difícil, baseando-se na sintomatologia clínica apresentada e na história do consumo recente de pescado cru ou insuficientemente cozinhado e, por este motivo é preciso que os clínicos estejam alerta e façam uma boa anamnese clínica. Com base na suspeita clínica de anisacuídase, no caso de uma infeção gástrica, o diagnóstico pode ser confirmado com recurso a uma gastroendoscopia, que é também uma medida terapêutica. Quando se trata de uma infeção intestinal, normalmente não é possível realizar uma endoscopia pois não se consegue alcançar a zona afetada. Nestes casos, não é fácil remover o parasita e muitas vezes é necessário recorrer a cirurgia, devido à dor abdominal intensa e/ou obstrução intestinal causada pela inflamação (em infeções intestinais graves, a espessura da parede intestinal pode aumentar três a cinco vezes mais a sua espessura normal, devido ao edema e infiltração celular) e o diagnóstico é confirmado posteriormente por análise histopatológica de uma amostra de tecido afetado. O diagnóstico

histopatológico baseia-se na identificação morfológica do nematode em cortes teciduais, utilizando características visíveis do parasita, como a presença de renete, cordas longitudinais da epiderme em forma de “Y” (género *Anisakis*) ou em forma de borboleta (géneros *Pseudoterranova* e *Contracaecum*), observação de ventrículo (uma porção glandular), intestino e infiltração de eosinófilos no tecido circundante. Em qualquer uma das formas clínicas de anisaquidíase podem ser também utilizados outros meios complementares de diagnóstico, como radiologia, tomografia computadorizada e ecografia, assim como análises sanguíneas (uma leucocitose grave pode estar presente, mas uma eosinofilia periférica é rara) e testes serológicos como o ensaio imunoenzimático (ELISA) para detetar IgE e IgG específica contra *Anisakis* spp., que irá ajudar a confirmar uma infeção recente por esse parasita (Measures, 2014; Carmo et al., 2017; Nieuwenhuizen, 2016; Baird et al., 2017; Mathison & Silva, 2018).

Na maioria dos casos a remoção da larva, tanto por cirurgia como por endoscopia, nas situações de infeções gástricas ou intestinais é curativo e após a remoção do parasita o paciente geralmente recupera rapidamente, no entanto a utilização de albendazol tem sido referida como uma alternativa, quando a história clínica do paciente é altamente sugestiva de anisaquidíase e não é possível fazer uma intervenção cirúrgica ou endoscópica (Baird et al., 2017; Mathison & Silva, 2018).

No que concerne a situações de anisaquidíase crónicas ou ectópicas, o tratamento depende das complicações médicas produzidas pelas larvas, variando desde a necessidade de remover cirurgicamente o granuloma à utilização de esteroides para reduzir a inflamação local causada pela presença do parasita (Bucci et al., 2013).

A identificação ao nível de género ou espécie do parasita não é necessária para o tratamento dos doentes, mas deve ser efetuada, sempre que possível, para fins epidemiológicos (Mathison & Silva, 2018).

2.4.5. Alergia a *Anisakis simplex*

Nos últimos anos, *A. simplex* deixou de ser um agente etiológico relativamente desconhecido e é considerado uma importante causa de alergia alimentar entre adultos em Espanha e no Japão, sendo atualmente um dos mais importantes alérgenos ocultos nos alimentos para adultos que sofrem de anafilaxia nestas áreas geográficas (Audicana et al., 2002; Audicana, Girao & Longo, 2017). Casos de hipersensibilidade associados a *A. simplex* têm sido particularmente identificados no norte de Espanha. Nessa região a principal causa da reação alérgica é atribuída ao consumo de pescada cozida (*Merluccius merluccius*), imediatamente seguido pelo consumo de anchovas (*Engraulis encrasicolus*) cozidas ou cruas (Audicana et al., 2017).

As reações alérgicas podem manifestar-se com sintomas de urticária, angioedema ou anafilaxia e podem ser desencadeadas por uma infecção com *Anisakis* spp. (anisaquíase) ou pela presença de alérgenos destes parasitas nos produtos da pesca. Esta última situação é preocupante, na medida em que um tratamento térmico por congelamento ou cozedura adequados para matar os parasitas e impedir assim uma infecção parasitária, não elimina o risco de desenvolvimento de uma reação alérgica ao parasita, uma vez que podem persistir alérgenos que são termoestáveis e, como tal, são extremamente resistentes ao tratamento térmico efetuado ao produto da pesca infetado (Audicana et al., 2002). Contudo, atualmente existe maior consenso relativamente à necessidade de um primeiro contacto com o parasita vivo para se desenvolver uma resposta alérgica numa próxima exposição a alérgenos do parasita (EFSA, 2010; Ramos, 2011; Tejada et al., 2014).

Os primeiros sinais de uma reação alérgica geralmente aparecem dentro de 30 a 120 minutos após a ingestão do peixe infetado ou contaminado com alérgenos de *Anisakis* spp., mas pode demorar seis horas até aparecerem os primeiros sinais (Audicana et al., 2017).

Esta alergia tem apresentado algumas diferenças no historial clínico dos pacientes em relação a outras alergias alimentares comuns, que incluem: (1) inexistência de antecedentes de doença atópica, portanto a atopia não é um fator predisponente; (2) idade média dos pacientes elevada (idades compreendidas entre os 40 e 50 anos); (3) os pacientes e os seus clínicos relacionam os sintomas com a medicação, mas essa causa é descartada posteriormente e, (4) os episódios alérgicos têm ocorrido durante a noite (Audicana et al., 2002).

A anafilaxia é uma síndrome perigosa de início rápido. É a manifestação mais grave de uma reação alérgica, que se caracteriza por urticária e angioedema, colapso, choque, broncoconstrição e sintomas gastrointestinais graves, podendo ser fatal. A maioria dos fatores intrínsecos do paciente que aumentam o risco de episódios de anafilaxia grave ou fatal são semelhantes em todo o mundo. Esses fatores incluem a idade e doenças concomitantes (e.g., doenças cardiovasculares e doenças atópicas graves) para as quais a medicação tomada também pode contribuir para aumentar o risco. A título de exemplo temos os AINES e os inibidores da bomba de prótons, medicamentos amplamente prescritos para a população idosa, que aumentam a permeabilidade intestinal e conseqüentemente a absorção de antígenos. As pessoas idosas são, assim, uma população de risco para anafilaxia por *A. simplex*, não apenas por causa das doenças e da medicação que utilizam para o seu tratamento que pode funcionar como cofator, mas também porque nessa faixa etária a maioria das pessoas tem o hábito de incluir um maior consumo de peixe na sua dieta (Audicana et al., 2017).

Embora a maioria dos casos de alergia sejam resultantes da ingestão de produtos da pesca contaminados com larvas ou componentes das larvas de *A. simplex*, também já foram descritos

casos de alergia resultantes da exposição ocupacional ou doméstica a alergénios por inalação ou contato com a pele, com sintomatologia como asma, rinite, conjuntivite e dermatite (Baptista-Fernandes et al., 2017).

Do ponto de vista estrutural e funcional podem considerar-se três tipos de alergénios: (1) alergénios de excreção-secreção, que são proteases e inibidores de protease secretados pela larva durante a penetração nos tecidos; (2) alergénios somáticos, obtidos do corpo do parasita; e (3) alergénios cuticulares, secretados para proteger a larva das secreções digestivas do hospedeiro (Pravettoni et al., 2012).

Dependendo do destino final da larva no corpo do hospedeiro, os indivíduos podem ser expostos a diferentes alergénios. Durante a penetração ativa da larva e a sua morte subsequente, os indivíduos são expostos a todos os alergénios de *A. simplex*, enquanto se a larva for eliminada intacta através do trato gastrointestinal, os pacientes são expostos apenas a alergénios de excreção-secreção. Por fim, se as larvas ingeridas já estiverem mortas, os pacientes são expostos principalmente a alergénios somáticos e cuticulares e, minimamente, a alergénios de excreção-secreção (Pravettoni et al., 2012). Até ao momento, foram caracterizados e reconhecidos 14 alergénios de *A. simplex*, que foram numerados de 1 a 14 (Tabela 6). Este grande número de alergénios encontrados, pode ser um reflexo da forte reatividade humana contra antigénios de *A. simplex*, provavelmente devido à inexistência de coevolução entre o hospedeiro acidental (homem) e o parasita (Steinfelder, Rausch, Lucius, & Hartmann, 2013). Por definição, os principais alergénios são aqueles que são reconhecidos por mais de 50% dos indivíduos sensibilizados (Breiteneder & Chapman, 2014). Como tal, os principais alergénios são: Ani s 1, Ani s 2, Ani s 7, Ani s 11, Ani s 12, Ani s 13 e Ani s 14. Contudo, isso não é sinónimo de relevância clínica, uma vez que, por exemplo, Ani s 4 é reconhecido apenas por 27% dos indivíduos alérgicos, porém num estudo realizado por Moneo et al. (2005) observou-se que os episódios de anafilaxia são mais frequentes entre os indivíduos que reconhecem este antigénio, ou seja, os indivíduos sensibilizados ao Ani s 4, têm sintomas mais graves do que os indivíduos que não reconhecem este alergénio. Com base nisto, também se pode tirar a ilação de que é importante identificar os alergénios que são reconhecidos por cada indivíduo que é alérgico às proteínas de *A. simplex*, uma vez que dependente disso estão as restrições alimentares e as precauções mais ou menos exigentes que um paciente tem de adotar.

O diagnóstico de alergia a *A. simplex* baseia-se normalmente nos seguintes critérios: (1) história clínica compatível com alergia a *A. simplex*; (2) teste cutâneo por picada com extrato de *A. simplex* positivo (resultado positivo ocorre com a formação de uma pápula com diâmetro superior a 3 mm, normalmente 15 minutos após o teste); (3) doseamento de IgE total e específica contra *A. simplex*, que pode ser feito através da utilização do sistema ImmunoCAP®

(positivo se IgE específica > 0.7 kU/L), imunoblotting (WB) ou ELISA; (4) ausência de reação às proteínas do peixe hospedeiro e/ou a outras possíveis reações cruzadas com outros antígenos como os com origem nos crustáceos, caracóis, ácaros, baratas e outros insectos (Audicana et al., 2002;2017; Mattiucci et al., 2015a). De forma a aumentar a especificidade do diagnóstico de alergia a *A. simplex*, podem ser usados vários alérgenos purificados de forma combinada no doseamento da IgE específica contra *A. simplex* e no teste cutâneo por picada (Agencia Española de Seguridad Alimentaria [AESAs], 2009; Mattiucci et al., 2015a). O teste de ativação dos basófilos (BAT) também pode ser utilizado de forma complementar, quando os resultados com os outros testes são inconclusivos (Baird et al., 2017).

Após o diagnóstico, o tratamento de uma reação alérgica sintomática passa pela prescrição de corticoides e anti-histamínicos e, nos casos de anafilaxia, utiliza-se adrenalina (Santana & Cives, 2009).

Tabela 6. Alérgenos de *Anisakis simplex* (Fonte: Sangiao, 2017)

Alérgeno	Tipo de alérgeno	Peso molecular (kDa)	Função	Caraterísticas principais
Ani s 1	E/S	24	Inibidor de proteases de serina	Reconhecido por 85 % dos indivíduos alérgicos. Termoestável.
Ani s 2	S	97	Paramiosina	Reconhecido por 88% dos indivíduos alérgicos. Responsável por reatividades cruzadas.
Ani s 3	S	41	Tropomiosina	Responsável por reatividades cruzadas. Alérgeno não relevante. Termoestável.
Ani s 4	E/S	9	Inibidor das proteases de cisteína	Termoestável e estável à pepsina. Reconhecido por 27% dos indivíduos alérgicos. Alto valor de diagnóstico.
Ani s 5	E/S	15	Família SXP-RAL-2	Termoestável.
Ani s 6	D	-	Inibidor das proteases de serina	Reconhecido por 18% dos indivíduos alérgicos.
Ani s 7	E/S	139	Função desconhecida	Reconhecido por 93,9% dos indivíduos alérgicos.
Ani s 8	E/S	15	Família SXP-RAL-2	Reconhecido por 25% dos indivíduos alérgicos. 35% de sequência homóloga com Ani s 5. Termoestável.
Ani s 9	E/S	14	Família SXP-RAL-2	Reconhecido por 13,8% dos indivíduos alérgicos. Termoestável.
Ani s 10	S	21	Função desconhecida	Reconhecido por 39% dos indivíduos alérgicos. Termoestável.
Ani s 11	D	27	Função desconhecida	Reconhecido por 50% dos indivíduos alérgicos.
Ani s 12	D	31	Função desconhecida	Reconhecido por 57% dos indivíduos alérgicos.
Ani s 13	E/S	37	Hemoglobina	Reconhecido por 63,6% dos indivíduos alérgicos. Responsável por reatividades cruzadas.
Ani s 14	D	24	Função desconhecida	Reconhecido por 54% dos indivíduos alérgicos.

Legenda: E/S: antígeno de excreção-secreção; S: antígeno somático; D: desconhecido

3. Enquadramento legislativo

A anisakiase não se encontra entre as doenças transmissíveis de notificação obrigatória definidas pela Direção-Geral da Saúde (DGS) no Despacho nº 15385-A/2016 de 21 de dezembro, nem entre as definidas pela Comissão Europeia (Decisão de Execução (CE) Nº 2018/945 de 22 de junho de 2018). Igualmente e sendo uma infeção zoonótica não está na lista publicada para o ano de 2018 de doenças de notificação à OIE (sigla pela qual é conhecida a Organização Mundial da Saúde Animal) e não tem qualquer plano específico de controlo no país.

O Regulamento (CE) nº 853/2004 estabelece as regras específicas de higiene que são aplicadas a todos os géneros alimentícios de origem animal, onde se incluem, naturalmente, os produtos da pesca. No que diz respeito aos parasitas, o supracitado regulamento refere que os operadores das empresas do setor alimentar devem assegurar que os produtos da pesca foram submetidos a um exame visual para a deteção de parasitas visíveis e que nenhum produto da pesca obviamente contaminado com parasitas pode ser colocado no mercado. Além disso, o regulamento refere que os produtos da pesca devem ser mantidos armazenados a uma temperatura próxima do gelo fundente e, com as alterações introduzidas pelo Regulamento (CE) Nº 1020/2008, é recomendada a evisceração dos produtos da pesca o mais rapidamente possível após a captura ou o desembarque. Com estas medidas evita-se, tanto quanto possível, a migração do parasita para os músculos após a morte do hospedeiro. Adicionalmente, também no Regulamento (CE) Nº 1020/2008, é recomendado que quando a evisceração dos peixes ocorre a bordo das embarcações, todas as vísceras e partes que possam constituir um risco para a saúde pública devem ser armazenadas em locais afastados dos produtos destinados ao consumo humano.

Complementarmente a estes regulamentos, no anexo III do Regulamento (CE) nº 854/2004, é exigido às autoridades competentes a realização de testes aleatórios ao longo da cadeia de comercialização de forma a verificar o cumprimento da legislação comunitária sobre parasitas. Caso se verifique o não cumprimento da legislação comunitária em vigor na matéria, os produtos da pesca devem ser declarados impróprios para consumo.

Na secção 1 do Regulamento (CE) nº 2074/2005 são pormenorizadas as regras relacionadas com as inspeções visuais para detetar os parasitas nos produtos da pesca. Neste regulamento, é referido que o método não pode ser destrutivo e, sempre que necessário, pode incluir a transiluminação.

Em abril de 2010, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) publicou um parecer científico sobre a avaliação do risco de parasitas nos produtos da pesca (EFSA, 2010). Na sequência desse parecer científico, a 8 de dezembro de 2011 surge o Regulamento (CE) Nº

1276/2011, que altera os requisitos estabelecidos no anexo III, secção VIII, capítulo III, parte D, do Regulamento (CE) Nº 853/2004 relativamente ao tratamento para eliminar parasitas. Deste modo, atualmente os operadores do sector alimentar têm de garantir o tratamento por congelação dos produtos da pesca destinados a serem consumidos crus ou os produtos da pesca marinados, salgados e quaisquer outros produtos da pesca tratados, se o tratamento for insuficiente para inviabilizar o parasita. Nestes casos, a congelação tem de reduzir a temperatura em todas as partes do produto no mínimo até -20°C durante pelo menos 24 horas ou no mínimo até -35°C durante pelo menos 15 horas. Os restantes operadores do sector alimentar, cujos produtos são submetidos a um tratamento térmico adequado para a inviabilização dos parasitas (i.e., o produto é submetido a um tratamento térmico em que a sua temperatura interna atinge pelo menos os 60°C durante, no mínimo, um minuto) ou que foram preservados como produtos da pesca congelados durante um período suficientemente longo para inviabilizar os parasitas, estão isentos do tratamento de congelação, assim como os operadores que apresentem dados epidemiológicos seguros ou operem em condições de aquacultura específicas, com condições ambientais e de alimentação controladas e que, simultaneamente, no caso de aquaculturas portuguesas, estejam autorizados pela DGAV a não submeter os seus produtos ao processo de congelação (ver esclarecimento nº1/2014, emitido pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV], 2014).

Neste momento, o salmão-do-atlântico de sistemas de aquacultura em jaulas flutuantes ou em tanques de terra e todos os que assegurem os mesmos procedimentos de criação, como é o caso do alabote e truta arco-íris proveniente do Reino Unido, estão isentos dos requisitos de congelação impostos pelo Regulamento (CE) Nº 1276/2011 (ver referência de isenção para o alabote e truta arco-íris proveniente do Reino Unido no trabalho de Brooker et al., 2016).

Desde 2006 que os restaurantes em Espanha, que servem peixe cru ou pouco cozinhado, são obrigados a congelar o peixe antes que este seja servido ao consumidor, durante pelo menos 24 horas a temperaturas iguais ou inferiores a - 20°C. Adicionalmente, a legislação espanhola obriga a que os estabelecimentos de restauração informem os seus clientes (e.g. através de cartazes ou nos menús) de que os produtos que irão consumir foram sujeitos a uma congelação prévia e o governo espanhol, nomeadamente o Ministério da Saúde, Serviços Sociais e Igualdade de Espanha, tem desenvolvido campanhas destinadas à população de informação e educação para a saúde nesta problemática. A mais recente, lançada no mês de maio de 2018, com o lema “Anisakis: Comer pescado es sano y saludable. La Anisakiasis es fácil de evitar”. Pelo contrário, em Portugal não existe nenhuma legislação complementar às normas europeias e que obrigue os estabelecimentos de restauração a congelar previamente o pescado que se

destine a ser consumido cru nos seus estabelecimentos e, por isso, tanto é utilizado pescado refrigerado ou congelado nas suas confeções (El País, 2006; Sousa, Amaral & Oliveira, 2012).

4. Métodos de inativação de larvas de anisquídeos no pescado

No parecer científico da autoridade europeia para a segurança dos alimentos (EFSA) emitido em 2010, é reconhecido que todos os peixes marinhos e de água doce, provenientes do meio selvagem e de qualquer zona de pesca, devem ser considerados em risco de conter parasitas viáveis e perigosos para a saúde humana, se forem ingeridos crus ou insuficientemente cozinhados (EFSA, 2010). A presença de larvas de anisquídeos no músculo de espécimes capturados em ambiente selvagem não pode ser excluída, independentemente da espécie hospedeira, da origem, da parte do corpo ou do tamanho do espécime. Por estas razões, é necessário a adoção de tratamentos preventivos para a inviabilização dos parasitas quando os produtos da pesca são consumidos crus ou insuficientemente cozinhados (Casti et al., 2017).

As larvas de anisquídeos são parasitas extremamente resistentes, que conseguem suportar condições ambientais muito adversas, tais como o pH baixo do estômago dos seus hospedeiros (Measures, 2014; Ramón, 2015). Para sobreviver nesses ambientes, estes parasitas desenvolveram vários mecanismos defensivos que os tornam muito resistentes a diferentes tratamentos tecnológicos (Ramón, 2015). Na musculatura dos peixes estas larvas conseguem sobreviver a processos de fumagem a frio, a marinadas, salmouras ou qualquer outro tipo de tratamento que não incorpore uma etapa em que o pescado seja submetido a um tratamento adequado de inviabilização das larvas (Measures, 2014).

Segundo a EFSA (2010), a congelação e a cozedura continuam a ser os processos mais eficazes na inviabilização das larvas, sob condições bem definidas. Como tal, as normas europeias, à semelhança do que existe noutros países como nos E.U.A. e Canadá, exigem a congelação ou o tratamento térmico dos produtos da pesca que se destinem a ser consumidos crus ou praticamente crus (Fæste, Plassen, Løvberg, Moen & Egaas, 2015).

Apesar de a congelação ser um método eficaz para matar as larvas de anisquídeos, é necessário ter em atenção alguns aspetos no processo de congelação, nomeadamente ao volume do peixe a ser congelado. Por exemplo, caixas com 20 Kg de tamboril necessitam de mais do que 28 horas para atingir a temperatura de -35°C a -38°C no seu centro térmico (Measures, 2014). É importante, por isso, que todas as partes do peixe fiquem congeladas a essas temperaturas e pelo tempo necessário para assegurar a morte de quaisquer larvas que possam estar presentes (Measures, 2014). Em alguns estudos com *A. simplex* e *Pseudoterranova* spp. nos E.U.A. foi observada a sobrevivência de larvas de anisquídeos após a congelação a -20°C durante curtos períodos e, portanto, as recomendações da *Food and*

Drug Administration (FDA) para a congelação do pescado em termos de duração do tratamento de congelação são superiores às exigidas pelas normas europeias (Audicana & Kennedy, 2008).

Ainda não existem informações suficientes que demonstrem a eficácia de tratamentos alternativos ao tratamento de congelação para inviabilizar as larvas de anisacídeos, particularmente o tratamento com altas pressões hidrostáticas, irradiação, secagem e com corrente de baixa voltagem (EFSA, 2010). Contudo, na Tabela 7, é apresentado um resumo de alguns tratamentos alternativos que foram eficazes na inviabilização das larvas e, simultaneamente apresenta-se os tratamentos recomendados pela Comissão Europeia e pela FDA do governo dos E.U.A.

No caso da irradiação, é ainda de salientar o facto de as larvas de *A. simplex* parecerem ser extremamente resistentes à irradiação, a menos que se apliquem doses muito elevadas, o que não é recomendado, pois afeta a qualidade organoléptica do pescado (AESA, 2005; EFSA, 2010).

A salmoura e a marinada podem ser eficazes na inviabilização das larvas de parasitas, mas para isso o sal e o ácido acético devem ser distribuídos uniformemente em todas as partes do músculo e devem ser utilizadas as concentrações e os tempos recomendados (Mattiucci et al., 2015a).

Tabela 7. Tratamentos para inviabilização das larvas de anisacídeos no pescado

Tratamentos físicos previstos nas normas europeias e FDA			
Regulamento (EU) Nº 1276/2011	Congelação	-20°C, pelo menos 24h ou -35°C, no mínimo 15h	
	Aquecimento	≥ 60 °C no centro térmico, no mínimo 1 min	
FDA* *FDA Food Code 2017	Congelação	≤ -20°C, 7 dias ou ≤ -35°C até o produto se tornar uma massa sólida e armazenar a ≤ -35°C, 15 h ou ≤ -35°C até o produto se tornar numa massa sólida e armazenar a -20°C, 24 h	
	Aquecimento	≈ 63°C ou 74°C (micro-ondas) no centro térmico. Importante rodar e agitar o produto durante o aquecimento no micro-ondas para distribuir uniformemente o calor.	
Outros tratamentos físicos			
Tratamento	Parâmetros	Produto	Referência
Alta pressão hidrostática	300 MPa, 5 min	Sarda (5 espécimes por eviscerar colocados em sacos individuais em vácuo)	Brutti et al. (2010)
Micro-ondas	≥ 74°C, pelo menos 15 seg	halibute-do-pacífico (filetes de peixe com peso aproximado de 275 g ± 65 g e espessura entre 0,5 a 1,75 cm)	Adams, Miller, Wekell & Dong (1999)

Tabela 7. Tratamentos para inviabilização das larvas de anisquídeos no pescado (continuação)

Tratamentos químicos			
Tratamento	Parâmetros	Produto	Referência
Marinada	12% NaCl + 10% ácido acético, 5 dias a 4°C		Armas et al. (2005)
	6% NaCl + 2,5% ácido acético, 35 dias ou 12% de NaCl + 6% ácido acético, 13 dias	filetes de anchovas (<i>boquerones</i>)	Agencia Espanola de Seguridad Alimentaria y Nutrición [AESAN] (2007)
Salga a seco ou salmoura	22% NaCl, 10 dias	Arenque	Smith & Wootten (1978)
	8 a 9 % NaCl, no mínimo 6 semanas	Não especificado	AESAN (2007)
Plantas Aromáticas (α -pireno)	46,9 mg/ml (<i>in vivo</i>) e 62,5 μ g/ml (<i>in vitro</i>)	<i>In vivo</i> (com ratos Wistar) e <i>in vitro</i> (com larvas em placas de poliestireno)	Navarro et al. (2008)
Plantas aromáticas (citral)	46.90 mg/0.5 ml azeite (introduzido no estômago dos ratos 4h após a infecção)	<i>In vivo</i> (com ratos Wistar laboratorialmente infetados com larvas de anisquídeos)	Hierro, Valero & Navarro (2006)
Molho de soja	> 18 h	<i>In vitro</i> com larvas de anisquídeos	
Pasta comercial de wasabi ou solução de 5% de wasabi	2h	(quantidades mínimas depositadas sobre as peças de sushi e sashimi podem não ter qualquer efeito na larva que está inserida no músculo do peixe que é consumido cru)	Brogliá & Kapel (2011)

5. Medidas de controlo no setor da pesca

Na medida em que é impossível controlar a infeção de peixes selvagens, a única medida possível e, também recomendada no parecer científico emitido pela EFSA em 2010, é uma pesquisa e monitorização contínua de parasitas com importância para a saúde pública nos produtos da pesca de várias zonas de pesca (EFSA, 2010; Cavallero et al., 2015; Brooker et al., 2016). Desta forma, pode-se evitar, tanto quanto possível, a captura de peixes de zonas de pesca que têm revelado uma maior prevalência de anisquídeos e também evitar de capturar determinadas espécies ou determinados calibres de pescado que têm demonstrado estar mais infetados (AESAN, 2005,2009).

Logo após a captura do pescado, as medidas preventivas passam pela evisceração precoce do mesmo, de forma a eliminar as possíveis larvas de anisquídeos que possam existir nas vísceras e na cavidade abdominal, reduzindo assim a probabilidade de migração para os músculos (AESAN, 2005, Measures, 2014, Bao et al., 2017). Contudo, caso a evisceração seja

efetuada a bordo, que é o mais recomendável, as vísceras dos peixes eviscerados não devem ser descartadas no mar, pelo menos sem qualquer tratamento prévio. Por exemplo, pode ser realizada uma congelação das vísceras a uma temperatura e tempo semelhantes ao exigido pela legislação comunitária no caso do pescado que vai ser consumido cru ou praticamente cru para, dessa forma, inviabilizar as larvas de anisaquídeos que possam estar presentes e prevenir o aumento da prevalência da infeção entre as espécies de peixe que vivem em meio selvagem naquela região (Abollo et al., 2001; Ramos, 2011). Outra medida preventiva para reduzir ou atrasar o processo de migração *post-mortem* das larvas consiste no armazenamento do pescado a uma temperatura próxima do gelo fundente (0°C), tanto nas embarcações como nos estabelecimentos em terra, incluindo as lotas de pesca e mercados grossistas onde os produtos da pesca são expostos para venda. Esta medida já está prevista no Regulamento (CE) nº 853/2004, como já mencionado anteriormente e é muito importante que seja cumprida, uma vez que, segundo o estudo de Levsen et al. (2018b), a temperatura e o tempo de armazenamento parecem ser as variáveis mais importantes que determinam a ativação e motilidade das larvas de anisaquídeos nos peixes e favorece a migração larvar *post-mortem*.

Os processos de evisceração existentes atualmente também podem ser melhorados, devendo incluir-se a possibilidade de remover as abas abdominais dos peixes no produto final, tal como sugerido por Pascual et al. (2018). No estudo deste mesmo autor e respetiva equipa com pescada-do-atlântico, verificou-se que, independentemente da zona de pesca, as abas abdominais concentravam a maior parte da carga parasitária de cada exemplar infetado. Em consonância com o observado por estes autores, Levsen et al. (2018b) verificou que com a remoção das abas abdominais na sarda, arenque e bacalhau, conseguia-se reduzir a probabilidade de presença de larvas de anisaquídeos no produto final em mais de 90%.

É ainda importante e necessário qualificar e sensibilizar os operadores comerciais para a deteção destes parasitas, de forma a poder assegurar a saúde dos consumidores (Casti et al., 2017). Simultaneamente, tal como já salientado, é preciso melhorar a eficácia e rapidez dos protocolos e a tecnologia disponível para a deteção de parasitas nos produtos da pesca, de forma a ser viável a sua aplicação na indústria e permitir controlar melhor o agente patogénico ao longo da cadeia alimentar (Cavallero, et al., 2017; Bao et al., 2017).

6. Medidas de controlo em aquacultura

Para adquirir a infeção, tal como em ambiente selvagem, os peixes de aquacultura necessitam de ingerir presas infetadas (Brooker et al., 2016). Contudo, na aquacultura é possível um maior controlo sobre o historial das populações de peixes e é possível evitar em grande parte ou mesmo na totalidade a exposição a presas infetadas (Brooker et al., 2016). Para isso, é

necessário identificar as potenciais fontes de infecção em todo o ciclo de produção na exploração aquícola e implementar medidas ou alterar práticas para garantir que a probabilidade de infecção seja reduzida ou mesmo negligenciável (Brooker et al., 2016).

Neste momento, tal como já foi anteriormente referido, com as alterações introduzidas pelo Regulamento (EU) Nº 1276/2011, os peixes de aquacultura criados num ambiente livre de infecção e com um adequado programa de monitorização de parasitismo nos seus peixes, de forma a assegurarem que o risco para a saúde pública no que diz respeito à presença de larvas de anisaquídeos é negligenciável, estão isentos de realizar o procedimento de congelação imposto pela lei comunitária. De seguida, de forma sucinta, serão mencionadas algumas dessas medidas implementadas nos sistemas de aquacultura da Escócia, que permitiram a este país obter a isenção de congelação para o alabote-do-atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*) e para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) proveniente dos seus sistemas de aquacultura (Brooker et al., 2012, 2016):

a) As larvas de peixe, como as do alabote-do-atlântico, devem ser criadas em sistemas de tanques terrestres abastecidos com água tratada, por exemplo, água salgada esterilizada e devem ser alimentadas exclusivamente com alimento vivo criado em cativeiro (e.g. zooplâncton);

b) Além do alimento vivo criado em cativeiro utilizado para alimentar as larvas de peixes, os peixes devem ser alimentados exclusivamente com ração comercial granulada, que deve ser fornecida *ad libitum*, pois dessa forma é menos provável que vão ingerir presas selvagens, inclusivamente nos períodos do ciclo de produção, que normalmente variam entre um a quatro dias, como no transporte, seleção/calibração, mudanças de redes e colheita do peixe, em que ficam privados de alimento. Nessas situações, alguns estudos verificaram que os peixes alimentados *ad libitum* e com uma condição corporal normal (próprios para o consumo humano), muito improvavelmente ingerem presas selvagens, mesmo durante esses períodos em que não lhes é fornecida alimentação. Pelo contrário, peixes de muito baixa condição corporal (impróprios para consumo humano), muito provavelmente não aceitaram a ração granulada comercial como alimento e irão alimentar-se oportunisticamente de presas selvagens que entram dentro das jaulas, apresentando muitas vezes prevalências de infecção muito elevadas;

c) A criação de peixes em sistemas de tanques em todo o ciclo de produção utilizando sistemas de recirculação e tratamento de água ou água suficientemente tratada (filtração mecânica ou tratamento com UV ou ozono) elimina a probabilidade de infecção por nematodes;

d) O tamanho das malhas dos sistemas de aquacultura em jaulas é muito importante, uma vez que limita o tamanho da presa selvagem que pode entrar dentro das jaulas. A malha das

jaulas deve ser ajustada à fase de crescimento do peixe. Conforme os peixes vão crescendo, começam a ignorar as presas de menor tamanho e começam a preferir presas de maior tamanho. Consequentemente, a malha das jaulas pode ajudar a evitar o consumo das presas preferenciais à medida que os peixes crescem;

e) Sempre que possível, as jaulas devem estar localizadas longe das populações de hospedeiros definitivos (e.g. cetáceos e focas), pois além de constituírem uma fonte de infecção no ambiente que rodeia a exploração aquícola, são também predadores de peixes marinhos criados em cativeiro. No caso dos cetáceos é difícil implementar as explorações aquícolas longe de populações conhecidas destas espécies, uma vez que são fundamentalmente espécies nômadas.

7. Medidas de prevenção para o consumidor

A comunidade científica é unânime em concluir que consumir o pescado bem cozinhado é a melhor medida de prevenção contra a anisacuídase, visto que, aparentemente, nos países onde não se tem o hábito de consumir peixe cru, esta zoonose praticamente não ocorre. No artigo de Fæste et al. (2015) é dado o exemplo da Noruega, um país com um consumo de peixe *per capita* elevado e onde o número de ocorrências de anisacuídase é baixo, possivelmente porque os produtos da pesca nesse país são consumidos principalmente bem cozidos (i.e, a temperatura interna do pescado atinge os 60-63°C durante alguns minutos).

Do ponto de vista do consumidor, quando se compra peixes ou cefalópodes deve-se ter em consideração os critérios de frescura (olhos, brânquias, consistência e pele), de modo a escolher os exemplares mais frescos e é recomendado adquirir peixes de tamanho médio e grande já eviscerados ou, caso não estejam eviscerados, deve ser realizada a sua evisceração o mais rápido possível (AESAs, 2009). No caso dos peixes de pequena dimensão, como as anchovas (biqueirão) e as sardinhas, muitas vezes são consumidos inteiros e inclusivamente crus, após preparações caseiras típicas como as que existem em muitos países da zona do mediterrâneo (i.e., os peixes são submetidos apenas a marinadas ligeiras em limão ou vinagre consoante a região ou uma ligeira salga), o que aumenta o risco de infecção, pois as larvas de anisacuídeos são predominantemente encontradas nas vísceras (Cipriani et al., 2018a; Levsen et al., 2018b). Por isso, é muito importante sensibilizar o consumidor para a importância de cozinhar bem o peixe ou de o congelar previamente se o for consumir cru ou praticamente cru, para reduzir a probabilidade de surgirem mais casos de anisacuídase e, consequentemente, evitar que mais pessoas fiquem sensibilizadas contra as proteínas destes parasitas. No caso da congelação a nível doméstico, deve ter-se em consideração que nem todos os congeladores domésticos atingem temperaturas iguais ou inferiores a -20°C (apenas os congeladores de 3 ou

4 estrelas atingem estas temperaturas) (AESAs, 2009; Casti et al., 2017). Nesses casos, o tempo de congelação deve ser estendido, sendo que no caso dos congeladores que atingem apenas temperaturas negativas até -18°C, o tempo de congelação aconselhado é de 96 horas (4 dias). Da mesma forma, nos restaurantes em que é servido peixe cru ou praticamente cru, os consumidores devem tentar certificar-se de que o peixe que vão ingerir foi congelado previamente (AESAs, 2009; Casti et al., 2017).

No caso de pessoas que já sejam alérgicas às proteínas de *Anisakis simplex*, isto é, indivíduos que já foram sensibilizados contra as proteínas deste parasita, é necessário adotar medidas adicionais, nomeadamente é ainda mais importante evitar o consumo de peixe cru ou insuficientemente cozinhado, assim como a ingestão das abas abdominais e vísceras dos peixes, pois uma vez ocorrida a sensibilização aos antigénios do parasita, numa próxima exposição a esses antigénios, a resposta do sistema imunitário pode ser extremamente agressiva e gerar reações de hipersensibilidade do tipo I extremamente graves (EFSA, 2010). Para estes consumidores é mais seguro consumir pescado congelado, principalmente o que foi congelado em alto-mar, porque é imediatamente eviscerado e ultracongelado logo nas embarcações de pesca (AESAs, 2009). A opção por peixe criado em aquacultura também pode ser uma alternativa para estes consumidores, contudo é necessário certificar-se junto da informação que acompanha o produto que o pescado foi criado em ambiente indemne de parasitas viáveis ou que foram criados em condições, como as abordadas no ponto anterior, que não representam um risco para que os peixes possam estar infetados (AESAs, 2009).

A título de exemplo, já foi observada uma infestação por larvas de *Anisakis* spp. em populações de polvo-comum (*Octopus vulgaris*) em sistemas de aquacultura nas águas galegas, que foram infetados pelo consumo de peixes marinhos selvagens fornecidos como alimento (Abollo et al., 2001). Como tal, o facto de o pescado que consumimos ser proveniente de aquacultura não pode ser uma garantia de que não estejam infetados com larvas de anisacídeos.

É necessário ter presente que atualmente nenhum método de inativação das larvas de anisacídeos e nem mesmo a cozedura completa do alimento é capaz de garantir a segurança contra o desenvolvimento de reações alérgicas em indivíduos previamente sensibilizados contra as proteínas de *A. simplex* no decorrer de uma primeira infeção com larvas vivas deste parasita, uma vez que alguns alergénios deste parasita são termoestáveis (EFSA, 2010; Pascual, et al., 2018; Ramos, 2011; Tejada et al., 2014). Sendo assim, as medidas preventivas devem focar-se em evitar uma infeção com larvas de anisacídeos vivas (Ramos, 2011).

No estudo de Bao et al. (2017), mediante uma análise de risco, foi estimado que a migração *post-mortem* de *Anisakis* das vísceras para a musculatura aumenta a incidência da doença em mais de 1000%. Por outro lado, na mesma investigação, os autores estimaram que uma

campanha de educação das populações para congelar a anchova (biqueirão) antes do seu consumo pode reduzir os casos de anisakiase em 80%.

IV. ANISAKIDAE E RAPHIDASCARIDIDAE: Pesquisa, identificação morfológica e molecular em carapau (*Trachurus trachurus*) capturado em águas portuguesas

1. Objetivos do estudo

Como mencionado na introdução, esta dissertação tem como principal finalidade contribuir para o conhecimento morfológico e molecular dos anisquídeos, particularmente dos géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium*, uma vez que são os géneros de nematodes parasitas de peixes aos quais se atribui um maior potencial patogénico para o homem, bem como são apontados como responsáveis por perdas económicas na indústria da pesca.

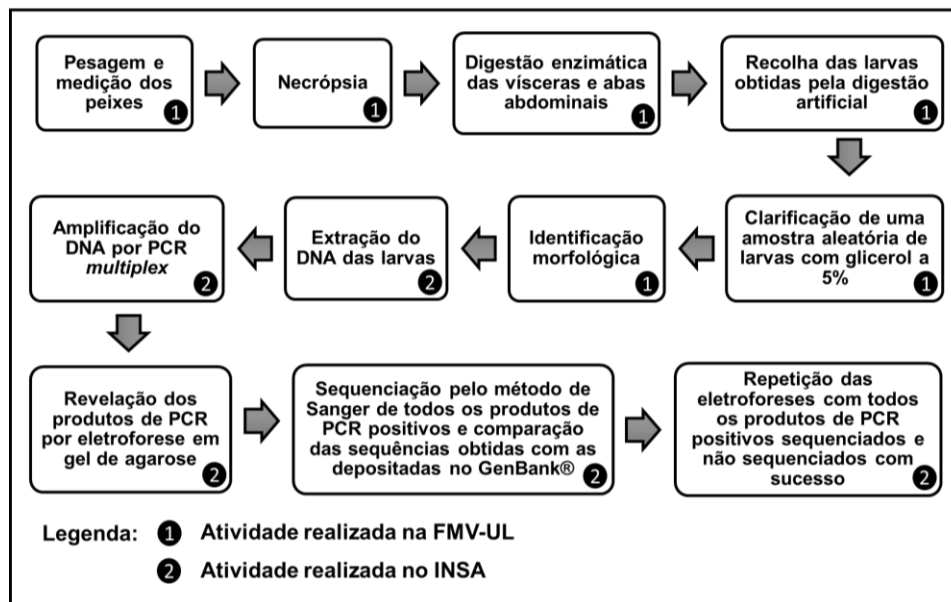
Para alcançar este objetivo principal, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Fazer um rastreio epidemiológico de nematodes das famílias Anisakidae e Raphidascarididae em carapau (*Trachurus trachurus*) capturado em águas portuguesas;
- Determinar os índices parasitários da infeção por anisquídeos em carapau capturado em águas portuguesas no mês de novembro de 2017;
- Identificar as características do pescado, nomeadamente do carapau, que podem constituir fatores de risco para a sua infeção por anisquídeos, de forma a elaborar um conjunto de medidas preventivas para a anisquidíase;
- Efetuar a caracterização morfológica e molecular das larvas de anisquídeos encontradas para identificação das espécies;
- Relacionar as diferentes variáveis do estudo de modo a tirar ilações de utilidade prática para futuros estudos, para os pescadores e consumidores em geral.

2. Material e métodos

Na figura 2 encontra-se um esquema simplificado da metodologia adotada. Mais à frente, em cada ponto, será efetuada uma explicação detalhada de cada etapa deste estudo.

Figura 2. Esquema simplificado da metodologia adotada.



2.1. Breve descrição da espécie em análise: carapau (*Trachurus trachurus*)

O carapau, *Trachurus* spp., é um género de peixes ósseos que pertence à família Carangidae, que se encontra distribuído no Mediterrâneo e nas águas temperadas e tropicais do Atlântico Este, desde a Noruega até à África do Sul (Rumolo et al., 2017).

Nas águas portuguesas continentais, estão presentes três espécies do género *Trachurus*: o carapau-branco, que vulgarmente se designa apenas por carapau (*Trachurus trachurus*), o carapau-negrão (*Trachurus picturatus*) e o carapau-do-mediterrâneo (*Trachurus mediterraneus*) (Gonçalves, Henriques & Angélico, 2013).

Apesar das três espécies serem exploradas comercialmente, a espécie *T. trachurus*, usualmente designada por carapau, é de longe a espécie mais capturada (Abaunza et al., 2003; Gonçalves et al., 2013). Esta espécie de carapau (*T. trachurus*) começa por ser uma espécie pelágica que forma densos cardumes e, à medida que cresce, vai tendencialmente habitando águas mais profundas (Instituto Português do Mar e da Atmosfera [IPMA], 2018). É habitual distribuir-se a baixas profundidades até aos 400 m nos mares da plataforma e talude continental (IPMA, 2018). Tem áreas distintas para a desova, alimentação e invernção, sendo a migração provavelmente estimulada pela temperatura da água do mar e disponibilidade de alimento. Dados na literatura sugerem que a temperatura mínima da água tolerada pelo carapau é de 8°C, sendo que a temperaturas inferiores a 9°C esta espécie deixa de se alimentar, o que demonstra também a forte influência da temperatura da água na ingestão de alimento (Abaunza et al., 2003; Lavín, Moreno-Ventas, Zárata, Abaunza & Cabanas, 2007). Consequentemente, o

teor lipídico do carapau varia sazonalmente, sendo maior no verão e menor no inverno (Garrido, Murta, Moreira, Ferreira & Angélico, 2008).

O carapau (*T. trachurus*) tem uma época de desova alargada ao longo da costa portuguesa, que pode chegar aos 8 meses, com um pico no inverno e primavera (entre dezembro e março) (Lavín et al., 2007). Durante o período da desova, a actividade alimentar aparenta ser reduzida, sendo que esta espécie de peixe parece ter o seu pico de actividade alimentar no Verão, o que também vai ao encontro do acima referido (Cabral & Murta, 2002).

Consoante o seu tamanho, o carapau é conhecido popularmente por jaquinzinho (até 15 cm de comprimento) e chicharro (carapau de calibre mais elevado). Durante os primeiros anos de vida crescem muito rapidamente, atingindo cerca de 20 cm de comprimento com um ano de idade. O crescimento torna-se muito mais lento após os três anos de vida. A longevidade desta espécie é superior a 20 anos e o seu comprimento pode atingir os 60 cm, apesar de mais frequentemente serem encontrados espécimes com tamanhos entre os 15 e os 40 cm (IPMA, 2018; International Council for the Exploration of the Sea [ICES], 2018). Morfologicamente, os peixes da espécie *T. trachurus* apresentam um corpo alongado e ligeiramente comprimido, com uma coloração cinzenta-esverdeada ou azulada na região dorsal e coloração prateada nos flancos e região ventral, possuem duas barbatanas dorsais, uma linha lateral com uma fiada completa de escudetes com uma inflexão muito marcada ao nível dos espinhos anais e uma linha lateral acessória que termina entre o 19º e 31º raios moles da segunda dorsal (IPMA, 2018).

A dieta do carapau em águas portuguesas é variável, mas estes peixes alimentam-se preferencialmente de pequenos crustáceos (zooplâncton). Conforme vão crescendo, a sua alimentação vai tornando-se mais diversificada, alimentando-se também de crustáceos maiores, outros peixes e cefalópodes (lulas) quando atingem cerca de 30 cm de comprimento (IPMA, 2018). Dado ser uma espécie abundante, é frequente serem presas de peixes carnívoros, tubarões, golfinhos e aves marinhas (IPMA, 2018).

2.2. Colheita da amostra de carapaus

A amostra de carapaus utilizada para este estudo foi cedida pela lota de Peniche e recolhida durante o mês de novembro de 2017, conforme indicado na tabela 8. Todos os espécimes de carapau utilizados no presente estudo foram aprovados para consumo e destinavam-se a ser vendidos na lota.

No total, esta amostra era composta por 116 exemplares de carapau (*T. trachurus*), que foram capturados em águas portuguesas (Atlântico Nordeste, Divisão ICES IXa, zona FAO 27.9.a), a partir da pesca de arrasto e foram selecionados aleatoriamente do conjunto de carapaus descarregados na lota nos dias da colheita da amostra.

Tabela 8. Distribuição e composição da amostra

Data de Captura	Local de Captura	Lote	Nº de Peixes
08.11.2017	Ericeira	A	30
15.11.2017	Nordeste da ilha da Berlenga	B	29
22.11.2017	Ericeira	C	35
28.11.2017	Ericeira	D	22
			Total: 116

Nota. Todos os peixes foram capturados por arrasto a uma profundidade aproximada de 154 metros.

Os exemplares de carapau que constituíram a amostra, foram transportados em recipientes isotérmicos, sob gelo, até ao Laboratório de Parasitologia da FMV-UL. No laboratório, os peixes foram mantidos refrigerados, a uma temperatura próxima do gelo fundente, até ao seu processamento, que não excedeu mais do que 24 horas após a chegada à lota e transporte para o laboratório.

Cada elemento da amostra foi individualmente identificado através de um código alfanumérico atribuído da seguinte forma:

- Letra maiúscula – correspondente ao lote (grupo de peixes capturados no mesmo dia e local);
- Algarismo – número sequencial de cada espécime dentro da amostra.

2.3. Processamento das amostras

Em primeiro lugar, em todos os exemplares da amostra foi medido o comprimento total em centímetros (cm) com uma régua graduada e verificado o peso em grama (g) numa balança de precisão Kern 440-43N (figura 3). O comprimento total de cada espécime foi obtido medindo ao longo do eixo longitudinal do corpo entre a extremidade cefálica e o bordo externo da barbatana caudal, tal como ilustrado na figura 3.

Figura 3. Pesagem e medição do comprimento total de um exemplar de carapau, à esquerda e direita respetivamente (originais).



2.3.1. Exame visual e necrópsia

A etapa seguinte do processamento da amostra consistiu na realização da necrópsia e exame visual exaustivo para detetar a presença de anisakuídeos na cavidade abdominal.

A necrópsia foi realizada com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e uma pinça bico de pato, com base no procedimento descrito por Gomes (2014) e Peleteiro (2016), nomeadamente da seguinte forma:

- a) Removeram-se as barbatanas peitorais e ventrais;
- b) Fez-se uma incisão ao longo da linha ventral desde a abertura anal até à base do opérculo (Figura 4.A);
- c) De forma a permitir destacar a musculatura hipaxial e a observar os órgãos na cavidade abdominal, efetuou-se uma segunda incisão, em forma de arco de circunferência, desde a abertura anal, seguindo o limite superior da cavidade abdominal até se encontrar a extremidade anterior do primeiro corte (Figura 4.B);
- d) Repetiu-se os passos anteriores na face contralateral (Figura 4.C e 4.D) e, de seguida, colocou-se a musculatura hipaxial que recobre a cavidade abdominal (abas abdominais) num copo de vidro identificado com o código de identificação do peixe seguido pela letra “M” (músculo), de forma a proceder à digestão artificial em etapas subseqüentes (Figura 4.E). Por exemplo: A.1.M (músculos do 1º peixe do lote A);
- e) Observou-se a cavidade abdominal e as vísceras para pesquisa de parasitas visíveis à vista desarmada (Figura 4.F). Simultaneamente, observou-se as gónadas para fazer a sexagem. Registou-se o número de larvas de anisakuídeos encontradas à vista desarmada para cada peixe e, após lavagem em soro fisiológico, colocaram-se as larvas obtidas num frasco com etanol a 70%, identificado com o lote de peixes e a letra “O” para indicar que eram os parasitas encontrados à vista desarmada na cavidade abdominal (Figura 4.G). Por exemplo: A.O (parasitas do lote A observados à vista desarmada durante a necrópsia);
- f) Destacou-se as vísceras começando por seccionar o recto e os ligamentos adjacentes e, de seguida, seccionou-se o esófago. Todas as vísceras do peixe foram colocadas num copo de vidro devidamente identificado com o código de identificação do peixe seguido pela letra “V” (vísceras), para proceder à digestão artificial na etapa seguinte (Figura 4.H e 4.I). Por exemplo: A.1.V. (vísceras do 1º peixe do lote A).

Para cada exemplar foi elaborada uma ficha de necrópsia (ver anexo 1) onde foram registadas as seguintes informações:

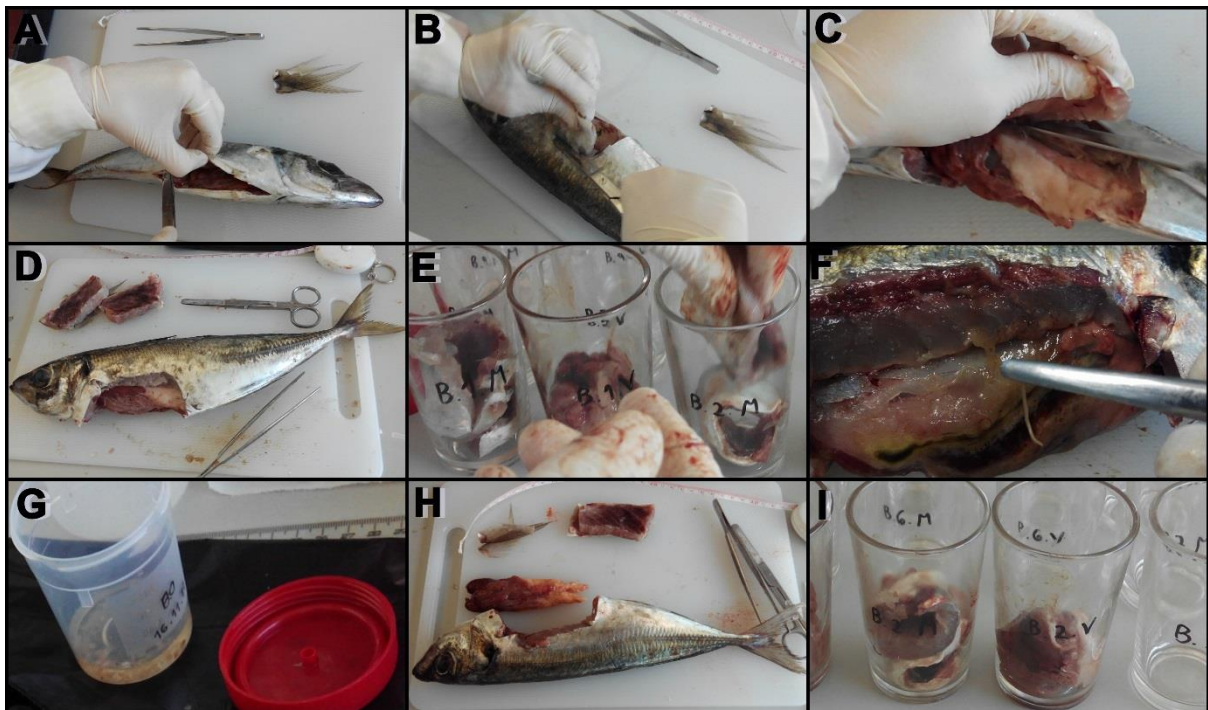
- Código de identificação do peixe;
- Peso e comprimento anteriormente medidos;

- Identificação do sexo do peixe;
- Nº de larvas encontradas à vista desarmada durante a necrópsia;
- Nº de larvas obtidas pela digestão artificial das abas abdominais (ponto 2.3.2);
- Nº de larvas obtidas pela digestão artificial das vísceras (ponto 2.3.2).

Importa ainda esclarecer que, neste estudo, todos os parasitas encontrados a circular livremente na cavidade abdominal ou sobre as vísceras ou na parede abdominal foram incluídos no grupo dos parasitas observados à vista desarmada durante a necrópsia e colocados em frascos de plástico com etanol a 70% identificados com a letra O.

Apesar de as larvas de anisacídeos poderem ser encontradas potencialmente em todos os músculos dos peixes, vários estudos indicam que a esmagadora maioria se concentra essencialmente ao nível da musculatura hipaxial que recobre a cavidade abdominal (e.g., Wootten et al., 2010; Levsen et al., 2018a). Como tal, neste estudo foi analisada exclusivamente essa musculatura quanto à presença de larvas de anisacídeos nos músculos dos peixes e, tal como já foi mencionado, os frascos de cada lote foram identificados com a letra M.

Figura 4. Imagens da pesquisa macroscópica de parasitas (originais).



Após a realização das necrópsias aos peixes foi possível fazer a caracterização da amostra do estudo, que se encontra resumida na tabela 9. Conforme é possível verificar nessa tabela, dos 116 exemplares de carapau que constituem a amostra do estudo, 85 peixes são fêmeas (73,3%

do total), a maioria pesa entre 100 a 200 gramas e tem um comprimento total superior a 26 cm. Na restante amostra, apenas foram observados 31 machos (26,7% do total).

Tabela 9. Caracterização da Amostra.

	Lote A (n = 30)	Lote B (n = 29)	Lote C (n = 35)	Lote D (n = 22)	Total (n = 116)
Sexo					
n (%) de fêmeas	24 (80%)	21 (72.4%)	26 (74.3%)	14 (63.6%)	85 (73.3%)
n (%) de machos	6 (20%)	8 (27.6%)	9 (25.7%)	8 (36.4%)	31 (26.7%)
Peso					
Entre 100-200 g	76.7%	0%	100%	54.5%	60.3%
Entre 201-300 g	23.3%	51.7%	0%	36.4%	25.9%
Entre 301-400 g	0%	37.9%	0%	9.1%	11.2%
Entre 401-500 g	0%	10.3%	0%	0%	2.6%
Comprimento					
Entre 24 a 25 cm	16.7%	0%	11.4%	18.2%	11.2%
Entre 25 a 26 cm	20%	0%	34.3%	13.6%	18.1%
> 26 cm	63.3%	100%	54.3%	68.2%	70.7%

2.3.2. Digestão artificial e colheita das larvas de anisquídeos

Para recuperar as larvas de anisquídeos eventualmente presentes nos músculos hipaxiais que recobrem a cavidade abdominal e vísceras dos peixes analisados, efetuou-se uma digestão artificial de forma a simular as condições de digestão existentes no estômago de um mamífero marinho (hospedeiro definitivo).

O método de digestão artificial adotado baseou-se no protocolo descrito por Gomes (2014) e no protocolo preconizado pelo laboratório de referência da UE para os parasitas (ISS, 2006), a saber:

- a) Num copo de vidro, juntou-se pela ordem que se segue os seguintes reagentes: 6 g de pepsina; 8,5 g de cloreto de sódio; 1000 ml de água destilada e 10 ml de ácido clorídrico a 37%. Misturou-se tudo com o auxílio de uma vareta até obter uma mistura homogênea (Figura 5.A).
- b) Verteu-se a mistura para cada um dos copos de vidro (dois copos de vidro por peixe: um copo de vidro com as abas abdominais e outro copo de vidro com as vísceras, identificados com a letra “M” e “V”, respetivamente), de modo a que as amostras ficassem completamente submersas na mistura (Figura 5.B).

- c) Colocaram-se os copos de vidro numa estufa a 37°C, durante pelo menos 24 horas, cobrindo a abertura de cada copo de vidro com uma folha de alumínio perfurada no centro de forma a manter a temperatura constante e diminuir a evaporação (Figura 5.B e 5.C).
- d) Findo o período de incubação em estufa, despejou-se o conteúdo de cada um dos copos de vidro num tabuleiro metálico onde se fez uma análise minuciosa com o auxílio de uma lâmpada de luz branca (Figura 5.D). Sempre que se formava um aglomerado de larvas, colocavam-se estas numa placa de Petri com um fundo preto por baixo de forma a se conseguir isolar melhor as larvas a fim de proceder à sua contagem (Figura 5.E e 5.F). Adicionalmente, com a ajuda de um funil de vidro e um filtro, fez-se uma análise minuciosa dos resíduos sólidos da digestão artificial ao verter os resíduos líquidos no recipiente destinado a armazenar os mesmos para posterior tratamento adequado (Figura 5.G-I). Dessa forma, algumas larvas de anisacídeos que não foram observadas no tabuleiro metálico puderam ser recuperadas.
- e) Recolheram-se e lavaram-se em soro fisiológico as larvas de anisacídeos obtidas pela digestão artificial. Registou-se na ficha de necropsia de cada peixe o número de larvas de anisacídeos encontradas no músculo e nas vísceras e colocaram-se as larvas obtidas em dois frascos com etanol a 70%:
- Um frasco para as larvas encontradas nos músculos, identificado com o lote de peixes e a letra “M”;
 - Um frasco para as larvas obtidas das vísceras, identificado com o lote de peixes e a letra “V”.

No final da colheita de larvas de anisacídeos, para cada lote de peixes (grupo de peixes capturados no mesmo dia e local) as larvas foram distribuídas para 3 frascos e preservadas em etanol a 70%, mais precisamente: (1) um frasco com as larvas encontradas à vista desarmada durante a necropsia e identificado com o lote seguido pela letra “O”; (2) um frasco com as larvas obtidas pela digestão artificial das abas abdominais identificado com o lote seguido pela letra “M” e (3) um frasco com as larvas obtidas pela digestão artificial das vísceras identificado com o lote seguido pela letra “V”. De cada um dos 3 frascos de cada lote foram extraídas aleatoriamente amostras representativas de larvas para identificação morfológica e posterior confirmação com análise molecular. O *n* da amostra foi obtido na plataforma *online* OpenEpi, introduzindo a informação relativa ao tamanho da população, frequência de parasitismo obtida no estudo e limite de confiança de 5%. Deste modo, do total de 3148 larvas colhidas da amostra de carapaus, após introdução dos dados na referida plataforma *online*, obteve-se um resultado

de 196 larvas necessárias colher aleatoriamente do total de 12 frascos com larvas de anisquídeos colhidas da amostra de carapaus (4 lotes, cada um com 3 frascos). Assim, colheram-se aleatoriamente cerca de 16 a 17 larvas de cada um dos 12 frascos, até perfazer o total de 196 larvas.

Figura 5. Etapas da digestão artificial, cujas etapas de A a I foram discriminadas previamente (originais)



2.4. Caracterização morfológica das larvas de anisquídeos

A caracterização morfológica de cada larva de anisquídeo foi realizada por observação ao microscópio ótico (*Olympus DP10*, modelo BX50F) no Laboratório de Parasitologia da FMV-UL. Em primeiro lugar, para permitir uma melhor visualização dos órgãos internos dos parasitas, foi efetuado um esclarecimento dos nematodes, no qual as larvas foram transferidas para uma solução de etanol a 70% e glicerol a 5% durante pelo menos 24 horas, contida num recipiente que foi deixado aberto, de forma a permitir a evaporação lenta do etanol. Após esse período, os parasitas foram colocados individualmente entre lâmina e lamela com uma gota da solução utilizada para clarificar as estruturas internas e foram observados ao microscópio ótico com ampliação total de 40 a 200x, conforme a região anatômica que se estava a observar.

As estruturas internas dos parasitas foram observadas e medidas com uma ocular micrométrica, tendo por base a informação reunida e sumarizada na Tabela 5 do ponto 1.7.1 da

Revisão Bibliográfica. Na maioria dos casos, para a observação e medição do ventrículo e do esófago foi utilizada a objetiva de 4x, sendo muitas vezes necessário fazer uma ligeira pressão na lamela com os dedos para que as estruturas do parasita ficassem mais comprimidas e se pudesse observar melhor o ventrículo. Quanto à extremidade posterior do parasita, a objetiva mais frequentemente utilizada foi a de 20x e, por vezes, para conseguir observar o *mucron* foi necessário retirar a lamela e observar somente o parasita sobre a lâmina. Como o *mucron* é uma estrutura de pequenas dimensões e a solução de etanol a 70% com glicerol a 5% é pouco viscosa, ao colocar a lamela podemos ter maior dificuldade em conseguir visualizar essa estrutura.

Embora o esclarecimento das estruturas morfológicas seja superior com o lactofenol, neste estudo teve de se optar pela utilização do glicerol, uma vez que se pretendia também identificar as mesmas larvas por métodos moleculares, de forma a cruzar a informação obtida com a caracterização morfológica. Quando se pretende fazer a extração de DNA com o objetivo de realizar estudos moleculares alguns investigadores não recomendam a utilização de lactofenol no esclarecimento, visto que a sua utilização provoca a destruição do DNA, inviabilizando assim esse tipo de estudos (S. L. Gardner, comunicação pessoal, 2017; M. Santoro, comunicação pessoal, 2017).

O primeiro passo na identificação morfológica consistiu em verificar se se tratava de uma larva do género *Anisakis* (apêndice ventricular e ceco intestinal ausentes). Caso se tratasse de uma larva pertencente a esse género, efetuava-se a categorização em larva tipo I ou tipo II, tal como sugerido por Berland (1961). À semelhança de Gomes (2014), por ser mais prático, no presente estudo, essa categorização foi efetuada com base apenas na presença ou ausência de *mucron*, ou seja, se presente, a larva era identificada como *Anisakis* tipo I e, se ausente, a larva era identificada como *Anisakis* tipo II. De seguida, independentemente do género a que pertencia o parasita, foi medida e registada numa ficha criada para o efeito (ver anexo 2), a seguinte informação:

- Comprimento total (CT) – distância compreendida entre a extremidade anterior e extremidade posterior do parasita;
- Comprimento do esófago (CE) – distância compreendida entre a boca e o limite anterior do ventrículo;
- Comprimento do ventrículo (CV) – distância compreendida entre o limite anterior e posterior do ventrículo;
- Espessura do ventrículo (EV) – corresponde à secção onde o ventrículo atinge a maior largura;

- Comprimento da cauda (CC) – distância compreendida entre o ânus e a ponta da cauda mais o comprimento do *mucron* no caso de este existir;
- Comprimento do *mucron* (CM), no caso de se tratar de uma larva de *Anisakis* tipo I.

Após a observação das características morfológicas, os parasitas foram conservados individualmente em tubos *ependorf* de 1,5 ml com etanol a 70% até serem utilizados nos estudos moleculares.

Cada um dos tubos *ependorf* foi identificado com um código da seguinte forma:

- Letra maiúscula – lote do peixe;
- Letra “O” (cavidade abdominal), “M” (músculo) ou “V” (vísceras), consoante a proveniência das larvas;
- Algarismo – número sequencial de cada larva observada em cada amostra.

Por exemplo: A.V.22 – corresponde à vigésima segunda larva observada, que foi extraída das vísceras de um peixe do lote A.

2.5. Caracterização molecular das larvas de anisquídeos

Concluída a identificação morfológica, para completar o estudo com a identificação molecular, as larvas de anisquídeos foram transportadas para o LNR de Infecções Parasitárias e Fúngicas do INSA nos tubos *ependorf* em etanol a 70%.

A identificação ao nível da espécie foi conseguida por PCR *multiplex* de um segmento do gene ribossomal nuclear que inclui a região ITS-1, o gene 5.8S e a região ITS-2 com adição de 70 bp do gene 28S, que doravante se passará a designar apenas por região ITS (sigla para “*Internal Transcribed Spacer*”).

A amostra de larvas foi organizada e tratada da seguinte forma:

- As larvas de anisquídeos identificadas morfológicamente como não pertencendo ao género *Anisakis* ou que, pelas características observadas ao microscópio, se consideraram larvas de *Anisakis* tipo II, foram analisadas individualmente;
- As restantes larvas foram organizadas e analisadas por *pools* consoante o lote de proveniência (A, B, C ou D), a sua localização no peixe (cavidade abdominal, músculos ou vísceras) e o seu comprimento total (comprimento total até 1 cm; entre 1 a 2 cm ou superior a 2 cm). Este último parâmetro, isto é, o comprimento total, foi o que apresentou maior variação de dimensões entre as larvas, a seguir ao comprimento do *mucron* para o qual, noutros estudos, nomeadamente no estudo de Quiazon, Yoshinaga, Ogawa e Yukami (2008), não foram encontradas diferenças entre espécies. Como tal, escolheu-se o segundo parâmetro que variava mais na amostra, ou seja, o comprimento total, para agrupar a amostra de larvas.

2.5.1. Extração e purificação do DNA das larvas

O kit de extração de DNA utilizado foi o QIAamp DNA Mini Kit da Qiagen® e seguiu-se o protocolo de extração de DNA para tecidos indicado pelo fabricante que a seguir se descreve.

- a) Retirou-se cerca de 2 mm de cada larva e colocou-se num tubo *eppendorf* limpo. Com a ajuda de uma micropipeta eliminou-se o excesso de etanol e lavaram-se as amostras de larvas com soro fisiológico.
- b) Adicionou-se 180 µl de tampão de lise tecidual (Buffer ATL) a cada um dos tubos.
- c) Adicionou-se 20 µl de Proteinase K, misturou-se com o vórtex e colocou-se os tubos a incubar à temperatura de 56°C durante a noite (*overnight*) sob agitação constante de 600 rpm, até as amostras ficarem completamente lisadas. A incubação foi feita em banho seco Thermomixer R da Eppendorf®.
- d) No dia seguinte, retiraram-se os tubos da incubação e centrifugaram-se (Centrifuge 5415 D, *Eppendorf*®) durante alguns segundos para remover as gotas do interior das tampas.
- e) Adicionou-se 200 µl de tampão de lise (Buffer AL) a cada amostra, agitou-se com o vórtex durante 15 segundos e de seguida incubou-se em banho seco a 70 °C durante 10 minutos (Thermomixer R, *Eppendorf*®). Centrifugou-se durante alguns segundos os tubos (Centrifuge 5415 D, *Eppendorf*®) para remover as gotas no interior das tampas.
- f) Adicionou-se 200 µl de etanol (96-100%) e agitou-se no vórtex durante 15 segundos.
- g) Transferiu-se cuidadosamente a mistura do passo anterior (incluindo o precipitado) para a coluna *QIAamp Mini spin* (num tubo coletor de 2ml), sem molhar os bordos. Fechou-se a tampa e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto. Colocou-se a coluna *QIAamp Mini spin* num tubo coletor de 2 ml limpo (fornecido no kit) e descartou-se o tubo que continha o filtrado.
- h) Abriu-se, com cuidado, a coluna *QIAamp Mini spin* e adicionou-se 500 µl de tampão AW1 (previamente reconstituído), sem molhar os bordos. Fechou-se a tampa e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto. Colocou-se a coluna *QIAamp Mini spin* num tubo coletor de 2 ml limpo (fornecido pelo fabricante) e descartou-se o tubo coletor que contém o filtrado.
- i) Abriu-se, com cuidado, a coluna *QIAamp Mini spin* e adicionou-se 500 µl de tampão AW2 (previamente reconstituído), sem molhar os bordos. Fechou-se a tampa e centrifugou-se à velocidade máxima durante 3 minutos.
- j) Colocou-se a coluna *QIAamp Mini spin* num *tubo eppendorf* limpo (não fornecido pelo fabricante) e descartou-se o tubo coletor contendo o filtrado. Abriu-se, com cuidado, a coluna *QIAamp Mini spin* e adicionou-se 60 µl de tampão de eluição (*Buffer AE*).

Incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto e depois centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto.

- k) Descartou-se a coluna *QIAamp Mini spin* e armazenou-se o DNA extraído a – 20°C até à sua utilização.

2.5.2. Amplificação do DNA: PCR *multiplex*

As reações de amplificação por PCR *multiplex* foram realizadas num termociclador *GeneAmp PCR System 9700* da Applied Biosystems®, segundo um protocolo baseado no publicado pelo laboratório de referência da UE para os parasitas (ISS, 2006).

Foi escolhido amplificar a região ITS para distinguir, com base na diferença de tamanho dos fragmentos de DNA obtidos, ao nível da espécie as larvas de *Anisakis* spp. das larvas de *Pseudoterranova* spp., *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. e, dentro das larvas de *Anisakis* spp. fazer a distinção entre *A. pegreffii*, *A. simplex* (s.l.) (incluindo o genótipo híbrido *A. simplex/A. pegreffii*), *A. physeteris* (incluindo *A. brevispiculata* e *A. paggiae*) e *A. typica*.

Os tamanhos dos fragmentos obtidos pela amplificação com os *primers* específicos para cada espécie são os apresentados na Tabela 10 e as sequências nucleotídicas de cada *primer* são as apresentadas na Tabela 11.

Tabela 10. Tamanho esperado dos fragmentos ITS (bp) para cada espécie obtidos com os *primers* indicados.

Espécie de anisacídeo	<i>Primer</i> 5'	<i>Primer</i> 3'	Tamanho do fragmento obtido
<i>A. pegreffii</i>	ASPf	RevB	588 bp
	APE1	“	672 bp
<i>A. simplex</i> (s.l.) e híbrido <i>A. simplex/pegreffii</i>	ASPf	“	588 bp
<i>A. physeteris</i> ^a	APyf	“	143 bp
<i>A. typica</i>	ATf	“	427 bp
<i>Contracaecum osculatum</i>	COf	“	799 bp
<i>C. rudolphii</i> (A, B, C)	CRf	“	307 bp
<i>Pseudoterranova</i> spp.	PDf	“	370 bp
<i>Hysterothylacium aduncum</i>	HAf	“	991 bp

^a Pode amplificar também *Anisakis brevispiculata* e *A. paggie*

Tabela 11. Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados

Sequência nucleotídica	Primer	Sequência-alvo
5'-TTGCAATCACTTCTCTCAGATTG-3'	ATf	ITS
5'-GGCTGGTTGATGAACTGTTG-3'	APyf	ITS
5'-GACATTGTTATTTTCATTGTATGTGTTGAAAATG-3'	ASPf	ITS
5'-GAGCAGCAGCTTAAGGCAGAGGC-3'	APE1	ITS
5'-CGAGTACTTTTTATGGTCGTGAAGT-3'	PDf	ITS
5'-TGATATGCTTGAAAGGCAGG-3'	COf	ITS
5'-CGACAAGCAGTGTCCCTTTG-3'	CRf	ITS
5'-GCCTTCCATATGCGCGTATA-3'	HAf	ITS
5'-GCCGGATCCGAATCCTGGTTAGTTTCTTTTCC-3'	RevB	ITS

O processo de amplificação foi realizado num volume de 50 μ l, para o qual aos 5 μ l de DNA larvar extraído foi adicionado 45 μ l de mistura de PCR, que continha 23 μ l de *Taq PCR Master Mix Kit* (cat. No. 201443, Qiagen), 1 μ l de cada *primer* e 13 μ l de água para biologia molecular (*molecular grade water*, cat#2900136, 5-Prime GmbH).

O protocolo de amplificação utilizado foi o seguinte:

- Pré-desnaturação – 2 min a 95°C;
- 30 ciclos de:
 - Desnaturação – 30 segundos a 95 °C;
 - Hibridização – 30 segundos a 55 °C;
 - Extensão – 45 segundos a 72 °C;
- Extensão final – 7 minutos a 72°C.

2.5.3. Visualização em gel de agarose

Os produtos de PCR foram revelados por eletroforese utilizando um gel de agarose a 1,5% que foi preparado com tampão TBE 1X e que continha 2,5 μ l de *GelRed®* como agente revelador.

As eletroforeses foram realizadas numa tina de eletroforese horizontal *i-Mupid Mini-Gel Electrophoresis Unit* (Figura 6), na qual se fez correr um volume de 7 μ l de produto de PCR e 3 μ l de tampão de carga *6X DNA Loading Dye* (Thermo Fisher®) em cada poço, com exceção do primeiro poço onde se introduziu 1 μ l de marcador *GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder* (Thermo Fisher®). A eletroforese foi efetuada

Figura 6. Tina de eletroforese utilizada no estudo (original)



aplicando uma voltagem de 100 v durante cerca de 30 minutos.

As fotografias dos géis foram realizadas numa sala escura, usando o transiluminador com luz UV *Gel Doc™ XR da Bio-Rad®* (Figura 7), bem como o *software Quantity One 4.4.0®* da mesma marca.

Figura 7. Transiluminador utilizado no estudo (original)



2.5.4. Sequenciação e leitura de seqüências

Antes das amostras serem sequenciadas segundo a metodologia de Sanger, os produtos de PCR positivos foram purificados com a enzima *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent®* (5µl de produto de PCR com 2 µl de enzima), colocando no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems®), no qual foram sujeitos a uma temperatura de 37°C durante 15 minutos e, de seguida, a uma temperatura de 80°C durante 15 minutos. Findo esse período, preparou-se uma reação de amplificação de acordo com o seguinte: 2 µl de mistura (*Big Dye Terminator v1.1. Cycle Sequencing RR-100*); 1 µl de produto de PCR; 5 µl de água para biologia molecular (*molecular grade water, cat#2900136, 5-Prime GmbH*), 1 µl de tampão (*5X Sequencing Buffer*) e 1 µl de *primer* (*forward* ou *reverse*). De seguida, a solução foi colocada novamente no termociclador e programou-se a PCR nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C durante 5 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 96°C durante 10 segundos, hibridização a 50°C durante 5 segundos e extensão a 60°C durante 4 minutos.

Cada produto de PCR foi sequenciado em ambas as direções. As seqüências complementares obtidas de cada produto de PCR foram comparadas de forma a corrigir possíveis erros de sequenciamento no programa *BioEdit®* (versão 7.0.5.3), com ajuda do programa *Chromas®* (versão 2.6.4) e, após todas as correções necessárias, obteve-se uma seqüência *consensus* para cada fragmento de DNA. Por último, cada seqüência *consensus* foi comparada com as seqüências depositadas no *GenBank®*, utilizando para isso o programa *online BLAST (Basic Local Alignment Search)* do NCBI, de modo a identificar a espécie de anisáquideo à qual cada elemento da amostra de larvas pertencia.

2.6. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foram utilizados os programas *SPSS® 25.0.* e *Excel® 2016.*

Foi efetuado um tratamento estatístico dos dados recorrendo-se à estatística descritiva, bem como foram calculados os índices parasitários conforme Bush et al. (1997):

- Frequência ou Prevalência – é definida como o número de hospedeiros infetados com um ou mais exemplares de um determinado parasita dividido pelo número de hospedeiros analisados para a pesquisa desse parasita.
- Intensidade (da infecção) – representa o número médio de parasitas num único hospedeiro infetado, obtido pela divisão do número total de parasitas colhidos pelo número total de hospedeiros infetados.
- Abundância – representa o número médio de parasitas num único hospedeiro examinado, que se obtêm dividindo o número total parasitas colhidos pelo número total de peixes examinados, independentemente de estarem ou não infetados.

Como o n da amostra total de peixes e o n das amostras de parasitas são superiores a 30, aplicou-se o teorema do limite central. Este teorema estabelece que quando as amostras têm um n superior a 30, a distribuição da amostra irá assumir a forma de uma distribuição normal, independentemente da forma que esta assume na população de onde a amostra foi retirada (Field, 2009, pp. 782). Assim, para as restantes análises utilizaram-se testes paramétricos. Nomeadamente, recorreu-se às análises de regressão linear para observar as relações entre as variáveis independentes e dependentes. Embora a análise de correlações tenha utilidade para verificar as relações entre variáveis, a análise de regressões lineares serve o mesmo propósito, no entanto trata-se de uma análise mais robusta na medida em que os dados são analisados tendo por base um modelo em que é estabelecido quais são as variáveis dependentes e as variáveis independentes (Field, 2009). Adicionalmente, para verificar se existiam diferenças significativas entre os valores médios dos parâmetros morfológicos medidos para *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* procedeu-se à análise de variância (ANOVA; F). Para todas as análises e testes efetuados, o valor utilizado para avaliar a sua significância foi de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Análise epidemiológica de nematodes das famílias Anisakidae e Raphidascarididae em carapau de águas portuguesas

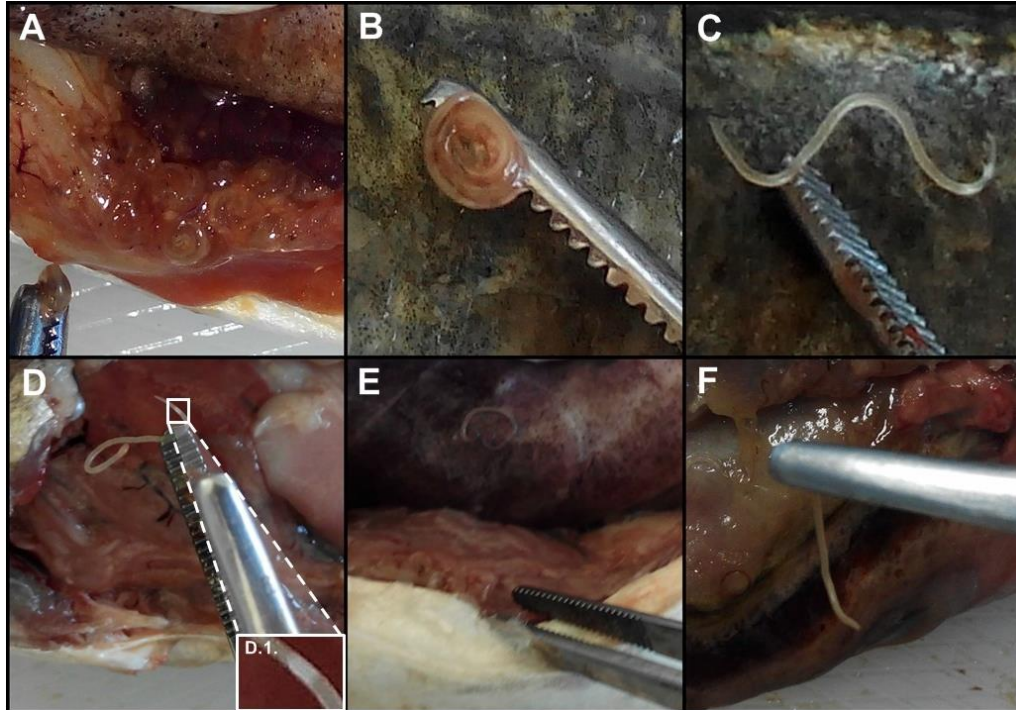
Dos 116 carapaus analisados, 98 (84,5% do total da amostra) encontravam-se parasitados, sendo que durante a necrópsia foram detetados 84 carapaus infetados (Tabela 12). De entre as 85 fêmeas examinadas, 75 estavam infetadas (22 fêmeas do lote A, 21 fêmeas do lote B, 21 fêmeas do lote C e 11 fêmeas do lote D), o que representa uma frequência parasitária nas fêmeas de 88,2%. Quanto aos peixes macho, dos 31 examinados, 23 estavam parasitados (quatro machos do lote A, oito machos do lote B, seis machos do lote C e cinco machos do lote D), correspondendo deste modo a uma prevalência parasitária de 74,2% nos machos.

Neste estudo, no total foram colhidos 3148 parasitas e, dentro desse número, a maior parte teve origem nas vísceras (68,5% do total de larvas obtidas) e apenas 1,6% (49/3148) das larvas foram encontradas nos músculos (Tabela 12). É de referir que todos os parasitas colhidos durante a necrópsia e que foram colocados no grupo “observados à vista desarmada” (30% do total de larvas examinadas), encontravam-se viáveis e circulavam livremente na cavidade abdominal ou encontravam-se enquistados sobre as serosas e vísceras (Figura 8). Ao colher as larvas, foi possível ainda distinguir claramente a olho nu a porção ventricular da larva. Esta estrutura, localizada na extremidade anterior da larva, apresenta uma cor mais esbranquiçada em relação ao resto do corpo, conforme é possível observar na figura 8.C, 8.D, 8.F e, mais pormenorizadamente, na Figura 8.D.1. Do mesmo modo, todas as larvas colhidas após o processo de digestão artificial encontravam-se viáveis, mas neste caso todas se encontravam desenquistadas e a mover-se vigorosamente, tanto dentro dos copos utilizados para a digestão artificial, como dentro do tabuleiro metálico utilizado para a sua colheita.

Tabela 12. Caracterização da amostra quanto ao parasitismo.

	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	Total
	(n = 30)	(n = 29)	(n = 35)	(n = 22)	(n = 116)
Nº de peixes parasitados	26	29	27	16	98
(%)	(86.7%)	(100%)	(77.1%)	(72.7%)	(84.5%)
Nº de peixes não parasitados	4	0	8	6	18
(%)	(13.3%)	(0%)	(22.9%)	(27.3%)	(15.5%)
Nº de parasitas					
Observados à vista desarmada	138	471	67	267	943
Músculos (após digestão artificial)	20	19	3	7	49
Vísceras (após digestão artificial)	352	1285	137	382	2156
Total de parasitas	510	1775	207	656	3148

Figura 8. Colheita de larvas da cavidade abdominal.



Nota. Larvas enquistadas na cavidade abdominal (A), larva enquistada e após desenquistamento com a ajuda de uma pinça bico de pato (B e C), exemplos de larvas a circular livremente na cavidade abdominal (D-F). Pormenor de observação da porção ventricular com uma cor mais esbranquiçada em relação ao resto do corpo (D.1). Originais.

Os dados referentes aos índices parasitários constam na tabela 13. Nessa tabela pode-se observar que o lote B apresentou a frequência, intensidade e abundância média de infecção mais elevadas e, simultaneamente, foi o lote cujos peixes tinham o peso e o comprimento médios mais elevados (294,4 Kg e 32,2 cm, respetivamente). Concretamente, no lote B todos os peixes estavam parasitados (prevalência de 100%) e obteve-se uma amplitude de intensidade parasitária de 5 a 229 parasitas por peixe (i.e., foram colhidos no mínimo 5 parasitas e no máximo 229 parasitas em exemplares desse lote). Simultaneamente, também se verificou uma elevada variabilidade no conjunto de peixes que compõem cada um dos lotes, como se pode observar pelos desvios-padrão e valores mínimos e máximos obtidos em cada lote nas diferentes variáveis (Tabela 13).

Na totalidade da amostra do estudo, obteve-se uma intensidade e abundância média de cerca de 32 e 27 parasitas, respetivamente (Tabela 13).

Tabela 13. Frequência, intensidade e abundância do parasitismo por lote e amostra total.

	Lote A (<i>n</i> = 30)	Lote B (<i>n</i> = 29)	Lote C (<i>n</i> = 35)	Lote D (<i>n</i> = 22)	Total (<i>n</i> = 116)
<i>N</i> total de parasitas	510	1775	207	656	3148
Comprimento (<i>cm</i>)	<i>M</i> = 27.0 (<i>DP</i> = 2.1) Min. = 23.5; Máx. = 30.0	<i>M</i> = 32.2 (<i>DP</i> = 3.3) Min. = 28.0; Máx. = 38.5	<i>M</i> = 25.9 (<i>DP</i> = 1.0) Min. = 24.0; Máx. = 27.5	<i>M</i> = 28.1 (<i>DP</i> = 3.2) Min. = 23.5; Máx. = 34.0	<i>M</i> = 28.2 (<i>DP</i> = 3.5) Min. = 23.5; Máx. = 38.5
Peso (<i>g</i>)	<i>M</i> = 169.0 (<i>DP</i> = 37.4) Min. = 120.0; Máx. = 243.9	<i>M</i> = 294.4 (<i>DP</i> = 79.5) Min. = 204.9; Máx. = 435.1	<i>M</i> = 142.6 (<i>DP</i> = 14.6) Min. = 111.3; Máx. = 173.5	<i>M</i> = 186.8 (<i>DP</i> = 64.5) Min. = 108.9; Máx. = 335.8	<i>M</i> = 195.7 (<i>DP</i> = 78.9) Min. = 108.9; Máx. = 435.1
Frequência (%)	86.7%	100%	77.1%	72.7%	84.5%
Intensidade	<i>M</i> = 19.6 (<i>DP</i> = 38.1) Min. = 1; Máx. = 203	<i>M</i> = 61.2 (<i>DP</i> = 50.2) Min. = 5; Máx. = 229	<i>M</i> = 7.7 (<i>DP</i> = 7.2) Min. = 1; Máx. = 29	<i>M</i> = 41.0 (<i>DP</i> = 39.2) Min. = 1; Máx. = 131	<i>M</i> = 32.1 (<i>DP</i> = 43.2) Min. = 1; Máx. = 229
Abundância	<i>M</i> = 17.0 (<i>DP</i> = 36.1) Min. = 0; Máx. = 203	<i>M</i> = 61.2 (<i>DP</i> = 50.2) Min. = 5; Máx. = 229	<i>M</i> = 5.9 (<i>DP</i> = 7.1) Min. = 0; Máx. = 29	<i>M</i> = 29.8 (<i>DP</i> = 38.1) Min. = 0; Máx. = 131	<i>M</i> = 27.1 (<i>DP</i> = 41.4) Min. = 0; Máx. = 229

Nota. *M* = Média; *DP* = Desvio-padrão; Min. = Mínimo; Máx. = Máximo.

Com a amostra total (*n* = 116), mediante a análise de regressões lineares, observaram-se algumas relações significativas entre as variáveis (Tabela 14). Nomeadamente, verificou-se: (1) uma relação positiva e significativa entre a variável sexo e a variável comprimento do peixe [$\beta = .20$, $p < .05$, $R^2 = .04$]; (2) uma relação positiva e significativa entre a variável peso do peixe e a variável peixe infetado [$\beta = .34$, $p < .01$, $R^2 = .12$]; (3) uma relação positiva e significativa entre a variável peso do peixe e a variável número total de parasitas [$\beta = .76$, $p < .01$, $R^2 = .58$]; (4) uma relação positiva e significativa entre a variável comprimento do peixe e a variável peixe infetado [$\beta = .37$, $p < .01$, $R^2 = .13$] e (5) uma relação positiva e significativa entre a variável comprimento do peixe e a variável número total de parasitas [$\beta = .76$, $p < .01$, $R^2 = .57$). Atendendo ao padrão de relações observado, verificou-se que: (1) os peixes machos são significativamente mais compridos que os peixes fêmeas; (2) os peixes mais pesados têm mais probabilidade de estar

infetados; (3) os peixes mais pesados têm mais parasitas; (4) os peixes mais compridos têm mais probabilidade de estar infetados e (5) os peixes mais compridos têm mais parasitas.

Tabela 14. Relação entre variáveis.

Relação entre variáveis	<i>B</i>	Valor- <i>p</i>	<i>R</i> ²
Sexo → Peixe Infetado	-.17	.07	.03
Sexo → Peso do Peixe	.17	.07	.03
Sexo → Comprimento do Peixe	.20*	.03	.04
Sexo → N ^o Total de Parasitas	.18	.06	.03
Peso do Peixe → Peixe Infetado	.34**	.00	.12
Peso do Peixe → N ^o Total de Parasitas	.76**	.00	.58
Comprimento do Peixe → Peixe Infetado	.37**	.00	.13
Comprimento do Peixe → N ^o Total de Parasitas	.76**	.00	.57

Nota. Sexo (0 = Fêmea; 1 = Macho); Peixe Infetado (0 = Não; 1 = Sim); * = $p < .05$; ** $p < .01$.

3.2. Resultados da análise morfológica e identificação molecular das larvas de anisaquídeos

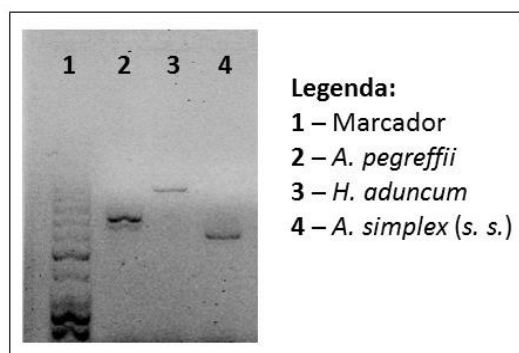
De acordo com os critérios especificados no material e métodos do presente trabalho, foram caracterizadas morfológicamente e identificadas com metodologia molecular 196 larvas de anisaquídeos. Durante a observação das características morfológicas das larvas de anisaquídeos, apenas foi identificada uma larva não pertencente ao género *Anisakis* que era proveniente do lote A do grupo de larvas que foram colhidas da cavidade abdominal durante a necrópsia. Das 195 larvas restantes que foram observadas, apenas em nove não foi observada a existência de *mucron* (cinco larvas colhidas dos músculos dos peixes do lote A, uma larva colhida durante a necrópsia de um peixe do lote A, uma larva colhida dos músculos de um peixe do lote B e duas larvas colhidas durante a necrópsia dos peixes do lote C). Como tal, essas larvas foram classificadas como larvas de *Anisakis* tipo II. Essas 10 larvas foram, por isso, processadas individualmente nos estudos moleculares e as restantes 186 larvas foram processadas em *pools* formados com base no lote de proveniência, localização no peixe e comprimento total, tal como já foi anteriormente referido.

Das 196 larvas de anisaquídeos previamente caracterizadas morfológicamente, obteve-se produtos de PCR positivos em 159 larvas e, entre estes, três tinham quantidade suficiente de DNA que permitiu fazer a sequenciação. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas no *GenBank*®, tendo-se obtido os seguintes resultados: (1) uma sequência revelou 99% de identidade com uma sequência previamente registada como

pertencente a um espécime de *Hysterothylacium aduncum* (KU306720), (2) uma sequência revelou 99% de identidade com uma sequência previamente registrada como pertencente a um espécime de *Anisakis simplex sensu stricto* (LL324431) e, por último, (3) uma sequência revelou 96% de identidade com uma sequência previamente registrada como pertencente a um espécime de *Anisakis pegreffii* (MF803221). Apesar desta última sequência ter 96% de identidade com sequências previamente registradas no *GenBank*®, como foi possível fazer a sequenciação com o *primer* APE1, que só permite amplificar a região ITS de *Anisakis pegreffii*, foi possível ter mais segurança em relação à classificação efetuada quanto à espécie deste exemplar. Posteriormente, repetiram-se as corridas de eletroforese com todos os produtos de PCR positivos, utilizando os três produtos de PCR que foram sequenciados como controlos positivos da eletroforese. Dessa forma, foi possível classificar quanto à espécie as 156 larvas restantes com as quais se tinha obtido previamente resultados positivos por PCR, através de comparação das suas bandas com as bandas das três larvas sequenciadas.

Devido à grande quantidade de amostras de DNA analisadas, apenas se apresenta, na Figura 9, o resultado de uma corrida de eletroforese com os produtos de PCR das larvas cujo DNA foi sequenciado. As bandas obtidas com os produtos de PCR dessas larvas serviram para classificar quanto à espécie as restantes larvas com produtos de PCR positivos que não foi possível sequenciar. Todos os resultados obtidos nas eletroforeses podem ser consultados no anexo 3 e a lista com todos os produtos de PCR positivos no anexo 4.

Figura 9. Revelação por eletroforese dos produtos de PCR das larvas sequenciadas (original).



A informação resultante da identificação das larvas de anisquídeos por biologia molecular foi associada com os dados obtidos com a caracterização morfológica e encontra-se sistematizada na tabela 15.

Tabela 15. Medições de algumas características morfológicas em larvas L3 de anisquídeos.

Classificação Molecular	<i>Anisakis</i> spp.*	<i>A. simplex</i> (s. s.)	<i>A. pegreffii</i>	<i>A. simplex</i> (s. l.)	<i>H. aduncum</i>	
Nº de Larvas	37	43	73	42	1	
Caraterização Morfológica	CT (cm)	<i>M</i> = 1.424 (<i>DP</i> = 0.326) Min. = 0.900; Máx. = 2.500	<i>M</i> = 1.705 (<i>DP</i> = 0.467) Min. = 1.100; Máx. = 2.700	<i>M</i> = 1.518 (<i>DP</i> = 0.301) Min. = 0.700; Máx. = 2.100	<i>M</i> = 1.619 (<i>DP</i> = 0.279) Min. = 1.000; Máx. = 2.000	2.200
	CE (mm)	<i>M</i> = 1.443 (<i>DP</i> = 0.318) Min. = 0.900; Máx. = 2.500	<i>M</i> = 1.700 (<i>DP</i> = 0.314) Min. = 1.250; Máx. = 2.500	<i>M</i> = 1.479 (<i>DP</i> = 0.279) Min. = 0.875; Máx. = 2.250	<i>M</i> = 1.533 (<i>DP</i> = 0.249) Min. = 0.750; Máx. = 2.000	2.166
	CV (mm)	<i>M</i> = 0.568 (<i>DP</i> = 0.082) Min. = 0.500; Máx. = 0.875	<i>M</i> = 0.671 (<i>DP</i> = 0.140) Min. = 0.500; Máx. = 1.000	<i>M</i> = 0.603 (<i>DP</i> = 0.101) Min. = 0.400; Máx. = 1.000	<i>M</i> = 0.642 (<i>DP</i> = 0.083) Min. = 0.500; Máx. = 0.825	0.286
	EV (mm)	<i>M</i> = 0.226 (<i>DP</i> = 0.035) Min. = 0.125; Máx. = 0.300	<i>M</i> = 0.213 (<i>DP</i> = 0.047) Min. = 0.120; Máx. = 0.325	<i>M</i> = 0.232 (<i>DP</i> = 0.040) Min. = 0.125; Máx. = 0.325	<i>M</i> = 0.245 (<i>DP</i> = 0.034) Min. = 0.175; Máx. = 0.325	0.086
	CC (mm)	<i>M</i> = 0.114 (<i>DP</i> = 0.020) Min. = 0.050; Máx. = 0.150	<i>M</i> = 0.117 (<i>DP</i> = 0.030) Min. = 0.010; Máx. = 0.175	<i>M</i> = 0.114 (<i>DP</i> = 0.020) Min. = 0.038; Máx. = 0.175	<i>M</i> = 0.118 (<i>DP</i> = 0.025) Min. = 0.075; Máx. = 0.225	0.216
	CM (µm)	<i>M</i> = 17.652 (<i>DP</i> = 6.930) Min. = 5.00; Máx. = 32.50	<i>M</i> = 12.917 (<i>DP</i> = 6.715) Min. = 5.00; Máx. = 25.00	<i>M</i> = 15.543 (<i>DP</i> = 6.529) Min. = 5.00; Máx. = 30.00	<i>M</i> = 14.464 (<i>DP</i> = 7.039) Min. = 5.00; Máx. = 25.00	NA

* nos espécimes desta coluna não foi possível efetuar a identificação molecular.

Nota. CT = comprimento total; CE = comprimento do esófago; CV = comprimento do ventrículo; EV = espessura do ventrículo; CC = comprimento da cauda; CM = comprimento do *mucron*; *M* = Média; *DP* = Desvio-padrão; Min. = Mínimo; Máx. = Máximo; NA = Não aplicado.

Neste estudo observou-se uma diferença na frequência relativa entre *A. pegreffii* e *A. simplex* (s.s.). Das 116 larvas L3 de anisquídeos nas quais se conseguiu identificar a espécie críptica a que pertenciam dentro do complexo *Anisakis simplex*, 73 pertenciam à espécie *A. pegreffii* e 43 pertenciam à espécie *A. simplex* (s.s.), o que corresponde a uma frequência relativa de 62,9 e 37,1%, respetivamente.

Através da análise de variância (ANOVA) verificou-se que existem algumas diferenças significativas entre os valores médios dos parâmetros morfológicos medidos para *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii*. Concretamente, estas duas espécies de parasitas diferem significativamente quanto ao comprimento total [$F(1,116) = 6.87$; $p < .01$], comprimento do esófago [$F(1,116) = 15.51$; $p < .01$], comprimento do ventrículo [$F(1,116) = 9.18$; $p < .01$], espessura do ventrículo [$F(1,116) = 5.66$; $p < .05$] e comprimento do *mucron* [$F(1,116) = 4.14$; $p < .05$]. Conforme é possível constatar pelos valores *F* registados, é no comprimento do esófago e do ventrículo que as diferenças entre as duas espécies são mais salientes. Tal como mostra a tabela 15, o comprimento médio do esófago é de 1,700 mm em *Anisakis simplex* (s.s.) e 1,479 mm em *Anisakis pegreffii*. Relativamente ao comprimento do ventrículo, verifica-se que em média tem o comprimento de 0,671 mm em *Anisakis simplex* (s.s.) e 0,603 mm em *Anisakis pegreffii*.

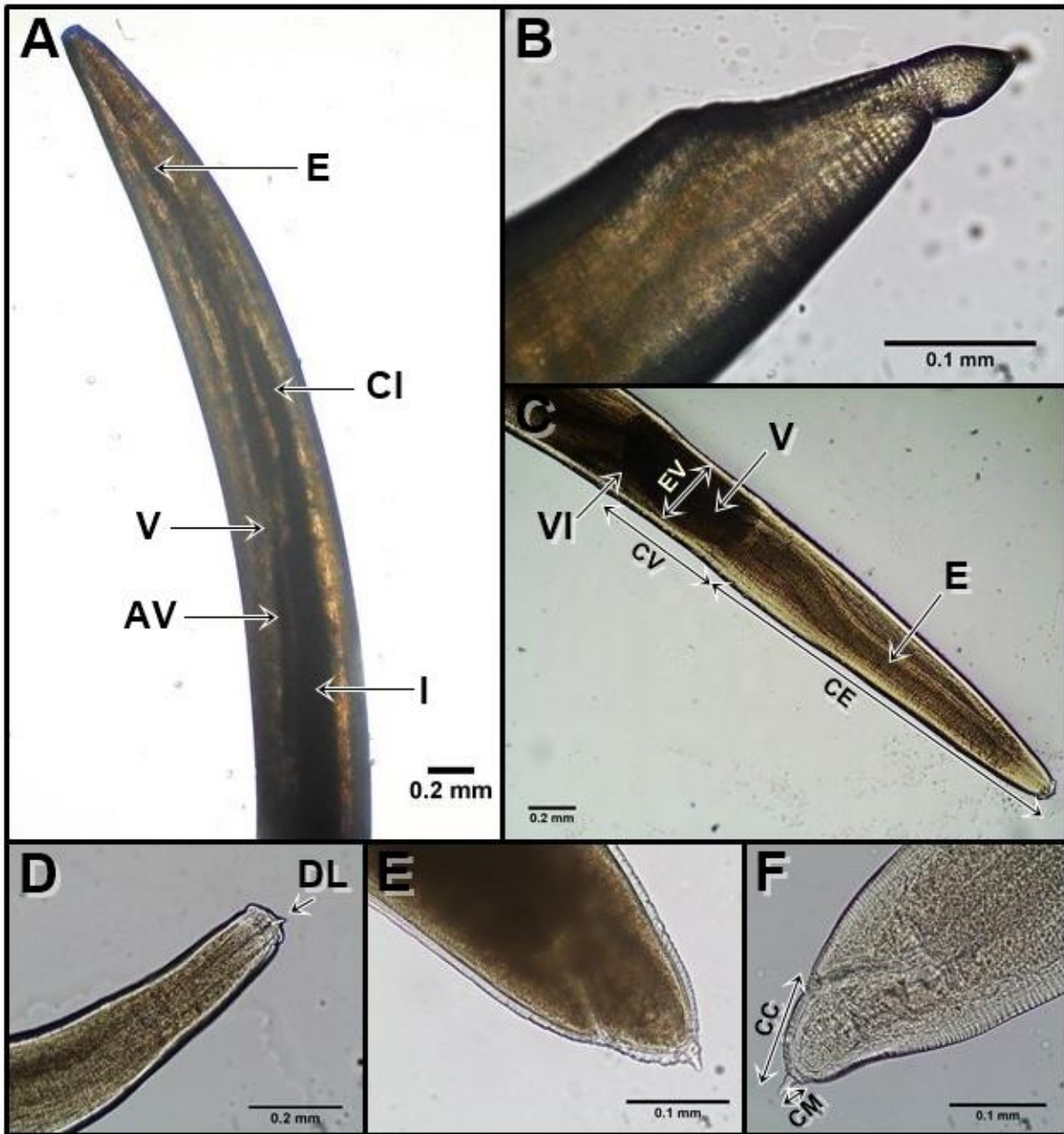
Na figura 10, pode-se observar várias fotografias originais deste estudo, selecionadas para mostrar as características morfológicas dos tipos de larvas de anisquídeos observadas ao microscópio ótico.

Como se pode observar na figura 10.A e 10.B, morfológicamente a larva de *Hysterothylacium aduncum* apresenta lábios pouco desenvolvidos, esófago longo e ventrículo relativamente curto, poro excretor localizado ao nível do anel nervoso e o apêndice ventricular e ceco intestinal estão presentes. A extremidade posterior apresenta a forma típica de uma larva de terceiro estágio larvar desta espécie, pois termina num bulbo levemente arredondado que contém no seu interior a cauda em forma de cacto (“cactus-tail”) típica do quarto estágio larvar.

Nas imagens C a F da Figura 10 pode-se observar as características típicas de uma larva L3 de *Anisakis simplex sensu lato*. Nomeadamente, um tubo digestivo simples sem apêndice ventricular e ceco intestinal, com um ventrículo relativamente comprido que se une ao intestino de forma oblíqua e a presença de um *mucron* na cauda.

Por último, deve-se referir que o DNA de cinco larvas classificadas como larvas de *Anisakis* do tipo II durante a identificação morfológica foi amplificado com sucesso e que o resultado a nível molecular demonstrou que quatro dessas larvas tratavam-se na realidade de nematodes pertencentes à espécie *Anisakis pegreffii* e uma larva pertencia à espécie *Anisakis simplex sensu stricto*. Além disso, das três sequenciações efetuadas com sucesso, duas foram realizadas com produtos de PCR de duas dessas larvas que foram classificadas como *Anisakis* do tipo II durante a caracterização morfológica. A outra larva sequenciada foi a larva que tinha sido identificada como não pertencente ao género *Anisakis* durante a identificação morfológica, sendo que essa classificação foi confirmada por biologia molecular cujo resultado a identificou como pertencendo à espécie *Hysterothylacium aduncum*.

Figura 10. Principais parâmetros morfológicos das larvas de anisacídeos observadas microscopicamente.



Nota. Extremidade anterior (A) e extremidade posterior (B) de L3 de *Hysterothylacium aduncum*; Extremidade anterior de *Anisakis simplex* (s.l.) (C e D); Extremidade posterior de *Anisakis simplex* (s.l.) (E e F). Legenda: E – esófago; CI – ceco intestinal; V – ventrículo; AV – apêndice ventricular; I – intestino; VI – junção ventrículo-intestino; EV – espessura do ventrículo; CV – comprimento do ventrículo; CE – comprimento do esófago; DL – dente larvar; CC – comprimento da cauda; CM – comprimento do *mucron*. Obs.: O esclarecimento foi efetuado com glicerol a 5% em A, B e E, enquanto em C, D e F foi utilizado lactofenol para esse procedimento (originais).

4. Discussão

Tal como foi salientado na revisão bibliográfica, os anisquídeos parasitam várias espécies de peixes e cefalópodes que são consumidos habitualmente pela população portuguesa. Entre as principais espécies de peixes consumidas a nível nacional, o carapau (*Trachurus trachurus*) tem-se revelado uma das espécies mais parasitadas e os resultados deste estudo vêm ao encontro do registado em estudos anteriores. Na tabela 16, pode-se observar a prevalência e a intensidade média parasitária de anisquídeos em carapau proveniente de águas Ibéricas encontrada em alguns estudos até à atualidade, inclusivamente os valores encontrados no presente estudo.

Tabela 16. Comparação entre vários estudos de prevalência e intensidade média parasitária em carapau proveniente de águas Ibéricas.

Área geográfica	Nº de amostras	[Comp.; peso corporal]	P%	I.M.	Método de deteção	Referência
Galiza, Espanha	100	[23 a 41 cm; 84 a 652 g]	88%	15,5	I.V. (V e CA) e D.A. (M)	Abollo et al., 2001
Costa oeste portuguesa	58	[17 a 27 cm; N.R.]	75,9%	6,2	I.V.	Silva & Eiras, 2003
Porto, Portugal	209	[15 a 29,9 cm; N.R.]	38,3%	2,2	I.V.	Cruz et al. (2005)
Peniche, Portugal	186	[25 a 28 cm; 110 a 180 g]	82,25%	11,8	I.V.	Borges, 2008
Setúbal, Portugal	186	[20 a 26,5 cm; 60 a 160 g]	68,81%	9		
Peniche, Portugal	104	[18 a 40 cm; 44,3 g a 608,5 g]	67,31% (70/104, 37 detetados durante a necrópsia, i.e, cerca de 53% da amostra infetada)	21,5	I.V. + D.A.	Gomes, 2014
Peniche, Portugal	116	[23,5 a 38,5 cm; 108,9 a 435,1 g]	84,5% (98/116, 84 detetados durante a necrópsia, i.e, cerca de 85,7% da amostra infetada)	32,1	I.V. + D.A	Presente estudo

Nota. [Comp.; peso corporal] = intervalos de comprimento e peso corporal dos peixes analisados; P = Prevalência, I.M. = Intensidade Média, N.R. = Não revelado; I.V. = inspeção visual; V = vísceras, CA = cavidade abdominal; D. A. = digestão artificial, M = músculos.

Atendendo aos dados da tabela 16, verifica-se que a prevalência de carapaus parasitados (84,5%) obtida neste estudo é semelhante ao verificado por Borges (2008) com a amostra de carapaus proveniente da mesma área geográfica. Contudo, a intensidade média dos carapaus infetados neste estudo foi muito superior ao obtido por Borges (2008) para os carapaus infetados provenientes da mesma área geográfica, ou seja, os carapaus parasitados deste estudo tinham em média 32 parasitas, enquanto os carapaus parasitados analisados por Borges (2008) tinham em média 12 parasitas. As amostras deste estudo foram obtidas durante apenas um mês do ano e, portanto, não foi possível estudar o efeito da sazonalidade nos níveis de infeção. Porém, no estudo de Borges (2008) verificou-se um efeito da sazonalidade na prevalência e intensidade do parasitismo no caparau, tendo sido superior na Primavera (maio e junho), logo após o pico da desova, que na costa portuguesa ocorre entre dezembro e março (Lavín et al., 2007). Assim, pode-se colocar a hipótese de que, uma vez que nesse estudo foi apenas utilizado o método de inspeção visual como método de deteção de larvas de anisacuídeos e que este método tem demonstrado ser pouco eficaz na deteção das larvas de anisacuídeos nos produtos da pesca, provavelmente os carapaus parasitados analisados por Borges (2008) pudessem ter uma intensidade média parasitária superior à verificada. Para apoiar esta hipótese, das 3148 larvas de anisacuídeos colhidas no presente estudo, apenas 30% foram colhidas durante a necrópsia, sendo as restantes recuperadas após digestão artificial das vísceras e abas abdominais. Além disso, também se pode constatar na tabela 16 que nos estudos em que é realizada a digestão artificial complementarmente à inspeção visual são registadas as maiores intensidades médias de parasitismo (estudos de Abollo et al, 2001; Gomes, 2014 e presente estudo). Deste modo, fica igualmente patente a necessidade de uma revisão e melhoria das medidas e técnicas de deteção de anisacuídeos nos produtos da pesca em Portugal, uma vez que a inspeção visual e a transiluminação estabelecidas no Regulamento (CE) nº 2074/2005 parecem não ser suficientes. Para o efeito, é fundamental um trabalho em equipa, que envolva a autoridade sanitária portuguesa, o sector primário e a indústria.

Seguindo o mesmo raciocínio, seria expetável que a prevalência de infeção obtida por Borges (2008) na mesma área geográfica deste estudo fosse superior e não semelhante à que foi obtida, uma vez que as amostras do presente estudo foram colhidas durante o mês de novembro (Outono), enquanto as amostras do referido estudo foram colhidas de janeiro a fevereiro (Inverno) e de maio a junho (Primavera), sendo que as amostras colhidas no Inverno tinham uma prevalência de parasitismo de 75,26% e na Primavera tinham uma prevalência de parasitismo de 89,24%, que em média perfaz a prevalência de parasitismo indicada na Tabela 16 para esse estudo (82,25%). Neste caso, a obtenção de resultados diferentes dos espectáveis deve-se provavelmente à grande diferença na amplitude nos comprimentos e

pesos corporais dos peixes analisados em ambos os estudos. Se compararmos os dois estudos apresentados na Tabela 16 em que para além da inspeção visual foi também efetuada uma digestão artificial para a colheita de larvas de anisauquídeos, tal como foi realizado neste estudo, verifica-se que a prevalência de infeção foi mais baixa no estudo de Gomes (2014), cuja amostra era composta por carapaus de menores dimensões e menos pesados ($24,43 \pm 5,84$ cm; $148,02 \pm 131,84$ g); seguido pelo presente estudo, cujos carapaus apresentavam um comprimento médio de $28,2 \pm 3,5$ cm e peso médio de $195,7 \pm 78,9$ g e, por fim, a maior prevalência de parasitismo foi registada no estudo de Abollo et al. (2001), cuja amostra era composta por carapaus comparativamente mais pesados e de maiores dimensões em relação aos dois estudos *supra* referidos ($30,67 \pm 3,81$ cm; $254,68 \pm 117,34$ g).

Neste estudo, para confirmar a possível relação entre as variáveis acima mencionadas (i.e., peso e comprimento do peixe) com a prevalência e abundância parasitária obtidas fez-se uma análise de regressões lineares e foi observado que os peixes mais pesados e mais compridos tinham significativamente mais probabilidade de estarem infetados e de conterem mais parasitas, ou seja, mais probabilidade de terem uma elevada carga parasitária. Como tal, os resultados do presente estudo indicam, à semelhança de outros trabalhos, que o comprimento e peso corporal do peixe hospedeiro são importantes indicadores da presença e da abundância da infeção por anisauquídeos (Abollo et al, 2001; Cruz et al, 2005; Borges, 2008; Madrid et al., 2012; Abattouy et al., 2014; Gomes, 2014; Ichalal et al., 2015; Molina-Fernández et al., 2015; Cipriani et al., 2018a,b; Levsen et al., 2018b). Todavia, no estudo de Silva e Eiras (2003), apesar de terem encontrado uma tendência para valores mais elevados de parasitismo com o comprimento do peixe, não foi encontrada uma correlação entre o comprimento do peixe e a carga parasitária. No entanto, é de salientar que nesse trabalho foram analisadas simultaneamente 12 espécies de peixe com estruturas e composições corporais (i.e., teor lipídico) diferentes, assim como diferentes hábitos alimentares, pelo que esses factores podem explicar esse resultado contrário ao encontrado em diversos estudos. Todavia, contrariamente ao verificado por Silva e Eiras (2003), no estudo de Borges (2008) foram igualmente analisadas outras espécies de peixe para além do carapau, nomeadamente a pescada (*Merluccius merluccius*) e a sardinha (*Sardina pilchardus*), tendo sido observada uma associação entre o número de anisauquídeos presentes e as características morfométricas dos peixes. Tendo em conta a inconsistência de resultados verificada nos dois estudos, podemos avançar outra explicação alternativa. Outra hipótese para explicar o verificado poderá ser a grande diferença no número de exemplares que compõem as amostras nos dois estudos. No total, no trabalho de Silva e Eiras (2003) foram examinados 390 espécimes de peixe, enquanto no de Borges (2008) foram examinados 1116 espécimes de peixes.

É importante também referir que, em relação ao presente trabalho, não se pode afirmar que os peixes capturados a Nordeste da ilha da Berlenga (lote B) constituem um maior risco para a saúde pública, uma vez que os espécimes capturados nesse local não apresentavam características semelhantes às dos espécimes capturados na zona da Ericeira (restantes lotes) quanto ao peso e comprimento médio registado. Comparativamente com os restantes lotes, os peixes capturados a Nordeste da ilha da Berlenga tinham um peso e comprimento médio superior.

Na presente investigação, tanto na amostra de machos como na amostra de fêmeas examinadas, a percentagem de peixes parasitados foi superior (74,2% dos machos e 88,2% das fêmeas, respetivamente) à percentagem de peixes não parasitados. Simultaneamente, verificou-se que os peixes machos eram significativamente mais compridos do que as fêmeas analisadas, contudo não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre o sexo dos peixes e a probabilidade de os peixes estarem infetados, bem como também não foi observada uma relação significativa entre o sexo e a carga parasitária do peixe. Estes resultados vão ao encontro do observado noutros trabalhos (Costa et al., 2003; Silva & Eiras, 2003; Borges, 2008; Abattouy et al., 2014; Gomes, 2014).

Quanto à influência da estação do ano na prevalência e intensidade parasitária, esta parece ter influência ou não consoante a espécie de peixe hospedeira. A título de exemplo, no estudo de Borges (2008), foram encontradas diferenças significativas relativamente à prevalência e número médio de parasitas encontrados no carapau e na pescada consoante a estação do ano, mas tal não foi observado no caso da sardinha. Contudo, existem autores que defendem que o nível de infeção por anisauquídeos não é influenciado pela sazonalidade, uma vez que a invasão dos tecidos e órgãos pelos anisauquídeos é irreversível e por isso estes vão-se acumulando ao longo da vida do hospedeiro (McClelland, 2002).

Na generalidade da literatura é reconhecido que os peixes quando são mantidos por eviscerar, a uma temperatura próxima do gelo fundente durante algumas horas, as larvas de *A. simplex* podem migrar das vísceras para a musculatura (Abollo et al., 2001). No presente estudo, apenas 1,6% das larvas colhidas foram encontradas nos músculos. Apesar dessa baixa frequência e do processamento dos peixes no Laboratório de Parasitologia da FMV-UL não ter excedido mais do que 24 horas após a sua chegada à lota de Peniche, existe a possibilidade de algumas das larvas encontradas na musculatura serem resultado da migração *postmortem*, uma vez que os peixes não foram eviscerados imediatamente após a sua captura. De referir ainda, que todas as larvas colhidas se encontravam viáveis, o que reforça a importância de um tratamento térmico adequado para inviabilizar as potenciais larvas de anisauquídeos presentes. Nesse sentido, é necessário sensibilizar a população e os clínicos para este problema. Com a

aquisição de novos hábitos alimentares (consumo de peixe cru) no ocidente e particularmente em Portugal e as elevadas prevalências de infeção em peixes muito consumidos entre os portugueses, como o carapau, o risco de emergência desta zoonose e de consequentemente surgirem quadros alérgicos por exposição a proteínas de *Anisakis simplex* aumenta e estima-se que cada vez mais casos possam surgir. Adicionalmente, ao contrário do que se verifica nos restantes países europeus, em Portugal não é obrigatório a congelação do peixe antes de ser consumido nos restaurantes de *sushi* e, portanto, nos restaurantes portugueses tanto é utilizado peixe congelado como apenas refrigerado. Tal como referido pela especialista Dra. Maria João Gargaté, numa entrevista para um artigo no jornal Observador, publicado no dia 16 de maio de 2017, “a forma mais segura de comer *sushi* é se o peixe tiver sido previamente congelado”. Contudo, para a realização do mesmo artigo alguns *sushiman* foram entrevistados e verificou-se que uma grande parte do peixe que é utilizado para a confeção desta especialidade japonesa em Portugal não é submetido a um tratamento de congelação prévio. Um *sushiman* chega inclusivamente a afirmar, em entrevista para o mesmo artigo, que os especialistas dessa área de restauração têm conhecimento de que existe uma regra para congelar o peixe antes de ser servido nos restaurantes dessa especialidade, todavia ninguém cumpre essa regra pois, segundo os mesmos, o peixe perde com esse procedimento qualidades organoléticas (Carriço, 2017). Face ao exposto e com base nos resultados obtidos no presente estudo e noutros trabalhos, consumir peixe cru nos restaurantes de *sushi* em Portugal, é um risco sanitário real e é necessário que os clínicos e a comunidade em geral estejam alerta, para que o surgimento destes novos casos seja notificado e para que as devidas precauções e tratamentos sejam adotados.

A caracterização da variabilidade genética das espécies de anisacídeos que parasitam o carapau também foi alvo deste estudo e, através de uma análise molecular, foi realizada a identificação precisa das espécies de anisacídeos presentes numa amostra de larvas de anisacídeos escolhida aleatoriamente do total de exemplares colhidos da amostra de carapaus deste estudo. Das 196 larvas de anisacídeos analisadas, apenas uma pertencia à espécie *H. aduncum* (0,5% da amostra total de L3 de anisacídeos analisadas) e as restantes pertenciam ao género *Anisakis*. Neste estudo, uma vez que foi analisada morfológica e de modo molecular uma amostra aleatória do total de larvas L3 de anisacídeos encontradas na amostra de carapaus (3148 larvas), não foi possível obter a prevalência de infeção discriminada por parasita, nomeadamente, a prevalência de infeção por *Anisakis* spp. e *H. aduncum* nos peixes. Contudo, no estudo realizado por MacKenzie et al. (2008) com carapaus, essas prevalências foram obtidas e são apresentadas na tabela 17. Através dos resultados do estudo de Mackenzie et al. (2008), que indicam que os géneros *Anisakis* e *Hysterothylacium* são sem dúvida os

parasitas mais encontrados nas amostras de carapau e uma vez que neste estudo não se verificou a presença de mais nenhum parasita para além de anisquídeos, pode-se inferir que a prevalência de *Anisakis* spp. na amostra de carapaus do presente estudo se aproxima dos 84,5%, enquanto a prevalência de *H. aduncum* nos peixes analisados é muito próxima do zero. A presença de apenas larvas de *Anisakis* spp. e *Hysterothylacium* spp. em carapau, está igualmente em conformidade com o reportado noutros estudos relativamente à presença de anisquídeos nesta espécie de peixe e vai ao encontro do esperado de acordo com os seus hábitos alimentares. Isto é, por ser um peixe que se alimenta preferencialmente de pequenos crustáceos planctónicos, como os eufasídeos (invertebrados pelágicos), esta espécie está propensa a infetar-se com larvas de *Anisakis* spp. e *H. aduncum* (Adroher et al., 1996; Abollo et al., 2001; Silva & Eiras, 2003; Borges, 2008). Por outro lado, devido ao seu hábito alimentar pelágico, existe pouca oportunidade de contactar com *Pseudoterranova* spp. que tem sido referido na literatura como tendo um ciclo de vida mais bentónico (Wootten et al., 2010; Measures, 2014).

Tabela 17. Comparação de prevalências de infeção por *Anisakis* spp. e *H. aduncum*, frequências relativas de *A. pegreffii* e *A. simplex* (s.s.) com diferentes autores.

	Ano	Norte de Portugal Continental	Centro de Portugal Continental	Sul de Portugal Continental
P (%) <i>Anisakis</i> spp.	2000^a	88	71	48
	2001^a	88	37	39
P (%) L3 <i>H. aduncum</i>	2000^a	22	4	5
	2001^a	0	0	0
Freq. rel. de <i>A. pegreffii</i> (%)	2008^b	38,7	51,4	86,5
	2018^c	-	62,9	-
Freq. rel. de <i>A. simplex</i> (s.s.) (%)	2008^b	61,3	48,6	13,5
	2018^c	-	37,1	-

Nota. ^aMackenzie et al. (2008); ^bMattiucci et al. (2008); ^cpresente estudo; P = prevalência; Freq. rel. = frequência relativa

A identificação precisa de qualquer estágio de desenvolvimento e sexo dos nemátodes é fundamental para compreender os seus ciclos de vida, epidemiologia, ecologia, genética populacional e encontrar formas de controlar a sua dispersão (Guo et al., 2014). Adicionalmente, a nível de saúde pública também é fundamental identificar a espécie de parasita presente no peixe destinado ao consumo humano, uma vez que a cada género e espécie de anisquídeo está associado um menor ou maior grau de patogenicidade para o Homem. Todavia, muitas vezes é difícil alcançar o objetivo exclusivamente com base em características morfológicas, principalmente se os parasitas se encontram num estado larvar, dado o pequeno número de diferenças entre géneros. As limitações da caracterização

morfológica foram visíveis neste estudo já que ao fazer a identificação molecular se verificou que cinco das larvas classificadas morfologicamente como larvas de *Anisakis* do tipo II, correspondiam na realidade a larvas de *Anisakis* do tipo I, mais concretamente quatro dessas larvas pertenciam à espécie *Anisakis pegreffii* e uma larva pertencia à espécie *A. simplex* (s.s.). Como tal, apesar de morfologicamente se conseguir identificar as larvas de *Anisakis* spp. em tipo I e tipo II, é fundamental proceder a uma identificação molecular para aumentar o nível de confiança da classificação efetuada. Uma vez que o *mucron*, sendo uma estrutura de pequenas dimensões, nem sempre é facilmente visível e, por isso, uma classificação morfológica baseada exclusivamente na sua presença ou ausência acarreta alguma margem de erro. Além disso, como referido na revisão bibliográfica, a identificação das larvas no terceiro estágio larvar ao nível de espécie só é possível com recurso a técnicas moleculares (Mattiucci & Nascetti, 2008). Deste modo, a identificação molecular dos nematodes anisquídeos envolvidos na infeção dos peixes representa a base para qualquer estudo epidemiológico destinado a identificar as espécies zoonóticas envolvidas e melhora a possibilidade de fornecer uma avaliação de risco precisa para a saúde pública (Cipriani et al., 2018b).

Na tabela 17 é possível verificar as frequências relativas de *A. pegreffii* e *A. simplex* (s.s.) obtidas no estudo de Mattiucci et al. (2008) e no presente estudo, após identificação molecular. Comparando os valores obtidos nos dois estudos, verifica-se que a proporção de *A. pegreffii* em relação a *A. simplex* (s.s.), continua a ser superior e está a aumentar na zona centro da costa de Portugal continental. Contudo, são necessários mais estudos noutras espécies e noutras regiões de norte a sul do país para tentar perceber se a predominância de *A. pegreffii* se está a estender na direção do norte da costa portuguesa ou se este aumento se deve ao facto de os peixes analisados serem provenientes de outra população (*stock*) de carapaus do Atlântico Nordeste.

Dado o potencial zoonótico de *Anisakis* spp., principalmente das espécies *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* e o elevado nível de infeção por estes anisquídeos encontrado neste estudo em exemplares de carapau destinado ao consumo, existe um elevado risco de infeção para os humanos, caso o peixe seja consumido cru ou insuficientemente cozinhado. Os resultados deste estudo vêm assim reforçar a importância de implementar os procedimentos e as normas concebidas para garantir a segurança dos alimentos, concretamente, do pescado destinado ao consumo humano. Somente dessa forma será possível reduzir o risco de infeção e reações alérgicas a estes parasitas, uma vez que é difícil intervir no meio selvagem, onde os peixes são capturados. Visto que alguns estudos realizados, incluindo o presente, permitiram verificar que a frequência e intensidade de parasitismo por anisquídeos está dependente da espécie hospedeira (hábitos alimentares, características morfométricas como o comprimento e o peso e,

a idade, pois quanto mais vive o peixe, maior possibilidade de se infetar e acumular mais parasitas), das condições abióticas e bióticas da zona da pesca onde os peixes são capturados (e.g., temperatura média da superfície do mar e disponibilidade em nutrientes) e das condições de armazenamento dos produtos da pesca após serem capturados, existem várias medidas que devem ser colocadas em prática. Nomeadamente, dado que neste estudo os peixes mais pesados e mais compridos tinham mais probabilidade de estarem infetados e de conterem mais parasitas, é aconselhável evitar a captura de peixe com o maior calibre, de forma a diminuir o risco de ocorrência destes parasitas. Uma vez que a esmagadora maioria dos parasitas foi encontrada nas vísceras dos peixes, a sua evisceração precoce ajuda a reduzir consideravelmente o risco de exposição a estes parasitas, não apenas por eliminarmos a maior parte das larvas hipoteticamente existentes no peixe, mas também por impedirmos desta forma a migração das larvas para as massas musculares do peixe. Contudo, como já foi referido na revisão bibliográfica, é importante que as vísceras não sejam descartadas diretamente no mar sem serem tratadas convenientemente. Idealmente, se possível, sugere-se que as vísceras sejam congeladas antes de serem descartadas no mar, durante o período previsto e exigido para os produtos da pesca que vão ser consumidos crus ou praticamente crus (i.e., -20°C durante pelo menos 24 horas ou -35°C durante pelo menos 15 horas). Se não for possível congelar as vísceras em alto-mar, não devem ser descartadas e devem ser armazenadas em locais afastados dos produtos destinados ao consumo humano, tal como vem mencionado no Regulamento (CE) nº 1020/2008.

Os nematodes estão protegidos por um exosqueleto extremamente flexível e resistente designado por cutícula. Esta camada robusta (460 nm de espessura) é resistente a ligeiras perturbações químicas, enzimáticas e físicas, sendo um obstáculo para uma extração de DNA bem-sucedida para identificação molecular das larvas e a sua ruptura é um pré-requisito para uma eficiente extração de DNA, assim como a eliminação, tanto quanto possível, de todos os inibidores de PCR, de forma a ter uma concentração de DNA suficiente e de boa qualidade que permita a realização da PCR com sucesso (Seesao et al., 2017). Neste estudo, não foi possível identificar com metodologia molecular 37 larvas de anisaquídeos e os atributos da cutícula poderão ser uma possível explicação para as dificuldades com este tipo identificação.

Na literatura existem já vários estudos com peixes provenientes de águas portuguesas, onde é feita a identificação genética das larvas de anisaquídeos. No entanto, que seja do nosso conhecimento, não existia ainda um estudo a nível nacional que conjugasse as características morfométricas das larvas L3 de *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* provenientes de peixes de águas portuguesas, com a identificação genética das mesmas larvas efetuada a posteriori. Como tal, uma das finalidades do presente trabalho foi conciliar essas duas técnicas de identificação (i.e.,

morfológica e molecular), de forma a contribuir para que a distinção entre estas duas espécies de anisacídeos com grande importância para a saúde pública seja mais fácil a nível morfológico, pois nem sempre, ainda que seja o ideal, é possível recorrer a uma identificação molecular. Na tabela 18, é possível comparar os dados morfométricos das larvas L3 de anisacídeos deste estudo com os dados morfométricos obtidos em estudos anteriores.

Tabela 18. Dados morfométricos de larvas L3 de anisacídeos deste estudo em comparação com os reportados noutros estudos.

Dados morfométricos:							
Referência	Parasita	CT (cm)	CE (mm)	CV (mm)	EV (mm)	CC (mm)	CM (µm)
Silva & Eiras (2003)	<i>Anisakis</i> spp.	1,83 – 2,85	1,3 – 2,7	0,3 – 0,9	0,19 – 0,39	NR	NR
Este estudo	<i>Anisakis</i> spp.	0,9 – 2,5	0,9 – 2,5	0,5 – 0,875	0,125 – 0,3	0,05 – 0,15	5 – 32,5
Moravec (1994)	<i>A. simplex</i> (s.l.)	≤ 3,6	1,8 – 2,66	1,05 – 1,52	0,204 – 0,245	≈ 0,12	12 – 15
Este estudo	<i>A. simplex</i> (s.l.)	1 – 2	0,75 – 2	0,5 – 0,825	0,175 – 0,325	0,075 – 0,225	5 – 25
Quiazon et al. (2008)	<i>A. simplex</i> (s.s.)	1,275 – 2,994	1,18 – 2,58	0,9 – 1,5	0,13 – 0,31	0,04 – 0,14	20 – 30
	<i>A. pegreffii</i>	1,110 – 2,678	1,04 – 2,11	0,5 – 0,78	0,12 – 0,27	0,05 – 0,12	20 – 30
Este estudo	<i>A. simplex</i> (s.s.)	1,1 – 2,7	1,250 – 2,5	0,5 – 1	0,120 – 0,325	0,01 – 0,175	5 - 25
	<i>A. pegreffii</i>	0,7 – 2,1	0,875 – 2,250	0,4 – 1	0,125 – 0,325	0,038 – 0,175	5 - 30
Costa et al. (2013)	<i>Hysterothylacium</i> spp.	1 – 2,5	0,75 – 1,57	0,095 – 0,35	NR	0,125 – 0,5	NA
Moravec (1994)	<i>H. aduncum</i>	0,66 – 2,16	1 – 2	NR	NR	0,12 – 0,21	NA
Este estudo	<i>H. aduncum</i> *	2,2	2,166	0,286	0,086	0,216	NA

Nota. CT = comprimento total; CE = comprimento do esófago; CV = comprimento do ventrículo; EV = espessura do ventrículo; CC = comprimento da cauda; CM = comprimento do *mucron*; NR = não revelado; NA = não aplicado; * neste estudo foi colhido apenas um exemplar desta espécie.

No que diz respeito à morfometria das larvas L3 de *Anisakis* spp., as larvas deste estudo têm em média um comprimento total (CT), comprimento de esófago (CE), comprimento de ventrículo (CV) e espessura de ventrículo (EV) de menores dimensões em comparação com os espécimes observados por Silva e Eiras (2003), que foram também colhidos de peixes capturados na costa oeste portuguesa e cujos valores médios registados foram respetivamente, 2,42 cm; 2,07 mm; 0,82 mm e 0,28 mm. No entanto, e de forma diferente do presente trabalho, os exemplares de *Anisakis* spp. colhidos eram provenientes de várias espécies de peixes com diferentes constituições corporais e comprimentos bastante diferentes e isso pode ajudar a explicar as diferenças encontradas.

Em relação às larvas de *A. simplex* (s.l.), em comparação com o observado por Moravec (1994), uma vez que não existe disponível a informação relativamente aos valores médios dos parâmetros morfológicos registados nesse estudo, comparando apenas o valor mínimo medido das estruturas nos dois trabalhos, verifica-se que no presente estudo foram identificados espécimes de menores dimensões face aos identificados por esse autor.

No estudo de Quiazon et al. (2008) em águas japonesas, verificou-se que, entre os vários parâmetros morfológicos, o comprimento do ventrículo é o que possui diferenças mais significativas entre *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* e que essa diferença pode ser utilizada como um elemento-chave para distinguir as duas espécies. Esta característica morfométrica, isto é, o comprimento do ventrículo, também é utilizada para distinguir as larvas de *Anisakis* tipo I das larvas de *Anisakis* do tipo II, em que as primeiras possuem um comprimento de ventrículo entre 0,65 e 1,5 mm e as segundas um comprimento de ventrículo entre 0,52 e 0,75 mm. Contudo, apesar dos comprimentos dos ventrículos das larvas de *A. pegreffii* registados por Quiazon et al. (2008) se encontrarem dentro da amplitude de comprimentos registados para as larvas de *Anisakis* tipo II, as larvas de *A. pegreffii*, sendo larvas de *Anisakis* do tipo I, apresentam *mucron* e a sua cauda é arredondada, enquanto a cauda das larvas de *Anisakis* do tipo II é longa, cônica e desprovida de *mucron*. Desta forma, através da análise da extremidade posterior, as larvas de *A. pegreffii* conseguem ser diferenciadas de larvas de *Anisakis* do tipo II. Os resultados deste estudo vêm confirmar que existem diferenças significativas entre os valores médios dos parâmetros morfológicos entre as larvas de *Anisakis simplex* (s.s.) e *Anisakis pegreffii*, sendo que, à semelhança do verificado por Quiazon et al. (2008), é no comprimento do ventrículo que as diferenças são mais salientes. Contudo, para além disso, nesta investigação também se verificaram diferenças marcantes entre os comprimentos do esófago. Tal como notado por Gomes (2014), algumas das larvas do tipo I também colhidas de carapaus provenientes da lota de Peniche eram de menores dimensões do que as encontradas por Quiazon et al. (2008) no seu estudo em águas japonesas, uma vez que o comprimento mínimo total registado por Gomes (2014) foi de 0,625 cm, enquanto o comprimento total mínimo registado por Quiazon et al. (2008) foi de 1,275 cm para *A. simplex* (s.s.) e 1,110 cm para *A. pegreffii*. No presente trabalho, o comprimento total mínimo registado foi de 1,1 cm e 0,7 cm para *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii*, respetivamente. Porém, com esta investigação pode-se verificar que nas espécies de larvas de *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* provenientes de peixes capturados em águas portuguesas, a diferença entre os tamanhos dos ventrículos mantém-se e pode ser utilizada para distinguir as duas espécies. Além disso, os resultados deste estudo também indicam que o tamanho do esófago pode ser também utilizado para fazer essa distinção.

Quanto aos dados morfométricos da larva de *H. aduncum* obtida neste estudo, não se podem tirar grandes ilações, uma vez que uma larva não consegue ser representativa de uma população. Contudo, pode-se verificar que a larva encontrada tem um comprimento total que se situa no limite superior da amplitude de comprimentos identificados para o género por Costa et al. (2013) e tem um tamanho ligeiramente superior em relação às larvas de *H. aduncum* identificadas por Moravec (1994).

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho veio confirmar que o carapau (*Trachurus trachurus*), um dos peixes mais consumidos pelos portugueses, está extremamente parasitado por anisacídeos e os dados obtidos são alarmantes. Neste estudo, as larvas de anisacídeos estavam presentes em 84,5% dos exemplares de carapau examinados e em média um carapau infetado tinha cerca de 32 larvas de anisacídeos (intensidade média parasitária). Perante estes resultados, apesar de apenas 1,6% das larvas deste estudo terem sido encontradas nos músculos, o que corresponde normalmente à parte edível do peixe, o risco sanitário está presente, na medida em que pode ocorrer migração larvar das vísceras para os músculos e por isso é necessário controlar e reduzir este risco através das medidas preventivas anteriormente referidas na revisão bibliográfica deste estudo.

Com este trabalho também ficou evidente que a inspeção visual e a transiluminação estabelecidas no Regulamento (CE) nº 2074/2005 como métodos para deteção de parasitas no sector da pesca e na indústria de transformação do pescado são claramente insuficientes, pois apenas 30% das larvas de anisacídeos recuperadas da amostra de 116 carapaus analisada foram colhidas durante a inspeção visual e necrópsia.

Neste estudo, ficou demonstrado que o comprimento e o peso corporal do peixe hospedeiro são importantes indicadores da presença e abundância da infeção por anisacídeos e que a presença de anisacídeos no carapau não parece ser influenciada pelo sexo.

Do total de 196 larvas de anisacídeos identificadas neste estudo, apenas uma das larvas correspondia a um espécime de *Hysterothylacium aduncum* e as restantes pertenciam ao género *Anisakis*. Dentro do género *Anisakis*, das 158 larvas de *Anisakis* spp. em que foi possível chegar à identificação da espécie, verificou-se que todas pertenciam ao complexo *A. simplex* (s.l.), sendo que em 116 foi possível identificar inclusivamente a espécie críptica a que pertenciam e concluiu-se que correspondiam a larvas de *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii*, com uma frequência relativa de 37,1% e 62,9%, respetivamente. Uma vez que estas duas espécies têm sido apontadas como as que possuem maior potencial zoonótico, a sua presença quase exclusiva como fauna parasitária dos carapaus analisados torna ainda mais importante a

adoção de medidas que minimizem o risco para a saúde pública de consumir exemplares deste peixe infetados.

Por último, este estudo veio dar um importante contributo para que a distinção entre *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* seja mais fácil a nível morfológico. Os resultados do presente trabalho permitiram concluir que estas duas espécies podem ser distinguidas através do comprimento do seu esófago e ventrículo.

VI. PROPOSTAS PARA INVESTIGAÇÕES FUTURAS

Tendo em conta as considerações finais do presente trabalho e, com vista a complementá-lo, verifica-se a necessidade de em estudos futuros realizar-se uma abordagem multigénica na identificação molecular, incluindo outros marcadores genéticos nucleares e mitocondriais.

De forma a avaliar as variações temporais nas populações de anisacídeos, é importante em trabalhos futuros realizar uma avaliação a longo-termo pois, desta forma, será possível perceber a evolução da presença e grau de parasitismo no carapau. Mais ainda, é importante que sejam realizados estudos noutras espécies de peixe com interesse económico, uma vez que a distribuição de larvas de anisacídeos parece comportar-se de forma diferente consoante a espécie e para esse efeito a sardinha e a pescada deviam ser consideradas como espécies-alvo para essa investigação. Além disso, com as alterações climáticas que o planeta atravessa, o cenário que presenciamos hoje pode mudar a qualquer momento e, por esse motivo, é importante uma constante monitorização. Os rastreios epidemiológicos são importantes também na medida que são a base para a realização de qualquer análise de risco e porque ao estudar as larvas de anisacídeos que parasitam os peixes destinados ao consumo humano percebemos também quais são os parasitas endémicos de uma região, o que permite seguir e perceber as migrações e flutuações nas populações (*stocks*) de peixes, uma vez que os anisacídeos, uma vez adquiridos pelos peixes, tendem a permanecer no hospedeiro por longos períodos e por isso são marcadores biológicos adequados para esse efeito.

Até ao momento, ainda não foi realizada nenhuma análise de risco de anisacuídiase para a população portuguesa. Dado que os portugueses são os maiores consumidores de pescado entre todos os estados membros da União Europeia, seria importante a realização de um estudo nesse âmbito em Portugal.

Adicionalmente, futuros trabalhos devem ser desenvolvidos para avaliar a sensibilização específica contra as proteínas de *Anisakis simplex* na população portuguesa, principalmente nas regiões do país com uma grande tradição piscatória e, conseqüentemente, elevado consumo de diferentes espécies de peixe. Com a crescente popularidade do consumo de peixe cru ou insuficientemente cozinhado, mais casos de doença e de pessoas alérgicas a estes

parasitas podem ocorrer e, como tal, seria importante fazer um estudo longitudinal neste campo.

Por fim, seria igualmente pertinente efetuar-se um estudo epidemiológico relativamente à presença de anisacídeos em peixes criados em sistemas de aquacultura portugueses.

VII. BILIOGRAFIA

- Abollo, E., Gestal, C., & Pascual, S. (2001). *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitology Research*, 87(6), 492-499.
- Abollo, E., Paggi, L., Pascual, S., & D'Amelio, S. (2003). Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* ss and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(3), 175-181. doi: 10.1016/S1567-1348(03)00073-X
- Abattouy, N., Lopez, A. V., Maldonado, J. L., Benajiba, M. H., & Martín-Sánchez, J. (2014). Epidemiology and molecular identification of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in the horse mackerel *Trachurus trachurus* from northern Morocco. *Journal of Helminthology*, 88(3), 257-263. doi: 10.1017/S0022149X13000102
- Abattouy, N., Valero, A., Lozano, J., Barón, S. D., Romero, C., & Martín-Sánchez, J. (2016). Population genetic analysis of *Anisakis simplex* sl and *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) from parapatric areas and their contact zone. *Parasite Epidemiology and Control*, 1(2), 169-176. doi: <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.003>
- Abaunza, P., Gordo, L., Karlou-Riga, C., Murta, A., Eltink, A. T. G. W., García Santamaría, M-T., Zimmermann, C., Hammer, C., Lucio, P., Iversen, S. A., Molloy, J. & Gallo, E. (2003). Growth and reproduction of horse mackerel, *Trachurus trachurus* (Carangidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13, 27-61. doi: 10.1023/A:1026334532390
- Abdel-Ghaffar, F., Abdel-Gaber, R., Bashtar, A. R., Morsy, K., Mehlhorn, H., Al Quraishy, S., & Saleh, R. (2015). *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda, Anisakidae) with a new host record from the common sole *Solea solea* (Soleidae) and its role as a biological indicator of pollution. *Parasitology Research*, 114(2), 513-522. doi: 10.1007/s00436-014-4213-1
- Adams, A. M., Miller, K. S., Wekell, M. M., & Dong, F. M. (1999). Survival of *Anisakis simplex* in microwave-processed arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Journal of Food Protection*, 62(4), 403-409. doi: <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-62.4.403>
- Adroher, F. J., Valero, A., Ruiz-Valero, J., & Iglesias, L. (1996). Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). *Parasitology Research*, 82(3), 253-256.
- Armas, C., Martínez, J., Rodríguez, F., Sánchez, I. (2005). *Elaboración y uso de salmueras que eliminan el riesgo de anisakiosis*. Universidad de Alcalá. Accessed on 22/06/2018 at http://www.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/23/31/ES-2233194_B1.pdf
- AESA, *Agencia Española de Seguridad Alimentaria* (2005). *Dictámenes del Comité Científico de la AESA – Anisakis: recomendaciones para su prevención*. Accessed on 23/06/2018 at http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/publicaciones/boletines/AESANoticias_6.pdf
- AESA, *Agencia Española de Seguridad Alimentaria* (2009). *Opinión en relación con los factores favorecedores de la aparición de alergia a Anisakis, así como de las medidas de prevención aplicables*. Accessed on 23/06/2018 at http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/ANISAKIS_ALERGIA.pdf

- AESAN, *Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición* (2007). *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de Anisakis*. Accessed on 23/06/2018 at http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/REDUCCION_PREVALENCIA_ANISAKIOSIS.pdf
- Audicana, M. T., Ansotegui, I. J., de Corres, L. F., & Kennedy, M. W. (2002). *Anisakis simplex: dangerous - dead and alive?*. *Trends in Parasitology*, 18(1), 20-25. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02152-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02152-3)
- Audicana, M. T., & Kennedy, M. W. (2008). *Anisakis simplex: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(2), 360-379. doi: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00012-07>
- Audicana, M.T., Girao I. & Longo N. (2017). *Anisakis simplex*, a New Hero in the Anaphylaxis Scene. *SM Emergency Medicine and Critical Care*,1(2): 1008.
- Baird, F. J., Morishima, Y. & Sugiyama, H. (2017). 7. *Anisakis*, allergy and the globalization of food. In Lopata, A. L. (Ed.). *Food Allergy: Molecular and Clinical Practice* (pp. 155-175). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Balbuena, J. A., Karlsbakk, E., Kvenseth, A. M., Saksvik, M., & Nylund, A. (2000). Growth and emigration of third-stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in larval herring *Clupea harengus*. *Journal of Parasitology*, 86(6), 1271-1275. doi: [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[1271:GAEOTS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[1271:GAEOTS]2.0.CO;2)
- Bao, M., Mota, M., Nachón, D. J., Antunes, C., Cobo, F., Garci, M. E., Pierce, G.J. & Pascual, S. (2015). *Anisakis* infection in allis shad, *Alosa alosa* (Linnaeus, 1758), and twaite shad, *Alosa fallax* (Lacépède, 1803), from Western Iberian Peninsula Rivers: zoonotic and ecological implications. *Parasitology Research*, 114(6), 2143-2154. doi: 10.1007/s00436-015-4403-5
- Bao, M., Pierce, G. J., Pascual, S., González-Muñoz, M., Mattiucci, S., Mladineo, I., Cipriani, P., Bušelić, I., & Strachan, N. J. C. (2017). Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: Anisakiasis. *Scientific Reports*, 13(7), 43699. doi: 10.1038/srep43699.
- Baptista-Fernandes, T., Rodrigues, M., Castro, I., Paixão, P., Pinto-Marques, P., Roque, L., Belo, S., Ferreira, P. M., Mansinho, K., & Toscano, C. (2017). Human gastric hyperinfection by *Anisakis simplex*: A severe and unusual presentation and a brief review. *International Journal of Infectious Diseases*, 64, 38-41. doi: 10.1016/j.ijid.2017.08.012
- Berland, B. (1961). Nematodes from some Norwegian Marine Fishes. *Sarsia*, 2, 1-50.
- Berland, B. (1991). *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda) in fish. *International Council for the Exploration of the Sea* (ICES). Accessed on 28/05/2018 at <http://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Disease%20Leaflets/Sheet%20no%2044.pdf>
- Bernardi, C., Gustinelli, A., Fioravanti, M. L., Caffara, M., Mattiucci, S., & Cattaneo, P. (2011). Prevalence and mean intensity of *Anisakis simplex* (sensu stricto) in European sea bass

- (*Dicentrarchus labrax*) from Northeast Atlantic Ocean. *International Journal of Food Microbiology*, 148(1), 55-59. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.027
- Borges, S. A. S. L. G. (2008). *Nemátodes da família Anisakidae em peixes de elevado consumo em Portugal e provenientes das lotas de Peniche e de Setúbal: intensidade do parasitismo, prevalência e potencial zoonótico*. Dissertação de Mestrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.
- Borges, J. N., Cunha, L. F. G., Santos, H. L. C., Monteiro-Neto, C., & Santos, C. P. (2012). Morphological and molecular diagnosis of anisakid nematode larvae from cutlassfish (*Trichiurus lepturus*) off the coast of Rio de Janeiro, Brazil. *Plos one*, 7(7), e40447. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040447>
- Breiteneder, H. & Chapman, M.D. (2014). 3. Allergen Nomenclature. In Lockey, R.F. & Ledford, D. K. (Eds.), *Allergens and Allergen Immunotherapy* (pp.37). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Brito, C., Vieira, N., Sá, E., & Carvalho, I. (2009). Cetaceans' occurrence off the west central Portugal coast: a compilation of data from whaling, observations of opportunity and boat-based surveys. *Journal of Marine Animals and Their Ecology*, 2(1), 10-13.
- Brogia, A., & Kapel, C. (2011). Changing dietary habits in a changing world: emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Veterinary Parasitology*, 182(1), 2-13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.011>
- Brooker, A., Shinn, A., Wootten, R., & Bron, J. (2012). *A survey of parasitic nematodes in maricultured finfish in Scotland FS241054 October 2012*. Accessed on 28/05/2018 at http://www.foodstandards.gov.scot/downloads/Report_2.pdf
- Brooker, A. J., Wootten, R., Shinn, A. P., & Bron, J. E. (2016). An assessment of the potential for zoonotic parasitic nematode infections arising from the consumption of maricultured Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Scotland. *Food Control*, 66, 198-204. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.011>
- Brutti, A., Rovere, P., Cavallero, S., D'Amelio, S., Danesi, P., & Arcangeli, G. (2010). Inactivation of *Anisakis simplex* larvae in raw fish using high hydrostatic pressure treatments. *Food Control*, 21(3), 331-333. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.05.013>
- Bucci, C., Gallotta, S., Morra, I., Fortunato, A., Ciacci, C., & Iovino, P. (2013). Anisakis, just think about it in an emergency!. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(11), e1071-e1072. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.05.008>
- Cabral, H. N., & Murta, A. G. (2002). The diet of blue whiting, hake, horse mackerel and mackerel off Portugal. *Journal of Applied Ichthyology*, 18(1), 14-23. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00297.x>
- Carmo, J., Marques, S., Bispo, M., & Serra, D. (2017). Anisakiasis: a growing cause of abdominal pain. *BMJ case reports*, bcr-2016-218857. doi: 10.1136/bcr-2016-218857
- Carrera, M., Gallardo, J. M., Pascual, S., González, Á. F., & Medina, I. (2016). Protein biomarker discovery and fast monitoring for the identification and detection of Anisakids by parallel reaction monitoring (PRM) mass spectrometry. *Journal of proteomics*, 142, 130-137. doi: 10.1016/j.jprot.2016.05.012

- Carrico, M. (2017). Sushi. "Peixe cru ou mal cozinhado é fator de risco". *Observador*. Accessed on 23/07/2018 at <https://observador.pt/2017/05/16/sushi-peixe-cru-ou-mal-cozinhado-e-fator-de-risco/>
- Castellanos, J. A., Tangua, A. R., & Salazar, L. (2017). Anisakidae nematodes isolated from the flathead grey mullet fish (*Mugil cephalus*) of Buenaventura, Colombia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6(3), 265-270. doi: 10.1016/j.ijppaw.2017.08.001
- Casti, D., Scarano, C., Piras, M. C., Merella, P., Muglia, S., Piras, F., Garippa, G., Spanu, C. & De Santis, E. P. (2017). Occurrence of nematodes of the genus *Anisakis* in Mediterranean and Atlantic fish marketed in Sardinia. *Italian Journal of Food Safety*, 6(1). doi: <https://doi.org/10.4081/ijfs.2017.6185>
- Cavallero, S., Magnabosco, C., Civettini, M., Boffo, L., Mingarelli, G., Buratti, P., Giovanardi, O., Fortuna, C. M. & Arcangeli, G. (2015). Survey of *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. in sardines and anchovies from the North Adriatic Sea. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 18-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.017>
- Cavallero, S., Bruno, A., Arletti, E., Caffara, M., Fioravanti, M. L., Costa, A., Cammilleri, G., Graci, S., Ferrantelli, V. & D'Amelio, S. (2017). Validation of a commercial kit aimed to the detection of pathogenic anisakid nematodes in fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 75-79. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.011
- Cavallero, S., Lombardo, F., Su, X., Salvemini, M., Cantacessi, C., & D'Amelio, S. (2018). Tissue-specific transcriptomes of *Anisakis simplex* (*sensu stricto*) and *Anisakis pegreffii* reveal potential molecular mechanisms involved in pathogenicity. *Parasites & vectors*, 11(1), 31. doi: 10.1186/s13071-017-2585-7
- Cipriani, P., Smaldone, G., Acerra, V., D'Angelo, L., Anastasio, A., Bellisario, B., Palma, G., Nascetti, G. & Mattiucci, S. (2015). Genetic identification and distribution of the parasitic larvae of *Anisakis pegreffii* and *Anisakis simplex* (ss) in European hake *Merluccius merluccius* from the Tyrrhenian Sea and Spanish Atlantic coast: implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 198, 1-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.019
- Cipriani, P., Sbaraglia, G. L., Palomba, M., Giulietti, L., Bellisario, B., Bušelić, I., Mladineo, I., Chelieschi, R., Nascetti, G. & Mattiucci, S. (2018a). *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy *Engraulis encrasicolus* from the Mediterranean Sea: Fishing ground as a predictor of parasite distribution. *Fisheries Research*, 202, 59-68. doi: 10.1016/j.fishres.2017.03.020
- Cipriani, P., Sbaraglia, G. L., Paoletti, M., Giulietti, L., Bellisario, B., Palomba, M., Bušelić, I., Mladineo, I., Nascetti, G. & Mattiucci, S. (2018b). The Mediterranean European hake, *Merluccius merluccius*: detecting drivers influencing the *Anisakis* spp. larvae distribution. *Fisheries Research*, 202, 79-89. doi: 10.1016/j.fishres.2017.07.010
- Colombo, F., Cattaneo, P., Castelletti, M., & Bernardi, C. (2016). Prevalence and Mean Intensity of Anisakidae Parasite in Seafood Caught in the Mediterranean Sea Focusing on Fish Species at Risk of Being Raw-consumed. A Meta Analysis and Systematic Review.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56(9), 1405-1416. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2012.755947>

- Costa, G., Pontes, T., Mattiucci, S., & D'Amélio, S. (2003). The occurrence and infection dynamics of *Anisakis* larvae in the black-scabbard fish, *Aphanopus carbo*, chub mackerel, *Scomber japonicus*, and oceanic horse mackerel, *Trachurus picturatus* from Madeira, Portugal. *Journal of Helminthology*, 77(2), 163-166. doi: 10.1079/JOH2002156
- Costa, G., Khadem, M., Silva, S., Moreira, E. M., & D'Amélio, S. (2013). Endohelminth parasites of the blacktail comber *Serranus atricauda* (Pisces: Serranidae), from Madeira Archipelago (Atlantic Ocean). *Diseases of aquatic organisms*, 103(1), 55-64. doi: 10.3354/dao02564
- Costa, A., Cammilleri, G., Graci, S., Buscemi, M. D., Vazzana, M., Principato, D., Giangrosso, G. & Ferrantelli, V. (2016). Survey on the presence of *A. simplex* ss and *A. pegreffii* hybrid forms in Central-Western Mediterranean Sea. *Parasitology International*, 65(6), 696-701. doi: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.08.004>
- Cross, M. A., Collins, C., Campbell, N., Watts, P. C., Chubb, J. C., Cunningham, C. O., Hatfield, K. & MacKenzie, K. (2007). Levels of intra-host and temporal sequence variation in a large CO1 sub-units from *Anisakis simplex sensu stricto* (Rudolphi 1809) (Nematoda: Anisakidae): implications for fisheries management. *Marine Biology*, 151(2), 695-702. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-006-0509-8>
- Cruz, C., Barbosa, C., & Saraiva, A. (2007). Distribution of larval anisakids in blue whiting off Portuguese fish market. *Helminthologia*, 44(1), 21-24. doi: 10.2478/s11687-006-0051-8
- Dailey, M. D. (2001). Parasitic Diseases. In L. Dierauf & F.M. Gulland (Eds.). (2001). *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: health, disease, and rehabilitation* (2nd ed.) (pp.362, 369). Boca Raton, Florida, USA: CRC press
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K. D., Santos, C. P., Pugachev, O. N., Webb, S. C., Picanço, M., & Paggi, L. (2000). Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology*, 30(2), 223-226. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00178-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00178-2)
- Decisão de Execução (CE) Nº 2018/945 de 22 de junho de 2018. *Jornal Oficial da União Europeia*, L170. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Despacho nº 15385-A/2016, de 21 de dezembro. *Diário da República*, nº 243/2016, Série II de 2017-12-21. Direção-Geral da Saúde. Lisboa.
- DGAV, *Direção-Geral de Alimentação e Veterinária* (2014). *Esclarecimento nº1/2014*. Accessed on 28/06/2018 at http://www.dgv.min-agricultura.pt/xevov21/attachfileu.jsp?look_parentBoui=9715075&att_display=n&att_download=y
- DGRM, *Direção Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos* (2017). *Datapescas. Janeiro a Dezembro de 2017, Nº 115*. Accessed on 23/04/2018 at <https://www.dgrm.mm.gov.pt/documents/20143/119213/DATAPESCAS+N%C2%BA+115+-+janeiro+a+dezembro+2017+%282%29.pdf/32d04978-c135-cdd2-c5d2-7e30d8bf05b3>

- DGRM, *Direção Geral de Recursos Naturais, Segurança e Serviços Marítimos* (2018). *Relatório de caracterização da subdivisão do continente (Volume IV-A)*. Accessed on 06/07/2018 at http://www.psoem.pt/wp-content/uploads/2018/04/PlanoSituacao_volume-IV-A.pdf
- Dixon, B. R. (2006). Isolation and identification of anisakid roundworm larvae in fish. Health Canada, Ottawa, *OPFL-2*.
- Domingos, I., Gameiro, C., Ferreira, A., Adão, H., Amorim, A., Brotas, V., Cabral, H., Chainho, P. Costa, J. L., Gordo, L. S., Newton, A., Sousa, F., Teixeira, H., Vieira, A. R., Zilhão, R. & Brito, A. C. (2017). *Ecossistemas da Plataforma Continental*. Lisboa: DGRM; pp-31. Accessed on 18/05/2018 at https://www.sophia-mar.pt/uploads/GUIA_Plat_Cont_Final.pdf
- EFSA, *European Food Safety Authority* (2010). Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*, 8(4), 1543. Accessed on 24/06/2018 at <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1543>
- EFSA, *European Food Safety Authority* (2012). *EFSA assesses safety of long-chain omega-3 fatty acids*. Accessed on 23/04/2018 at <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/120727>
- EFSA, *European Food Safety Authority* (2014). Scientific Opinion on health benefits of seafood (fish and shellfish) consumption in relation to health risks associated with exposure to methylmercury. *EFSA Journal*, 12(7):3761. Accessed on 23/04/2018 at <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2014.3761>
- Eiras, J. D. C. (2016). Parasites of marine, freshwater and farmed fishes of Portugal: a review. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 25(3), 259-278.
- El país (2006). *Los restaurantes, obligados desde hoy a congelar el pescado 24 horas*. Accessed on 21/06/2018 at https://elpais.com/sociedad/2006/12/20/actualidad/1166569202_850215.html
- Espiñeira, M., Herrero, B., Vieites, J. M., & Santaclara, F. J. (2010). Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR–RFLP of ITS-1 region. *Food Control*, 21(7), 1051-1060. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.12.026>
- EUMOFA, *European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products* (2016). The EU fish market. 2016 Edition. Accessed on 23/04/2018 at <https://www.eumofa.eu/documents/20178/77960/The+EU+fish+market+-+2016+Edition.pdf>
- EUMOFA, *European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products* (2017). The EU fish market. 2017 Edition. Accessed on 23/04/2018 at <http://www.eumofa.eu/documents/20178/108446/The+EU+fish+market+2017.pdf>
- Fæste, C. K., Plassen, C., Løvberg, K. E., Moen, A., & Egaas, E. (2015). Detection of proteins from the fish parasite *Anisakis simplex* in Norwegian farmed salmon and processed fish products. *Food Analytical Methods*, 8(6), 1390-1402. doi: <https://doi.org/10.1007/s12161-014-0003-8>
- FAO, *Food and Agriculture Organization* (2011). *FAO yearbook. Fishery and aquaculture statistics, 2009*. Rome: FAO; pp-18.

- FAO, *Food and Agriculture Organization* (2015). *FAO Statistical Pocketbook, 2015*. Rome: FAO; pp-35.
- Farjallah, S., Slimane, B. B., Busi, M., Paggi, L., Amor, N., Blel, H., Said, K. & D'Amelio, S. (2008). Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitology Research*, 102(3), 371. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0771-9>
- FDA, *Food and Drug Administration* (2017). *Food Code 2017*. Accessed on 27/06/2018 at <https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/retailfoodprotection/foodcode/ucm595140.pdf>
- FDA & EPA, *Food and Drug Administration & Environmental Protection Agency* (2017). *Eating Fish: What Pregnant Women and Parents Should Know*. Accessed on 23/04/2018 at <https://www.fda.gov/downloads/Food/ResourcesForYou/Consumers/UCM537120.pdf>
- Fernandes, C. P. (2017). *The consumption of seafood in Portugal: preferences, knowledge and public perception*. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental. Lisboa: Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Animal - Universidade de Lisboa.
- Ferreira, I. D. F. (2013). Estudo da Presença de *Anisakis* sp. no polvo-vulgar (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) na Costa Portuguesa e Análise dos Hábitos de Consumo. Dissertação de Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar. Leiria: Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Instituto Politécnico de Leiria.
- Field, A. (2009). *Discovering statistics using SPSS*. Sage publications.
- Garbin, L. E., Mattiucci, S., Paoletti, M., Diaz, J. I., Nascetti, G., & Navone, G. T. (2013). Molecular identification and larval morphological description of *Contraecaecum pelagicum* (Nematoda: Anisakidae) from the anchovy *Engraulis anchoita* (Engraulidae) and fish-eating birds from the Argentine North Patagonian Sea. *Parasitology International*, 62(3), 309-319. doi: 10.1016/j.parint.2013.03.001
- Garrido, S., Murta, A. G., Moreira, A., Ferreira, M. J., & Angélico, M. M. (2008). Horse mackerel (*Trachurus trachurus*) stomach fullness off Portugal: index calibration and spatio-temporal variations in feeding intensity. *ICES Journal of Marine Science*, 65, 1662-1669. doi: 10.1093/icesjms/fsn169
- Gazzonis, A. L., Cavallero, S., Zanzani, S. A., Olivieri, E., Malandra, R., Ranghieri, V., D'Amelio, S. & Manfredi, M. T. (2017). *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. larvae in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) and chub mackerel (*Scomber colias*) in the Mediterranean Sea: molecular identification and risk factors. *Food Control*, 80, 366-373. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.05.004
- Generon (2018). *PATHfinder Anisakis/Pseudoterranova Assay 100 Reactions*. Accessed on 06/12/2018 at http://www.generon.it/en/catalog-microbiology-consumablesreagents-veterinary-health-parasites__2-832/pathfinder-anisakispseudoterranova-assay-100-reactions_ID7184.html
- Ghadam, M., Banaii, M., Mohammed, E. T., Suthar, J., & Shamsi, S. (2018). Morphological and molecular characterization of selected species of *Hysterothylacium* (Nematoda:

Raphidascarididae) from marine fish in Iraqi waters. *Journal of Helminthology*, 92(1), 116-124. doi: 10.1017/S0022149X17000128

Gomes, T. A. L. (2014). *Anisakis spp.: Relevância da sua pesquisa e identificação em peixes*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.

Gonçalves, P., Henriques, E., Angélico, M. M. (2013). Co-occurrence of *Trachurus trachurus* and *Trachurus picturatus* spawners in Atlantic Iberian waters and the ability to distinguish their eggs in plankton samples. *Fisheries Research*, 138, 139-145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.07.021>

González-Amores, Y., Clavijo-Frutos, E., Salas-Casanova, C. & Alcain-Martínez, G. (2015). Direct parasitological diagnosis of infection with *Hysterothylacium aduncum* in a patient with epigastralgia. *Revista española de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*, 107(11), 699-700.

Guo, Y. N., Xu, Z., Zhang, L. P., Hu, Y. H., & Li, L. (2014). Occurrence of *Hysterothylacium* and *Anisakis* nematodes (Ascaridida: Ascaridoidea) in the tanaka's snailfish *Liparis tanakae* (Gilbert & Burke) (Scorpaeniformes: Liparidae). *Parasitology Research*, 113(4), 1289-1300. doi: 10.1007/s00436-014-3767-2

Hermida, M., Mota, R., Pacheco, C. C., Santos, C. L., Cruz, C., Saraiva, A., & Tamagnini, P. (2012). Infection levels and diversity of anisakid nematodes in blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, from Portuguese waters. *Parasitology Research*, 110(5), 1919-1928. doi: 10.1007/s00436-011-2718-4

Hierro, I., Valero, A., & Navarro, M. C. (2006). In vivo larvicidal activity of monoterpene derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* sl. *Phytomedicine*, 13(7), 527-531. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.05.001>

ICES, *International Council for the Exploration of the Sea* (2018) *Species Fact Sheets. Horse mackerel*. Accessed on 23/04/2018 at <http://www.ices.dk/explore-us/projects/EU-RFP/EU%20Repository/ICES%20FishMap/ICES%20FishMap%20species%20factsheet-horsemackerel.pdf>

Ichalal, K., Ramdane, Z., Ider, D., Kacher, M., Iguerouada, M., Trilles, J. P., Courcot, L. & Amara, R. (2015). Nematodes parasitizing *Trachurus trachurus* (L.) and *Boops boops* (L.) from Algeria. *Parasitology Research*, 114(11), 4059-4068. doi: 10.1007/s00436-015-4633-6

IPMA, *Instituto Português do Mar e da Atmosfera* (2018). Carapau-branco: *Trachurus trachurus*. Accessed on 23/04/2018 at <http://www.ipma.pt/pt/pescas/recursos/carapau/>

ISS, *Istituto Superiore di Sanità* (2006). Identification of Anisakidae larvae at the species level by multiplex PCR. Accessed on 23/04/2018 at http://old.iss.it/binary/crlp/cont/MI_10_rev._1.pdf

Jacobs, D., Fox, M., Gibbons, L., & Hermosilla, C. (2015). *Principles of veterinary parasitology* (p.50). West Sussex, UK: John Wiley & Sons.

- Kassai, T., Del Campillo, M. C., Euzeby, J., Gaafar, S., Hiepe, T., & Himonas, C. A. (1988). Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Veterinary Parasitology*, 29(4), 299-326.
- Keskin, E., Koyuncu, C. E., & Genc, E. (2015). Molecular identification of *Hysterothylacium aduncum* specimens isolated from commercially important fish species of Eastern Mediterranean Sea using mtDNA cox1 and ITS rDNA gene sequences. *Parasitology International*, 64(2), 222-228. doi: 10.1016/j.parint.2014.12.008
- Kuhn, T., Hailer, F., Palm, H. W., & Klimpel, S. (2013). Global assessment of molecularly identified *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts. *Folia parasitologica*, 60(2), 123. doi: <http://dx.doi.org/10.14411/fp.2013.013>
- Kuhn, T., Cunze, S., Kochmann, J., & Klimpel, S. (2016). Environmental variables and definitive host distribution: a habitat suitability modelling for endohelminth parasites in the marine realm. *Scientific reports*, 6, 30246. doi: 10.1038/srep30246
- Lavín, A., Moreno-Ventas, X., Zárate, V. O., Abaunza, P., & Cabanas, J. M. (2007). Environmental variability in the North Atlantic and Iberian waters and its influence on horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and albacore (*Thunnus alalunga*) dynamics. *ICES Journal of Marine Science*, 64, 425-438. doi: 10.1093/icesjms/fsl042
- Levsen, A., Cipriani, P., Mattiucci, S., Gay, M., Hastie, L. C., MacKenzie, K., Pierce, G. J., Svanevik, C. S., Højgaard, D. P., Nascetti, G., González, A. F. & Pascual, S. (2018a). *Anisakis* species composition and infection characteristics in Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*, from major European fishing grounds-reflecting changing fish host distribution and migration pattern. *Fisheries Research*, 202, 112-121. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2017.07.030>
- Levsen, A., Svanevik, C. S., Cipriani, P., Mattiucci, S., Gay, M., Hastie, L. C., Bušelić, I., Mladineo, I., Karl, H., Ostermeyer, U., Buchmann, K., Højgaard, D. P., González, A. F., Pascual, S. & Pierce, G. J. (2018b). A survey of zoonotic nematodes of commercial key fish species from major European fishing grounds-Introducing the FP7 PARASITE exposure assessment study. *Fisheries Research*, 202, 4-21. doi: 10.1016/j.fishres.2017.09.009
- Llarena-Reino, M., González, Á. F., Vello, C., Outeiriño, L., & Pascual, S. (2012). The accuracy of visual inspection for preventing risk of *Anisakis* spp. infection in unprocessed fish. *Food Control*, 23(1), 54-58. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.010>
- Longshaw, M. (2012a). *Anisakis* larvae (“herringworm”; Nematoda) in fish. *International Council for the Exploration of the Sea (ICES)*. Accessed on 28/05/2018 at <http://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Disease%20Leaflets/Sheet%20no.%208.pdf>
- Longshaw, M. (2012b). *Pseudoterranova* larvae (“codworm”; Nematoda) in fish. *International Council for the Exploration of the Sea (ICES)*. Accessed on 28/05/2018 at <http://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Disease%20Leaflets/Sheet%20no.%207.pdf>
- Lymbery, A. J. & Walters, J. A. (2014). Anisakid Nematodes. In Motarjemi, Y., Moy, G. & Todd, E. (Eds), *Encyclopedia of Food Safety* (Vol. 1) (pp. 78-82). USA: Academic Press.

- MacKenzie, K., Campbell, N., Mattiucci, S., Ramos, P., Pinto, A. L., & Abaunza, P. (2008). Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus*. *L. Fisheries Research*, 89(2), 136-145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2007.09.031>
- Madrid, E., Galán-Puchades, M. T., & Fuentes, M. V. (2012). Risk analysis of human anisakidosis through the consumption of the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, sold at Spanish supermarkets. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(10), 934-938. doi: 10.1089/fpd.2012.1196
- Marques, J. F., Cabral, H. N., Busi, M., & D'Amelio, S. (2006). Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes off the Portuguese coast. *Journal of Helminthology*, 80(1), 47-51. doi: 10.1079/JOH2005325
- Mathison, B. A. & Silva, A. (2018). Chapter 8: Anisakiasis. In Ortega, Y. R. & Sterling, C. R. (Eds.), *Foodborne parasites* (2nd ed.). (pp. 159-174). Cham, Switzerland: Springer Nature.
- Mattiucci, S., & Nascetti, G. (2008). Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host—parasite co-evolutionary processes. *Advances in parasitology*, 66, 47-148. doi: 10.1016/S0065-308X(08)00202-9
- Mattiucci, S., Farina, V., Campbell, N., MacKenzie, K., Ramos, P., Pinto, A. L., Abaunza, P. & Nascetti, G. (2008). *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fisheries Research*, 89(2), 146-151. doi: 10.1016/j.fishres.2007.09.032
- Mattiucci, S., Paoletti, M., & Webb, S. C. (2009). *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology*, 74(3), 199-217. doi: 10.1007/s11230-009-9212-8
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S. C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisario, B., Gibson, D. I. & Nascetti, G. (2014). Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *The Journal of Parasitology*, 100(2), 199-214. doi: <https://doi.org/10.1645/12-120.1>
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Cipriani, P., Webb, S. C. & Nascetti, G. (2015a). 15. Anisakis. In Xiao, L., Ryan, U. & Feng, Y (Eds.), *Biology of foodborne parasites* (pp. 255-274). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Paoletti, M., Nardi, V., Santoro, M., Bellisario, B., & Nascetti, G. (2015b). Temporal stability of parasite distribution and genetic variability values of *Contraecum osculatum* sp. D and *C. osculatum* sp. E (Nematoda: Anisakidae) from fish of the Ross Sea (Antarctica). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 356-367. doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.10.004
- Mattiucci, S., Acerra, V., Paoletti, M., Cipriani, P., Levsen, A., Webb, S. C., Canestrelli, D. & Nascetti, G. (2016). No more time to stay 'single' in the detection of *Anisakis pegreffii*, *A. simplex* (ss) and hybridization events between them: a multi-marker nuclear genotyping approach. *Parasitology*, 143(8), 998-1011. doi: 10.1017/S0031182016000330

- Mattiucci, S., Cipriani, P., Paoletti, M., Levsen, A., & Nascetti, G. (2017). Reviewing biodiversity and epidemiological aspects of anisakid nematodes from the north-East Atlantic Ocean. *Journal of Helminthology*, 91(4), 422-439. doi: 10.1017/S0022149X1700027X
- McClelland, G. (2002). The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. *Parasitology*, 124(7), 183-203. doi: 10.1017/S0031182002001658
- Measures, L.N. (2014). *Anisakiosis and pseudoterranovosis: U.S. Geological Survey, Circular 1393*. Accessed on 23/06/2018 at <https://pubs.usgs.gov/circ/1393/pdf/circ1393.pdf>
- Meloni, M., Angelucci, G., Merella, P., Siddi, R., Deiana, C., Orrù, G., & Salati, F. (2011). Molecular characterization of *Anisakis* larvae from fish caught off Sardinia. *Journal of Parasitology*, 97(5), 908-914. doi: <https://doi.org/10.1645/GE-2742.1>
- Miguéis, S., Santos, C., Saraiva, C., & Esteves, A. (2015). Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants. *Food Control*, 47, 32-36. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.025>
- Mladineo, I., & Poljak, V. (2014). Ecology and genetic structure of zoonotic *Anisakis* spp. from Adriatic commercial fish species. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1281-1290. doi: 10.1128/AEM.03561-13
- Molina-Fernández, D., Malagón, D., Gómez-Mateos, M., Benítez, R., Martín-Sánchez, J., & Adroher, F. J. (2015). Fishing area and fish size as risk factors of *Anisakis* infection in sardines (*Sardina pilchardus*) from Iberian waters, southwestern Europe. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 27-34. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.024
- Moneo, I., Caballero, M. L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A. I., Rodríguez-Perez, R., & Silva, A. (2005). Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitology Research*, 96(5), 285-289. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1362-2>
- Moravec, F. (1994). *Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 21-28, 126, 386-404.
- Nadler, S. A., D'Amelio, S., Dailey, M. D., Paggi, L., Siu, S., & Sakanari, J. A. (2005). Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from northern Pacific marine mammals. *Journal of Parasitology*, 91(6), 1413-1429. doi: <http://dx.doi.org/10.1645/GE-522R.1>
- Navarro, M. C., Noguera, M. A., Romero, M. C., Montilla, M. P., de Selgas, J. G., & Valero, A. (2008). *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpenic derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology*, 120(4), 295-299.
- NCBI, *National Center for Biotechnology Information* (n.d.). *NCBI Taxonomy Browser*. Accessed on 22/06/2018 at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- Nieuwenhuizen, N. E. (2016). *Anisakis*-immunology of a foodborne parasitosis. *Parasite Immunology*, 38(9), 548-557. doi: <https://doi.org/10.1111/pim.12349>

- NIID, *National Institute of Infectious Diseases*. (2017). *Infectious Agents Surveillance Report (IASR)*. Accessed on 29/06/2018 at <https://www.niid.go.jp/niid/en/iasr-vol33-e/865-iasr/7225-446te.html>
- OIE, Organização Mundial da Saúde Animal (2018). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2018. Accessed on 27/06/2018 at <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2018/>
- Olson, R.E. (1987). Marine fish parasites of public health importance. In Kramer, D.E. & Liston, J. (Eds.) *Seafood Quality Determination* (pp. 339-355). The Netherlands: Elsevier Science Publishers.
- Pascual, S., Rodríguez, H., Pierce, G. J., Hastie, L. C., & González, A. F. (2018). The NE Atlantic European hake: A neglected high exposure risk for zoonotic parasites in European fish markets. *Fisheries Research*, 202, 69-78. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.12.008>
- Peleteiro, M.C. (2016). Técnica de necrópsia de peixes. In Peleteiro, M.C., Ferreira da Silva, J., Dias-Pereira, P., Carvalho, T., Faustino, A., Correia, J., Pissarra, H. & Stilwell, G. *Manual de Necrópsia Veterinária* (pp. 113-118). Lisboa: Lidel.
- Petrie, A., Wootten, R., Bruno, D., MacKenzie, K., & Bron, J. (2007). A survey of *Anisakis* and *Pseudoterranova* in Scottish fisheries and the efficacy of current detection methods. *Report of Food Standard Agency—FSAS Project S*, 14008.
- Picó-Durán, G., Pulleiro-Potel, L., Abollo, E., Pascual, S., & Muñoz, P. (2016). Molecular identification of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in commercial cephalopods from the Spanish Mediterranean coast. *Veterinary Parasitology*, 220, 47-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.020>
- Podolska, M., & Horbowy, J. (2003). Infection of Baltic herring (*Clupea harengus membras*) with *Anisakis simplex* larvae, 1992–1999: a statistical analysis using generalized linear models. *ICES Journal of Marine Science*, 60(1), 85-93.
- Pravettoni, V., Primavesi, L., & Piantanida, M. (2012). *Anisakis simplex*: current knowledge. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 44(4), 150.
- Quiazon, K. M. A., Yoshinaga, T., Ogawa, K., & Yukami, R. (2008). Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (*sensu stricto*) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitology International*, 57(4), 483-489. doi: 10.1016/j.parint.2008.06.003
- Ramón, J. L. (2015). *Estudio de la presencia de nematodos anisákidos en distintas especies acuícolas producidas en el litoral español*. Ph.D. Thesis. Valencia: Universitat Politècnica de València.
- Ramos, P. (2011). *Anisakis* spp. em bacalhau, sushi e sashimi: risco de infeção parasitária e alergia. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 87-97
- Regulamento CE nº 853/2004 de 29 de abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia*, L139. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.

- Regulamento (CE) nº 854/2004 de 29 de abril de 2004. *Jornal Oficial da União Europeia*, L139. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Regulamento (CE) nº 2074/2005 de 5 de dezembro de 2005. *Jornal Oficial da União Europeia*, L338. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Regulamento (CE) Nº 1020/2008 de 17 de outubro de 2008. *Jornal Oficial da União Europeia*, L277. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Regulamento (CE) Nº 1276/2011 de 8 de dezembro de 2011. *Jornal Oficial da União Europeia*, L327. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Rello, F. J., Adroher, F. J., & Valero, A. (2008). *Hysterothylacium aduncum*, the only anisakid parasite of sardines (*Sardina pilchardus*) from the southern and eastern coasts of Spain. *Parasitology Research*, 104(1), 117-121. doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1168-0>
- Rumolo, P., Basilone, G., Fanelli, E., Barra, M., Calabrò, M., Genovese, S., Gherardi, S., Ferreri, R., Mazzola, S. & Bonanno, A. (2017). Linking spatial distribution and feeding behavior of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Strait of Sicily (Central Mediterranean Sea). *Journal of Sea Research*. doi: 10.1016/j.seares.2017.01.002
- Sangiao, M. N. C. (2017). *Caracterización del riesgo de exposición al parásito de pescado Anisakis sp.* Ph.D. Thesis. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Santana, A. H., & Cives, M. V. (2009). Anisakis: pasado, presente y futuro. *Medicina clínica*, 132(10), 400-403.
- Santos, M. J., Castro, R., Cavaleiro, F., Rangel, L., Palm, H. W. (2017). Comparison of anisakid infection levels between two species of Atlantic mackerel (*Scomber colias* and *S. scombrus*) off the Atlantic Portuguese coast. *Scientia Marina*, 81(2), June 2017, 179-185. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/scimar.04552.26A>
- Seesao, Y., Gay, M., Merlin, S., Viscogliosi, E., Aliouat-Denis, C. M., & Audebert, C. (2017). A review of methods for nematode identification. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 37-49. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.030>
- Silva, M. E. R., & Eiras, J. C. (2003). Occurrence of *Anisakis* sp. in fishes off the Portuguese West coast and evaluation of its zoonotic potential. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23(1), 13-17.
- Silva, M. A., Brito, C., Santos, S. V., & Barreiros, J. P. (2009). Historic and recent occurrences of pinnipeds in the Archipelago of the Azores. *Mammalia*, 73(1), 60-62.
- Smith, J. W., & Wootten, R. (1978). Anisakis and anisakiasis. In *Advances in Parasitology* (Vol. 16, pp. 93-163). Academic Press.
- Smith, J. W. (1983). *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea): morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. *Journal of Helminthology*, 57(3), 205-224.
- Smith, J. & Wootten, R. (1984). *Phocascaris/Contraecaecum* larvae (Nematoda) in fish. *International Council for the Exploration of the Sea (ICES)*. Accessed on 28/05/2018 at

<http://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Disease%20Leaflets/Sheet%20no%2009.pdf>

- Sousa, M., Amaral, R., & Oliveira, B. (2012). Boas Práticas que Contribuem para a Qualidade do *Sushi* em Estabelecimentos de Restauração. *Revista Nutrícias*, (15), 31-33.
- Steinfelder, S., Rausch, S., Lucius, R. & Hartmann, S. (2013). 19. Nematode Allergens. In Kennedy, M. W. & Harnett, W. (Eds.), *Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry and Immunology* (2nd ed) (p. 383). UK: CAB International.
- Tejada, M., Karl, H., De Las Heras, C., Vidacek, S., Solas, M. T., & Garcia, M. L. (2014). Does the intensity of *Anisakis* infection affect the quality of hake muscle?. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23(3), 221-236.
- Timi, J. T., Paoletti, M., Cimmaruta, R., Lanfranchi, A. L., Alarcos, A. J., Garbin, L., George-Nascimento, M., Rodríguez, D. H., Giardino, G.V. & Mattiucci, S. (2014). Molecular identification, morphological characterization and new insights into the ecology of larval *Pseudoterranova cattani* in fishes from the Argentine coast with its differentiation from the Antarctic species, *P. decipiens* sp. E (Nematoda: Anisakidae). *Veterinary Parasitology*, 199(1-2), 59-72. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.09.033
- União Europeia (2016). Factos e números sobre a política comum das pescas. *Dados estatísticos de base. Edição de 2016*. Belgium: União Europeia; pp-24. Accessed on 23/04/2018 at https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/pcp_pt.pdf
- Valentini, A., Mattiucci, S., Bondanelli, P., Webb, S. C., Mignucci-Giannone, A. A., Colom-Llavina, M. M., & Nascetti, G. (2006). Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial cox2 sequences, and comparison with allozyme data. *Journal of Parasitology*, 92(1), 156-166. doi: <https://doi.org/10.1645/GE-3504.1>
- Van Thiel, P. H. (1962). *Anisakis*. *Parasitology*, 53, 16-17.
- Vericimo, M. A., Teixeira, G., Figueiredo, I., Ribeiro J., Fantezia, M. A. M. & Clemente, S. C. S. (2017). 42. *Anisakis*. In Liu, D. (Ed.), *Laboratory Models for Foodborne Infections* (pp.679-699). Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Vieira, N., Carvalho, I., Brito, C. (2009). Occurrence and relative abundance of common dolphins in three sites of the Portuguese shore, 7 pp. United Kingdom: Report of the International Whaling Commission, SC/61/SM16.
- Wootten, R., Yoon, G. H., & Bron, J. E. (2010). *A survey of anisakid nematodes in Scottish wild Atlantic salmon*. Institute of Aquaculture, University of Stirling, UK, 1-23.
- Yagi K., Nagasawa K., Ishikura H., Nagagawa A., Sato N., Kikuchi K. & Ishikura K. (1996). Female worm *Hysterothylacium aduncum* excreted from human: a case report. *Japanese Journal of Parasitology*, 45(1),12-23.

ANEXO 1

Ficha de necrópsia

Código do peixe: _____ Local de captura: _____

Navio: _____ Data de captura: __/__/__ Espécie: _____

Género: _____ Peso: _____ g Comprimento: _____ cm

Data da necrópsia: __/__/__ Hora de início da necrópsia: ____:____

Nº de larvas detectadas à vista desarmada: _____ Observações: _____

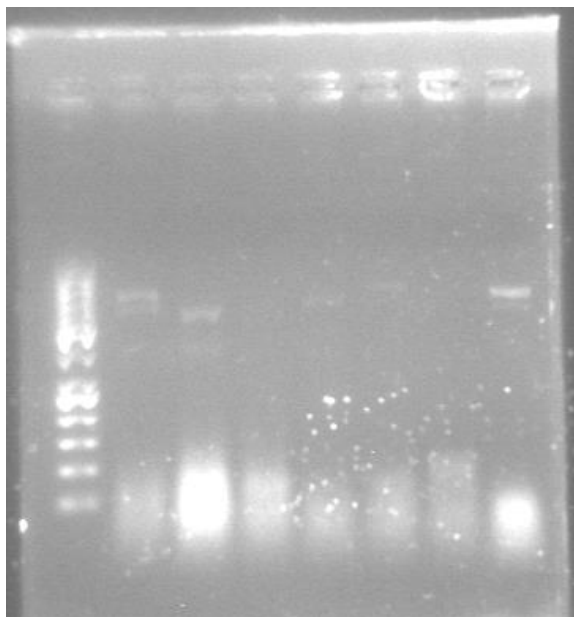
Data de início da digestão artificial: __/__/__ Hora de início da digestão artificial: ____:____

Nº de larvas detectadas nos músculos: _____ Nº de larvas detectadas nas vísceras: _____

ANEXO 2

ANEXO 3

Eletroforese realizada no dia 5 de janeiro de 2018



Poço 1 – marcador

Poço 2 – 5.1.AO3_1

Poço 3 – 5.1. AM3_2

Poço 4 – 5.1. AM4_3

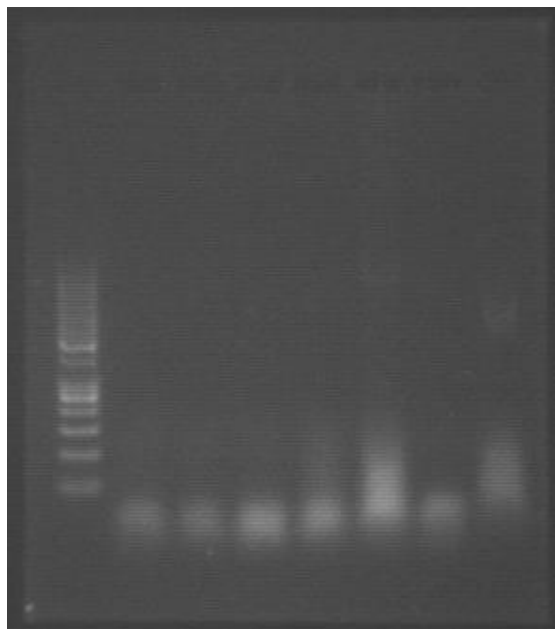
Poço 5 – 5.1. AM7_4

Poço 6 – 5.1. AM13_5

Poço 7 – 5.1. Neg_6

Poço 8 – 4.12. ANI.7

Eletroforese realizada no dia 8 de janeiro de 2018



Poço 1 – marcador

Poço 2 – 5.1. AM14_1

Poço 3 – 5.1.BM11_2

Poço 4 – 5.1.CO5_3

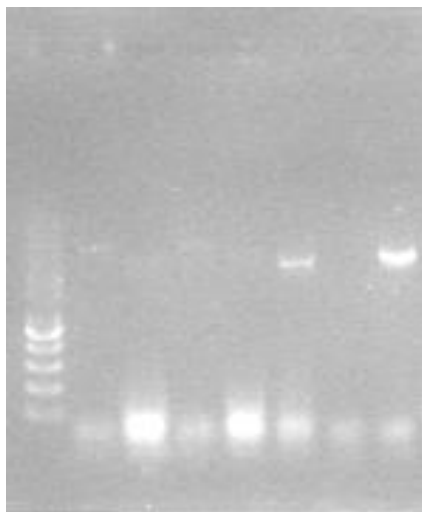
Poço 5 – 5.1.CO11_4

Poço 6 – 5.1. AO17_5

Poço 7 – 5.1. Neg_6

Poço 8 – 5.1. AO3_1

Eletroforese realizada no dia 19 de janeiro de 2018



Poço 1 – marcador

Poço 2 – 19.1. AVpoll1_1

Poço 3 – 19.1. AVpoll2_2

Poço 4 – 19.1. AMpoll1_3

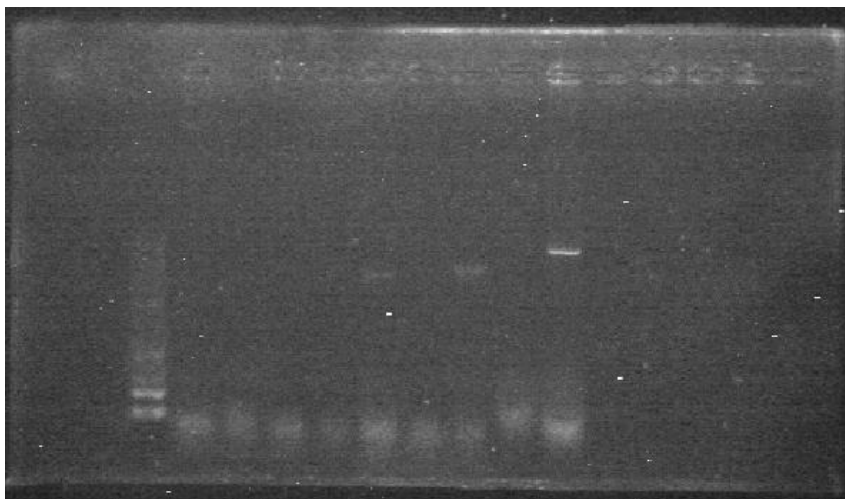
Poço 5 – 19.1. AMpoll2_4

Poço 6 – 19.1. AOpoll1_5

Poço 7 – 19.1. Neg_6

Poço 8 – 19.1. Am2(CP)_7

Eletroforese realizada dia 22 de janeiro de 2018



Poço 3 – marcador

Poço 4 – 19.1. AM4_10

Poço 5 – 19.1. AM14_11

Poço 6 – 19.1. BM11_12

Poço 7 – 19.1. CO5_13

Poço 8 – 19.1.CO11_14

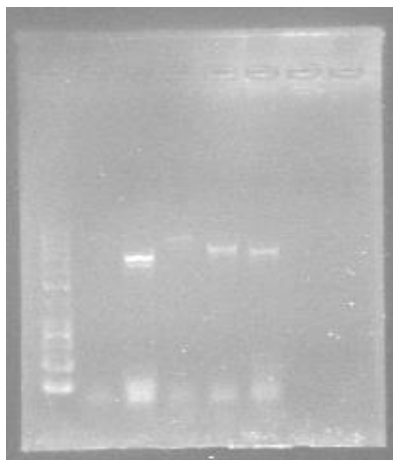
Poço 9 – 19.1. Neg_15

Poço 10 – 19.1. Am2_16

Poço 11 – 19.1. AO17_COf

Poço 12 – 19.1. AO17_HAf

Eletroforese realizada dia 23 de janeiro de 2018



Poço 1 – marcador

Poço 2 – 23.1. AOpoll2_1

Poço 3 – 23.1. BVpoll1_2

Poço 4 – 23.1. BVpoll2_3

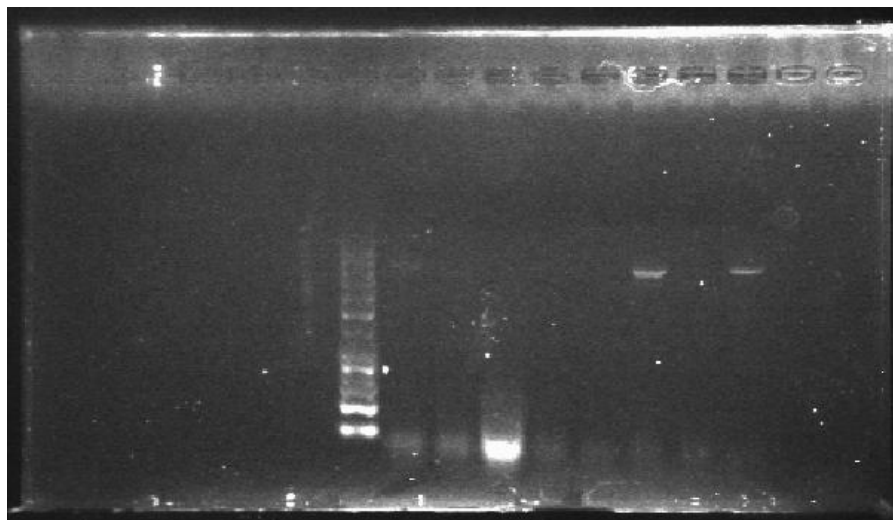
Poço 5 – 23.1. BMpoll1_4

Poço 6 – 23.1. BMpoll2_5

Poço 7 – 23.1. 23.1. Neg._6

Poço 8 – 23.1. Am1(CP)

Eletroforese realizada no dia 25 de janeiro de 2018



Poço 7 – marcador

Poço 8 – 25.1. BOpoll1_1

Poço 9 – 25.1. CVpoll1_2

Poço 10 – 25.1. CVpoll2_3

Poço 11 – 25.1. CMpoll1_4

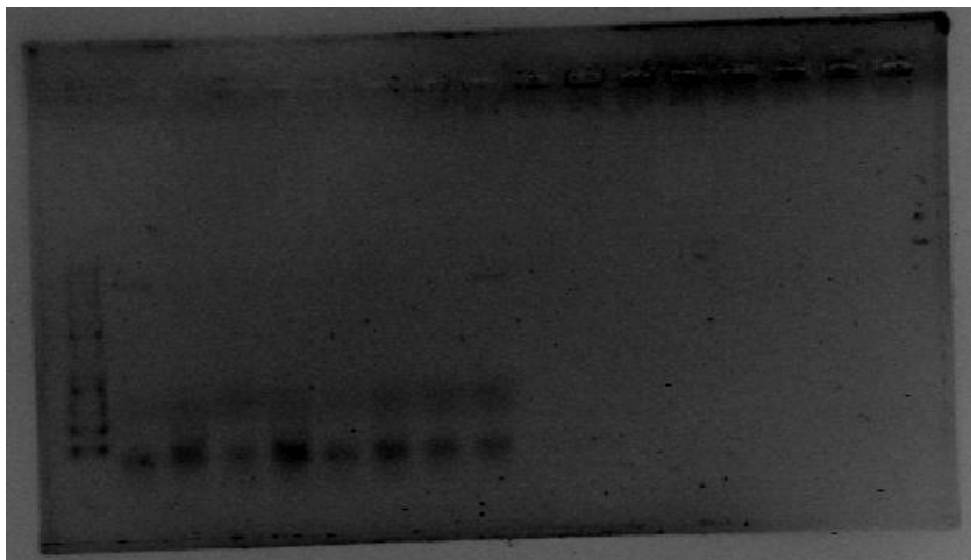
Poço 12 – 25.1. COpoll1_5

Poço 13 – 25.1. COpoll2_6

Poço 14 – 25.1. Neg_7

Poço 15 – 25.1.Am1_CP_8

Eletroforese realizada no dia 26 de janeiro de 2018



Poço 1 – marcador

Poço 2 – 26.1. DVpoll1_1

Poço 3 – 26.1. DVpoll2_2

Poço 4 – 26.1. DMpoll1_3

Poço 5 – 26.1. DMpoll2_4

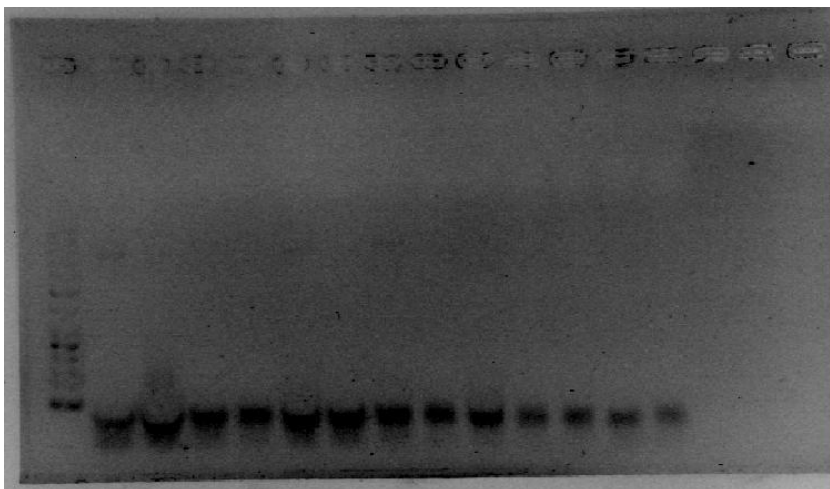
Poço 6 – 26.1. DOpoll1_5

Poço 7 – 26.1. DOpoll2_6

Poço 8 – 26.1. Neg._7

Poço 9 – Am1(CP)

Eletoforese realizada no dia 5 de feveiro de 2018



Poço 1 – marcador

Poço 2 – 5.2. CVpoll1_1

Poço 3 – 5.2. CVpoll2_2

Poço 4 – 5.2. CMpoll1_3

Poço 5 – Copoll1_4

Poço 6 – 5.2. DVpoll2_5

Poço 7 – 5.2. Neg_6

Poço 8 – 5.2. Am2_7

Poço 9 – 5.2. DMpoll1_1

Poço 10 – 5.2. DMpoll2_2

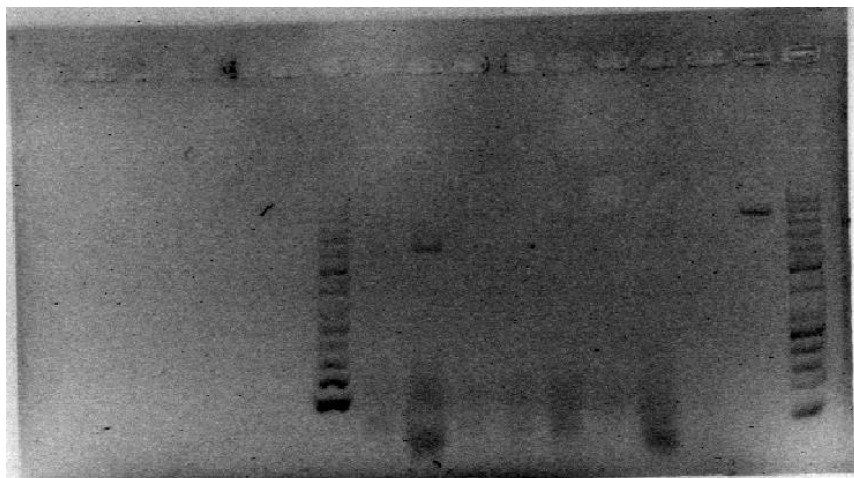
Poço 11 – 5.2. DOpoll1_3

Poço 12 – 5.2. DOPoll2_4

Poço 13 – 5.2. Neg_5

Poço 14 – 5.2. Am2_6

Eletroforese realizada no dia 5 de março de 2018



Poço 7 – marcador

Poço 8 – 2.1. AOpoll2_1

Poço 9 – 2.1. CVpoll2_2

Poço 10 – 2.1. COpoll1_3

Poço 11 – 2.1. DMpoll1_4

Poço 12 – 2.1. DMPoll2_5

Poço 13 – 2.1. DOpoll1_6

Poço 14 – 2.1. DOpoll2_7

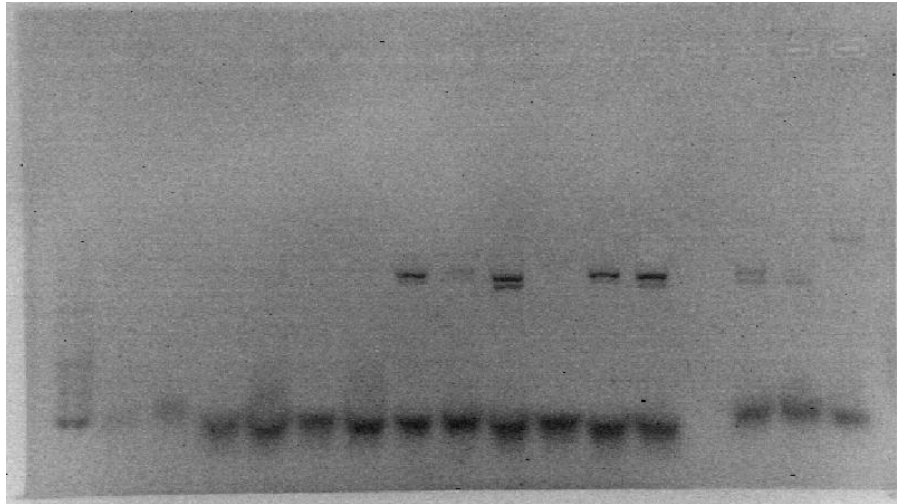
Poço 15 – Cneg_8

Poço 16 – CP (Am1)_9

Poço 17 – marcador

Eletoforeses de todos os produtos de PCR positivos

Eletoforese realizada no dia 8 de fevereiro de 2018



Poço 1 – marcador

Poço 2 – 5.1. AM7_4

Poço 3 – 5.1. AM13_5

Poço 4 – 19.1. AVpoll1_1

Poço 5 – 19.1. AVpoll2_2

Poço 6 – 19.1. AMpoll1_3

Poço 7 – 19.1. AMpoll2_4

Poço 8 – 19.1. AOpoll1_5

Poço 9 – 19.1. CO11_14

Poço 10 – 23.1. BVpoll1_2

Poço 11 – 23.1. BVpoll2_3

Poço 12 – 23.1. BMpoll1_4

Poço 13 – 23.1. BMpoll2_5

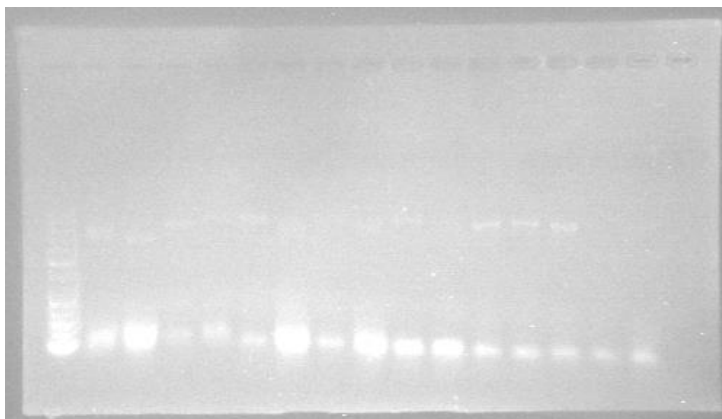
Poço 14 – Neg

Poço 15 – 5.1. AO3_1 → *A. pegreffii*

Poço 16 – 5.1. AM3_2 → *A. simplex* s.s.

Poço 17 – 5.1. AO17_5 → *Hysterothyliacium aduncum*

Eletoforese realizada no dia 8 de fevereiro de 2018



Poço 1 – marcador

Poço 2 – 5.1. AO3_1 → *A. pegreffii*

Poço 3 – 5.1. AM3_2 → *A. simplex* s.s.

Poço 4 – 5.1. AM7_4

Poço 5 – 5.1. AM13_5

Poço 6 – 19.1. AVpoll1_1

Poço 7 – 19.1. AVpoll2_2

Poço 8 – 19.1. AMpoll1_3

Poço 9 – 19.1. AMpoll2_4

Poço 10 – 23.1. BVpoll2_3

Poço 11 – 25.1. BOpoll1_1

Poço 12 – 25.1. COpoll2_6

Poço 13 – 26.1. DVpoll1_1

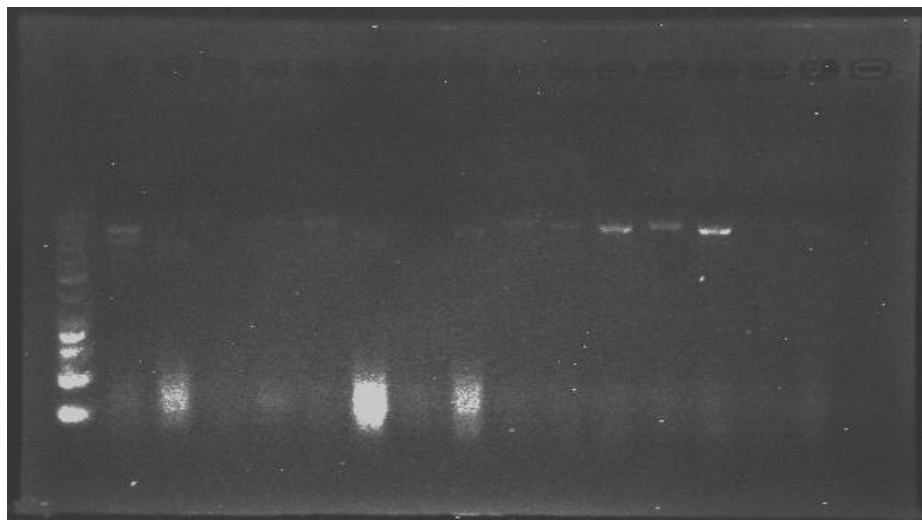
Poço 14 – 5.2. CVpoll1_1

Poço 15 – 5.2. CMpoll1_3

Poço 16 – 5.2. DVpoll2_5

Poço 17 – Neg

Eletoforese realizada o dia 9 de fevereiro de 2018



Poço 1 – marcador

Poço 2 – 5.1. AO3_1 → *A. pegreffii*

Poço 3 – 5.1. AM3_2 → *A. simplex* s.s.

Poço 4 – 5.1. AM7_4

Poço 5 – 5.1. AM13_5

Poço 6 – 19.1. AVpoll1_1

Poço 7 – 19.1. AVpoll2_2

Poço 8 – 19.1. AMpoll1_3

Poço 9 – 19.1. AMpoll2_4

Poço 10 – 23.1. BVpoll2_3

Poço 11 – 25.1. BOpoll1_1

Poço 12 – 25.1. COpoll2_6

Poço 13 – 26.1. DVpoll1_1

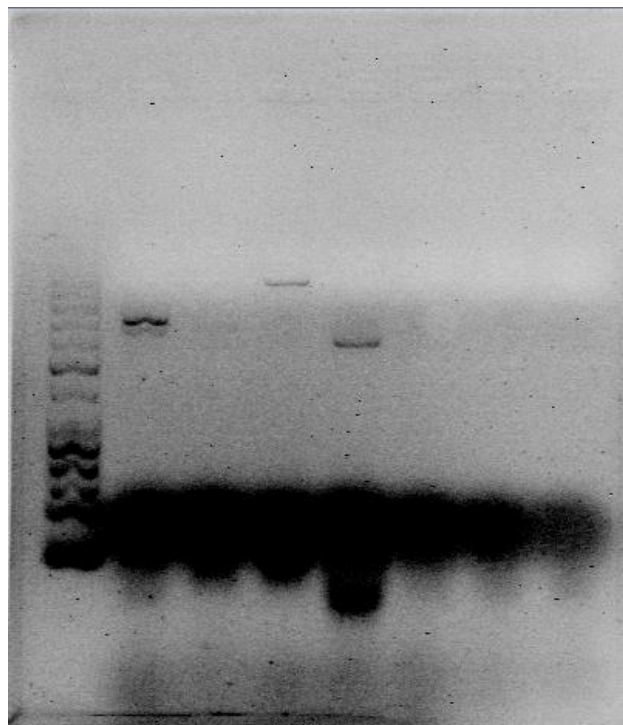
Poço 14 – 5.2. CVpoll1_1

Poço 15 – 5.2. CMpoll1_3

Poço 16 – 5.2. DV poll2_5

Poço 17 – Neg

Electroforese realizada no dia 13 de março de 2018



Poço 1 – marcador

Poço 2 – 23.1.BVpoll1_2 (= 5.1.AO3_1) → *A. pegreffii*

Poço 3 – 5.1. AM3_2 → *A. simplex* s.s.

Poço 4 – 19.1. AO17_HAf_18 → *Hysterothyliacium aduncum*

Poço 5 – 2.3.CVpoll2_2

Poço 6 – 5.2.CMpoll1_3

Poço 7 – 5.2. DVpoll2_5

Poço 8 – Neg

ANEXO 4

Lista de pools positivas

- 1 – **A03** – *A. pegreffii* (sequenciado)
- 2 – **AM3** – *A. simplex* s.s. (sequenciado)
- 3 – **AM7** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 8 fev às 16h26)
- 4 – **AM13** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 8 fev às 16h26)
- 5 – **CO11** – *A. pegreffii* (apresentou as duas bandas – 8 fev às 14h09)
- 6 – **A017** – *Hysterothylacium aduncum* (sequenciado)
- 7 – **AVpoll1** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 8 fev às 16h26)
- 8 – **AVpoll2** – *A. simplex* s.s. (8 fev. às 16h26)
- 9 – **AMPoll1** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 8 fev às 16h26)
- 10 – **AMPoll2** – *A. simplex* s.s. (8 fev às 16h26)
- 11 – **AOPoll1** – *A. pegreffii* (apresentou as duas bandas – 8 fev às 14h09)
- 12 – **BVpoll1** – *A. pegreffii* (apresentou as duas bandas – 8 fev às 14h09)
- 13 – **BVpoll2** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 9 fev às 16h04)
- 14 – **BMpoll1** – *A. pegreffii* (apresentou as duas bandas – 8 fev às 14h09)
- 15 – **BMpoll2** – *A. pegreffii* (apresentou as duas bandas – 8 fev às 14h09)
- 16 – **BOpoll1** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 9 fev às 16h04)
- 17 – **CVpoll1** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 9 fev às 16h04)
- 18 – **CVpoll2** – *A. simplex* s.s. (13 de março)
- 19 – **CMpoll1** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 9 fev às 16h04)
- 20 – **COpoll2** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 9 fev às 16h04)
- 21 – **DVpoll1** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 9 fev às 16h04)
- 22 – **DVpoll2** – *A. pegreffii* (apresentou apenas a banda mais pesada – 9 fev. às 16h04)