



Sanidade, Segurança
Alimentar e Ambiental
no Agronegócio

INSTITUTO BIOLÓGICO

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Núcleo de Informação e Documentação - Biblioteca
Instituto Biológico
Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo

Rodrigues, Marianna Vaz

Presença do parasita anisquídeo em pescada (*Cynoscion spp.*) como ponto crítico de controle na cadeia produtiva do pescado comercializado na Baixada Santista / Marianna Vaz Rodrigues. – São Paulo, 2010.

Dissertação (Mestrado) Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.
Área de concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente

Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e Ambiental na produção animal
Orientador: Cláudia Del Fava

Co-Orientador: Agar Costa Alexandrino de Pérez

Versão do título para o inglês: Presence of anisakid parasite in weakfish (*Cynoscyon spp.*) as critical control point in productive seafood chain commercialized on Baixada Santista.

1. Anisquídeos 2. Pescado, Cadeia Produtiva 3. Saúde Pública 4. Zoonoses parasitárias 5. Baixada Santista (SP). I. Fava, Cláudia Del II. Pérez, Agar Costa Alexandrino de III. Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação IV. Título

IB/Bibl /2010/001

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

PRESENÇA DO PARASITA ANISAQUÍDEO EM PESCADA (*Cynoscion* spp.) COMO PONTO CRÍTICO DE CONTROLE NA CADEIA PRODUTIVA DO PESCADO COMERCIALIZADO NA BAIXADA SANTISTA

MARIANNA VAZ RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente

Orientador (a): Dra. Claudia Del Fava

Co-orientador (a): Dra. Agar Costa Alexandrino de Pérez

São Paulo

2010



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo – SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Marianna Vaz Rodrigues

Título: Presença do parasita anisquídeo em pescada (*Cynoscion* spp.) como ponto crítico de controle na cadeia produtiva do pescado comercializado na Baixada Santista

Orientador(a): Claudia Del Fava

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Claudia Del Fava

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Eliana Scarcelli Pinheiro

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. Dr.: Ricardo Moreira Calil

Instituição: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus por guiar meus passos e ter me abençoado com este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha família (Mário, Márcia e Felipe) que sempre me deram apoio, amor e foi a minha base sólida para eu conseguir alcançar mais esse objetivo.

Ao meu namorado Rogério pela paciência, companheirismo, amor e força a mim dadas, sendo essencial para minha vida.

A Dra Agar que sempre me guiou profissionalmente e é além de uma grande professora e amiga, uma segunda mãe.

A Dra Claudía que me acolheu no laboratório de Anatomia Patológica e me orientou da melhor forma, sendo também uma grande amiga.

A minha melhor amiga Aline Diniz que me confortou em muitos momentos de tristeza e se tornou uma grande irmã.

As amigas do laboratório, Michele, Maria Jeovania, Carol e Mary pela ajuda tanto na parte prática do projeto, como com o apoio durante a realização do projeto.

Ao Dr Fabiano do CEAGESP por tão gentilmente ter cedido amostras para a realização desta dissertação.

RESUMO

RODRIGUES, M. V. PRESENÇA DO PARASITA ANISAQUÍDEO EM PESCADA (*CYNOSCION* SPP.) COMO PONTO CRÍTICO DE CONTROLE NA CADEIA PRODUTIVA DO PESCADO COMERCIALIZADO NA BAIXADA SANTISTA. 2009. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente) – Instituto Biológico.

A anisiquiase é uma doença que inclui infecções por todos os nematódeos ascarídeos, tendo estágios larvais em hospedeiros aquáticos. Pouco se comenta sobre as zoonoses parasitárias transmitidas por peixes e, no Brasil, o aumento crescente do consumo de pratos orientais está levando as autoridades de Saúde Pública e os pesquisadores a dar uma atenção especial a essa tendência do consumidor de não cozinhar ou cozinhar pouco os alimentos para melhor preservar seus nutrientes. Os parasitos da Família Anisakidae podem ser encontrados em toda a cadeia produtiva do pescado, uma vez que a infecção no peixe ocorre pela ingestão de crustáceo infestado. Tendo em vista a importância da anisiquiase como zoonose e o risco de sua transmissão por meio do consumo do pescado cru, necessita-se avaliar o ponto crítico da cadeia produtiva do pescado com a finalidade de sugerir ações corretivas e com isso garantir um alimento inócuo para consumo. Visando a determinação deste ponto crítico de controle, objetivou-se verificar a presença de anisiquídeos em pescada comercializada na Baixada Santista (Bertioga, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos, São Vicente) associando técnicas parasitológicas e histopatológicas como ferramentas auxiliares para o inspetor de pescado, tendo em vista que a avaliação macroscópica não é totalmente eficaz para detectar o parasita. Observou-se que 52,17% (48/92) amostras estavam parasitadas por espécies de anisiquídeos, sendo 67,30% (35/52) *Contracaecum* sp, 30,76% (16/52) *Anisakis* sp e 3,84% (2/52) *Pseudoterranova* sp, obtendo maior prevalência no mesentério, seguido de musculatura, fígado e estômago. Foram detectados 9,61% (5/52) cestódeos da ordem Trypanorhyncha. As lesões histopatológicas mais observadas foram presença de melanomacrófagos e infiltrado inflamatório mononuclear que estão associados a um processo infeccioso. Também se visualizou que 66,66% (2/3) da musculatura parasitada não estava envolta por tecido conjuntivo, indicando evisceração inadequada, afirmando ser um ponto crítico de controle. Concluiu-se que os consumidores devem ser alertados para o risco da anisiquiase e que deve ser feita a inspeção associada à análise histopatológica, tendo em vista que esta detectou 79,34% (73/92) de parasitos pela microscopia e pela macroscopia 52,17% (48/92), com o intuito de garantir um alimento inócuo para consumo.

Palavras-chave: Anisiquídeos, Cadeia Produtiva, Saúde Pública, Zoonoses, Pescado, Baixada Santista.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. V. PRESENCE OF ANISAKID PARASITE IN WEAKFISH (*CYNOSCION* SPP.) AS CRITICAL CONTROL POINT IN PRODUCTIVE SEAFOOD CHAIN COMMERCIALIZED ON BAIXADA SANTISTA. 2009. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal, Segurança Alimentar e o Ambiente) – Instituto Biológico.

Anisakiasis is a disease caused by all threadworm nematodes, having larval stages on aquatic host. There are few comments about this parasitic zoonosis transmitted by fishes, and in Brazil there is an increased consumption of oriental food that is leading the Health Public authorities and researchers to pay special attention to this trend of raw or undercooked food to preserve their nutrients. The parasites of family Anisakidae can be found in all productive seafood chain, once this infection occurs by the ingestion of infested crustacean. In view of importance of anisakiasis as zoonosis and the risk of its transmission through consumption of raw seafood, it is necessary to evaluate the critical point of productive seafood chain with the proposal of corrective actions to guarantee a safety food for consumers. To determine the critical control point, it was verified the presence of Anisakidae in weakfish commercialized in Baixada Santista (Bertioga, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos and São Vicente municipalities) associating parasitological and histopathological analysis as auxiliary tools for the inspector of seafood, in view of the macroscopic evaluation not be totally efficient to detect these parasites. It was observed that 52.17% (48/92) samples were parasited by Anisakidae: 67.30% (35/52) *Contracaecum* sp, 30.76% (16/52) *Anisakis* sp and 3.84% *Pseudoterranova* sp, more frequently found in mesentery, followed by muscle, liver and stomach. It was detected 9.61% (5/52) cestodes of the order Trypanorhyncha. The most frequent histopathological findings were the presence of melanomacrophages and inflammatory cells that are associated with infectious process. It was also seen that 66.66% (2/3) of parasited muscles were not involved by fibrous connective tissue, indicating inadequate evisceration because the migration to this organ, showing that this is the critical control point. It was concluded that the consumers have to be alerted about the risk of anisakiasis and that inspection food has to be associated to histopathological analysis, in view of that it was detected, 79,34% (73/92) of parasites by microscopic analysis and 52.17% (48/92) by macroscopic method, with the intention of guarantee a safety food to consumption.

Keywords: Anisakides, Productive Chain, Public Health, Zoonosis, Seafood, Baixada Santista.

LISTAS DE ABREVIATURAS

AFA:	Álcool, Formol e Ácido Acético
APPCC:	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF:	Boas Práticas de Fabricação
CEAGESP:	Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo
cm:	centímetros
FDA:	Food and Drug Administration
HE:	Hematoxilina e Eosina
kGy:	quilogray
mm:	milímetro
µm:	micrômetro

LISTAS DE TABELAS

	Página
Tabela 01. Porcentagem de lesões em relação aos tecidos analisados	38
Tabela 02. Porcentagem de lesões observadas em tecidos parasitados	41

LISTAS DE FIGURAS

	Página
Figura 01. Pescada foguete (<i>Macrodon ancylodon</i>).	19
Figura 02. Ciclo evolutivo de <i>Anisakis</i> sp.	21
Figura 03. Visualização dos órgãos: fígado (a), estômago (b), coração (c), intestino (d), baço (e), mesentério (f) e testículos (g) de pescada durante necropsia.	30
Figura 04. Visualização de cisto (seta) em musculatura com utilização de <i>candling-table</i> .	31
Figura 05. Presença de cistos (seta) no mesentério.	32
Figura 06. Observa-se através de microscopia óptica comum parasita do gênero <i>Contracaecum</i> (A), extremidade anterior (B) e posterior (C). Aumento de 40 X.	35
Figura 07. Observa-se em microscopia óptica comum extremidade anterior (A) com presença de mucron (seta) e extremidade posterior (B) de <i>Anisakis</i> spp. Aumento de 100 X.	35
Figura 08. Observa-se em microscopia óptica comum extremidade anterior (A) e corpo com vilosidade (B, seta) de <i>Pseudoterranova</i> spp. Aumento de 100 X.	36
Figura 09. Observa-se em microscopia óptica comum extremidade anterior do parasita da ordem Trypanorhyncha. Aumento 100 X.	36
Figura 10. Observa-se presença de melanomacrófago (seta), hiperemia (A), infiltrado inflamatório mononuclear (B) e necrose de coagulação (C) em tecido renal. Aumento 100X. HE.	39
Figura 11. Observa-se infiltrado inflamatório mononuclear (seta), necrose de coagulação (A) e rarefação (B) em tecido muscular. Aumento 100X. HE.	39
Figura 12. Observa-se necrose de caseificação (A) e presença de melanomacrófagos (seta) em intestino. Aumento 100X. HE.	40
Figura 13. Presença de trombo (A), rarefação (B) e degeneração vacuolar (seta). Aumento 100X. HE.	40
Figura 14. Presença de parasita nematódeo em tecido gástrico. Aumento 100X. Tricrômio de Masson.	42
Figura 15. Presença de parasito em tecido hepático. Observa-se mucron no seu interior (seta). Aumento 40X. Tricrômio de Masson.	42
Figura 16. Observa-se parasita circunscrito de melanomacrófagos (seta) em tecido hepático. Aumento 100X. HE.	43

- Figura 17.** Presença de parasitos na serosa intestinal. Aumento 100X. HE. 43
- Figura 18.** Presença de parasito na serosa intestinal. Aumento 100X. Tricrômio de Masson. 44
- Figura 19.** Presença de parasito envolto por cápsula de tecido conjuntivo em tecido gástrico. Aumento de 100X. Tricrômio de Masson. 44
- Figura 20.** Presença de parasitas (seta) na musculatura. Aumento 40X. HE. 45
- Figura 21.** Presença de parasitas (seta) na musculatura. Aumento 40X. Tricrômio de Masson. 45

LISTAS DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 01. Porcentagem de amostras positivas e negativas para parasitos.	34
Gráfico 02. Prevalência de parasita em relação às amostras parasitadas.	34
Gráfico 03. Prevalência de infestação de parasitas por tecido.	37
Gráfico 04. Prevalência de parasitismo em relação ao sexo do pescado.	37
Gráfico 05. Detecção de parasitos por meio de análise macroscópica e microscópica.	46

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 01: Ficha parasitológica.	63
Anexo 02: Ficha de colheita.	64
Anexo 03: Bateria de desidratação e diafanização dos tecidos.	66
Anexo 04: Protocolo de coloração de hematoxilina-eosina.	67
Anexo 05: Protocolo de coloração de Tricrômio de Masson.	68
Anexo 06: Ficha de histopatologia.	69
Anexo 07. Certificado de Ética na Experimentação Animal	71

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 BIOLOGIA DA PESCADA	19
2.2 ANISAQUÍDEOS	19
2.3 CICLO EVOLUTIVO	20
2.4 EPIDEMIOLOGIA	22
2.5 ANISAQUÍASE NO PEIXE	23
2.6 ANISAQUÍASE EM HUMANOS	23
2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE	25
2.7.1 RELAÇÃO TEMPO E TEMPERATURA	26
2.7.2 IRRADIAÇÃO	28
2.7.3 SALGA	28
2.7.4 CANDLING TABLE	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
8. ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO

É considerado pescado, os peixes, elasmobrânquios, quelônios, cefalópodos, moluscos e crustáceos destinados à alimentação humana. No entanto, são excluídos dessa nomenclatura os mamíferos, anfíbios e répteis aquáticos (BRASIL, 1952; CODEX ALIMENTARIUS, 1993).

O peixe constitui fonte de proteínas de alto valor biológico, tão importante quanto à carne bovina. Em muitos países, principalmente na Europa e Ásia é o produto com proteína de origem animal mais consumido. O teor protéico varia de 15 a 20% e em relação à gordura são classificados como magros (menos que 1% de gordura, assim como bacalhau, carpa, pescada, truta, linguado), meio gordos (entre 7 e 8% de gordura, assim como salmão, arenque, cavala, congro) e gordos (mais de 15% de gordura, assim como atum, enguia) (LEDERER, 1991).

No pescado de água doce e salgada, a presença de parasitos é relativamente frequente e possui consequências diversas relacionadas principalmente com aspectos econômicos e sanitários. Alguns parasitos provocam alta mortalidade nos peixes e por também causar lesão tecidual levam a perda econômica (FERRE, 2001).

A maioria dos parasitos é encontrada nas vísceras que são eliminadas durante o processamento do pescado, porém algumas espécies de parasitas se alojam na musculatura, causando em alguns casos zoonose caso o pescado seja consumido de forma inadequada (RODRÍGUEZ, 1998; UBEIRA et al., 2000; LORENZO, 2000).

Os animais parasitados não são boas fontes alimentares para as dietas das pessoas, tanto em qualidade, como em quantidade, pois as mortes por doenças ictioparasitárias podem diminuir muito as quantidades nutricionais disponíveis para abastecer uma população. Deste modo, um peixe pode constituir-se uma excelente fonte de proteínas e de outras substâncias, mas se for proveniente de um animal parasitado, enfraquecido e com seu metabolismo alterado pela presença de parasitas, torna-se pobre e insuficiente como fonte alimentar (LEITÃO, 1983).

As zoonoses parasitárias transmitidas por pescado cada vez mais vêm chamando a atenção de pesquisadores e autoridades sanitárias do mundo inteiro, por serem causas de problemas de saúde pública na população, a qual se infecta pelo consumo de pescado cru ou cozido insuficientemente (OKUMURA et al., 1999).

A síndrome da antropozoonose de origem parasitária conhecida como anisakiase, foi reconhecida pela primeira vez pelo Dr. Strub em 1955 na Holanda. O paciente ingeriu arenque levemente salgado e 24 horas depois, apresentou sintomas que conduziram a

laparotomia, quando foi verificada a presença de larvas de terceiro estágio de anisacídeos na luz do intestino e lesões ulcerativas no íleo (VAN THIEL et al., 1960).

No Brasil está havendo grande procura de pratos feitos à base de pescado cru, como *sushi* e *sashimi*, devido à influência da cozinha oriental nos dias de hoje. Além disso, há dados que mostram a presença de parasitas zoonóticos nos peixes brasileiros, tanto de água doce, quanto de água salgada. Apesar disso, até o presente momento, ainda não há relatos dessas parasitoses em humanos no Brasil (com exceção da fagicolose). Acredita-se que isto se deva à falta de diagnóstico e não à ausência dessas doenças no país. Como zoonoses transmissíveis por pescado, pode-se citar a anisacuíase, a eustrongilidíase, a capilaríase, a fagicolose, a clonorquíase e a difilobotríase, dentre outras (OKUMURA et al., 1999).

Há relatos de casos de anisacuíase no Japão, Noruega, Estados Unidos e Peru, onde há costume de ingerir pescado cru ou mal cozido. Além disso, o atual movimento cultural das “comidas naturais” tem influenciado também, com ênfase, o “não cozinhar demais” para a preservação dos nutrientes dos alimentos (AMATO; BARROS, 1984).

A anisacuíase é uma doença que inclui infecções por todos os nematódeos ascarídeos, tendo estágios larvais em hospedeiros aquáticos. Os nematódeos principais que causam doença em humanos são o *Anisakis simplex* e *Pseudoterranova decipiens* (CDC, 2008).

Quando a larva penetra na mucosa do trato gastrointestinal, a anisacuíase humana pode causar muitos sinais clínicos, sendo a gastrite aguda o sinal clínico mais frequente. Os pacientes apresentam dor epigástrica, náuseas e vômitos após 12 horas da ingestão do parasito. Se o parasito estiver no intestino, pode causar uma obstrução intestinal, apendicite aguda, gastroenterite eosinofílica ou peritonite, necessitando de tratamento urgente (NARANJO et al., 2003).

Esses parasitos podem ser encontrados em toda a cadeia produtiva do pescado, uma vez que a infecção no peixe ocorre pela ingestão de crustáceo infestado. Com isso, Pacini et al. (1993) testaram amostras de peixes frescos, congelados e defumados no mercado italiano para verificar a presença de larva de anisacídeos. Os autores relataram que 54% do pescado fresco, 28% do congelado e 75% do defumado continham nematódeos da família Anisakidae; e ainda observaram que todas as larvas das amostras congeladas estavam mortas.

As lesões macroscópicas observadas nos peixes são cistos com conteúdo seroso e o parasita na fase L3. Pode-se observar a presença de nematódeos aderidos na musculatura, órgãos e mesentério, sendo mais comum neste último (LÓPEZ SABATER; LÓPEZ SABATER, 2000; GONZALES et al., 2001). O diagnóstico é realizado pela técnica

de Amato (1991), onde se observam as características morfológicas do parasita clarificado, à microscopia óptica comum.

As lesões histopatológicas foram descritas por Hauck e May (1977), caracterizadas pela formação de tecido capsular fibroso que circunscreve o estágio L3, localizado nos cecos pilóricos, pâncreas, fígado e intestino grosso. Estes autores ressaltam que muitas vezes os cistos não são visíveis a olho nu e que podem conter o estágio larvário infectante do parasito.

Levando em conta que esses parasitos são zoonóticos, Cabrera et al. (2003) consideram que o profissional da área da saúde deve conhecer essa patologia, para que dessa forma possa tratar o quanto antes possível, a fim de evitar maiores danos à saúde do paciente.

O ponto crítico de controle é a fase em que se pode aplicar uma medida mitigatória que é essencial para prevenir ou eliminar um perigo relacionado com a inocuidade dos alimentos ou para reduzi-lo a um nível aceitável, sendo que o perigo é um agente biológico (parasitas, bactérias, vírus, fungos), químico (metais pesados, desinfetantes) ou físico (cabelo, palito de dente) presente no alimento que pode causar doença no consumidor (CODEX, 2003).

Tendo em vista a importância da anisquiase como zoonose e o risco de sua transmissão por meio do consumo do pescado cru, necessita-se avaliar o ponto crítico de controle na cadeia produtiva do pescado com a finalidade de sugerir ações corretivas e com isso garantir um alimento inócuo para consumo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOLOGIA DA PESCADA

Os peixes conhecidos popularmente como pescada (Figura 01) pertencem à família Sciaenidae, ordem Perciformes e Classe Actinopterygii. Possui 70 gêneros e 270 espécies que são encontradas em água salgada (BERG, 1958).



Figura 01. Pescada foguete (*Macrodon ancylodon*).

Fonte: Arquivo do autor, 2008.

São encontrados no oceano Atlântico, Indiano e Pacífico e por serem carnívoros se alimentam de peixes pequenos e invertebrados bentônicos (NELSON, 1994).

2.2 ANISAQUÍDEOS

Algumas espécies de nematóides são potencialmente patogênicas para o homem, sendo o risco de infecção pronunciado em relação às que penetram na musculatura do pescado. O homem parece ser quase sempre um hospedeiro acidental para estes parasitas, que nessas condições, não terão possibilidade de alcançar a maturidade (EIRAS, 1994).

Os anisaquídeos podem ser o grupo de nematóide mais importante dos peixes marinhos, ocupando o centro em discussões sobre nematóides de peixes do mar. Esses parasitos podem ser patogênicos para os peixes, pela sua invasão no fígado, gônadas, mesentério e musculatura corporal, onde podem resultar em uma extensa patologia, principalmente quando um grande número de parasitas está presente (SINDERMANN, 1990).

Estes nematódeos pertencem à ordem Ascarida, subordem Ascaridina e família Anisakidae, contendo os gêneros *Anisakis*, *Belanisakis*, *Phocanema*, *Porrocaecum*, *Paradujardinia*, *Pseudoterranova*, *Cloeoascaris*, *Phocascaris* e *Contracaecum* (CHENG, 1982; ACHA; SZYFRES, 1986).

As espécies mais importantes são o *Pseudoterranova decipiens* e *Anisakis simplex* por serem extremamente frequentes nos peixes marinhos, especialmente nas águas polares e nas regiões mais frias das zonas temperadas (EIRAS, 1994).

O corpo dos anisaquídeos é alongado e afunilado em ambas as extremidades. A porção posterior das fêmeas é geralmente retilínea, enquanto que a dos machos é curvada centralmente. A cutícula é normalmente decorada com finos estreitamentos. O achado mais característico destes nematódeos é a presença de um ventrículo. Mais do que isto, apêndices adicionais, tais como um ceco intestinal e um apêndice ventricular estão presentes em certos gêneros. Ainda, a posição do poro excretor é empregada como critério morfológico para identificação, e também possuem saliências de dentes nos seus lábios que se localizam posteriormente aos ventrículos esofagianos (CHENG, 1982).

Esses parasitos infestam os animais marinhos mesmo antes do surgimento do *Homo sapiens*, estando presente há mais de quatro milhões de anos (ANDERSON, 1984).

Além de causar doença ao animal e ao homem, a detecção, remoção e descarte de pescado em virtude da presença de parasitos na musculatura dos peixes causa um prejuízo anual às indústrias de processamento de pescado da costa Atlântica do Canadá estimado em 50 milhões de dólares (GUERRA et al., 1998; MCCLELLAND, 2002).

2.3 CICLO EVOLUTIVO

Os anisaquídeos adultos são parasitos de mamíferos aquáticos e aves piscívoras: baleias, golfinhos, focas, leões marinhos e garças. O ciclo evolutivo (Figura 02) exige a presença de hospedeiros intermediários. O primeiro deles são os crustáceos (Euphasídeos) que são ingeridos pelo segundo hospedeiro intermediário (peixes, cefalópodos). Várias espécies podem participar desta etapa, dentro das quais cabe mencionar: arenque (*Clupea harengus*), bacalhau (*Gadus* spp.), salmão (*Oncorhynchus* spp.) e muitas outras. Na América Latina, várias espécies de pescado têm sido descritas como parasitadas por anisaquídeos, dentro delas: jurel (*Trachurus murphyi*) e merluza (*Merluccius hubbsi*) na Argentina, corvina (*Micropogonias furnieri*) no Peru e anchova (*Pomatomus saltatrix*) no Chile e no Peru (QUIJADA et al., 2005; YANONG, 2002). No Brasil, São Clemente, et al. (1995) relataram a ocorrência de anisaquídeos em peixe espada (*Trichiurus lepturus*). Quijada et al. (2005) afirmam que eventualmente este segundo hospedeiro intermediário

pode ser consumido por outro peixe ou cefalópodo, naqueles que também se encistará a larva do anisacídeo. Quando um mamífero marinho ingere algum peixe ou cefalópodo infectado, o ciclo biológico se completa com o desenvolvimento no tubo digestivo do hospedeiro e o homem atua como hospedeiro acidental quando ingere o pescado cru ou mal cozido infestado com esses parasitas (CDC, 2008).

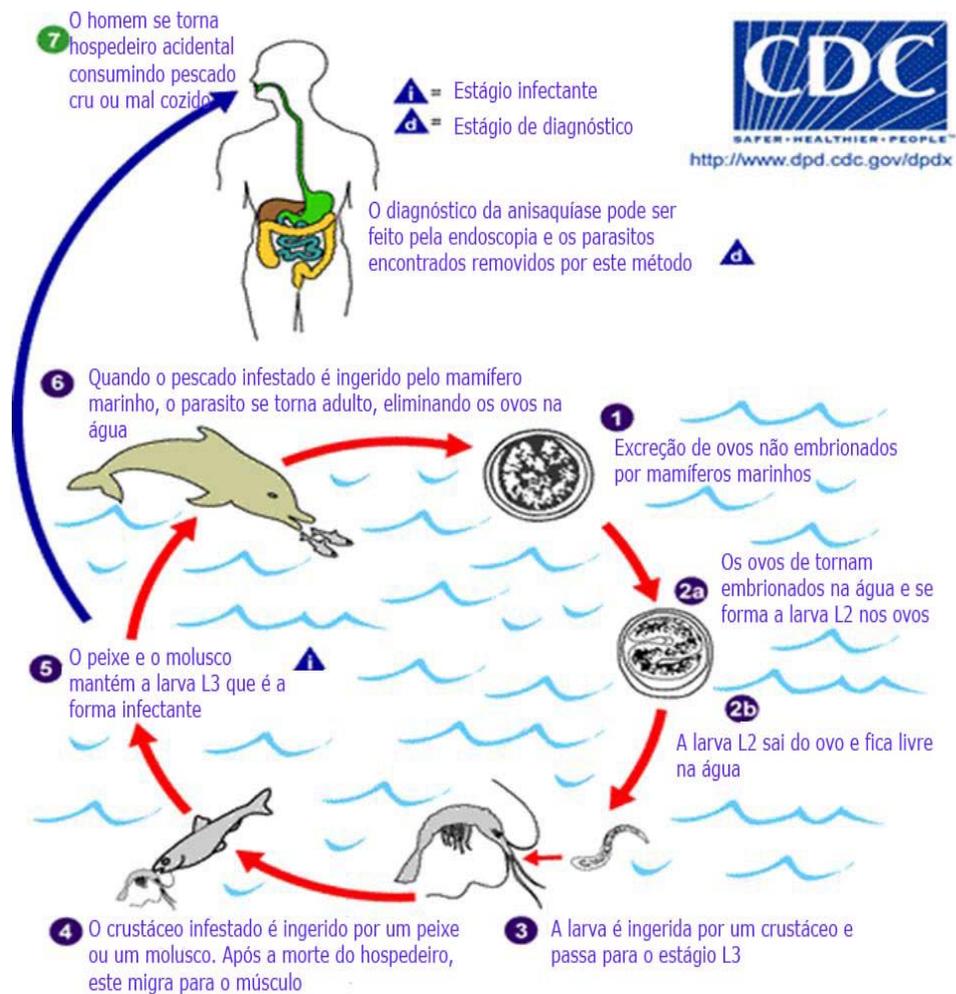


Figura 02. Ciclo evolutivo de *Anisakis* sp.

Fonte: CDC, 2008.

2.4 EPIDEMIOLOGIA

Os parasitos do gênero *Anisakis* encontram-se na maioria dos oceanos e mares, apesar de algumas espécies terem uma distribuição mais restrita (ACHA; SZYFRES, 1986).

Embora a anisacuíase tenha sido relatada em humanos na Holanda, Japão, América do Norte e França é uma doença mais frequente em países onde existe o hábito de ingerir peixe marinho cru ou mal cozido (OKUMURA et al., 1999).

Os nematóides da família Anisakidae foram registrados parasitando mais de 160 espécies de peixes marinhos, em sua maioria, teleósteos capturados em todos os continentes (LÓPEZ SABATER; LÓPEZ SABATER, 2000).

No Brasil, esta doença ainda não foi diagnosticada em humanos, porém existem relatos sobre a ocorrência de anisacuídeos em peixes de importância comercial, como cavalas (*Scomber japonicus*), pargos (*Pagrus pagrus*), anchovas (*Pomatomus saltatrix*), bacalhau (*Gadus morhua*), arenque (*Clupea harengus*), cangulos reais (*Balistes vetula*), cabrinha (*Prionotus punctatus*), peixes-espada (*Trichiurus lepturus*), merluza (*Merluccius gayi*), maria-luiza (*Paralanchurus brasiliensis*), xixarro (*Trachurus murphyi*), tainha (*Mugil cephalus*), sardinha (*Sardinella brasiliensis*), corvina (*Micropogonias furnieri*), jundiá (*Rhamdia sebae*), pargo (*Pagrus pagrus*), dourado (*Coryphaena hippuru*), camarões e moluscos bivalves (TORRES et al., 1978; AMATO; AMATO, 1982; REGO; SANTOS, 1983; REGO et al., 1983; AMATO; BARROS, 1984; FABRESSE et al., 1984; WITTNER et al., 1989; BARROS, 1994; SÃO CLEMENTE et al., 1995; ADROHER et al., 1996; LUQUE, 1996; BARROS; CAVALCANTI, 1998; VALLES-RIOS et al., 2000; RIBEIRO et al., 2002; MARTINS et al., 2005; MADI; SILVA, 2005; BICUDO et al., 2005; ISHIDA et al., 2007; ITO et al., 2007).

Além de ter sido relatada a anisacuíase em peixes marinhos, Shukerova (2005) detectou prevalência de 16,67% de *Contracaecum microcephalum* em carpas (*Carassius gibelio*) na reserva de Srebarna, na Bulgária. Yanong (2002) e Dick et al. (1987a, b) também descrevem que nematódeos do gênero *Contracaecum* podem ocorrer em ictalurídeos (bagre do canal), centraquídeos (robalo branco e peixe galo), tilápia, truta arco-íris e perca.

Silva et al. (2005) realizaram o primeiro relato da ocorrência de anisacuídeos do gênero *Contracaecum* em atobá (*Sula leucogaster*), sugerindo que também participam do ciclo destes parasitas.

Apesar da anisacuíase em humanos ter sido primariamente restrita a países com costume de ingerir peixe marinho cru ou mal cozido, o potencial para infecções humanas existe no mundo todo, na medida em que os parasitas causadores têm distribuição mundial (CHENG, 1982).

2.5 ANISAQUIÁSE NO PEIXE

As larvas de anisacídeos podem estar em grandes quantidades e causar alterações patológicas em várias espécies de peixes marinhos, podendo afetar vários órgãos. Geralmente as larvas abandonam o trato digestivo para alojarem-se sobre o mesentério ou em diferentes órgãos internos. Em alguns casos, podem se deslocar do trato gastrointestinal dos peixes penetrando profundamente na musculatura, se dispendo enroladas em forma de espirais (LÓPEZ SABATER; LÓPEZ SABATER, 2000; GONZALES et al., 2001).

O órgão mais afetado é o fígado e a sua alteração mais comum é a atrofia. Também ocorre perda de peso significativa. Ainda existem dúvidas se essas alterações são realizadas pela presença do parasita ou pela secreção de toxinas (CHENG, 1982; ACHA; SZYFRES, 1986).

Segundo Acha e Szyfres (1989), as larvas de *Contracaecum*, quando infectam peixes jovens, podem causar a morte ou invadir a região cardíaca. Além do fígado, as larvas de anisacídeos podem encapsular-se em outros órgãos e causar alterações tais como perfurações da parede estomacal, adesão de vísceras e danos à musculatura.

Eiras (1994) afirma que as larvas podem persistir durante anos na musculatura do peixe e ainda, segundo Hauck e May (1977) a presença destas no órgão pode ocasionar compressão no mesmo levando a necrose das fibras musculares esqueléticas.

As lesões descritas são hemorragia, nódulos, inflamação, necrose, cistos e granulomas. Quando os parasitas migram, formam “túneis” no tecido envolvidos por reação inflamatória (YANONG, 2002).

Em um processo crônico podem ser encontradas células denominadas melanomacrófagos no tecido afetado por parasitas ou por outras causas, tais como intoxicação medicamentosa, infecção bacteriana, entre outras (DEZFULI et al., 2007). Também podem possuir as células denominadas “rodlet” (presentes no epitélio de peixes), eosinófilos e linfócitos devido ao processo inflamatório (DEZFULI et al., 2000).

2.6 ANISAQUIÁSE EM HUMANOS

A anisacíase ocorre quando o homem acidentalmente ingere larvas de anisacídeos, penetrando no trato digestivo e causando um granuloma eosinofílico que pode ocorrer na parede gástrica e intestinal, sendo o estômago o local mais frequente (KATES et al., 1973).

O primeiro relato de caso de anisacíase em humanos foi na Holanda em 1955 e foi somente relatado em 1960. A partir deste caso foi diagnosticada anisacíase em pacientes

que apresentavam dores gastrintestinais após ingestão de pescado cru ou mal passado (VAN THIEL et al., 1960).

No Japão, os pesquisadores Ishikura, Kikuchi e Nagasawa (1993) relataram 11629 casos gástricos, 567 casos intestinais e 45 casos extra-intestinais em humanos causados por anisaquídeos.

Os sintomas clínicos incluem dor gástrica ou intestinal, podendo também formar abscessos ocasionando febre. Geralmente ocorre leucocitose média, embora a eosinofilia não seja aparente. Não há tensão anormal dos músculos abdominais e não há febre. De acordo com clínicos experientes, esses sinais são importantes na distinção da anisaquíase de apendicite aguda e de obstrução interna (CHENG, 1982).

As larvas que se localizam fora do tubo digestivo provocam a formação de granulomas eosinofílicos, ocorrendo dores estomacais e vômitos cerca de quatro a seis horas após a ingestão de larvas. No estômago, as larvas invadem a mucosa e submucosa, criando túneis e galerias nos tecidos claramente observados em microscopia de varredura (EIRAS, 1994).

Após a ingestão, as larvas de anisaquídeos viáveis podem atravessar a parede gastrintestinal e causar um processo invasivo (peritonite). Também há relato de caso de artrite, asma, adenocarcinoma, pneumoperitônio, obstrução intestinal e penetração cutânea (MINETA et al., 2006; ITO et al., 2007; ISHIDA et al., 2007; ARMENTIA et al., 1998; CUENDE et al., 1998; DEARDORFF et al., 1986).

Outros órgãos também podem ser afetados, tais como língua, baço, fígado, rim, pâncreas, linfonodos, amídalas e esôfago, porém em menor frequência (MESEGUERA et al., 2007).

A anisaquíase pode ser crônica, mas é rara e o seu diagnóstico é difícil, uma vez que o título de anticorpos cai e o parasita se degenera. O paciente pode possuir neoplasia, principalmente de submucosa decorrente de anisaquíase gástrica, peritonite após perfuração do trato intestinal. Quando o diagnóstico é feito, muitas vezes a cirurgia é desnecessária (MINETA et al., 2006; ITO et al., 2007).

Atualmente, pesquisadores estão relatando casos de reações alérgicas provocadas pela ingestão de peixes bem cozidos, mas infectados. A existência do potencial alergênico do *Anisakis simplex* fez com que os pesquisadores considerassem esse agente no diagnóstico diferencial de urticária em humanos com relatos de ingestão de pescado. A severidade das reações de hipersensibilidade por alimento com antígenos ingerido varia de uma leve urticária até choque anafilático (AUDICANA et al., 1997; DAY, 1997).

Ubeira et al. (2000) e Sastre et al. (2000) contradizem Audicana et al. (1997) e Day (1997), pois afirmam que a alergia só acontecerá em caso de parasitismo ativo e não simplesmente pelo contato com alérgenos de parasitos presentes no pescado infectado.

Esse fator é explicado por Baeza et al. (2004) que relatam que a pepsina gástrica hidrolisa esses alérgenos, não causando patologia.

O diagnóstico e tratamento são feitos com auxílio de endoscópio (visualização e remoção do parasita), radiografia e técnicas cirúrgicas. Também é realizado o exame histológico do tecido inflamado para identificação do parasita (RODRÍGUEZ, 1998; UBEIRA et al., 2000).

Mineta et al. (2006) dizem que a anisacuíase humana deve ser diferenciada da doença de Chron, tuberculose intestinal, neoplasia intestinal, apendicite, diverticulite, alergia de origem alimentar e colite.

2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE

Os parasitos devem ser considerados como um perigo significativo para qualquer fase do processamento onde a medida preventiva é ou pode ser usada para eliminar ou reduzir a probabilidade de ocorrência a um nível aceitável de parasitas no pescado (FDA, 1998).

Segundo Yanong (2002) a prevenção pode ser feita pela eliminação dos hospedeiros definitivos (aves piscívoras ou mamíferos) e hospedeiros intermediários que poderão reduzir ou até eliminar a infestação.

Os Estados Unidos, com a finalidade de garantir um produto seguro para consumo, adotaram medidas específicas que incluem a implementação de boas práticas de fabricação (BPF) e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) pelos órgãos competentes (HUSS, 1992; KHAMBOONRUANG et al., 1997).

As BPF atuam em diferentes níveis para garantir inocuidade do produto, ou seja, recebem matéria-prima somente de área aprovada, avaliando também o método de captura, tamanho e tipo do pescado, bem como verificando se é realizada a evisceração a bordo (BUTT et al., 2004).

O APPCC é uma ferramenta que tem como objetivo eliminar ou reduzir os perigos a níveis aceitáveis, identificando os perigos e implementando as medidas corretivas cabíveis (ADAMS et al., 1997; HUSS, 1992; RIPPEY, 1994).

Antes de avaliar os perigos (biológico, físicos e químicos) na indústria deve-se levar em consideração o tamanho do peixe, idade, alimentação e o ambiente em que vive, pois a incidência de parasitos será maior em peixes grandes e mais velhos. Além disso, se o pescado é eviscerado logo após a captura, o número de parasitas na musculatura será menor (HOWGATE, 1998; BUTT et al., 2004).

Os parasitos podem ser detectados por uma inspeção visual com auxílio de uma mesa com incidência de luz denominada *candling-table*. Esta mesa possui algumas

limitações, ou seja, a detecção é dependente da espessura do filé, presença de pele, pigmentação e experiência do inspetor. Caso sejam encontrados, devem ser removidos e a parte afetada descartada (ADAMS et al., 1997).

Healy et al. (1984) recomendam que sejam realizadas análises microscópicas para pesquisa de formas parasitárias e alterações histopatológicas que comprometam a integridade do pescado.

A *Food and Drug Administration* (FDA, 1998) diz que as medidas preventivas para eliminar os parasitos são:

- Esterilização.
- Cocção.
- Pasteurização.
- Congelamento.
- Trituração.
- Iluminação indireta sob o produto (*candling-table*) e remoção física.
- Retirar a porção do pescado que contém o parasito.

No caso do parasito ser encontrado, pode-se utilizar a relação de tempo e temperatura ou irradiação. Isto para inativar os parasitos e dessa forma evitar uma possível zoonose ou perda econômica por ter que descartar os peixes infestados de forma maciça (FDA, 1998).

2.7.1 RELAÇÃO TEMPO E TEMPERATURA

O monitoramento deve ser feito com o uso de termômetro, sendo checada a temperatura pelo menos uma vez durante e após o término do processamento. Deve-se ainda anotar a temperatura do produto final e ver se está de acordo com o permitido pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (FDA, 1998).

Segundo Ching (1984), Jackson em 1975 advertiu que os nematódeos anisquídeos variam na habilidade para sobreviver sob baixas temperaturas. Certas espécies de anisquídeos têm sido descritas com sobrevivência por 52 horas a -20°C . Outra opção seria colocar o peixe à temperatura de -23°C (-10°F) por 60 horas.

Muitos estudos têm descrito as temperaturas e o tempo necessário para inativar os parasitos. Por exemplo, Bier (1976) indicou que 60°C (140°F) por um minuto era necessário para tornar a larva de anisquídeo inviável, enquanto Huss (2004) preconiza a temperatura de 55°C por um minuto para realizar a inativação de parasitas. Essas temperaturas não são alcançadas durante a defumação a frio do pescado e, conseqüentemente, os parasitas não são eliminados por esse processo, corroborando com Gardiner (1990), que relatou que nem a defumação a frio por 12 horas a $25,6^{\circ}\text{C}$ (78°F) e nem a refrigeração por 27 dias reduzem a

quantidade de larvas no salmão. Um resultado similar foi encontrado em sardinhas (*Clupea harengus pallasii*) do Pacífico, onde Hauck (1977) relatou que a viabilidade da larva de *Anisakis* sp depois da defumação na temperatura média de 19°C (66°F) por 24 horas foi de 100% e 87,5%, respectivamente.

Há diversos trabalhos relatando a inativação de parasitos pelo congelamento, tais como Mercado et al. (1997) que recomendam -20°C por 60 horas, Guerra et al. (1998) e Marques et al. (1995) que preconizam 0°C por 34 dias.

De acordo com Margolis (1977), cozinhar três centímetros de densidade de filés de peixe a 70°C ou 60°C por sete a dez minutos, respectivamente, inativa qualquer larva presente.

Com isso, uma das formas de se evitar as parasitoses de pescado é pela inativação das fases larvais infectantes. Howgate (1998) cita que a Diretiva FDA número 493 de 1991 recomenda o congelamento do pescado por sete dias a -20°C ou -35°C por 15 horas, enquanto que Huss (2004) recomenda um período de 24 horas a -20°C e ressalta ainda que a temperatura de 55°C por um minuto também é eficaz na inativação das formas infectantes. Isto significa que o pescado defumado a quente, pasteurizado e cozido a vácuo são seguros. Contudo, algumas tradições culinárias caseiras usuais podem não cumprir as regras de segurança.

Os parasitos podem ser inativados pelo congelamento do produto final, porém é mais apropriado congelar o produto previamente cru para posterior processamento. Os nematódeos serão encontrados quando as vísceras rompem durante o processamento e com isso, irão migrar para o músculo durante a salga ou a defumação. O resultado pode ser a presença de nematódeos na superfície do produto final, frequentemente perpendicular para a superfície (HAUCK, 1977).

No caso dos peixes grandes é importante ensinar os pescadores artesanais para que eviscerem o pescado antes de ser congelado para evitar a migração de larvas dos parasitos para a musculatura do peixe (CABRERA & SUÁREZ-OGNIO, 2002; CHING, 2001). Com isso, Dominguéz-Ortega e Martínez-Cócera (2000) recomendam que o pescado seja congelado em alto mar para diminuir os riscos dos parasitos migrarem para a musculatura.

2.7.2 IRRADIAÇÃO

A irradiação no pescado é um método efetivo na eliminação da metacercária e outros parasitos (WHO, 1995).

Estudos indicaram que para inativar *Anisakis simplex* em sardinhas, as doses teriam que ser altas, sendo que os valores seriam entre seis a dez kGy (VAN MAMEREN; HOUWING, 1968).

O motivo pelo qual a larva de anisquídeo requer doses muito altas de irradiação do que outros parasitos (por exemplo, metacercária, larva de *Trichinella*, protozoários) é que a anisquíase resulta da infestação pela larva. As doses de irradiação devem ser altas o suficiente para tornar a larva inviável. Para outros parasitos, a irradiação previne contra parasitos adultos que são os responsáveis por causar doença (FAP/IAEA, 1992).

2.7.3 SALGA

O processamento da salga para obter pescado seguro para consumo, ou seja, com parasitos inviáveis é a utilização de cloreto de sódio de 4 a 5% por mais de 17 semanas, 6 a 7% por 10 a 12 semanas ou 8 a 9% por cinco a seis semanas com utilização de 2,5 a 3% de ácido acético no tecido (HUSS, 2004).

2.7.4 CANDLING-TABLE

Segundo Dixon (2006), a *candling-table* é uma mesa que contém um vidro fosco e lâmpada fluorescente para detecção de parasitos no filé para posterior remoção da porção afetada. As especificações são as seguintes:

- Possuir um vidro com 30 x 60 centímetros e de cinco a seis milímetros de espessura.
- A lâmpada deve estar posicionada 30 centímetros abaixo do vidro.
- Intensidade de luz de 1500 a 1800 lux.
- O local da análise deve possuir iluminação de 500 lux.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A colheita das amostras foi realizada pela Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP), órgão estadual de São Paulo que realiza a recepção e distribuição do pescado para os elos que compõem a cadeia produtiva do pescado: mercados municipais, supermercados, feiras livres, entrepostos e indústrias, localizados em diferentes regiões do Estado de São Paulo, inclusive a Baixada Santista.

A Região Metropolitana da Baixada Santista é composta por nove cidades, sendo elas: Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente e conta com cerca de 1.4 milhões de habitantes (IBGE, 2000). Esta região também é conhecida como Costa da Mata Atlântica e tem grande importância histórica, econômica e turística em âmbito estadual, nacional e até mesmo internacional (CAZEIRO, 2004).

A importância econômica da Costa da Mata Atlântica está ligada também ao porto de Santos, que na atualidade, atende aos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, e países do Mercosul. É hoje o maior porto do hemisfério sul em termos de infra-estrutura e movimentação de cargas e concentra cerca de um quarto dos produtos negociados pelo país no exterior. As indústrias de Cubatão são um dos principais pólos industriais do país, exercendo assim, papel fundamental na economia nacional (CAZEIRO, 2004).

Foram obtidas 92 amostras de forma aleatória. As colheitas foram realizadas durante o período da noite pelo veterinário chefe do CEAGESP durante a descarga da matéria-prima. O amostrador utilizou um “kit” de colheita constituído por caixa isotérmica, gelo gel, sacos plásticos, etiquetas, luvas, avental e touca. O pescado amostrado foi etiquetado, sendo as amostras numeradas e datadas.

O controle da origem do pescado foi feito com a obtenção de certificado sanitário e nota fiscal de produtor, que acompanha a carga até o CEAGESP.

A unidade amostral era um pescado na forma inteira. Estas foram transportadas do ponto de colheita do CEAGESP ao Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Biológico de São Paulo nos respectivos “kits” de colheita para realização das análises parasitológica e histopatológica.

Para a análise parasitológica foram elaboradas fichas para registro dos dados (Anexo 01). Também foi feita uma ficha de colheita (Anexo 02) que consistia de informações do estabelecimento (identificação do estabelecimento, nome fantasia, registro, endereço),

condições sanitárias do pescado (temperatura, conservação) e boas práticas de manipulação (higiene pessoal, vestimenta adequada).

Para realização da análise parasitológica foi feita necropsia pela linha média do pescado (Figura 03) e em seguida, os mesmos foram filetados para posterior análise em mesa de inspeção *candling-table* (Figura 04) para possível visualização de presença de larvas e/ou cistos de parasitas. Esta mesa contém na parte superior uma superfície de vidro fosco sobre uma fonte de luz fria de 1500 lux. Sobre o vidro foram colocados os filés cortados de forma a permitir a observação de parasitas por transparência.

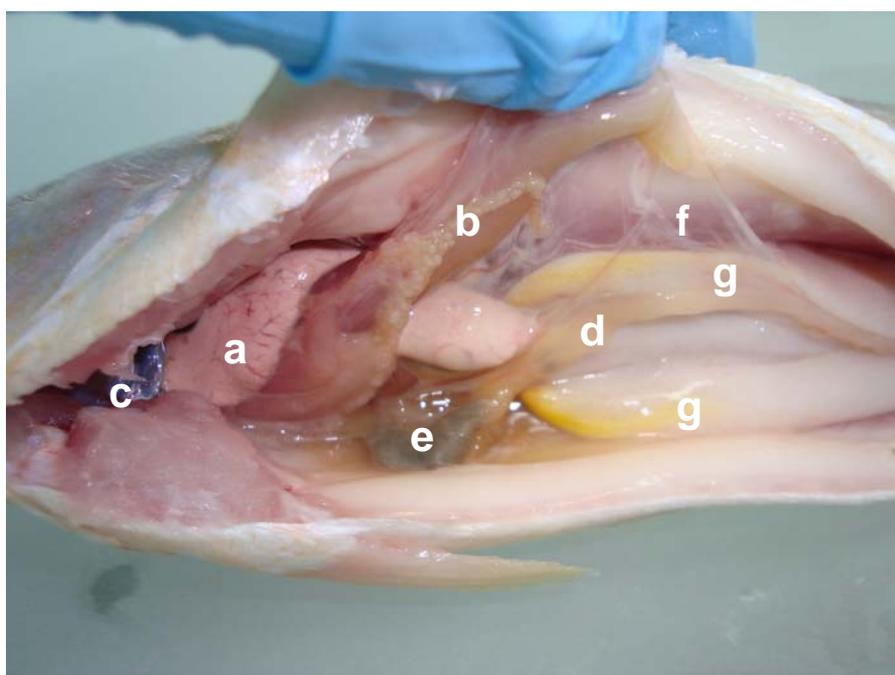


Figura 03. Visualização dos órgãos: fígado (a), estômago (b), coração (c), Intestino (d), baço (e), mesentério (f) e testículos (g) de pescada durante necropsia.

Fonte: Arquivo do autor, 2008.

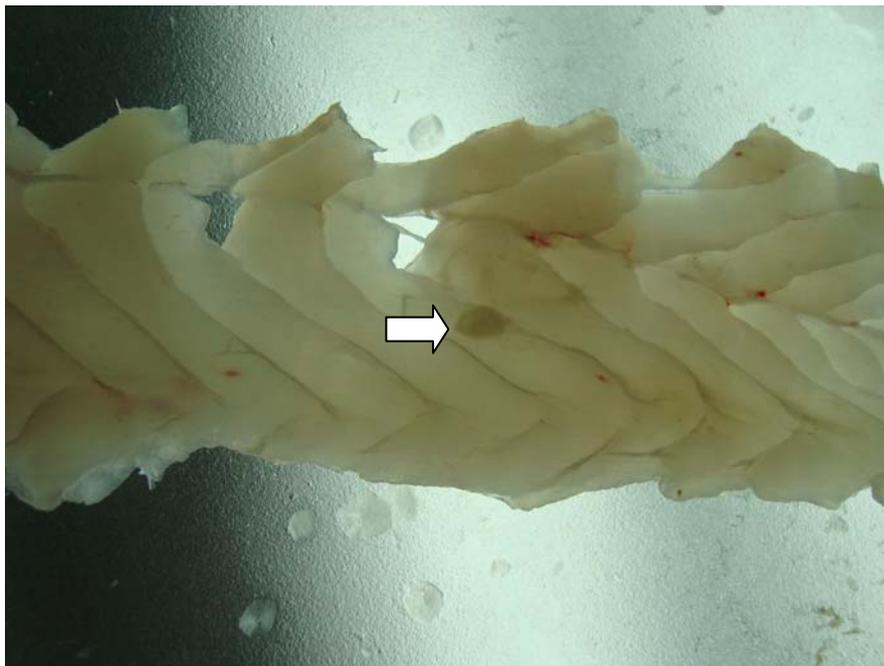


Figura 04. Visualização de cisto (seta) em musculatura com utilização de *candling-table*.

Fonte: Arquivo do autor, 2008.

Os parasitos, quando encontrados vivos na cavidade abdominal ou na musculatura, foram colhidos com pinça anatômica e colocados em uma placa de Petri com água destilada. Após esse procedimento, os parasitos eram fixados em AFA (93 partes de álcool 70°GL, cinco partes de formalina 37-40% e duas partes de ácido acético glacial) na temperatura de 65°C para facilitar a sua identificação conforme preconizado por Amato et al. (1991). No entanto, quando os parasitos estavam mortos eram fixados diretamente em AFA. Quando encontrados cistos nas vísceras e mesentérios (Figura 05), estes foram rompidos e os parasitos encontrados removidos e fixados em AFA.

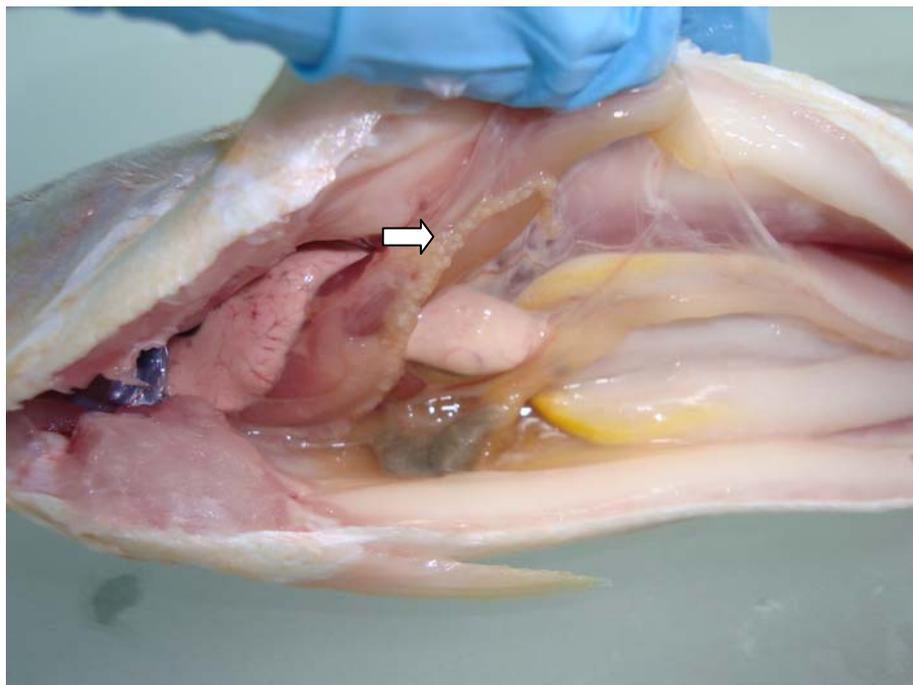


Figura 05. Presença de cistos (seta) no mesentério.

Fonte: Arquivo do autor, 2008.

Os parasitos nematódeos encontrados foram identificados conforme a técnica de Amato et al. (1991). O objetivo desta técnica é a clarificação do parasito para facilitar a sua identificação conforme descrito a seguir:

- Colocar os nematódeos vivos em placa de Petri com AFA a 65°C;
- Esfriar e deixar por 48 horas;
- Clarificar com lactofenol (50 partes de ácido láctico, 25 partes de fenol cristalizado e 25 partes de água) para realizar adequada identificação;
- Realizar montagem do parasito entre lâmina e lamínula;
- Observar em microscópio óptico comum;
- Fazer a foto documentação (10X e 20X);
- Conservar em álcool 70%.

Durante a necropsia foram colhidos fígado, rim, baço, intestino, estômago, coração e musculatura para realização da análise histopatológica. Este material foi fixado em formol tamponado por um período de 24 horas e em seguida foram feitos os cortes dos tecidos, colocados em cassete para realização de desidratação e diafanização (Anexo 03).

Após realização de desidratação e diafanização, os tecidos foram emblocados e montados em lâmina conforme descrito a seguir:

- Adicionar parafina líquida no molde;
- Colocar o tecido no molde que contém a parafina líquida;
- Identificar o molde com o número da amostra, utilizando uma tira de papel com 3 cm de comprimento por 0,5 cm de largura;
- Colocar na geladeira após secagem da parafina líquida;
- Remover o bloco do molde e retirar o excesso com auxílio de faca;
- Cortar no micrótomo com espessura de 4 μ m;
- Passar gelatina na lâmina;
- Colocar o fragmento em placa de petri com água;
- Pescar o tecido com a lâmina;
- Esticar o corte em banho-maria à 50°C;
- Deixar na estufa *overnight* para desparafinar e realizar a coloração requerida.

As colorações utilizadas foram de hematoxilina-eosina (anexo 04) pela técnica de Allen (1995) com a finalidade de observar a presença do parasito no pescado e suas alterações patológicas, e tricrômio de Masson (anexo 05) conforme descrito por Masson (1929) que auxilia a distinguir o colágeno do músculo e outros elementos histológicos (McELROY, 1995). As observações microscópicas foram registradas em ficha (Anexo 06) específica para comparar esses resultados com os encontrados na análise macroscópica.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB) e registrado sob nº 043/08 atendendo aos princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Anexo 7).

4. RESULTADOS

Das 92 amostras colhidas 56,52% (52/92) encontravam-se parasitadas (Gráfico 01), sendo 67,30% (35/52) do gênero *Contracaecum* (Figura 06), 30,76% (16/52) de *Anisakis* (Figura 07), 3,84% (2/52) de *Pseudoterranova* (Figura 08) e 9,61% (5/52) da ordem Trypanorhyncha (Figura 09, Gráfico 02). Agrupando apenas os anisacídeos (gêneros *Anisakis*, *Contracaecum* e *Pseudoterranova*), obteve-se 52,17% (48/92) de amostras positivas.

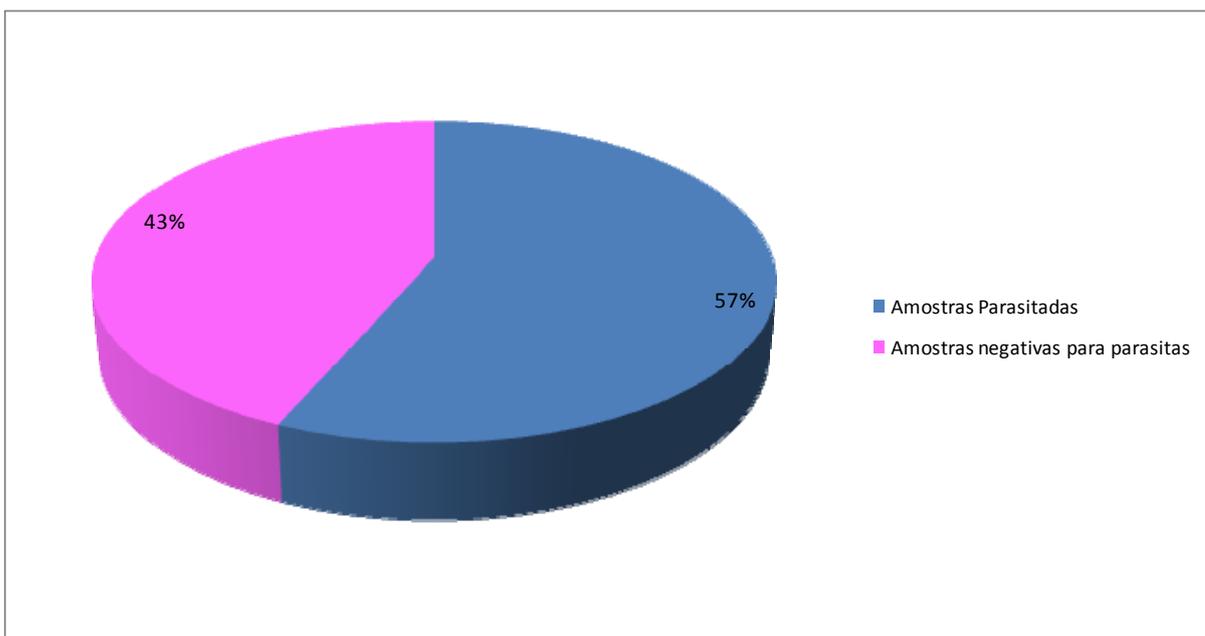


Gráfico 01. Porcentagem de amostras positivas e negativas para parasitos.

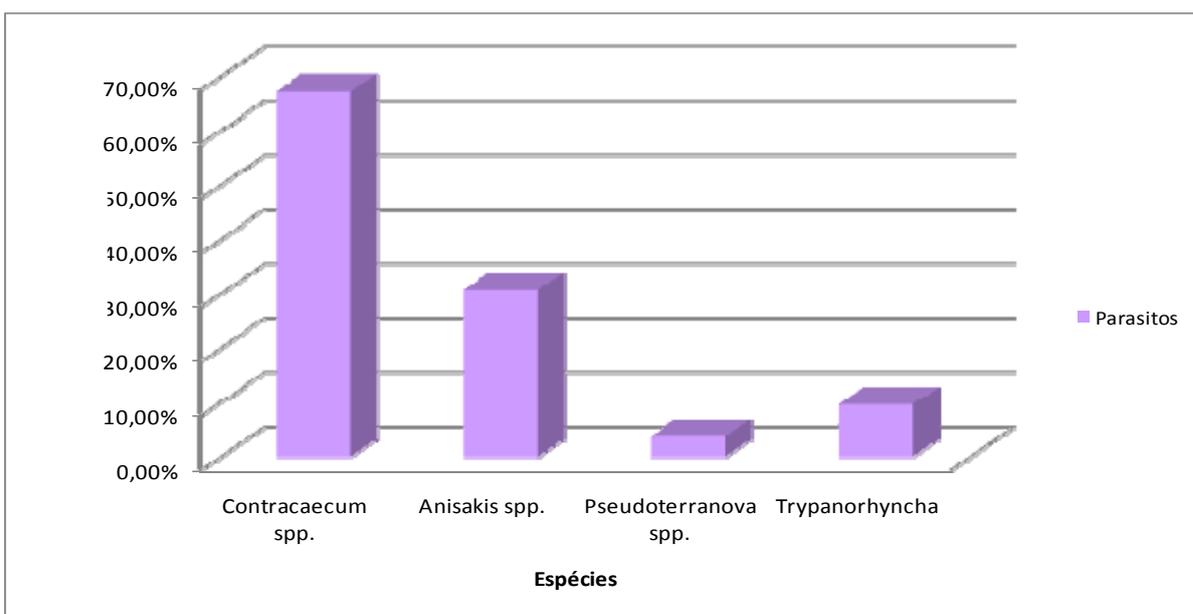


Gráfico 02. Prevalência de parasita em relação às amostras parasitadas.

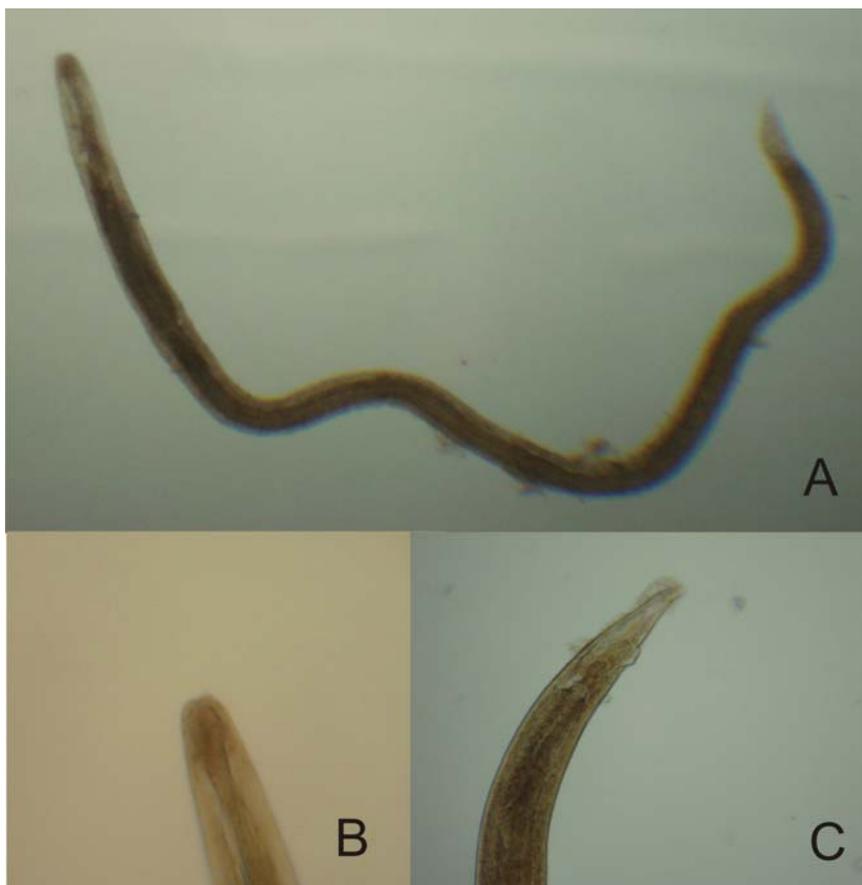


Figura 06. Observa-se através de microscopia óptica comum parasita do gênero *Contracaecum* (A), extremidade anterior (B) e posterior (C). Aumento de 40 X.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

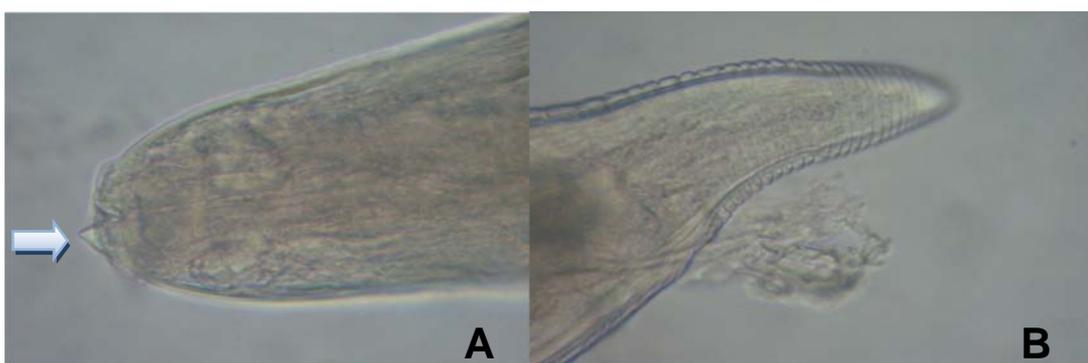


Figura 07. Observa-se em microscopia óptica comum extremidade anterior (A) com presença de mucron (seta) e extremidade posterior (B) de *Anisakis* spp. Aumento de 100 X.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

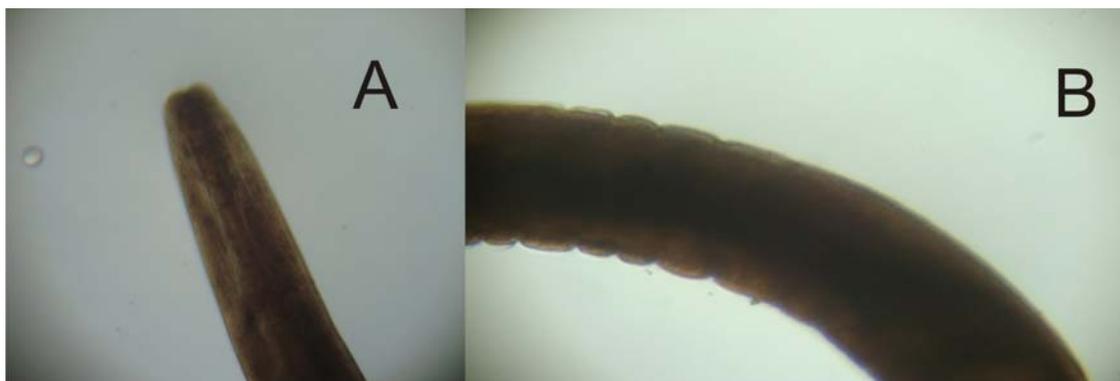


Figura 08. Observa-se em microscopia óptica comum extremidade anterior (A) e corpo com vilosidade (B, seta) de *Pseudoterranova* spp. Aumento de 100 X.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.



Figura 09. Observa-se em microscopia óptica comum extremidade anterior do parasita da ordem Trypanorhyncha.

Aumento 100 X.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

Em relação ao tecido infestado, observou-se na macroscopia maior parasitismo no mesentério 90,38% (47/52), seguido por musculatura 9,61% (5/52), fígado 5,76% (3/52) e estômago 5,76% (3/52) (Gráfico 03).

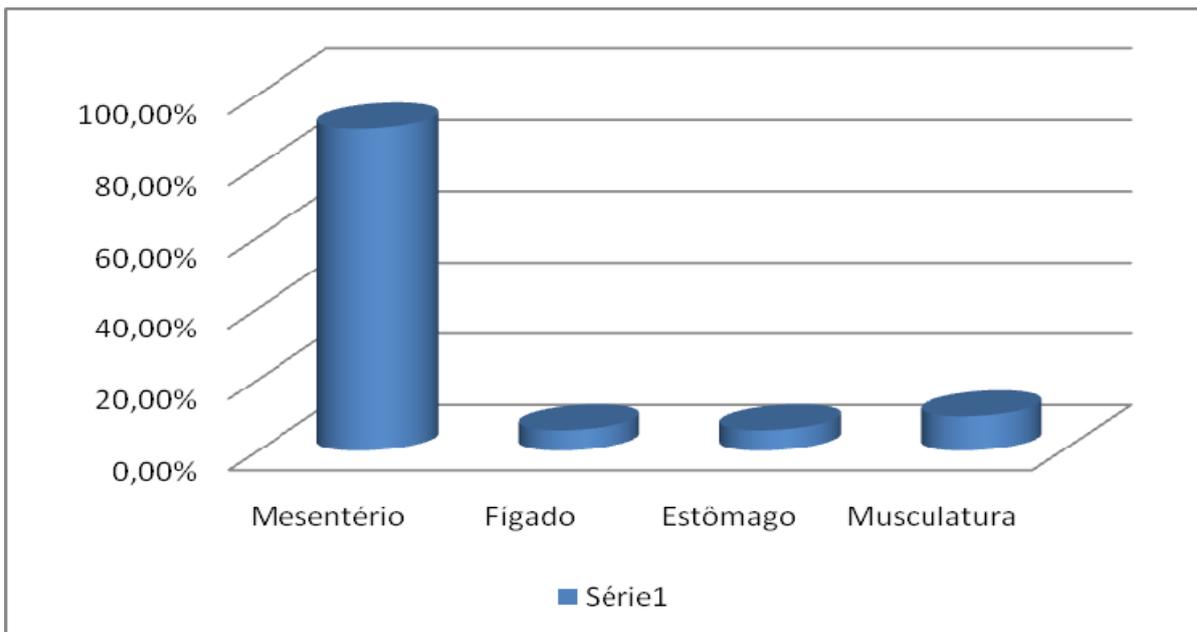


Gráfico 03. Prevalência de infestação de parasitas por tecido.

Conforme o gráfico 04 observa-se maior prevalência de parasitas em machos 61,53% (32/52) do que em fêmeas 38,46% (20/52).

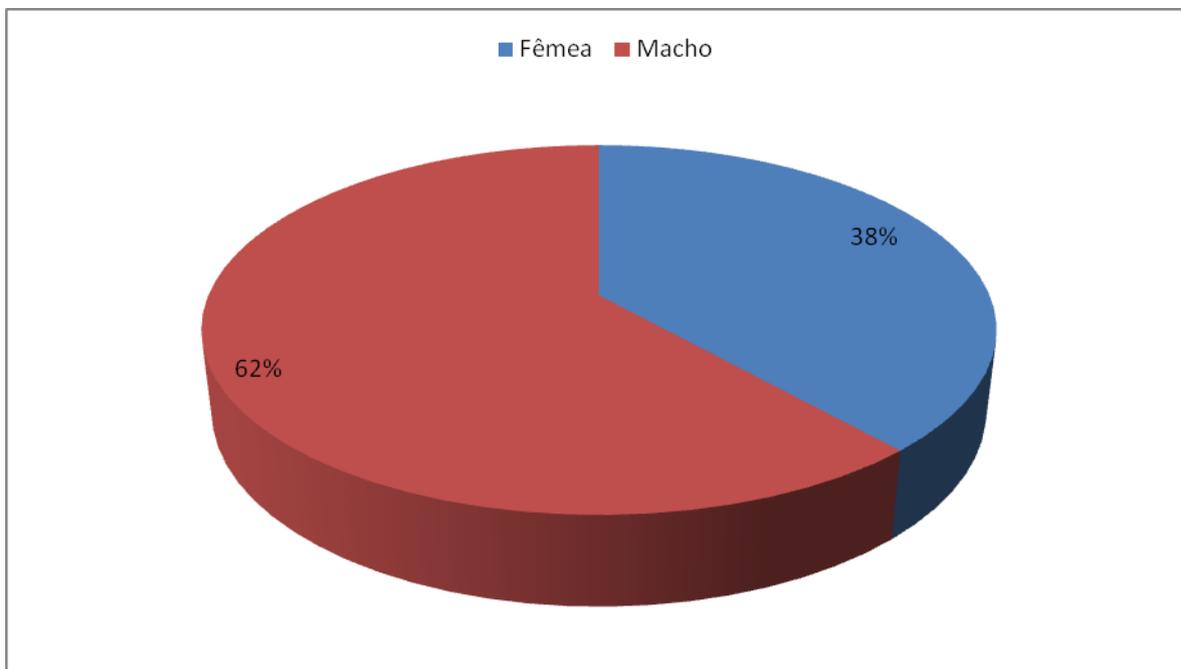


Gráfico 04. Prevalência de parasitismo em relação ao sexo do pescado.

As alterações histopatológicas (Figuras 10, 11, 12 e 13) são descritas na tabela abaixo:

Tabela 01. Porcentagem de lesões histopatológicas em relação aos tecidos analisados. (São Paulo, 2009).

Órgão	Necrose de coagulação	Necrose de caseificação	Presença de parasito	Presença de parasito com cápsula	Presença de parasito sem cápsula	Hiperplasia de polpa branca	Rarefação	Hiperemia	Presença de melanomacrófagos	Degeneração vacuolar	Trombo	Congestão	Infiltrado inflamatório mononuclear
Fígado	65,21% (60/92)	0% (0/92)	31,52% (29/92)	37,93% (11/29)	62,06% (18/29)	0% (0/0)	0% (0/92)	0% (0/92)	30,43% (28/92)	26,08% (24/92)	5,43% (5/92)	11,95% (11/92)	3,26% (3/92)
Baço	57,60% (53/92)	0% (0/92)	6,52% (6/92)	50% (3/6)	50% (3/6)	2,71% (2/92)	73,91% (68/92)	0% (0/92)	36,95% (34/92)	2,17% (2/92)	1,08% (1/92)	2,17% (2/92)	3,26% (3/92)
Coração	56,52% (52/92)	0% (0/92)	0% (0/92)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)	30,43% (28/92)	0% (0/92)	52,17% (48/92)	5,43% (5/92)	0% (0/92)	0% (0/92)	11,95% (11/92)
Intestino	70,65% (65/92)	1,08% (1/92)	29,34% (27/92)	18,51% (5/27)	85,18% (23/27)	0% (0/0)	15,21% (14/92)	3,26% (3/92)	27,17% (25/92)	0% (0/92)	0% (0/92)	1,08% (1/92)	21,73% (20/92)
Estômago	44,56% (41/92)	1,08% (1/92)	45,65% (42/92)	90,47% (38/42)	9,52% (4/42)	0% (0/0)	8,69% (8/92)	3,26% (3/92)	27,17% (25/92)	1,08% (1/92)	0% (0/92)	4,34% (4/92)	11,95% (11/92)
Musculatura	100% (92/92)	1,08% (1/92)	3,26% (3/92)	33,33% (1/3)	66,66% (2/3)	0% (0/0)	80,43% (74/92)	36,95% (34/92)	35,86% (33/92)	0% (0/92)	0% (0/92)	1,08% (1/92)	11,95% (11/92)
Rim	100% (92/92)	1,08% (1/92)	0% (0/92)	0% (0/0)	0% (0/0)	0% (0/0)	23,91% (22/92)	44,56% (41/92)	38,04% (35/92)	3,26% (3/92)	10,86% (10/92)	0% (0/92)	76,08% (70/92)

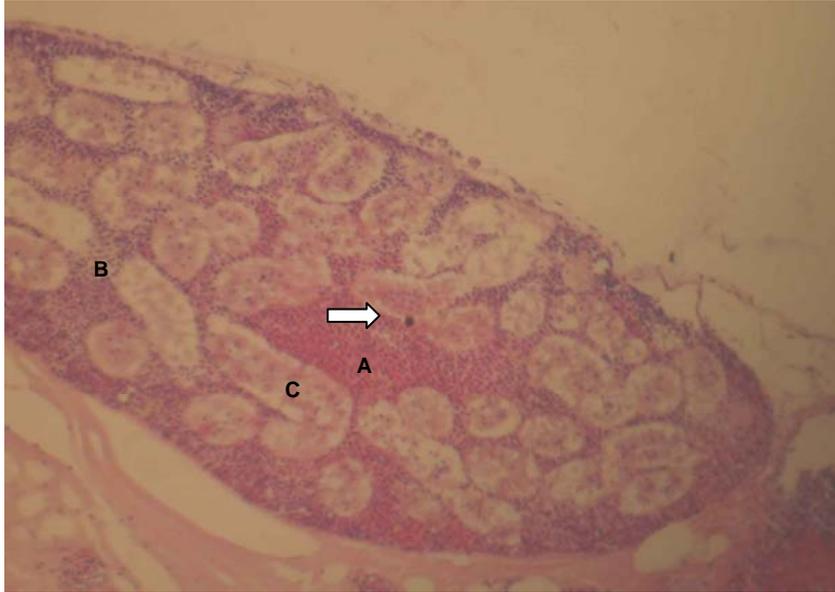


Figura 10. Observa-se presença de melanomacrófago (seta), hiperemia (A), infiltrado inflamatório mononuclear (B) e necrose de coagulação (C) em tecido renal. Aumento 100X. HE.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

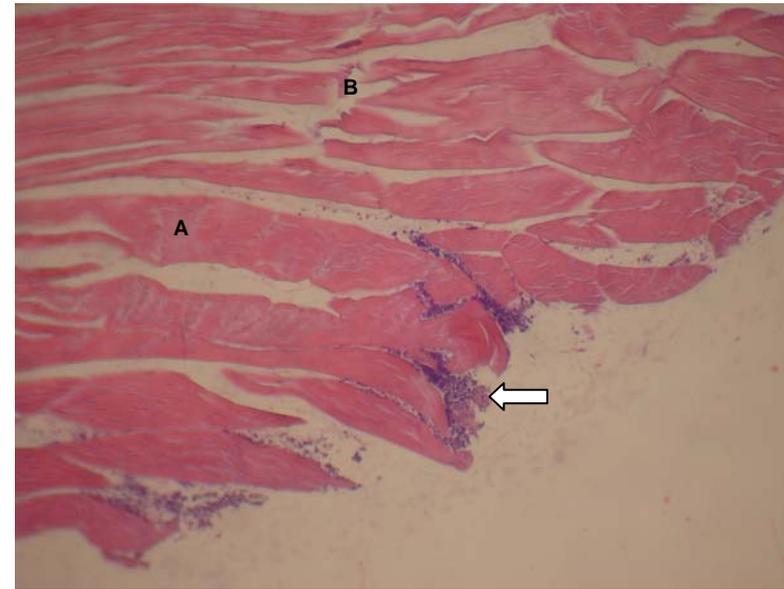


Figura 11. Observa-se infiltrado inflamatório mononuclear (seta), necrose de coagulação (A) e rarefação (B) em tecido muscular. Aumento 100X. HE.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

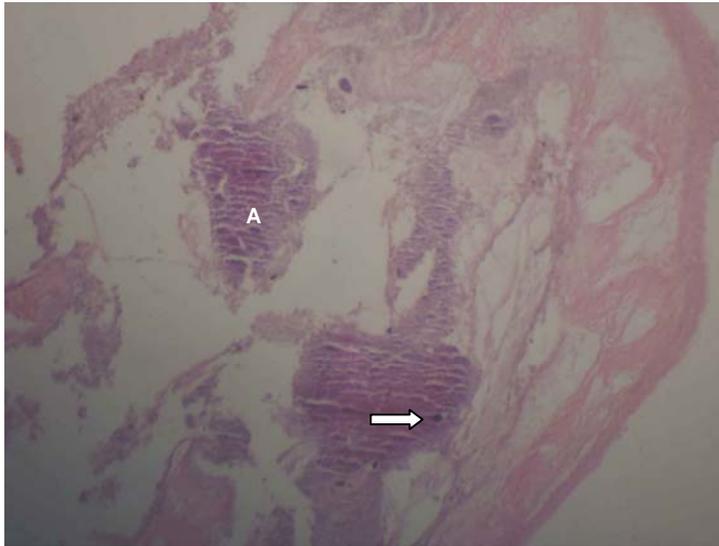


Figura 12. Observa-se necrose de caseificação (A) e presença de melanomacrófagos (seta) em intestino. Aumento 100X. HE.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

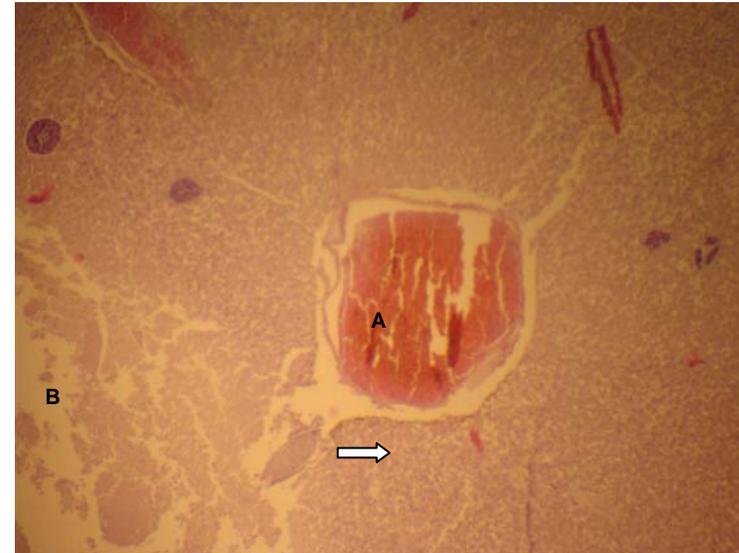


Figura 13. Presença de trombo (A), rarefação (B) e degeneração vacuolar (seta). Aumento 100X. HE.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

Alterações encontradas nos tecidos parasitados (Figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21) são mostradas na tabela abaixo:

Tabela 02. Porcentagem de lesões observadas em tecidos parasitados. (São Paulo, 2009).

Órgão	Presença de parasito	Infiltrado inflamatório mononuclear	Necrose de coagulação	Hiperemia	Degeneração vacuolar	Presença de melanomacrófagos
Fígado	31,52% (29/92)	0% (0/29)	68,96% (20/29)	3,44% (1/29)	27,58% (8/29)	24,13% (7/29)
Baço	6,52% (6/92)	33,33% (2/6)	50% (3/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	50% (3/6)
Intestino	29,34% (27/92)	14,81% (4/27)	74,07% (20/27)	3,70% (1/27)	0% (0/27)	11,11% (3/27)
Estômago	45,65% (42/92)	7,14% (3/42)	23,80% (10/42)	0% (0/42)	0% (0/42)	35,71% (15/42)
Musculatura	3,26% (3/92)	33,33% (1/3)	100% (3/3)	66,66% (2/3)	0% (0/3)	0% (0/3)

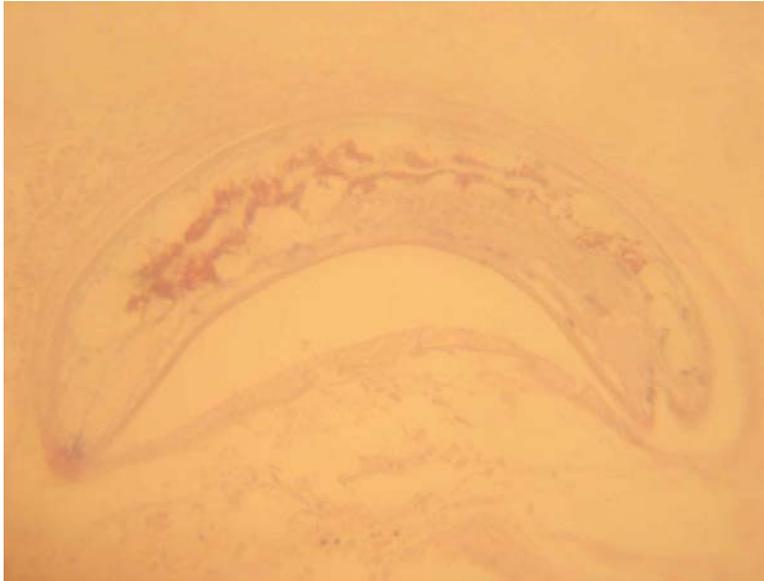


Figura 14. Presença de parasita nematódeo em tecido gástrico. Aumento 100X. Tricrômio de Masson.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

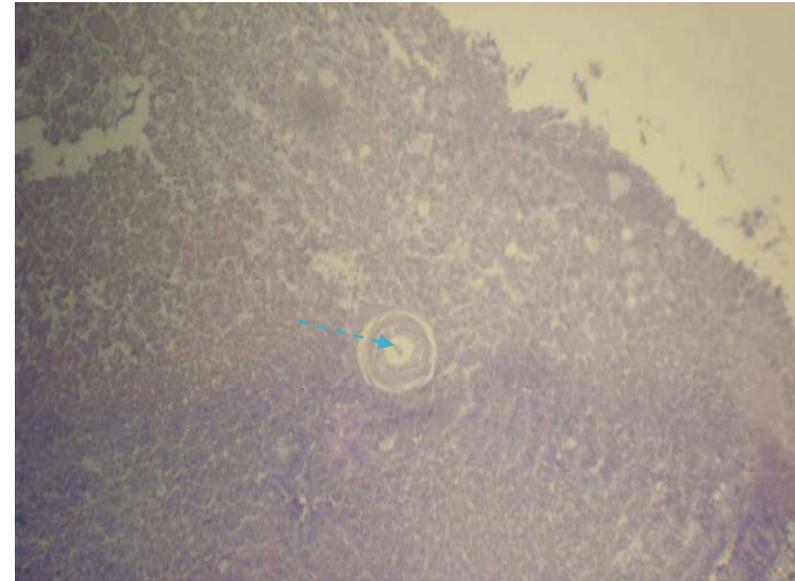


Figura 15. Presença de parasito em tecido hepático. Observa-se mucron no seu interior (seta). Aumento 40X. Tricrômio de Masson.

Fonte: Arquivo do autor, 2009

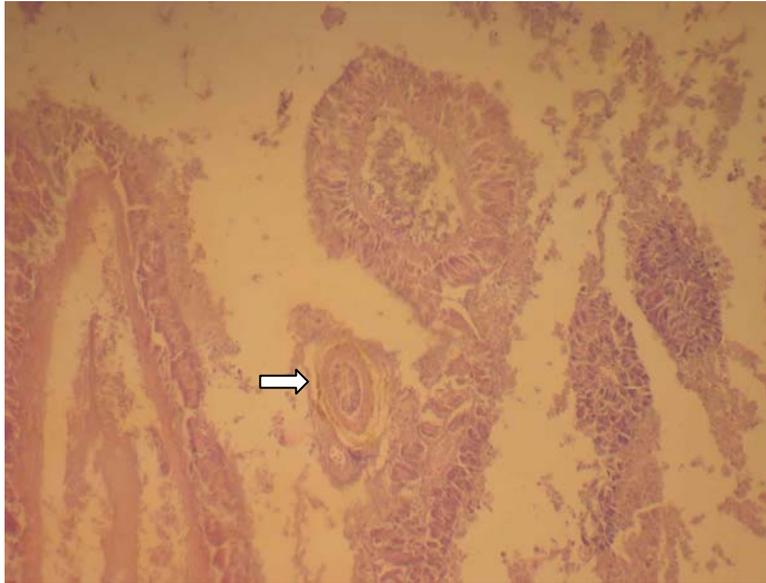


Figura 16. Observa-se parasita circunscrito de melanomacrófagos (seta) em tecido hepático. Aumento 100X. HE.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

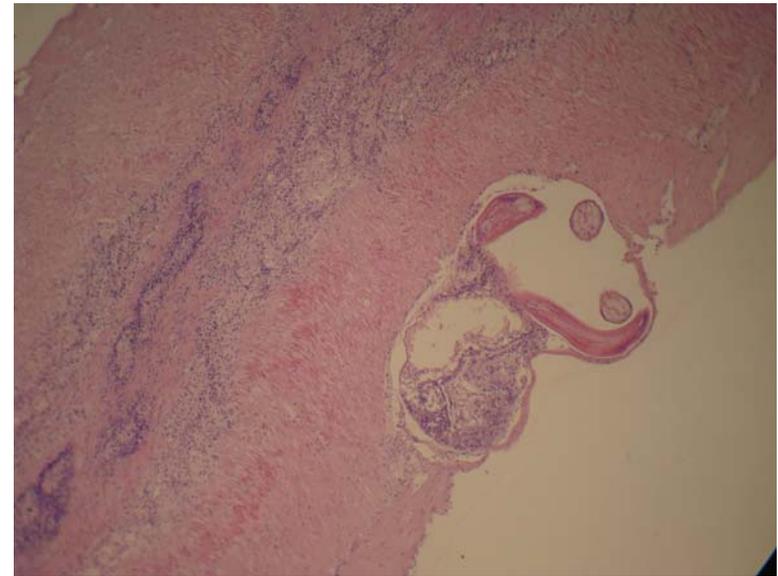


Figura 17. Presença de parasitos na serosa intestinal. Aumento 100X. HE.

Fonte: Arquivo do autor, 2009

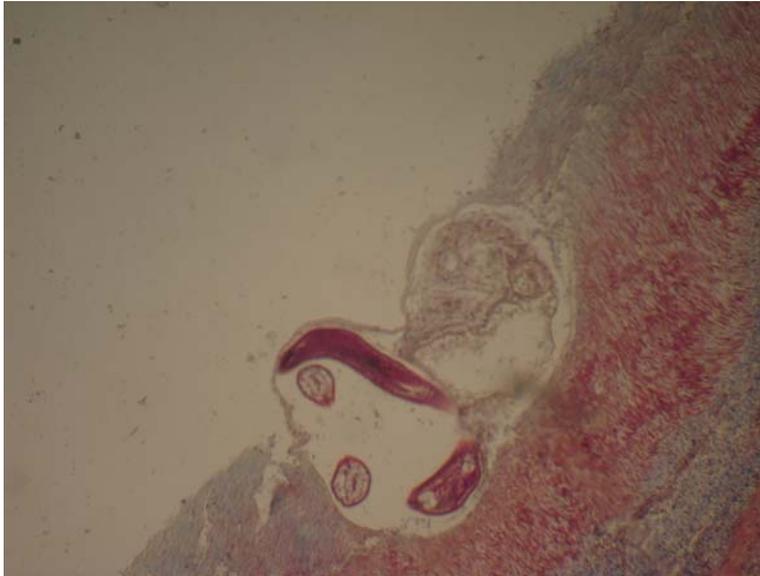


Figura 18. Presença de parasito na serosa intestinal.
Aumento 100X. Tricrômio de Masson.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

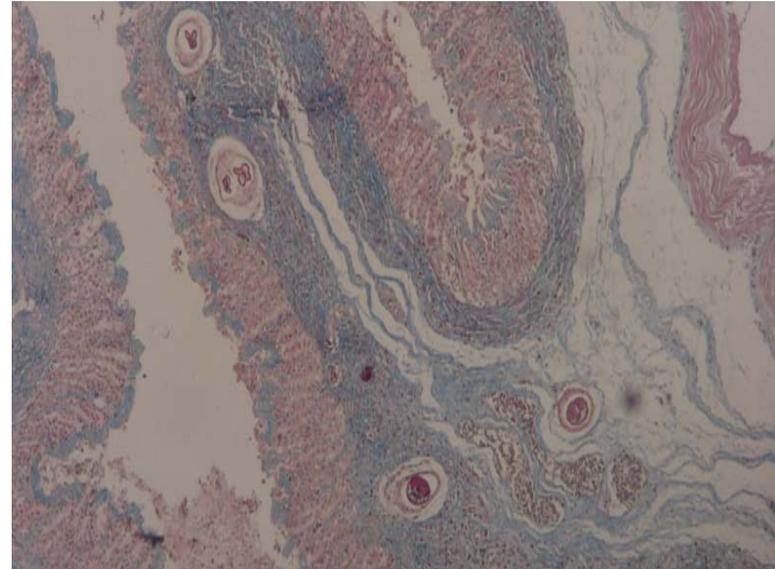


Figura 19. Presença de parasito envolto por cápsula de tecido conjuntivo em tecido gástrico. Aumento de 100X.
Tricrômio de Masson.

Fonte: Arquivo do autor, 2009

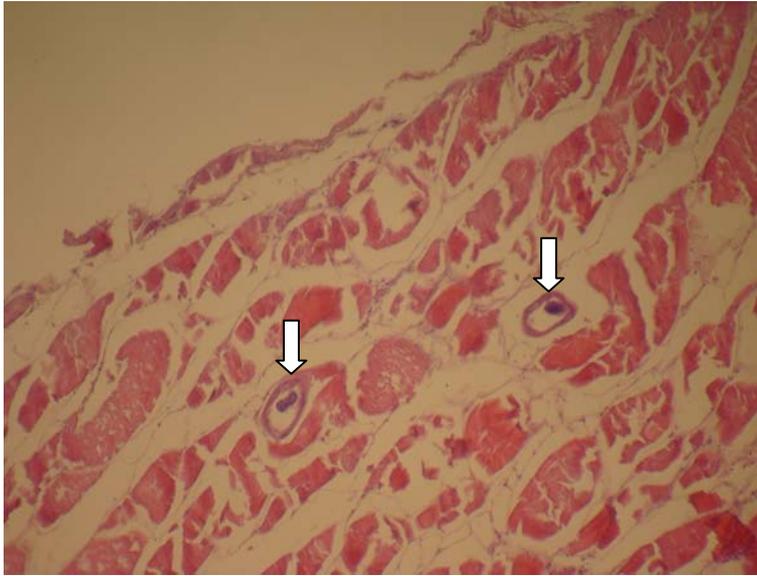


Figura 20. Presença de parasitas (seta) na musculatura.

Aumento 40X. HE.

Fonte: Arquivo do autor, 2009.

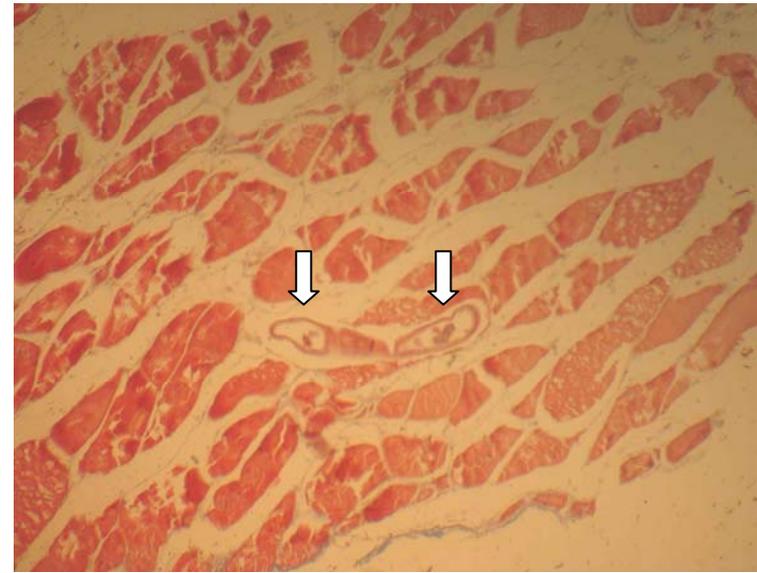


Figura 21. Presença de parasitas (seta) na musculatura.

Aumento 40X. Tricrômio de Masson.

Fonte: Arquivo do autor, 2009

Das 78 amostras parasitadas, 79,34% (73/92) foram detectadas por análise microscópica e 56,52% (52/92) por análise macroscópica conforme demonstrado pelo Gráfico 05. Levando em consideração os anisquídeos (gêneros *Anisakis*, *Contraecum* e *Pseudoterranova*), pela macroscopia foi observada prevalência de 52,17% (48/92) de amostras positivas.

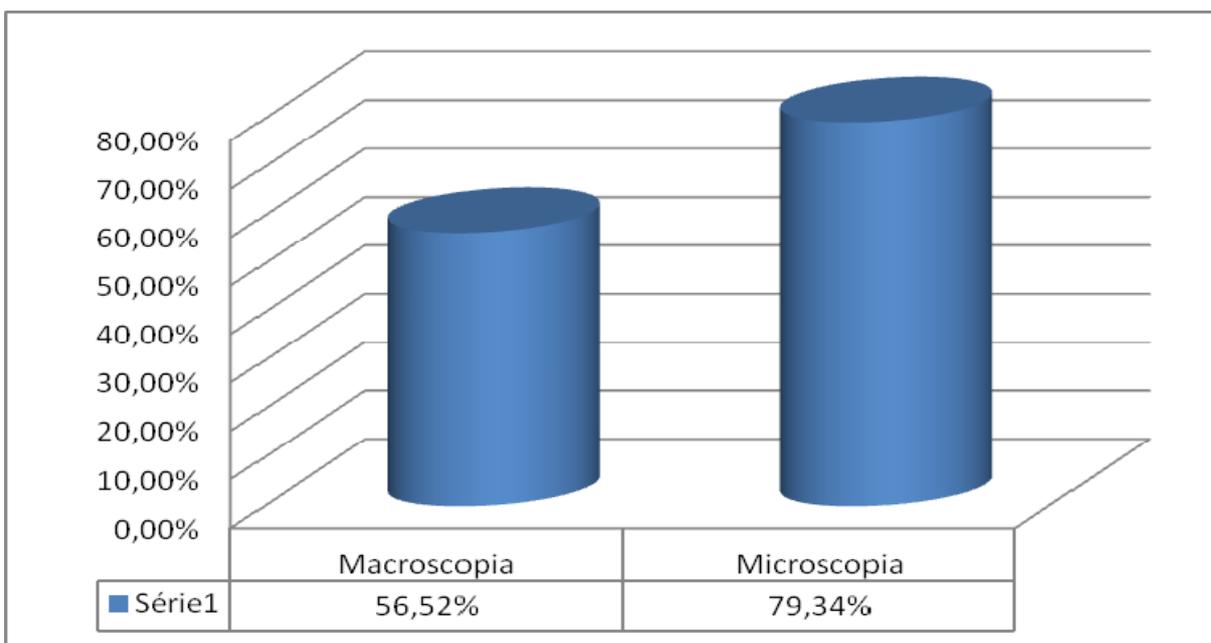


Gráfico 05. Detecção de parasitos por meio de análise macroscópica e microscópica.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho encontrou alta prevalência de nematódeos da família Anisakidae em pescada, enquanto que Pacini et al. (1993) observaram parasitas em peixe fresco (54%), congelado (28%) e defumado (75%). Observaram também que todas as larvas das amostras congeladas estavam mortas, demonstrando que o congelamento e a defumação utilizadas foram eficientes para inativação de tais parasitas.

Embora Molina et al. (2000) tenha encontrado prevalência de 26% e Alexandrino de Pérez et al. (2007) em um estudo realizado sobre a caracterização higiênico-sanitária do pescado comercializado na Baixada Santista, encontraram 18,79% (25/133) de anisacídeos em pescada, o presente trabalho observou 56,52% (52/92) nesta espécie de pescado, demonstrando que há a necessidade de realização de pesquisa parasitológica com o peixe da costa brasileira para fornecer subsídio para a Inspeção Sanitária garantir um alimento seguro para consumo. Esta diferença pode-se dar pela espécie de pescada analisada, bem como da área de captura do pescado, pois se nessa região não possuir o mamífero marinho que é o hospedeiro definitivo, provavelmente esse pescado não terá infestação por tais parasitas.

Segundo pesquisa realizada em bacalhau comercializado no Estado de São Paulo, nove (40,91%) das 22 amostras foram condenadas por conter larvas de nematóides (ALVES et al., 2004). Ainda relatam que do total de amostras de bacalhau, seis apresentavam larvas da família Anisakidae, demonstrando mais uma vez uma alta prevalência de parasitose. Também foram observados anisacídeos nessa mesma espécie de peixe com prevalência de 12%, sendo que o parasito identificado foi do gênero *Contracaecum* sp. Considerando a legislação do Ministério da Agricultura para o pescado curado, a mesma considera alterado o peixe que apresentar larvas ou parasitas e em relação ao Decreto da Lei Estadual de São Paulo nº 12.486 de Outubro de 1978 para conserva de pescado, a mesma exige ausência de sujidade, parasitas e larvas.

Pesquisa realizada por Ribeiro et al. (2002) no litoral do Estado do Rio de Janeiro revelou que o peixe maria-luiza (*Paralichthys brasiliensis*) teve uma prevalência de 63,5% de *Contracaecum* sp no mesentério, corroborando com os resultados do presente trabalho, porém os autores não relatam a ocorrência na musculatura. No entanto, Knoff et al. (2004) analisaram 38 peixes da espécie congro-rosa (*Genypterus brasiliensis*), sendo que apenas um apresentou larvas de *Anisakis* sp na musculatura.

Knoff et al. (2001) também detectaram maior parasitismo em machos do que em fêmeas, porém os autores ainda afirmam que em algumas espécies de parasitas pode ocorrer maior prevalência em fêmeas.

Sabater e Sabater (2000) e Gonzales et al. (2001) relataram que a visualização de lesões macroscópicas observadas nos peixes são cistos com conteúdo seroso e o parasita na fase L3.

Este trabalho detectou com auxílio da *candling-table* cinco amostras de músculo parasitadas, corroborando com Myers (1976) e Silva e São Clemente (2001) que recomendam o seu uso para detecção de larvas de parasitas em filés de peixes nas linhas de produção das indústrias. Porém, deve-se lembrar que a eficácia deste equipamento depende da espessura e pigmentação do filé. Esta técnica é considerada ineficiente na detecção de parasitas e não pode ser utilizada para outros produtos, assim como lombo e postas, que são cortes espessos, dificultando a inspeção destes produtos (DIXON, 2006).

O *Codex Alimentarius* (1999) diz que a presença de dois ou mais parasitos por quilo de unidade de amostra, quando apresentar uma cápsula de mais de três mm de diâmetro ou se não for encapsulado e tiver mais de 10 mm de comprimento, comprometem a qualidade do pescado demonstrando a importância deste trabalho para garantir um alimento seguro para consumo.

A legislação da Comunidade Européia (Diretiva do Conselho 91/493, Decisão da Comissão de 19 de janeiro de 1993, Diretiva 93/143) não permite a comercialização de pescado ou parte dele que apresentem parasitos e informa quais devem ser os controles visuais para detecção de tais parasitos, estabelecendo obrigatoriedade de congelamento de -20°C por 24 horas para todos os produtos da pesca destinados ao consumo cru.

No Brasil, o Regulamento de Inspeção Industrial Sanitário de Produtos de Origem Animal, no artigo 445 cita que o pescado que apresentar infestação muscular maciça por parasitas que possam prejudicar ou não a saúde do consumidor deve ser condenado (BRASIL, 1952). No entanto, sabe-se que a presença de somente um anisquídeo mesmo inativado tem potencial alergênico e essa legislação não define o que seria infestação maciça, dificultando a ação do inspetor. Por isso, se faz necessário o remanejamento de tal legislação para evitar interpretações errôneas e dessa forma garantir um alimento seguro para consumo.

Corroborando com trabalhos realizados por Hauck e May (1977) e Dezfuli et al. (2007), a lesão histopatológica mais encontrada foi a formação de tecido capsular fibroso que circunscreve o estágio L3, contendo linfócitos e/ou melanomacrófagos, podendo também estas últimas células estarem agregadas ao redor do parasita ou próximo a ele. Vale ressaltar que a presença de melanomacrófagos pode ocorrer devido à infecção parasitária, justificando a presença destas nos tecidos analisados.

Dick (1987 a, b) relatou a ocorrência de *Contracaecum* sp no coração de um peixe espinho (*Pungitius pungitius*), observando ao exame histopatológico intensa reação

inflamatória ao redor do nematódeo. Essas alterações também foram encontradas quando o órgão afetado continha parasitas.

A presença de uma cápsula de tecido conjuntivo circunscrevendo o parasita nos tecidos do pescado observada em alguns cortes histológicos neste trabalho também foi visualizada por Margolis (1970), Hauck e May (1977), Torres e Gonzalez (1978), Elarifi (1982) e Eiras e Rego (1987). Porém na musculatura observou-se que 66,66% (2/3) das amostras não estavam envolvidas por uma cápsula de tecido conjuntivo (coloração Tricrômio de Masson), sugerindo que a migração ocorreu após a morte do animal. De acordo com Howgate (1998) e Butt et al. (2004), se o pescado é eviscerado logo após a captura, o número de parasitas na musculatura será menor, isto porque os parasitas se encontram nas vísceras, não tendo tempo para migrar para o músculo. Com base nessas informações, pode-se concluir que nesse caso a evisceração é um ponto crítico de controle, pois se não for realizada de forma adequada, os parasitas podem migrar para a musculatura, sendo um problema de saúde pública.

Também foi observado que somente a análise macroscópica não é suficiente para detecção de parasitas no pescado, pois nesta pesquisa observou-se que 56,52% (52/92) das amostras colhidas encontravam-se parasitadas pelos gêneros *Contracaecum*, *Anisakis*, *Pseudoterranova* e ordem Trypanorhyncha, pela macroscopia e 79,34% (73/92) pela microscopia, demonstrando que poderia estar sendo comercializado pescado com parasitas, não garantindo, desta forma, um alimento seguro para consumo.

Segundo Ubeira et al. (2000) e Ferrer (2001), os riscos sanitários devem ser minimizados com a contribuição das autoridades sanitárias para se obter um produto inócuo para consumo, porém também citam que é necessário alertar aos consumidores os riscos de consumir pescado cru.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que o pescado da família Scianidae (pescada) comercializado na Baixada Santista/SP possui alto índice de parasitose por anisquídeos - 52,17% (48/92) que contemplou os gêneros *Anisakis*, *Contracaecum* e *Pseudoterranova*, necessitando informar ao consumidor o risco potencial em se ingerir esse alimento na forma crua ou insuficientemente cozida, tendo em vista que esses parasitos são zoonóticos.

No caso de estabelecimentos que vendem pescado para ser consumido cru, devem garantir ausência de parasitos mediante controle macroscópico (inspeção com auxílio de *candling table*) e microscópico (análise histopatológica) periodicamente.

Pode-se sugerir que sejam incluídas análises histopatológicas como análise obrigatória para complementar a análise macroscópica utilizada pelo inspetor, com a finalidade de conhecer o grau de infestação do pescado, selecionando o fornecedor e garantindo maior segurança do produto. Também realizar treinamento de pescadores para realização de evisceração completa a bordo para evitar que parasitos migrem para a musculatura, sendo o principal ponto crítico de controle relacionado à presença do anisquídeo na musculatura do pescado. Outro fator que não foi analisado neste estudo é a área de captura do pescado, pois se este estiver em uma localidade em que tenha o hospedeiro definitivo, terá probabilidade alta de estar parasitado, oferecendo risco no consumo destes de forma crua ou insuficientemente cozida.

Caso a evisceração não seja possível, esclarecer aos colaboradores que a evisceração deve ser completa e também deve ser feita a inspeção com auxílio de *candling-table* do produto em processamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Washington, D. C.; **Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica**, 2ª ed., 1986. 989p.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. In: _____. Zoonosis y enfermedades transmisibles communes al hombre y a los animales. **Editora Organização Panamericana de la Salud**, 2ª ed., p. 784-790, 1989.

ADAMS, A. M.; MURREL, K. D.; ROSS, J. H. Parasites of fish and risks to public health. **Revue Scientifique et Technique**, v. 16, n. 2, p. 652-660, 1997.

ADROHER, F. J.; VALERO, A.; RUIZ-VALERO, J.; IGLESIAS, L. Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). **Parasitology Research**, v. 82, n. 4, p. 319-322, 1996.

ALEXANDRINO de PÉREZ, A. C.; NEIVA, C. R. P.; FURLAN, E. F.; LEMOS NETO, M. J.; LOPES, R. G.; TOMITA, R. Y.; MACHADO, T. M.; OKUMURA, M. P. M.; RODRIGUES, M. V.; CORRÊA, A. M.; SÃO CLEMENTE, S. C. Pescado comercializado na baixada santista: aspectos parasitológicos. In: CONBRAVET, 34., 2007, Santos. **Resumos...** Santos: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2007. p. 54.

ALLEN, T. C. Hematoxilina y eosina. In: PROPHET, E.B. et al. (Eds.). **Métodos Histotecnológicos**. Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos de América, 1995. cap. 9, p. 55-60, 1995.

ALVES, D. R.; PARAGUASSÚ, A. R.; LUQUE, J. L. Metazoários parasitos de abrótea, *Urophycis brasiliensis* (KAUP, 1858), (OSTEICHTHYES: PHYCIDAE) do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 2, p. 49-55, 2004.

AMATO, J. F. R.; AMATO, S. B. *Sulcascaaris sulcata* (Nematoda, Anisakinae) infecting sea scallops being exposted from southeastern Brazil. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 5, n. 1, p. 61-67, 1982.

AMATO, J. F. R.; BARROS, G. C. Anisakíase humana no Brasil – problema inexistente ou não pesquisado. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 1, p. 12, 1984.

AMATO, J. F. R.; BOEGER, W. A.; AMATO, S. B. **Protocolos para Laboratório – Coleta e Processamento de Parasitos de Pescado**. Ed.1, p. 14-32, 1991.

ANDERSON, R. C. The origins of zooparasitic nematodes. **Canadian Journal of Zoology**, v. 62, n. 3, p. 317-328, 1984.

ARMENTIA, A.; LOMBARDERO, M.; CALLEJO, A. Occupational asthma by *Anisakis simplex*. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, n. 5, p. 831-834, 1998.

AUDICANA, L., AUDICANA, M. T.; CORRES, F. L.; KENNEDY, M. W. Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. **The Veterinary Record**, v. 140, n. 9, p. 235, 1997.

BAEZA, M. L.; RODRIGUEZ, A.; MATHEU, V.; RUBIO, M.; TORNERO, P.; BARRIO, M.; HERRERO, T.; SANTAOLALLA, M.; ZUBELDIA, J. M. Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. **Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 34, n. 2, p. 296-302, 2004.

BARROS, G. C. Larvas de anisakídeos de peixes economicamente importantes da costa do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 16, n. 5, p. 205-208, 1994.

BARROS, G. C.; CAVALCANTI, W. J. Larvas infectantes de anisakídeos em peixes de elevado consumo provenientes do litoral nordeste do Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n. 58, p. 71-75, 1998.

BERG, L. S. System der rezenten und fossilen Fischartigen und Fische. **VEB Verlag der Wissenschaften**, Berlin, 1958.

BICUDO, A. J. A.; TAVARES, L. E. R.; LUQUE, J. L. Larvas de Anisakidae (Nematoda: Ascaridoidea) parasitas da cabrinha *Prionotus punctatus* (Bloch, 1793) (Osteichthyes: Triglidae) do litoral do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 14, n. 3, p.109-118, 2005.

BIER, J. W. Experimental *Anisakis*: cultivation and temperature tolerance determination. **Journal Milk Food Technol**, v. 39, n. 2, p.132, 1976.

BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de Março de 1952, alterado pelo Decreto nº 6385, de 27 de Fevereiro de 2008). **Leis, Decretos, etc.** Brasília, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1952. 154p.

BUTT, A. A.; ALDRIDGE, K. E.; SANDERS, C. V. Infections related to the ingestion of seafood. Part 1: viral and bacterial infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 201-212, 2004.

CABRERA, R.; SUÁREZ-OGNIO, L. Probable emergencia de anisakiosis por *Anisakis physeteris* durante el fenómeno "El Nino" 1997-1998 em la costa peruana. **Parasitology Latino American**, v. 57, p. 166-170, 2002.

CABRERA, R., LUNA-PINEDA, M.; SUÁREZ-OGNIO, L. Nuevo caso de infección humana por una larva de *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Anisakidae) em el Peru. **Veterinary Gastroenterology**, v. 23, p. 217-220, 2003.

CAZEIRO, A. C. M. **Região Metropolitana da Baixada Santista: Caracterização Geral**. 2004. Disponível em: <<http://www.etur.com.br/conteudocompleto.asp?IDConteudo=3324>> Acesso em: 23 fev. 2010.

CDC. **Anisakiasis**. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Anisakiasis.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2008.

CHENG, T. C. Anisakiasis. In: CRC handbook. **Series in Zoonosis: parasitic zoonosis**. Boca Raton, Florida: CRC Press, v. 2, p. 37-54, 1982.

CHING, H. L. Fish tapeworm infections (Diphyllobothriasis) in Canada, particularly British Columbia. **Canadian Medical Association Journal**, v. 130, n. 9, p. 1125-1127, 1984.

CODEX ALIMENTARIUS. **Glosario de términos y definiciones (para Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos)**. CAC/MISC 5, 1993, 5p.

CODEX ALIMENTARIUS. **Directrices del Códex para la evaluación sensorial del pescado y los mariscos en laboratorio.** CAC/GL 31. 1999, 25p.

CODEX ALIMENTARIUS. **Código Internacional de Prácticas Recomendado – Principios Generales de Higiene de los Alimentos.** CAC/RCP1-1969, rev. 4, 2003. 35p.

CUENDE, E.; AUDICANA, M. T.; GARCIA, M. Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 16, n. 3, p. 303-304, 1998.

DAY, M. Fish worm allergy puts diners in hospital. **New Scientist**, n. 2073, p. 7, 1997.

DEARDORFF, T. L.; OVERSTREET, R. M.; OKIHIRO, M.; TAM, R. Piscine adult nematode invading and open lesion in human hand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 4, n. 35, p. 827-830, 1986.

DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 19 de enero de 1993, por el que se establecen las modalidades del control visual para detectar productos de la pesca. **Decisión de la Comisión**, 1993.

DEZFULI, B. S.; SIMONI, E.; ROSSI, R.; MANERA, M. Rodlet cells and other inflammatory cells of *Phoxinus phoxinus* infected with *Raphidascaris acus* (Nematoda). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 43, n. 1, p. 61-69, 2000.

DEZFULI, B. S.; PIRONI, F.; SHINN, A. P.; MANERA, M.; GIARI, L. Histopathology and ultrastructure of *Platichthys flesus* naturally infected with *Anisakis simplex* S. L. larvae (Nematoda: Anisakidae). **The Journal of Parasitology**, v. 93, n. 6, p. 1416-1423, 2007.

DICK, T. A. Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) stocking and *Contracaecum* spp. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, n. 2, p. 242-247, 1987a.

DICK, T. A. The atrium of the fish heart as a site for *Contracaecum* spp. larvae. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, n. 2, p. 328-330, 1987b.

DIXON, B. R. Isolation and identification of anisakis roundworm larvae in fish. **Laboratory Procedure (OPFLP-2)**, Government of Canada, 2006. 7p.

DIXON, B. R. Isolation and identification of anisakid roundworm larvae in fish. 1999. **Food Directorate's (Health Canada's)**. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/research/analy-meth/microbio/index_e.html>. Acesso em: 03 fev. 2009.

DOMÍNGUEZ-ORTEGA, J. & MARTÍNEZ-CÓCERA, C. Guide lines in pathology induced by *Anisakis simplex*. **Allergologia e Inmunologia Clinica**, v. 15, p.267-272, 2000.

ECOD. **DIRECTIVE 93/140EC**. n. 156, p. 42, 1993.

EIRAS, J. C. & REGO, A. A. The histopathology of *Scomber japonicas* infection by *Nematobothrium scombri* (Trematoda: Didymozoidae) and of larval anisakid nematode infections in the liver of *Pagrus pagrus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 2, p. 155-159, 1987.

EIRAS, J. C. Elementos de ictioparasitologia. **Porto: Fundação Eng. António de Almeida**, 1994. 339p.

ELARIFI, A. E. The histopathology of larval anisakid nematode infections in the liver of whiting, *Merlangius merlangus* (L.), with some observations on blood leucocytes of the fish. **Journal of Fish Diseases**, v. 5, n. 5, p. 411-419, 1982.

FABRESSE, F. X.; ESSIUX, H.; MEYRAN, M.; LARROQUE, P.; CELTON, H. Polyarthrititis in anisakiasis. **La Presse Médicale**, v. 13, n. 16, p. 1004, 1984.

FAP/IAEA. Final FAO/IAEA research co-ordination meeting on the use of irradiation to control infectivity of food borne parasites. **Food Irradiation Newsletter**, v. 1, n. 16, p. 5-14, 1992.

FERRER, I. Anisakiosis y otras zoonosis parasitarias transmitidas por consume de pescado. **Aquatic**, v. 14, p. 1-21, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Fish & fisheries products hazards & controls guide. 2nd ed. Washington, D. C.: FDA, **Office of Seafood**, 1998. 276 p.

GARDINER, M. A. Survival of *Anisakis* in cold smoked salmon. **Canadian Institute Food Science Technology**, v. 23, n. 2/3, p. 143-144, 1990.

GONZALEZ, I.; GARCIA, T.; HERNANDEZ, P. E.; MARTÍN, R. Aspectos relacionados con la presencia de parásitos en los productos de la pesca. I. Parásitos de interés. **Alimentaria**, v. 321, p. 55-60, 2001.

GUERRA, R. M. S. N. C.; PRATA, M. C. A.; ARAÚJO, M. M. Contribuição ao conhecimento de parásitos de peixe. **Revista Pesquisa Foco**, v. 6, n. 8, p. 67-75, 1998.

HAUCK, A. K. & MAY, E. B. Histopathologic alterations associate with Anisakis larvae in Pacific Herring from Oregon. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 13, n. 3, p. 290-293, 1977.

HEALY, G. R.; JACKSON, G. J.; LICHTENFELS, J. R.; HOFFMAN, G. L.; CHENG, T. C. Foodborne parasites. In: SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2nd ed. Washington, American Public Health Association, p. 542-556, 1984.

HOWGATE, P. **Freezing to kill nematode parasites in fish products: implications for HACCP**. Disponível em: <<http://seafood.ucdavis.edu/pubs/nematodes.htm>> Acesso em: 04 fev. 2009.

HOWGATE, P. **Chapter 16: Parasites**. Disponível em: <<http://seafood.ucdavis.edu/HACCP/Compendium/Chapt16.htm>> Acesso em: 04 fev. 2009.

HUSS, H. H. Development and use of the HACCP concept in fish processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 33-44, 1992.

HUSS, H. H. Assessment and Management of Seafood Safety and Quality. In: HUSS, H. H. **Parasites**, paper 444, 2004. 229p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2000**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 23 fev. 2010.

ISHIDA, M.; HARADA, A.; EGAWA, S.; WATABE, S.; EBINA, N.; UNNO, M. Three successive cases of enteric anisakiasis. **Digestive Surgery**, v. 24, n. 3, p. 228-231, 2007.

ISHIKURA, H.; KIKUCHI, K.; NAGASAWA, K. Anisakidae and anisakidosis. **Progress Clinical Parasitology**, v. 3, p. 43-102, 1993.

ITO, Y.; IKEMATSU, Y.; YUZAWA, H.; NISHIWAKI, Y.; KIDA, H.; WAKI, S.; UCHIMURA, M.; OZAWA, T.; IWAOKA, T.; KANEMATSU, T. Chronic gastric anisakiasis presenting as pneumoperitoneum. **Asian Journal of Surgery**, v. 30, n. 1, p. 67-71, 2007.

KATES, S.; WRIGHT, K. A.; WRIGHT, R. A case of human infection with the cod nematode *Phocanema* sp. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 22, n. 5, p. 606-608, 1973.

KHAMBOONRUANG, C.; KEAWVICHIT, R.; WONGWORAPAT, K. Application of hazard analysis critical control point (HACCP) as a possible control measure for *Opisthorchis viverrini* infection in cultured carp (*Puntius gonionotus*). **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 28, (supl. 1), p. 65-72, 1997.

KNOFF, M.; SÃO CLEMENTE, S. C.; PINTO, R. M.; GOMES, D. C. Nematodes of elasmobranch fishes from the coast of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 81-87, 2001.

KNOFF, M.; SÃO CLEMENTE, S. C.; GOMES, D. C.; PADOVANI, R. E. S. Primeira ocorrência de larvas de *Anisakis* sp. na musculatura de congro-rosa, *Genypterus brasiliensis* Regan, 1903. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 11, n. 1-2, p. 119-120, 2004.

LEDERER, J. **Enciclopédia moderna de higiene alimentar**. III Tecnologia e Higiene Alimentar. São Paulo: Manole, 1991. 121 p.

LEITÃO, J. S. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. I-II, 1993.

LÓPEZ SABATER, E. I.; LÓPEZ SABATER, C. J. Health hazards related to occurrence of parasites of the genera *Anisakis* and *Pseudoterranova* in fish. **Food Science and Technology International**, v. 6, n. 3, p. 183-195, 2000.

LORENZO, S. Anisakis y alergia. **Tesis doctoral**. (Ed. Ubeira, F.M.), Imprenta Universitaria, Santiago de Compostela, 2000, 182 p.

LUQUE, J. L. Estudo preliminar da fauna parasitária do pargo, *Pagrus pagrus* (Osteichthyes: Sparidae), do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. In: Encontro Brasileiro de Patologia

de Organismos Aquáticos, 4. São Paulo, 1996. **Resumos**. São Paulo: ABRAPOA, p. 6, 1996.

MADI, R. R.; SILVA, M. S. R. *Contraecum*, Railliet & Henry, 1912 (Nematoda, Anisakidae): o parasitismo relacionado à biologia de três espécies de peixes piscívoros no reservatório Jaguari, SP. **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 7, n. 1, p. 15-24, 2005.

MARGOLIS, L. Nematode disease of marine fishes. In: _____ A symposium on diseases of fishes and shellfishes. **American Fisheries Society**, Washington, D. C., p. 190-208, 1970.

MARGOLIS, L. Public health aspects of "codworm" infection: A review. **Journal Fish Research Board Canada**, v. 34, p. 887-98, 1977.

MARQUES, M. C.; SÃO CLEMENTE, S. C.; BARROS, G. C.; LUCENA, F. P. Utilização de frio (resfriamento e congelamento) na sobrevivência de larvas de nematóides anisakídeos em *Trichiurus lepturus* (L.). **Revista Higiene Alimentar**, v. 9, n. 39, p. 23-28, 1995.

MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; FENERICK, J. J.; Larval *Contraecum* SP. (Nematoda: Anisakidae) in *Hoplias malabaricus* and *Hoplerhynchus unitaeniatus* (Osteichthyes: Erythrinidae) of economic importance in occidental marshlands of Maranhão, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 51-59, 2005.

MASSON, P. J. Some histological methods: trichrome staining and their preliminary technique. **Journal Technique Methods**, v. 12, p. 75-90, 1929.

McCLELLAND, G.; MISRA, R. K.; MARTELL, D. J. Larval anisakine nematodes in various larval fish species from Sable Island Bank and vicinity. In: BOWEN, W. D. Population biology of sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) in relation to its intermediate and seal hosts. **Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 222, p. 83-118, 1990.

McCLELLAND, G. The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. **Parasitology**, v. 124, (supl.), p. 183-203, 2002.

McELROY, D. A. Tejido Conectivo. In: PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Métodos Histotecnológicos**. p. 119-135, 1995.

MERCADO, R., TORRES, P.; MAIRA, J. Human case of gastric infection by a fourth larval stage of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae). **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 131-133, 1997.

MESEGUERA, J.; NAVARROB, V.; SÁNCHEZ-GUERREROC, I.; BARTOLOMÉD, B.; NEGRO ÁLVAREZE, J. M. Anisakis simplex allergy and nephrotic syndrome. **Allergologia et immunopathologia**, v. 35, n. 5, p. 216-220, 2007.

MINETA, S.; SHIMANUKI, K.; SUGIURA, A.; TSUCHIYA, Y.; KANEKO, M.; SUGIYAMA, Y.; AKIMARU, K.; TAJIRI, T. Chronic anisakiasis of the ascending colon associated with carcinoma. **Journal of Nippon Medical School**, v. 73, n. 3, p. 169-174, 2006.

MOLINA, R. T.; APARICIO, J. P.; BIENES, M. H.; PÉREZ, R. J.; RUSO, A. M.; FRANCO, E. M. Anisakiasis em pescados frescos comercializados em el norte de Córdoba. **Revista Española de Salud Pública**, v. 74, n. 5/6, p. 517-526, 2000.

MYERS, B. J. Research then and now on the Anisakidae nematodes. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 95, n. 2, p. 137-42, 1976.

NARANJO, S. P., VENTURINI-DÍAZ, M.; COLÁS-SANZ, C.; AGUILELLA-DIAGO, V.; RUIZ-DE-LA-IGLESIA, F.; PÉREZ-CALVO, J. I. Intestinal anisakiasis mimicking intestinal obstruction. **European Journal of Medical Research**, v. 8, n. 3, p. 135-136, 2003.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. Third edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. 600 p.

OKUMURA, M. P. M.; PEREZ, A. C. A.; SPINDOLA, A. F. Principais zoonoses parasitárias transmitidas por pescado – revisão. **Revista Educação Continuada -CRMV-SP**, v. 2, n. 2, p. 66-80, 1999.

PACINI, R., PANIZZI, L.; GALLESCHI, G.; QUAGLI, E.; GALASSI, R.; FATIGHENTI, P.; MORGANTI, R. Presenza di larve di anisakidi in prodotti ittici freschi e congelati del commercio. **Industrie Alimentari**, v. 32, p. 942-4, 1993.

QUIJADA, J.; LIMA, C.; AVDALOV, N. Enfermedades parasitarias por consumo de pescado. Incidencia en América Latina. **Infopesca Internacional**, v. 24, p. 16-23, 2005.

REGO, A. A.; SANTOS, C. P. Helminthofauna de cavalas, *Scomber japonicus* Houtt, do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 4, p. 443-448, 1983.

REGO, A. A.; VICENTE, J. J.; SANTOS, C. P.; WEKID, R. M. Parasitas de anchovas, *Pomatomus saltatrix* (L.) do Rio de Janeiro. **Ciência e Cultura**, v. 35, n. 9, p. 1329-1336, 1983.

RIBEIRO, R. S.; LUQUE, J. L.; ALVES, D. R. Aspectos quantitativos dos parasitos da Maria-luiza, *Paralanchurus brasiliensis* (Osteichthyes: Sciaenidae), do litoral do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Universidade Rural – Ciência da Vida**, v. 22, n. 2, p. 151-154, 2002.

RIPPEY, S. R. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 419-425, 1994.

RODRÍGUEZ, M. Parásitos de importância en la salud pública. Curso taller: Diagnóstico y control de enfermedades em peces de cultivo. **Centro de Investigaciones Pesqueras**. Ciudad de la Habana. Cuba. 1998, 345p.

SABATER, E. I. L.; SABATER, C. J. L. Health hazards related to occurrence of parasites of the genera Anisakis and Pseudoterranova in fish. **Food Science and Technology International**, v. 6, n. 3, p. 183-195, 2000.

SASTRE, J.; LLUCH-BERNAL, M.; QUIRCE, S. A double-blind placebo controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite Anisakis simplex. **Allergy**, v. 55, n. 2, p. 560-564, 2000.

SÃO CLEMENTE, S. C.; MARQUES, M. C.; SERRA-FREIRE, N. M ; LUCENA, F. P. Análise do parasitismo de peixe espada *Trichiurus lepturus* L. do litoral do Rio de Janeiro – Brasil. **Parasitologia al Día**, v. 19, n. 3/4, p. 146-149, 1995.

SHUKEROVA, S. Helminth fauna of the prussian carp, *Carassius gibelio* (Bloch, 1782), from the Srebarna Biosphere Reserve. **Trakia Journal of Sciences**, v. 3, n. 6, p. 36-40, 2005.

SILVA, R. J.; RASO, T. F.; FARIA, P. J.; CAMPOS, F. P. Occurrence of *Contraecaecum pelagicum* Johnston & Mawson 1942 (Nematoda, Anisakidae) in *Sula leucogaster* Boddaert 1783 (Pelecaniformes, Sulidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 565-567, 2005.

SINDERMANN, C. J. Principal diseases of marine fish and shellfish – diseases of marine fish. **San Diego: Academic Press**, v. 1, 1990. 521 p.

TORRES, P. & GONZALEZ, H. Determinacion de larvas de Terranova (=Phocanema) y *Anisakis* em *Genypterus* SP. Aspectos morfometricos e histopatológicos a nível hepático. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 33, p. 82-86, 1978.

TORRES, P.; PEQUEÑO, G.; FIGUEROA, L. Nota preliminar sobre Anisakidae (Railliet y Henry, 1912) Skrjabin y Karokhin, 1945 em alguns peces de consumo habitual por La población humana de Valdivia (Chile). **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 33, p. 39-45, 1978.

UBEIRA, F. M.; VALIÑAS, B.; LORENZO, S.; IGLESIAS, R.; FIGUEIRAS, A.; GARCÍA-VILLAESCUSA, R. Anisakuosis y alergia. Un estudio epidemiológico en la comunidad Autónoma Gallega. **Documentos Técnicos de Salud Pública**. Consellería de Sanidade e Servizos Sociais. Xunta de Galicia. Serie B, n. 24, 2000. 102 p.

VALLES-RIOS, M. E. G.; CAMPOS, R.; SILVA, L. G. Parasite prevalence and intensity in *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae), from Colorado River, Baja California, Mexico. **Revista de Biología Tropical**, v. 48, n. 2/3, p. 495-501, 2000.

VAN MAMEREN, J. & HOUWING, H. Effect of irradiation on *Anisakis* larvae in salted herring. Elimination of harmful organisms from food and feed by irradiation. **Vienna: IAEA**, p. 73-80, 1968.

VAN THIEL, P. H., KUIPERS, F. C.; ROSKAN, T. H. A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 12, p. 97-113, 1960.

WITTNER, M.; TURNER, J. W.; JACQUETE, G.; ASH, L. R.; SALGO, M. P.; TANOWITZ, H. B. Eustrongylidiasis – a parasitic infection acquired by eating sushi. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 17, p. 1124-1126, 1989.

WHO. Control of foodborne trematode infections, report of a study group. **World Health Organization Technical Report Series**, n. 849, 1995. 157 p.

YANONG, R. P. E. Nematode (Roundworm) infection in fish. **Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida**, v. 91, p. 1-10, 2002.

ANEXOS

Anexo 01

Ficha parasitológica

- Nº da amostra:
- Município / Serviço de Inspeção:
- Data: ___/___/___
- Espécie do peixe:
- Sexo do peixe:
- Local onde o parasito foi encontrado:
- Técnica utilizada para identificação:

Filo	Características	Positivo/Negativo	Quantidade de Parasitos
<i>Cestódeo</i>	Achatado e segmentado		
Trematódeo	Achatado e não-segmentado		
Nematódeo	Cilíndrico e não-segmentado		

- Observações: _____

Anexo 02**Ficha de colheita**

Identificação do estabelecimento: _____

Razão social/ nome fantasia: _____

Representante legal: _____

Registro SIF/SISP: _____

Registro no município: _____

Endereço: _____

Município: _____

Tel: () _____ Fax: () _____

Email: _____

Horário de funcionamento: __:__ às __:__

Responsável técnico: _____

Município de origem do pescado: _____

Espécie amostrada: _____

Destino do pescado inspecionado:

Supermercado Indústria Mercado

Acondicionamento: _____

Temperatura do pescado no local: _____ °C

Destino das vísceras: _____

Origem e destino da água utilizada: _____

Presença de animais domésticos próximos ao local da coleta:

Sim Não

O manipulador possui exame de saúde feito regularmente:

Sim Não

Vestuário do manipulador

Avental Luvas Máscara Touca

Higiene pessoal

Adequada Ruim

Higiene estabelecimento

Adequada Ruim

Obs. adicionais:

Amostrador: _____

Data: ____/____/____

Anexo 03**Bateria de desidratação e diafanização dos tecidos**

Reagente	Tempo
1. Álcool 70% I	30 minutos
2. Álcool 70% II	30 minutos
3. Álcool 80% I	30 minutos
4. Álcool 80% II	30 minutos
5. Álcool 95% I	30 minutos
6. Álcool 95% II	30 minutos
7. Álcool absoluto I	1 hora
8. Álcool absoluto II	1 hora
9. Xilol I	1 hora
10. Xilol II	1 hora
11. Parafina líquida em estufa 57°C	Overnight

Anexo 04**Protocolo de coloração de hematoxilina-eosina**

Reagente	Tempo
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool absoluto	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 80%	2 minutos
Álcool 70%	1 minuto
Água corrente	Imergir rapidamente
Hematoxilina	30 segundos
Água corrente	Lavar 15 minutos em água corrente
Eosina	2 minutos
Água corrente	Imergir rapidamente
Álcool 70%	Imergir rapidamente
Álcool 80%	1 minuto
Álcool 90%	1 minuto
Álcool absoluto I	5 minutos
Álcool absoluto II	5 minutos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos

Anexo 05**Protocolo de coloração de Tricrômio de Masson**

1. Desparafinizar as lâminas em xilol por 5 minutos. Após, hidratar as lâminas em álcool 99%, 95%, 70% e lavar em água corrente;
2. Lavar as lâminas com água destilada e secar;
3. Em um béquer pequeno colocar 20 gotas de hematoxilina férrica de Weigert sobre o tecido e deixar agir por 10 minutos;
4. Lavar as lâminas com água corrente e secar;
5. Colocar 10 gotas de solução alcoólica de ácido pícrico no tecido e deixar agir por 6 minutos;
6. Lavar as lâminas em água destilada rapidamente e secar;
7. Adicionar 10 gotas de fucsina ponceau ácida segundo Mallory e deixar agir por 4 minutos;
8. Lavar as lâminas em água corrente;
9. Colocar sobre o tecido 10 gotas de solução ácida fosfomolibdica e deixar agir por 5 minutos;
10. Secar as lâminas;
11. Adicionar 10 gotas de azul de anilina de Masson e deixar agir por 5 minutos;
12. Lavar em água destilada, desidratar e montar as lâminas.

Anexo 06**Ficha de histopatologia**

- Nº da amostra:
- Nº de registro no Laboratório de Anatomia Patológica:
- Data: __/__/__

Descrição das lesões:

- Fígado: _____

- Baço: _____

- Coração: _____

- Intestino: _____

- Estômago: _____

- Musculatura; _____

Observações: _____

Anexo 07**Certificado de ética na experimentação animal**

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 43/08, sobre o Projeto de Pesquisa: *Presença do parasita anisáquideo em pescada (Cynoscion sp) associado ao ponto crítico de controle na cadeia produtiva do pescado comercializado na Baixada Santista*, sob a responsabilidade da Dra. *Claudia Del Fava*, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 16 de abril de 2008.

São Paulo, 16 de abril de 2008.


Dra. Vera Cecília Annes Ferreira
Coordenadora da CETEA-IB

CETEA - IB

Registro

Número : 043/08

Livro : 01

Folha : 44

Data: 16/04/2008



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)