

## *Anisakis* spp. em bacalhau, *sushi* e *sashimi*: risco de infecção parasitária e alergia

## *Anisakis* spp. in Cod, *Sushi* and *Sashimi*: risk of parasitic infection and allergy

Paula Ramos

Laboratório de Patologia de Animais Aquáticos. Unidade de Aquacultura.  
INRB, I.P.-IPIMAR. Avenida de Brasília. 1449-006 Lisboa, Portugal

**Resumo:** A anisaquidose é uma zoonose resultante da ingestão accidental de larvas viáveis de anisaquídeos em produtos da pesca crus ou pouco confeccionados. A infecção por *Anisakis simplex* foi associada a alergia. Em Portugal, apesar de não serem conhecidos casos clínicos da doença, têm sido recolhidas larvas de anisaquídeos em peixe com valor comercial. Com a introdução de hábitos de consumo de peixe cru, aumenta a probabilidade de sensibilização ao parasita. Neste estudo analisaram-se 14 amostras de bacalhau salgado seco inteiro, 13 amostras de bacalhau demolido ultracongelado em posta, com marcas comerciais distintas, bem como 18 refeições de *sushi* e *sashimi* obtidas em 18 postos de venda. Pesquisou-se a ocorrência de larvas de anisaquídeos combinando os métodos de inspeção visual, transiluminação e dissecação dos tecidos. No bacalhau salgado seco, 13 (92,9%) amostras estavam parasitadas por *Anisakis* spp. (62,7%) e 1,3% por *Pseudoterranova* spp. No bacalhau demolido ultracongelado todas apresentavam parasitas: *Anisakis* spp. (57,1%) e *Pseudoterranova* spp. (11,4%). A abundância parasitária variou de 1 a 30 no bacalhau salgado seco e de 1 a 7 no bacalhau demolido ultracongelado. Todos os parasitas estavam inviáveis.

Apesar de não terem sido observados anisaquídeos nas refeições japonesas, a sua confecção domiciliária e o desconhecimento do público em geral no reconhecimento das larvas, justifica a implementação de acções de formação neste sentido. No produto da pesca embalado refrigerado, a indicação de congelação prévia ao seu consumo em cru ou praticamente cru, pode prevenir a infecção parasitária e assim, alergia a produtos da pesca contaminados.

**Summary:** Anisakidosis is a zoonotic disease. Humans may acquire accidental infection by eating raw or undercooked fish with viable anisakids larvae. Apart from digestive disorders, *Anisakis simplex* can also lead to allergic reactions. In Portugal, although clinical cases of the disease are not known, *Anisakis* larvae have been recovered from commercial fish. The introduction of food consumption of raw or undercooked fish, increased the risk of infection and sensitisation to parasite. In this study, 14 samples of dried salt cod, 13 samples of frozen codfish and 18 meals of *sushi* and *sashimi* obtained at 18 different points of sale were analysed. The occurrence of anisakid larvae was recorded combining the methods of visual inspection, candling and destructive slicing. Thirteen samples (92.9%) of dried salted cod were parasitized being 62.7% by *Anisakis* spp. larvae and 1.3% by *Pseudoterranova* spp. larvae.

All samples of frozen codfish were parasitized: 57.1% by *Anisakis* spp. larvae and 11.4% by *Pseudoterranova* spp. Anisakid larvae abundance ranged from 1 to 30 in dried salted cod and 1-7 in frozen codfish. All the collected parasites were not viable. Although no anisakids larvae were observed in Japanese meals, home cooking process and the lack of general public recognition of the larvae, justifies the implementation of training in this subject. Refrigerated packaged fishery products, should include a freezing indication prior to its raw or almost raw consumption, in order to prevent parasite infection and contribute to avoid allergy by contaminated fish products ingestion.

### Introdução

A presença de larvas L3 de anisaquídeos em peixe com valor comercial pode constituir um problema com duas vertentes. Por um lado, a repercussão económica resultante do aumento da incidência destes parasitas em peixes selvagens com valor comercial, em áreas de pesca por todo o mundo (Vidacek *et al.*, 2009). Por outro lado, coloca-se um problema de saúde pública em que o risco de doença (anisaquidose) pode ser directo devido à ingestão de larvas viáveis em produtos da pesca crus ou pouco confeccionados ou indirecto, quando estão presentes larvas de *Anisakis simplex*, responsáveis por reacções alérgicas.

O termo "anisaquidose" refere-se a doenças causadas por parasitas da família Anisakidae e o termo "anisaquiose" designa a infecção parasitária do tubo digestivo causada pela ingestão de larvas do género *Anisakis* (Kassai *et al.*, 1988). As espécies mais vulgarmente associadas à infecção humana são *Anisakis simplex* e *Pseudoterranova decipiens* (Audicana e Kennedy, 2008).

No ciclo biológico dos géneros *Anisakis* e *Pseudoterranova*, os mamíferos marinhos desempenham o papel de hospedeiros definitivos (HD), os crustáceos bentónicos e planctónicos de hospedeiros intermediários (HI) e os peixes e cefalópodes (lula), de hospedeiros de transporte (HT) ou paraténicos

\*Correspondência: pramos@ipimar.pt

(Gómez Sáenz *et al.*, 1999), uma vez que as larvas de anisacídeos ao perfurar a parede do tubo digestivo, alcançam a cavidade corporal, onde podem aumentar de tamanho sem experimentar nenhum tipo de muda. As fêmeas adultas libertam os ovos no intestino dos HD, que os eliminam juntamente com as fezes. Ainda dentro do ovo, a larva sofre as duas primeiras mudas, com eclosão de L3 (Køie *et al.*, 1995). Uma vez livre, a larva entra na cadeia alimentar de pequenos crustáceos, que servem de alimento aos peixes. Nestes, a larva L3 perfura a parede intestinal e permanece livre na cavidade abdominal ou migra para as vísceras ou músculo, onde enquista, conservando a sua capacidade infestante. Dado que as formas larvares dos anisacídeos não têm especificidade de hospedeiro, podem ser encontradas numa grande variedade de espécies de peixes, aumentando a probabilidade de transmissão (Mattiucci *et al.*, 2002; 2005).

O homem pode ser um hospedeiro acidental (HA) ao ingerir peixe ou cefalópodes com L3 viáveis, a única forma larvar susceptível de causar infecção (Audicana e Kennedy, 2008). A presença de larvas vivas de *Anisakis* no homem, pode evoluir para quadros clínicos distintos: infecção do tubo digestivo (anisacuíose gástrica ou intestinal) ou ocasionalmente de outros órgãos (ectópica) e as formas alérgicas, quando estão presentes larvas de *A. simplex* (anisacuíase gastroalérgica e alergia a *A. simplex*) (Audicana e Kennedy, 2008). A anisacuíose gástrica é a forma clínica mais frequente de parasitismo por *A. simplex* (Daschner *et al.*, 1997). A reação inflamatória é consequência da perfuração das larvas na mucosa da parede do tubo digestivo, com formação de granuloma eosinofílico e manifestando-se por dor abdominal, náuseas e vômitos nas 12 horas após a ingestão de peixe cru (Daschner *et al.*, 2000). Mais de 90% dos casos de anisacuíose são causados por uma única larva mas estão descritos casos de parasitismo massivo (Daschner *et al.*, 1997). Alguns doentes apresentam sintomatologia abdominal acompanhada de reacção alérgica de hipersensibilidade, mediada por IgE, com sintomas de urticária, angioedema ou anafilaxia. Esta síndrome designa-se anisacuíase gastroalérgica (Daschner *et al.*, 2000) e resulta da infecção pela larva viva, durante a invasão da mucosa, com libertação de produtos de excreção/secreção parasitária (E/S), como o alergénio Ani s 1 (Moneo *et al.*, 2000). O verdadeiro impacto de *A. simplex* como causa de síndrome alérgica aguda pode estar a ser subestimado devido à ausência de correlação temporal (por vezes, mais de 24 horas) entre a ingestão de peixe parasitado e a manifestação de sintomas alérgicos, constituindo um elemento de confusão no diagnóstico de alergia a *A. simplex* (Ventura *et al.*, 2008). Esta variabilidade está provavelmente dependente do tempo necessário para a invasão da mucosa digestiva e a secreção de alergénios E/S pela larva viva (Foti *et al.*, 2002). Esta situação traduz-se em elevada prevalência de casos de sensibi-

lização a *A. simplex* em indivíduos saudáveis (Del Rey Moreno *et al.*, 2006). No estudo de sensibilização a *A. simplex* efectuado no Barlavento Algarvio, apesar de não terem sido observados casos de anisacuíose nem formas clínicas relacionadas com *Anisakis*, a presença de anticorpos anti-*Anisakis*, traduz presumivelmente uma situação de sub-diagnóstico de reacções alérgicas provocadas por *A. simplex* (Nunes *et al.*, 2003) ou reacções cruzadas (Moneo *et al.*, 2000).

Na anisacuíose gástrica aguda, o tratamento consiste na remoção endoscópica das larvas eventualmente completado com albendazole (Arias-Díaz *et al.*, 2006) e nas outras formas clínicas, a intervenção dependerá das complicações produzidas. Não havendo tratamento farmacológico específico para destruir eficazmente os parasitas viáveis *in vivo*, a prevenção é a forma mais eficaz de intervenção (EFSA, 2010).

*A. simplex* é o único parasita associado aos produtos da pesca responsável por quadros clínicos de alergia, quer anisacuíase gastroalérgica em que os sintomas alérgicos surgem numa situação de parasitismo gástrico agudo devido a infecção com a larva viva, quer alergia a *A. simplex* mediada por IgE, resultante da presença de alergénios nos produtos da pesca, sem a necessária presença do parasita vivo. Estes quadros clínicos de alergia são frequentes nalgumas regiões de Espanha e menos frequentes noutros países (Audicana e Kennedy, 2008). A principal via de sensibilização no homem é a digestiva, com infecção pela larva viva mas, também pode ocorrer sensibilização através do aparelho respiratório e contacto com a pele e mucosas, dando origem a diferentes formas clínicas de alergia a *A. simplex*: doença reumática (Cuende *et al.*, 1998), doença respiratória crónica e dermatite (Nieuwenhuizen *et al.*, 2006), conjuntivite (Añibarro e Seoane, 1998), asma (Armentia *et al.*, 1998) e urticária (Scala *et al.*, 2001) ocupacionais.

Até hoje, foram descritos a nível molecular doze proteínas identificadas como alergénios de *A. simplex* (Ani s 1 a Ani s 12) (Audicana e Kennedy, 2008; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008); Caballero *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2011; . Sete destes são alergénios de excreção ou secreção parasitária (E/S) e dois de origem somática, Ani s 2 e Ani s 3, que correspondem às proteínas paramiosina e tropomiosina, respectivamente. Desconhecem-se as funções dos alergénios Ani s 10, Ani s 11 e Ani s 12. Ani s 1 é o principal alergénio E/S de *A. simplex*, altamente resistente ao calor (Moneo *et al.*, 2000; 2005). Os alergénios Ani s 4, Ani s 5, Ani s 8 e Ani s 9 também são alergénios termoestáveis (Audicana e Kennedy, 2008; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008).

Os antigénios de *A. simplex* libertados durante a fixação e a passagem da larva através do corpo e durante o seu enquistamento e/ou desintegração, sensibilizam o doente a futura exposição e causam reacção alérgica (Del Rey Moreno *et al.*, 2006). Os doentes sensibilizados podem manifestar sintomatologia alér-

gica após consumirem peixe cozinhado ou congelado (Ventura *et al.*, 2008), com risco três vezes maior de desenvolverem urticária aguda recidivante (Falcão *et al.*, 2008). Trata-se de uma situação de alergia resultante da exposição a alérgenos que permaneceram nos produtos da pesca confeccionados (Audicana *et al.*, 1995, 2002; Vidacek *et al.*, 2009). A controvérsia associada às alergias causadas por *A. simplex* presentes nos produtos da pesca prende-se sobretudo com o desconhecimento dos mecanismos da doença i.e., se para haver sensibilização alérgica a *A. simplex* é necessário infecção prévia ou se a exposição a antigénios, na ausência da larva viva pode causar alergia (Audicana *et al.*, 2002). Há registos de que os alérgenos podem causar alergia sem infecção (Audicana *et al.*, 2002; Vidacek *et al.*, 2009). A base da questão é a termoestabilidade que manifestam alguns alérgenos de *A. simplex* como Ani s 4, que retem as suas propriedades antigénicas e alérgicas e assim, pode constituir um risco para a saúde de indivíduos sensibilizados (Vidacek *et al.*, 2009). Apesar da controvérsia sobre o impacto epidemiológico das duas vias responsáveis pelas reacções alérgicas, há consenso quanto ao facto de que o consumo de produtos da pesca contendo larvas de *A. simplex* viáveis representa um risco de alergia maior que o consumo de produtos da pesca com parasitas não viáveis e assim, a prevenção da sensibilização a *A. simplex* deve focar-se no controlo da infecção (EFSA, 2010).

Em Portugal, regista-se o maior consumo de peixe da UE e o terceiro a nível mundial. Embora não hajam casos clínicos reportados de anisakiíase foi registada a ocorrência de larvas de anisakiídeos em espécies de peixes marinhos com valor comercial capturados na Costa portuguesa e ilhas: Peixe-espada-preto (Cruz *et al.*, 2009); verdelho (Silva e Eiras, 2003; Cruz *et al.*, 2007); carapau (Silva e Eiras, 2003; Cruz *et al.*, 2005); sarda, choupá, faneca, linguado, pescada-branca, cabra-cabaço, sardinha (Silva e Eiras, 2003); goraz (Costa *et al.*, 2004); pescada, carapau e sardinha (Borges, 2008); cavala, peixe-espada-preto e carapau-negrão (Costa *et al.*, 2003) e safio (Saraiva *et al.*, 2000). Com base nestes estudos, tendo em vista a prevenção da anisakiíase e embora os portugueses não tivessem o hábito de consumir peixe cru, o consumo de sardinha "a pingar no pão" e o carapau assado com as vísceras (Ramos, 1998) bem como o peixe-espada grelhado com vísceras (Borges, 2008) foram referenciados como potenciais factores de risco.

Com a crescente popularidade de restaurantes e *fast food* especializados em cozinha tradicional japonesa e os sinais de apetência dos portugueses para o consumo de peixe cru, este estudo teve como objectivo registar a ocorrência de larvas de anisakiídeos em refeições de *sushi* e *sashimi*, bem como em bacalhau, uma das espécies de peixe com maior valor comercial e mais apreciada na gastronomia portuguesa. Com base nos dados obtidos, serão identificados potenciais factores

de risco de infecção parasitária e de sensibilização associados ao consumo de peixe cru e apresentadas medidas de prevenção.

## Material e métodos

O estudo parasitológico foi efectuado em 14 amostras de bacalhau salgado seco, inteiro e em 13 amostras de bacalhau demolhado ultracongelado, em posta. Para este estudo utilizaram-se 12 exemplares de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e 2 exemplares de bacalhau do Pacífico (*Gadus macrocephalus*) salgado seco, inteiro, crescido a granel, obtido em 14 postos de venda a retalho, respectivamente. As 14 amostras de bacalhau salgado seco constituídas por apenas uma posta correspondente a cada peixe, foram cortadas unilateralmente, com cerca de 10 cm x 18 cm, desde a coluna vertebral até à zona da barriga. As postas de bacalhau foram pesadas e posteriormente demolhadas.

As 13 amostras de bacalhau do Atlântico demolhado ultracongelado em posta eram constituídas por sacos com 10 postas de bacalhau cada um, prefazendo 130 amostras.

Em ambos os lotes de amostras de bacalhau, procedeu-se inicialmente ao exame macroscópico das amostras (inspecção visual), remoção da pele e do peritoneu, dissecação e observação dos tecidos pelo processo de transiluminação.

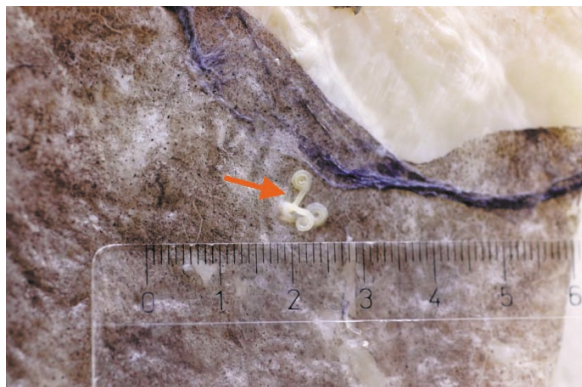
Para este estudo obtiveram-se 18 refeições japonesas, comercializadas por 18 estabelecimentos distintos. *Sushi* e *sashimi* são pratos típicos da gastronomia japonesa em que *sushi* consiste em arroz cozido, condimentado com vinagre e preparado com vegetais, ovo, peixe ou marisco cru, e servido frio. *Sashimi* consiste em peixe cru cortado em fatias finas, cubos ou tiras, servido com óleo de soja e *wasabi* (pasta de rábano-bastardo). Nas amostras de *sushi*, o peixe foi removido das diferentes apresentações: *nigiri sushi* (arroz comprimido com forma oval e peixe de diferentes espécies por cima: salmão, atum, cherne, cavala), *hosamaki* (cilindro de arroz enrolado em alga *nori*, com peixe no centro, salmão ou atum-*tekka maki*). Nos pratos de *sashimi*, as fatias de peixe (atum, salmão e cherne) foram removidas para observação. O estudo parasitológico incluiu o exame macroscópico (inspecção visual), dissecação e observação dos tecidos pelo processo de transiluminação.

As larvas de nemátodes recolhidas foram processadas para estudo morfológico em microscopia óptica: desencapsulamento, remoção dos detritos em água salgada e diafanização em lactofenol (Lactofenol, VWR). Procedeu-se à sua identificação até ao género, através da chave dicotómica de Berland (1961) e posteriormente foram fixados em álcool a 70°.

Na análise estatística dos resultados dos ensaios utilizou-se o programa informático Statistica 7.1. e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

## Resultados

No bacalhau salgado seco (peso médio: 175,22 g  $\pm$  30,22) a inspecção visual efectuada durante a dissecação e o processo de transiluminação das amostras, permitiram recolher respectivamente, 92% e 8% das 75 larvas de anisacídeos enquistadas no músculo de 13 amostras (ocorrência=92,9%). Apenas numa das amostras de bacalhau (*Gadus macrocephalus*) não foram observados parasitas. Foram observadas larvas a perfurar a serosa peritoneal (Figura 1) e outras encontravam-se enquistadas, enroladas em espiral plana, sob o peritoneu e na musculatura abdominal (Figura 2). A abundância parasitária por bacalhau variou de 1 a 30 parasitas. Das 75 larvas de anisacídeos removidas, 62,7% foram identificadas como *Anisakis* spp. e 1,3% como *Pseudoterranova* spp. As larvas de *Anisakis* spp. correspondiam a L3 de *Anisakis* tipo I (Berland, 1961). As restantes formas larvares de anisacídeos (36,0%) encontravam-se danificadas, não permitindo a sua identificação. Não foi observada relação entre o peso de cada amostra e a abundância parasitária. Em duas amostras com pesos 207,78 g e 207,36 g respectivamente, numa recolheram-se 30 larvas de anisacídeos e na outra, apenas foram observadas duas larvas por transiluminação. O número médio de larvas recolhidas no lote de bacalhau



**Figura 1** – Bacalhau salgado seco. (→) Larvas de *Anisakis* spp. a perfurar a serosa peritoneal (Original).



**Fig. 2** – Bacalhau salgado seco. (→) Larvas de *Anisakis* spp. enroladas em espiral plana, sob o peritoneu e na musculatura abdominal (Original).

salgado seco, por observação macroscópica foi 5,75 $\pm$ 8,14 e por transiluminação foi 2,0 $\pm$ 1,0. A intensidade parasitária foi 3,68 e o número médio de larvas de *Anisakis* spp. recolhidas foi 3,62 $\pm$ 6,16. Todas as formas larvares recolhidas apresentavam-se inviáveis.

No bacalhau demolido ultracongelado, os pesos médios registados por amostra foram: (279,98 g  $\pm$  46,09); (286,18 g  $\pm$  53,11); (247,82 g  $\pm$  54,36); (255,86 g  $\pm$  21,46); (250,54 g  $\pm$  35,34); (207,94 g  $\pm$  67,27); (227,37 g  $\pm$  47,43); (261,54 g  $\pm$  38,80); (269,18 g  $\pm$  43,46); (252,69 g  $\pm$  29,94); (262,64 g  $\pm$  62,59); (263,52 g  $\pm$  31,26); (231,63 g  $\pm$  23,33). Todas as amostras estavam parasitadas (ocorrência=100%), tendo sido recolhidas 105 larvas de anisacídeos. Destas, 73,3% por observação macroscópica durante a dissecação (Figura 3) e 26,7% pelo processo de transiluminação. As larvas encontravam-se encapsuladas, enroladas em espiral plana, sob o peritoneu e na musculatura abdominal envolvente da cavidade abdominal. As formas larvares foram classificadas de *Anisakis* spp. (57,1%) e de *Pseudoterranova* spp. (11,4%). As restantes formas larvares (31,4%) encontravam-se danificadas, não permitindo a observação das suas características morfológicas e por isso, inviabilizando a sua classificação. As larvas de *Anisakis* spp. correspondiam a L3 de *Anisakis* tipo I (Berland, 1961). A abundância parasitária por posta era de 1 a 7 larvas. O número médio de larvas recolhidas no lote de bacalhau demolido ultracongelado, por observação macroscópica foi 5,92 $\pm$ 4,79 e por transiluminação foi 2,8 $\pm$ 2,3. Neste lote, a intensidade parasitária foi 6,20 e o número médio de larvas de *Anisakis* spp. recolhidas foi 5,0 $\pm$ 3,72. Todas as formas larvares recolhidas apresentavam-se inviáveis.

O número médio de parasitas recolhidos nas amostras de bacalhau processadas quer pela salga quer pela ultracongelção, não foi significativamente diferente ( $P>0,1$ ). O número médio de parasitas recolhidos por observação macroscópica dos lotes de amostras de bacalhau ultracongelado e de bacalhau salgado seco também não diferiu significativamente ( $P>0,1$ ). A observação dos dois lotes de bacalhau pelo



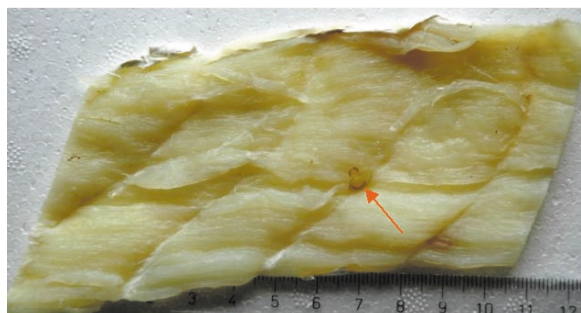
**Fig. 3** – Bacalhau demolido ultracongelado. (→) Larva de *Anisakis* spp. observável por inspecção visual, em contraste com o tecido muscular (Original).

processo de transiluminação permitiu identificar um número médio de parasitas significativamente maior ( $P < 0,5$ ) nas amostras de bacalhau demolido ultracongelado. Não se verificou diferença significativa ( $P > 0,10$ ) no número médio de parasitas recolhidos danificados nas amostras de bacalhau processadas quer pela salga quer pela ultracongelação.

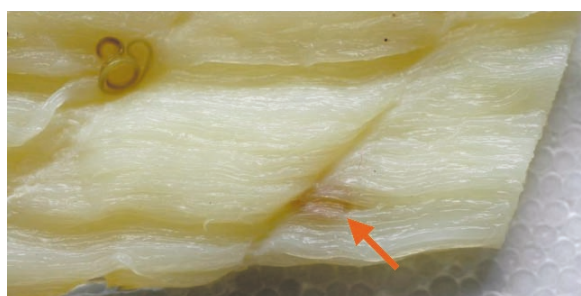
Nas amostras de peixe (salmão, atum, cherne, cavala) removidas das amostras de *sushi* e *sashimi* não foram observadas larvas de anisacídeos.

## Discussão

Todas as amostras deste estudo foram adquiridas em locais de venda ao público e de acordo com o Regulamento (CE) N° 853/2004, de 29 de Abril, não deveriam corresponder a produtos da pesca obviamente contaminados por parasitas, tendo sido submetidos a inspeção visual, individual ou segundo um plano de amostragem (Regulamento (CE) N° 2074/2005 de 5 de Dezembro). A presença de parasitas no peixe pode ser avaliada recorrendo a metodologias distintas: inspeção visual e transiluminação (regulamentadas), exame destrutivo, prensagem e observação com luz ultravioleta (Karl e Leinemann, 1993), espectrofotometria (Heia *et al.*, 2007), digestão peptídica e técnicas moleculares (PCR-RFLP, região ITS-1) (Espíneira *et al.*, 2010). A inspeção visual e a transiluminação são métodos usados no sector da indústria e eficazes na detecção de pelo menos 75,5% das larvas de *Anisakis* presentes na musculatura abdominal, mas detectam apenas cerca de 33,3% *Anisakis*, em filetes de bacalhau (Petrie *et al.*, 2007). Apenas a conjugação dos métodos de transiluminação e dissecação dos tecidos permitem obter a maioria de L3 de *Anisakis* e *Pseudoterranova* presentes nos filetes de bacalhau (Petrie *et al.*, 2007). A inspeção visual e a transiluminação são eficazes na detecção de *Pseudoterranova* em filetes finos e sem pele de peixes com músculo branco, como o bacalhau, mas a transiluminação é menos eficaz a detectar *Anisakis* (EFSA, 2010). A comparação de métodos de detecção sucessivamente mais precisos, transiluminação, degradação enzimática e radiação ultravioleta na observação de filetes, revelou que apenas 7 a 10% das larvas eram detectadas por transiluminação (Levsen *et al.*, 2005). Neste estudo, para obter o maior número de larvas presentes na musculatura, a metodologia usada resultou da combinação de inspeção visual, transiluminação e dissecação dos tecidos (Figura 4). A utilização do processo de transiluminação na observação dos dois lotes de bacalhau permitiu identificar um número médio de larvas significativamente maior ( $P < 0,5$ ) nas amostras de bacalhau demolido ultracongelado. Este facto, presume-se que esteja relacionado com o processo tecnológico usado. A ultracongelação preserva as estruturas morfológicas dos parasitas e não



**Figura 4 – (A)** Posta de bacalhau demolido ultracongelado. (→) Larva de *Pseudoterranova* spp. observável por inspeção visual (Original).



**Figura 4 – (B)** Ampliação da imagem anterior. (→) Presença de uma zona de contraste mais escuro no canto inferior direito (Original).



**Figura 4 – (C)** (→) Através do exame destrutivo foi possível remover uma larva L3 de anisacídeo, enquistada no músculo (Original).



**Figura 4 – (D)** Larvas L3 de anisacídeos removidas do músculo e desencapsuladas (Original).

ocorrendo a desidratação dos tecidos pela salga e seca, o músculo não escurece, permitindo melhor visualização das larvas por contraste.

A identificação das formas larvares dos anisacídeos através dos caracteres morfológicos coloca alguns obstáculos, que também se devem à semelhança entre as espécies. O recurso a técnicas moleculares, como a PCR (Chen *et al.*, 2008) permitiu verificar que as metodologias com recurso à morfologia eram inad-

quadas para reconhecer "verdadeiras" espécies dentro dos géneros *Anisakis* e *Pseudoterranova*. Os estudos de genética molecular permitiram identificar sete espécies dentro do complexo *A. simplex* e quatro dentro do complexo *P. decipiens*, com estrutura genética, ciclo biológico e distribuição geográfica distintas e grande variedade de hospedeiros (Mattiucci *et al.*, 2002, 2005): *A. simplex* s.s. no Atlântico Norte, *A. simplex* C no Pacífico Norte e águas mais a sul abaixo dos 30° N e *A. pegreffii* no Mar Mediterrâneo (Mattiucci *et al.*, 1997). *A. typica* no Oceano Índico e Mar Mediterrâneo, *A. physeteris* no Oceano Atlântico e Mar Mediterrâneo, *A. brevispiculata* no Atlântico Sudeste e *A. zyphidarum* no Atlântico Sudeste e Mediterrâneo (Mattiucci *et al.*, 2005). Dentro do complexo *P. decipiens*, Paggi *et al.* (2000) identificaram quatro espécies, recorrendo a marcadores genéticos.

Neste estudo, a identificação das formas larvares dos nemátodes baseou-se nos caracteres morfológicos e foi determinada até ao género. Identificaram-se estádios larvares L3 de *A. simplex* s.l. (*sensu lato*) e *P. decipiens* s.l. (*sensu lato*). Nas amostras de bacalhau salgado seco e demolhado ultracongelado, foram removidas formas larvares danificadas, 36,0% e 31,4%, respectivamente, o que para efeito de identificação definitiva, tornaria necessário fazer a sua diferenciação molecular.

A presença de larvas de anisacídeos em bacalhau salgado seco foi anteriormente registada por outros autores. As taxas de ocorrência obtidas nas amostras de bacalhau salgado seco e no bacalhau demolhado ultracongelado foram 92,9% e 100%, respectivamente. No Brasil, foram efectuados três estudos em bacalhau infectado com larvas da família Anisakidae, comercializado em diferentes Estados. Pereira *et al.* (2000) obtiveram uma taxa de infecção de 15,8% em bacalhau do Atlântico, salgado seco e 100% em bacalhau fresco. Prado e Capuano (2006) obtiveram 64% das amostras de bacalhau (porto e zarbo) salgado seco, parasitadas. No estudo efectuado por Maciel (2008) em bacalhau do Pacífico, verificou-se uma taxa de infecção de 71,4%. Em Portugal, num estudo efectuado há doze anos atrás em bacalhau do Atlântico, salgado seco obtiveram-se taxas de infecção de 86,4% e 100% (Ramos, 1998) e os valores agora obtidos neste estudo, assemelham-se aos de então. Porém, a descrição da metodologia usada nos estudos efectuados no Brasil não permite a comparação dos resultados. Importa sobretudo reter, que independentemente da origem do peixe, as larvas de anisacídeos podem estar presentes nos produtos da pesca transformados e comercializados, em qualquer parte do mundo.

Entre as várias espécies de peixes comercializadas como bacalhau, destacam-se o bacalhau do Atlântico, *Gadus morhua* e o bacalhau do Pacífico, *Gadus macrocephalus*. O bacalhau do Atlântico é uma das espécies de peixes comerciais com mais valor e apre-

senta uma fauna parasitária excepcionalmente rica e variada, tendo sido identificadas 107 espécies de parasitas incluindo as larvas de anisacídeos (Hemmingsen e Mackenzie, 2001). Esta diversidade resulta de três características da sua biologia nomeadamente, ter uma dieta omnívora, tolerar baixa salinidade e pela sua abundância e dispersão no Atlântico Norte (Hemmingsen e Mackenzie, 2001). Os anisacídeos, incluindo as larvas de *Anisakis* spp. e *Pseudoterranova* spp. representam a maioria da fauna parasitária do bacalhau, o que pode estar relacionado com o facto de se tratar de um predador voraz, em que os parasitas passam da presa para o predador e a sua longevidade facilita a acumulação das larvas (Hemmingsen e Mackenzie, 2001; Petrie *et al.*, 2007). Os peixes piscívoros como o bacalhau, ao ingerirem as larvas enquistadas, têm um papel importante do ponto de vista epidemiológico e da segurança dos alimentos visto que a transferência repetida de larvas entre os peixes dentro da cadeia alimentar, pode resultar na sua acumulação, especialmente nos peixes maiores e nos mais velhos (Smith e Wooten, 1978). Neste estudo, a ocorrência de *P. decipiens* foi inferior à de *A. simplex*, 61,3% e 45,7% no bacalhau salgado seco e no bacalhau demolhado ultracongelado, respectivamente. A este propósito, Hemmingsen e MacKenzie (2001) referem que apesar do ênfase dado na literatura ao bacalhau como hospedeiro de *P. decipiens*, espécies de peixe béticas não comerciais, terão provavelmente um papel mais importante que o bacalhau, como hospedeiro de *P. decipiens*. Ao longo de grandes períodos de tempo, a variação na intensidade das infecções parasitárias de *A. simplex* e *P. decipiens* no músculo do bacalhau, foi atribuída a alterações na distribuição de cetáceos, seus HD e o aumento de *A. simplex* foi atribuído à variação na dieta do peixe (Hemmingsen e MacKenzie, 2001). Uma vez no peixe hospedeiro, as larvas são envolvidas por tecido conjuntivo, que resulta no encapsulamento do parasita, cuja remoção é necessária para a sua identificação.

Smith e Wooten (1975) demonstraram que a evisceração imediata do peixe no mar diminui a probabilidade de migração *post mortem* das larvas de *Anisakis* para os músculos e que esta ocorre apenas nos peixes gordos. Porém, Silva e Eiras (2003), num estudo efectuado em peixes da Costa portuguesa, verificaram haver migração *post mortem* de parasitas para o músculo do peixe, mas sem relação com o teor lipídico da carne. Neste caso, o peixe foi eviscerado 24 horas após a sua captura e considerou-se que efectuaram "migração" apenas os parasitas que se encontravam enquistados no músculo. Pelo facto de não serem evidentes as causas que determinam a migração *post mortem* de *A. simplex*, o momento em que esta migração ocorre e em que espécies (EFSA, 2010), as 24 horas que mediaram a captura do peixe e a evisceração podem ter interferido nos resultados. A

aquisição apenas de peixe fresco e a sua rápida evisceração para evitar a migração das larvas para o músculo, apontada como medida de prevenção da anisakiase (Ventura *et al.*, 2008) é pois, difícil de avaliar. Nas amostras de bacalhau, observou-se parasitas enquistados no músculo, resultantes de acumulação larvar mas também, a perfurar a serosa peritoneal, pelo que se presume tratar-se da fase inicial da migração muscular. Em qualquer dos casos verificados, a presença de parasitas detectáveis a olho nu é considerada um defeito do bacalhau salgado, verde, semi-seco ou seco (Decreto-Lei n.º 25/2005, artigo 8º, alínea p, de 28 de Janeiro), depreciando o seu valor comercial.

Consideram-se indivíduos em risco de desenvolverem alergia a *A. simplex*, todos os que tenham exposição repetida a alérgenos de *Anisakis* devido aos seus hábitos alimentares e pela elevada prevalência de infecção nalgumas espécies de peixe (Audicana e Kennedy, 2008). De facto, a elevada prevalência de IgE específica a *A. simplex* em Madrid foi associada ao hábito de consumir anchovas cruas (boquerones en vinagre) provenientes de stocks com elevada prevalência de infecção a *A. simplex* (Puente *et al.*, 2008). Um estudo em anchovas levado a cabo por Rello *et al.* (2009) revelou maior prevalência de *Anisakis* no peixe do Atlântico, que de *Hysterothylacium aduncum* e viceversa no peixe do Mediterrâneo, com mais de 55% das larvas de *Anisakis* encontradas no músculo. Noutro estudo epidemiológico dos mesmos autores (Rello *et al.*, 2008), em sardinha da Costa sul e oriental de Espanha, não foram identificadas larvas de *Anisakis* mas sim de *Hysterothylacium aduncum* com uma prevalência de 11,9%. Porém, Silva e Eiras (2003) registaram uma prevalência de *Anisakis* de 28,1% nas sardinhas da Costa Oeste de Portugal. Importa ainda referir que o peixe capturado em áreas com uma população abundante de cetáceos apresenta elevada prevalência de *Anisakis* e pode constituir um enorme risco de anisakiase para o consumidor (Rello *et al.*, 2009). Noutro estudo, Romero *et al.* (2009b) determinaram que a patogenicidade das larvas de *A. simplex* s.s é três vezes maior que a de *A. pegreffii*, espécie predominante no Mediterrâneo. Dada a diferente distribuição das duas espécies nas Costas da Península Ibérica, o consumo de verdinho, capturado no sudeste da península, pressupõe menor risco de anisakiase, dado que *A. pegreffii* é a espécie que predomina nessas águas. De acordo com os dados apontados, o risco de adquirir anisakiase/anisakiase através do consumo de peixe cru ou pouco confeccionado, depende da prevalência da infecção nos produtos da pesca e a sua prevenção depende do conhecimento do grau de risco (zona de captura, prevalência por espécie, localização do parasita no hospedeiro). Acresce o facto de no meio natural, as medidas de prevenção da anisakiase/anisakiase serem difíceis de implementar porque nos animais

marinhos, como o bacalhau, esta parasitose é determinada por múltiplos factores ecológicos e pelos numerosos HD e HI como se referiu, stocks de peixes e áreas de pesca (Valero *et al.*, 2006). Porém, as práticas pesqueiras como a congelação do material resultante da evisceração do peixe após a captura, antes da sua eliminação para o mar, ao garantir a inactivação das larvas de *Anisakis*, previne o aumento da prevalência do parasita nos stocks naturais de peixe (AESAN, 2009).

Devido à crescente popularidade da cozinha japonesa entre os portugueses, aumentaram os restaurantes e *take away* especializados em *sushi* e *sashimi* bem como a sua preparação doméstica. Presume-se que os chefes de cozinha dos restaurantes japoneses sejam conhecedores no reconhecimento de larvas de anisakiídeos, mas essa experiência pode faltar ao público português em geral. A legislação em vigor exige a inspecção visual do peixe, a extracção dos parasitas visíveis e a remoção de peixes fortemente parasitados, dos circuitos comerciais (Regulamento (CE) N.º 853/2004 e 2074/2005). Porém, a inspecção visual não é um método destrutivo e por vezes é realizada de acordo com um plano de amostragem (Regulamento (CE) N.º 2074/2005, Cap. II. 2), o que possibilita que os parasitas presentes nos produtos da pesca possam chegar aos consumidores ou sejam interceptados pelas autoridades, através do sistema de alerta rápido da UE: RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) (Kleter *et al.*, 2009). A possibilidade de larvas de anisakiídeos se encontrarem enquistadas no músculo dos peixes não pode ser descartada, pois devido à complexidade e variação na distribuição dos parasitas, não foram consideradas áreas de pesca isentas de *A. simplex*, devendo os peixes selvagens ser considerados potenciais portadores de parasitas viáveis e assim, com importância na saúde pública, se forem consumidos crus ou praticamente crus (EFSA, 2010). A excepção é o salmão do Atlântico de aquacultura, cuja probabilidade de infecção é negligenciável (EFSA, 2010). No presente trabalho recolheu-se salmão, atum, cherne e cavala, em cru, das refeições japonesas. Embora a legislação comunitária, com o objectivo de prevenir e controlar a transmissão dos parasitas não tremátodes ao homem, através dos produtos da pesca, estabeleça a sua congelação, quando se destinem a ser consumidos em cru (matéria prima ou produto acabado), a temperatura não superior a -20 °C durante, no mínimo, 24 horas ou a -35 °C, no mínimo, 15 horas, em toda as partes do produto (Regulamento (UE) N.º 1276/2011, de 8 de Dezembro), a confecção em casa, das refeições japonesas aumenta a probabilidade de infecção por larvas de anisakiídeos não só pelo desconhecimento do público mas também porque nas habitações, geralmente não se empregam sistemas rápidos de congelação. A eficácia da congelação depende da temperatura e do tempo necessário para alcançar essa temperatura, aspectos a considerar, uma

vez que nos frigoríficos domésticos a temperatura mínima obtida varia em função do número de estrelas dos mesmos. Assim, os frigoríficos de 1 (\*) e 2 (\*\*) estrelas podem atingir uma temperatura mínima de -6 °C e -12 °C, respectivamente. Apenas os frigoríficos de 3 (\*\*\*) estrelas, os frigoríficos congeladores de 4 estrelas \*(\*\*\*), os congeladores verticais e os congeladores tipo arca, atingem temperaturas inferiores a -18 °C (AESAN, 2007). O tratamento térmico que proporciona um nível de protecção idêntico à congelação regulamentada é a congelação a -15 °C durante pelo menos 96 horas, no centro do produto (EFSA, 2010).

Porém, se existirem dados epidemiológicos que indiquem que os pesqueiros de origem não apresentam risco sanitário no que diz respeito à presença de parasitas e se a autoridade competente assim o autorizar, os operadores das empresas do sector alimentar não têm de efectuar o tratamento por congelação regulamentado (Regulamento (UE) N.º 1276/2011). Este peixe poderia ser preferencialmente escolhido pelos consumidores, se o objectivo fosse o consumo em cru ou praticamente cru (Rello *et al.*, 2009), visto que na União Europeia é obrigatório declarar a origem do peixe no posto de venda (Decreto-Lei n.º 243/2003, Artigo 3.º-A, Ponto 1, alínea c). O entrave a esta opção é que os países da UE importam peixe de países terceiros, pelo que esta medida exigiria uma acção coordenada de todos os países, o que pela dimensão e complexidade do estudo a desenvolver, se revelaria pouco exequível. Em Portugal, os dados epidemiológicos disponíveis, não provêm de um sistema de monitorização mas sim, de estudos parasitológicos pontuais, pelo que falta informação sobre o ciclo biológico, distribuição geográfica e sazonal, prevalência, intensidade e localização anatómica dos parasitas com importância em saúde pública, nos produtos da pesca do meio natural, o que permitiria a implementação de medidas que minimizassem a exposição humana aos parasitas. Porém, importa referir que mesmo que estivessem disponíveis dados sobre a prevalência ou abundância das larvas de *A. simplex* nas espécies de peixe de determinada zona de pesca, não seria possível prever a sua presença ou grau de abundância no músculo do peixe (EFSA, 2010).

A completa eliminação de risco de anisakiase/anisakióse pode ser difícil de atingir, uma vez que é impossível evitar que os peixes selvagens (bacalhau, inclusivé) adquiram parasitas durante a vida. Com vista à inviabilização das larvas presentes nos produtos da pesca, a actual legislação (Regulamento (UE) N.º 1276/2011) prevê para além da congelação, o tratamento térmico em que a temperatura interna do produto seja 60 °C ou mais, durante, no mínimo, um minuto. As larvas de *Anisakis* são sensíveis ao calor e podem ser inactivadas quando forem alcançadas temperaturas superiores a 60 °C no centro do produto, durante pelo menos um minuto (EFSA,

2010). Em todos os outros tratamentos (fumagem a frio) em que não se atinjam estas condições de temperatura e tempo, no caso de parasitas não tremátodes, é necessário fazer a congelação prévia (Regulamento (UE) N.º 1276/2011).

Os tratamentos químicos mais vulgarmente utilizados para inactivar as larvas de anisakióse são a salga e a marinada. As larvas de anisakióse são sensíveis ao sal, apenas em certas condições. Quando a concentração de cloreto de sódio, acima de 8-9% for mantida durante pelo menos seis semanas, não é necessário fazer o tratamento térmico regulamentado (AESAN, 2007). Neste estudo, as amostras de bacalhau salgado seco apresentavam teores de cloreto de sódio superiores a 16%, de acordo com o Decreto-Lei n.º 25/2005, Anexo III, ponto 1 e as larvas de anisakióse encontravam-se inviáveis. O vinagre e o sal podem reduzir o risco associado a *A. simplex* mas não o eliminam nem reduzem a um nível aceitável, pelo que muitos métodos tradicionais de marinada não são suficientes para inviabilizar as larvas de anisakióse (EFSA, 2010). De acordo com o Regulamento (UE) N.º 1276/2011, Anexo III, Secção VIII, Cap. III. D. alínea c, os produtos da pesca marinados ou salgados, se o tratamento aplicado for insuficiente para eliminar o parasita viável, devem ser congelados conforme regulamentado. Alguns métodos tradicionais (marinada e fumagem a frio), não inviabilizam as larvas de *A. simplex* e se nestes casos não for aplicada a congelação, cada preparação individual do produto da pesca deve ser optimizada, pois a sobrevivência das larvas depende de factores como o tamanho do peixe, a quantidade de gordura e os ingredientes activos (EFSA, 2010).

Em virtude da inexistência de tratamento farmacológico eficaz para a anisakióse, estudaram-se métodos alternativos. A aplicação de pressão hidrostática elevada (300 MPa durante 5 minutos) em cavala, foi eficaz na inactivação das larvas de anisakióse (Brutti *et al.*, 2010), mas carece de avaliação da sua aplicabilidade no processamento de alimentos. Nos condimentos vegetais usados na cozinha tradicional chinesa, extractos vegetais e óleos essenciais ou seus componentes, incluindo extracto de gengibre, usado como tempero no *sushi* e *sashimi*, tem sido investigada a sua actividade larvicida (Goto *et al.*, 1990), bem como em componentes das folhas da planta aromática *Perilla frutescens* (Hiero *et al.*, 2006), que em condições específicas se mostraram eficazes na inviabilização de *A. simplex* s.l. Noutros ensaios *in vivo* estudou-se a actividade larvicida de derivados monoterpénicos obtidos de óleos essenciais (Hiero *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008). Nas plantas tradicionais do Mediterrâneo, menta, camomila e manjerição, apenas esta última revelou algum interesse na inviabilização de larvas de *A. simplex* tipo I (Romero *et al.*, 2009a).

A anisakióse gastroalérgica e a alergia a *A. simplex*



são duas síndromes clínicas distintas, em que na primeira é necessária a presença de uma larva viva e na segunda, é condição a exposição prévia a uma larva viva e o desenvolvimento de infecção parasitária aguda, com sensibilização do indivíduo. É a prevenção destas síndromes que está subjacente à avaliação dos factores de risco inerentes à mudança de hábitos alimentares dos portugueses, avaliados neste estudo. Com vista a evitar a sensibilização a *A. simplex* é importante o reconhecimento das larvas de anisacídeos e o cumprimento da legislação referente ao tratamento térmico (congelamento e calor) do peixe que se destina a ser consumido cru (*sushi* e *sashimi*), ainda que esta recomendação não seja completamente válida porque não leva à total inactivação das proteínas alergénicas (Audicana *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2008), considerando a termostabilidade do alergénio Ani s 4 (Moneo *et al.*, 2007), detectado após a inviabilização da larva a  $94 \pm 1$  °C durante 3 minutos (Vidacek *et al.*, 2010). Uma vez que alergénios como Ani s 1 e Ani s 4 são altamente resistentes ao calor e à congelamento (Moneo *et al.*, 2000, 2005 e 2007; Falcão *et al.*, 2008), a ingestão de parasitas mortos no peixe após confecção ou em conservas, também pode causar reacção alérgica (Audicana *et al.*, 2002). Para além disso, os alergénios de *A. simplex* também podem estar presentes no músculo do peixe em áreas próximas da larva ou onde a larva intacta já não está presente (Audicana e Kennedy, 2008). Solas *et al.*, (2008) detectaram antigénios de *A. simplex* e o alergénio Ani s 4 em áreas próximas da larva L3, no músculo do peixe infectado, o que indica que os antigénios do parasita e os seus alergénios E/S estão dispersos no músculo e podem causar alergia em alguns indivíduos sensíveis a *A. simplex*, mesmo que a larva não seja ingerida. As amostras de bacalhau estudadas apresentavam larvas de anisacídeos inviabilizadas por congelamento ou salga. Se a ingestão de larvas de *A. simplex* pode causar alergia em consumidores sensibilizados a *A. simplex*, ainda que o peixe parasitado seja consumido bem cozinhado e após congelamento, nas condições recomendadas para matar as larvas e evitar a anisaciose (Vidacek *et al.*, 2009) então, a apetência culinária por peixe cru pode representar um importante factor de risco para a transmissão da larva viva e consequentemente, para a sensibilização por IgE. Uma vez sensibilizado, o consumidor de bacalhau parasitado poderá estar em risco de manifestar alergia, quer pela ingestão das larvas inviáveis quer pela ingestão dos tecidos próximos destas (posta).

Com a mudança de hábitos alimentares dos portugueses, a intervenção não passa pelo aumento da fiscalização durante a inspecção dos produtos da pesca ou pela implementação de legislação destinada a alimentos preparados com peixe cru. Uma medida simples e eficaz consiste na promoção de acções de formação do público em geral, acerca do risco de

infecção a *A. simplex* associado ao consumo de peixe cru ou pouco cozinhado e generalizar o reconhecimento das larvas de anisacídeos, sobretudo em peixe fresco. No produto da pesca embalado refrigerado usado na confecção de pratos de peixe em cru, a indicação de congelamento prévia ao seu consumo em cru ou praticamente cru, poderá de igual forma contribuir para a prevenção da infecção. Ambas as medidas podem ser importantes na prevenção da infecção por *A. simplex* e assim, diminuir o risco de sensibilização associada ao consumo de produtos da pesca parasitados, como eventualmente, as amostras de bacalhau analisadas.

## Agradecimentos

A Graça Pita, Augusta Moledo, Leonor Cavalinhos e Constança Pasadas pelo apoio prestado na execução laboratorial deste estudo e a Manuela Oliveira pela análise estatística dos dados.

Aos Professores Doutores Fernando Bernardo e Isabel Pereira da Fonseca, pela revisão crítica do trabalho.

## Bibliografia

- AESAN (2007). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de *Anisakis*. Revista del Comité Científico de la AESAN, 6, 59-65.
- AESAN (2009). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Incidencia de la eliminación del pescado o partes del mismo en relación con la reducción de la prevalencia de la anisaciosis humana. Revista del Comité Científico de la AESAN, 10, 19-25.
- Armentia A, Lombardero M, Callejo A, Martín Santos JM, Martín Gil FJ, Vega J, Arranz ML e Martínez C (1998). Occupational asthma by *Anisakis simplex*. J Allergy Clin Immunol, 102, 831-834.
- Añíbarro B e Seoane FJ (1998). Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*. J Allergy Clin Immunol, 102, 331-332.
- Arias-Díaz J, Zuloaga J, Vara E, Balibrea J e Balibrea JL (2006). Efficacy of albendazole against *Anisakis simplex* *in vitro*. Digestive and Liver Disease, 38, 24-26.
- Audicana MT, Fernández de Corres L, Muñoz D, Fernández E, Navarro JA e Pozo MD (1995). Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish. J Allergy Clin Immunol, 96, 558-560.
- Audicana MT, Ansotegui IJ, de Corres LF e Kennedy MW (2002). *Anisakis simplex*: dangerous – dead and alive? Trends Parasitol, 18, 20-25.
- Audicana MT e Kennedy MW (2008). *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. Clin Microbiol Rev, 2, 360-379.
- Berland B (1961). Nematodes from some Norwegian marine fishes. Sarsia, 2, 1-50.
- Borges SASLG (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. Tese de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.
- Brutti A, Rovere P, Cavallero S, D'Amelio S, Danesi P e Arcangeli G (2010). Inactivation of *Anisakis simplex* larvae in raw fish using high hydrostatic pressure treatments. *Food Control*, 21, 331-333.
- Caballero ML, Umpierrez A, Moneo I e Rodríguez-Perez R (2011). Ani s 10, a new *Anisakis simplex* allergen: Cloning and heterologous expresión. *Parasitology Internacional*, 60, 209-212.
- Chen Q, Yu HQ, Lun ZR, Chen XG, Song HQ, Lin RQ e Zhu XQ (2008). Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodes with zoonotic potential. *Parasitol Res*, 104, 79-84.
- Costa G, Pontes T, Mattiucci S e 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. *J Helminthol*, 77, 163-166.
- Costa G, Madeira A, Pontes T e D'Amélio S (2004). Anisakid nematodes of the blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, from Madeiran waters, Portugal. *Acta Parasitol*, 49, 156-161.
- Cruz C, Vaz A e Saraiva A (2005). Larval anisakids from horse mackerel in Portugal. *Helminthologia*, 42, 3-7.
- Cruz C, Barbosa C e Saraiva A (2007). Distribution of larval anisakids in blue whiting off Portuguese fish market. *Helminthologia*, 44, 21-24.
- Cruz C, Saraiva A, Santos MJ, Eiras JC, Ventura C, Soares JP e Hermida M (2009). Parasitic infection levels by *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) in the black scabbardfish *Aphanopus carbo* (Osteichthyes: Trichiuridae) from Portuguese waters. *Scientia Marina*, 73S2, 115-120.
- Cuende E, Audicana MT, Garcia M, Anda M, Fernandez Corres L, Jimenez C e Vesga JC (1998). Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. *Clin Exp Rheumatol*, 16, 303-304.
- Daschner A, Alonso-Gómez A, Mora C, Moreno-Ancillo R, Villanueva R e López-Serrano MC (1997). Anisakiasis gastro-alérgica con parasitación masiva. *Rev Esp Alergol Immunol Clín*, 12, 370-372.
- Daschner A, Alonso-Gómez A, Cabañas R, Suarez-de-Parga ML e López-Serrano M-C (2000). Gastroallergic anisakiasis: Bordline between food allergy and parasitic disease-Clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol*, 105, 176-181.
- Del Rey Moreno A, Valero A, Mayorga C, Gómez B, Torres MJ, Hernández J, Ortiz M e Maldonado JL (2006). Sensitization to *Anisakis simplex* s.l. in a healthy population. *Acta Tropica*, 97, 265-269.
- EFSA (2010). Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*, 8, 1543. (91pp).
- Espiñeira M, Herrero B, Vieites JM e Santaclara FJ (2010). Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR-RFLP of ITS-1 region. *Food Control*, 21, 1051-1060.
- Falcão H, Lunet N, Neves E, Iglésias I e Barros H (2008). *Anisakis simplex* as a risk factor for relapsing acute urticária: a case control study. *J Epidemiol. Community Health*, 62, 634-637.
- Foti C, Nettis E, Cassano N, Mundo I e Vena G (2002). Acute Allergic Reactions to *Anisakis simplex* after Ingestion of Anchovies. *Acta Derm Venereol*, 82, 121-123.
- Goto C, Kasuya S, Koga K, Ohtomo H e Kagei N (1990). Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in *Anisakis* larvae in vitro. *Parasitol Res*, 76, 653-656.
- Gómez Sáenz JT, Gérez Callejas MJ, Zangróniz Uruñuela MR, Muro Ovejas E, González JJ e García Palacios MJ (1999). Reacciones de hipersensibilidad y manifestaciones digestivas producidas pela ingestión de pescado parasitado por *Anisakis simplex*. *Semerger*, 25, 792-797.
- Heia K, Sivertsen AH, Stormo SK, Elvevoll E, Wold JP e Nilssen H (2007). Detection of nematodes in cod (*Gadus morhua*) fillets by Imaging Spectroscopy. *J Food Sci*, 72, 11-15.
- Hemmingsen W e MacKenzie K (2001). The parasite fauna of the Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Adv Mar Biol*, 40, 1-80.
- Hierro I, Valero A e Navarro MC (2006). *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomedicine*, 13, 527-531.
- Karl M e Leinmann M (1993). A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products. *Arsh Lebensmittelhyg*, 44, 105-128.
- Kassai T, Cordero del Campillo M, Euzeby J, Gaafar S, Hiepe Th e Himonas CA (1988). Standardized nomenclature of animal parasite diseases (SNOAPAD). *Vet Parasitol*, 29, 299-326.
- Kleter GA, Prandini A, Filippi L e Marvin HJP (2009). Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by European Community's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) during a four-year period. *Food Chem Toxicol*, 47, 932-950.
- Kobayashi Y, Ohsaki K, Ikeda K, Kakemoto S, Ishizaki S, Shimakura, K, Nagashima Y e Shiomi K (2012). Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitology International*, 60, 144-150.
- Køie M, Berland B e Burt MDB (1995). Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can J Fish Aquat Sci*, 52(Suppl. 1), 134-139.
- Levsen A, Lunestad BT e Berland B (2005). Low Detection Efficiency of Candling as a Commonly Recommended Inspection Method for Nematode Larvae in the Flesh of Pelagic Fish. *J Food Prot*, 68, 828-832.
- Maciel PB (2008). Ocorrência de larvas de parasitas da família Anisakidae em bacalhau (*Gadus macrocephalus*) comercializado em Florianópolis, SC. Trabalho monográfico de conclusão do Curso de Pós-Graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Universidade Castelo Branco. 40p.

- Mattiucci S, Nascetti G, Cianchi R, Paggi L, Arduino P, Margolis L, Bratney J, Webb S, D'Amelio S, Orecchia P e Buillini L (1997). Genetic and Ecological Data on the *Anisakis simplex* Complex, with Evidence for a New Species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). The Journal of Parasitology, 83, 401-416.
- Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Portes Santos C, Costa G, Di Benedetto AP, Ramos R, Argyrou M, Cianchi R e Bullini L (2002). Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardi, 1845 (Nematoda: Anisakidae). Syst Parasitol, 51, 159-170.
- Mattiucci S, Nascetti G, Dailey M, Webb SC, Barros NB, Cianchi R e Bullini L (2005). Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). Syst Parasitol, 61, 157-171.
- Moneo I, Caballero M-L, Gómez F, Ortega E e Alonso MJ (2000). Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. J Allergy Immunol, 106, 177-182.
- Moneo I, Caballero M-L, González-Muñoz M, Rodríguez-Mahillo A-I; Rodríguez-Perez R e Silva A (2005). Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. Parasitol Res, 96, 285-289.
- Moneo I, Caballero M-L, Rodríguez-Perez R, Rodríguez-Mahillo A-I, González-Muñoz M (2007). Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. Parasitol Res, 101, 1051-1055.
- Navarro MC, Noguera MA, Romero MC, Montilla MP, González de Selgas JM e Valero A (2008). *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpenic derivatives of natural origin against L3 larvae *in vitro* and *in vivo*. Exp Parasitol, 120, 295-299.
- Nieuwenhuizen N, Lopata AL, Jeebhay F, Herbert BR, Robins TG e Brombacher F (2006). Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. J Allergy Clin Immunol, 117, 1098-1105.
- Nunes C, Ladeira S e Mergulhão A (2003). Alergia ao *Anisakis simplex* na população portuguesa. Revista Portuguesa de Imunoalergologia, XI, 30-40.
- Paggi L, Mattiucci S, Gibson DI, Berland B, Nascetti G, Cianchi R e Bullini L (2000). Pseudoterranova decipiens species A and B (Nematoda, Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. Syst Parasitol, 45, 185-197.
- Pereira AD, Atui MB, Torres DMAGV, Mangini ACS e Zamboni CQ (2000). Incidência de parasitos da família Anisakidae em bacalhau (*Gadus morhua*) comercializado no Estado de São Paulo. Rev Ins. Adolfo Lutz, 59, 45-49.
- Petrie A, Wooten R, Bruno D, MacKenzie K e 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. 121p.
- Prado SPT e Capuano DM (2006). Relato de nematóides da família Anisakidae em bacalhau comercializado em Ribeirão Preto, SP. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39(6), 580-581.
- Puente P, Anadón AM, Rodero M, Romarís F, Ubeira FM e Cuéllar C (2008). *Anisakis simplex*: The high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. Exp Parasitol, 118, 271-274.
- Ramos P (1998). *Anisakis* sp.: Um risco para a Saúde Pública? Veterinária Técnica, 3, 30-41.
- Rello FJ, Adroher FJ e Valero A (2008). *Hysterothylacium aduncum*, the only anisakid parasite of sardine (*Sardina pilchardus*) from the southern and eastern coasts of Spain. Parasitol Res, 104, 117-121.
- Rello FJ, Adroher FJ, Benítez R, Valero A (2009). The fishing area as a possible indicator of the infection by anisakids in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) from southwestern Europe. Int J Food Microbiol, 129, 277-281.
- Rodríguez-Perez R, Moneo I, Rodríguez-Mahillo A e Caballero ML (2008). Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. Mol Biochem Parasitol, 159, 92-97.
- Romero MC, Abatony N, Valero A, Martín-Sánchez J, Lozano J e Navarro MC (2009a). Actividad Larvicida de las Infusiones y Aceites Esenciales e Menta (*Mentha piperita*), Manzanilla (*Chamomilla recutita*) y Albahaca (*Ocimum basilicum*) frente a L3 de *Anisakis* tipo I. Acta Parasitol Port, 16, 126-127.
- Romero MC, Valero A, Hierro I e Martín-Sánchez J (2009b). Diferencias de patogenicidad entre *Anisakis simplex* s.s. y *Anisakis pegreffii*. Acta Parasitol Port, 16, 424-425.
- Saraiva A, Cruz C, Santos M.J e Ferreira S (2000). Nematode Parasites from Digestive Tracto of Conger conger L. from the Northwest Coast of the Iberian Peninsula. Bull Eur Ass Fish Pathol, 20, 163-166.
- Scala E, Giani M, Pirrotta L, Guerra EC, Cadoni S, Girardelli CR, De Pita O e Puddu P (2001). Occupational generalised urticaria and allergic airborne asthma due to *Anisakis simplex*. Eur J Dermatol, 11, 249-50.
- Silva MER e Eiras JC (2003). Occurrence of *Anisakis* sp. in fishes off the Portuguese West coast and evaluation of its zoonotic potential. Bull Eur Ass Fish Pathol, 23, 13-17.
- Smith JW e Wooten R (1975). Experimental studies on the migration of *Anisakis* sp. Larvae (Nematoda: Ascaridida) into the flesh of herring, *Clupea harengus* L. Int J Parasitol, 5, 133-136.
- Solas MT, Garcia ML, Rodríguez-Mahillo AL, Gonzalez-Munoz M, Heras C e Tejada M. (2008). *Anisakis* antigens detected in fish muscle infested with *Anisakis simplex* L3. J Food Prot, 71, 1273-6.
- Valero A, López-Cuello MM, Benítez R e Adroher F (2006). *Anisakis* spp. In European hake, *Merluccius merluccius* (L.) from the Atlantic off north-west Africa and Mediterranean off southern Spain. Acta Parasitologica, 51, 209-212.
- Ventura MT, Tummolo RA, Leo E, D' Erasmo M e Arsieni A (2008). Immediate and Cell-Mediated Reactions in Parasitic Infections by *Anisakis simplex*. J Investig Allergol Clin Immunol, 18, 253-259.
- Vidacek S, Heras C, Solas MT, Mendizábal A, Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M e Tejada M (2009). *Anisakis simplex* allergens remain active after conventional or microwave heating and pepsin treatments of chilled and frozen L3 larvae. J Sci Food Agric, 89, 1997-2002.
- Vidacek S, Heras C, Solas MT, Solas MT, Mendizábal A, Rodríguez-Mahillo AI e Tejada M (2010). Antigenicity and viability of *Anisakis* larvae infesting hake heated at different time-temperature conditions. J Food Prot, 73, 62-68.