

# Diagnóstico morfológico e molecular de larvas de *Anisakis typica* e *Anisakis brevispiculata* em peixes do litoral do Rio de Janeiro\*

Carla Juliete dos Reis Sardella<sup>1</sup> e José Luis Luque<sup>2+</sup>

**ABSTRACT.** Sardella C.J. & Luque J.L. [Morphological and molecular diagnostic of *Anisakis typica* and *Anisakis brevispiculata* of southeastern coast of Brazil.] Diagnóstico morfológico e molecular de larvas de *Anisakis typica* e *Anisakis brevispiculata* em peixes do litoral do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 38(Supl. 3):124-130, 2016. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Anexo 1, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, 23890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. E-mail: luqueufrj@gmail.com

The nematodes of the family Anisakidae Skrjabin and Karokhin, 1945 are parasites of aquatic organisms, e.g. fishes, marine mammals and piscivorous birds, being distributed throughout the world. Their larvae are of major importance in the industry of fisheries, since they are known as etiological agents of the human anisakiasis, which occurs through the ingestion of live larvae in raw or poorly cooked seafood. The aim of the present study was to characterize the larvae of *Anisakis* spp. infecting Brazilian sandperch *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829, Frigate tuna *Auxis thazard* Lacépède, 1800 (fish of commercial importance) and Silvery John dory *Zenopsis conchifer* Lowe, 1852 in coast of the State of Rio de Janeiro, Brazil, using morphological and molecular approaches. Thirty fish of the species *P. brasilianus* (Pinguipedidae), 02 of *A. thazard* (Scombridae) and 10 of *Z. conchifer* (Zeidae) were analyzed, being collected a total of 04 larvae of *Anisakis* spp. through the molecular analyzes using mitochondrial and ribosomal DNA sequences and morphological studies, the species *Anisakis typica* Diesing, 1860 and *Anisakis brevispiculata* Dollfus, 1966 were confirmed. *Zenopsis conchifer* represents a new host record for *A. typica*, and *A. brevispiculata* was reported for the first time in Brazilian waters.

**KEYWORDS.** *Anisakis*, DNA, Anisakiasis, Fishes, southeastern coast, Brazil.

**RESUMO.** Os nematoides da família Anisakidae Skrjabin e Karokhin, 1945 são parasitos de organismos aquáticos, como peixes, mamíferos marinhos e aves piscívoras sendo distribuídos em grande parte do mundo. Suas larvas são um grande problema para a indústria pesqueira, uma vez que estas são agentes causadores de anisiquiase humana, a qual ocorre através da ingestão de larvas presentes em frutos do mar crus ou mal-cozidos. O objetivo deste estudo foi caracterizar as larvas de *Anisakis* spp.

parasitando os hospedeiros Michole-quati *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829, Dourado-cachorro *Auxis thazard* Lacépède, 1800 (peixes de importância comercial) e Galo de fundo *Zenopsis conchifer* Lowe, 1852, no litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, utilizando ferramentas morfológicas e moleculares. Foram analisados 30 peixes da espécie *P. brasilianus* (Pinguipedidae), 02 de *A. thazard* (Scombridae) e 10 de *Z. conchifer* (Zeidae), sendo coletadas um total de 04 larvas de *Anisakis* spp. Baseado

\*Recebido em 21 de julho de 2016.

Aceito para publicação em 17 de novembro de 2016.

<sup>1</sup> Bióloga, MSc. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Anexo 1, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.

<sup>2</sup> Biólogo, PhD. Departamento de Parasitologia Animal, Anexo 1, IV, UFRRJ. BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. +Autor para correspondência. E-mail: luqueufrj@gmail.com - bolsista do CNPq.

nas análises moleculares utilizando sequências de DNA mitocondrial e ribossomal, bem como nos dados morfológicos, foram identificadas as espécies *Anisakis typica* Diesing, 1860 e *Anisakis brevispiculata* Dollfus, 1966. *Zenopsis conchifer* representa um novo registro de hospedeiro para *A. typica*, e este é o primeiro registro da larva de *A. brevispiculata* em águas costeiras do Brasil.

PALAVRAS CHAVE. *Anisakis*, DNA, anisiquiase, pescado, costa sudeste, Brasil

## INTRODUÇÃO

Os nematoides da família Anisakidae Skrjabin e Karokhin, 1945 são parasitos de organismos aquáticos, como peixes, mamíferos marinhos e aves piscívoras e são distribuídos em grande parte do mundo (Anderson 2000).

Larvas de anisiquídeos são comuns em diversas espécies de peixes marinhos no litoral do Rio de Janeiro (Luque & Poulin 2004). As larvas destes nematoides são um grande problema para a indústria de pesca comercial (Abollo et al. 2001), sendo conhecidas como agentes etiológicos da anisiquiase humana, a qual ocorre através da ingestão de larvas de terceiro estágio (L3), por isso, esses parasitos são motivo de grande preocupação em saúde pública, devido ao crescente consumo de frutos do mar crus ou mal cozidos (Audicana & Kennedy 2008, Koinari et al. 2013). Nesse caso, o homem atua como hospedeiro acidental, e as larvas não completam seu desenvolvimento, mas podem penetrar o trato digestório e invadir os órgãos anexos, provocando uma série de efeitos patológicos (Saad & Luque 2009).

Este estudo abordou três hospedeiros: Michole-quati *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829 (Perciformes: Pinguipedidae), Dourado-cachorro *Auxis thazard* Lacépède, 1800 (Perciformes: Scombridae) e Galo de fundo *Zenopsis conchifer* Lowe, 1852 (Zeiformes: Zeidae). *Pinguipes brasilianus* apresenta sua localização limitada à costa Atlântica Brasileira e Argentina, são encontrados em águas relativamente profundas, alimentando-se principalmente de crustáceos e outros invertebrados, sua carne é considerada de excelente qualidade (Szpilman 2000). Pantoja et al. (2015) e Timi et al. (2010) relataram a presença de larvas de *Anisakis typica* e larvas de *A. simplex* respectivamente para este hospedeiro.

*Auxis thazard* é encontrado em toda a costa brasileira, sendo predadores oportunistas alimentando-se de peixes pelágicos, lulas, crustáceos e outros invertebrados, sua carne é considerada excelente e tem grande valor comercial (Szpilman 2000). Iñi-

guez et al. (2009) relataram a presença de *A. typica* e *A. physeteris* para este hospedeiro.

A espécie *Z. conchifer* é encontrada na Indonésia migrando para o Atlântico oeste, podendo viver sozinha ou em pequenos cardumes nadando lentamente no fundo do mar. É caracterizada por ser predadora de zooplâncton enquanto jovens e se alimentar de pequenas lulas e peixes quando adultos (Martins & Schwingel 2012). Nenhuma larva de *Anisakis* spp. foi registrada para este hospedeiro.

O objetivo deste estudo foi diagnosticar larvas de *Anisakis* spp. parasitando *P. brasilianus*, *A. thazard* e *Z. conchifer* através de abordagens morfológicas e moleculares.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, os métodos utilizados para identificação foram microscopia de luz complementada com análise de sequência de espaçadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) e 5.8 de DNA ribossômico e a subunidade II do citocromo c-oxidase mitocondrial (COX2).

Um total de 42 espécimes de peixes foram necropsiados a procura de nematoides: 30 de *P. brasilianus*, 2 de *A. thazard* e 10 de *Z. conchifer*.

### Coleta, processamento e estudo morfológico

Os peixes foram capturados entre julho de 2015 e junho de 2016 nas águas da costa de Cabo Frio, Estado do Rio de Janeiro, Brasil (22° 52' 43.26" S, 42° 1' 11.55" W). Após a obtenção dos hospedeiros, os mesmos foram acondicionados imediatamente em caixas térmicas contendo gelo, para assegurar boas condições morfológicas dos parasitos e para protegê-los durante o transporte até o Laboratório de Parasitologia de Peixes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) onde foram examinados. A identificação dos hospedeiros foi realizada de acordo com Menezes e Figueiredo (1980, 1985).

Todos os peixes foram pesados, medidos e subsequentemente necropsiados. Após o descongelamento dos hospedeiros, eles foram necropsiados através de uma incisão ventral desde a abertura anal até a linha do opérculo, expondo a cavidade corporal. Todos os órgãos internos (esôfago, estômago, cecos e intestino) foram individualizados e colocados em placas de Petri, contendo solução salina (NaCl 0,65%), e posteriormente examinados com auxílio de um microscópio estereoscópico para coleta dos parasitos. Os nematoides coletados foram cortados em 3 partes, anterior, mediana e posterior com o auxílio de um bisturi estéril. Para estudos morfológicos, as partes anterior e posterior de cada espécime foram fixadas em formalina 5% durante 48 horas e depois transferidas para etanol a 70%. As partes anterior e posterior de cada parasito foram colocadas entre lâmina e lamínula e clarificados com lactofenol de Amann. As partes medianas foram fixadas em etanol a 80% para os procedimentos moleculares. A identificação morfológica e a terminologia utilizada segue Anderson et al. (2009). Os desenhos foram confeccionados com au-

xílio de um tubo de desenho, acoplado ao microscópio Olympus BX53. As medidas dos parasitos foram feitas através do sistema de digitalização de imagens com o software CellR & CellRImaging Life Science Microscopy acoplado ao microscópio Olympus BX51.

As larvas encontradas foram depositadas na Coleção Helmintológica do Instituto Oswaldo Cruz (CHIOC), Rio de Janeiro, Brasil.

### Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado utilizando o protocolo fenol/clorofórmio de Billings et al. (1998). A amostra foi lavada duas vezes com água ultrapura e em seguida foram adicionados 200 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de tampão de digestão e incubado por 30 minutos a uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de proteínaase K e a amostra foi incubada a  $55^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de fenol e em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm durante 2 minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado e transferido para um microtubo novo estéril. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de fenol e 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio/álcool isoamílico e as amostras foram centrifugadas novamente à 14000rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi retirado e esse passo foi repetido mais uma vez. Foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  de etanol 100% e em seguida a amostra foi centrifugada a 14000rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi lavado com 400  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, logo após foi centrifugado durante 15 minutos. Após esta etapa o etanol foi descartado. O pellet foi deixado para secar durante 5 minutos e o DNA foi ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. O DNA extraído foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### Reações em cadeia de polimerase (PCR) das regiões intergênicas (ITS 1, 5.8S e ITS 2) do DNA ribossomal (rDNA)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para ITS 1, 5.8S e ITS 2 rDNA utilizou os oligonucleotídeos iniciadores NC5 (Forward: GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT) e NC2 (Reverse: TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT) desenvolvidos por Zhu et al. (1998). O volume final da reação foi de 25  $\mu\text{L}$ , sendo 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de reação (10X), 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50mM), 2,5  $\mu\text{L}$  de dNTP's (2,5mM), 2,5  $\mu\text{L}$  de primers (10mM), 1 unidade de Taq DNA polimerase (5 unidades por 1 microlitro), 13,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  e 2,5  $\mu\text{L}$  de DNA extraído. As amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) e submetidas às seguintes condições: desnaturação  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundo, seguido de 30 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, anelamento  $55^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, extensão  $72^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e extensão final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.

### Reações em cadeia da polimerase (PCR) da região codificante da subunidade II da citocromo oxidase (Cox-2 mtDNA)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) da região Cox2 mtDNA foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 211 (Forward: TTTTCTAGTTATATATAGAT-

TGRTTTYAT) e 210 (Reverse: CACCAACTCTTAAAATTATC) desenvolvidos por Nadler e Hudspeth (2000). O volume final da reação foi de 25  $\mu\text{L}$ , sendo 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de reação (10X), 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50mM), 2  $\mu\text{L}$  de dNTP's (2,5mM), 4  $\mu\text{L}$  de primers (10mM), 2 unidades de Taq DNA polimerase (5 unidades por 1  $\mu\text{L}$ ), 12,1  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  e 2  $\mu\text{L}$  de DNA extraído. As amostras foram colocadas no termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) e submetidas às seguintes condições: desnaturação  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundo, seguido de 34 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, anelamento  $46^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos, extensão  $72^{\circ}\text{C}$  por 90 segundos e extensão final de  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

### Sequenciamento

Os produtos da PCR foram visualizados com brometo de Etídio em géis de agarose a 1,5%. Os produtos amplificados foram purificados com Exo-SAP-IT seguindo as instruções do fabricante, seqüenciados através do método de Sanger utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores das reações de PCR e o kit de reação de sequenciamento Cycle Sequencing Cycle de ABI PRISM BigDye em um seqüenciador MegaBACE.

As seqüências contíguas obtidas foram montadas no programa Geneious (Geneious Ver. 9 criado por Biomatters, disponível a partir de <http://www.geneious.com/>) e depositadas na base de dados do GenBank, com os números de acesso para ITS: KY352229 (*Z. conchifer*), KY352230 (*A. thazard*), KY352231 (*A. brevispiculata*) e para COX: KY421192 (*Z. conchifer*), KY421193 (*A. thazard*), KY421194 (*A. brevispiculata*).

### Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram baseadas no alinhamento das sequencias do ITS1-5.8S-ITS2 DNAr e do Cox2 DNAm. Foram utilizadas todas as sequencias de espécies de *Anisakis* presentes na base de dados do GenBank, além das obtidas no presente estudo. A Inferência Bayesiana (IB) foi utilizada para gerar a árvore filogenética, através do modelo evolutivo GTR+I+G, o qual foi escolhido com auxílio do programa jModel (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba et al., 2012). O suporte nodal, representado pela probabilidade posterior da IB, foi determinado após a execução das cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC), 2 execuções, 4 cadeias, por  $4 \times 10^6$  gerações, com frequência de amostragem a cada  $4 \times 10^3$  gerações, descartando-se o primeiro  $\frac{1}{4}$  ( $1 \times 10^6$ ) de árvores amostradas. *Ascaris lumbricoides* foi escolhido como grupo externo, com base em estudos filogenéticos anteriores de Anisakidae (Pantoja et al. 2015).

## RESULTADOS

### Descrição morfológica

**Família** Anisakidae Skrjabin e Karokhin, 1945

**Gênero** *Anisakis* Dujardin, 1845

**Espécie** *Anisakis brevispiculata* Dollfus, 1966

### Descrição [Baseada em 1 espécime coletado em *P. brasilianus*]

Nematoides esbranquiçados. Larvas de terceiro

estádio. Largura do corpo 0,347 mm. Extremidade anterior com lábio dorsal e dois lábios ventrolaterais pouco desenvolvidos. Dente larval próximo à abertura oral (Figura 1C). Anel nervoso próximo a extremidade cefálica, 0,156 mm da extremidade anterior (Figura 1C). Poro excretor lateral, localizado logo abaixo dos lábios ventrolaterais (Figura 1C). Esôfago 1,455 mm de comprimento. Ventrículo 0,405 mm de comprimento, bem desenvolvido (Figura 1C). Cauda com formato cônico, arredondada medindo 0,104 mm de comprimento, desprovida de mucron terminal. Presença de 2 glândulas retais esféricas (Figura 1D).

Hospedeiro: Michole - quati *Pinguipes brasiliensis* Cuvier, 1829 (Perciformes: Pinguipedidae)

Localidade: Cabo Frio, Costa do Rio de Janeiro, Brasil (22° 52' 43.26" S, 42° 1' 11.55" W)

Local de infecção: Estômago

Intensidade de infecção: 1 parasito em 1 peixe infectado

Prevalência: 3,3%

Número de depósito: CHIOC 38380

### *Anisakis typica* Diesing, 1860

**Descrição [Baseada em 3 espécimes 1 coletado em *Z. conchifer* e 2 coletados em *A. thazard*]**

Nematoides esbranquiçados. Larvas de terceiro estágio. Largura do corpo 0,215-0,253 mm. Extremidade anterior com lábio dorsal e dois lábios ventrolaterais pouco desenvolvidos. Dente larval próximo à abertura oral (Figura 1A). Anel nervoso próximo a extremidade cefálica, 0,127-0,136 mm da extremidade anterior (Figura 1A). Poro excretor lateral, localizado logo abaixo dos lábios ventrolaterais (Figura 1A). Esôfago 1,120-1,681 mm de comprimento. Ventrículo 0,442-0,488 mm de comprimento, bem desenvolvido (Figura 1A). Cauda com formato cônico, arredondada medindo 0,179-0,192 mm de comprimento apresentando mucron terminal. Presença de 4 glândulas retais esféricas (Figura 1B).

Hospedeiros: Galo de fundo *Zenopsis conchifer* Lowe, 1852. (Zeiformes: Zeidae), Dourado-cachorro *Auxis thazard* Lacépède, 1800 (Perciformes: Scombridae)

Localidade: Cabo Frio, Costa do Rio de Janeiro, Brasil (22° 52' 43.26" S, 42° 01' 11.55" W)

Local de infecção: Estômago

Intensidade de infecção: 1 parasito em 1 peixe infectado (*Z. conchifer*); 2 parasitos em 1 peixe infectado (*A. thazard*)

Prevalência: 1% (*Z. conchifer*); 0,1% (*A. thazard*)

Número de depósito: CHIOC 38382 (*Z. conchifer*); CHIOC 38381 (*A. thazard*)

### Descrição genética e filogenia

Neste estudo foram obtidas sequências parciais da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNAr com 827 pares de base (*A. thazard*) e 829 pares de base (*Z. conchifer*) para a espécie de *A. typica* e 773 pares de base (*P. brasiliensis*) para *A. brevispiculata* e do gene COX2 do DNAm com 535 pares de base para *A. typica* e *A. brevispiculata*. As larvas do presente estudo agruparam com adultos da mesma espécie, além de apresentarem alta similaridade com as sequências depositadas no GenBank.

### DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

*Anisakis typica* e *A. brevispiculata* fazem parte do gênero *Anisakis* por apresentarem ventrículo longo e bem desenvolvido, além do poro excretor posicionado próximo ao lábio. Se difere dos demais gêneros de Anisakidae: *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912, *Hysterothylacium* Ward & Magath, 1917,

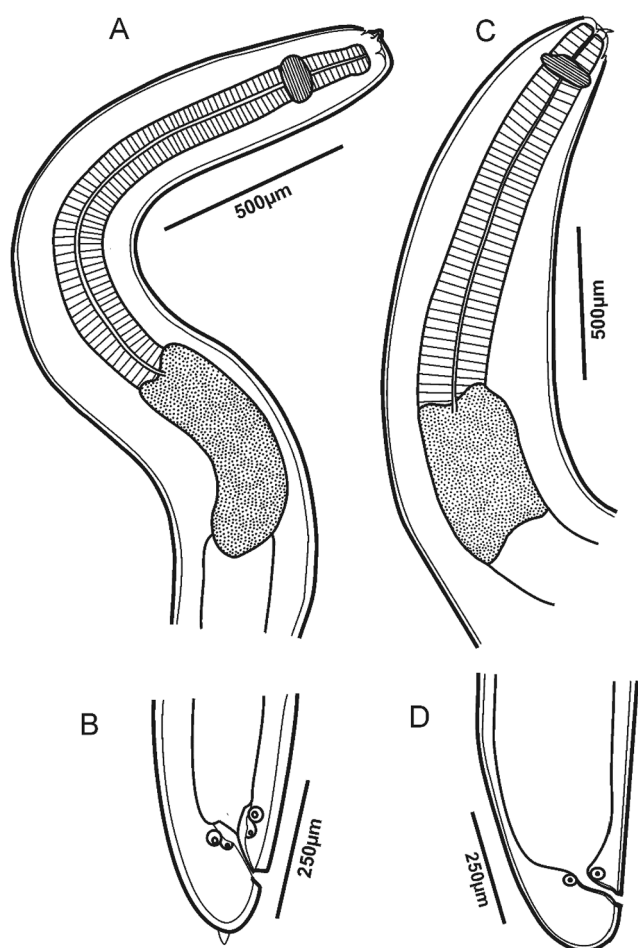


Figura 1. (A) Região anterior com dente larval e poro excretor próximo aos lábios e (B) região posterior com mucron terminal de *Anisakis typica* (vista ventral) de *Zenopsis conchifer*; (C) Região anterior com dente larval e poro excretor próximo aos lábios e (D) região posterior sem mucron terminal de *Anisakis brevispiculata* (vista ventral) de *Pinguipes brasiliensis*.

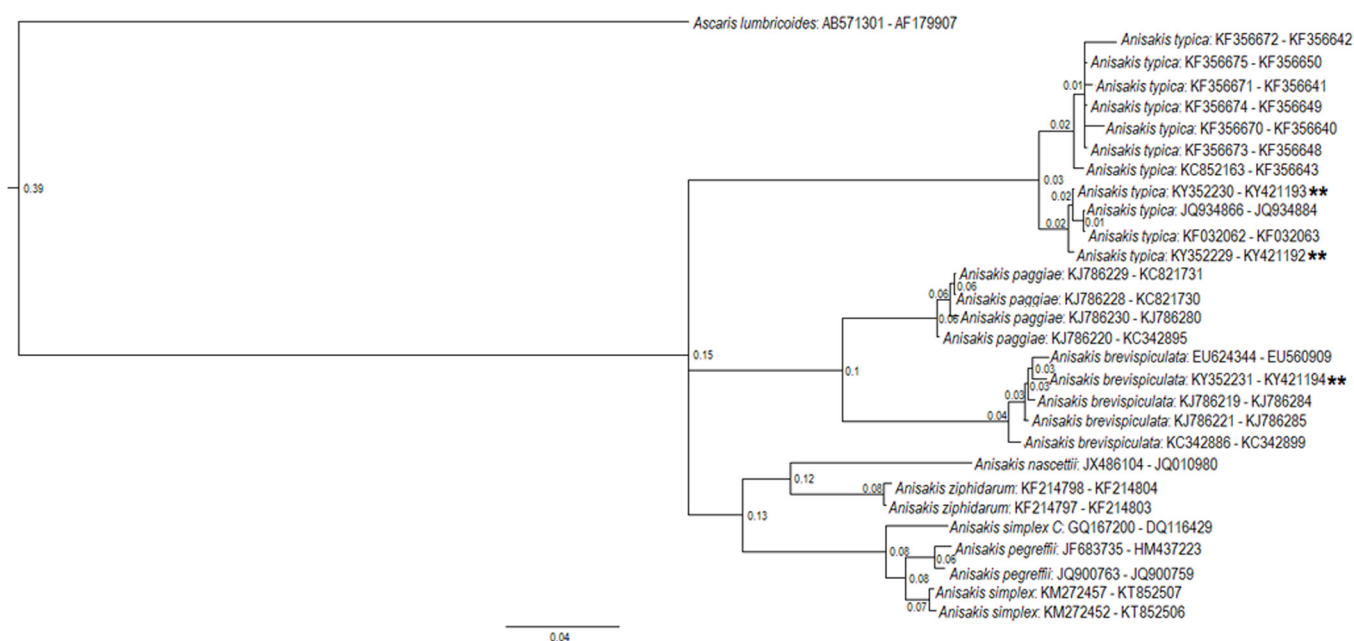


Figura 2. Árvore filogenética gerada a partir de dados concatenados ITS1, 5.8S e ITS2 de rDNA e COX2 de mtDNA respectivamente, de sequências de *A. típica* e *A. brevispiculata* geradas neste estudo, marcadas com asteriscos (\*\*) e sequências obtidas do GenBank utilizando Inferência Bayesiana, usando como grupo externo *Ascaris lumbricoides*. Os números mostram a probabilidade posterior ( $4 \times 10^6$  gerações; burn-in =  $4 \times 10^3$ ).

*Raphidascaris* Railliet & Henry, 1915, *Terranova* Leiper & Atkinson, 1914 e *Pseudoterranova* Mozgovoi, 1951 por não possuírem ceco intestinal nem apêndice ventricular, bem como pela posição do poro excretor próximo aos lábios (SAAD et al., 2012). As presentes formas larvais de *A. típica* exibiram diferenças morfométricas quando comparadas a outros registros de coespecíficos do litoral do Rio de Janeiro, onde os espécimes do presente estudo apresentaram ventrículo de tamanho menor (0,442-0,488 x 0,61, 0,62, respectivamente) bem como a cauda mais longa (0,179-0,192 x 0,12, 0,09, respectivamente) (Borges et al. 2012, Pantoja et al. 2015). Até o momento não existem dados na literatura para comparar *A. brevispiculata* com outras larvas da mesma espécie no litoral do Rio de Janeiro.

De acordo com Timi et al. (2001) as diferenças morfométricas encontradas entre espécimes de uma mesma espécie podem ocorrer em virtude de um desenvolvimento alométrico dos indivíduos e que de acordo com Køie (1993) a limitação de espaço nos primeiros hospedeiros intermediários (crustáceos e moluscos) pode influenciar no tamanho das larvas encontradas em peixes teleósteos.

Adultos de *Anisakis* spp. são parasitos de estômago e de intestino de pinípedes e cetáceos, já as larvas de *Anisakis* spp. são geralmente encontradas na cavidade corporal, intestino ou tecidos de uma grande variedade de peixes teleósteos marinhos, bem como em lulas e camarões (Anderson 2000).

De acordo com Mattiucci e Nascetti (2008) existem nove espécies de *Anisakis* spp. subdivididos em dois morfotipos, com base em dados genéticos. O morfotipo I consiste em *A. simplex* sensu stricto (ss), *A. pegreffii*, *A. simplex C*, *A. típica*, *A. ziphidarum* e *A. nascoettii* enquanto que o morfotipo II é composto por *A. paggiae*, *A. physeteris* e *A. brevispiculata*. As larvas dos hospedeiros *Z. conchifer* e *A. thazard* pertencem ao morfotipo I e a larva encontrada em *P. brasiliensis* pertence ao morfotipo II. Os morfotipos podem ser diferenciados por caracteres morfométricos do ventrículo e por possuir ou não mucron (Berland 1961, Saad et al. 2012), o que foi observado nos espécimes deste estudo.

As larvas encontradas neste estudo apresentam as características descritas para o gênero, contudo para a determinação específica, foi necessário o uso de técnicas moleculares, já que larvas não apresentam estruturas de diferenciação entre espécie (Moravec 1998).

Mattiucci et al. (2014) mostraram que o uso de marcadores genéticos e moleculares é fundamental não apenas para definir o status taxonômico das espécies de *Anisakis*, mas também para seu reconhecimento. Devido à sua maior taxa de alteração de bases, a variabilidade genética que observamos no gene COX2 é maior do que a dos genes ribossômicos (Ceballos-Mendiola et al. 2010). A sequência da região do gene COX2 do DNAm provou ser útil em estudos de genética de população e filogeografia de *Anisakis* spp. (Mattiucci et al. 2014).

Diferentes estudos demonstraram que a região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr nuclear fornece marcadores genéticos úteis para a identificação precisa de espécies irmãs e morfoespécies dentro de espécies de anisacuídeos (D'Amelio et al. 2000, Pontes et al. 2005). *Anisakis typica* apresenta notável homogeneidade genética, mesmo entre populações geograficamente distantes (Mattiucci et al. 2002), provavelmente devido ao efeito do fluxo genético, reforçado pela alta capacidade de dispersão de hospedeiros intermediários/paratênicos e definitivos.

O estudo realizado por Iñiguez et al. (2009) desenvolveu e aplicou um diagnóstico molecular específico para *A. typica* baseado na região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossômico. A análise genética baseada neste diagnóstico mostrou uma predominância de *A. typica* e mostrou, pela primeira vez, a presença de *A. physeteris* em *A. thazard* da costa brasileira, o que corrobora com este estudo, que baseado na análise molecular mostrou que as larvas encontradas nesse hospedeiro também eram da espécie *A. typica*.

Na costa brasileira, larvas de *Anisakis* são encontradas em uma variedade de espécies de peixes. Até o presente, o gênero foi relatado em aproximadamente 38 espécies de peixes do litoral do Estado do Rio de Janeiro (Luque et al. 2011).

A maioria dos cetáceos relatados na literatura como hospedeiros definitivos de *A. typica* pertencem à família Delphinidae e são comuns na zona epipelágica (Mattiucci et al. 2002). Alguns peixes também vivem nestas profundidades, o que pode explicar a ocorrência deste parasito em vários peixes, tal como *A. thazard*. Isto também pode explicar a contaminação da família Delphinidae por terem como base de sua alimentação composta por peixes e lulas. Embora o hospedeiro *Z. conchifer* seja um peixe mesopelágico (200 - 1000m de profundidade), em algum momento de sua vida pode habitar a mesma profundidade de *A. thazard* (até 200m de profundidade) o que indica a possibilidade de também ser parasitado por *A. typica*.

Para o hospedeiro *Z. conchifer*, existem registros de copépodes feitos por Braicovich et al. (2013) e *Hysterothylacium spirale* adulto feito por Rossin et al. (2011) pertencente à mesma família de *Anisakis* sp. (Anisakidae), porém até o momento nunca foi registrada a presença de *A. typica*, ou qualquer outra espécie do gênero *Anisakis* para este hospedeiro. Isso pode ser devido à falta de estudos na área, ou mesmo o fato de que este peixe não é de interesse comercial, ao contrário de outros hospedeiros apontados neste estudo, caracterizando este como o primeiro registro da presença de *A. typica* para este hospedeiro.

*Anisakis brevispiculata* foi encontrado na França (Dollfus 1966), Espanha (Mattiucci 2001, Abollo & Pascual 2002), África do Sul (Mattiucci 2001) e México (GONZÁLEZ-Solís et al. 2006).

Alguns estudos, como o realizado por Davey (1971) sugerem que *A. brevispiculata* e *A. physeteris* são morfológicamente muito semelhantes, representando um caso de sinonímia. No entanto, a distribuição e o número de papilas, bem como o tamanho do espículo nos machos são caracteres que distinguem as duas espécies (Abollo & Pascual 2002). Além disso, estudos genéticos mostram que *A. brevispiculata* e *A. physeteris* são duas espécies biologicamente distintas. O alto nível de diferenciação genética entre *A. physeteris* e *A. brevispiculata* com outras espécies do gênero *Anisakis* geneticamente estudadas até agora por marcadores aloenzimáticos, indica que o gênero *Anisakis* é polifilético e altamente heterogêneo (Mattiucci et al. 2001).

De acordo com os dados disponíveis na literatura (Ross 1979, Mattiucci et al. 2001), *A. brevispiculata* parece estar distribuído no Atlântico Sul e Central, mesmo oceano que banha a costa do Brasil, justificando sua presença mesmo em baixa prevalência e intensidade nos peixes considerados hospedeiros intermediários. Lulas ou outras espécies da família Cranchiidae são importantes no ciclo de vida deste parasito, uma vez que também fazem parte da dieta da *Kogia breviceps*, hospedeiro definitivo de *A. brevispiculata*.

Até agora no Brasil foram registradas as espécies de *A. physeteris* Baylis, 1923 (Luque et al. 2010, 2011), *A. simplex* Rudolphi, 1809 (Luque et al. 2010, 2011), *A. typica* Diesing, 1860 (Luque 2010, 2011) e *Anisakis* spp. (Luque et al. 2010, 2011).

A presente identificação de larvas pertencentes à *A. brevispiculata*, representa o primeiro registro desta espécie em águas costeiras do Brasil.

O conhecimento de larvas de anisacuídeos no Brasil ainda é muito limitado, são poucos os trabalhos de cunho taxonômicos e moleculares, não permitindo que o registro de algumas larvas a nível de espécie aconteça. As sequências depositadas no GenBank fornecem novos dados para estudos futuros desses parasitos que podem estar presentes em uma grande quantidade de peixes marinhos ao longo de toda costa brasileira.

**Agradecimentos.** Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento à pesquisa e ao Dr. Douglas McIntosh do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ pelo apoio técnico no sequenciamento de amostras.

## REFERÊNCIAS

- Abollo E., Gestal C. & Pascual S. *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: An updated perspective. *Parasitol. Res.*, 87: 492-499, 2001.
- Abollo E. & Pascual S. SEM study of *Anisakis brevispiculata* Dollfus, 1966 and *Pseudoterranova ceticola* (Deardoff and Overstreet, 1981) (Nematoda: Anisakidae), parasites of the pygmy sperm whale *Kogia breviceps*. *Sci. Mar.*, 66: 249-255, 2002.
- Anderson R.C., Chabaud A.G., Willmott S. *Keys to the nematode parasites of vertebrates: archival volume*. Wallingford: CABI Publishing, 2009. 480 pp.
- Anderson R.C. *Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission*. 2<sup>ed</sup>. London: CAB Publishing, 2000.
- Audicana M. & Kennedy M. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.* 21: 360-379, 2008.
- Berland B. Nematodes from some Norwegian Marine fishes. *Sarsia*, 2:1-50, 1961. Billings A.N., Yu X., Teel P.D. & Walker D.H. Detection of a spotted fever group rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. *J. Med. Entomol.*, 35: 474-478, 1998.
- Braicovich P.E., Lanfranchi A.L., Incorvaia I.S. & Timi J.T. Chondracanthid copepod parasites of dories (Zeiformes: Zeidae) with the description of a new species of *Chondracanthus* from waters off northern Argentina. *Folia Parasit.*, 60: 359-364, 2013.
- Borges J.N., Cunha L.F.G., Santos H.L.C., Monteiro-Neto C., Santos C.P. Morphological and molecular diagnosis of anisakid nematode larvae from cutlassfish (*Trichiurus lepturus*) off the coast of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One* 2012; 7: e40447.
- Ceballos-Mendiola G., Valero A., Polo-Vico R., Tejada M., Abattouy N., Karl H., De Las Heras C., Martín-Sánchez J. Genetic variability of *Anisakis simplex* s.s. parasitizing European hake (*Merluccius merluccius*) in the Little Sole Bank area in the Northeast Atlantic. *Parasitol. Res.*, 107: 1399-1404, 2010.
- D'Amelio S., Mathiopoulos K.D., Santos C.P., Pugachev O.N., Webb S.C., Picanco M.O., et al. 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. *Int. J. Parasitol.*, 30: 223-226, 2000.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9: 772, 2012.
- Davey J.T. A revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridida). *J. Helminthol.*, 45: 51-72, 1971.
- Dollfus R.P. Helminthofaune de *Kogia breviceps* (Blainville, 1838) céta-cé odontocéte. *Ann. So. Sci. Nat. Charente-Marit.*, 4: 3-6, 1966.
- González-Solis D., Vidal-Martínez V.M., Antochiw-Alonso D.M. & Ortega-Argueta A. Anisakid Nematodes From Stranded Pygmy Sperm Whales, *Kogia breviceps* (Kogiidae), in Three Localities of the Yucatan Peninsula, Mexico. *J. Parasitol.*, 92: 1120-1122, 2006.
- Guindon S., Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.*, 52: 696-704, 2003.
- Íñiguez A.M., Santos C.P., Vicente A.C. Genetic characterization of *Anisakis typica* and *Anisakis physeteris* from marine mammals and fish from the Atlantic Ocean off Brazil. *Vet. Parasitol.*, 165: 350-356, 2009.
- Koie, M. Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Zool.*, 71: 1289-1296, 1993.
- Koinari M., Karl S., Elliot A., Ryana U. & Lymbery A.J. Identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) in marine fish hosts from Papua New Guinea. *Vet. Parasitol.*, 193: 126-133, 2013.
- Luque J.L., Aguiar J., Vieira F., Gibson D. & Santos C. Checklist of Nematoda associated with the fishes of Brazil. *Zootaxa*, 3082: 1-88, 2011.
- Luque J.L., Muniz-Pereira L.C., Siciliano S., Siqueira L.R., Magda S. & Vieira F.M. Checklist of helminth parasites of cetaceans from Brazil. *Zootaxa*, 2548: 57-68, 2010.
- Luque J.L. & Poulin R. Use of fish as intermediate hosts by helminth parasites: a comparative analysis. *Acta Parasitol.*, 49: 353-361, 2004.
- Martins R. & Schwingel P. Biological aspects of the Sailfin dory *Zenopsis conchifer* (Lowe, 1852) caught by deep-sea trawling fishery off southern Brazil. *Braz. J. Oceanogr.*, 60: 171-179, 2012.
- Mattiucci S., Cipriani P., Webb S.C., Paoletti M., Marcer F., Bellisario B., Gibson D.I. & Nascetti G. 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). *J. Parasitol.*, 100: 199-214, 2014.
- Mattiucci S. & Nascetti G. *Advances and Trends in the Molecular Systematics of Anisakid Nematodes, with implications for their Evolutionary Ecology and Host-Parasite Co-Evolutionary Processes*. 2<sup>ed</sup> New York: Elsevier Ltd., 2008. P.49-137.
- Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Abollo E., Webb S.C., Pascual S., Cianchi R. & Bullini L. Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *Int. J. Parasitol.*, 31: 9-14, 2001.
- Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Santos C.P., Costa G., Di Benedetto A.P., Ramos R., Argyrou M., Cianchi R. & Bullini L. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.*, 51: 159-170, 2002.
- Menezes N.A. Figueiredo J.L. *Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil*. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 1985, 107 pp.
- Menezes N.A., Figueiredo J.L. *Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil IV. Teleostei* (3). São Paulo: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. 1980, 96 pp.
- Moravec F. *Nematodes of the Freshwater Fishes of the Neotropical Region*. Academia, Prague, República Tcheca. 1998. 464pp.
- Nadler S.A. & Hudspeth D.S. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on tree genes and morphology: Hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.*, 86: 380-393, 2000.
- Pantoja C.S., Borges J.N., Santos C.P. & Luque J.L. Molecular and Morphological Characterization of Anisakid Nematode Larvae from the Sandperches *Pseudoperca numida* and *Pinguipes brasilianus* (Perciformes: Pinguipedidae) of Brazil. *J. Parasitol.*, 101: 492-499, 2015.
- Pontes T., D'Amelio S., Costa G. & Paggi L. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. *J. Parasitol.*, 91: 1430-1434, 2005.
- Ross G.J. Records of pygmy and dwarf sperm whales, genus *Kogia* from Southern Africa, with biological notes and some comparisons. *Ann. Cape. Pro. Museum Nat. Hist.*, 11: 259-327, 1979.
- Rossin M.A., Datri L., Incorvaia I.S. & Timi J.T. A new species of *Hysterothylacium* (Ascaridoidea, Anisakidae) parasitic in *Zenopsis conchifer* (Zeiformes, Zeidae) from Argentinean Waters. *Acta Parasitol.*, 56: 310-314, 2011.
- Saad C.D.R., Vieira F.M. & Luque J.L. Larvae of Anisakidae Skrjabin & Karokhin, 1945 (Nematoda, Ascaridoidea) in *Lophius gastrophysus* Miranda-Ribeiro, 1915 (Actinopterygii, Lophiidae) from the Coastal Zone of the State of Rio De Janeiro, Brazil. *Neotrop. Helminthol.*, 6: 159-177, 2012.
- Saad, C. D. R. & Luque, J. L. Larval Anisakidae in musculature of *Pagrus pagrus* from the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18: 71-73, 2009.
- Szpilman M. *Peixe marinhos do Brasil: guia prático de identificação*/ Marcelo Szpilman. Insitute Ecológico Aqualung e MAUAD Editora, 2000.
- Timi J., Lanfranchi A. & Luque J. Similarity in parasite communities of the teleost fishes *Pinguipes brasilianus* in the southwestern Atlantic: Infracommunities as a tool to detect geographical patterns. *Int. J. Parasitol.*, 40: 243-254, 2010.
- Timi J.T., Sardella N.H., Navone G.T. Parasitic nematodes of *Engraulis anchoita* Hubbs et Marini, 1935 (Pisces, Engraulidae) of the Argentine and Uruguayan coasts, South West Atlantic. *Acta Parasitol.*, 46: 186-193, 2001.
- Zhu X.Q., Gasser R.B., Podolska M. & Chilton N.B. Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.*, 28: 1911-1921, 1998.