

Verbreitung humanpathogener Parasiten in marinen Ökosystemen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Katharina Gabriele Alt
aus Karlsruhe

Frankfurt am Main 2022
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

Gutachter: Prof. Dr. Sven Klimpel
Prof. Dr. Jörg Oehlmann

Datum der Disputation: 04.10.2022

You can't cross the sea merely by standing and staring at the water.

Rabindranath Tagore

Vorwort

Die vorliegende Dissertation "Verbreitung humanpathogener Parasiten in marinen Ökosystemen" wurde in kumulativer Form verfasst. Ihr liegen drei in ISI-Fachjournalen veröffentlichte Publikationen zugrunde. Im Anschluss an eine thematische und methodische Einführung werden die Publikationen im Ergebnisteil (Kapitel 3) zusammengefasst und im Diskussionsteil eingeordnet und diskutiert. Im Folgenden wird auf die dem Anhang (Kapitel 8) dieser Arbeit, unter Auflistung der Autorenanteile, vollständig beigefügten Fachartikel anhand römischer Ziffern (I-III) verwiesen. Diese sind wie folgt zugeordnet:

- (I) **Alt KG**, Cunze S, Kochmann J, Klimpel S (2021) Parasites of three closely related Antarctic fish species (Teleostei: Nototheniinae) from Elephant Island. *Acta Parasitologica*. DOI:10.1007/s11686-021-00455-8
- (II) **Alt KG**, Kochmann J, Klimpel S, Cunze S (2019) Improving species distribution models of zoonotic marine parasites. *Scientific Reports* 9:9851. DOI: 10.1038/s41598-019-46127-6
- (III) **Alt KG**, Feldmeyer B, Kochmann J, Klimpel S (2022) Gene expression and allergenic potential of *Pseudoterranova bulbosa* L3 from different infection sites in North Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Fish Diseases* JFD13630. DOI: 10.1111/jfd.13630

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung	1
2. Wissenschaftlicher Hintergrund	5
2.1 Parasitismus	5
2.2 Nematoda.....	6
2.2.1 Morphologie.....	6
2.2.2 Systematik	8
2.2.3 Lebenszyklus von <i>Pseudoterranova</i>	10
2.3 Zoonosen.....	13
2.3.1 Anisakidosis.....	14
2.3.2 Allergische Anisakidosis.....	15
2.4 Methodische Grundlagen	16
2.4.1 Methoden der parasitologischen Primärdatengewinnung	18
2.4.2 Molekulare Artbestimmung.....	19
2.4.3 Next Generation Sequencing	20
2.4.4 Transkriptomsequenzierung	21
2.5. Auswertung parasitologischer Daten.....	22
2.5.1 Ökologische Nischenkonzepte	22
2.5.2 Nischen- und Habitateignungsmodellierung	23
2.5.3 Bioinformatische Auswertung von Transkriptomdaten	24
3. Ergebnisse	26

3.1 Alt KG, Cunze S, Kochmann J, Klimpel S (2021) Parasites of three closely related Antarctic fish species (Teleostei: Nototheniinae) from Elephant Island. Acta Parasitologica.....	26
3.2 Alt KG, Kochmann J, Klimpel S, Cunze S (2019) Improving species distribution models of zoonotic marine parasites. Scientific Reports 9:9851.	30
3.3 Alt KG, Feldmeyer B, Kochmann J, Klimpel S (2022) Gene expression and allergenic potential of <i>Pseudoterranova bulbosa</i> L3 from different infection sites in North Atlantic cod (<i>Gadus morhua</i>). Journal of Fish Diseases.....	34
4. Diskussion	38
4.1 Können Parasiten(-gemeinschaften) antarktischer Fische als Bioindikatoren dienen?.....	38
4.2 Kompensieren biotische Prädiktoren die Schwachpunkte von Habitateignungsmodellen des <i>Pseudoterranova decipiens</i> Komplexes und anderer Arten mit geringen Vorkommensdaten?.....	43
4.3 Wie ist das humanpathogene Potential von <i>Pseudoterranova bulbosa</i> nach aktuellem Kenntnisstand zu bewerten?	47
5. Schlussfolgerung	52
6. Zusammenfassung.....	54
7. Literaturverzeichnis	58
8. Anhang.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenie der Anisakidae basierend auf ITS-1 und ITS-2, verändert nach Shamsi & Suthar (2016). Der rote Kasten kennzeichnet <i>Pseudoterranova</i> spp. DOI: 10.7717/peerj.1722/fig-3.....	9
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>Pseudoterranova</i> spp. I) Eier in der Wassersäule, II) am Meeresboden angeheftete Larve, III) erster Zwischenwirt (Copepoda), IV) paratenischer Wirt (Teleostei), V) Endwirt (Pinnipedia). L = Larvenstadium.	12
Abbildung 3: Die Schnittmenge von abiotischer Nische (A, blau), biotischen Interaktionen (B, rot) und Mobilität (M, gelb) gibt die realisierte Nische wieder (basierend auf Soberón & Peterson 2005).	23
Abbildung 4: Parasit-Endwirt-Beziehungen des <i>Pseudoterranova decipiens</i> Komplexes. Anzahl der Datenpunkte (n) und Literaturquellen der Parasitenvorkommensdaten (siehe unten), sowie Datensatz DOI der von GBIF.org bezogenen Vorkommensdaten der Endwirte.....	32

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kommerziell genutzte, bodenassoziierte Fischarten aus Gewässern des Nordatlantik und Nordpazifik, basierend auf (Barz & Zimmermann, 2022).....	48
---	----

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
<i>A. pegreffii</i>	<i>Anisakis pegreffii</i>
<i>A. simplex</i>	<i>Anisakis simplex</i>
AP	Antarctic Peninsula (Antarktische Halbinsel)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BOLD	Barcode of Life Data System
bspw.	beispielsweise
<i>C. bullosum</i>	<i>Corynosoma bullosum</i>
CCAMLR	Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources
cDNA	complementary DNA
COI	Cytochromoxidase I
ddNTP	Dideoxyribonukleosidtriphosphat
DHD	Definitive host distance
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
DOI	Digital Object Identifier
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. oatesi</i>	<i>Elytrophalloides oatesi</i>
eDNA	environmental DNA
et al.	et alii
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GBIF	Global Biodiversity Information Facility
GFP	Gemeinsame Fischereipolitik
GMED	Global Marine Environment Datasets
GPS	Global Positioning System
h	Stunde
ISI	Institute for Scientific Information
ITS+	Internal Transcribed Spacer
IUIS	International Union of Immunological Societies
<i>L. garrardi</i>	<i>Lepidapedon garrardi</i>
<i>L. squamifrons</i>	<i>Lepidonotothen squamifrons</i>
L3	Drittes Larvenstadium
LD	Land distance
min	Minuten
Mrd.	Milliarden
mRNA	Messenger RNA
<i>N. antarctica</i>	<i>Neolebouria antarctica</i>
<i>N. larseni</i>	<i>Nototheniops larseni</i>
<i>N. nudifrons</i>	<i>Nototheniops nudifrons</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NGS	Next Generation Sequencing
Nr.	Nummer
<i>P. azarasi</i>	<i>Pseudoterranova azarasi</i>
<i>P. bulbosa</i>	<i>Pseudoterranova bulbosa</i>
<i>P. cattani</i>	<i>Pseudoterranova cattani</i>
<i>P. decipiens</i>	<i>Pseudoterranova decipiens</i>
<i>P. krabbei</i>	<i>Pseudoterranova krabbei</i>
PacBio	Pacific Biosciences of California, Incorporation
PCA	Principal Components Analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	potentia Hydrogenii
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
SARS	Severe-Acute-Respiratory-Syndrome
SARS-CoV-2	SARS Coronavirus Typ 2
s.g.	so genannte
<i>s.l.</i>	<i>sensu lato</i> , im weiteren Sinne
SOLiD	Sequencing by Oligo Ligation Detection
sp.	Spezies
spp.	Spezies pluralis
<i>s.s.</i>	<i>sensu stricto</i> , im engeren Sinne
SSI	Süd-Shetland-Inseln
T	Tonnen
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Wo es zu Kontakt zwischen Menschen und Tieren kommt, besteht das Risiko der Übertragung zoonotischer Krankheitserreger, die in der Lage sind sowohl Tiere als auch Menschen zu infizieren. Wichtige Treiber dieses Kontakts an Land sind die Nutztierhaltung, das Vordringen des Menschen in zuvor isolierte Habitate von Wildtieren, der Habitatverlust und das Ausweichen von Wildtieren in Agrarland oder Siedlungsgebiete (als Synanthropen) sowie die Verschiebung tierischer Verbreitungsgebiete in Folge des Klimawandels (Blowes et al., 2019). Während zwischen terrestrischen und limnischen Organismen und dem Menschen vielfältige Berührungspunkte bestehen, ist der Kontakt zu Meeresorganismen stark an die Nutzung mariner Ressourcen als Nahrungsmittel geknüpft. Mariner Fisch und Fischereiprodukte bilden eine wichtige Grundlage der Proteinversorgung von etwa 3,3 Milliarden Menschen und sind somit ein kritischer Teil der globalen Ernährung (FAO, 2020). Um den weltweiten Bedarf an Fischereiprodukten zu decken, hat seit Beginn der 1990er Jahre die Aquakultur an Bedeutung gewonnen. Marikultur, also marine Aquakultur, nahm 2018 bereits einen Anteil von 26,7 % am weltweiten Gesamtverbrauch (115,2 Mrd. T) mariner Fischereiprodukte ein (FAO, 2020).

So wie auch in anderen Formen der industriellen Tierhaltung, spielt die Kontrolle von Pathogenen eine wichtige Rolle in der Marikultur (Saravanan et al., 2013; Timi & Mackenzie, 2015). Dabei geht es hauptsächlich darum, Krankheiten der Zuchtfische und die mit viralen, bakteriellen und parasitischen Infektionen einhergehenden Ertragseinbußen zu vermeiden. Jedoch ist auch das Verhindern eines Eintrags humanpathogener Parasiten durch das Futter relevant (Deardorff & Kent, 1989; Skov et al., 2009; Lima dos Santos & Howgate, 2011). In wilden Fischbeständen ist die Infektion mit metazoischen Parasiten, insbesondere mit Nematoden, ein Merkmal von Ökosystemen. Marine Nematoden verfügen über komplexe mehrwirtige Lebenszyklen, in denen Fische als Endwirte fungieren oder als paratenische Zwischenwirte einen essentiellen Beitrag zur Übertragung leisten (Parker et al., 2003a; Klimpel, Kellermanns & Palm, 2008). Die Häufigkeit, mit der Nematoden in Speisefischen auftreten, hängt mit der Ernährungsweise der Wirte zusammen und variiert zusätzlich regional in Abhängigkeit der Anwesenheit anderer Wirtsorganismen, besonders der spezifischen Endwirte (Hauksson, 2011).

Nematoden aus der Familie der Anisakidae nutzen marine Säuger als Endwirte und können durch den Konsum roher oder unzureichend gegarter, infizierter Fischereiprodukte den Menschen als Fehlwirt befallen. Dieser Befall löst eine als Anisakidosis bezeichnete Zoonose aus, die unterschiedliche klinische Verlaufsformen annehmen kann (Hochberg & Hamer, 2010). Die durch den Befall hervorgerufenen Krankheitsbilder hängen mit der Eigenschaft des Parasiten zusammen, aktiv in Wirtsgewebe einzudringen, z.B. in die Magenmucosa (Arai et al., 2014; Jeon & Kim, 2015). Dabei wird eine Immunantwort ausgelöst, die Entzündungsreaktionen im infizierten Gewebe hervorruft (Makepeace et al., 2012). Die Parasiten setzen im Rahmen der Gewebeinvasion und als Abwehrmechanismus gegen das Wirtsimmunsystem exkretorisch-sekretorische Enzyme frei (Kochanowski et al., 2019). Unter diesen Enzymen wurden bei Anisakidae bereits mehrere Allergene identifiziert (Baird et al., 2016; Aibinu, Smooker & Lopata, 2019; Kochanowski et al., 2020). Wurde das Immunsystem des Wirts durch die Infektion sensibilisiert, löst künftig bereits der Kontakt mit Spuren des Allergens eine Immunreaktion aus. Für betroffene Personen hat das im Zweifel Folgen für die Proteinversorgung und die wirtschaftliche Situation, da die Allergie zu Einschränkungen beim Konsum von Fischereiprodukten oder der Arbeit im Fischereisektor führt (Nieuwenhuizen et al., 2006).

Kenntnisse über die Verbreitung humanpathogener Parasiten in marinen Ökosystemen können im Kontext der Lebensmittelsicherheit als Basis für die Risikoeinschätzung von Fischereiprodukten dienen. Darunter fallen sowohl die Verbreitung der Parasiten auf geographischer Ebene als auch Befallszahlen in Wirtspopulationen sowie die Mikrohabitatwahl bei der Infektion eines als Lebensmittel genutzten Fischwirtes (Klapper et al., 2015, 2018; Kuhn et al., 2016; Cipriani et al., 2018a, b). Technische Innovationen der letzten Jahrzehnte haben das Methodenspektrum, welches zur Erforschung der Verbreitung von Parasiten zur Verfügung steht, erweitert. Große Onlinedatenbanken ermöglichen umfangreiche Metaanalysen. Durch leistungsfähige Hard- und Software ist man in der Lage komplexe Modelle zu berechnen und anhand geographischer Projektionen der Habitateignung mögliche Verbreitungsgebiete zu identifizieren. Moderne Sequenzierungstechniken liefern Daten für genom- und transkriptomweite Studien, die durch Auswertetechniken wie Genexpressionsanalysen die Untersuchung der Interaktion von Parasiten mit ihren Wirten auf molekularer Ebene erlauben.

Neben einer Perspektive auf die Verbreitung von Parasiten, die den Schutz der menschlichen Gesundheit in den Mittelpunkt stellt, sollten Parasiten auch in ihrer ökologischen Rolle, als Teil eines schützenswerten Systems zu betrachtet werden (Wood, Lafferty & Micheli, 2010). Resultierend aus der hohen Bedeutung von Meeresorganismen für die globale Ernährung und in der traditionellen Küche vieler Küstennationen besteht ein hohes wirtschaftliches Interesse an marinen Fischereiprodukten. Intensive Fischereiaktivitäten stellen, neben den Auswirkungen von Verschmutzung und Klimawandeleffekten, eine gravierende Belastung für marine Ökosysteme dar (FAO, 2020). Als Teil einer nachhaltigen und verantwortungsvollen Nutzung von Ressourcen ist die Überwachung dieser Auswirkungen zwingend erforderlich und teilweise gesetzlich vorgeschrieben (z.B. EU GFP). Das Monitoring von Parasiten und Parasitengemeinschaften als Indikatoren ist ein möglicher methodischer Ansatzpunkt, um Auswirkungen von Stressoren auf Organismen in einem Ökosystem zu beobachten (Kabata, 1963; Margolis, 1965; Gibson, 1972; Hemmingsen, Lombardo & Mackenzie, 1991; Palm, 2011; Mackenzie & Hemmingsen, 2015; Alarcos et al., 2016), da Parasiten, insbesondere Parasitenfaunen, über einen hohen Informationsgehalt hinsichtlich der Nahrungsbeziehungen ihrer Wirte verfügen (Marcogliese & Cone, 1997; Lafferty, 2013). Störungen im Nahrungsnetz wirken sich auf Parasitierungsmuster aus und lassen sich so retrospektiv nachvollziehen. Die Voraussetzung für diese Anwendung bildet ein umfassendes Grundlagenwissen über parasitische Lebenszyklen und Parasit-Wirtsbeziehungen (Margolis, 1965). Ist dieses Grundlagenwissen vorhanden, eignet sich der Ansatz insbesondere für schwer zugängliche, vulnerable Ökosysteme.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

In der dieser Dissertation zugrundeliegenden Forschung wurden Aspekte der Verbreitung von Parasiten untersucht. Die Verbreitung wurde aus unterschiedlichen Blickwinkeln auf Ebene von Parasitengemeinschaften (I), im ökologischen Nischenraum und Georaum (II), sowie in Mikrohabitaten innerhalb des Fischwirtes (III) betrachtet. Im Mittelpunkt stand der potenziell humanpathogene *Pseudoterranova decipiens* Komplex (II & III).

Davon abgeleitet wurden folgende Fragestellungen diskutiert:

- 1) Können Parasiten(-gemeinschaften) antarktischer Fische als Bioindikatoren dienen?
- 2) Kompensieren biotische Prädiktoren die Schwachpunkte von Habitateignungsmodellen des *Pseudoterranova decipiens* Komplexes und anderer Arten mit geringen Vorkommensdaten?
- 3) Wie ist das humanpathogene Potential von *Pseudoterranova bulbosa* nach aktuellem Kenntnisstand zu bewerten?

2. Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1 Parasitismus

Als Parasitismus bezeichnet man eine Lebensweise, bei der ein Organismus episodisch oder dauerhaft von einem weiteren, artfremden Wirt abhängig ist und ihm dabei Ressourcen entzieht (Mehlhorn & Piekarski, 2002; Lucius & Loos-Frank, 2008).

Findet der Parasitenbefall an der Körperoberfläche eines Wirtes statt, bezeichnet man diesen als Ektoparasitismus. Zur Körperoberfläche zählen auch die Mund- und Nasenhöhle, Gehörgänge und im Falle von Fischen die Kiemen. Die meisten Ektoparasiten gehören dem Stamm der Arthropoda an. Unter ihnen befinden sich viele human- und veterinärmedizinisch relevante Arten, da sie oft als Vektoren für Krankheitserreger dienen oder Verletzungen verursachen, die Sekundärinfektionen zur Folge haben. Einige der wichtigsten Infektionskrankheiten des Menschen werden durch Arthropoden übertragen, z.B. Malaria, West-Nil-Fieber, Denguefieber, Leishmaniose, Pest, Chagas-Krankheit uvm. Im aquatischen Bereich befallen Ektoparasiten ihre Wirte in der Regel nicht episodisch, sondern permanent und werden durch engen Kontakt zwischen den Tieren übertragen. Das Massenaufreten von Ektoparasiten führt in der marinen Aquakultur mitunter zu hohen Ertragseinbußen (Barrett et al., 2020). Befinden sich relevante Teile des Parasiten dauerhaft zugleich innerhalb und außerhalb des Wirtes, wie im Falle einiger parasitischer Copepoden (z.B. *Sphyrion lumpi*, Klapper et al., 2017), wird dies Mesoparasitismus genannt. Endoparasiten befallen das Körperinnere des Wirtsorganismus und liegen je nach Übertragungsweg und Entwicklungsstadium häufig im Verdauungstrakt, der Körperhöhle oder in speziellen Organen bzw. Geweben vor. Während terrestrische und limnische, metazoische Endoparasiten über vielfältige Wege, wie Vektoren (z.B. *Wuchereria bancrofti*, *Brugia* spp.), Kontakt mit Fäkalien (z.B. *Echinococcus multilocularis*) oder invasive Infektion (z.B. Zerkarien von *Schistosoma mansoni*) auf ihre Wirte übertragen werden, sind die Übertragungswege im Meer überwiegend an die trophischen Beziehungen der Wirte zueinander geknüpft.

Marine Lebensräume schaffen, im Vergleich zu terrestrischen Lebensräumen, aufgrund ihrer Dreidimensionalität besondere Bedingungen für Parasiten. Die Verfügbarkeit von Licht und Nährstoffen beeinflusst die Verteilung von Organismen in marinen Habitaten. Dabei stellen die lichtdurchlässigen Schichten des Epipelagials den Ort der Primärproduktion dar und der Meeresboden (Benthos) eine Nährstoffsенke für organisches Material. In diesen beiden Zonen ist die Organismenvielfalt und -dichte am

höchsten, die Bereiche des Mesopelagials (je nach Tiefe zusätzlich Bathypelagial, Abyssopelagial und Hadopelagial) sind weniger artenreich. Die Artenvielfalt mariner Parasiten ist ebenfalls dieser Verteilung unterworfen und bestimmte Parasitengruppen treten vorwiegend in begrenzten Bereichen auf. Eine in (epi-)pelagischen Lebensräumen häufige Gruppe sind Nematoda der Gattung *Anisakis* (Klimpel, Kellermanns & Palm, 2008). Typische Parasiten benthischer oder bodenassoziierter (demersaler) Organismen sind Saugwürmer der Unterklasse Digenea (Campbell, Haedrich & Munroe, 1980). Diese besitzen eine (ebenfalls bei den terrestrischen Vertretern dieser Gruppe auftretende) hohe Spezifität hinsichtlich ihres ersten Zwischenwirtes, Mollusca aus der Klasse der Gastropoda, welche im Meer mehrheitlich im Benthos vorkommen.

2.2 Nematoda

Den Stamm der Nematoda (Fadenwürmer) zeichnet eine hohe Artenvielfalt bei geringer Formenvielfalt aus. Mit einem breiten Spektrum von Lebensräumen und -strategien gehören Nematoden zu den arten- und individuenreichsten Tiergruppen. Neben der bekannten Anzahl von circa 20.000 Arten wird ihre tatsächliche Diversität auf 100.000 bis 10 Millionen Arten geschätzt (Hugot, Baujard & Morand, 2001; Poinar, 2011, 2016). Nematoden treten in beinahe allen denkbaren Habitaten auf. Unter den freilebenden Nematoden finden sich terrestrische und aquatische Arten, die sich teilweise an extreme Lebensräume wie z.B. Gletscher- und Meereis angepasst haben. In Bodenproben stellen Nematoda die arten- und individuenreichste tierische Organismengruppe dar. Der Stamm der Nematoda umfasst zahlreiche Parasitentaxa, darunter sowohl Pflanzen- als auch Tierparasiten. Pflanzenparasitische Nematoda gehören zu den wichtigsten limitierenden, biotischen Faktoren der landwirtschaftlichen Nutzpflanzenproduktion (Westphal, Chitambar & Subbotin, 2018). Ihre agrarwirtschaftliche Relevanz als Pflanzenschädlinge und ihre medizinische Relevanz als Pathogene haben Nematoden in den Fokus verschiedenster Forschungsfelder gerückt. Ein hochkonservierter Bauplan und das häufige Auftreten von Zellkonstanz (Eutelie) machten Nematoden außerdem zu wichtigen Modellorganismen der Zellbiologie und Genetik (Lucius & Loos-Frank, 2008).

2.2.1 Morphologie

Nematoda sind überwiegend getrenntgeschlechtlich und haben einen charakteristischen drehrunden Körper. Das anteriore Körperende verfügt über eine Mundöffnung, deren Form gruppenspezifisch variiert und Lippenstrukturen, Zähne, Haken und Schneidplatten

aufweisen kann. Der Exkretionsporus und die weibliche Geschlechtsöffnung befinden sich meist im vorderen Körperdrittel. Ihre Positionen können als morphologisches Bestimmungsmerkmal dienen. Das Darmrohr der Nematoda ist durchgängig und weist im Bereich des Vorderdarms bei manchen Taxa (u.a. in der Familie der Anisakidae) bestimmungsrelevante Strukturen auf. Am posterioren Ende befinden sich Drüsen, deren Anordnung ebenfalls für die taxonomische Bestimmung relevant ist, sowie der After, bzw. bei Männchen die Kloake, welche bei vielen Arten eine paarige Struktur des Geschlechtsorgans (Spiculae) aufweist (Mehlhorn & Piekarski, 2002). Charakteristisch für Nematoda ist eine dreischichtige, robuste, u.a. aus Keratin und Collagen aufgebaute Cuticula. Sie macht Nematoden widerstandsfähig gegen unterschiedliche chemische Milieus (Mehlhorn & Piekarski, 2002; Lucius & Loos-Frank, 2008) und wird im Laufe der Ontogenese durch vier Ektosteroidhormon-vermittelte Häutungen erneuert. Gemeinsam mit der Hypodermis und der Längsmuskulatur bildet die Cuticula den Hautmuskelschlauch. Die flüssigkeitsgefüllte Leibeshöhle (Pseudocoel) sorgt in Wechselwirkung mit der starren Cuticula und der Längsmuskulatur für das Nematodentypische, schlängelnde Bewegungsmuster. Die Bewegung wird durch das einfache zentrale Nervensystem der Nematoden gesteuert, bestehend aus einem Nervenring und entlang der Dorsal- und Ventralleiste verlaufenden Nervensträngen. Die Sinneswahrnehmung erfolgt über Chemorezeptoren (abhängig von der taxonomischen Gruppe Amphiden oder Phasmiden), die sowohl anterior als auch caudal positioniert sind (Mehlhorn & Piekarski, 2002).

Anisakidae haben eine dreilippige Mundöffnung mit einem Bohrzahn und charakteristische Vorderdarmstrukturen mit einem ausgeprägten Ventrikel, anhand derer die Larven auf Gattungsebene unterschieden werden können. Ab dem Ventrikel verläuft der Darm von *Anisakis* ohne auffällige Merkmale, während *Pseudoterranova* ein nach anterior gewandtes Caecum aufweist und die Gattung *Contracaecum* über Aussackungen des Darms nach anterior und posterior verfügt. Ein auffälliges, jedoch variables Merkmal der Gattung *Pseudoterranova* ist ihre meist rötlich-braune Färbung. Die Variation der Farbintensität wird durch Konformationsunterschiede des Hämoglobins hervorgerufen – je mehr Häm-Bindestellen vorhanden sind, desto dunkler die Färbung (Dixon et al., 1993; Nieuwenhuizen et al., 2013).

2.2.2 Systematik

Der Stammbaum der Nematoda ist Gegenstand andauernder Forschung. Mit dem Aufkommen der molekularen Systematik wurden auf Basis morphologischer Merkmale abgeleitete Verwandtschaftsbeziehungen weitestgehend verworfen. Als gesichert gilt, dass der Parasitismus im Stamm der Nematoda mehrfach unabhängig voneinander entstanden ist. Pflanzen- und Tierparasiten bilden innerhalb der Nematoda ein Paraphylum, d.h. abgeleitet von ihrem gemeinsamen Vorfahren finden sich auch nicht parasitische Arten (Blaxter & Koutsovoulos, 2015).

Jedoch stellt nicht nur die Auflösung der basalen Kladen des Stammbaumes eine Herausforderung dar, sondern auch die speziellere Taxonomie und Artzuschreibung, welche durch molekulargenetische Methoden große Fortschritte verzeichnen konnte (Fišer, Robinson & Malard, 2018). Seit Beginn der 1990er Jahre wurden anhand genetischer Marker Artkomplexe in der Familie der Anisakidae aufgelöst (Mattiucci & Nascetti, 2008). Die aufgrund ihrer Ähnlichkeit im dritten Larvenstadium zunächst als monotypisch beschriebenen Gattungen *Anisakis*, *Contracaecum* und *Pseudoterranova* beinhalten mehrere kryptische, molekular definierbare Arten, die ökologische und biogeografische Unterschiede aufweisen (Paggi et al., 1991; Bristow & Berland, 1992; Nascetti et al., 1993; Bratley & Davidson, 1996; Paggi et al., 2000; George-Nascimento & Urrutia, 2000; Mattiucci et al., 2003, 2005, 2007b; Mattiucci, Paoletti & Webb, 2009; Timi et al., 2014; Mattiucci et al., 2014, 2015). Als Erklärung für den Ursprung kryptischer Diversität wurden von Fišer et al. (2018) drei Hypothesen diskutiert: kürzliche Divergenz, phylogenetischer Nischenkonservatismus und morphologische Konvergenz.

Die Systematik der Anisakidae ist in Abbildung 1 als phylogenetischer Baum dargestellt.

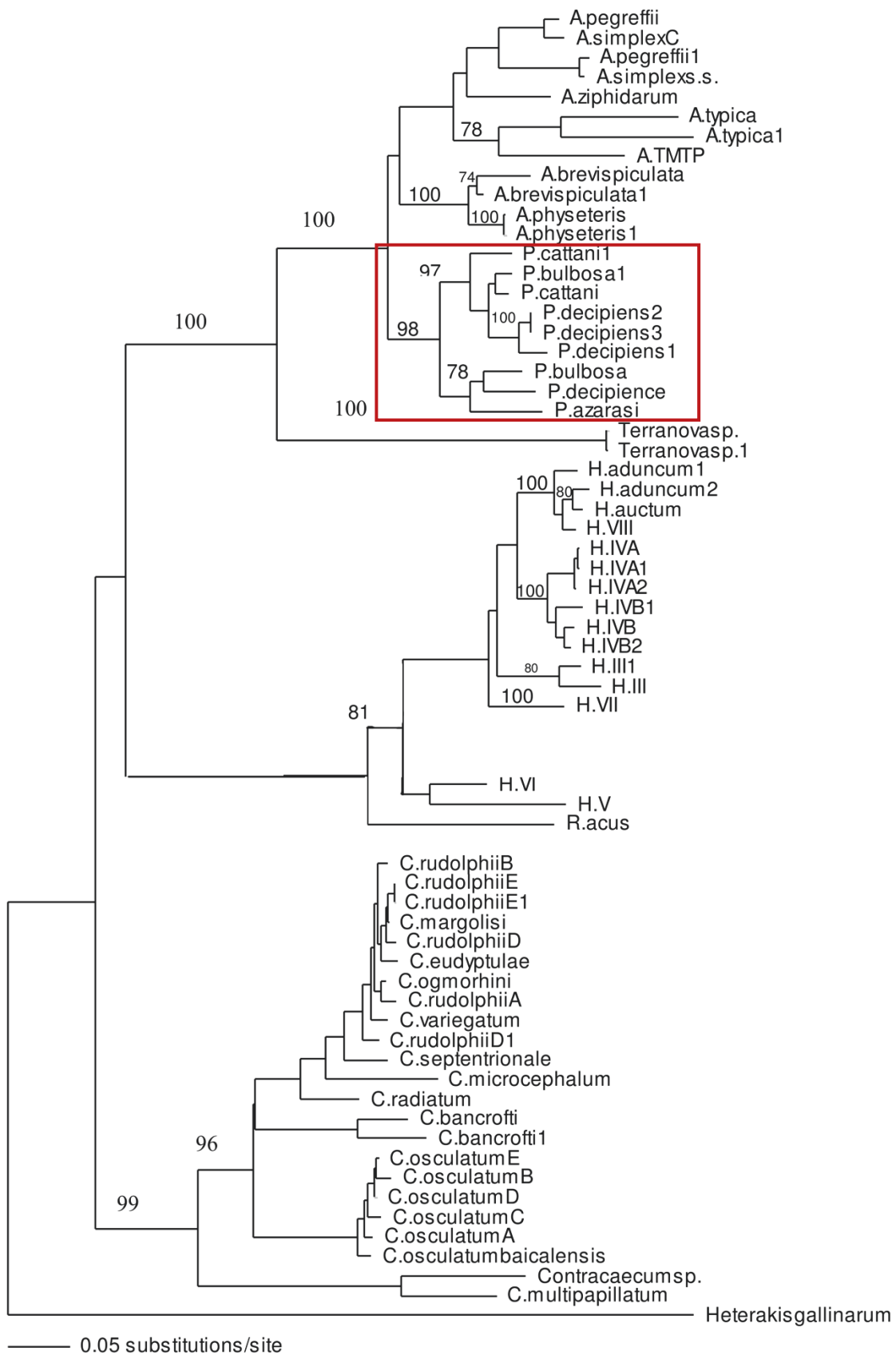


Abbildung 1: Phylogenie der Anisakidae basierend auf ITS-1 und ITS-2, verändert nach Shamsi & Suthar (2016). Der rote Kasten kennzeichnet *Pseudoterranova* spp. DOI: 10.7717/peerj.1722/fig-3

2.2.3 Lebenszyklus von *Pseudoterranova*

Komplexe, spezialisierte Lebenszyklen mit mehr als einem Wirtsorganismus, wie der von *Pseudoterranova*, haben sich über lange entwicklungsgeschichtliche Zeiträume ausgebildet und unterliegen stochastischen Prozessen auf genetischer sowie ökologischer Ebene. Eine notwendige Voraussetzung für diese Entwicklung ist das Vorhandensein einer engen Räuber-Beute-Beziehung zwischen dem neuen und dem ursprünglichen Wirt. Schließt der Lebenszyklus eines über Nahrungsbeziehungen übertragenen Endoparasiten mehr als einen Wirt ein, gibt es gemäß Parker et al. (2003a) zwei Wege auf denen zusätzliche Wirte gewonnen werden: (1) Befindet sich der neue Wirt nahrungshierarchisch über dem bisherigen Wirtsorganismus, muss der Parasit durch das Unterdrücken der sexuellen Vermehrung im ursprünglichen Wirt und die Übertragung auf den neuen Wirt einen Vorteil erhalten. Dieser Ablauf, bei dem ein neuer Endwirt Teil des Lebenszyklus wird, bezeichnen Parker et al. (2003a) als 'upward incorporation' (also 'Einbindung aufwärts'). (2) Ist der neue Wirt ein Beuteorganismus des ursprünglichen Wirtes, muss die gegebene Wahrscheinlichkeit der Aufnahme freier Vermehrungsstadien des Parasiten durch den neuen Wirt höher sein als durch den ursprünglichen Wirt. Gleichzeitig muss der neue Wirt die Infektionswahrscheinlichkeit des Endwirtes gegenüber der direkten Infektion erhöhen, indem er die Übertragung durch eine nahrungsökologische Beziehung gewährleistet.

Die komplexen Lebenszyklen mariner Helminthen (parasitische Würmer) sind an das Nahrungsnetz geknüpft (Marcogliese, 1995; Parker et al., 2003b; Byers, 2009). Der Lebenszyklus der Gattung *Pseudoterranova* (Abb. 2) wird im Folgenden basierend auf McClelland (2002) erläutert. Im Verdauungstrakt des artspezifischen Endwirtes aus der Gruppe der Robben (Mammalia, Carnivora, Pinnipedia) findet die Paarung der getrenntgeschlechtlichen adulten Parasiten statt. Das weibliche Tier entlässt befruchtete Eier und diese werden mit den Fäzes der Robbe in die Wassersäule abgegeben. Im Ei entwickeln sich aus dem Embryo Larvenstadien. Aufgrund seiner relativ zum Wasser größeren Dichte sinkt das Ei an den Meeresgrund, wo das freilebende Larvenstadium schlüpft (McClelland, 1990). Dabei handelt es sich bereits um das infektiöse dritte Larvenstadium (Køie, Berland & Burt, 1995). Als infektiöses Stadium bezeichnet man das Entwicklungsstadium eines Parasiten, welches in der Lage ist den Endwirt zu befallen und sich dort zum sexuell vermehrungsfähigen Adultstadium zu entwickeln. Die Larve heftet sich mit ihrem caudalen Körperende am Substrat des Benthos an und führt mit dem Körper flimmernde Bewegungen durch, die den ersten, obligatorischen Zwischenwirt,

einen bodenassoziierten Copepoden, zum Verzehr des Wurmes anregen (McClelland, 2002). Der Wurm durchdringt die Darmwand des Crustacea und liegt in der Hämolymphe vor (McClelland, 1990). Da die Übertragung vom ersten Zwischenwirt auf den Endwirt jedoch durch das Fehlen einer direkten trophischen Interaktion in der Regel nicht gewährleistet ist, sind weitere Zwischenwirte notwendig (Marcogliese, 2002), um den Lebenszyklus von *Pseudoterranova* zu vollziehen. Diese Schlüsselrolle nehmen Makroinvertebraten und demersale Knochenfische ein, die in das Beutespektrum der Endwirte fallen. Über die hierarchischen Nahrungsbeziehungen der Fische untereinander kommt es mit steigender Trophiestufe zu einer Akkumulation der Parasiten in den (paratenischen) Wirten. Sowohl die Prävalenz als auch die Abundanz der Parasiten steigt mit zunehmender Trophiestufe an. Dies hat einen begünstigenden statistischen Effekt auf die Infektionswahrscheinlichkeit des Endwirtes. Obwohl eine geringe Spezifität bezüglich des Zwischenwirtes den Lebenszyklus begünstigt, kann dieser durch Fehlwirte, die nicht in der Lage sind, den Parasiten auf den Endwirt zu übertragen, unterbrochen werden. Zu diesen Sackgassen gehören nicht nur die Topprädatoren unter den Knochenfischen, welche nicht mehr ins Beutespektrum von Robben fallen, sondern auch der Mensch, der sich durch den Verzehr von Fischereiprodukten mit *Pseudoterranova* (L3) infizieren kann (siehe Abschnitt 3.3).

Neben den ökologischen Faktoren, die grundlegend für den Lebenszyklus von *Pseudoterranova* sind, sind auch abiotische Faktoren für die Entwicklung entscheidend. Sie bestimmen das Überleben von *Pseudoterranova* direkt im freilebenden Stadium, zwischen dem Endwirt und dem ersten Zwischenwirt, und indirekt in den parasitischen Stadien, über die Bedürfnisse seiner Wirtsorganismen. In McClelland (1990) wurde die Auswirkung der Umgebungstemperatur auf die Entwicklungsdauer der Larve experimentell untersucht. Bei Temperaturen zwischen 1 und 22 °C benötigten die Larven 125 bzw. 7 Tage zum Schlüpfen. Bei den in der Studie betrachteten *P. decipiens* s.s. fand ab 0 °C keine Entwicklung mehr statt (McClelland, 1990). Neben der Temperatur spielen in diese Lebensabschnitt Salinität, Tiefe und Strömung eine entscheidende Rolle. Sie bestimmen das Absinkverhalten des mit dem Kot des Endwirtes ausgeschiedenen Eies in Richtung Meeresgrund. Die Dauer des Absinkens steigt mit zunehmender Tiefe, starke Strömungsbilder können den Sedimentationsprozess zusätzlich verlangsamen. Dauert der Vorgang zu lange, ist die Übertragung der Larve nicht mehr gewährleistet. Des Weiteren fehlen in zu großer Tiefe die benötigten Zwischenwirte und eine Verknüpfung

mit dem Ökosystem des Endwirtes ist nicht mehr gegeben (McConnell, Marcogliese & Stacey, 1997).

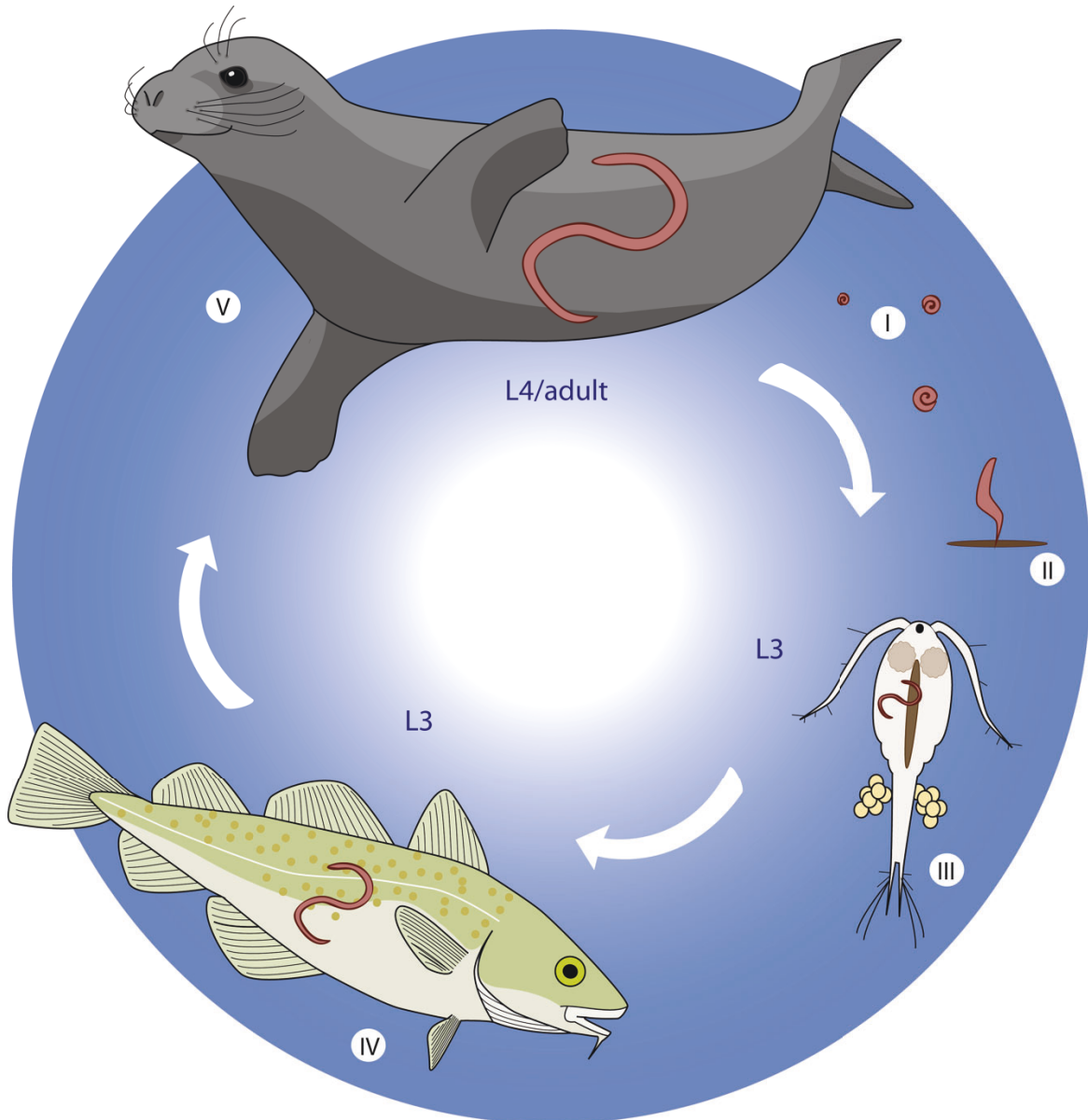


Abbildung 2: Lebenszyklus von *Pseudoterranova* spp. I) Eier in der Wassersäule, II) am Meeresboden angeheftete Larve, III) erster Zwischenwirt (Copepoda), IV) paratenischer Wirt (Teleostei), V) Endwirt (Pinnipedia). L = Larvenstadium.

2.3 Zoonosen

Als Zoonosen werden Krankheiten bezeichnet, die zwischen Menschen und Tieren übertragbar sind. Darunter fallen sowohl Erreger, die auf diesen Übertragungsweg angewiesen sind, als auch solche bei denen Menschen sich durch den Kontakt mit infizierten Tieren anstecken und zu zufälligen Wirten des Erregers werden. In der Regel geht die Übertragung von einem Organismus aus, der an den Erreger angepasst ist und diesem als Reservoir dient. Diese Reservoirs sind häufig andere Säugetiere, beispielsweise Fledertiere, aber auch Vögel. Bei zahlreichen Infektionskrankheiten, die für die Menschheit von einschneidender Bedeutung waren und sind, handelt es sich um Zoonosen. Die Pest wird von einem bakteriellen Erreger (*Yersinia pestis*) ausgelöst und durch Flöhe von Nagern auf den Menschen übertragen. Die Pestepidemie im vierzehnten Jahrhundert dezimierte die Bevölkerung Europas um ein Drittel – heute lässt sich die Erkrankung gut behandeln und tritt seit den 1990er Jahren am häufigsten noch auf dem afrikanischen Kontinent auf (Stenseth et al., 2008; WHO, 2022). Weitere wichtige Beispiele für zoonotische Erkrankungen sind Tuberkulose, Malaria, Tollwut, Ebola, AIDS, Vogelgrippe, Salmonellen, SARS und jüngst SARS-CoV-2, zu dessen Bekämpfung weitreichende, globale Eindämmungsmaßnahmen getroffen wurden.

Zoonosen können jedoch nicht nur ein Problem für die Menschheit darstellen, sondern auch durch den Menschen, etwa bei Reiseaktivitäten, verschleppt werden und durch Übertragung auf bedrohte Tierarten die Biodiversität gefährden. Ein Beispiel dafür ist die Übertragung von Erkältungsviren auf Menschenaffen, die im Falle des Humanen Rhinovirus C für die infizierten Schimpansen tödlich verlief (z.B. Köndgen et al., 2008; Scully et al., 2018).

Parasitäre Zoonosen betreffen mehrheitlich Menschen, die unter schlechten Hygienebedingungen leben oder arbeiten. Besonders in Ländern mit mangelhafter Gesundheitsversorgung ist die Prävention gegen zoonotische Helminthen noch ungenügend. Jedoch sind auch in Ländern mit guten Gesundheitssystemen, etwa in Mitteleuropa, weitreichende Vorbeugemaßnahmen gegen relevante, zoonotische Parasiten notwendig, beispielsweise gegen den Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis*. Teil dieser Vorbeugemaßnahmen sind auch strenge Lebensmittelkontrollen, denn über Nahrung, insbesondere parasitenbelastetes Fleisch (z.B. mit Finnen und Trichinen) und Fischereiprodukte, bestehen Übertragungswege von Helminthen auf

Menschen. Besondere Essgewohnheiten, wie der Verzehr rohen Fleisches und Fisches, stellen daher Risikofaktoren für humane Wurminfektionen dar.

2.3.1 Anisakidosis

Anisakidosis ist ein Sammelbegriff für von marinen Nematoden aus der Familie der Anisakidae und den Gattungen *Anisakis*, *Contracaecum* und *Pseudoterranova* hervorgerufene Krankheitsbilder (Hochberg & Hamer, 2010; Buchmann & Mehrdana, 2016). Die Infektion erfolgt durch den Konsum roher oder unzureichend gegarter Fischereiprodukte und wurde daher hauptsächlich in Ländern beschrieben, in denen entsprechende Essgewohnheiten herrschen und frischer Fisch roh zubereitet und verzehrt wird (Torres et al., 2007). Durch globalisierten Fischhandel und die Verbreitung von Ernährungstrends über soziale Medien ist das Herstellen dieses Zusammenhangs umstritten und Gegenstand wissenschaftlichen Austauschs (Rahmati et al., 2020; Daschner et al., 2021). Der unbeabsichtigt mit dem Fisch lebendig aufgenommene Nematode kann gastrische, intestinale, ektopische oder bzw. und allergische Anisakidosis auslösen. Gastrische Anisakidosis ist die häufigste beschriebene Verlaufsform, wobei sich der Parasit in die Magenschleimhaut oder Magenwand bohrt und dort eine Entzündungsreaktion hervorruft, deren Symptome denen eines Magengeschwürs ähneln. Bei der intestinalen Anisakidosis passiert der Parasit den Magen und löst Beschwerden im Bereich des Dünndarms aus. Die Symptome gastro-intestinaler Anisakidosis stehen in einem direkten zeitlichen Kontext mit der Fischmahlzeit - häufig treten Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, leichtes Fieber und Durchfall auf. In seltenen Fällen durchbohrt der Nematode Magen oder Darm und gelangt in den Peritonealraum, sodass es außerhalb des Gastrointestinaltrakts zu einem ektopischen Verlauf kommen kann. In der Regel sterben die Nematoden binnen weniger Tage ab, woraufhin sich eosinophile Granulome um das Gewebe des Parasiten bilden. Die Behandlung erfolgt durch die endoskopische oder chirurgische Entfernung des Parasiten (Hochberg & Hamer, 2010).

In medizinischen Fallstudien wurden verschiedene Verlaufsformen von Infektionen mit *Pseudoterranova* beschrieben (Pinel et al., 1996; Mercado, Torres & Maira, 1997; Mercado et al., 2001; Torres et al., 2007; Arizono et al., 2011; Arcos et al., 2014; Timi et al., 2014; Weitzel et al., 2015; Cavallero, Scribano & D'Amelio, 2016; Brunet et al., 2017; Mitsuboshi et al., 2017; Llorens et al., 2018; Murata et al., 2018; Nordholm et al., 2020; Menghi et al., 2020; Sánchez-Alonso et al., 2020; Suzuki et al., 2021). Die Bestimmung der Parasiten auf Artniveau ist allerdings selten, sodass häufig nur die Gattung oder *P. decipiens s.l.* genannt

wird (Bouree, Paugam & Petithory, 1995; Mercado, Torres & Maira, 1997; Ramanan et al., 2013). Molekulare Identifikation erfolgte nur in wenigen Fällen, z.B. bei *P. decipiens* s.s. (Brunet et al., 2017) *P. azarasi* (Arizono et al., 2011) und *P. cattani* (Weitzel et al., 2015; Menghi et al., 2020). Außerdem wurden Infektionen mit *Pseudoterranova* beschrieben, welche keine klinische Relevanz hatten, da die Larven nach dem Verzehr wieder hervorgehustet oder erbrochen wurden. Auf dieser Basis wurden Infektionen mit *Pseudoterranova* spp. verharmlosend als Auslöser des ‚tingling throat syndrome‘ (übersetzt: ‚Kribbeln im Hals Syndrom‘) bezeichnet (Sakanari & McKerrow, 1989; Menghi et al., 2020). Demgegenüber stehen Fallstudien mit invasiven Verläufen welche zum Teil chirurgisch behandelt werden mussten: nasale Infektion (Nordholm et al., 2020), Infektion des Larynx (Suzuki et al., 2021), Infektion der Leiste und Hervorrufen einer Hernie (Mitsuboshi et al., 2017), gastrische Anisakidosis und ektopisch in Lebergewebe (unter dem vorläufigen Befund Leberkrebs, Murata et al., 2018).

Um Anisakidosis vorzubeugen, wurden verschiedene Maßnahmen etabliert. Eine kühle Lagerung, sowie zeitnahes Ausnehmen und Verarbeiten des Fisches nach dem Fang soll die so genannte post-mortem-Migration der Parasiten in das Muskelfleisch verhindern (Šimat et al., 2015; Cipriani et al., 2016). Des Weiteren verhindern das Entfernen von Bauchlappen und Leberoberflächengewebe (Klapper et al., 2015, 2018), sowie optische Kontrollen und Auflagen (EU-Verordnung Nr. 1276/2011) was Lagerung (tiefrieren bei -20 °C für 24 h oder bei -35 °C für 15 h) und Gartemperatur (60 °C Kerntemperatur für 1 min) angeht, die Aufnahme lebendiger Larven beim Verzehr von Fischereiprodukten.

2.3.2 Allergische Anisakidosis

Anisakidosis kann auch allergische Erkrankungen einschließen (Armentia et al., 1998; Daschner & Pascual, 2005; Nieuwenhuizen et al., 2006; Nordholm et al., 2020). Diese sind besonders kritisch, da nach erfolgter Sensibilisierung durch die Infektion mit dem (lebendigen) Parasiten bereits Kontakt mit Spuren des Antigens (beispielsweise in einer Fischmahlzeit) ausreichen, um Symptome auszulösen.

Beim Kontakt des Immunsystems mit fremden Proteinen kommt es zu einer Reaktion, welche die Elimination der fremden Proteine bezweckt. Man unterscheidet zwischen angeborener und spezifischer (auch sekundäre/erworbene) Immunantwort. Das Immunsystem umfasst verschiedene Zelltypen, die unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die sekundäre Reaktion auf eine Infektion mit Würmern wird durch T_H2-Zellen unter Einwirkung von Zytokinen reguliert und äußert sich als Entzündungsreaktion, welche als

Typ 2 Immunantwort klassifiziert wird (Bröker, Schütt & Fleischer, 2019a). Für die Wurminfektion ist das Auftreten von eosinophilen Granulozyten und Immunglobulin E (IgE) typisch (Bröker, Schütt & Fleischer, 2019b). Die sensibilisierenden Antikörper (IgE) sind in der Lage eine Mastzellendegranulation hervorzurufen (Bröker, Schütt & Fleischer, 2019c). Dabei setzt die Mastzelle toxische Granula und Zytokine frei, wodurch weitere Immunzellen in das betroffene Gewebe wandern (Bröker, Schütt & Fleischer, 2019b). Durch Anpassung sind viele Parasiten gut vor dem Immunsystem ihrer Wirte geschützt und sind teilweise in der Lage anti-inflammatorische Prozesse zu induzieren (Bröker, Schütt & Fleischer, 2019d). Neben dieser regulären Funktionsweise des Immunsystems können im Rahmen der sekundären Immunantwort auch IgE-vermittelte Allergien entstehen. Allergien äußern sich dort, wo die Degranulation der Mastzellen stattfindet, in Form von Rhinitis, Asthma, Konjunktivitis oder Urtikaria. In schweren Fällen tritt mit der Anaphylaxis ein lebensbedrohlicher Zustand ein, der unbehandelt durch Blutdruckabfall und Konstriktion der Bronchien zum Atemstillstand führt (Bröker, Schütt & Fleischer, 2019e).

Allergisches Potential geht von zahlreichen Invertebraten aus, die in Kontakt mit Menschen stehen z.B. von Arthropoden wie stechenden Insekten, Hausstaubmilben oder Schalentieren aber auch parasitischen Würmern, wie Nematoden. Teilweise besteht zwischen Invertebratenallergenen auch das Potential für Kreuzreaktivität, z.B. zwischen Nematoden und Hausstaubmilben, was zu Problemen in der spezifischen Diagnostik führen kann (Johansson et al., 2001; Guarneri, Guarneri & Benvenga, 2007). In der Familie der Anisakidae wurden bisher für die Gattung *Anisakis* die meisten Allergene identifiziert (Asturias et al., 2000; Pérez-Pérez et al., 2000; Moneo et al., 2000; Anadón et al., 2009; Arcos et al., 2014; Fæste et al., 2014; González-Fernández et al., 2015; Garcia Alonso et al., 2015; Carballeda-Sangiao et al., 2016a,b; Baird et al., 2016; Abe & Teramoto, 2017; Mattiucci et al., 2017b; González-Fernández et al., 2017; Asnoussi et al., 2017) und durch WHO/IUIS anerkannt (Pomés et al., 2018). Das allergene Potential von *Pseudoterranova* spp. ist Gegenstand andauernder Forschung (Ludovisi et al., 2017; Kochanowski et al., 2019, 2020).

2.4 Methodische Grundlagen

Die in der vorliegenden Dissertation angewandten Methoden lassen, am Beispiel des *Pseudoterranova decipiens* Komplexes, die historische Entwicklung parasitologischer Datengewinnung und Auswertung nachvollziehen. Dabei wird deutlich, dass

grundlegende Arbeitsschritte sich nur unwesentlich verändert haben und eine Basis darstellen, die durch innovative Methoden ergänzt wird.

Der Fokus früher Naturforschung lag auf der Beschreibung der Artenvielfalt anhand morphologischer Merkmale. Die Typus-Beschreibung von *P. decipiens* geht auf Krabbe (1878) zurück, der die Art anhand von Museumsbelegen ascarider Nematoden aus grönländischen Robben, als "*Ascaris decipiens*", beschrieb. Krabbe (1878) bezog sich unter anderem auf Erwähnungen von Fabricius in *Fauna Groenlandica* (1780), sah die dortige Beschreibung allerdings noch als unzureichend an. Eine frühe Erwähnung von parasitischen Würmern im Fischwirt findet sich bereits bei Linnée und Salvius (Linné & Salvius, 1758), wonach das Vorkommen eines Wurmes, "*Gordius marinus*", in der Leber von Kabeljau beschrieben ist. Bei Rudolphi (1808) findet sich ebenfalls eine Beschreibung, bei der es sich um *Pseudoterranova* oder zumindest Anisakidae handeln könnte. Ergänzend zur Beschreibung der "*Filaria Piscium*" nach Fabricius (die u.A. die Bezeichnung spiralförmig aufgewundener Würmer enthält), wurden Leibeshöhle, Leber, Pyloruszwischenräume, Muskelgewebe und Mesenterien verschiedener Fische, darunter "Gadi", also Kabeljauverwandte, und "*Pleuronectis Platessoidae*", Plattfische, genannt. Obwohl marine Nematoden seit dem 18. Jahrhundert im Forschungsinteresse standen, gelang es erst viel später ihre Verwandtschaftsbeziehungen anhand morphologischer Merkmale teilweise zu entschlüsseln. Auf die Zuordnung des *Pseudoterranova decipiens* Komplexes in die Gattung "*Ascaris*" folgten "*Porrocaecum*", "*Terranova*" und *Pseudoterranova* (M ozgovi, 1953), sowie das Synonym "*Phocanema*" (Myers, 1959). Neben der Taxonomie spielte auch die Entschlüsselung von Lebenszyklen durch deskriptive und experimentelle Ansätze eine wichtige Rolle in der parasitologischen Grundlagenforschung.

Mit der Entdeckung der PCR und der Sanger-Sequenzierung gewonnen molekulare Marker an Bedeutung und halfen bei der Zuordnung larvaler Stadien aus Zwischenwirten und der Entschlüsselung des *P. decipiens* Artenkomplexes (Paggi et al., 1991, 2000; Bratney & Davidson, 1996; Bullini et al., 1997; Mattiucci et al., 1998; George-Nascimento & Urrutia, 2000; Timi et al., 2014). Wachsende genetische Datenbanken und algorithmengestützte Sequenzabgleiche (mittels Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al., 1990), sowie die Verfügbarkeit entsprechender DNA-Extraktionskits, Labortechnik und Sequenzierungsdienstleister haben die Nutzung molekularer Marker zur Bestimmung anisakider Nematoden vorangetrieben. Die Entschlüsselung der

Artkomplexe brachte u.A. die Erforschung von Fischwirtsspektren, Parasitengemeinschaften und geographischer Verbreitung entscheidend voran.

2.4.1 Methoden der parasitologischen Primärdatengewinnung

Die Probengewinnung mariner Parasiten birgt, im Vergleich zu terrestrischen Systemen, besondere Herausforderungen. Während bei terrestrischen Endoparasiten des Gastrointestinaltraktes auf die nicht-invasive Methode der Kotbeprobung zurückgegriffen werden kann, ist die Untersuchung aquatischer Organismen auf Endoparasiten invasiv und erfolgt nicht am lebenden Organismus. Marine Wirtsorganismen lassen sich schwerer beobachten und ihr Lebensraum ist dreidimensional. Die technischen Voraussetzungen für eine marine parasitologische Probennahme umfassen die Reise zur Probennahmestelle per Schiff, sowie die Ausstattung des Schiffes mit Fischerei- und Probennahmeequipment unterschiedlicher Größenordnungen und Einsatzgebiete (z.B. pelagische Schleppnetze, Grundschleppnetze, Planktonsammler, Bodengreifer). Je nach Habitat und Verhalten (schwarmbildend oder solitär) sind Möglichkeiten eine Wirtsart gezielt zu beproben stark begrenzt und die Probennahme am Meeresgrund ist durch die Nutzung von Grundschleppnetzen sehr destruktiv.

Die Prävalenz mehrwirtiger Endoparasiten variiert stark zwischen den verschiedenen Trophiestufen im Nahrungsnetz, wodurch der Nachweis von Parasiten in Makroinvertebraten eines hohen Stichprobenumfangs und entsprechenden Aufwands bedarf (Busch et al., 2012). Handelt es sich bei den Endwirten um Meeressäuger oder Knorpelfische, ist eine Probennahme aufgrund der Größe des Wirtes und eines möglichen Schutzstatus ebenfalls selten. Parasitologische Untersuchungen dieser Tiergruppen werden hauptsächlich an durch Strandung oder Beifang verendeten Tieren durchgeführt, (Solís et al., 2006; Skrzypczak et al., 2014; Blažeković et al., 2015; Di Azevedo, Carvalho & Iniguez, 2016; Di Azevedo, Carvalho & Iñiguez, 2017), während gezielte, systematische Probennahmen nur eingeschränkt oder gar nicht möglich sind. Da Fisch als Nahrungsquelle kommerziell gefangen und Bestände fischereilich relevanter Arten wissenschaftlich überwacht werden, ist die Probennahme von marinen Parasiten aus dem Fischwirt am gängigsten.

Der Nachweis metazoischer Parasiten von Fischen erfolgt durch eine äußere Inspektion und die anschließende Präparation der Leibeshöhle, des Gastrointestinaltraktes und der Organe. Diese kann entweder direkt nach dem Fang erfolgen oder nach einer Lagerung

bei -20 °C. Die äußere Inspektion schließt die Untersuchung der Körperoberfläche, der Mund- und Nasenöffnung und der Kiemen ein. Für die Untersuchung auf Endoparasiten wird die Leibeshöhle geöffnet und die Organe werden separiert. Bei der Präparation ist sauberes Arbeiten ausschlaggebend, um eine Verschleppung von Parasiten zwischen den Organen zu verhindern. Die Organe werden gegebenenfalls portioniert und in jeweils geeigneter Weise als Quetschpräparat (fetthaltig) oder in physiologischer Kochsalzlösung mit einem Durchlichtmikroskop untersucht. Parasiten werden aus den Organen entnommen, morphologisch vorbestimmt und gezählt (Klimpel et al., 2019).

2.4.2 Molekulare Artbestimmung

Mit der Entwicklung von Sanger-Sequenzierung (Sanger & Coulson, 1975), Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis et al., 1986) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (Rudner, Studamire & Jarvis, 1994) brach das Zeitalter der molekularen Datengewinnung an. Damit gewann die Parasitologie wertvolle Bestimmungsmethoden, um Artkomplexe zu entschlüsseln, sowie die Möglichkeit anhand phylogenetischer Stammbäume entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaftsverhältnisse zu ermitteln und zwischen Parasitenpopulationen zu differenzieren.

Das Prinzip der PCR beruht auf der gezielten Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnitts durch eine hitzestabile Polymerase (gängig aus *Thermophilus aquaticus*). Der Prozess wird innerhalb eines gepufferten Mediums unter Zugabe phosphorylierter Nucleoside (dNTPs; Nucleoside = an Desoxyribose gebundene Nucleinbasen) sowie spezifischer Primer, die den gewünschten DNA-Abschnitt in 5'- und in 3'-Richtung flankieren, durchgeführt. Dabei wird durch Temperatureinwirkung in mehreren Zyklen die doppelsträngige DNA denaturiert (Schritt 1, "Denaturierung", üblicherweise bei 94 °C), Primer an die DNA-Einzelstränge angelagert (Schritt 2, "Primerhybridisierung", bei 50-65 °C – primersequenzabhängig) und von den Primern ausgehend synthetisiert die Polymerase den komplementären DNA-Strang (Schritt 3, "Elongation", üblicherweise bei 72 °C). Mit jedem PCR-Zyklus erhöht sich die Ausbeute des gewünschten DNA-Fragments. Vor dem Sequenzieren des PCR-Produkts werden in einem Aufreinigungsschritt Reste der Primer, Polymerase und unverbrauchte dNTPs entfernt.

Die Sanger-Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode, die durch eine PCR-Reaktion unter anteiliger Zugabe von Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTP) erfolgt. Da die Elongation an ddNTPs in 3'-Richtung nicht möglich ist, bricht die Reaktion an dieser Stelle ab. In den gängigen Verfahren werden die ddNTPs mit entsprechenden

Fluoreszenz-Farbstoffen markiert, die mit einem Laser angeregt und mit einem Detektor erfasst werden können (Quesada et al., 1991). Durch Auftrennen des Produkts in Längenfragmente wird die Abfolge der Sequenz bestimmt.

Diese ersten Amplifikations- und Sequenziermethoden sind durch die Leistungsfähigkeit der DNA-Polymerase limitiert (Perler, Kumar & Kong, 1996), die sowohl die Länge des DNA-Fragments als auch die Anzahl der möglichen Zyklen begrenzt (Yamagami et al., 2014).

2.4.3 Next Generation Sequencing

Neuere Methoden, manchmal unter dem Begriff „Next Generation Sequencing“ (NGS, Sequenzierung der nächsten Generation) zusammengefasst, haben sowohl Fortschritte durch die Parallelisierung von Synthese und Sequenzierung als auch durch das Erhöhen des Durchsatzes und der Sequenzlängen erzielt (Fuller et al., 2009). Bei den modernen Verfahren unterscheidet man amplifikationsabhängige Verfahren mit kurzen Sequenzlängen, s.g. „short Reads“ (kurze Sequenzabschnitte, 454, Ion Torrent, Illumina, SOLiD) von Reaktionen, bei denen die Basenabfolge einer Sequenz direkt bestimmt wird (PacBio, Oxford Nanopore), was die zusammenhängende Bestimmung sehr langer Sequenzen, s.g. „long Reads“ (lange Sequenzabschnitte), ermöglicht (Levene et al., 2003; Deamer, Akeson & Branton, 2016). Beide Ansätze finden unabhängig voneinander oder als Hybridmethode, die von der höheren Genauigkeit kurzer Reads und dem höheren Informationsgehalt längerer Reads profitiert, Verwendung. Obwohl die Bestimmung eines Genoms bereits mittels Sanger-Sequenzierung, durch den Ansatz des „Primer-Walkings“ bereits vor der Etablierung von NGS möglich war, konnten innovative Methoden Kosten und Arbeitsaufwand innerhalb weniger Jahre stark reduzieren. In Folge der Kommerzialisierung von NGS hat sich das Forschungsfeld der „Omics“, also der Forschungsfelder Genomik, Transkriptomik, Proteomik, Metabolomik, innerhalb kurzer Zeit rasch entwickelt. Nach Pionierprojekten, wie dem Humangenomprojekt und der Sequenzierung der Genome wichtiger Modellorganismen wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* ist die Vielfalt an Sequenzierungsprojekten spezieller Organismen zur Bearbeitung spezifischer Fragestellungen innerhalb kurzer Zeit stark angestiegen (Adams et al., 2000; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Mardis, 2008; The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Die Analyse der großen dabei entstehenden Datenmengen wird durch fortlaufende computertechnische und bioinformatische Innovationen ermöglicht.

2.4.4 Transkriptomsequenzierung

Das Transkriptom eines Organismus umfasst die Information aller zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimierten Gene, welche als Polynukleotid von Ribonukleinsäuren (RNA) vorliegen. Im Gegensatz zur doppelsträngigen DNA liegt RNA als Einzelstrang vor und beinhaltet die Base Uracil anstelle des in der DNA enthaltenen Thymins. Die RNA wird synthetisiert, wenn im Rahmen der Translation Gene ausgelesen werden und dient als Informationsträger (mRNA) für die Proteinbiosynthese. Außerdem kann RNA katalytische und genregulatorische Funktionen erfüllen. Dementsprechend gibt das Transkriptom nur einen Teil der Gesamtheit aller Gene (Genom) wieder und zeigt welche konkreten Gene gerade aktiv und in welchem Umfang (Menge) genutzt werden. So lässt sich beispielsweise ableiten, wie ein Organismus auf molekularer Ebene auf die Umwelt reagiert, welche Gene in bestimmten Phasen der Ontogenese oder des Geschlechtszyklus aktiv sind und ob bestimmte Gene in bestimmten Organen oder Körperabschnitten eine besondere Rolle spielen. In der medizinischen Forschung ist Transkriptomik ein bedeutendes Werkzeug der Krebs- und Virusforschung.

Da es sich bei der einzelsträngigen RNA um ein instabileres Molekül handelt als DNA, muss dies bei der Probennahme berücksichtigt werden. Spezielle Medien sind in der Lage die RNA zu stabilisieren, indem sie RNA-abbauende Enzyme hemmen.

Im Folgenden wird die Illumina Standardsequenziermethode kurz erläutert (Illumina Inc., San Diego, USA): Die moderne Transkriptomik verwendet Verfahren, die auf Sequenzierung basieren und somit in der Lage sind auch bisher unbekannte Sequenzenabfolgen *de novo* zu bestimmen. Dazu wird die isolierte RNA mittels reversen Transkriptasen in cDNA übersetzt. Als Vorbereitung auf den Sequenziervorgang wird die cDNA in kurze Abschnitte unterteilt, denaturiert, die Einzelstränge am 5' und am 3' Ende mit Adaptern versehen und mittels PCR amplifiziert. Die Adapter haben spezifische Sequenzen, welche sich auch auf der so genannten Flow Cell, dem Träger, auf dem die Sequenzierung erfolgt, wiederfinden. Die einzelsträngigen DNA-Fragmente hybridisieren mittels der Adaptersequenzen an die Flow Cell und bilden charakteristische Brücken. Dann laufen PCR-Zyklen ab, bei denen sich auf der Flow Cell Cluster der komplementären Stränge des gleichen DNA-Fragments bilden. Der Vorteil des Verfahrens ist die Parallelisierung dieses Prozesses mit allen auf der Flow Cell befindlichen Fragmenten. Die Sequenzierung erfolgt durch Synthese des komplementären DNA-Strangs (sequence by synthesis) für beide DNA-Stränge getrennt. Farbllich markierte dNTPs und ein reversibler

Blockademechanismus ermöglichen, die Basenabfolge der DNA-Fragmente eines Clusters optisch, Base für Base, zu registrieren.

Der Fortschritt von Sequenzierungsmethoden und die einhergehende Kommerzialisierung ermöglichen mittlerweile die Genom- und Transkriptomdatengewinnung zu verhältnismäßig niedrigen Preisen. Ein Vorteil dieser Entwicklung ist, dass die Methode nun nicht mehr finanzierungsstarken Forschungsfeldern, z.B. in der Humanmedizin (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), oder der Arbeit an Modellorganismen, wie beispielsweise *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Adams et al., 2000), vorbehalten ist, sondern auch in Spezial- und Grundlagenforschung angewandt wird. Um die durch NGS erzeugten Datensätze aufzuarbeiten, ist nicht nur Hardware in Form angemessener Speichermedien (Festplatten, Server, Clouds) und Computern mit entsprechendem Arbeitsspeicher und Prozessorleistung (Cluster) nötig, sondern auch Algorithmen zur bioinformatischen Auswertung der Daten.

2.5. Auswertung parasitologischer Daten

Im Folgenden werden Grundlagen für die in Studie II und III verwendeten Auswertungsmethoden dargestellt und deren Hintergründe erläutert.

2.5.1 Ökologische Nischenkonzepte

Der Begriff der ökologischen Nische entstand am Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts und wurde von Grinnell (1917) und Elton (1927) als Eigenschaft einzelner Arten beschrieben. Grinnells Fokus lag dabei auf den abiotischen Variablen, die für die ökologische und geografische Verbreitung von Arten verantwortlich sind (Soberón, 2007). Das ökologische Nischenkonzept nach Elton (1927) schließt biotische Interaktionen mit ein und bezieht sich somit konkreter auf die Bedingungen an einem bestimmten Ort (Soberón, 2007). Hutchinson (1957) definierte die ökologische Nische als n-dimensionalen Hyperraum, der sich aus der Gesamtheit aller Faktoren zusammensetzt, die das Vorkommen einer Art bestimmen. Arten weisen demnach in ihrer fundamentalen Nische typischerweise bezüglich einzelner Umweltfaktoren eine unimodale Verteilung auf, die ihr Toleranzspektrum darstellt. Das Konzept der fundamentalen Nische umfasst das Spektrum der Umweltbedingungen, unter denen Populationen einer Art unter Ausschluss von biotischer Interaktion aufrechterhalten werden können. Die realisierte Nische entspricht dem Teil der fundamentalen Nische, unter dem eine Art ihre Population

in Interaktion (z.B. Konkurrenz um Ressourcen, Parasitismus, Prädation) mit anderen Arten aufrechterhält (Hutchinson, 1957). Sobéron (2007) argumentierte, dass Hutchinsons Nischendefinition sich stärker auf die Eltonische Nische stützt, da die von Grinnell definierten Umweltfaktoren abiotisch und somit nicht durch Konkurrenz limitiert seien. Andere interpretieren die fundamentale Nische nach Hutchinson als jene Faktoren, die weder durch biotische Interaktionen (z.B. Konkurrenz um Ressourcen) noch durch Mobilitätsbegrenzung limitiert werden, womit sie näher an der Grinnellschen Nischendefinition wäre (Clark et al., 2007; Barve et al., 2011; Guisan, Thuiller & Zimmermann, 2017). Die Verbreitung von Arten wird, neben der Verfügbarkeit abiotischer und biotischer Ressourcen, auch durch ihre Mobilität begrenzt (Soberón & Peterson, 2005, Abb. 3).

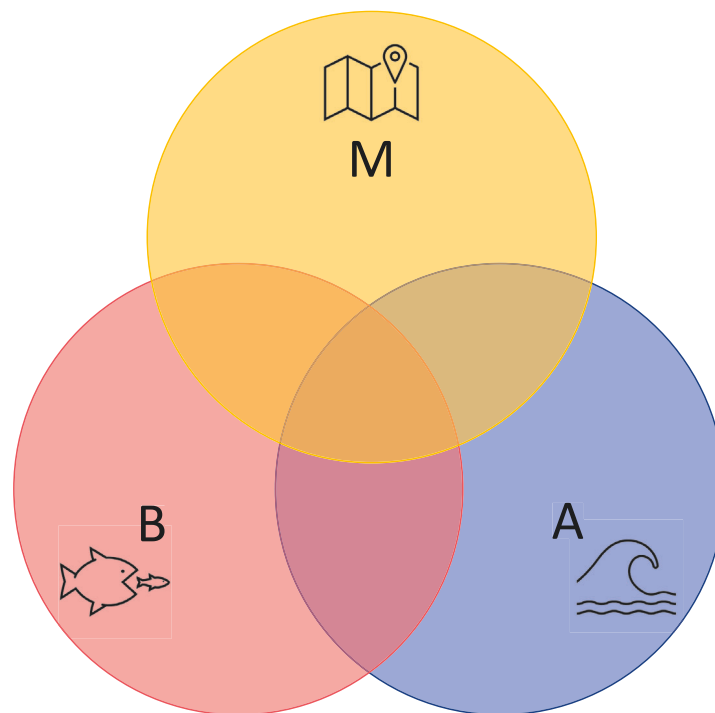


Abbildung 3: Die Schnittmenge von abiotischer Nische (A, blau), biotischen Interaktionen (B, rot) und Mobilität (M, gelb) gibt die realisierte Nische wieder (basierend auf Soberón & Peterson 2005).

2.5.2 Nischen- und Habitateignungsmodellierung

Die Verbreitung von Pathogenen zu kennen, ist wichtig, um gesundheitliche Risiken abzuschätzen und gegebenenfalls zu reduzieren. Die ökologische Nischenmodellierung kann die Vorkommenswahrscheinlichkeit einer Art unter bestimmten Umweltbedingungen in einem Habitat berechnen und in den geographischen Raum projizieren. Als Datengrundlage einer Modellierung dienen Umweltdaten der Probenahme- und Projektionsgebiete und die Vorkommensdaten der zu modellierenden Art. Die

Vorkommensdaten werden anhand eines Modellierungsalgorithmus mit den Umweltdaten in Beziehung gesetzt und statistisch verarbeitet (Pearson & Dawson, 2003; Guisan & Thuiller, 2005; Elith et al., 2011; Guisan, Thuiller & Zimmermann, 2017).

Der Modellierung liegen theoretische (1-3) und methodische (4-7) Annahmen zugrunde (Guisan & Zimmermann, 2000; Guisan, Thuiller & Zimmermann, 2017):

1) Vorkommensdaten bilden die realisierte Nische ab, da sie aus einem Gleichgewichtszustand zwischen der modellierten Art und ihrer Umwelt erhoben wurden und alle passenden Habitate umfassen (Franklin, 1995; Guisan & Theurillat, 2000; Guisan, Thuiller & Zimmermann, 2017). Ist dies nicht der Fall, wird die Nische vom Modell unterschätzt (Guisan et al., 2014). 2) Alle wichtigen Prädiktoren wurden erfasst und fließen in das Modell mit ein. 3) Die erhobenen Vorkommensdaten entstammen stabilen Populationen. 4) Der gewählte Algorithmus passt zu den Eingangsdaten, z.B. presence-only Daten (Guisan & Zimmermann, 2000). 5) Die Umweltdaten sind fehlerfrei. 6) Die Probennahme ist randomisiert und unverzerrt (Soberón, 2007). 7) Die Vorkommensdaten sind unabhängig. Diese Annahmen geben wieder, wie kritisch die Eingangsdaten für die Qualität von Modellierungen sind. Umweltdaten werden in der Regel aus Datenbanken bezogen, z.B. GMED für marine und WorldClim für terrestrische Daten. Es existieren auch Datenbanken für Vorkommensdaten (z.B. GBIF, Aquamaps.org), die allerdings für einige Spezies lückenhaft und für fast alle verzerrt sind.

Die Auswahl des für die Modellierung verwendeten Algorithmus sollte sich nach der Art der Vorkommensdaten richten (Elith, Kearney & Phillips, 2010). Systematisch erhobene Daten, die Informationen zu Vorkommen und Abwesenheit (presence/absence) sowie Abundanz enthalten, können mit Regressionsmodellen (z.B. Generalized Linear Models) analysiert werden. Ein solches Design der Datenerhebung lässt sich jedoch bei historischen Belegen (bspw. aus zoologischen Sammlungen), schwer zugänglichen Probennahmegebieten (z.B. Tiefsee oder Polarregionen) oder aus Datenbanken und Literatur gewonnenen Vorkommensdaten nicht umsetzen, sodass mit reinen Präsenzdatensätzen (presence-only) gearbeitet werden muss (Elith, Kearney & Phillips, 2010). Ein für diese Form der Daten geeigneter Algorithmus ist MaxEnt (Phillips, Anderson & Schapire, 2006).

2.5.3 Bioinformatische Auswertung von Transkriptomdaten

Obwohl noch für jeden Datensatz und Teilschritt eine passende Softwareauswahl getroffen werden muss, existieren für nahezu jede Ausgangslage passende, frei

verfügbare Computerprogramme. Die Gesamtheit, der für die bioinformatische Auswertung verwendeten Programme wird als Pipeline bezeichnet. Die Konfiguration der einzelnen Anwendungen muss für jeden Datensatz individuell angepasst werden (Conesa et al., 2016).

Grundsätzlich existieren zwei mögliche Ausgangsszenarien für die Assemblierung eines Genoms oder Transkriptoms – entweder ist eine Referenz vorhanden oder nicht, im zweiten Fall spricht man von einer *de novo* Assemblierung. Bei der *de novo* Assemblierung müssen zunächst Reads zu Transkripten zusammengefügt werden. Dazu werden aus den Reads k-mere, also Untersequenzen der Länge k, gebildet und anhand von De Bruijn Graphen deren Überlappungen ermittelt (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013). Die entstandenen Transkripte dienen als Grundlage für das Mapping, bei dem ein Alignment der Reads an die Transkriptsequenzen erfolgt. Die Transkripte werden quantifiziert, um Genexpressionsanalysen zu ermöglichen (Bray et al., 2016). Im Idealfall entspricht ein Transkript einem Gen. Bei der Annotation werden Transkripte durch Datenbankabgleiche (NCBI, SwissProt) mit bekannten Genen oder Proteinen verglichen, um ihre Funktion (Gene Ontology) zu bestimmen (Altschul et al., 1990; Gish & States, 1993; Jones et al., 2014). Zusammen mit der Transkriptanzahl ermöglicht dies Rückschlüsse auf die Intensität der Genexpression zur Durchführung bestimmter biologischer Prozesse im beprobten Organismus oder Organ (Zelle) zum Zeitpunkt der Probennahme.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit fasst die einzelnen Publikationen (I-III) zusammen. In den Zusammenfassungen werden die Hintergründe der Forschungsprojekte, verwendete Methoden und die Ergebnisse dargestellt. Außerdem werden einzelne Diskussionspunkte der Publikationen kurz erläutert.

3.1 Alt KG, Cunze S, Kochmann J, Klimpel S (2021) Parasites of three closely related Antarctic fish species (Teleostei: Nototheniinae) from Elephant Island. Acta Parasitologica.

Die Antarktische Konvergenz bildet, seit der Öffnung der Drake Straße zwischen Südamerika und der Antarktischen Halbinsel, durch ihre starke Strömung und das thermohaline Frontensystem eine Grenze zwischen dem Südpolarmeer und den angrenzenden Gewässern (Kock, 1992; Orsi, Whitworth & Nowlin, 1995; Rogers et al., 2012). Diese natürliche Barriere hat die Anpassung der in den Gewässern des Südpolarmeeres lebenden Organismen an die besonderen Eigenschaften ihres kalten Lebensraumes gefördert und durch Isolation hauptsächlich endemische Arten hervorgebracht (Rogers et al., 2012). Die Antarktisdorsche (Unterfamilie: Nototheniinae) haben durch adaptive Radiation eine große Vielfalt erlangt und sich an die unterschiedlichsten Habitate des Südpolarmeeres angepasst (Eastman & Clarke, 1998). Nahverwandte Arten (Familie: Nototheniidae), die außerhalb der Antarktis vorkommen, weisen mit sechzehn Spezies eine geringere Diversität und Formenvielfalt auf als in der Antarktis beheimatete Nototheniidae (Hewitt & Hine, 1972; Grabda & Ślósarczyk, 1981; Hine, Jones & Diggles, 2000; Near, Pesavento & Cheng, 2004; Eastman, 2005). Antarktisdorsche sind die artenreichste und in antarktischen Gewässern dominierende Knochenfischart (Eastman, 2005). Die meisten Antarktisdorsche sind demersal und belegen ökologische Nischen am oder in der Nähe des Meeresgrundes. Ihnen kommt, neben Antarktischem Krill (*Euphausia superba*), eine Schlüsselrolle im marinen Nahrungsnetz zu, insbesondere in Gewässern der Antarktischen Halbinsel, wo sie wesentlich zum Energiefluss zwischen Primärkonsumenten und Topprädatoren beitragen (Barrera-Oro, 2002). Diese Schlüsselfunktion macht Nototheniinae zu wichtigen Zwischen- und Endwirten metazoischer Parasitentaxa.

In dieser Studie wurden drei der häufigsten Fischarten der westlichen Antarktischen Halbinsel und Südshetlandinseln betrachtet (Tiedtke & Kock, 1989; Kock & Stransky,

2000; Barrera-Oro, 2002). *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* und *Lepidonotothen squamifrons* unterscheiden sich in ihren Tiefenhorizonten und Habitatpräferenzen (Barrera-Oro, 2002). Die Unterschiede in der Lebensweise sollten sich in der Parasitenfauna der drei Wirtsarten widerspiegeln und Rückschlüsse auf ihre Ökologie, Ernährung, mögliche Räuber und Stellung im Nahrungsnetz geben. Diese Arbeit fasst den bisherigen Kenntnisstand der Parasitenfaunen der untersuchten Fische zusammen und diskutiert die Nutzung der Parasitierungsmuster als mögliche Indikatoren für die Auswirkungen des Klimawandels auf marine Artengemeinschaften in der Antarktis.

Die Probennahme von *Nototheniops larseni* (n=40) *N. nudifrons* (n=40), *Lepidonotothen squamifrons* (n=49) fand im März und April 2012 an verschiedenen Stellen nahe der Elefanteninsel, auf der Expedition ANT-XXVIII/4 des Forschungseisbrechers „Polarstern“ statt. Nach dem Fang mit Grundschleppnetzen wurden die morphologisch auf Artebene bestimmten Fische bei -20 °C gelagert. Bei der Untersuchung wurde der Mageninhalt bestimmt und quantifiziert, um Ernährungsparameter nach Hyslop (1980) zu berechnen. Die Tiere wurden auf Ecto- und Endoparasiten untersucht, welche anschließend für die entsprechenden Bestimmungsmethoden vorbereitet wurden (beschrieben in Klimpel et al., 2019). Parasiten aus den Großgruppen der Digenea, Acanthocephala und Cestoda wurden gemäß Zdzitowiecki (1991, 1997) bestimmt und in der wissenschaftlichen Sammlung der Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung archiviert. Zur Bestimmung der Nematoda wurden spezifische, genetische Marker (Zhu et al., 1998; Shih, 2004; Kellermanns, Klimpel & Palm, 2007) amplifiziert und mittels BLAST mit den bei NCBI-Genbank hinterlegten Daten abgeglichen (Altschul et al., 1990). Die Parasitierung der Fische wurde anhand parasitologischer Kenngrößen nach Bush et al. (1997) wiedergegeben. Literaturdaten von Parasit-Wirtsbeziehungen (presence/absence) wurden aus vorhandenen Checklisten (Oğuz et al., 2015) entnommen und um neuere Belege ergänzt. Die Daten wurden mittels R (Version 4.0.3) und einem Skript nach Brandl et al. (2020) als Bipartitnetzwerke grafisch dargestellt.

Der Mageninhalt der untersuchten Fischarten wies unterschiedliche Verdauungsgrade auf, sodass die Bestimmung der Nahrungskomponenten von *N. larseni* (n=18 Mägen mit Inhalt) und *N. nudifrons* (n=7 Mägen mit Inhalt) nur auf wenigen Proben basiert. Bei beiden Arten wurden Crustacea als wichtigste Nahrungsorganismen identifiziert. Die bedeutendste Beutegruppe von *L. squamifrons* (n=49 Mägen mit Inhalt) waren ebenfalls Krebstiere (Amphipoda und Euphausiacea), in geringerer Zahl traten andere Invertebraten (Ostracoda, Isopoda, Mollusca, Polychaeta) und Knochenfische auf.

Die Parasitenfauna der untersuchten Fischarten beinhaltete Parasiten aus den Großgruppen der Digenea, Acanthocephala, Cestoda und Nematoda. Die Arten *Neolebouria antarctica* (Digenea), *Corynosoma bullosum* (Acanthocephala) und *Pseudoterranova decipiens* E (Nematoda) wurden in allen drei Wirtsspezies identifiziert. Die vorliegende Studie erbrachte neue Wirtsnachweise für *Lepidapedon garrardi* (*L. squamifrons*) und *Echinorhynchus petrotschenkoi* (*N. larseni*).

Neben *N. antarctica* traten in *L. squamifrons* zwei weitere Digeneaarten, *L. garrardi* und *Elytrophalloides oatesi*, auf. In *Nototheniops nudifrons* wurden *Neolebouria antarctica* und *L. garrardi* identifiziert. Nematoda traten in allen drei Wirten mit den höchsten Prävalenzen auf. Mittels molekularem Barcoding wurden anhand einer Unterprobe die Anisakidenlarven *Pseudoterranova decipiens* E und *Contracaecum osculatum* s.l. in allen drei Fischarten nachgewiesen, außerdem wurde *C. osculatum* C in *L. squamifrons* bestimmt. Im Magen von *N. nudifrons* wurden adulte *Ascarophis nototheniae* (Nematoda: Cystidicolidae) identifiziert. Acanthocephalen waren nach den Nematoden das zweithäufigste Parasitentaxon. *Echinorhynchus petrotschenkoi* trat nur im Magen von *N. larseni* auf. *Corynosoma bullosum* und *Metacanthocephalus* spp. wurden in allen drei Wirtsarten identifiziert, wobei *L. squamifrons* die höchsten Prävalenzen von *C. bullosum* aufwies und *Metacanthocephalus* die häufigste Acanthocephalengattung in *N. nudifrons* war.

Die Parasitierung von Fischen hängt eng mit ihrer Ernährung zusammen, welche wiederum durch das Habitat und ihre Jagdstrategie beeinflusst wird. Diese Zusammenhänge spiegeln sich auch in unseren Daten wider.

Bei allen drei Fischarten war Antarktischer Krill (*Euphausia superba*) ein häufiger Nahrungsbestandteil, sowohl in dieser Studie als auch in vergangenen Untersuchungen (Richardson, 1975; Targett, 1981; Takahashi & Iwami, 1997; Barrera-Oro, 2002; Casaux et al., 2003; Curcio, Tombari & Capitano, 2014; Moreira, Juarez & Barrera-Oro, 2014; Blasina et al., 2017). Krill scheint insbesondere im Sommer eine wichtige Nahrungsquelle zu sein und weist in Gewässern um die AP und SSI eine Verteilung durch die ganze Wassersäule auf, so dass er auch demersalen Fischen als Beute dient (Kock, 1985; Kawaguchi et al., 1986; Marin, Brinton & Huntley, 1991; Gutt & Siegel, 1994; Takahashi & Iwami, 1997). Neben Krill waren benthische Amphipoda, die über einen noch günstigeren Nährstoffgehalt verfügen, wichtige Nahrungsorganismen aller untersuchten Fische (Barrera-Oro, 2002). In Mägen von *N. larseni* und *N. nudifrons* wurden benthische Invertebraten identifiziert, die auf eine bodennahe Ernährung schließen lassen (Barrera-

Oro, 2002; Curcio, Tombari & Capitano, 2014). Für *Lepidonotothen squamifrons* wurde neben benthischer Ernährung auch eine (bentho-)pelagische Nahrungsaufnahme beschrieben (Barrera-Oro, 2002). Insgesamt scheinen alle drei Fischarten bezüglich ihrer Ernährung eine hohe Anpassungsfähigkeit an die an einem Standort verfügbaren Nahrungsorganismen zu besitzen (Kellermann, 1990; Linse et al., 2002; Lörz & Brandt, 2003; Calbet et al., 2005; San Vicente et al., 2009; Blasina et al., 2017).

Die Parasitierung der in dieser Studie untersuchten Fische entspricht der typischen Parasitenfauna demersaler Fische aus Gewässern der AP und SSI (Zdzitowiecki, 1998; Rocka, 2004, 2006; Laskowski & Zdzitowiecki, 2005; Klimpel et al., 2010; Zdzitowiecki & Laskowski, 2013; Münster et al., 2017). Die Unterschiede zwischen den in den drei Wirten identifizierten Parasitenarten und Befallszahlen sind gering, da es sich bei den identifizierten Digenea, Acanthocephala und Nematoda, hinsichtlich des Fischwirtes, um euryxene Arten mit breitem Wirtsspektrum handelt (Oğuz et al., 2015). Dies ist im Falle der anisakiden Nematodenlarven und Cystacanthstadien ein Bild, das sich auch außerhalb antarktischer Gewässer findet. Ungewöhnlicher ist die geringe Spezifität adulter Digenea, von denen *Elytrophalloides oatesi* auch außerhalb des Südpolarmeeres vorkommt (Jeżewski, Zdzitowiecki & Laskowski, 2014) – was die Vermutung eines Artenkomplexes nahelegt. Die identifizierten Digeneen- und Nematodenarten unterstützen die anhand der Nahrungskomponenten zugeschriebene benthische Lebensweise. Andere Autoren haben sowohl hinsichtlich der Nahrungsökologie als auch bei der Parasitierung (und Infektionszahlen) der hier untersuchten und anderer Nototheniinaespezies Standorteffekte beschrieben (Moser & Cowen, 1991; Laskowski & Zdzitowiecki, 2005; Münster et al., 2016; Muñoz & Rebolledo, 2019). In diesen Studien variierten beispielsweise die Infektionsparameter derselben Wirtsart mit *E. oatesi* und *L. garrardi*, sowie *Corynosoma pseudohamanni* standortspezifisch (Laskowski & Zdzitowiecki, 2005). Die Nahrungsverfügbarkeit an den Probestellen wird durch die strukturelle Habitatvielfalt der AP und SSI beeinflusst. Spezifität und Durchseuchung der Invertebratenwirte könnten zu unterschiedlichen Befallszahlen an verschiedenen Standorten führen. Ein Standorteffekt würde, neben dem Alter der Tiere (abgeleitet durch Größe und Gonadenreife), Unterschiede zwischen dieser Studie und anderen Untersuchungen erklären.

Bei der Auswertung historischer Daten zeichnete sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl der Studien, welche sich mit den Parasiten einer spezifischen Fischart befassen, und der Anzahl bekannter Parasiten ab. Je mehr Studien sich mit einer

Wirtsart befassen, desto mehr verschiedene Probenstandorte bilden sie ab. Der Forschungsaufwand wird weiterhin auch durch den Faktor der wirtschaftlichen Relevanz eines Wirtes als Fischereiresource beeinflusst. Außerdem wird die Parasitendiversität von der Trophiestufe des Wirts beeinflusst.

Aus den im Rahmen dieser und anderer Studien erhobenen Daten geht hervor, dass Parasitengemeinschaften und Parasitierungsmuster einen vielversprechenden Ansatz bieten, Auswirkungen des Klimawandels auf antarktische Artengemeinschaften zu untersuchen. Dafür scheint insbesondere der Bereich der AP und SSI ein besonders sensibles Gebiet zu sein. Allerdings zeigte sich, dass mögliche Standorteffekte berücksichtigt werden sollten und regelmäßiges Monitoring, mit einem Studiendesign, das möglichst viele unterschiedliche Wirte und Habitate einschließt, notwendig ist, um künftige Änderungen zu verfolgen.

3.2 Alt KG, Kochmann J, Klimpel S, Cunze S (2019) Improving species distribution models of zoonotic marine parasites. Scientific Reports 9:9851.

Ökologische Nischenmodellierung und Artverbreitungsmodelle sind wichtige methodische Ansätze datenbasierte Ressourcen zu nutzen und neue Perspektiven bei der Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen einzunehmen (Guisan & Zimmermann, 2000; Guisan & Thuiller, 2005). Die wichtigste Voraussetzung für robuste Modellierungsergebnisse bilden repräsentative Vorkommensdaten der betrachteten Art (Elith et al., 2006). Aufgrund dieses Zusammenhanges stellt die Betrachtung von häufigen Arten, für die nur wenige Fundpunkte verfügbar sind, ein Problem dar, da ein Datendefizit die Modellqualität negativ beeinflusst.

Das Erheben von Vorkommensdaten ist im Falle mariner Organismen erschwert, da sie sich schlechter beobachten und nachverfolgen lassen, z.B. durch GPS-Tracking (Wiley et al., 2003). Eine besondere Herausforderung stellen marine Endoparasiten dar, deren Anwesenheit sich nur durch Untersuchung ihres entsprechenden Wirts feststellen lässt, weshalb die Methode der ökologischen Nischenmodellierung in diesem Bereich bisher nur selten angewendet wurde (Kuhn et al., 2016). Endoparasiten haben häufig komplexe Lebenszyklen mit mehreren, in trophischen Beziehungen zueinanderstehenden Wirtsarten. Man geht, insbesondere im Falle des Endwirtes, in dem der Parasit seine Geschlechtsreife erreicht und seinen Lebenszyklus schließt, von einer hohen Wirtsspezifität aus. Dieser enge Zusammenhang macht den Endwirt zu einem möglichen

biotischen Prädiktor (als notwendige Bedingung) für das Vorkommen eines Parasiten. Dieser biotische Prädiktor könnte die Modellierung mariner Endoparasiten – auch auf Basis weniger Vorkommensdaten – verbessern.

Um anhand eines geeigneten Organismus zu überprüfen, ob ein biotischer Prädiktor die Modellierung datenarmer Spezies verbessern kann, wurde der *Pseudoterranova decipiens* Komplex ausgewählt. Der Artkomplex beinhaltet sowohl Arten mit guten Vorkommensdaten, vorwiegend aus den Zwischenwirten, als auch solche mit defizitärer Beprobung. Diese hängt mit dem Umstand zusammen, dass sich das am häufigsten nachgewiesene Stadium der Gattung *Pseudoterranova*, die L3 Larve aus dem Fischzwischenwirt, nicht morphologisch, sondern nur anhand genetischer Marker auf Artebene bestimmen lässt, was nur in wenigen Studien erfolgte (Abb. 4). Für die Endwirte von *Pseudoterranova* spp., Pinnipedia (Robben), liegen robuste Vorkommensdaten vor, da sie sich als semiaquatische, marine Säuger, die Zeit an Land oder auf Eis verbringen, gut beobachten lassen (Abb. 4).

Ziel der Studie war ein Vergleich der realisierten Nischen der Parasiten mit jenen ihrer Endwirte im Nischenraum, sowie den Einfluss des biotischen Prädiktors auf die geografische Projektion in Form von Habitatauswahlkarten zu ermitteln. Der verwendete Modellierungsalgorithmus MaxEnt basiert auf dem Konzept, maximale Entropie sei der geeignetste Weg, Verteilungen reiner Präsenzdaten zu beschreiben (Phillips, Anderson & Schapire, 2006; Elith et al., 2011; Phillips et al., 2017). Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen der Art und den Umweltbedingungen lassen sich anhand verschiedener Parameter qualitativ beschreiben und in den Georaum projizieren (Pearson & Dawson, 2003; Guisan & Thuiller, 2005; Elith et al., 2011).

Vorkommensdaten der *Pseudoterranova*-Arten wurden anhand einer Stichwortsuche bei Google Scholar und Web of Science recherchiert. Kriterien für die Aufnahme in den Datensatz waren eine möglichst genaue Georeferenzierung sowie die Bestimmung auf Artebene, anhand molekulargenetischer Marker im Falle von Larvenstadien oder auf Basis morphologischer Merkmale im Adultstadium. Basierend auf der Ökologie von *Pseudoterranova* wurden von der Datenbank GMED geeignete, abiotische Prädiktoren (mittlere Meeresoberflächentemperatur, Salinität, Landdistanz, Tiefe und Primärproduktion) ausgewählt. Anhand dieser Daten wurde das abiotische Modell in MaxEnt berechnet.

Der biotische Prädiktor, Endwirtsdistanz (DHD = definitive host distance), wurde basierend auf in der Datenbank G-Bif vorhandenen Vorkommensdaten der Endwirtsarten

in Esri ArcGIS erstellt (Abb. 4, Mattiucci & Nascetti, 2008, sowie die darin enthaltenen Quellen). Diese Variable wurde im biotischen Modell anstelle der Variable Landdistanz verwendet. Das abiotische und das biotische Modell wurde basierend auf Qualitätsindikatoren (Area under the curve Wert, variable contribution) und der Auflösung der geografischen Projektion (0.083 Dezimalgrad) bewertet.

Der Vergleich der realisierten Parasitennischen mit den entsprechenden Endwirtsnischen wurde im Nischenraum mittels PCA_env nach Broennimann et al. (2012), enthalten im R-Paket 'ecospat' (Di Cola et al., 2017), visualisiert und ihre Überlappung (Petitpierre et al., 2012; Guisan et al., 2014) anhand Schoener's D quantifiziert (Schoener, 1968; Warren, Glor & Turelli, 2008).

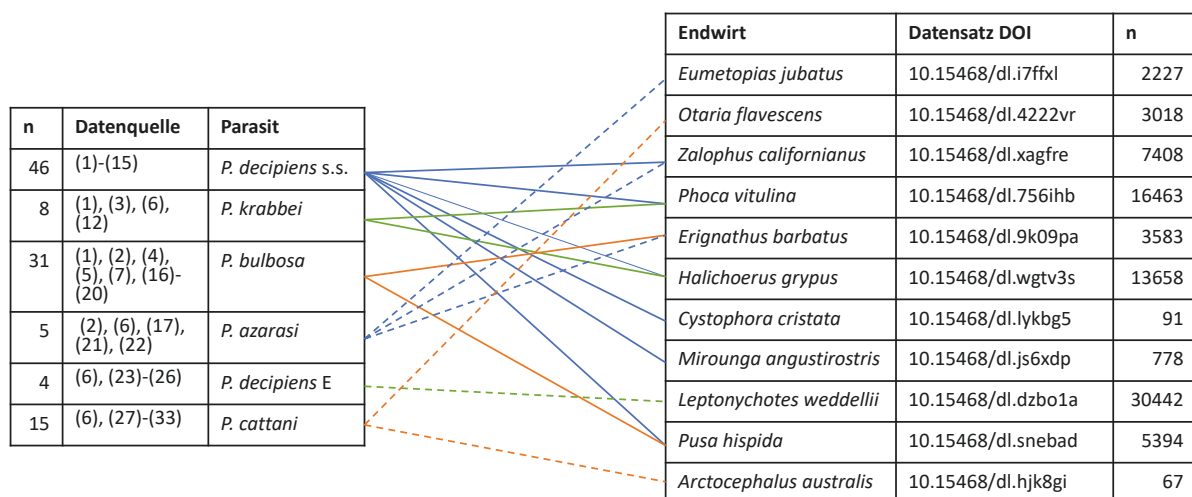


Abbildung 4: Parasit-Endwirt-Beziehungen des *Pseudoterranova decipiens* Komplexes. Anzahl der Datenpunkte (n) und Literaturquellen der Parasitenvorkommensdaten (siehe unten), sowie Datensatz DOI der von GBIF.org bezogenen Vorkommensdaten der Endwirte.

(1) (Paggi et al., 1991), (2) (Paggi et al., 1998), (3) (Paggi et al., 2000), (4) (Bratney & Stenson, 1993), (5) (Bratney & Davidson, 1996), (6) (Zhu et al., 2002), (7) (Nadler et al., 2005), (8) (Kellermanns, Klimpel & Palm, 2007), (9) (Kuhn et al., 2013), (10) (Mehrdana et al., 2014), (11) (Skrzypczak et al., 2014), (12) (Ferrantelli et al., 2015), (13) (Zuo et al., 2016), (14) (Bilska-Zajac et al., 2016), (15) (Klapper et al., 2016), (16) (Bristow & Berland, 1992), (17) (Mattiucci et al., 1998), (18) (Karpiej et al., 2013), (19) (Karpiej et al., 2014), (20) (Najda et al., 2015), (21) (Arizono et al., 2011), (22) (Liu et al., 2015), (23) (Bullini et al., 1997), (24) (Rengifo-Herrera et al., 2014), (25) (Timi et al., 2014), (26) (Münster et al., 2016), (27) (George-Nascimento & Llanos, 1995), (28) (George-Nascimento & Urrutia, 2000), (29) (Hernández-Orts et al., 2013a), (30) (Hernández-Orts et al., 2013b), (31) (Weitzel et al., 2015), (32) (Alarcos et al., 2016), (33) (Jacobus et al., 2016)

Die Modellqualität der biotischen Modellierungen hat sich im Vergleich mit den abiotischen Modellierungen für alle *Pseudoterranova*-Arten verbessert. Zusammen mit DHD stieg der Beitrag anderer Variablen zum Modell ebenfalls an. Demgegenüber stützte sich das abiotische Modellierungsergebnis der Arten mit besonders starkem Datendefizit hauptsächlich auf eine Variable (bspw. Landdistanz im Falle von *P. azarasi*). Die modellierte Vorkommenswahrscheinlichkeit sank entsprechend den Erwartungen monoton zur zunehmenden Endwirtsdistanz. Die Projektionen im Georaum entsprachen

im Falle des biotischen Modells nicht den klassischen Habitataignungskarten, welche jedes physikalisch geeignete Habitat wiedergeben, sondern beschränken sich z.B. auf die Hemisphäre, in der es Fundpunkte der Endwirte gab.

Der Vergleich zwischen den ökologischen Nischen der Parasiten und ihrer Endwirte im Nischenraum zeigte, dass die Nischen der verschiedenen spezifischen Endwirte in Summe die Nische des Parasiten vollständig abdeckten. Das bedeutet, dass Parasit und Endwirt ähnliche Anforderungen an ihre abiotische Umwelt haben.

Diese Studie hat gezeigt, dass die Endwirtsdistanz ein geeigneter biotischer Deskriptor ist, um die Modellierung von *Pseudoterranova*-Arten zu verbessern. Die Ausgangshypothese legte zugrunde, dass die Reproduktion des Parasiten die wichtigste Voraussetzung für eine stabile Population ist, welche nicht durch eine rein abiotische Modellierung abgebildet wird. Die biotische Variable kompensiert teilweise das Datendefizit von *P. azarasi* und *P. decipiens* E, wodurch auch aus den abiotischen Variablen mehr Information mit in das Modell floss. Die geographische Projektion der Modellierungsergebnisse basierend auf abiotischen Deskriptoren ist im Falle des Parasiten besonders problematisch, da sie nur eine Habitataignung auf physikalischer Basis wiedergeben und dabei nicht nur räumliche Barrieren außer Acht lassen, sondern die biologisch-ökologischen Barrieren eines mehrwirtigen Lebenszyklus ignorieren. Somit kann ein abiotisches Modell nur die potenzielle Habitataignung, jedoch nicht die realisierte Verbreitung wiedergeben.

Ein ähnlicher Modellierungsansatz für einen marinen Endoparasiten wurde von Kuhn et al. (2016) publiziert, allerdings dienten hier nicht die Vorkommensdaten der Endwirte sondern ihre modellierte Vorkommenswahrscheinlichkeit als biotischer Prädiktor. Während dieses Vorgehen im Falle der dort modellierten Arten aus der Gattung *Anisakis*, deren Endwirte Zahnwale sind, eine sinnvolle Entscheidung war, wurde in dieser Studie auf einen zusätzlichen Modellierungsschritt verzichtet, da im Falle von *Pseudoterranova* spp. ein auf den Vorkommensdaten der Endwirte basierender Prädiktor, in Form von Endwirtsdistanzen, eine robustere Datenbasis bildet.

Endwirtsdistanzen eignen sich als biotischer Deskriptor für die Modellierung mariner Endoparasiten, insbesondere wenn gute, unabhängige Vorkommensdaten der Endwirte zur Verfügung stehen. Im Falle der hier modellierten Arten des *Pseudoterranova decipiens* Komplexes war der biotische Deskriptor teilweise in der Lage die ungünstige Datenlage der Parasiten zu kompensieren.

3.3 Alt KG, Feldmeyer B, Kochmann J, Klimpel S (2022) Gene expression and allergenic potential of *Pseudoterranova bulbosa* L3 from different infection sites in North Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Fish Diseases*

Technische Innovationen im Bereich der genetischen Sequenzierung und computer-gestützten Datenauswertung haben im letzten Jahrzehnt neue Ansätze und Perspektiven bei der Erforschung von Parasiten geschaffen. Sie ermöglichen die Untersuchung bisher unverstandener Aspekte des Lebenszyklus, z.B. in der Parasit-Wirt-Interaktion. Bei zoonotischen Nematoden aus der Familie der Anisakidae ist die Mikrohabitatwahl des Parasiten im Fischwirt ausschlaggebend für eine Übertragung auf den Menschen (Cattan & Carvajal, 1984; Hernández-Orts et al., 2013a; Klapper et al., 2015; Cipriani et al., 2016). Werden Anisakidae mit einer unzureichend gegarten oder roh zubereiteten Fischmahlzeit vom Menschen lebendig aufgenommen, kann die Infektion Anisakidosis auslösen. Darunter versteht man durch den Befall ausgelöste Krankheitsbilder, welche sich in Form gastro-intestinaler, ektopischer und allergischer Symptome äußern und eine chirurgische Entfernung des Parasiten erfordern können (Hochberg & Hamer, 2010). Die genomische und transkriptomische Erforschung der Anisakidae steht noch am Anfang. Erste Studien umfassten die Sequenzierung des Genoms von *Anisakis simplex* s.s., sowie Transkriptome von *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* und deren Hybriden, Resequenzierungsprojekte und Metaanalysen (Fæste et al., 2014; Baird et al., 2016; Consortium International Helminth Genomes, 2017; Bušelić et al., 2018; Cavallero et al., 2018, 2020; Kim et al., 2018; Palomba et al., 2019; Kochanowski et al., 2019, 2020; Nam, Kim & Kim, 2020; D'Amelio et al., 2020). Als häufigster Auslöser der Anisakidosis steht derzeit die namensgebende Gattung *Anisakis* im Mittelpunkt der Forschung. Aufgrund verschiedener Lebensweisen und Tiefenhorizonte treten die Gattungen *Anisakis* und *Pseudoterranova* in unterschiedlichen Fischwirten auf (McClelland, 2002; Klimpel, Kellermanns & Palm, 2008). Da es für Speisefische unterschiedliche Präferenzen für die Zubereitung gibt, treten humane Infektionen häufiger mit Parasiten auf, die Fischarten befallen, welche vorzugsweise roh oder halbroh verzehrt werden.

Im Atlantischen Kabeljau (*Gadus morhua*) wurde die Parasitierung verschiedener Mikrohabitate durch *Pseudoterranova* spp. beobachtet (eigene Beobachtung sowie Nadolna & Podolska, 2014; Mehrdana et al., 2014; Klapper et al., 2018). In der Leibeshöhle waren Lebergewebe und Viscera befallen, wobei Ansammlungen anisakider Nematoden im Lebergewebe gadider Fischwirte auffielen. Sofern diese Verteilung für den Parasiten

von Vorteil ist, beispielsweise, weil er im Bereich der Leber Nährstoffe erhält, oder vor einer Immunantwort des Wirtes besser geschützt ist, sollte sich dieser Effekt in unterschiedlichen Genexpressionsmustern zwischen den infizierten Wirtsgeweben zeigen. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden Proben von *P. bulbosa* aus Leber und Viscera des Atlantischen Kabeljaus entnommen, ein *de novo* Transkriptom assembliert und eine differentielle Genexpressionsanalyse durchgeführt. Diese Daten wurden in den Kontext des bisherigen Standes der Forschung zur Mikrohabitatwahl und Migration anisakider Nematoden im Fischwirt eingeordnet. Da in Speisefischen bereits Spuren eines Allergens ein Risiko für sensibilisierte Personen darstellen, wurde zusätzlich untersucht, ob von *P. bulbosa* exprimierte Proteine homolog zu bekannten Nematodenallergenen sind (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database (Pomés et al., 2018)), woraus sich erste Hinweise auf das allergene Potential dieser Art ergeben.

Die Probennahme von *Pseudoterranova bulbosa* erfolgte im Rahmen der 341. Expedition des Fischereiforschungsschiffs Walther Herwig III. Die Parasiten wurden direkt nach dem Fang aus Atlantischen Kabeljauen (*Gadus morhua*) entnommen, welche eine Infektion von Lebergewebe und Viscera mit *Pseudoterranova* aufwiesen. Die Parasiten wurden mittels genetischem Barcoding auf Artebene bestimmt (COI, Arizono et al., 2011). Um sicherzustellen, dass die für die Transkriptomsequenzierung verwendeten Proben der gleichen Population angehören, erfolgte die Probenauswahl basierend auf einem gemeinsamen Genotyp (ITS+, Zhu et al., 1998). Die Sequenzierung auf der Illumina NovaSeq 6000 Plattform (Illumina Inc., San Diego, USA) erfolgte bei Novogene UK Company Limited (Cambridge, Vereinigtes Königreich) und erzielte Transkripte von 13 Proben. Die Rohdaten sind unter der Accession-Nummer PRJEB42010 online zugänglich. Die Datenanalysepipeline umfasste taxonomische Filterung (Kraken2 v.2.1.0, Wood, Lu & Langmead, 2019), Assemblierung (Trinity v.2.11.0, Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013), Translation (TransDecoder v.5.50, Haas, 2018), Qualitätsprüfung (BUSCO v.4.1.4, Simão et al., 2015), Mapping (HISAT2 v.2.2.1, Kallisto v.0.46.1, Bray et al., 2016; Kim et al., 2019), Annotation (BLASTX v.2.12.0, Altschul et al., 1990; Gish & States, 1993) und Proteinklassifizierung (InterProScan v.5.47-82.0, Jones et al., 2014). Die differentielle Genexpressionsanalyse wurde mit dem R-Paket DESeq2 (v.3.1.2, Love, Huber & Anders, 2014), mit dem Infektionsort ("site") als Hauptfaktor, durchgeführt. Zu Nematodenallergenen (gem. WHO/IUIS Nomenclature Database, Pomés et al., 2018) wurden homologe Proteinsequenzen (> 80 % Identität) anhand einer BLASTX-Suche identifiziert.

Das assemblierte *de novo* Transkriptom, auf Basis der taxonomisch gefilterten Reads umfasste 65.146 Transkripte und 25.405 Gene, bei einem GC-Anteil von 40.54 %. Mit BLASTX ergab sich eine Annotation mit 92.3 % Abdeckung, mit InterProScan wurden 61.1 % der Transkripte Proteinen zugeordnet. Im Rahmen der Studie wurden siebzig differentiell exprimierte Gene identifiziert, von denen 32 in der Leber und 38 in Viscera signifikant häufiger exprimiert waren. Mittels BLASTX-Annotation wurden hauptsächlich Homologe zu in anderen Nematoden (z.B. *Loa loa* und *Brugia malayi*) beschriebenen Genen identifiziert. Die funktionelle Annotation der differentiell exprimierten Gene mit QuickGO zeigte u.A. Stoffwechselprozesse und RNA-Regulation. Das Allergenscreening der *P. bulbosa* Transkripte identifizierte Homologe zu Ani s 2 (Paramyosin), Ani s 3 (Tropomyosin), Ani s 7, Ani s 13 (Hämoglobin) und Asc s 13 (Glutathion-S-Transferase). Mit Ani s 3 bestand die höchste Übereinstimmung und Ani s 2 war am stärksten exprimiert.

Die aus dem Transkriptom von *Pseudoterranova bulbosa* gewonnenen Daten zeigten nur ein subtiles Muster hinsichtlich der mikrohabitatabhängigen Genexpression. Die Bewegung anisakider Nematoden im Fischwirt wurde in bisherigen Studien sowohl deskriptiv als auch experimentell behandelt (Sukhdeo & Sukhdeo, 1994; Strømnes & Andersen, 1998, 2003; Quiazon, Yoshinaga & Ogawa, 2011; Strømnes, 2014; Bušelić et al., 2018). Dabei wurden sowohl die Parasitenverteilungen im Fisch direkt nach dem Fang als auch nach längerer Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Die derzeitige Studienlage zeigt kein einheitliches Ergebnis und weist darauf hin, dass die Mikrohabitate von Anisakiden abhängig von der Wirtsart variieren (Strømnes & Andersen, 1998). Es wurden verschiedene Faktoren beschrieben, die die Verteilung oder das Migrationsverhalten der Larven beeinflussen, z.B. Temperatur (Cipriani et al., 2016), pH-Wert (Šimat et al., 2015), Lipidgehalt (Strømnes & Andersen, 1998, 2003; Strømnes, 2014). Die geringen Unterschiede in der Genexpression von *P. bulbosa* aus Leber und Viscera lassen unterschiedliche Interpretationen zu. Die hohe Infektion der Leber könnte durch die Position der am Magen anliegenden Leberlappen, also durch räumliche Nähe anstelle einer gerichteten Infektion begründet sein (Young, 1972). Sofern die Mikrohabitatwahl aufgrund günstiger Bedingungen für den Parasiten in der Leber von Kabeljau erfolgt, z.B. durch hohen Fettgehalt (Strømnes & Andersen, 2003), war dies anhand der hier erhobenen Genexpressionsdaten nicht ersichtlich. Es kommt in Frage, dass es sich bei der Migrationsphase nach der Infektion eines neuen Wirtes um ein kurzes Zeitfenster handeln könnte, oder bei den auslösenden Faktoren ein Sättigungseffekt

eintritt. Die ähnliche Genexpression in beiden Mikrohabitaten könnte durch ein Dauerstadium der Larven zum Zeitpunkt der Probennahme erklärt werden (Hand et al., 2016), in dem die Larve durch eine Enzystierung in Wirtsgewebe vor der Immunantwort des Wirts geschützt wird (Buchmann, 2012). Die Kabeljausequenzen, die beim taxonomischen Filtern entfernt wurden, könnten von Überresten der Zystenhülle stammen, oder darauf hinweisen, dass der Parasit sich von Wirtsgewebe ernährt. In transkriptomischen Folgestudien zu dieser Thematik könnte ein mit RNA-Sampling kombinierter experimenteller Ansatz verfolgt werden, ähnlich wie bei Strømnes (2014), wo das Migrationsverhalten von *Anisakis* Larven auf Agarmedium mit einem Lipidgradienten beobachtet wurde.

Im Transkriptom von *P. bulbosa* fanden sich fünf mögliche Allergene, die homolog zu bekannten Nematodenallergenen sind. Allerdings lässt diese Homologie noch keine Schlüsse auf die Allergenität zu, da schon kleine Sequenzunterschiede Einfluss auf die Proteinfaltung haben. Durch unterschiedliche Faltung kann sich die Oberflächenstruktur ändern und ausschlaggebend sein, ob Antigenbindestellen vorhanden sind (Guarneri, Guarneri & Benvenga, 2007). Die hier erhobenen Daten stellen einen Ausgangspunkt für weitere Forschung und serologische Studien dar. Transkriptomdaten von möglicherweise allergieauslösenden Parasiten sind vorteilhaft, da sie zeigen, welche Allergene im Wirt tatsächlich exprimiert werden. Die Daten liefern Hinweise darauf, welche Allergene möglicherweise auch nach dem Entfernen des Parasiten in Spuren in einem Fisch verbleiben.

4. Diskussion

Die im Folgenden diskutierten Forschungsfragen sollen die Ergebnisse der drei Studien in einen breiteren wissenschaftlichen Kontext einordnen. In Studie I wird die Eignung antarktischer Fischparasiten und -gemeinschaften als Bioindikatoren diskutiert. Die Diskussion von Studie II ordnet das Potential und die Grenzen von Habitateignungsmodellierungen mariner Parasiten und den Beitrag biotischer Prädiktoren ein. Die Anwendung von Genexpressionsanalysen bei der Erforschung der Mikrohabitatwahl von *Pseudoterranova bulbosa* im Fischwirt wird basierend auf Studie III betrachtet.

4.1 Können Parasiten(-gemeinschaften) antarktischer Fische als Bioindikatoren dienen?

Da Organismen mit ihrer Umwelt in Wechselwirkung stehen, können Veränderungen in der Umwelt gegebenenfalls am Organismus beobachtet werden. Organismen, die an bestimmte Umweltbedingungen angepasst sind und dort über einen Vorteil gegenüber anderen Arten verfügen, können als Indikatoren dieser Umweltfaktoren dienen (z.B. Metallophyten als Schwermetallzeiger). Bei parasitischen Lebenszyklen handelt es sich um eine durch Koevolution entstandene Beziehung zwischen Parasiten und Wirtsorganismen (Brooks, 1979, 1987), welche Rückschlüsse auf die Lebensweise (z.B. Habitat, Ernährung, Räuber-Beute-Beziehungen) und Umwelt (z.B. Migrationsverhalten, Artenvielfalt der Biozönose, Störungen des Ökosystems) der Wirte zulassen. Parasiten können als biologische Indikatoren, Akkumulationsindikatoren und Effektindikatoren dienen (Palm, 2011). Eine verbreitete Anwendung mariner Parasiten als Indikatoren ist die Identifikation von Fischbeständen (Moser & Cowen, 1991; Hemmingsen, Lombardo & Mackenzie, 1991; Mackenzie & Abaunza, 1998; Mackenzie, 2002; Santos et al., 2009; McClelland & Melendy, 2011; Marcogliese & Jacobson, 2015; Alarcos et al., 2016; Pascual, Abollo & González, 2016; Klapper et al., 2016; Cipriani et al., 2018a), welche zur Fangquotenbestimmung wirtschaftlich genutzter Fischarten dient.

Um als Indikator in Frage zu kommen, muss ein Parasit bestimmte Bedingungen erfüllen: (1) eine möglichst lange Lebensdauer, (2) ein bekanntes, begrenztes Verbreitungsgebiet, (3) einen bekannten Lebenszyklus (Margolis, 1965), (4) keine Saisonalität, (5) leicht und eindeutig zu identifizieren, (6) kein starker negativer Einfluss auf die Wirtsfitness (Mackenzie, 2002), (7) geringes Verlustrisiko während der Probennahme, (8) Daten

erlauben die Berechnung parasitologischer Parameter gemäß Bush et al. (1997; Palm, 2011).

Die in Projekt (I) identifizierten Parasitenfaunen der Antarktisdorsche *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* und *Lepidonotothen squamifrons* wiesen eine niedrige Wirtsspezifität auf. Ein Abgleich mit einer im Rahmen dieser Studie ergänzten Checkliste (Oğuz et al., 2015) des Wirtsspektrums der Parasiten zeigte ein Vorherrschen euryxener Arten, sowohl im Larven- als auch im Adultstadium. Die Spezifität von Larvenstadien im Fischwirt ist häufig gering, anders verhält es sich mit Parasiten, die in Fischen ihr Adultstadium erreichen. Adulte Fischparasiten weisen innerhalb der Antarktis eine niedrige Wirtsspezifität auf, da die Fischfauna der Antarktis entwicklungsgeschichtlich jung ist. Nach der plattentektonischen Öffnung der Drakestraße zwischen Südamerika (Kap Horn, Chile) und der Antarktischen Halbinsel entstand vor 34 bis 30 Millionen Jahren der Antarktische Zirkumpolarstrom (Livermore et al., 2005), welcher mit einer starken östlichen Strömung und thermohalinen Front die größte physiothermale Barriere der Weltmeere darstellt. Die in der Antarktis seither dominanten Fische sind Notothenioidea (Eastman, 2005). Sie entstanden durch die adaptive Radiation benthisch lebender Vorfahren und zeichnen sich durch langsame Ontogenese und lange Generationszeiten aus (Eastman & Clarke, 1998). Wirtsspezifität ist eine Eigenschaft von Parasiten, die sich evolutiv über lange Zeiträume, zeitverzögert zu ihren Wirten, entwickelt (Manter, 1963). Dies wird anhand phylogenetischer Parallelen von Parasiten und Wirten deutlich (Page, 1994; Desdevises, 2007). Zieht man in Betracht, dass die Artenvielfalt antarktischer Fische entwicklungsgeschichtlich jung ist, erschließen sich die breiten Wirtsspektren ihrer Parasiten. Dabei könnten auch Prozesse kumulativer Evolution stattgefunden haben (Palm & Klimpel, 2007). Die ähnliche, teils opportunistische Ernährungsweise von Antarktisdorschen (Barrera-Oro, 2002) sorgt für entsprechendes Überlappen der Nahrungsspektren und Parasitenfaunen (Campbell, Haedrich & Munroe, 1980).

Dieser Umstand erschwert das Herausgreifen einzelner Parasiten als Indikatoren. Als Kandidaten kämen Acanthocephalen in Frage, da ihre Lebenszyklen in der Antarktis gut erforscht sind (Zdzitowiecki, 1983, 1984, 1986, 1990, 1991, 1996; Zdzitowiecki & Rokosz, 1986; Zdzitowiecki & White, 1992, 1996; Zdzitowiecki & Presler, 2001; Laskowski & Zdzitowiecki, 2010, 2017; Laskowski, Jeżewski & Zdzitowiecki, 2010). Ein Nachteil von Acanthocephalen ist die Identifikation, welche morphologisch zwar möglich ist, jedoch unversehrter Belege bedarf. Die für die morphologische Bestimmung essentielle

Proboscis ist nur sichtbar, wenn im Parasiten ein hoher Innendruck herrscht, weil man ihn z.B. einer hypotonen Lösung aussetzt. Bei der Präparation verkapselter Larvenstadien kommt es leicht zu Verletzungen der Außenhülle und eine morphologische Bestimmung auf Artebene ist nicht mehr gesichert. Genetische Identifikation ist eine mögliche Alternative zur morphologischen Bestimmung, bedarf jedoch entsprechender Referenzen, welche für antarktische Acanthocephalen bisher nicht vorliegen.

Anstelle einzelner Arten lassen sich auch Parasitengemeinschaften als Indikatoren verwenden (Hudson, Dobson & Lafferty, 2006; Palm, 2011; Palm, Kleinertz & Rückert, 2011; Kleinertz et al., 2014; Kuhn et al., 2018). Bei der Auswertung unterscheidet man zwischen einfachen statistischen Ansätzen unter Verwendung von Diversitätsindizes und parasitologischen Parametern nach Bush et al. (1997) mit geeigneten Signifikanzanalysen und komplexen Verfahren auf Basis multivariater Statistik (Campbell, Haedrich & Munroe, 1980). Mögliche Kandidaten dafür sind anisakide Nematoden, die in antarktischen Fischen weit verbreitet sind und zuverlässig molekular identifiziert werden können. In der Antarktis sind *Pseudoterranova decipiens* E (Palm, 1999), *Contracaecum osculatum* D und E und *C. radiatum* (Mattiucci et al., 2008) endemisch. Die bisherige Verwendung anisakider Nematoden diente der Bestandstrennung kommerzieller Fischarten (Mattiucci et al., 2004, 2007a; Klapper et al., 2016). Bei einer Verwendung als Indikatoren für ganze Ökosysteme stellt sich die Frage, ob die Diversität der Nematoden in der Antarktis und die Komplexität ihrer Lebenszyklen ausreicht, um als Effektindikatoren von Ökosystemen zu dienen. Das Einbeziehen populationsgenetischer Diversität anisakider Nematoda (Klapper et al., 2016) könnte jedoch einen möglichen Teilaspekt des Monitorings von Fischbeständen darstellen.

Anders als diese wirtschaftlich orientierte Nutzung von Bioindikatoren als Bestandsmarker, stellt sich in der Antarktis die drängende Frage nach den Auswirkungen des Klimawandels und der damit verbundenen Erwärmung auf kälteadaptierte Ökosysteme. Antarktischer Krill (*Euphausia superba*) und benthische Nototheniidae sind Schlüsseltaxa für den Energiefluss der Antarktischen Halbinsel (Barrera-Oro, 2002) und gleichermaßen von niedrigen Temperaturen abhängig – die Kinderstube des Krills liegt unter der Eisdecke (Daly & Macaulay, 1991) und antarktische Nototheniidae gelten als stenotherm und haben eine limitierte Anpassungsfähigkeit gegenüber erhöhten Umgebungstemperaturen (Bilyk, Evans & DeVries, 2012; Strobel et al., 2013). Um die Veränderungen der Lebensgemeinschaften unter den Auswirkungen des Klimawandels zu erfassen, muss ein möglichst ganzheitlicher Ansatz verfolgt werden. Dafür sind

Parasitengemeinschaften als Indikatoren weit besser geeignet als einzelne Taxa. Anhand gut erforschter Parasitengemeinschaften lassen sich Rückschlüsse auf die Diversität der Organismen im Ökosystem ziehen (Hudson, Dobson & Lafferty, 2006; Palm & Rückert, 2009).

In Studie I wurde ein bisher uneinheitliches Sampling antarktischer Fischparasitengemeinschaften festgestellt. Eine retrospektive Auswertung der Daten war aus diesem Grund nicht möglich. Um als Bioindikatoren erhobene Daten in einer Zeitreihe vergleichen zu können, ist ein einheitliches Studiendesign notwendig. Parasitologische Daten müssen an festgelegten Probestellen, aus festgelegten Referenzarten mit normierten Methoden erhoben werden. Grundlegend dafür ist die zuverlässige Bestimmung der Parasiten auf Artniveau. Dies setzt neben morphologischen Bestimmungskennntnissen die Auswahl und Etablierung geeigneter genetischer Marker für die Parasiten der Referenzwirte voraus, da sonst fehlerhafte oder ungenaue Referenzdaten entstehen. Auf molekularen Markern basierende Bestimmung sollte morphologische Verfahren ergänzen. Im Idealfall sollten morphologische und genetische Belege vorliegen und neben wissenschaftlichen Sammlungen auch in digitalen Datenbanken archiviert werden. Dieser Ansatz sichert die Qualität von Bestimmungsdaten unabhängig von Spezialkenntnissen Einzelner und Spezialisierungen auf bestimmte Parasitengruppen.

Das Samplingdesign sollte in Betracht ziehen, dass Standorteffekte (Margolis, 1965; Moser & Cowen, 1991; Laskowski & Zdzitowiecki, 2005; Kleinertz et al., 2014; Münster et al., 2016; Muñoz & Rebolledo, 2019) möglich sind, die auch für Nahrungsnetze beschrieben wurden (McCormack et al., 2021). Probenstellen sollten so gewählt werden, dass sie regelmäßig ortsgenau zugänglich sind und möglichst viele unterschiedliche Habitate abbilden. Für die Beprobung küstennaher Stellen könnte in der Antarktis die vorhandene Infrastruktur meeresbiologischer Forschungsstationen genutzt werden. Neben Standorten, an denen Störungen (multiple Stressoren, z.B. Klimawandel und anthropogene Einwirkungen) zu erwarten sind, sollten auch Vergleichsstandorte mit möglichst geringem anthropogenem Einfluss gewählt werden, die als Referenz dienen. Die Störung, die durch die Probennahme selbst entsteht, sollte so minimal wie möglich gehalten werden. Die Kommission zur Erhaltung der lebenden Meeresschätze der Antarktis (CCAMLR) hat zum Schutz vulnerabler mariner Ökosysteme 2019 (gemäß Schutzmaßnahme 22-06) strenge Regularien zur Verwendung von Grundschieppnetzen beschlossen. Obwohl Ausnahmen für Forschungszwecke bestehen, stellt sich bezüglich

des Monitorings benthischer und benthopelagischer Organismen die Frage, ob langfristig Alternativen zu Grundschleppnetzen möglich sind. Die FAO nennt bodennahe Stellnetze und Langleinen sowie Fallen und Reusen als Alternativen (Valdemarsen, Jørgensen & Engås, 2007). Zwar besteht auch hier das Problem geringer Selektivität, jedoch ohne die zerstörerische Auswirkung eines Grundschleppnetzes auf den Meeresgrund (z.B. Sedimente, Strukturelemente, Bakterien) und darin lebende Organismen, die nicht Ziel des Samplings sind. Die Fangmethode sollte bei der Auswahl des Wirtsorganismus mit bedacht und durch Vorversuche untersucht werden. Bei der Wahl des Probennahmeintervalls sollte die Überlebensdauer von Parasiten im Fischwirt berücksichtigt werden.

Ein möglicher Wirtskandidat aus Studie I wäre *Lepidonotothen squamifrons*, der sich benthisch und benthopelagisch ernährt und von den betrachteten Fischen die größte Parasitendiversität aufwies. Da Fische im Rahmen ihrer Ontogenese einen Wechsel der Nahrungspräferenz durchlaufen, der sich auf ihre Parasitierung auswirkt (Campbell, Haedrich & Munroe, 1980; Lafferty et al., 2008), sollten nur Fische ähnlicher Größe (als Maßstab für das Alter) berücksichtigt werden. Die Auswertung sollte durch multivariate Statistik, wie Ordinationsverfahren, erfolgen, um die gesamte Parasitenfauna zu erfassen und so auch feinste Unterschiede abbilden zu können. Parasiten als Indikatoren setzen voraus, dass der (nahrungsoportunistische) Wirt zuerst seine Ernährung ändert und erst später durch weitere Verhaltensänderungen, wie Ortswechsel (z.B. in tiefere Zonen) reagiert.

Mögliche Probleme bei Verwendung von Parasiten als Indikatoren entstehen durch die Langlebigkeit bestimmter Parasitentaxa, z.B. Nematoda (Smith, 1984). Durch ihr langes Verbleiben im Wirt zeigen sie eine verzögerte Reaktion auf Veränderungen und bilden Effekte zeitverschoben ab. Die Probennahme stellt, wie bereits ausgeführt, aufgrund ihrer Invasivität und fehlenden Selektivität, ebenfalls ein Problem dar. Alternative, nicht invasive Monitoringverfahren auf Basis genetischer Methoden, wie das eDNA-Barcoding, bedürfen der entsprechenden Datenbasis. Die Datenbank des Barcode of Life Data System (BOLD, Ratnasingham & Hebert, 2007) verfügt momentan noch nicht über ausreichende Referenz-DNA-Barcodes aus der Antarktis (z.B. 64 Referenzen für Chordata, 3 Echinodermata, 907 Arthropoda, 16 Mollusca, 87 Porifera, 28 Nematoda), um eine Alternative zur klassischen Probennahme von Organismen darzustellen. Der Beitrag zu Datenbanken sollte in künftigen Forschungsbestrebungen stets mit bedacht werden.

Fazit 1) Das Monitoring antarktischer Fischparasiten kann einen wichtigen Beitrag zu der integrativen Überwachung von Ökosystemen leisten. Dazu sollten Parasitengemeinschaften herangezogen werden. Um Daten zu generieren, die untereinander und in einer Zeitreihe vergleichbar sind, ist ein einheitliches, durchdachtes Studiendesign unerlässlich. Da es sich beim Monitoring der Parasitenfaunen demersaler Fische um ein invasives Verfahren handelt, sollte eine regelmäßige Abwägung von Kosten und Nutzen stattfinden. In Rahmen des Monitorings könnte außerdem durch Aufarbeiten von Beifang und durch zusätzliche Probennahmen daran gearbeitet werden, die Datengrundlage für neue, weniger einschneidende Monitoringverfahren, z.B. eDNA-Barcoding, zu erweitern.

4.2 Kompensieren biotische Prädiktoren die Schwachpunkte von Habitateignungsmodellen des *Pseudoterranova decipiens* Komplexes und anderer Arten mit geringen Vorkommensdaten?

Die Grundannahme der Habitateignungsmodellierung des *Pseudoterranova decipiens* Komplex (II) war, dass Fundpunkte infizierter Fischwirte auf die Verbreitung des Parasiten schließen lassen. Der Fischwirt überbrückt im Falle anisakider Nematoda in der Regel die trophische Lücke zwischen dem ersten Wirt (Crustacea) und dem Endwirt (Pinnipedia) und gewährleistet somit die Übertragung und ist ein wichtiges Bindeglied im Lebenszyklus der Parasiten. Somit floss in die in Studie II als abiotisch bezeichnete Modellierung auf Basis der Fundpunkte infizierter Fische bereits eine gewisse biotische Information ein. Die tatsächliche, abiotische Nische des Parasiten müsste durch Fundpunkte des an den Meeresboden angehefteten Larvenstadiums bestimmt werden. Das Vorkommen der freien Larvenstadien ist jedoch räumlich stark an das Vorkommen infizierter Endwirte geknüpft, die Eier des Parasiten in die Wassersäule ausscheiden (Kapitel 2.2.3). Die systematische Beprobung von Pinnipedia, in Form einer parasitologischen Untersuchung durch Präparation, ist ethisch problematisch und das Sammeln und Zuordnen von Kotproben semi-aquatischer Organismen, die ihren Fäzes im Wasser absetzen, ist um ein Vielfaches erschwert gegenüber terrestrischer Probennahme. Aus diesem Grund stellt sich die Probengewinnung von *P. decipiens s.l.* aus dem Fischwirt am praktikabelsten dar. Über weite Strecken migrierende Fischwirte können jedoch zu einer Verzerrung der Vorkommensdaten führen, da *Pseudoterranova* spp. im Fischwirt lange überdauern (Smith, 1984) und es sich bei dem Fangort des Fisches nicht um den Ort handeln muss, an dem die Infektion mit dem Parasiten stattfand. Daraus resultierende

Ausreißer fallen bei ausreichendem Stichprobenumfang nicht ins Gewicht, sind jedoch relevant, wenn, wie in Studie II, nur wenige Fundpunkte der Parasitenart vorhanden sind. Datendefizite sind ein bei *P. decipiens s.l.* und anderen Anisakiden generell auftretendes Problem, da im Fischwirt das dritte Larvenstadium vorliegt, welches schwer zu identifizieren ist und nur genetisch auf Artniveau bestimmt werden kann. Wird bei der Fragestellung einer Studie die Bestimmung auf Gattungsebene als ausreichend erachtet, werden häufig Aufwand und Kosten gespart und die Parasiten nicht weiter auf Artebene identifiziert. Daraus resultieren lückenhafte Vorkommensdaten. Aufgrund unterschiedlich intensiver Forschungsaktivitäten in verschiedenen geographischen Regionen sind Arten aus schwer zugänglichen Gebieten außerdem unterrepräsentiert. Der *P. decipiens* Komplex kommt von den gemäßigten bis in die polaren Zonen beider Hemisphären vor (Mattiucci & Nascetti, 2008). Die Arten der nördlichen Hemisphäre haben teilweise überlappende Verbreitungsgebiete, etwa *P. decipiens s.s.* und *P. bulbosa* (Mattiucci et al., 2017a). Während man in der Antarktis davon ausgehen kann, dass es sich bei als *P. decipiens s.l.* bestimmten Proben um *P. decipiens* E handelt (Timi et al., 2014), lassen sich Proben aus dem Nordatlantik nur durch molekulares Barcoding unterscheiden. Nicht nur die erschwerte Artidentifikation, sondern auch das Fehlen georeferenzierter Fundpunkte mit ausreichender Auflösung tragen zu defizitären Vorkommensdaten mariner Endoparasiten bei.

Ihr humanpathogenes Potential und die Wertminderung von Fischereiprodukten durch für den Verbraucher auffälligen Befall mit einem 2-4 cm langen rötlich-braunem Wurm, sind gute Gründe, die Verbreitung von *Pseudoterranova* spp. zu untersuchen. Die nach Arten aufgeschlüsselte Modellierung ist nicht nur aufgrund des vermutlich unterschiedlichen pathogenen Potentials der einzelnen Spezies (siehe Kapitel 2.3) sinnvoll, sondern auch aufgrund ihrer zum Teil sehr unterschiedlichen ökologischen Nischen. Modellierungsalgorithmen berechnen anhand der an den Vorkommenspunkten einer Art herrschenden Umweltbedingungen die ökologische Nische, beziehungsweise bei MaxEnt die ökologische Nischenfunktion (Phillips, Anderson & Schapire, 2006; Cunze & Tackenberg, 2015). Kombiniert man im Falle des *P. decipiens* Komplexes Fundpunkte von der Doggerbank (Nordsee, *P. decipiens s.s.*) mit Vorkommen im Weddelmeer (Antarktis, *P. decipiens* E), würde ein auf Basis dieser Daten trainiertes Modell beide Nischen überschätzen und in der geographischen Projektion eine unspezifische Habitatsignung zeigen. Für *P. decipiens s.s.* (n=46) und *P. bulbosa* (n=31) existierten zum Zeitpunkt der Studie II mit Abstand die meisten georeferenzierten Fundpunkte. Diese

konzentrieren die Vorkommensdaten vorwiegend auf den Nordatlantik und führten zu einer in Modellierungen unerwünschten geographischen Gewichtung und somit zu einer Verzerrung der Daten. Um diesen Effekt zu vermeiden, wurden die Arten in Studie II individuell betrachtet, wodurch die ungleiche Beprobung der verschiedenen Arten zum Problem wurde. Während *P. decipiens* s.s. und *P. bulbosa* ausreichend georeferenzierte Fundpunkte aufwiesen, lag bei den anderen Arten des Komplexes ein Datendefizit vor [*P. cattani* (n = 15), *P. krabbei* (n = 8), *P. azarasi* (n = 5) and *P. decipiens* E (n = 4)].

Neben Vorkommensdaten sind Umweltdaten die zentralen Ausgangsinformationen einer ökologischen Nischenmodellierung. Bei terrestrischen Arten beziehen sich Umweltdaten auf die Erdoberfläche und beziehen sich somit auf einen zweidimensionalen Raum. Aquatische Lebensräume beinhalten eine dritte Dimension, die Tiefe, an die Teils dramatische Veränderungen abiotischer Umweltbedingungen geknüpft sind. Das Leben innerhalb der Ozeane spielt sich in einer Wassersäule von bis zu 11 Kilometern (Tiefe des Mariannengrabens) ab, die durchschnittliche Meerestiefe beträgt etwa 3,7 Kilometer. In den Meereswissenschaften werden verschiedene Zonen des Freiwassers unterschieden, die Tiefenzonen des Epi-, Meso-, Bathy-, Abyss- und Hadopelagials. Diese Zonierung ergibt sich aus dem Lichtanteil, der die Wassersäule durchdringt. Der Einfluss von Sonneneinstrahlung und Wind ist an der Wasseroberfläche ein anderer als in der Tiefe. In unterschiedlichen Tiefen können sich daher abiotische Parameter wie Temperatur, Salinität, Nähr- und Spurenstoffgehalt sowie Strömung stark unterscheiden. Aus diesem Grund argumentieren Duffy & Chown (2017), dass bei der Modellierung von Meeresorganismen bathymetrische Daten miteinfließen sollten und die Dreidimensionalität des Lebensraumes eine dreidimensionale Nischenprojektion erfordert. Temperatur- und Strömungsdaten der Meeresoberfläche sind keine geeigneten Variablen für die Modellierung von Organismen, die in größeren Tiefen leben. Besonders problematisch sind Organismen, die im Pelagial leben und sich in drei Dimensionen bewegen. In Ermangelung dreidimensionaler Daten schlagen Duffy & Chown (2017) ein 2,5 D Modell vor, in dem die Habitateignung in verschiedenen Tiefen projiziert wird. Die Berücksichtigung der Tiefe ist insbesondere bei Forschungsfragen, die mögliche Auswirkungen des Klimawandels auf das Vorkommen behandeln, von Bedeutung, da nicht nur das Ausweichen wärmesensibler Organismen in Bereiche niedrigerer Breitengrade, sondern auch in größere Tiefe, möglich ist (Perry et al., 2005). Mit der Berücksichtigung der Tiefe steigen jedoch die Anforderungen an die Probennahme, da Fundpunkte nicht nur in zwei, sondern in drei Dimensionen erhoben werden müssen

(Klimpel et al., 2007). Dies setzt einen vergleichbaren Beprobungsaufwand der betrachteten Tiefen voraus. Durch Berücksichtigung des Tiefenhorizontes und die Verwendung entsprechender Umweltdaten im model-training ließe sich die Modellierung mariner Organismen verbessern (Duffy & Chown, 2017).

Grundsätzlich gestaltet sich die Modellierung bodenassoziierter Meeresorganismen unkomplizierter, da sie sich durch Tiefe und am Meeresgrund gemessene Umweltvariablen gut darstellen lassen und ihr Lebensraum annähernd zweidimensional ist. Da der Lebenszyklus von *Pseudoterranova* spp. ein benthisches Larvenstadium beinhaltet, stellen die mit zunehmender Tiefe verändernden Bedingungen in der Wassersäule ein geringeres Problem dar als bei der Modellierung pelagischer Organismen, wie bspw. *Anisakis* spp. (Kuhn, García-Màrquez & Klimpel, 2011).

Die Modellierung des *P. decipiens* Komplexes unter Berücksichtigung der Endwirtverbreitung ist eine geeignete Methode, um das regionale Vorkommen einiger Arten in Speisefischen abzubilden. Der Ansatz lässt sich auf andere Arten übertragen, dabei sollte die Voraussetzung erfüllt sein, dass spezifische Wirte des Parasiten bekannt und Fundpunkte unkompliziert zu erheben sind. Es wäre denkbar, dass auch der erste Zwischenwirt kritisch für das Vorkommen des Parasiten ist und als biotischer Prädiktor dienen könnte. Liegt eine ausreichende Spezifität vor, erhöht sich durch das Einbeziehen der Zwischenwirtsdaten der Informationsgehalt der Modellierungseingangsdaten und birgt möglicherweise weiteres Potential für die Modelloptimierung.

Vorkommensdaten mariner Parasiten sind an Wirtsfundpunkte geknüpft und beinhalten inhärent biotische Informationen. Sofern möglich sollten auch ohne ein Datendefizit des Parasitenvorkommens gesicherte biotische Interaktionen mit anderen Wirten in Modelle einbezogen werden. Andernfalls geht man davon aus, dass die Nische eines Fisches, der oftmals als (unspezifischer) paratenischer Wirt dient, in Kombination mit der Gewichtung durch das Parasitenvorkommen (= Selektivität) die Nische des Parasiten bereits ausreichend repräsentiert und vollständig abdeckt. Je mehr biotische Information in ein Modell einfließt, desto geringer das Risiko, dass das Modell die Nische des Parasiten überschätzt.

Das Über- und Unterschätzen der Nische wirft unterschiedliche Probleme bei der Interpretation der Daten hinsichtlich bestimmter Fragestellungen auf. Das Überschätzen der Nische projiziert Parasitenvorkommen, wo kein Parasit vorhanden ist. Dient die Modellierung der Einschätzung der Lebensmittelsicherheit, entsteht ein Spannungsfeld zwischen wirtschaftlichen Interessen (Einschränken von Fanggebieten bei

Überschätzung) und angestrebtem Verbraucherschutz (nicht gewährleistet bei Unterschätzung).

Fazit 2) In Studie II wurde versucht, die dargelegten Probleme bei der Modellierung der Habitatsignung für die Arten des *P. decipiens* Komplexes durch ökologisch sinnvolle Stellvertreter (Endwirtsdistanz) zu kompensieren. Dafür wurde das ökologische Wissen über den Lebenszyklus und die spezifischen Endwirte der Arten genutzt. Dieser Ansatz ließe sich prinzipiell auf alle marinen Parasiten übertragen, deren spezifische Wirte über eine bessere Datenlage verfügen als der Parasit, allerdings mit der Einschränkung, dass biotische Prädiktoren auf regionaler Ebene standorttreu sein sollten. Trotz einer Verbesserung aller Modelle durch den biotischen Prädiktor zeigte sich, dass ausreichende Fundpunkte des Parasiten unerlässlich sind und ein Umdenken bei der Datenerhebung und -publikation wünschenswert wäre. Schwer zu identifizierende Taxa sollten mindestens in Form einer Unterprobe molekularbiologisch bestimmt werden, um eine verlässliche Identifikation der Probe auf Artniveau zu gewährleisten. Die Angabe essentieller Metadaten wie Datum, Fangkoordinaten und Fangtiefe sollte bei der Publikation mariner Parasitenfaunen obligatorisch sein. Liegt eine solche Datenbasis vor, könnten bei pelagischen Parasitenarten neben biotischen Prädiktoren auch dreidimensionale Modellierungsansätze verfolgt werden.

4.3 Wie ist das humanpathogene Potential von *Pseudoterranova bulbosa* nach aktuellem Kenntnisstand zu bewerten?

Die in Projekt (III) betrachtete Nematodenart *Pseudoterranova bulbosa* wurde bisher noch in keiner medizinischen Fallstudie mit Anisakidosis in Verbindung gebracht. Dies kann allerdings (1) mit der lückenhaften Identifikation der Auslöser auf Artebene zusammenhängen, (2) damit, dass mit für Speisezwecke bestimmten Fischereiprodukten keine Würmer aufgenommen werden oder (3) damit, dass sie im Falle einer Aufnahme inaktiv oder (4) tatsächlich nicht pathogen sind (ähnliche Eingrenzung in Shamsi & Sheorey (2018)). Ob es sich bei mit *P. bulbosa* befallenen Fischereierzeugnissen um ein zoonotisches Pathogen oder um ein rein kosmetisches Problem handelt, lässt sich auf Basis der derzeitigen Datenlage nicht ermitteln. Grundsätzlich ist jedoch ein humanpathogenes Potential des gesamten *P. decipiens* Artenkomplexes zum jetzigen Zeitpunkt nicht auszuschließen. Erste Hinweise auf die Möglichkeit eines allergenen Potentials von *P. bulbosa* finden sich in Studie III.

In Studie II wurde gezeigt, dass die modellierten Verbreitungsgebiete der Arten des *P. decipiens* Komplexes sich auf der Nordhalbkugel überlappen, die bekannten auf der Südhalbkugel vertretenen Arten kommen hingegen nicht sympatrisch vor. *Pseudoterranova cattani* ist die bisher einzige in den Gewässern Südamerikas identifizierte Art des Komplexes. Die hohe Bedeutung von Fischereiprodukten an den Küsten des Kontinents, sowie die Verbreitung roher Fischspezialitäten wie Ceviche, die häufig aus möglichen Wirten von *Pseudoterranova* Arten (Corvina, Plattfisch, Schwarzer Seehecht) zubereitet wird, stellen einen Risikofaktor für die Infektion mit der Parasitenart, die dort auch mit Anisakidosis in Zusammenhang gebracht wird, dar (Weitzel et al., 2015; Menghi et al., 2020; Muñoz-Caro et al., 2022).

Das in Studie II identifizierte Verbreitungsgebiet von *P. bulbosa* umfasst die FAO Fanggebiete Nordostatlantik (27), Nordwestatlantik (21), Nordostpazifik (67) und Nordwestpazifik (61) und überlappt mit den Verbreitungsgebieten von *P. decipiens* s.s. Die wichtigsten, kommerziell genutzten, möglichen Wirte von *Pseudoterranova* spp. in diesen Gebieten sind in Tabelle 1 aufgeführt. Diese Arten dienen als potentielle Überträger von *P. bulbosa* auf den Menschen.

Tabelle 1: Kommerziell genutzte, bodenassoziierte Fischarten aus Gewässern des Nordatlantik und Nordpazifik, basierend auf (Barz & Zimmermann, 2022).

Familie	Art	FAO 21	FAO 27	FAO 61	FAO 67
Pleuronectidae	<i>Limanda aspera</i>		x		
	<i>Limanda</i> spp.		x	x	
	<i>Pleuronectes platessa</i>		x		
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	x			
	<i>Scophthalmus maximus</i>		x		
Soleidae	<i>Solea solea</i>		x		
Gadidae	<i>Gadus chalogrammus</i>			x	x
	<i>Gadus macrocephalus</i>				x
	<i>Gadus morhua</i>		x		
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>		x		
Merlucciidae	<i>Merluccius merluccius</i>		x		
Merlucciidae	<i>Merluccius productus</i>				x
Lophiidae	<i>Lophius</i> spp.		x		
Sebastidae	<i>Sebastes</i> spp.	x	x		
Salmonidae	<i>Oncorhynchus</i> spp.				x

Da der Handel mit Fischereiprodukten jedoch stark globalisiert ist, lässt sich aus dem Standort einer Infektion nicht sicher ableiten, ob diese auch durch den Verzehr lokal gefangener Fischereiprodukte erworben wurde (Broglia & Kapel, 2011). Daschner et al. (2021) hoben in einem Kommentar zur Publikation von Rahmati et al. (2020) hervor, dass Fischkonsum kein prinzipielles Risiko für das Auftreten (allergischer) Anisakidosis darstelle und regionale Vorkommen der Parasiten in geeigneten Wirtsarten sich, begründet durch globalen Handel mit Fischereiprodukten, nicht mit dem lokalen Auftreten von Infektionen deckten. Ausschlaggebend für die Infektion mit Anisakiden sei, ob der Fischwirt vor dem Verzehr unter Bedingungen, die zur Inaktivierung des Parasiten führen, eingefroren wurde. Auf den großen Schiffen der Fischereiindustrie wird der Fisch noch an Bord verarbeitet und tiefgefroren. Durch das Tiefrieren wird der Parasit nachweislich unschädlich (Sánchez-Alonso et al., 2018, 2020; Podolska et al., 2019; Łopieńska-Biernat et al., 2020). Somit ist die Möglichkeit einer Infektion mit Anisakiden insbesondere gegeben, wenn Fisch im kleinen Umfang oder für den Eigenbedarf gefischt und lokal fangfrisch verkauft oder verzehrt wird. Betrachtet man die seit 2018 geführte EU-Datenbank für Lebensmittelrisiken (EU-RASFF) fällt auf, dass Fischereiprodukte häufiger aufgrund eines Befalls mit *Anisakis* (42 Meldungen) beanstandet werden als aufgrund eines Befalls mit *Pseudoterranova* (1 Meldung; RASFF, 2022, Stand April 2022). Eine denkbare Begründung dafür ist, dass *Pseudoterranova* spp. im Vergleich zu *Anisakis* spp. größer und, aufgrund ihrer Färbung, auffälliger sind. Präventionsmaßnahmen, wie z.B. die Sichtkontrolle von Fisch auf dem Leuchttisch vor und während der Verarbeitung, könnten für die Gattung *Pseudoterranova* effektiver sein als für die weniger auffällige Gattung *Anisakis*.

Die klinischen Bilder, die sich bei einer Infektion mit Parasiten aus dem *Pseudoterranova decipiens* Komplex zeigen können, waren Gegenstand der Kapitel 2.3.1 und 2.3.2. Eine potentielle Ursache für die Pathogenität von Anisakidae ist ihr Gewebeinvasionsverhalten und dessen mögliche Auslöser im Fehlwirt (diskutiert in III). Eine Erklärung für etwaige Unterschiede im Gewebeinvasionsverhalten der verschiedenen Arten könnte die Anpassung an unterschiedliche Magenmilieus oder Körpertemperaturen der spezifischen Endwirte sein. Es wäre denkbar, dass der pH-Wert, die Temperatur oder andere chemisch-physikalische Eigenschaften des menschlichen Verdauungstrakts unterschiedlich starke Signalwirkung auf die verschiedenen Arten haben und so ein unterschiedliches pathogenes Potential von ihnen ausgeht. An dieser Stelle könnten experimentelle Studien (z.B. verschiedene pH- und Temperaturgradienten) kombiniert

mit transkriptomischen Analysen den Kenntnisstand erweitern und auf die aus Studie III hervorgegangenen Referenztranskriptomdaten von *P. bulbosa* zurückgreifen.

Aufgrund der Vielzahl möglicher Symptome und Verläufe ist ungeklärt, ob die Erkrankung Anisakidosis an sich selten ist oder ob sie nur selten erkannt wird (Shamsi & Sheorey, 2018). Ein zentrales Problem scheint die Nachweismethode des Parasiten mit Bestimmung auf Familien- oder Gattungsebene zu sein. Anhand jener Berichte, in denen der Parasit mittels molekulargenetischer Methoden näher bestimmt wurde, ist bekannt, dass *P. decipiens* s.s., *P. azarasi* und *P. cattani* zoonotische Arten sind (Pinel et al., 1996; Mercado, Torres & Maira, 1997; Mercado et al., 2001; Torres et al., 2007; Arizono et al., 2011; Ramanan et al., 2013; Arcos et al., 2014; Timi et al., 2014; Weitzel et al., 2015; Cavallero, Scribano & D'Amelio, 2016; Brunet et al., 2017; Mitsuboshi et al., 2017; Llorens et al., 2018; Murata et al., 2018; Nordholm et al., 2020; Menghi et al., 2020; Sánchez-Alonso et al., 2020; Suzuki et al., 2021). In der medizinischen Diagnostik von Gewebeeränderungen nehmen histologische Schnitte eine zentrale Rolle ein. Die Aufbereitung der Gewebe geht jedoch gegebenenfalls mit der Zerstörung der DNA einher, sodass eine molekulare Bestimmung des Pathogens im Falle eines Parasitenbefalls nicht mehr möglich ist. Da schon die alleinige Entfernung des Parasiten in der Regel die Erkrankung behandelt, ist für das individuelle Patientenwohl eine nähere Bestimmung über die Familie Anisakidae oder die Gattung *Anisakis* hinaus nicht relevant (Shamsi & Sheorey, 2018). Anhand dieser Diagnose kann die Verbindung zum Verzehr roher Fischereiprodukte hergestellt und die Maßnahmen zur Vermeidung einer erneuten Infektion aufgezeigt werden. Eine Alternative zur molekularen Bestimmung des Parasiten stellen serologische Tests dar, die einen Kontakt des Immunsystems mit spezifischen Antigenen zeigen können (Guarneri, Guarneri & Benvenga, 2007). Allerdings wurde für die Gattung *Anisakis* schon lange und bisher ohne eindeutiges Ergebnis nach passenden Antigenen gesucht, die eine Unterscheidung von Infektionen mit den Parasitenarten ermöglichen (Anadón et al., 2009; Acevedo et al., 2013; González-Fernández et al., 2017). Diese Arbeit stünde für die Gattung *Pseudoterranova* noch aus. Mögliche Ansatzpunkte liefern die Ergebnisse aus Studie III, mit denen weitergeforscht werden könnte.

Fazit 3) Aktuell ist das von *Pseudoterranova bulbosa* ausgehende pathogene Potential als ungeklärt zu bewerten. Erste Hinweise eines allergenen Potentials dieser Art liefern die im Kabeljau exprimierten Homologe zu bekannten Nematodenallergenen. Aufgrund der unspezifischen Symptome und in der Regel nicht lebensbedrohlichen Verläufe der

Infektion ist davon auszugehen, dass Infektionen mit *Pseudoterranova* spp. unerkannt bleiben und Erkenntnisse zur Pathogenität nicht nur aus klinischen Berichten gewonnen werden können. Eine wichtige Möglichkeit der Datengewinnung stellen deshalb genetische Studien im Bereich der Genexpression dar, wozu Referenztranskriptome einen wichtigen Beitrag leisten. Das Potential dieses Bereichs ist bei Weitem noch nicht ausgeschöpft.

5. Schlussfolgerung

Die Verbreitung humanpathogener Parasiten in marinen Ökosystemen lässt sich aus verschiedenen Blickwinkeln betrachten und mit unterschiedlichen Methoden untersuchen: mit lang etablierten Methoden, wie der Identifikation und Beschreibung von Parasiten und Parasitengemeinschaften anhand morphologischer Merkmale (I), die seit dem Ende des 20. Jahrhunderts durch Identifikation anhand molekularer Marker (I-III) ergänzt wurde, Metaanalyseverfahren, z.B. die Modellierung, die durch auf Internetplattformen geteilte Daten ermöglicht wurden (II), und bioinformatischen Analysen von NGS-Daten, wie der Transkriptomik, die durch frei zugängliche Software erleichtert wird (III).

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Studien können als unterschiedliche Fokusebenen auf die Verbreitung von *Pseudoterranova* spp. betrachtet werden: die Modellierung der geographischen Ebene, abgeleitet von der ökologischen Nische der Vertreter des *Pseudoterranova decipiens* Komplexes (II), die Ebene der Parasitengemeinschaften in ihren paratenischen Wirten (I) und die transkriptomische Ebene, eingegrenzt auf die individuelle Reaktion von Parasiten auf unterschiedliche Mikrohabitate innerhalb des Fischwirtes. Sie geben einen Einblick in die vielfältigen, methodischen Möglichkeiten, die mittlerweile zur Verfügung stehen, um die Ökologie mariner Parasiten mit humanpathogenem Potential zu erforschen. Die neu hinzugewonnenen Methoden und Fokusebenen ersetzen jedoch nicht die zoologischen Grundkenntnisse, die für die Formulierung der Forschungsfragen, die Probennahme und Probenbestimmung und die Interpretation der Ergebnisse notwendig sind.

Die Diskussion der Studien I-III hat aufgezeigt, dass in jedem der Teilprojekte ein Mangel an Daten verhindert, das volle Potential der verwendeten Methoden zu nutzen. Studie I stieß an Grenzen, da ein bisher uneinheitliches Probedesign kein Langzeitmonitoring parasitischer Bioindikatoren ermöglicht. Studie II zeigt einen möglichen Weg, wie bei ökologischer Modellierung mit defizitären Verbreitungsdaten umgegangen werden kann, die ideale Datenlage bei marinen Organismen stellen jedoch aussagekräftige Vorkommensdaten dar, bei deren Erhebung auch unterschiedliche Tiefen berücksichtigt werden. Studie III konnte das Potential der Genexpressionsanalyse von Parasiten aufzeigen, die Interpretation der Ergebnisse war jedoch durch einen Mangel an Referenzdaten für die Annotation begrenzt. Die gezeigten Datenlücken zeigen, dass das Teilen wissenschaftlicher (Primär-)Daten vorangetrieben werden sollte. Die

Verantwortung dafür liegt sowohl bei wissenschaftlichen Fachzeitschriften, Datentransparenz und freie Datenverfügbarkeit einzufordern, aber auch bei den Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern selbst, zu bestehenden Datenbanken aktiv beizutragen.

Das Vernetzen und Bündeln von Kompetenzen aus Taxonomie, Ökologie, Bioinformatik und Humanmedizin und die freie Verfügbarkeit von Daten der verschiedenen Fachdisziplinen durch Beiträge zu Datenbanken sind Grundvoraussetzungen für die zukünftige Erforschung der Verbreitung und des pathogenen Potentials des *P. decipiens* Komplexes und anderer mariner, potentiell zoonotischer Parasiten. Aufgrund der zunehmenden Komplexität der Methoden ist ein ganzheitlicher Forschungsansatz, der das methodische Potenzial voll ausschöpft und sich gleichzeitig der Grenzen der eingesetzten Methoden bewusst ist, nur noch in interdisziplinärer Zusammenarbeit möglich.

6. Zusammenfassung

Die wachsende Weltbevölkerung und der damit einhergehende Platz- und Ressourcenbedarf des Menschen hat zum Verlust zahlreicher natürlicher Habitats und zur Störung von Ökosystemen geführt. Dadurch kommt es zu Kontakt zwischen Menschen und Tieren und es besteht das Risiko einer Übertragung von Zoonosen, also von Erkrankungen, mit denen sich Menschen und Tiere gleichermaßen infizieren können. Für Menschen ist der häufigste Weg einer Infektion mit marinen Zoonoseerregern die Nahrungsaufnahme.

Unter den marinen, metazoischen Fischparasiten gehört die Nematodenfamilie der Anisakidae zu den wichtigsten Auslösern von Erkrankungen beim Menschen. Die Anisakidosis tritt nach Verzehr roher oder unzureichend gegarter Fischereiprodukte auf, die von Nematodenlarven der Gattungen *Anisakis*, *Contracaecum* oder *Pseudoterranova* befallen sind. Die Erkrankung äußert sich durch gastro-intestinale Symptome und kann in schweren Fällen einen chirurgischen Eingriff zur Entfernung des Wurms nach sich ziehen. Als Folge einer Infektion mit Anisakidae können außerdem Allergien entstehen. Eine Gemeinsamkeit der Anisakidae ist, dass sie komplexe, mehrwirtige Lebenszyklen mit mehreren Larvenstadien aufweisen. Menschen infizieren sich mit dem dritten Larvenstadium, das in Crustacea, Cephalopoda und Teleostei auftritt und, aufgrund des konservierten Bauplans, über die Gattungsebene hinaus nur anhand molekulargenetischer Marker identifiziert werden kann. Die namensgebende Gattung *Anisakis* gilt als Hauptauslöser der Anisakidosis und ist unter den humanpathogenen Gattungen der Anisakidae am besten untersucht. Da eine genauere Bestimmung der Nematoden im klinischen Kontext nur selten erfolgt, werden chirurgisch entfernte oder von Patienten ausgeschiedene Nematoden *Anisakis* zugeordnet. Daraus ergibt sich ein Datenmangel hinsichtlich anderer Auslöser der Anisakidosis, etwa des *Pseudoterranova decipiens* Komplexes. Nematoden dieser Gattung nutzen Robben (Pinnipedia) als Endwirte und finden sich in kalten bis gemäßigten Gewässern der Nord- und Südhalbkugel. Fische dienen als paratenische Zwischenwirte und begünstigen die Übertragung der Parasiten auf den Endwirt. Da *Pseudoterranova* spp. insbesondere auch in kommerziell genutzten Kabeljauartigen (Gadidae) auftreten, ist eine Übertragung auf Menschen möglich und wurde bisher für die Arten *P. azarasi*, *P. cattani* und *P. decipiens* s.s. nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden unterschiedliche Aspekte der Verbreitung der Vertreter des *Pseudoterranova decipiens* Komplexes betrachtet und Fragestellungen zur Ökologie und Humanpathogenität der Parasiten bearbeitet. Sie basiert auf drei (ISI-) Fachartikeln, in denen die Nutzung von Fischparasitengemeinschaften als ökologische Indikatoren für entlegene Ökosysteme des Südpolarmeeres (I), die Modellierung geeigneter Verbreitungsgebiete für Arten mit geringen Vorkommensdaten am Beispiel des *P. decipiens* Komplexes (II) und das Vorkommen potentiell humanpathogener *P. bulbosa* in unterschiedlichen Mikrohabitaten in Atlantischem Kabeljau (III) thematisiert wurde.

Die Parasitengemeinschaften der in Studie I untersuchten, nahverwandten Antarktisdorsche (Nototheniinae) *Nototheniops larseni* (n=40), *N. nudifrons* (n=40) und *Lepidonotothen squamifrons* (n=49) unterschieden sich hauptsächlich hinsichtlich seltener Parasitenarten. *Pseudoterranova decipiens* E zählte zu den häufigsten Parasiten der drei betrachteten Wirtsarten. Für *Lepidapedon garrardi* (*L. squamifrons*) und *Echinorhynchus petrotschenkoi* (*N. larseni*) wurden neue Wirtsnachweise erbracht. Die Analyse der Wirtsspektren der auf Artebene bestimmten Parasiten zeigte eine geringe Spezifität antarktischer Fischparasiten im Larven- (z.B. *Pseudoterranova decipiens* E) und Adultstadium (z.B. *Elytrophalloides oatesi*). Für eine Nutzung als Bioindikatoren ergibt sich die Empfehlung, nicht auf einzelne Parasitenarten, sondern die Zusammensetzung von Parasitenfaunen zurückzugreifen und Parameter wie Abundanz oder Intensität zu berücksichtigen. Subtile Unterschiede in einem Langzeitmonitoring ließen sich mit statistischen, ordinationsbasierten Verfahren ermitteln. Vergleiche mit Literaturdaten legten nahe, dass ein Studiendesign, das den periodischen Vergleich der Parasitierungsmuster von Nototheniinae ermöglichen soll, Standorteffekte berücksichtigen sollte. Da es sich bei der Probennahme demersaler Fische um ein aufwändiges und einschneidendes Verfahren handelt, sollten alternative Methoden wie eDNA-Barcoding vorangetrieben und eine Datenbasis dafür geschaffen werden.

Um die Belastung von Speisefischen mit potentiell humanpathogenen Parasiten in bestimmten Fanggebieten abzuschätzen, kann anhand von Vorkommens- und Umweltdaten mittels statistischer Modelle die Habitateignung für den Parasiten bestimmt werden. Eine Voraussetzung für eine verlässliche Modellierung bilden die Wahl eines geeigneten Algorithmus und die Qualität der Eingangsdaten. Für die Modellierung geeigneter Verbreitungsgebiete für die sechs Arten des *P. decipiens* Komplexes wurde im Rahmen von Studie II erstmalig ein biotischer Deskriptor herangezogen. Dem Ansatz lag

die Annahme zugrunde, dass das Vorkommen geeigneter Endwirte der entscheidende, limitierende Faktor für die Verbreitung eines Parasiten ist, da nur so der Lebenszyklus geschlossen werden kann. Als Hypothesentest dienten Vergleiche der ökologischen Nischen von Parasiten und ihren spezifischen Endwirten im Nischenraum. Anhand der Endwirtsdistanz wurde eine Verbesserung der Modellierungsergebnisse mit MaxEnt, gegenüber der ausschließlich auf abiotischen Prädiktoren basierenden Modellierung, für alle *Pseudoterranova* Arten, insbesondere jene mit einer geringen Anzahl Fundpunkte, erzielt. Grundsätzlich ist der Ansatz auf marine Parasitenarten, deren spezifische Endwirte verlässliche Vorkommensdaten aufweisen, übertragbar. Die Methode stellt jedoch keinen Ersatz für die Erhebung von Vorkommensdaten dar, weshalb die genetische Bestimmung schwer zu identifizierender Taxa sowie die Angabe wichtiger Metadaten wie Datum, Fangkoordinaten und -tiefe in jeder parasitologischen Studie obligatorisch sein sollten. Liegt in Zukunft eine entsprechende Datenbasis vor, könnten in Modellierungen auch die Dreidimensionalität aquatischer Habitate berücksichtigt werden.

Die Verteilung potentiell humanpathogener Parasitenstadien in für den menschlichen Verzehr vorgesehenen Fische kann ein entscheidender Faktor für die Übertragung sein. Im Rahmen von Studie III wurde mit dem Referenztranskriptom von *P. bulbosa* das erste Transkriptom für eine Art des *P. decipiens* Komplexes erstellt. Anhand einer differentiellen Genexpressionsanalyse wurde untersucht, was die Verteilung der Parasiten auf unterschiedliche Mikrohabitate beeinflusst haben könnte. Dabei wurden siebenzig differentiell exprimierte Gene identifiziert, die in aus Leber (32 Gene) und Viscera (38 Gene) von Atlantischem Kabeljau (*Gadus morhua*) isolierten Proben von *P. bulbosa* hochreguliert waren. Eine Erklärung für diesen subtilen Unterschied könnte ein Dauerstadium der *P. bulbosa* Larven zum Zeitpunkt der Probennahmen sein. Ob sich bestimmte Mikrohabitate innerhalb des Wirtes begünstigend auf den Parasiten auswirken, beispielsweise durch die bessere Nährstoffversorgung oder Schutz vor der Wirtsimmunantwort, muss mit Hilfe experimenteller Studien gezeigt werden. Erste in Studie III erhobene Daten zum allergenen Potential von *P. bulbosa* sollten in serologischen Studien getestet werden. Um das pathogene Potential von *P. bulbosa*, sowie den weiteren Arten des *P. decipiens* Komplexes zu bewerten, sollten in experimentelle Studien NGS-Daten erhoben werden. Um einen besseren Nutzen für klinische Erkenntnisse erzielen zu können, bedarf es einer verbesserten parasitologischen Datenerhebung in der Medizin.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde in drei methodisch unterschiedlichen Studien ein Bedarf besserer Referenzdaten aufgezeigt. Bestreben diese Datenlücken zu schließen, um das Potential der Methoden besser ausschöpfen zu können, müssen zukünftig noch weiter verstärkt werden. Dazu gehören der Ausbau von Monitoringkapazitäten und eine gesteigerte Anzahl von Beiträgen zu Datenbanken.

7. Literaturverzeichnis

Abe N, Teramoto I. 2017. *Anisakis* haemoglobin is a main antigen inducing strong and prolonged immunoreactions in rats. *Parasitology Research* 116:2035–2039. DOI: 10.1007/s00436-017-5475-1.

Acevedo N, Mohr J, Zakzuk J, Samonig M, Briza P, Erler A, Pomés A, Huber CG, Ferreira F, Caraballo L. 2013. Proteomic and immunochemical characterization of glutathione transferase as a new allergen of the nematode *Ascaris lumbricoides*. *PLOS ONE* 8:e78353. DOI: 10.1371/journal.pone.0078353.

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers Y-HC, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Miklos, Abril JF, Agbayani A, An H-J, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, Pablos B de, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei M-H, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RDC, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang Z-Y, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh R-F, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195. DOI: 10.1126/science.287.5461.2185.

Aibinu IE, Smooker PM, Lopata AL. 2019. *Anisakis* nematodes in fish and shellfish – from infection to allergies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 9:384–393. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2019.04.007.

Alarcos AJ, Pereira AN, Taborda NL, Luque JL, Timi JT. 2016. Parasitological evidence of stocks of *Paralichthys isosceles* (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) at small and large geographical scales in South American Atlantic coasts. *Fisheries Research* 173:221–228. DOI: 10.1016/j.fishres.2015.07.018.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Anadón AM, Romarís F, Escalante M, Rodríguez E, Gárate T, Cuéllar C, Ubeira FM. 2009. The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clinical & Experimental Immunology* 156:471–478. DOI:

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03919.x>.

Arai T, Akao N, Seki T, Kumagai T, Ishikawa H, Ohta N, Hirata N, Nakaji S, Yamauchi K, Hirai M, Shiratori T, Kobayashi M, Fujii H, Ishii E, Naito M, Saitoh S, Yamaguchi T, Shibata N, Shimo M, Tokiwa T. 2014. Molecular genotyping of *Anisakis* larvae in Middle Eastern Japan and endoscopic evidence for preferential penetration of normal over atrophic mucosa. *PLOS ONE* 9:e89188. DOI: 10.1371/journal.pone.0089188.

Arcos SC, Ciordia S, Roberston L, Zapico I, Jiménez-Ruiz Y, Gonzalez-Muñoz M, Moneo I, Carballeda-Sangiao N, Rodriguez-Mahillo A, Albar JP, Navas A. 2014. Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex sensu stricto* and *A. pegreffii*. *PROTEOMICS* 14:1547–1568. DOI: 10.1002/pmic.201300529.

Arizono N, Miura T, Yamada M, Tegoshi T, Onishi K. 2011. Human infection with *Pseudoterranova azarasi* roundworm. *Emerging Infectious Diseases* 17:555–556. DOI: 10.3201/eid1703.101350.

Armentia A, Lombardero M, Callejo A, Martín Santos JM, Gil FJM, Vega J, Arranz ML, Martínez C. 1998. Occupational asthma by *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102:831–834. DOI: 10.1016/S0091-6749(98)70024-7.

Asnoussi A, Aibinu IE, Gasser RB, Lopata AL, Smooker PM. 2017. Molecular and immunological characterisation of tropomyosin from *Anisakis pegreffii*. *Parasitology Research* 116:3291–3301. DOI: 10.1007/s00436-017-5642-4.

Asturias JA, Eraso E, Moneo I, Martínez A. 2000. Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*? *Allergy (Copenhagen)* 55:898–899.

Baird FJ, Su X, Aibinu I, Nolan MJ, Sugiyama H, Otranto D, Lopata AL, Cantacessi C. 2016. The *Anisakis* transcriptome provides a resource for fundamental and applied studies on allergy-causing parasites. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10:e0004845. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004845.

Barrera-Oro E. 2002. The role of fish in the Antarctic marine food web: differences between inshore and offshore waters in the southern Scotia Arc and west Antarctic Peninsula. *Antarctic Science* 14:293–309. DOI: 10.1017/S0954102002000111.

Barrett LT, Oppedal F, Robinson N, Dempster T. 2020. Prevention not cure: a review of methods to avoid sea lice infestations in salmon aquaculture. *Reviews in Aquaculture* 12:2527–2543. DOI: 10.1111/raq.12456.

Barve N, Barve V, Jiménez-Valverde A, Lira-Noriega A, Maher SP, Peterson AT, Soberón J, Villalobos F. 2011. The crucial role of the accessible area in ecological niche modeling and species distribution modeling. *Ecological Modelling* 222:1810–1819. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2011.02.011.

Barz K, Zimmermann C. 2022. Fischbestände online. <https://www.fischbestaende-online.de> (aufgerufen am 20.04.2022).

Bilska-Zajac E, Lalle M, Różycki M, Chmurzyńska E, Kochanowski M, Karamon J, Sroka J, Pozio E, Cencek T. 2016. High prevalence of Anisakidae larvae in marketed frozen fillets of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Food Control* 68:216–219. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.03.049.

Bilyk KT, Evans CW, DeVries AL. 2012. Heat hardening in Antarctic notothenioid fishes. *Polar Biology* 35:1447–1451. DOI: 10.1007/s00300-012-1189-0.

Blasina G, Cazorla AL, Antoni MD, Bruno D, Delpiani M, de Astarloa JMD. 2017.

- Ontogenetic changes in the feeding strategy of *Lepidonotothen nudifrons* (Pisces, Nototheniidae) off the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Research* 36:1331558. DOI: 10.1080/17518369.2017.1331558.
- Blaxter M, Koutsovoulos G. 2015. The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology* 142:S26–S39. DOI: 10.1017/S0031182014000791.
- Blažeković K, Lepen Pleić I, Đuras M, Gomerčić T, Mladineo I. 2015. Three *Anisakis* spp. isolated from toothed whales stranded along the eastern Adriatic Sea coast. *International Journal for Parasitology* 45:17–31. DOI: 10.1016/j.ijpara.2014.07.012.
- Blowes SA, Supp SR, Antão LH, Bates A, Bruelheide H, Chase JM, Moyes F, Magurran A, McGill B, Myers-Smith IH, Winter M, Bjorkman AD, Bowler DE, Byrnes JEK, Gonzalez A, Hines J, Isbell F, Jones HP, Navarro LM, Thompson PL, Vellend M, Waldock C, Dornelas M. 2019. The geography of biodiversity change in marine and terrestrial assemblages. *Science* 366:339–345. DOI: 10.1126/science.aaw1620.
- Bouree P, Paugam A, Petithory J-C. 1995. Anisakidosis: Report of 25 cases and review of the literature. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 18:75–84. DOI: 10.1016/0147-9571(95)98848-C.
- Brandl SJ, Casey JM, Meyer CP. 2020. Dietary and habitat niche partitioning in congeneric cryptobenthic reef fish species. *Coral Reefs* 39:305–317. DOI: 10.1007/s00338-020-01892-z.
- Bratney J, Davidson WS. 1996. Genetic variation within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Ascaridoidea) from Canadian Atlantic marine fishes and seals: characterization by RFLP analysis of genomic DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53:333–341. DOI: 10.1139/f95-196.
- Bratney J, Stenson GB. 1993. Host specificity and abundance of parasitic nematodes (Ascaridoidea) from the stomachs of five phocid species from Newfoundland and Labrador. *Canadian Journal of Zoology* 71:2156–2166. DOI: 10.1139/z93-303.
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology* 34:525–527. DOI: 10.1038/nbt.3519.
- Bristow GA, Berland B. 1992. On the ecology and distribution of *Pseudoterranova decipiens* C (Nematoda: Anisakidae) in an intermediate host, *Hippoglossoides platessoides*, in northern Norwegian waters. *International Journal for Parasitology* 22:203–208. DOI: 10.1016/0020-7519(92)90102-Q.
- Broennimann O, Fitzpatrick MC, Pearman PB, Petitpierre B, Pellissier L, Yoccoz NG, Thuiller W, Fortin M-J, Randin C, Zimmermann NE, Graham CH, Guisan A. 2012. Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Global Ecology and Biogeography* 21:481–497. DOI: 10.1111/j.1466-8238.2011.00698.x.
- Broglia A, Kapel C. 2011. Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. *Veterinary Parasitology* 182:2–13. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.07.011.
- Bröker B, Schütt C, Fleischer B. 2019a. Wie wird eine Immunantwort koordiniert? In: Bröker B, Schütt C, Fleischer B (Herausgeber) *Grundwissen Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 115–141. DOI: 10.1007/978-3-662-58330-2_10.
- Bröker B, Schütt C, Fleischer B. 2019b. Was gehört zum Immunsystem? In: Bröker B, Schütt C, Fleischer B (Herausgeber) *Grundwissen Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 3–25. DOI: 10.1007/978-3-662-58330-2_1.

- Bröker B, Schütt C, Fleischer B. 2019c. Welche Konsequenzen hat die Aktivierung der Immunzellen? In: Bröker B, Schütt C, Fleischer B (Herausgeber) *Grundwissen Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 67–82. DOI: 10.1007/978-3-662-58330-2_5.
- Bröker B, Schütt C, Fleischer B. 2019d. Immunpathologische Prozesse in der Übersicht. In: Bröker B, Schütt C, Fleischer B (Herausgeber) *Grundwissen Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 199–208. DOI: 10.1007/978-3-662-58330-2_16.
- Bröker B, Schütt C, Fleischer B. 2019e. Wie können körpereigene Antikörper oder T-Zellen krank machen? In: Bröker B, Schütt C, Fleischer B (Herausgeber) *Grundwissen Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 209–219. DOI: 10.1007/978-3-662-58330-2_17.
- Brooks DR. 1979. Testing the context and extent of host-parasite coevolution. *Systematic Biology* 28:299–307. DOI: 10.1093/sysbio/28.3.299.
- Brooks DR. 1987. Analysis of host-parasite coevolution. *International Journal for Parasitology* 17:291–297. DOI: 10.1016/0020-7519(87)90052-X.
- Brunet J, Pesson B, Royant M, Lemoine J-P, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Yera H, Fréal E, Dupouy-Camet J, Merino-Espinosa G, Gómez-Mateos M, Martin-Sanchez J, Candolfi E. 2017. Molecular diagnosis of *Pseudoterranova decipiens* s.s. in human, France. *BMC Infectious Diseases* 17:397. DOI: 10.1186/s12879-017-2493-7.
- Buchmann K. 2012. Fish immune responses against endoparasitic nematodes – experimental models. *Journal of Fish Diseases* 35:623–635. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2012.01385.x.
- Buchmann K, Mehrdana F. 2016. Effects of anisakid nematodes *Anisakis simplex* (s.l.), *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) and *Contracaecum osculatum* (s.l.) on fish and consumer health. *Food and Waterborne Parasitology* 4:13–22. DOI: 10.1016/j.fawpar.2016.07.003.
- Bullini L, Arduino P, Cianchi R, Nascetti G, D’Amelio S, Mattiucci S, Paggi L, Orecchia P, Plotz J, Smith JH, Bratney J. 1997. Genetic and ecological research on anisakid endoparasites of fish and marine mammals in the Antarctic and Arctic-Boreal regions. In: Battaglia B, Valencia J, Walton DWH (Herausgeber) *Antarctic Communities: Species, Structure and Survival*. Cambridge: Cambridge University Press, 39–44.
- Busch MW, Kuhn T, Münster J, Klimpel S. 2012. Marine crustaceans as potential hosts and vectors for metazoan parasites. In: Mehlhorn H (Herausgeber). *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases*. Parasitology Research Monographs. Berlin, Heidelberg: Springer, 329–360. DOI: 10.1007/978-3-642-28842-5_14.
- Bušelić I, Trumbić Ž, Hrabar J, Vrbatović A, Bočina I, Mladineo I. 2018. Molecular and cellular response to experimental *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) third-stage larval infection in rats. *Frontiers in Immunology* 9. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02055.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology* 83:575. DOI: 10.2307/3284227.
- Byers JE. 2009. Including parasites in food webs. *Trends in Parasitology* 25:55–57. DOI: 10.1016/j.pt.2008.11.003.
- Calbet A, Alcaraz M, Atienza D, Broglio E, Vaqué D. 2005. Zooplankton biomass distribution patterns along the western Antarctic Peninsula (December 2002). *Journal of Plankton Research* 27:1195–1203. DOI: 10.1093/plankt/fbi081.

- Campbell RA, Haedrich RL, Munroe TA. 1980. Parasitism and ecological relationships among deep-sea benthic fishes. *Marine Biology* 57:301–313. DOI: 10.1007/BF00387573.
- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Navas A, Caballero T, Dominguez-Ortega J, Jurado-Palomo J, González-Muñoz M. 2016a. Anisakis-like protein is a pepsin- and heat-resistant major allergen of *Anisakis* spp. and a valuable tool for *Anisakis* allergy component-resolved diagnosis. *International Archives of Allergy and Immunology* 169:108–112. DOI: 10.1159/000444981.
- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Navas A, Moneo I, González-Muñoz M. 2016b. Changes over time in IgE sensitization to allergens of the fish parasite *Anisakis* spp. *PLOS Negl Trop Dis* 10:e0004864. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004864.
- Casaux R, Barrera-Oro E, Baroni A, Ramón A. 2003. Ecology of inshore notothenioid fish from the Danco Coast, Antarctic Peninsula. *Polar Biology* 26:157–165. DOI: 10.1007/s00300-002-0463-y.
- Cattan PE, Carvajal J. 1984. A study of the migration of larval *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridida) in the Chilean hake, *Merluccius gayi* (Guichenot). *Journal of Fish Biology* 24:649–654. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04835.x>.
- Cavallero S, Lombardo F, Salvemini M, Pizzarelli A, Cantacessi C, D'Amelio S. 2020. Comparative transcriptomics reveals clues for differences in pathogenicity between *Hysterothylacium aduncum*, *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii*. *Genes* 11:321. DOI: 10.3390/genes11030321.
- Cavallero S, Lombardo F, Su X, Salvemini M, Cantacessi C, D'Amelio S. 2018. Tissue-specific transcriptomes of *Anisakis simplex (sensu stricto)* and *Anisakis pegreffii* reveal potential molecular mechanisms involved in pathogenicity. *Parasites & Vectors* 11:31. DOI: 10.1186/s13071-017-2585-7.
- Cavallero S, Scribano D, D'Amelio S. 2016. First case report of invasive pseudoterranoviasis in Italy. *Parasitology International* 65:488–490. DOI: 10.1016/j.parint.2016.07.003.
- Cipriani P, Acerra V, Bellisario B, Sbaraglia GL, Cheleschi R, Nascetti G, Mattiucci S. 2016. Larval migration of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy, *Engraulis encrasicolus*: Implications to seafood safety. *Food Control* 59:148–157. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.04.043.
- Cipriani P, Sbaraglia GL, Palomba M, Giuliotti L, Bellisario B, Bušelić I, Mladineo I, Cheleschi R, Nascetti G, Mattiucci S. 2018a. *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy *Engraulis encrasicolus* from the Mediterranean Sea: Fishing ground as a predictor of parasite distribution. *Fisheries Research* 202:59–68. DOI: 10.1016/j.fishres.2017.03.020.
- Cipriani P, Sbaraglia GL, Paoletti M, Giuliotti L, Bellisario B, Palomba M, Bušelić I, Mladineo I, Nascetti G, Mattiucci S. 2018b. The Mediterranean European hake, *Merluccius merluccius*: Detecting drivers influencing the *Anisakis* spp. larvae distribution. *Fisheries Research* 202:79–89. DOI: 10.1016/j.fishres.2017.07.010.
- Clark JS, Dietze M, Chakraborty S, Agarwal PK, Ibanez I, LaDeau S, Wolosin M. 2007. Resolving the biodiversity paradox. *Ecology Letters* 10:647–659. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2007.01041.x.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szcześniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhang X, Mortazavi A. 2016. A survey of best

- practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology* 17:13. DOI: 10.1186/s13059-016-0881-8.
- Consortium International Helminth Genomes. 2017. Comparative genomics of the major parasitic worms. *bioRxiv*:236539. DOI: 10.1101/236539.
- Cunze S, Tackenberg O. 2015. Decomposition of the maximum entropy niche function – A step beyond modelling species distribution. *Environmental Modelling & Software* 72:250–260. DOI: 10.1016/j.envsoft.2015.05.004.
- Curcio N, Tombari A, Capitano F. 2014. Otolith morphology and feeding ecology of an Antarctic nototheniid, *Lepidonotothen larseni*. *Antarctic Science* 26:124–132. DOI: 10.1017/S0954102013000394.
- Daly KL, Macaulay MC. 1991. Influence of physical and biological mesoscale dynamics on the seasonal distribution and behavior of *Euphausia superba* in the antarctic marginal ice zone. *Marine Ecology Progress Series* 79:37–66.
- D’Amelio S, Lombardo F, Pizzarelli A, Bellini I, Cavallero S. 2020. Advances in Omic studies drive discoveries in the biology of Anisakid nematodes. *Genes* 11:801. DOI: 10.3390/genes11070801.
- Daschner A, Levsen A, Cipriani P, Cuéllar del Hoyo C. 2021. *Anisakis* allergy: Unjustified social alarm versus healthy diet. *Parasitology Research* 120:769–771. DOI: 10.1007/s00436-020-07029-z.
- Daschner A, Pascual C-Y. 2005. *Anisakis simplex*: sensitization and clinical allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 5:281–285.
- Deamer D, Akeson M, Branton D. 2016. Three decades of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology* 34:518–524. DOI: 10.1038/nbt.3423.
- Deardorff TL, Kent ML. 1989. Prevalence of larval *Anisakis simplex* in pen-reared and wild-caught salmon (Salmonidae) from Puget Sound, Washington. *Journal of Wildlife Diseases* 25:416–419. DOI: 10.7589/0090-3558-25.3.416.
- Desdevises Y. 2007. Cophylogeny: insights from fish-parasite systems. *Parassitologia* 49:125–128.
- Di Azevedo MIN, Carvalho VL, Iniguez AM. 2016. First record of the anisakid nematode *Anisakis nascettii* in the Gervais’ beaked whale *Mesoplodon europaeus* from Brazil. *Journal of Helminthology* 90:48–53. DOI: 10.1017/S0022149X14000765.
- Di Azevedo MIN, Carvalho VL, Iniguez AM. 2017. Integrative taxonomy of anisakid nematodes in stranded cetaceans from Brazilian waters: an update on parasite’s hosts and geographical records. *Parasitology Research* 116:3105–3116. DOI: 10.1007/s00436-017-5622-8.
- Di Cola V, Broennimann O, Petitpierre B, Breiner FT, D’Amen M, Randin C, Engler R, Pottier J, Pio D, Dubuis A, Pellissier L, Mateo RG, Hordijk W, Salamin N, Guisan A. 2017. ecospat: an R package to support spatial analyses and modeling of species niches and distributions. *Ecography* 40:774–787. DOI: 10.1111/ecog.02671.
- Dixon B, Kimmins W, Pohajdak B. 1993. Variation in colour of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Anisakidae) larvae correlates with haemoglobin concentration in the pseudocoelomic fluid. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50:767–771. DOI: 10.1139/f93-088.
- Duffy GA, Chown SL. 2017. Explicitly integrating a third dimension in marine species

- distribution modelling. *Marine Ecology Progress Series* 564:1–8. DOI: 10.3354/meps12011.
- Eastman JT. 2005. The nature of the diversity of Antarctic fishes. *Polar Biology* 28:93–107. DOI: 10.1007/s00300-004-0667-4.
- Eastman JT, Clarke A. 1998. A comparison of adaptive radiations of Antarctic fish with those of non-Antarctic fish. In: Di Prisco G, Pisano E, Clarke A (Herausgeber) *Fishes of Antarctica: A biological overview*. Milano: Springer Milan, 3–26. DOI: 10.1007/978-88-470-2157-0_1.
- Elith J, H. Graham C, P. Anderson R, Dudík M, Ferrier S, Guisan A, J. Hijmans R, Huettmann F, R. Leathwick J, Lehmann A, Li J, G. Lohmann L, A. Loiselle B, Manion G, Moritz C, Nakamura M, Nakazawa Y, McC. M. Overton J, Townsend Peterson A, J. Phillips S, Richardson K, Scachetti-Pereira R, E. Schapire R, Soberón J, Williams S, S. Wisz M, E. Zimmermann N. 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* 29:129–151. DOI: 10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x.
- Elith J, Kearney M, Phillips S. 2010. The art of modelling range-shifting species. *Methods in Ecology and Evolution* 1:330–342. DOI: 10.1111/j.2041-210X.2010.00036.x.
- Elith J, Phillips SJ, Hastie T, Dudík M, Chee YE, Yates CJ. 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions* 17:43–57. DOI: 10.1111/j.1472-4642.2010.00725.x.
- Elton CS. 1927. *Animal Ecology*. London: Sedgwick & Jackson Ltd.
- Fabricius O. (1780). *Fauna Groenlandica systematice sistens animalia Groenlandiae occidentalis hactenus indagata*. Ioannis Gottlob Rothe.
- Fæste CK, Jonscher KR, Dooper MMWB, Egge-Jacobsen W, Moen A, Daschner A, Egaas E, Christians U. 2014. Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. *EuPA Open Proteomics* 4:140–155. DOI: 10.1016/j.euprot.2014.06.006.
- FAO. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. Rome.
- Ferrantelli V, Costa A, Graci S, Buscemi MD, Giangrosso G, Porcarello C, Palumbo S, Cammilleri G. 2015. Anisakid nematodes as possible markers to trace fish products. *Italian Journal of Food Safety* 4:49–53. DOI: 10.4081/ijfs.2015.4090.
- Fišer C, Robinson CT, Malard F. 2018. Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Molecular Ecology* 27:613–635. DOI: 10.1111/mec.14486.
- Franklin J. 1995. Predictive vegetation mapping: geographic modelling of biospatial patterns in relation to environmental gradients. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment* 19:474–499. DOI: 10.1177/030913339501900403.
- Fuller CW, Middendorf LR, Benner SA, Church GM, Harris T, Huang X, Jovanovich SB, Nelson JR, Schloss JA, Schwartz DC, Vezenov DV. 2009. The challenges of sequencing by synthesis. *Nature Biotechnology* 27:1013–1023. DOI: 10.1038/nbt.1585.
- Garcia Alonso M, Caballero ML, Umpierrez A, Lluch-Bernal M, Knaute T, Rodríguez-Pérez R. 2015. Relationships between T cell and IgE/IgG4 epitopes of the *Anisakis simplex* major allergen Ani s 1. *Clinical & Experimental Allergy* 45:994–1005. DOI: 10.1111/cea.12474.
- George-Nascimento M, Llanos A. 1995. Micro-evolutionary implications of allozymic and morphometric variations in sealworms *Pseudoterranova* sp. (Ascaridoidea: Anisakidae) among sympatric hosts from the Southeastern Pacific Ocean. *International Journal for*

- Parasitology* 25:1163–1171. DOI: 10.1016/0020-7519(95)00038-4.
- George-Nascimento M, Urrutia X. 2000. *Pseudoterranova cattani* sp. nov. (Ascaridoidea: Anisakidae), un parásito del lobo marino común *Otaria byronia* De Blainville en Chile. *Revista chilena de historia natural* 73:93–98. DOI: 10.4067/S0716-078X2000000100010.
- Gibson DI. 1972. Flounder Parasites as Biological Tags. *Journal of Fish Biology* 4:1–9. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1972.tb05645.x.
- Gish W, States DJ. 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics* 3:266–272. DOI: 10.1038/ng0393-266.
- González-Fernández J, Daschner A, Nieuwenhuizen NE, Lopata AL, Frutos CD, Valls A, Cuéllar C. 2015. Haemoglobin, a new major allergen of *Anisakis simplex*. *International Journal for Parasitology* 45:399–407. DOI: 10.1016/j.ijpara.2015.01.002.
- González-Fernández J, Rivas L, Luque-Ortega JR, Núñez-Ramírez R, Campioli P, Gárate T, Perteguer MJ, Daschner A, Cuéllar C. 2017. Recombinant vs native *Anisakis* haemoglobin (Ani s 13): Its appraisal as a new gold standard for the diagnosis of allergy. *Experimental Parasitology* 181:119–129. DOI: 10.1016/j.exppara.2017.08.010.
- Grabda J, Ślósarczyk W. 1981. Parasites of marine fishes from New Zealand. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* XI:85–102.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, Chen Z, Mauceli E, Hacohen N, Gnirke A, Rhind N, di Palma F, Birren BW, Nusbaum C, Lindblad-Toh K, Friedman N, Regev A. 2011. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology* 29:644–652. DOI: 10.1038/nbt.1883.
- Grinnell J. 1917. The niche-relationships of the California thrasher. *The Auk* 34:427–433. DOI: 10.2307/4072271.
- Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S. 2007. Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of Ani s 2 and Ani s 3. *International Journal of Dermatology* 46:146–150. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2006.03091.x>.
- Guisan A, Petitpierre B, Broennimann O, Daehler C, Kueffer C. 2014. Unifying niche shift studies: insights from biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 29:260–269. DOI: 10.1016/j.tree.2014.02.009.
- Guisan A, Theurillat J-P. 2000. Equilibrium modeling of alpine plant distribution: how far can we go? *Phytocoenologia*:353–384. DOI: 10.1127/phyto/30/2000/353.
- Guisan A, Thuiller W. 2005. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters* 8:993–1009. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2005.00792.x.
- Guisan A, Thuiller W, Zimmermann NE. 2017. *Habitat Suitability And Distribution Models: With Applications in R*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Guisan A, Zimmermann NE. 2000. Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling* 135:147–186. DOI: 10.1016/S0304-3800(00)00354-9.
- Gutt J, Siegel V. 1994. Benthopelagic aggregations of krill (*Euphausia superba*) on the deeper shelf of the Weddell Sea (Antarctic). *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 41:169–178. DOI: 10.1016/0967-0637(94)90031-0.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles

- D, Li B, Lieber M, MacManes MD, Ott M, Orvis J, Pochet N, Strozzi F, Weeks N, Westerman R, William T, Dewey CN, Henschel R, LeDuc RD, Friedman N, Regev A. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* 8:1494–1512. DOI: 10.1038/nprot.2013.084.
- Haas BJ. 2018. TransDecoder (version 5.5.0). <https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/releases/tag/TransDecoder-v5.5.0> (heruntergeladen am 28.09.2020).
- Hand SC, Denlinger DL, Podrabsky JE, Roy R. 2016. Mechanisms of animal diapause: recent developments from nematodes, crustaceans, insects, and fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 310:R1193–R1211. DOI: 10.1152/ajpregu.00250.2015.
- Hauksson E. 2011. The prevalence, abundance, and density of *Pseudoterranova* sp. (p) larvae in the flesh of cod (*Gadus morhua*) relative to proximity of grey seal (*Halichoerus grypus*) colonies on the coast off Drangar, northwest Iceland. *Journal of Marine Biology*:1–8. DOI: 10.1155/2011/235832.
- Hemmingsen W, Lombardo I, Mackenzie K. 1991. Parasites as biological tags for cod, *Gadus morhua* L., in northern Norway: a pilot study. *Fisheries Research* 12:365–373. DOI: 10.1016/0165-7836(91)90019-C.
- Hernández-Orts JS, Aznar FJ, Blasco-Costa I, García NA, Villora-Montero M, Crespo EA, Raga JA, Montero FE. 2013a. Description, microhabitat selection and infection patterns of sealworm larvae (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda: Ascaridoidea) in fishes from Patagonia, Argentina. *Parasites & Vectors* 6:252. DOI: 10.1186/1756-3305-6-252.
- Hernández-Orts JS, Montero FE, García AJ-, García NA, Crespo EA, Raga JA, Aznar FJ. 2013b. Intestinal helminth fauna of the South American sea lion *Otaria flavescens* and fur seal *Arctocephalus australis* from northern Patagonia, Argentina. *Journal of Helminthology* 87:336–347. DOI: 10.1017/S0022149X12000454.
- Hewitt GC, Hine PM. 1972. Checklist of parasites of New Zealand fishes and of their hosts. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 6:69–114. DOI: 10.1080/00288330.1977.9515410.
- Hine M, Jones JB, Diggles BK. 2000. *A checklist of the parasites of New Zealand fishes including previously unpublished records*. Wellington, New Zealand: The National Institute of Water and Atmospheric Research.
- Hochberg NS, Hamer DH. 2010. Anisakidosis: Perils of the deep. *Clinical Infectious Diseases* 51:806–812. DOI: 10.1086/656238.
- Hudson PJ, Dobson AP, Lafferty KD. 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology & Evolution* 21:381–385. DOI: 10.1016/j.tree.2006.04.007.
- Hugot J-P, Baujard P, Morand S. 2001. Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology* 3:199–208. DOI: 10.1163/156854101750413270.
- Hutchinson GE. 1957. Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 22:415–417.
- Hyslop EJ. 1980. Stomach contents analysis - a review of methods and their application. *Journal of Fish Biology* 17:411–429. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1980.tb02775.x.

- International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921. DOI: 10.1038/35057062.
- Jacobus K, Marigo J, Gastal SB, Taniwaki SA, Ruoppolo V, Catao-Dias JL, Tseng F. 2016. Identification of respiratory and gastrointestinal parasites of three species of pinnipeds (*Arctocephalus australis*, *Arctocephalus gazella*, and *Otaria flavescens*) in Southern Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 47:132–140.
- Jeon C-H, Kim J-H. 2015. Pathogenic Potential of Two sibling species, *Anisakis simplex* (s.s.) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae): in vitro and in vivo Studies. *Biomed Research International*:983656. DOI: 10.1155/2015/983656.
- Jeżewski W, Zdzitowiecki K, Laskowski Z. 2014. Digenea in notothenioid fish in the Beagle Channel (Magellanic sub-region, sub-Antarctica). *Acta Parasitologica* 59:42–49. DOI: 10.2478/s11686-014-0208-4.
- Johansson E, Aponno M, Lundberg M, Hage-Hamsten MV. 2001. Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy* 56:660–666. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.2001.00798.x>.
- Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn AF, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong S-Y, Lopez R, Hunter S. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* 30:1236–1240. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu031.
- Kabata Z. 1963. Parasites as biological tags. *Parasites as biological tags*.
- Karpiej K, Dzido J, Rokicki J, Kijewska A. 2013. Anisakid nematodes of Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* from the Barents Sea. *Journal of Parasitology* 99:650–654. DOI: 10.1645/GE-2987.1.
- Karpiej K, Simard M, Pufall E, Rokicki J. 2014. Anisakids (Nematoda: Anisakidae) from ringed seal, *Pusa hispida*, and bearded seal, *Erignathus barbatus* (Mammalia: Pinnipedia) from Nunavut region. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 94:1237–1241. DOI: 10.1017/S0025315413001276.
- Kawaguchi K, Matsuda O, Ishikawa S, Naito Y. 1986. A light trap to collect krill and other micronektonic and planktonic animals under the Antarctic coastal fast ice. *Polar Biology* 6:37–42. DOI: 10.1007/BF00446238.
- Kellermann A. 1990. Food and feeding dynamics of the larval Antarctic fish *Nototheniops larseni*. *Marine Biology* 106:159–167. DOI: 10.1007/BF01314796.
- Kellermanns E, Klimpel S, Palm HW. 2007. Molecular identification of ascaridoid nematodes from the deep-sea onion-eye grenadier (*Macrourus berglax*) from the East Greenland Sea. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 54:2194–2202. DOI: 10.1016/j.dsr.2007.09.001.
- Kim J-H, Kim J-O, Jeon C-H, Nam U-H, Subramaniam S, Yoo S-I, Park J-H. 2018. Comparative transcriptome analyses of the third and fourth stage larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae). *Molecular and Biochemical Parasitology* 226:24–33. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2018.10.002.
- Kim D, Paggi JM, Park C, Bennett C, Salzberg SL. 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology* 37:907–915. DOI: 10.1038/s41587-019-0201-4.

- Klapper R, Bernreuther M, Wischnewski J, Klimpel S. 2017. Long-term stability of *Sphyrion lumpi* abundance in beaked redfish *Sebastes mentella* of the Irminger Sea and its use as biological marker. *Parasitology Research* 116:1561–1572. DOI: 10.1007/s00436-017-5433-y.
- Klapper R, Carballeda-Sangiao N, Kuhn T, Jensen HM, Buchmann K, Gonzalez-Muñoz M, Karl H. 2018. Anisakid infection levels in fresh and canned cod liver: Significant reduction through liver surface layer removal. *Food Control* 92:17–24. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.04.029.
- Klapper R, Kochmann J, O'Hara RB, Karl H, Kuhn T. 2016. Parasites as biological tags for stock discrimination of beaked redfish (*Sebastes mentella*): Parasite infra-communities vs. limited resolution of cytochrome markers. *PLOS ONE* 11:e0153964. DOI: 10.1371/journal.pone.0153964.
- Klapper R, Kuhn T, Münster J, Levsen A, Karl H, Klimpel S. 2015. Anisakid nematodes in beaked redfish (*Sebastes mentella*) from three fishing grounds in the North Atlantic, with special notes on distribution in the fish musculature. *Veterinary Parasitology* 207:72–80. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.11.017.
- Kleinertz S, Damriyasa IM, Hagen W, Theisen S, Palm HW. 2014. An environmental assessment of the parasite fauna of the reef-associated grouper *Epinephelus areolatus* from Indonesian waters. *Journal of Helminthology* 88:50–63. DOI: 10.1017/S0022149X12000715.
- Klimpel S, Busch MW, Kuhn T, Rohde A, Palm HW. 2010. The *Anisakis simplex* complex off the South Shetland Islands (Antarctica): endemic populations versus introduction through migratory hosts. *Marine Ecology Progress Series* 403:1–11. DOI: 10.3354/meps08501.
- Klimpel S, Kellermanns E, Palm HW. 2008. The role of pelagic swarm fish (Myctophidae: Teleostei) in the oceanic life cycle of *Anisakis* sibling species at the Mid-Atlantic Ridge, Central Atlantic. *Parasitology Research* 104:43–53. DOI: 10.1007/s00436-008-1157-3.
- Klimpel S, Kellermanns E, Palm HW, Moravec F. 2007. Zoogeography of fish parasites of the pearlside (*Maurollicus muelleri*), with genetic evidence of *Anisakis simplex* (s.s.) from the Mid-Atlantic Ridge. *Marine Biology* 152:725–732. DOI: 10.1007/s00227-007-0727-8.
- Klimpel S, Kuhn T, Münster J, Dörge DD, Klapper R, Kochmann J. 2019. *Parasites of Marine Fish and Cephalopods: A Practical Guide*. Springer International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-030-16220-7.
- Kochanowski M, Dąbrowska J, Różycki M, Karamon J, Sroka J, Cencek T. 2020. Proteomic profiling reveals new insights into the allergomes of *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens*, and *Contracaecum osculatum*. *Journal of Parasitology* 106:572–588. DOI: 10.1645/19-75.
- Kochanowski M, González-Muñoz M, Gómez-Morales MÁ, Gottstein B, Dąbrowska J, Różycki M, Cencek T, Müller N, Boubaker G. 2019. Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* and *Contracaecum osculatum* regarding their applicability for specific serodiagnosis of human anisakidosis based on IgG-ELISA. *Experimental Parasitology* 197:9–15. DOI: 10.1016/j.exppara.2018.12.004.
- Kock K-H. 1985. Krill consumption by Antarctic notothenioid fish. In: Siegfried WR, Condy PR, Laws RM (Herausgeber) *Antarctic Nutrient Cycles and Food Webs*. Berlin, Heidelberg: Springer, 437–444. DOI: 10.1007/978-3-642-82275-9_61.

- Kock K-H. 1992. *Antarctic fish and fisheries*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kock K-H, Stransky C. 2000. The composition of the coastal fish fauna around Elephant Island (South Shetland Islands, Antarctica). *Polar Biology* 23:825–832. DOI: 10.1007/s003000000159.
- Køie M, Berland B, Burt MDB. 1995. Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52:134–139. DOI: 10.1139/f95-519.
- Köndgen S, Kühl H, N’Goran PK, Walsh PD, Schenk S, Ernst N, Biek R, Formenty P, Mätz-Rensing K, Schweiger B, Junglen S, Ellerbrok H, Nitsche A, Briese T, Lipkin WI, Pauli G, Boesch C, Leendertz FH. 2008. Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Current Biology* 18:260–264. DOI: 10.1016/j.cub.2008.01.012.
- Krabbe H. 1878. On the Ascarides of the seals and toothed whales. *Annals and Magazine of Natural History* 2:430–432. DOI: 10.1080/00222937808682452.
- Kuhn T, Benninghoff T, Karl H, Landry T, Klimpel S. 2013. Sealworm *Pseudoterranova decipiens* s.s. infection of European smelt *Osmerus eperlanus* in German coastal waters: ecological implications. *Diseases of Aquatic Organisms* 102:217–224. DOI: 10.3354/dao02555.
- Kuhn T, Cunze S, Kochmann J, Klimpel S. 2016. Environmental variables and definitive host distribution: a habitat suitability modelling for endohelminth parasites in the marine realm. *Scientific Reports* 6:30246. DOI: 10.1038/srep30246.
- Kuhn T, García-Màrquez J, Klimpel S. 2011. Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: A zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. *PLoS ONE* 6:e28642. DOI: 10.1371/journal.pone.0028642.
- Kuhn T, Zizka VMA, Münster J, Klapper R, Mattiucci S, Kochmann J, Klimpel S. 2018. Lighten up the dark: metazoan parasites as indicators for the ecology of Antarctic crocodile icefish (Channichthyidae) from the north-west Antarctic Peninsula. *PeerJ* 6:e4638. DOI: 10.7717/peerj.4638.
- Lafferty KD. 2013. Parasites in marine food webs. *Bulletin of Marine Science* 89:123–134. DOI: 10.5343/bms.2011.1124.
- Lafferty KD, Allesina S, Arim M, Briggs CJ, Leo GD, Dobson AP, Dunne JA, Johnson PTJ, Kuris AM, Marcogliese DJ, Martinez ND, Memmott J, Marquet PA, McLaughlin JP, Mordecai EA, Pascual M, Poulin R, Thielges DW. 2008. Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology Letters* 11:533–546. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2008.01174.x.
- Laskowski Z, Jeżewski W, Zdzitowiecki K. 2010. New data on the occurrence of Acanthocephala in Antarctic Amphipoda. *Acta Parasitologica* 55:161–166. DOI: 10.2478/s11686-010-0022-6.
- Laskowski Z, Zdzitowiecki K. 2005. The helminth fauna of some notothenioid fishes collected from the shelf of Argentine Islands, West Antarctica. *Polish Polar Research* 26:315–324.
- Laskowski Z, Zdzitowiecki K. 2010. Contribution to the knowledge of the infection with Acanthocephala of a predatory Antarctic ice-fish *Chaenocephalus aceratus*. *Polish Polar Research* 31:303–308. DOI: 10.2478/v10183-010-0007-z.

- Laskowski Z, Zdzitowiecki K. 2017. Acanthocephalans in Sub-Antarctic and Antarctic. In: Klimpel S, Kuhn T, Mehlhorn H (Herausgeber) *Biodiversity and Evolution of Parasitic Life in the Southern Ocean*. Parasitology Research Monographs. Cham: Springer International Publishing, 141–182. DOI: 10.1007/978-3-319-46343-8_8.
- Levene MJ, Korlach J, Turner SW, Foquet M, Craighead HG, Webb WW. 2003. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science* 299:682–686. DOI: 10.1126/science.1079700.
- Lima dos Santos CAM, Howgate P. 2011. Fishborne zoonotic parasites and aquaculture: A review. *Aquaculture* 318:253–261. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.05.046.
- Linné C, Salvius L. 1758. *Caroli Linnaei... Systema naturae per regna tria naturae: secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Holmiae: Impensis Direct. Laurentii Salvii.
- Linse K, Brandt A, Hilbig B, Wegener G. 2002. Composition and distribution of suprabenthic fauna in the south-eastern Weddell Sea and off King George Island. *Antarctic Science* 14:3–10. DOI: 10.1017/S0954102002000512.
- Liu S-S, Liu G-H, Zhu X-Q, Weng Y-B. 2015. The complete mitochondrial genome of *Pseudoterranova azarasi* and comparative analysis with other anisakid nematodes. *Infection, Genetics and Evolution* 33:293–298. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.05.018.
- Livermore R, Nankivell A, Eagles G, Morris P. 2005. Paleogene opening of Drake Passage. *Earth and Planetary Science Letters* 236:459–470. DOI: 10.1016/j.epsl.2005.03.027.
- Llorens C, Arcos SC, Robertson L, Ramos R, Futami R, Soriano B, Ciordia S, Careche M, González-Muñoz M, Jiménez-Ruiz Y, Carballeda-Sangiao N, Moneo I, Albar JP, Blaxter M, Navas A. 2018. Functional insights into the infective larval stage of *Anisakis simplex s.s.*, *Anisakis pegreffii* and their hybrids based on gene expression patterns. *BMC Genomics* 19:592. DOI: 10.1186/s12864-018-4970-9.
- Łopieńska-Biernat E, Stryński R, Paukzto Ł, Jastrzębski JP, Makowczenko K. 2020. The selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis of *Anisakis simplex sensu stricto* gene expression from different developmental stages. *Acta Parasitologica* 65:837–842. DOI: 10.2478/s11686-020-00220-3.
- Lörz A-N, Brandt A. 2003. Diversity of Peracarida (Crustacea, Malacostraca) caught in a suprabenthic sampler. *Antarctic Science* 15:433–438. DOI: 10.1017/S0954102003001536.
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15:550. DOI: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Lucius R, Loos-Frank B. 2008. *Biologie von Parasiten*. Springer Berlin Heidelberg.
- Ludovisi A, Di Felice G, Carballeda-Sangiao N, Barletta B, Butteroni C, Corinti S, Marucci G, González-Muñoz M, Pozio E, Gómez-Morales MA. 2017. Allergenic activity of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Anisakidae) in BALB/c mice. *Parasites & Vectors* 10:290. DOI: 10.1186/s13071-017-2231-4.
- Mackenzie K. 2002. Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology* 124:153–163. DOI: 10.1017/S0031182002001518.
- Mackenzie K, Abaunza P. 1998. Parasites as biological tags for stock discrimination of marine fish: a guide to procedures and methods. *Fisheries Research* 38:45–56. DOI:

10.1016/S0165-7836(98)00116-7.

Mackenzie K, Hemmingsen W. 2015. Parasites as biological tags in marine fisheries research: European Atlantic waters. *Parasitology* 142:54–67. DOI: 10.1017/S0031182014000341.

Makepeace LB, Martin C, D. Turner J, Specht S. 2012. Granulocytes in helminth infection – who is calling the shots? *Current Medicinal Chemistry* 19:1567–1586. DOI: 10.2174/092986712799828337.

Manter HW. 1963. The zoogeographical affinities of trematodes of South American freshwater fishes. *Systematic Zoology* 12:45–70. DOI: 10.2307/2411621.

Marcogliese DJ. 1995. The role of zooplankton in the transmission of helminth parasites to fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 5:336–371. DOI: 10.1007/BF00043006.

Marcogliese DJ. 2002. Food webs and the transmission of parasites to marine fish. *Parasitology* 124:83–99. DOI: 10.1017/S003118200200149X.

Marcogliese DJ, Cone DK. 1997. Food webs: a plea for parasites. *Trends in Ecology & Evolution* 12:320–325. DOI: 10.1016/S0169-5347(97)01080-X.

Marcogliese DJ, Jacobson KC. 2015. Parasites as biological tags of marine, freshwater and anadromous fishes in North America from the tropics to the Arctic. *Parasitology* 142:68–89. DOI: 10.1017/S0031182014000110.

Mardis ER. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics* 24:133–141. DOI: 10.1016/j.tig.2007.12.007.

Margolis L. 1965. Parasites as an Auxiliary Source of Information About the Biology of Pacific Salmon (Genus *Oncorhynchus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 22:1387–1395. DOI: 10.1139/f65-122.

Marin VH, Brinton E, Huntley M. 1991. Depth relationships of *Euphausia superba* eggs, larvae and adults near the Antarctic Peninsula, 1986–87. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 38:1241–1249. DOI: 10.1016/0198-0149(91)90104-N.

Mattiucci S, Abaunza P, Damiano S, Garcia A, Santos M n., Nascetti G. 2007a. Distribution of *Anisakis* larvae, identified by genetic markers, and their use for stock characterization of demersal and pelagic fish from European waters: an update. *Journal of Helminthology* 81:117–127. DOI: 10.1017/S0022149X07754718.

Mattiucci S, Abaunza P, Ramadori L, Nascetti G. 2004. Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *Journal of Fish Biology* 65:495–510. DOI: 10.1111/j.0022-1112.2004.00465.x.

Mattiucci S, Cianchi R, Nascetti G, Paggi L, Sardella N, Timi J, Webb SC, Bastida R, Rodríguez D, Bullini L. 2003. Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. *Systematic Parasitology* 54:13–23. DOI: 10.1023/A:1022145926409.

Mattiucci S, Cipriani P, Paoletti M, Levsen A, Nascetti G. 2017a. Reviewing biodiversity and epidemiological aspects of anisakid nematodes from the North-East Atlantic Ocean. *Journal of Helminthology* 91:422–439. DOI: 10.1017/S0022149X1700027X.

Mattiucci S, Cipriani P, Paoletti M, Nardi V, Santoro M, Bellisario B, Nascetti G. 2015. Temporal stability of parasite distribution and genetic variability values of *Contracaecum osculatum* sp. D and *C. osculatum* sp. E (Nematoda: Anisakidae) from fish

- of the Ross Sea (Antarctica). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4:356–367. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2015.10.004.
- Mattiucci S, Cipriani P, Webb SC, Paoletti M, Marcer F, Bellisario B, Gibson DI, Nascetti G. 2014. Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *Journal of Parasitology* 100:199–214. DOI: 10.1645/12-120.1.
- Mattiucci S, Colantoni A, Crisafi B, Mori-Ubaldini F, Caponi L, Fazii P, Nascetti G, Bruschi F. 2017b. IgE sensitization to *Anisakis pegreffii* in Italy: Comparison of two methods for the diagnosis of allergic anisakiasis. *Parasite Immunology* 39:n/a-n/a. DOI: 10.1111/pim.12440.
- Mattiucci S, Nascetti G. 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. In: Rollinson D, Hay SI (Herausgeber) *Advances In Parasitology*. Academic Press, 47–148.
- Mattiucci S, Nascetti G, Dailey M, Webb SC, Barros NB, Cianchi R, Bullini L. 2005. Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology* 61:157–171. DOI: 10.1007/s11230-005-3158-2.
- Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Ishikura H, Kikuchi K, Sato N, Cianchi R, Bullini L. 1998. Allozyme and morphological identification of shape *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). *Systematic Parasitology* 40:81–92. DOI: 10.1023/A:1005914926720.
- Mattiucci S, Paoletti M, Damiano S, Nascetti G. 2007b. Molecular detection of sibling species in anisakid nematodes. *Parassitologia* 49:147–153.
- Mattiucci S, Paoletti M, Webb SC. 2009. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology* 74:199–217. DOI: 10.1007/s11230-009-9212-8.
- Mattiucci S, Paoletti M, Webb SC, Sardella N, Timi JT, Berland B, Nascetti G. 2008. Genetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocasaris* Höst, 1932 (Nematoda: Anisakidae) from pinnipeds inferred from mitochondrial cox2 sequences, and congruence with allozyme data. *Parasite* 15:408–419. DOI: 10.1051/parasite/2008153408.
- McClelland G. 1990. Larval sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infections in benthic macrofauna. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*:47–65.
- McClelland G. 2002. The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. *Parasitology* 124:183–203. DOI: 10.1017/S0031182002001658.
- McClelland G, Melendy J. 2011. Use of parasites as tags in delineating stocks of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the southern Gulf of St. Lawrence and the Cape Breton Shelf. *Fisheries Research* 107:233–238. DOI: 10.1016/j.fishres.2010.10.022.
- McConnell CJ, Marcogliese DJ, Stacey MW. 1997. Settling rate and dispersal of sealworm eggs (Nematoda) determined using a revised protocol for myxozoan spores. *The Journal of Parasitology* 83:203–206. DOI: 10.2307/3284439.

- McCormack SA, Melbourne-Thomas J, Trebilco R, Blanchard JL, Raymond B, Constable A. 2021. Decades of dietary data demonstrate regional food web structures in the Southern Ocean. *Ecology and Evolution* 11:227–241. DOI: 10.1002/ece3.7017.
- Mehlhorn H, Piekarski G. 2002. *Grundriß der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mehrdana F, Bahloul QZM, Skov J, Marana MH, Sindberg D, Mundeling M, Overgaard BC, Korbut R, Strøm SB, Kania PW, Buchmann K. 2014. Occurrence of zoonotic nematodes *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatum* and *Anisakis simplex* in cod (*Gadus morhua*) from the Baltic Sea. *Veterinary Parasitology* 205:581–587. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.08.027.
- Menghi CI, Gatta CL, Arias LE, Santoni G, Nicola F, Smayevsky J, Degese MF, Krivokapich SJ. 2020. Human infection with *Pseudoterranova cattani* by ingestion of “ceviche” in Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 52:118–120. DOI: 10.1016/j.ram.2019.06.005.
- Mercado R, Torres P, Maira J. 1997. Human case of gastric infection by a fourth larval stage of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae). *Revista De Saude Publica* 31:178–181. DOI: 10.1590/S0034-89101997000200012.
- Mercado R, Torres P, Muñoz V, Apt W. 2001. Human infection by *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) in Chile: report of seven cases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96:653–655. DOI: 10.1590/S0074-02762001000500010.
- Mitsuboshi A, Yamaguchi H, Ito Y, Mizuno T, Tokoro M, Kasai M. 2017. Extra-gastrointestinal anisakidosis caused by *Pseudoterranova azarasi* manifesting as strangulated inguinal hernia. *Parasitology International* 66:810–812. DOI: 10.1016/j.parint.2017.09.008.
- Moneo I, Caballero ML, Gómez F, Ortega E, Alonso MJ. 2000. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106:177–182. DOI: 10.1067/mai.2000.106732.
- Moreira E, Juarez M, Barrera-Oro E. 2014. Dietary overlap among early juvenile stages in an Antarctic notothenioid fish assemblage at Potter Cove, South Shetland Islands. *Polar Biology* 37:1507–1515. DOI: 10.1007/s00300-014-1545-3.
- Moser M, Cowen RK. 1991. The effects of periodic eutrophication on parasitism and stock identification of *Trematomus bernacchii* (Pisces: Nototheniidae) in McMurdo Sound, Antarctica. *The Journal of Parasitology* 77:551–556. DOI: 10.2307/3283158.
- Mozgovoy AA. 1953. Ascaridata of animals and man and diseases provoked by them. *Osnovy nematologii* 2:616.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51:263–273. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.032.
- Muñoz G, Rebolledo M. 2019. Comparison of the parasite community of two nototheniids, *Notothenia rossii* and *N. coriiceps* (Pisces: Nototheniidae), from King George Island, Antarctica. *Journal of Helminthology* 93:732–737. DOI: 10.1017/S0022149X18000858.
- Muñoz-Caro T, Machuca A, Morales P, Verdugo J, Reyes R, García M, Rutaihwa L, Schindler T, Poppert S, Taubert A, Hermosilla C. 2022. Prevalence and molecular identification of zoonotic *Anisakis* and *Pseudoterranova* species in fish destined to human consumption in Chile. *Parasitology Research*. DOI: 10.1007/s00436-022-07459-

x.

Münster J, Kochmann J, Grigat J, Klimpel S, Kuhn T. 2017. Parasite fauna of the Antarctic dragonfish *Parachaenichthys charcoti* (Perciformes: Bathydraconidae) and closely related Bathydraconidae from the Antarctic Peninsula, Southern Ocean. *Parasites & Vectors* 10:235. DOI: 10.1186/s13071-017-2176-7.

Münster J, Kochmann J, Klimpel S, Klapper R, Kuhn T. 2016. Parasite fauna of Antarctic *Macrourus whitsoni* (Gadiformes: Macrouridae) in comparison with closely related macrourids. *Parasites & Vectors* 9:403. DOI: 10.1186/s13071-016-1688-x.

Murata Y, Ando K, Usui M, Sugiyama H, Hayashi A, Tanemura A, Kato H, Kuriyama N, Kishiwada M, Mizuno S, Sakurai H, Isaji S. 2018. A case of hepatic anisakiasis caused by *Pseudoterranova decipiens* mimicking metastatic liver cancer. *BMC Infectious Diseases* 18:619. DOI: 10.1186/s12879-018-3540-8.

Myers BJ. 1959. *Phocanema*, a new genus for the anisakid nematode of seals. *Canadian Journal of Zoology* 37:459–465. DOI: 10.1139/z59-053.

Nadler SA, D'Amelio S, Dailey MD, Paggi L, Siu S, Sakanari JA. 2005. Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova* and *Contracaecum* from Northern Pacific marine mammals. *Journal of Parasitology* 91:1413–1429. DOI: 10.1645/GE-522R.1.

Nadolna K, Podolska M. 2014. Anisakid larvae in the liver of cod (*Gadus morhua*) L. from the southern Baltic Sea. *Journal of Helminthology* 88:237–246. DOI: 10.1017/S0022149X13000096.

Najda K, Simard M, Osewska J, Dziekonska-Rynko J, Dzido J, Rokicki J. 2015. Anisakidae in beluga whales *Delphinapterus leucas* from Hudson Bay and Hudson Strait. *Diseases of Aquatic Organisms* 115:9–14. DOI: 10.3354/dao02879.

Nam U-H, Kim J-O, Kim J-H. 2020. De novo transcriptome sequencing and analysis of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) third-stage and fourth stage larvae. *Journal of Nematology* 52. DOI: 10.21307/jofnem-2020-041.

Nascetti G, Cianchi R, Mattiucci S, D'Amelio S, Orecchia P, Paggi L, Bratney J, Berland B, Smith JW, Bullini L. 1993. Three sibling species within *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic-Boreal region: Reproductive isolation and host preferences. *International Journal for Parasitology* 23:105–120. DOI: 10.1016/0020-7519(93)90103-6.

Near TJ, Pesavento JJ, Cheng C-HC. 2004. Phylogenetic investigations of Antarctic nototheniid fishes (Perciformes: Notothenioidei) using complete gene sequences of the mitochondrial encoded 16S rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:881–891. DOI: 10.1016/j.ympev.2004.01.002.

Nieuwenhuizen NE, Meter JM, Horsnell WG, Hoving JC, Fick L, Sharp MF, Darby MG, Parihar SP, Brombacher F, Lopata AL. 2013. A cross-reactive monoclonal antibody to nematode haemoglobin enhances protective immune responses to *Nippostrongylus brasiliensis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7:e2395. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002395.

Nieuwenhuizen NE, Lopata AL, Jeebhay MF, Herbert DR, Robins TG, Brombacher F. 2006. Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117:1098–1105. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.12.1357.

- Nordholm A, Kurtzhals J a. L, Karami AM, Kania PW, Buchmann K. 2020. Nasal localization of a *Pseudoterranova decipiens* larva in a Danish patient with suspected allergic rhinitis. *Journal of Helminthology* 94. DOI: 10.1017/S0022149X20000681.
- Oğuz MC, Tepe Y, Belk MC, Heckmann RA, Aslan B, Gürgen M, Bray RA, Akgül Ü. 2015. Metazoan parasites of Antarctic fishes. *Turkiye parazitolojii dergisi*. DOI: 10.5152/tpd.2015.3661.
- Orsi AH, Whitworth T, Nowlin WD. 1995. On the meridional extent and fronts of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 42:641–673. DOI: 10.1016/0967-0637(95)00021-W.
- Page RDM. 1994. Parallel Phylogenies: Reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics* 10:155–173. DOI: 10.1111/j.1096-0031.1994.tb00170.x.
- Paggi L, Mattiucci S, Gibson DI, Berland B, Nascetti G, Cianchi R, Bullini L. 2000. *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda, Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. *Systematic Parasitology* 45:185–197. DOI: 10.1023/A:1006296316222.
- Paggi L, Mattiucci S, Ishikura H, Kikuchi K, Sato N, Nascetti G, Cianchi R, Bullini L. 1998. Molecular genetics in anisakid nematodes from the Pacific Boreal Region. In: Ishikura H, Aikawa M, Itakura H, Kikuchi K (Herausgeber) *Host Response to International Parasitic Zoonoses*. Springer Japan, 83–107.
- Paggi L, Nascetti G, Cianchi R, Orecchia P, Mattiucci S, D'Amelio S, Berland B, Bratney J, Smith JW, Bullini L. 1991. Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the North Atlantic and Norwegian and Barents Seas. *International Journal for Parasitology* 21:195–212. DOI: 10.1016/0020-7519(91)90010-5.
- Palm HW. 1999. Ecology of *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) (Nematoda: Anisakidae) from Antarctic waters. *Parasitology Research* 85:638–646. DOI: 10.1007/s004360050608.
- Palm HW. 2011. Fish parasites as biological indicators in a changing world: Can we monitor environmental impact and climate change? In: Mehlhorn H ed. *Progress in Parasitology*. Parasitology Research Monographs. Berlin, Heidelberg: Springer, 223–250. DOI: 10.1007/978-3-642-21396-0_12.
- Palm HW, Kleinertz S, Rückert S. 2011. Parasite diversity as an indicator of environmental change? An example from tropical grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) mariculture in Indonesia. *Parasitology* 138:1793–1803. DOI: 10.1017/S0031182011000011.
- Palm HW, Klimpel S. 2007. Evolution of parasitic life in the ocean. *Trends in Parasitology* 23:10–12. DOI: 10.1016/j.pt.2006.11.001.
- Palm HW, Rückert S. 2009. A new approach to visualize ecosystem health by using parasites. *Parasitology Research* 105:539–553. DOI: 10.1007/s00436-009-1423-z.
- Palomba M, Paoletti M, Colantoni A, Rughetti A, Nascetti G, Mattiucci S. 2019. Gene expression profiles of antigenic proteins of third stage larvae of the zoonotic nematode *Anisakis pegreffii* in response to temperature conditions. *Parasite* 26:52. DOI: 10.1051/parasite/2019055.
- Parker GA, Chubb JC, Ball MA, Roberts GN. 2003a. Evolution of complex life cycles in helminth parasites. *Nature* 425:480–484. DOI: 10.1038/nature02012.

- Parker GA, Chubb JC, Roberts GN, Michaud M, Milinski M. 2003b. Optimal growth strategies of larval helminths in their intermediate hosts. *Journal of Evolutionary Biology* 16:47–54. DOI: 10.1046/j.1420-9101.2003.00504.x.
- Pascual S, Abollo E, González AF. 2016. Biobanking and genetic markers for parasites in fish stock studies. *Fisheries Research* 173:214–220. DOI: 10.1016/j.fishres.2015.10.001.
- Pearson RG, Dawson TP. 2003. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography* 12:361–371. DOI: 10.1046/j.1466-822X.2003.00042.x.
- Pérez-Pérez J, Fernández-Caldas E, Marañón F, Sastre J, Bernal ML, Rodríguez J, Bedate CA. 2000. Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *International Archives of Allergy and Immunology* 123:120–129. DOI: 10.1159/000024442.
- Perler FB, Kumar S, Kong H. 1996. Thermostable DNA polymerases. *Advances in Protein Chemistry* 48:377–435. DOI: 10.1016/s0065-3233(08)60367-8.
- Perry AL, Low PJ, Ellis JR, Reynolds JD. 2005. Climate change and distribution shifts in marine fishes. *Science* 308:1912–1915. DOI: 10.1126/science.1111322.
- Petitpierre B, Kueffer C, Broennimann O, Randin C, Daehler C, Guisan A. 2012. Climatic niche shifts are rare among terrestrial plant invaders. *Science* 335:1344–1348. DOI: 10.1126/science.1215933.
- Phillips SJ, Anderson RP, Dudík M, Schapire RE, Blair ME. 2017. Opening the black box: an open-source release of Maxent. *Ecography* 40:887–893. DOI: 10.1111/ecog.03049.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190:231–259. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026.
- Pinel C, Beaudevin M, Chermette R, Grillot R, Ambroise-Thomas P. 1996. Gastric anisakidosis due to *Pseudoterranova decipiens* larva. *The Lancet* 347:1829. DOI: 10.1016/S0140-6736(96)91648-7.
- Poinar GO. 2011. *The Evolutionary History of Nematodes: As Revealed in Stone, Amber and Mummies*. Leiden: Brill.
- Poinar GO. 2016. Phylum Nemata. In: Thorp JH, Rogers DC (Herausgeber) *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates (Fourth Edition)*. Boston: Academic Press, 169–180. DOI: 10.1016/B978-0-12-385028-7.00009-3.
- Podolska M, Pawlikowski B, Nadolna-Ałtyn K, Pawlak J, Komar-Szymczak K, Szostakowska B. 2019. How effective is freezing at killing *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova krabbei*, and *P. decipiens* larvae? An experimental evaluation of time-temperature conditions. *Parasitology Research* 118:2139–2147. DOI: 10.1007/s00436-019-06339-1.
- Pomés A, Davies JM, Gadermaier G, Hilger C, Holzhauser T, Lidholm J, Lopata AL, Mueller GA, Nandy A, Radauer C, Chan SK, Jappe U, Kleine-Tebbe J, Thomas WR, Chapman MD, van Hage M, van Ree R, Vieths S, Raulf M, Goodman RE. 2018. WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Molecular Immunology* 100:3–13. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.03.003.
- Quesada MA, Rye HS, Gingrich JC, Glazer AN, Mathies RA. 1991. High-sensitivity DNA detection with a laser-excited confocal fluorescence gel scanner. *BioTechniques* 10:616–

625.

Quiazon KMA, Yoshinaga T, Ogawa K. 2011. Experimental challenge of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitology International* 60:126–131. DOI: 10.1016/j.parint.2010.11.007.

Rahmati AR, Kiani B, Afshari A, Moghaddas E, Williams M, Shamsi S. 2020. World-wide prevalence of *Anisakis* larvae in fish and its relationship to human allergic anisakiasis: a systematic review. *Parasitology Research* 119:3585–3594. DOI: 10.1007/s00436-020-06892-0.

Ramanan P, Blumberg AK, Mathison B, Pritt BS. 2013. Parametrial Anisakidosis. *Journal of Clinical Microbiology* 51:3430–3434. DOI: 10.1128/JCM.01398-13.

RASFF. 2022. Reports and publications. Available at https://ec.europa.eu/food/safety/rasff-food-and-feed-safety-alerts/reports-and-publications_en (aufgerufen am 14.03. 2022).

Ratnasingham S, Hebert PDN. 2007. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7:355–364. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.

Rengifo-Herrera C, Ferre I, Ortega-Mora LM, Rojo-Montejo S, García-Moreno FT, García-Párraga D, García-Peña FJ, Pereira-Bueno J, Pedraza-Díaz S. 2014. Helminth parasites found in faecal samples of phocids from the Antarctic Peninsula. *Polar Biology* 37:685–695. DOI: 10.1007/s00300-014-1469-y.

Richardson. 1975. The dietary composition of some Antarctic fish. *British Antarctic Survey Bulletin*, 41:113–120.

Rocka A. 2004. Nematodes of the Antarctic fishes. *Polish Polar Research* 25:135–152.

Rocka A. 2006. Helminths of Antarctic fishes: Life cycle biology, specificity and geographical distribution. *Acta Parasitologica* 51:26–35. DOI: 10.2478/s11686-006-0003-y.

Rogers AD, Tyler PA, Connelly DP, Copley JT, James R, Larter RD, Linse K, Mills RA, Garabato AN, Pancost RD, Pearce DA, Polunin NVC, German CR, Shank T, Boersch-Supan PH, Alker BJ, Aquilina A, Bennett SA, Clarke A, Dinley RJJ, Graham AGC, Green DRH, Hawkes JA, Hepburn L, Hilario A, Huvenne VAI, Marsh L, Ramirez-Llodra E, Reid WDK, Roterman CN, Sweeting CJ, Thatje S, Zwirgmaier K. 2012. The discovery of new deep-sea hydrothermal vent communities in the Southern Ocean and implications for biogeography. *PLOS Biology* 10:e1001234. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001234.

Rudner R, Studamire B, Jarvis ED. 1994. Determinations of restriction fragment length polymorphism in bacteria using ribosomal RNA genes. *Methods in Enzymology* 235:184–196. DOI: 10.1016/0076-6879(94)35140-6.

Rudolphi KA. 1808. *Entozoorum, sive vermium intestinalium: historia naturalis / auctore Carolo Asmundo Rudolphi*. Amstelaedami: Sumtibus Tabernae Librariae et Artium. DOI: 10.5962/bhl.title.14422.

Sakanari JA, McKerrow JH. 1989. Anisakiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 2:278–284. DOI: 10.1128/CMR.2.3.278.

San Vicente C, Munilla T, Corbera J, Sorbe J-C, Ramos A. 2009. Suprabenthic fauna from the Bellingshausen Sea and western Antarctic Peninsula: spatial distribution and community structure. *Scientia Marina* 73:357–368. DOI: 10.3989/scimar.2009.73n2357.

- Sánchez-Alonso I, Carballeda-Sangiao N, González-Muñoz M, Navas A, Arcos SC, Mendizábal A, Cuesta F, Careche M. 2020. Freezing kinetic parameters influence allergenic and infective potential of *Anisakis simplex* L3 present in fish muscle. *Food Control* 118:107373. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107373.
- Sánchez-Alonso I, Carballeda-Sangiao N, González-Muñoz M, Navas A, Arcos SC, Mendizábal A, Tejada M, Careche M. 2018. Pathogenic potential of *Anisakis* L3 after freezing in domestic freezers. *Food Control* 84:61–69. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.07.010.
- Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94:441–448. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
- Santos MJ, Saraiva A, Cruz C, Eiras JC, Hermida M, Ventura C, Soares JP. 2009. Use of parasites as biological tags in stock identification of the black scabbardfish, *Aphanopus carbo* Lowe, 1839 (Osteichthyes: Trichiuridae) from Portuguese waters. *Scientia Marina* 73:55–62. DOI: 10.3989/scimar.2009.73s2055.
- Saravanan K, Nilavan SE, Sudhagar SA, Naveenchandru V. 2013. Diseases of mariculture finfish species: a review. *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh* 65.
- Schoener TW. 1968. The anolis lizards of Bimini: Resource partitioning in a complex fauna. *Ecology* 49:704–726. DOI: 10.2307/1935534.
- Scully EJ, Basnet S, Wrangham RW, Muller MN, Otali E, Hyeroba D, Grindle KA, Pappas TE, Thompson ME, Machanda Z, Watters KE, Palmenberg AC, Gern JE, Goldberg TL. 2018. Lethal respiratory disease associated with human rhinovirus C in wild chimpanzees, Uganda, 2013. *Emerging Infectious Diseases* 24:267–274. DOI: 10.3201/eid2402.170778.
- Shamsi S, Sheorey H. 2018. Seafood-borne parasitic diseases in Australia: are they rare or underdiagnosed? *Internal Medicine Journal* 48:591–596. DOI: 10.1111/imj.13786.
- Shamsi S, Suthar J. 2016. Occurrence of *Terranova* larval types (Nematoda: Anisakidae) in Australian marine fish with comments on their specific identities. *PeerJ* 4:e1722. DOI: 10.7717/peerj.1722.
- Shih H-H. 2004. Parasitic helminth fauna of the cutlass fish, *Trichiurus lepturus* L., and the differentiation of four anisakid nematode third-stage larvae by nuclear ribosomal DNA sequences. *Parasitology Research* 93. DOI: 10.1007/s00436-004-1095-7.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM. 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31:3210–3212. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv351.
- Šimat V, Miletić J, Bogdanović T, Poljak V, Mladineo I. 2015. Role of biogenic amines in the post-mortem migration of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) larvae into fish fillets. *International Journal of Food Microbiology* 214:179–186. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.008.
- Skov J, Kania PW, Olsen MM, Lauridsen JH, Buchmann K. 2009. Nematode infections of maricultured and wild fishes in Danish waters: A comparative study. *Aquaculture* 298:24–28. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.09.024.
- Skrzypczak M, Rokicki J, Pawliczka I, Najda K, Dzido J. 2014. Anisakids of seals found on the southern coast of Baltic Sea. *Acta Parasitologica* 59:165–172. DOI: 10.2478/s11686-014-0226-2.

- Smith JW. 1984. *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878): length distribution and viability of L3 of known minimum age from herring *Clupea harengus* L. *Journal of Helminthology* 58:337–340. DOI: 10.1017/S0022149X00025232.
- Soberón J. 2007. Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. *Ecology Letters* 10:1115–1123. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2007.01107.x.
- Soberón J, Peterson AT. 2005. Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodiversity Informatics* 2:1–10. DOI: 10.17161/bi.v2i0.4.
- Solís DG, Vidal-Martínez VM, Antochiw-Alonso DM, Ortega-Argueta A. 2006. Anisakid nematodes from stranded pygmy sperm whales, *Kogia breviceps* (Kogiidae), in three localities of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Parasitology* 92:1120–1122. DOI: 10.1645/GE-3553RN.1.
- Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat E, Carniel E, Gage KL, Leirs H, Rahalison L. 2008. Plague: Past, present, and future. *PLOS Medicine* 5:e3. DOI: 10.1371/journal.pmed.0050003.
- Strobel A, Graeve M, Poertner HO, Mark FC. 2013. Mitochondrial acclimation capacities to ocean warming and acidification are limited in the Antarctic nototheniid fish, *Notothenia rossii* and *Lepidonotothen squamifrons*. *PLOS ONE* 8:e68865. DOI: 10.1371/journal.pone.0068865.
- Strømnes E. 2014. An in vitro study of lipid preference in whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) third-stage larvae. *Parasitology Research* 113:1113–1118. DOI: 10.1007/s00436-013-3748-x.
- Strømnes E, Andersen K. 1998. Distribution of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematoda, Ascaridoidea) L3 larvae in three species of marine fish; saithe (*Pollachius virens* (L.)), cod (*Gadus morhua* L.) and redfish (*Sebastes marinus* (L.)) from Norwegian waters. *Parasitology Research* 84:281–285. DOI: 10.1007/s004360050396.
- Strømnes E, Andersen K. 2003. Growth of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematodes, Ascaridoidea, Anisakidae) third-stage larvae in paratenic fish hosts. *Parasitology Research* 89:335–341. DOI: 10.1007/s00436-002-0756-7.
- Sukhdeo MVK, Sukhdeo SC. 1994. Optimal habitat selection by helminths within the host environment. *Parasitology* 109:S41–S55. DOI: 10.1017/S0031182000085073.
- Suzuki S, Bandoh N, Goto T, Uemura A, Sasaki M, Harabuchi Y. 2021. Severe laryngeal edema caused by *Pseudoterranova* species. *Medicine* 100. DOI: 10.1097/MD.0000000000024456.
- Takahashi M, Iwami T. 1997. The summer diet of demersal fish at the South Shetland Islands. *Antarctic Science* 9:407–413. DOI: 10.1017/S0954102097000527.
- Targett TE. 1981. Trophic ecology and structure of coastal Antarctic fish communities. *Marine Ecology Progress Series* 4:243–263.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282:2012–2018. DOI: 10.1126/science.282.5396.2012.
- Tiedtke JE, Kock K-H. 1989. Structure and composition of the demersal fish fauna around Elephant Island. *Archiv für Fischereiwissenschaft* 39:143–169.
- Timi JT, Mackenzie K. 2015. Parasites in fisheries and mariculture. *Parasitology* 142:1–4.

DOI: 10.1017/S0031182014001188.

Timi JT, Paoletti M, Cimmaruta R, Lanfranchi AL, Alarcos AJ, Garbin L, George-Nascimento M, Rodríguez DH, Giardino GV, Mattiucci S. 2014. Molecular identification, morphological characterization and new insights into the ecology of larval *Pseudoterranova cattani* in fishes from the Argentine coast with its differentiation from the Antarctic species, *P. decipiens* sp. E (Nematoda: Anisakidae). *Veterinary Parasitology* 199:59–72. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.09.033.

Torres P, Jercic MI, Weitz JC, Dobrew EK, Mercado RA. 2007. Human Pseudoterranovosis, an emerging infection in Chile. *Journal of Parasitology* 93:440–443. DOI: 10.1645/GE-946R.1.

Valdemarsen JW, Jørgensen T, Engås A. 2007. *Options to mitigate bottom habitat impact of dragged gears*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Warren DL, Glor RE, Turelli M. 2008. Environmental niche equivalency versus conservatism: Quantitative approaches to niche evolution. *Evolution* 62:2868–2883. DOI: 10.1111/j.1558-5646.2008.00482.x.

Weitzel T, Sugiyama H, Yamasaki H, Ramirez C, Rosas R, Mercado R. 2015. Human infections with *Pseudoterranova cattani* nematodes, Chile. *Emerging Infectious Diseases* 21:1874–1875. DOI: 10.3201/eid2110.141848.

Westphal A, Chitambar JJ, Subbotin SA. 2018. Nematodes of Agricultural Importance in Indiana, Illinois, Iowa, Missouri and Ohio. In: Subbotin SA, Chitambar JJ (Herausgeber) *Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America: Vol.2 - Northeastern, Midwestern and Southern USA*. Cham: Springer International Publishing, 87–107. DOI: 10.1007/978-3-319-99588-5_4.

WHO 2022. Plague. <https://www.who.int/health-topics/plague> (aufgerufen am 02.04.2022).

Wiley EO, McNyset KM, Townsend Peterson A, Richard Robins C, Stewart AM. 2003. Niche modeling and geographic range predictions in the marine environment using a machine-learning algorithm. *Oceanography* 16:120–127.

Wood CL, Lafferty KD, Micheli F. 2010. Fishing out marine parasites? Impacts of fishing on rates of parasitism in the ocean. *Ecology Letters* 13:761–775. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2010.01467.x.

Wood DE, Lu J, Langmead B. 2019. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology* 20:257. DOI: 10.1186/s13059-019-1891-0.

Yamagami T, Ishino S, Kawarabayasi Y, Ishino Y. 2014. Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Frontiers in Microbiology* 5:461. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00461.

Young PC. 1972. The relationship between the presence of larval anisakine nematodes in cod and marine mammals in British home waters. *Journal of Applied Ecology* 9:459–485. DOI: 10.2307/2402446.

Zdzitowiecki K. 1983. Antarctic acanthocephalans of the genus *Metacanthocephalus*. *Acta Parasitologica Polonica* 28:38–52.

Zdzitowiecki K. 1984. Redescription of *Corynosoma hamanni* (Linstow, 1892) and description of *C. pseudohammi* sp. n. (Acanthocephala) from the environs of the South Shetlands (Antarctic). *Acta Parasitologica Polonica* 29:379–393.

- Zdzitowiecki K. 1986. Prevalence of acanthocephalans in fishes of South Shetland Islands (Antarctic) III *Metacanthocephalus johnstoni* Zdzitowiecki, 1983, *M. dalmori* Zdzitowiecki, 1983 and notes on other species; general conclusions. *Acta Parasitologica Polonica* 31:125–141.
- Zdzitowiecki K. 1990. Occurrence of acanthocephalans in fishes of the open sea off the South Shetlands and South Georgia (Antarctic). *Acta Parasitologica Polonica* 35:131–141.
- Zdzitowiecki K. 1991. *Antarctic Acanthocephala*. Königstein: Koeltz Scientific Books.
- Zdzitowiecki K. 1996. Acanthocephala in fish in the Weddell Sea (Antarctic). *Acta Parasitologica* 41:199–203.
- Zdzitowiecki K. 1997. *Antarctic digenea parasites of fishes*. Königstein: Koeltz Scientific Books.
- Zdzitowiecki K. 1998. Diversity of Digenea, parasites of fishes in various areas of the Antarctic. In: Di Prisco G, Pisano E, Clarke A (Herausgeber) *Fishes of Antarctica: A biological overview*. Milano: Springer Milan, 87–94. DOI: 10.1007/978-88-470-2157-0_7.
- Zdzitowiecki K, Laskowski Z. 2013. New data on the occurrence of Acanthocephala in some fish in Admiralty Bay (South Shetland Islands). *Acta Parasitologica* 58:547–550. DOI: 10.2478/s11686-013-0175-1.
- Zdzitowiecki K, Presler P. 2001. Occurrence of Acanthocephala in intermediate hosts, Amphipoda, in Admiralty Bay, South Shetland Islands, Antarctica. *Polish Polar Research* 22:205–212.
- Zdzitowiecki K, Rokosz B. 1986. Prevalence of acanthocephalans in fishes of South Shetland Islands (Antarctic). II. *Aspersentis austrinus* Van Cleave, 1929 and remarks on the validity of *Heteracanthocephalus hureaui* Dollfus, 1965. *Acta Parasitologica Polonica* 30:161–171.
- Zdzitowiecki K, White MG. 1992. Acanthocephalan infection of inshore fish in two fjords at South Georgia. *Antarctic Science* 4:197–203. DOI: 10.1017/S0954102092000300.
- Zdzitowiecki K, White MG. 1996. Acanthocephalan infection of inshore fishes at the South Orkney Islands. *Antarctic Science* 8:273–276. DOI: 10.1017/S0954102096000387.
- Zhu XQ, D'Amelio S, Palm HW, Paggi L, George-Nascimento M, Gasser RB. 2002. SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Parasitology* 124:615–623. DOI: 10.1017/S0031182002001579.
- Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB. 1998. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology* 28:1911–1921. DOI: 10.1016/S0020-7519(98)00150-7.
- Zuo S, Huwer B, Bahloul Q, Al-Jubury A, Christensen ND, Korbut R, Kania P, Buchmann K. 2016. Host size-dependent anisakid infection in Baltic cod *Gadus morhua* associated with differential food preferences. *Diseases of Aquatic Organisms* 120:69–75. DOI: 10.3354/dao03002.

8. Anhang

Erklärung der Autorenanteile und Publikation "Parasites of three closely related Antarctic fish species (Teleostei: Nototheniinae) from Elephant Island" (I)

Alt KG, Cunze S, Kochmann J, Klimpel S (2021) Parasites of three closely related Antarctic fish species (Teleostei: Nototheniinae) from Elephant Island. *Acta Parasitologica*. DOI:10.1007/s11686-021-00455-8

Anlage 1

Erklärung zu den Autorenanteilen an der Publikation:

Parasites of three closely related Antarctic fish species (Teleostei: Nototheniinae) from Elephant Island

Status (*submitted, under review, in revision, accepted*): accepted

Ab *accepted* Name der Zeitschrift: Acta Parasitologica

Beteiligte Autoren (Namen mit eindeutigen Kürzeln):

Katharina G. Alt (Promovierender), Sarah Cunze (SC), Judith Kochmann (JK), Sven Klimpel (SK)

Was hat der Promovierende bzw. was haben die Koautoren beigetragen?

(1) zu Entwicklung und Planung

Promovierender: 35 %

Co-Autor SC: 35 %

Co-Autor JK: 15 %

Co-Autor SK: 15 %

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

Promovierender: 45 %

Co-Autor SC: 35 %

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

Promovierender: 55 %

Co-Autor SC: 35 %

Co-Autor SK: 10 %

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

Promovierender: 30 %

Co-Autor SC: 45 %

Co-Autor JK: 25 %

Co-Autor SK: 10 %

(5) zum Verfassen des Manuskripts

Promovierender: 50 %

Co-Autor SC: 20 %

Co-Autor JK: 20 %

Co-Autor SK: 10 %

Zustimmende Bestätigungen der oben genannten Angaben:

Datum/Ort

Unterschrift Promovend

Datum/Ort

Unterschrift Betreuer



Parasites of Three Closely Related Antarctic Fish Species (Teleostei: Nototheniinae) from Elephant Island

Katharina G. Alt¹ · Sarah Cunze¹ · Judith Kochmann² · Sven Klimpel^{1,2}

Received: 25 January 2021 / Accepted: 6 July 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Background Studies of parasite communities and patterns in the Antarctic are an important knowledge base with the potential to track shifts in ecological relations and study the effects of climate change on host–parasite systems. Endemic Nototheniinae is the dominant fish group found in Antarctic marine habitats. Through their intermediate position within the food web, Nototheniinae link lower to higher trophic levels and thereby also form an important component of parasite life cycles. The study was set out to gain insight into the parasite fauna of *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons* (Nototheniinae) from Elephant Island (Antarctica).

Methods Sampling was conducted at three locations around Elephant Island during the ANT-XXVIII/4 expedition of the research vessel Polarstern. The parasite fauna of three Nototheniine species was analysed, and findings were compared to previous parasitological and ecological research collated from a literature review.

Results All host species shared the parasites *Neolebouria antarctica* (Digenea), *Corynosoma bullosum* (Acanthocephala) and *Pseudoterranova decipiens* E (Nematoda). Other parasite taxa were exclusive to one host species in this study. *Nototheniops nudifrons* was infected by *Ascarophis nototheniae* (Nematoda), occasional infections of *N. larseni* with *Echinorhynchus petroschenkoi* (Acanthocephala) and *L. squamifrons* with *Elytrophalloides oatesi* (Digenea) and larval tetraphyllidean Cestoda were detected.

Conclusion All examined fish species' parasites were predominantly euryxenous regarding their fish hosts. The infection of *Lepidonotothen squamifrons* with *Lepidapedon garrardi* (Digenea) and *Nototheniops larseni* with *Echinorhynchus petroschenkoi* represent new host records. Despite the challenges and limited opportunities for fishing in remote areas, future studies should continue sampling on a more regular basis and include a larger number of fish species and sampling sites within different habitats.

Keywords Demersal fish · Marine food webs · Antarctic parasites · Southern Ocean

Introduction

The Antarctic Circumpolar Current (ACC) which forms the boundaries of the Southern Ocean is the biggest physio-thermal barrier found in the world oceans [1, 2]. With its strong eastward current and thermohaline frontal systems it serves as a natural boundary for most organisms inhabiting

the Southern Ocean which promoted a high degree of endemism and adaptation to the distinctive features of this cold environment [3].

The Antarctic Peninsula (AP) extends from the Antarctic continent towards the southern extension of South America (Cape Horn, Chile), and is connected by the Drake Passage and the Polar Front found between 56.8° S and 59.3° S [4]. The area around Elephant Island (South Shetland Islands) is characterised by its high net production as one of the nursery areas of the keystone species Antarctic krill (*Euphausia superba* DANA, 1850), the region's most important energy resource [5–9]. It belongs to the seasonal pack ice zone, which is defined by not being covered by an ice sheet perennially. As a result, the region has a different habitat structure compared to high Antarctic areas (from 70° South), such

✉ Katharina G. Alt
alt@bio.uni-frankfurt.de

¹ Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Goethe University, 60438 Frankfurt am Main, Germany

² Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, 60325 Frankfurt am Main, Germany

as a steep shelf slope, lack of littoral, vast depth range, and unique marine fauna [10]. Average temperatures at the western AP have increased during the last years of proceeding climate change and reached the maximum measured temperature of 18.4 °C, February 6th 2020, measured at Esperanza research base [11, 12] (World Meteorological Organization 2020). The resulting decrease in sea ice is expected to severely impact the local ecosystem [5]. Since krill depends on ice algae as their winter food, the decrease of ice could lead to a shift in the communities of pelagic feeders and all dependent organisms [5].

Inshore fish are an essential link for the energy flow between invertebrates and higher predators. They are mostly consumers of benthos and zooplankton and prey of predatory mammals and birds, which promotes energy transport from sea to land. In offshore regions, fish forage on nekton and zooplankton and are preyed on by larger fish, because they are out of reach for most seals and birds [13]. Despite krill being the most important factor for energy flow in offshore habitats of the Southern Ocean, demersal fish seem to be more important in inshore habitats than krill [13].

The Notothenioidea are the most dominant fish group found in the Southern Ocean and the paragon of the adaptive radiation of teleosts in the marine environment [14]. The Nototheniidae have evolved from strictly benthic ancestors characterised by the lack of a swim bladder. Important features shared by all Nototheniidae are slow ontogenesis and long generation time [2, 10, 15]. Throughout their radiation and diversification, some species have evolved to follow a benthopelagic lifestyle. The 16 nototheniid species occurring outside the Southern Ocean [16] are all adapted to a benthic habitat and possess a different parasite fauna than Antarctic Nototheniidae [16–20]. The subfamily Nototheniinae exclusively occurs in the Southern Ocean [17]. *Nototheniops larseni* (LÖNNBERG, 1905), *N. nudifrons* (LÖNNBERG, 1905) and *Lepidonotothen squamifrons* (GÜNTHER, 1880; syn. *L. kempfi*) are among the most abundant fish species of the West Antarctic Peninsula and Southern Scotia Arc [13, 21, 22]. They are distinguished by their depth ranges and habitats which results in *Nototheniops nudifrons* being more abundant inshore (e.g. fjords), *N. larseni* (also occurs inshore) and *L. squamifrons* (exclusively found at the outer shelf) being more common in offshore areas [13]. With their intermediate position within the food web, these species create an important link for energy flow from lower to higher trophic levels and play an important part in the life cycles of parasites.

The diversity and abundance of parasite infection in a host are, among other factors (i.e. host age/size), connected to the variability and trophic level of its diet. Infection rates of zooplankton and macroinvertebrates with helminth parasite stages are lower than the parasite prevalence in small fish [23–25]. By including higher trophic level organisms

into its diet, a host is more likely to acquire parasites from its food. But parasites can also be used as an indicator of diet components of their hosts in addition to stomach content analysis, which can only represent the diet at the time of sampling. If the parasites' life cycles are known, infection patterns can provide information about the higher trophic levels and potential predators of their hosts.

The fundamental research in the field of Antarctic parasitology (notably K. Zdizitowiecki and colleagues) has provided a knowledge base to track the shift of ecological relations in an ecosystem eminently affected by increasing temperatures. However, early studies have mostly focused on parasite species descriptions, identification keys, and life cycles of certain taxa [26–29], while studies on the parasite communities of the fishes examined [30, 31] are more scarce. In this study, we aim to contribute to the monitoring of marine communities from the seasonal pack ice zone off Elephant Island. Based on parasitological data, collected during an expedition of the RV Polarstern, and a literature review we intend to gain insight into the ecology of three fish species of the subfamily Nototheniinae, *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons*, more specifically their diet, potential predators and their position in the food web.

Materials and Methods

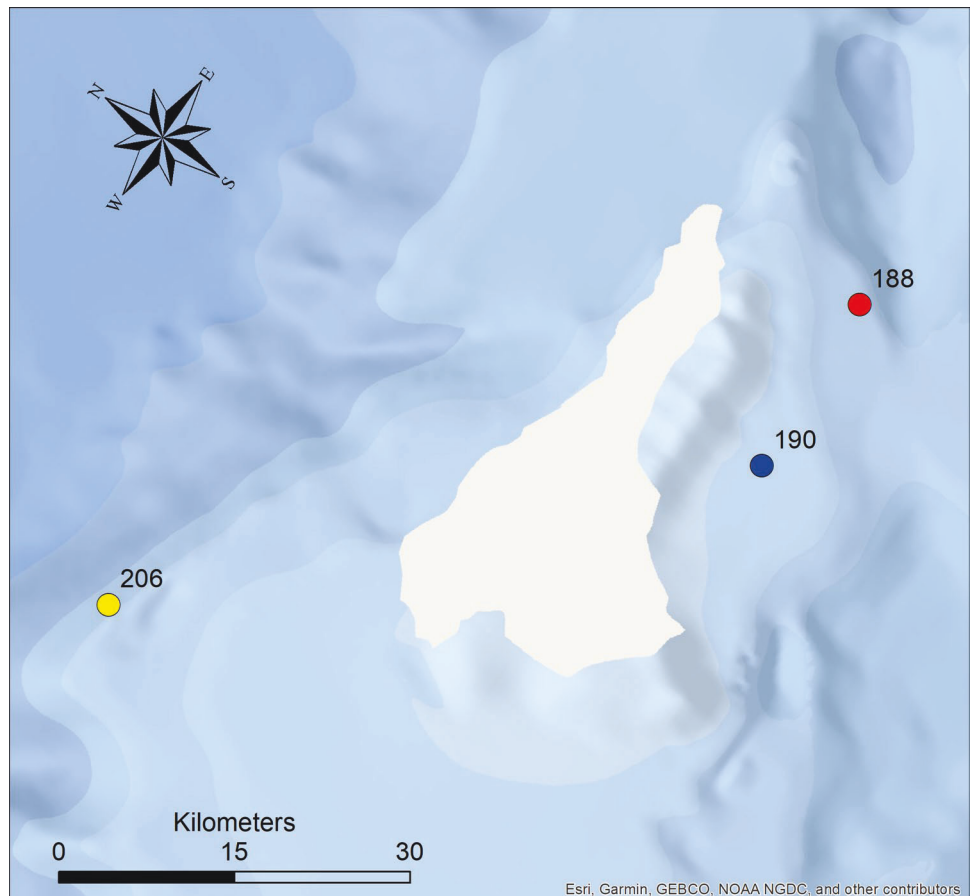
Sampling

Host sampling of Nototheniidae, *Nototheniops larseni* ($n = 40$), *N. nudifrons* ($n = 40$) and *Lepidonotothen squamifrons* ($n = 49$), was conducted at the ANT-XXVIII/4 expedition of the RV Polarstern to the Antarctic Peninsula (CCAMLR Subarea 48.1), from March 13th to April 9th, 2012. Specific sampling locations were situated around Elephant Island (Fig. 1, Table S1). Fishing was performed through bottom trawling. The catch was sorted, identified, measured, weighted and fish samples were stored at -20 °C until further examination.

Host and Parasite Taxonomy

Despite contradictory database entries about the taxonomic status of the fishes examined in this study (the online platforms FishBase [32] and World Register of Marine Species [33] assign the genus *Lindbergichthys*) this study follows Eschmeyer's Catalog of Fishes [34] referring to the taxonomy proposed by Near *et al.* [35], assigning the genus *Nototheniops* to both *N. larseni* and *N. nudifrons*. The taxonomy of *Lepidonotothen squamifrons* follows the findings of Miya *et al.* [36]. All references

Fig. 1 Sampling locations of bottom trawl fisheries around Elephant Island. Haul 188 = red, haul 190 = blue, haul 206 = yellow. (Projection: South Pole Lambert Azimuthal Equal Area, WKID: Authority: 102020 (Esri), Geographic Coordinate System: GCS_WGS_1984.) (colour figure online)



agree on the placement of *L. squamifrons*, *N. larseni* and *N. nudifrons* into the subfamily Nototheniinae.

Since the parasitological findings from this study need to be put into the context of previous research, a list of the recorded parasites of *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons*, was compiled. This was based on the checklist of Antarctic fish parasites by Oğuz *et al.* [37] complemented by the entries in the host–parasite database of the Natural History Museum London [38] and search on Google Scholar. The changes of host taxonomy were taken into account by including the known synonyms: *Notothenia larseni*, *Lepidonotothen larseni* for *Nototheniops larseni*; *Notothenia nudifrons*, *Lepidonotothen nudifrons*, *Lindbergichthys nudifrons*, *Notothenia mizops nudifrons* for *Nototheniops nudifrons* and *Notothenia squamifrons*, *Lepidonotothen kemp*, *Notothenia brevipectoralis*, *Notothenia kemp*, *Notothenia macrophthalmia* for *Lepidonotothen squamifrons*. Outdated systematics of parasite records were revised to recent taxonomic classification using the World Register of Marine Species [33]. Despite their careful assembly, the lists might not be fully exhaustive. The findings were visualised as bipartite networks using R version 4.0.3, following a script by Brandl *et al.* [39].

Host Morphometry and Diet

The fish samples were thawed at room temperature and morphometric measures were taken. The diet of the fishes was examined by analysing the stomach contents. Full and empty stomach weight was determined, and each food item was identified to the lowest possible taxonomic level. The different food organisms were counted and weighted. Trophic measures were calculated according to Hyslop [40].

Parasitological Examination

The host fishes were examined for metazoan ecto- and endoparasites, using a stereomicroscope (Olympus SZ61) with transmitting light (Olympus KL1600 LED, Olympus Corporation). The body surface and buccal and nasal cavities were examined for ectoparasites, and the visceral cavity, organs, and alimentary tract were examined for endoparasites. Parasites were washed in saline solution or purified water (Acanthocephala), determined taxonomically, and counted. Parasitological parameters were calculated as stated in Bush *et al.* [41].

Parasite species were identified either by their morphological (Digenea, Cestoda and Acanthocephala) or molecular

characteristics (Nematoda). For morphological identification, specimens were treated with 4% Roti-Histofix (Roth) and mounted on microscope slides in glycerine. The respective keys by Zdzitowiecki [42, 43] were used. Pictures were taken with an Olympus BX53 microscope and cellSens Standard software version 1.14 (Olympus Corporation). Specimens of the identified parasites were deposited in the scientific collection of the Senckenberg Research Institute and Natural History Museum, Frankfurt am Main, Germany, Catalogue Number SMF 15198 (*Elytrophalloides oatesi*), 15,199 (*Lepidapedon garrardi*), 15200 (*Neolebouria antarctica*), 17065 (*Corynosoma bullosum*) and 17066 (*Echinorhynchus petrotschenkoi*).

Nematodes were identified genetically because larval stages often lack distinct morphological features. Due to the high number of Nematoda infecting each host species, a subsample was taken to reduce sequencing costs. A random sub-sample was taken from the morphologically pre-sorted samples for molecular species determination. For this reason, the calculation of parasitological parameters according to Bush *et al.* [41] was omitted in the case of Nematoda.

Anisakidae were distinguished using internal transcribed spacers (ITS-1, 5.8 s, ITS-2) as described Zhu *et al.*, Shih and Klimpel *et al.* [44–47], using primers NC5 and NC2. For Cystidiocolidae specimens primers flanking the ribosomal small subunit (SSU) were designed using Geneious 8.17 software (f 93 5'-CCA ACG TGG ATA ACT GTG GT-3'; r 880 5'-CTC TCA CGC AGC GAT ACG AA-3'). The PCR was performed in 30 cycles with 60 s initiation at 95 °C, 30 cycles of 45 s denaturation at 94 °C, 45 s hybridisation at 52 °C, 45 s elongation at 72 °C and a 10 min final extension at 72 °C. Sanger sequencing was performed at SeqLab (Göttingen). A multiple alignment with sequences deposited in NCBI Genbank was performed using nBLAST [48]. Sequencing data are given in the supplemental information (Data S1).

Results

Host Diet

The digestion stage of the stomach contents of the three fish species varied. While there was mostly mucus detected in the stomachs of *Nototheniops larseni* and *L. nudifrons*, most food items of *L. squamifrons* were assigned to a taxonomic group (Table S2).

The sample of *N. larseni* ($n=40$) included 18 stomachs with defined contents. The prey predominantly consisted of Crustacea (IRI=18,041). Euphausiacea were identified as a food item and one specimen had preyed on fish.

The stomach contents of most samples of *N. nudifrons* ($n=40$) were undefined. The contents of 7 stomachs could

be assigned to a taxon, the rest contained undefined mucus. Based on these limited findings, Crustacea (IRI=6409) were the most important food item of *N. nudifrons*, followed by benthic Mollusca (IRI=3590).

Almost all food items of *L. squamifrons* ($n=49$) could be identified. The most important group was Crustacea (IRI=13,379, $F=97.62\%$), where Amphipoda and Euphausiacea were the most frequent (both taxa with $F=59.52\%$). Other rarer food items of *L. squamifrons* were Isopoda, Ostracoda, Mollusca (Gastropoda and Bivalvia), Polychaeta and Teleostei.

Parasite Fauna

The parasite fauna of the three *Nototheniinae* spp. included the taxa Digenea, Acanthocephala, Cestoda and Nematoda. The three host species shared several parasites with different prevalences and intensities (Table 1). The digenean *Neolebouria antarctica* (SZIDAT & GRAEFE, 1967; ZDZITOWIECKI, 1990), the acanthocephalan *Corynosoma bullosum* (LINSTOW, 1892; RAILLIET & HENRY 1907) and nematode *Pseudoterranova decipiens* E were detected in all host species. Photographs of the parasites are shown in Fig. 2.

Digenea were isolated from the alimentary tract of the host specimens. Three different species were identified in *Lepidonotothen squamifrons*, *Neolebouria antarctica*, *Lepidapedon garrardi* (LEIPER & ATKINSON, 1914; MANTER, 1926) and *Elytrophalloides oatesi* (LEIPER & ATKINSON, 1914; SZIDAT & GRAEFE, 1967). *Lepidonotothen squamifrons* had the highest prevalence and diversity of Digenea. The specimens of *Nototheniops nudifrons* were infected with at least two different digenean species, *Neolebouria antarctica* and *Lepidapedon garrardi*. The lowest number of digeneans were isolated from *Nototheniops larseni*. Here, *Neolebouria antarctica* was identified as well.

Nematoda was the taxon with the highest prevalence and intensities in all host species. Nematodes were identified in all samples of *Nototheniops nudifrons* and *L. squamifrons*. *Nototheniops larseni* was the host with the highest infection intensity, one specimen was infected with 52 nematodes. The subsample of nematodes used for molecular barcoding revealed an infection with *P. decipiens* E and *Contracaecum osculatum* s.l. in all three host species (Table 2). *Ascarophis nototheniae* (JOHNSTON & MAWSON, 1945) was exclusively detected in the stomach of *N. nudifrons*. *Contracaecum osculatum* D was identified in *L. squamifrons*.

Cestoda only occurred in one host species. Unidentified tetraphyllidean larvae were isolated from two host specimens of *L. squamifrons*.

Acanthocephala were the second most frequent parasite taxon in all hosts, preceded by the Nematoda. *Nototheniops nudifrons* had the highest prevalence, followed by *L. squamifrons* and *N. larseni*. The parasites occurred as

Table 1 Parasites of *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons* from the SSI

Host	Parasite	<i>n</i>	<i>P</i> [%]	<i>I</i>	mI	mA	
<i>Nototheniops larseni</i> (<i>n</i> =40)	<u>Digenea</u>	5	5	1–2	2.5	0.125	
	Digenea indet	3	5	1–2	1.5	0.075	
	<i>Neolebouria antarctica</i>	2	2.5	2	2	0.05	
	<u>Nematoda</u>	499	97.5	1–52	12.79	12.48	
	<u>Acanthocephala</u>	49	60	1–6	2.04	1.225	
	Acanthocephala indet	1	2.5	1	1	0.025	
	<i>Corynosoma</i> spp.	27	42.5	1–5	1.59	0.675	
	<i>C. bullosum</i>	6	15	1	1	0.15	
	<i>Echinorhynchus petrotschenkoi</i>	4	7.5	1–2	1.33	0.1	
	<i>Metacanthocephalus</i> spp.	11	15	1–6	1.83	0.275	
	<i>Nototheniops nudifrons</i> (<i>n</i> =40)	<u>Digenea</u>	11	7.5	1–4	3.67	0.275
		Digenea indet	5	5	2–3	2.5	0.125
		<i>Lepidapedon garrardi</i>	1	5	1	1	0.05
		<i>Neolebouria antarctica</i>	4	2.5	4	4	0.1
		<u>Nematoda</u>	503	100	1–38	12.58	12.58
<u>Acanthocephala</u>		226	90	1–34	6.28	5.65	
Acanthocephala indet		51	50	1–7	2.55	1.275	
<i>Corynosoma</i> spp.		10	12.5	1–4	2	0.25	
<i>C. bullosum</i>		1	2.5	1	1	0.025	
<i>Metacanthocephalus</i> spp.		164	82.5	1–34	4.97	4.1	
<i>Lepidonotothen squamifrons</i> (<i>n</i> =49)		<u>Digenea</u>	78	59.2	1–11	2.69	1.591
		Digenea indet	50	40.8	1–11	2.5	1.02
		<i>Elytrophalloides oatesi</i>	1	2.04	1	1	0.02
		<i>Lepidapedon garrardi</i>	17	16.3	1–6	2.13	0.346
		<i>Neolebouria antarctica</i>	10	14.3	1–34	1.43	0.204
	<u>Nematoda</u>	437	100	1–36	8.92	8.92	
	<u>Cestoda</u>	8	4.08	2–6	4	0.163	
	<u>Acanthocephala</u>	298	89.8	1–19	6.77	6.081	
	Acanthocephala indet	19	22.4	1–3	1.72	0.387	
	<i>Corynosoma</i> spp.	142	73.5	1–19	3.94	2.897	
	<i>C. bullosum</i>	127	73.5	1–10	3.53	2.591	
	<i>Metacanthocephalus</i> spp.	10	16.3	1–3	1.25	0.204	

Quantity = *n*, Prevalence = *P* [%], (mean) Intensity = (m)I, mean Abundance = mA

Taxon groups are underlined to better distinguish the parasitological parameters of the whole group from parasitological parameters of specimens that were not identified to a more specific taxon

adults (*Echinorhynchus petrotschenkoi* (RODIUK, 1984, ZDZITOWIECKI, 1989) and *Metacanthocephalus* spp.) or cystacanth stages (*Corynosoma* spp.).

Each fish species had some parasites that were either exclusive in the sample or occurred more frequently than in the other host species, especially from the group Acanthocephala. With an infection of *Echinorhynchus petrotschenkoi* in the stomach, *N. larseni* was the only host species infected by this parasite. *Nototheniops nudifrons* had the highest prevalence and infection intensities by the genus *Metacanthocephalus*, which occurred in the pyloric caeca and intestine. The highest prevalence of *Corynosoma bullosum* was detected in *L. squamifrons*.

Parasite records of *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons* and host spectrum of the identified parasites collated from literature are presented in Figs. 3 and 4, references of the records are stated in Tables S3 and S4.

Discussion

Prey organisms can vary with the habitat of the fish and determine which parasites they ingest through their diet. Both the life cycles and infestation patterns of the parasites are used to gain insight into the ecology of the fish studied.

Fig. 2 Parasites of notothenioid fishes from Elephant Island. **A** *Elytrophalloides oatesi*, **B** *Lepidapedon garrardi*, **C** *Neolebouria antarctica*, **D** Cestode cercoid with bilocular acetabula, **E** *Echinorhynchus petrotschenkoi*, **F** *Corynosoma bullosum* (colour figure online)

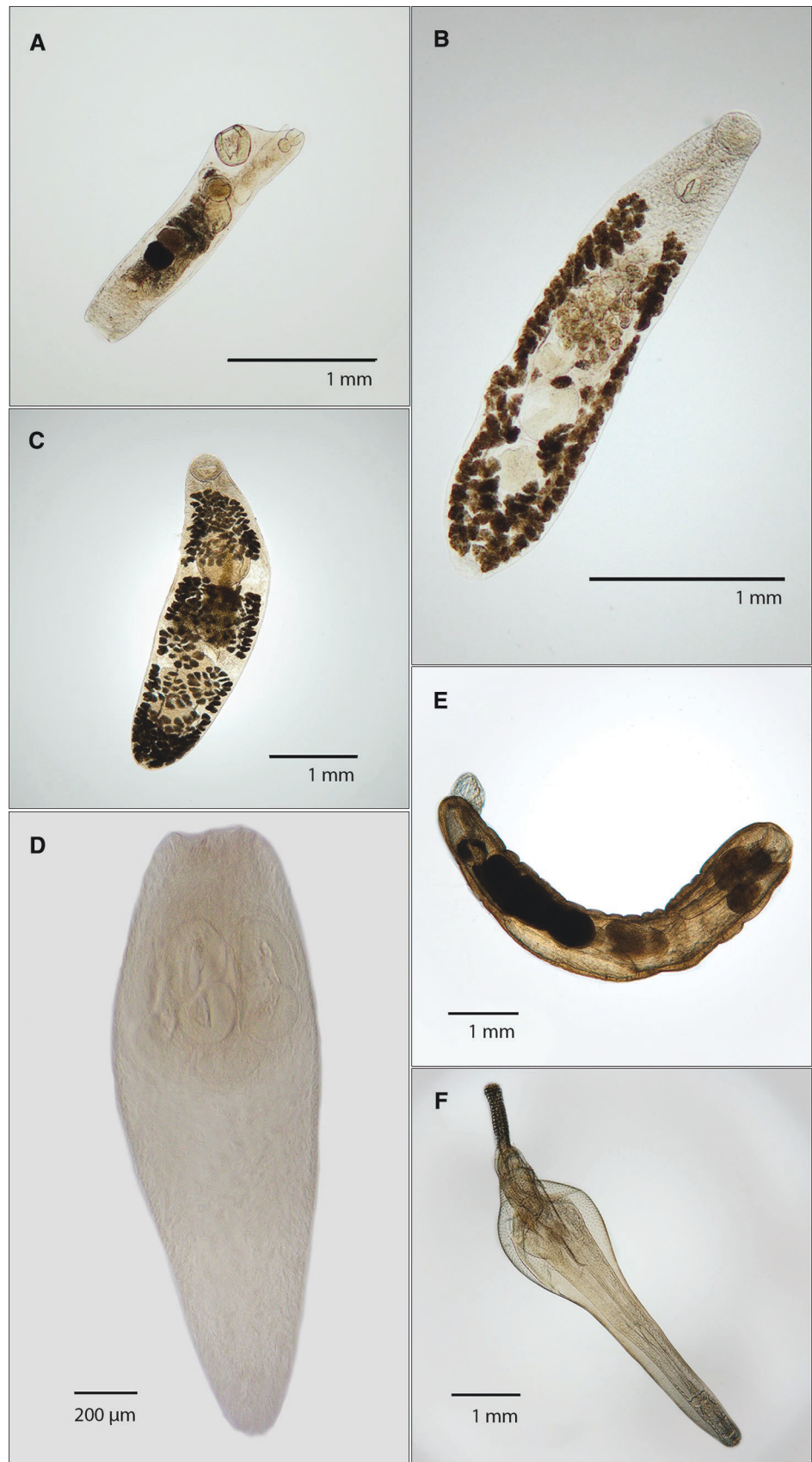


Table 2 Nematoda subsamples from *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons*, stating number of hosts, number of parasites and NCBI-Accession numbers (Ref. ID)

Host	<i>Ascarophis nototheniae</i>		<i>Contraceacum osculatum</i> s.l		<i>Contraceacum osculatum</i> D		<i>Pseudoterranova decipiens</i> E	
	n	Ref. ID	n	Ref. ID	n	Ref. ID	n	Ref. ID
<i>Nototheniops larseni</i> (n=27)	–	–	–	–	7	KY275507.1, MG787548.1	27	KF017610.1, KX378173.1, KX378174.1
<i>Nototheniops nudifrons</i> (n=20)	13	DQ094172.1	3	KY275507.1	–	–	6	KX378173.1, KX378174.1
<i>Lepidonotothen squamifrons</i> (n=19)	–	–	5	MT258528.1	2	KY275507.1, MG787549.1	12	KF017610.1, KX378173.1, KX378174.1

We here discuss aspects of diet and parasitisation patterns of Antarctic fish (Nototheniinae), focusing on the three species, *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons* and the results gained through our sampling and a current literature review.

Diet

Dietary analyses depend on the food consumed directly before and digestion degree at the point of sampling. Indigestible components, bones, exoskeletons, shells, bristles, etc., can be used for morphological identification. Fish from the same size group caught in a single haul usually contain similar food items and digestion stages.

In this study, the stomach contents of *Nototheniops larseni* and *N. nudifrons* were in an advanced digestion stage, which resulted in a low sample and statistically unreliable calculations of dietary parameters, overestimating proportions and importance of food components. However, the few food items identified did not contradict previous findings.

Stomach contents of *N. larseni* were mostly identified as Euphausiacea and Teleostei (rare). These findings agree with the reported main food source of *N. larseni* being krill (*Euphausia superba*), amphipods (*Probolisca ovata*, *Gitanopsis squamosa*, *Oradarea bidentata*, *Prostebbingia gracilis*, *P. brevicornis*, *Paramoera* spp.) and copepods [49–51]. The food composition (krill, hyperiids, copepods, young fish), reports of benthic amphipoda and stones in the stomach of *N. larseni* indicate an epibenthic lifestyle [13, 51]. A positive connection between fish size and increasing consumption of Mysida (e.g. *Antarctomysis maxima*) and hyperiid Amphipoda (*Parathemisto gaudichaudii*) has been observed [50].

The discovered food items of *N. nudifrons* from this study point to a benthic feeding strategy, agreeing with previous research [13]. Other studies described the diet composition of *N. nudifrons* as a typical secondary consumer with an increasing number of different prey taxa with increasing total length [52, 53]. Previous research suggests an ontogenetic shift of the diet from cyclopoid and calanoid copepods

(e.g. *Paraeuchaeta antarctica* and *Pleuromamma gracilis*) and Mysida to benthic invertebrates, amphipods, polychaetes and isopods, but also krill (*E. superba*), and shrimp (*Cragon antarcticus*, *Chorismus antarcticus*) [13, 50, 52, 54, 55].

A variation of food components at different sites has been described for *N. larseni* and *N. nudifrons*, adapting to the availability of food items, related to the respective habitat conditions [52, 56–60].

The stomach contents of *L. squamifrons* were preserved best in this study, hence the highest diversity of food items. The higher variety of food organisms in adult specimens compared to subadult samples of *L. squamifrons* from this study indicate a size and maturity-related ontogenetic shift in feeding behaviour, as previously observed in other Nototheniinae [52]. Other studies found the diet of *L. squamifrons* to be similar to *N. larseni* [61]. Both fishes feed predominantly on krill, with a lower proportion of benthic invertebrates and *L. squamifrons* also feed on fish [61]. The reported feeding behaviour of *L. squamifrons* includes demersal and pelagic hunting [13]. Salps have been reported to be a component of *L. squamifrons* diet [13], which could be advantageous in the light of a growing salp population due to the increase of water temperatures [5, 62–64].

Krill is a dominant diet component of demersal fish summer diet at the South Shetland Islands region, and its biomass is positively correlated with demersal fish abundance. The reported distribution of krill in the water column reaches the bottom, which agrees with a demersal lifestyle of krill consuming fish species [61, 65–68]. The proportion of Amphipoda and krill in the demersal fish diet varies seasonally, more energy-rich Amphipoda are consumed during winter and krill during summer [13]. Our data support the importance of krill and amphipods in the diet of all examined fish species. Literature data agree with diet variations depending on size (ontogenetic shift) and between different sampling sites.

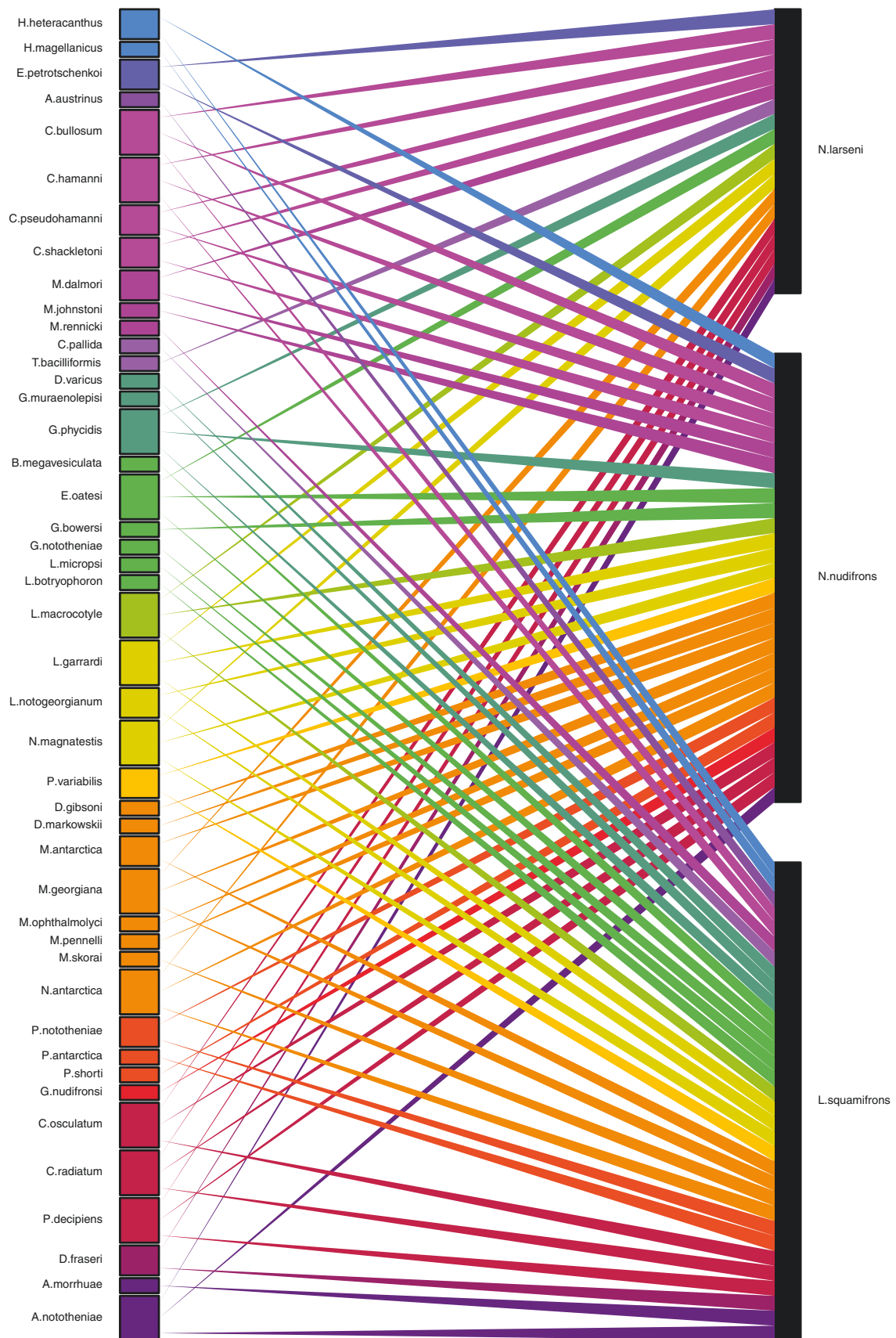


Fig. 3 Reported parasites of *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons* represented as bipartite network plot. Ray and box color indicates the parasite family, box size increases with the number of connections (colour figure online)

Parasites of the Examined Nototheniinae

Digenea

In our study, infections with Digenea were rare in *Nototheniops larseni* and *N. nudifrons* and more frequent in *Lepidonotothen squamifrons*. Most known digeneans found in the Southern Ocean infect fish hosts associated with a benthic habitat. An increase in infection intensity of fish hosts with digeneans, but a site effect with a decrease in taxon diversity has been described in coastal areas compared to offshore sites [29].

Elytrophalloides oatesi (Hemiuridae) is frequently detected in Antarctic fish (e.g. *N. nudifrons*) [31] but it is not endemic to the Southern Ocean [69] and the reported host range is wide [37, 69, 70]. It is not host-specific to Nototheniidae and it does not imply a restriction of the host to the Southern Ocean. *Elytrophalloides oatesi* could be considered an indicator of a benthopelagic fish host, the life cycle of Hemiuridae includes a pelagic intermediate host [71, 72]. This is supported by our findings on the diet and parasitisation of *L. squamifrons*.

The general distribution and ecology of *Lepidapedon garrardi* (Lepocreadiidae) is similar to *E. oatesi*, as it occurs in Notothenioidei and is found throughout the Southern Ocean and Sub-Antarctic regions [29, 70]. The genus includes 30 species [72, 73]. In contrast to our findings, *L. garrardi* was the dominant digenean of *Nototheniops nudifrons* at Admiralty Bay, occurring with high intensities to 131 parasites per host [31]. This difference could be owed to a site effect between King George Island and Elephant Island. This effect had been described for *L. garrardi* infection of *T. bernacchii*, which could also apply to *L. garrardi* and *N. nudifrons* in this study [74].

Neolebouria antarctica (Opecoelidae) was detected in all host species examined in this study and is frequently found in Notothenioidei and Liparididae (Table S4, [29]). Its distribution covers West Antarctica and South Georgia, while its congener *N. terranovensis* is found in East Antarctica (Weddell and Ross Sea, Indian Sector) [29]. The life cycle of *N. antarctica* includes a metacercariae stage in crustaceans [70, 75], which could play an important role in the transmission to fishes. Its infection parameters seem to vary with site and host species. The low prevalence in *N. nudifrons* detected in this study agrees with findings from Laskowski & Zdzitowiecki [31] from Vernadsky Station (Argentine Islands, Antarctic Peninsula).

The aforementioned Digenea have all been previously detected in the examined host species (Table S3), except *Lepidapedon garrardi* in *Lepidonotothen squamifrons*, for which we provided a new host record.

Nematoda

Nematodes were the most prevalent and numerous parasites of the examined Nototheniidae. The nematode infection of the examined fishes is connected to their demersal lifestyle. The similarities of the euryxenous parasites of the three host species are also reflected within this group, including larval stages of the anisakids *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) and *Contracaecum osculatum* (s.l.). Considering that we molecularly identified a subsample as *Pseudoterranova decipiens* E, which is the only species from the *P. decipiens* complex occurring in Antarctic fishes [76], it can be assumed that the parasites identified as *P. decipiens* (s.l.) are most likely *P. decipiens* E. This species has been reported to be characteristic of the lower Antarctic shelves of the seasonal pack ice zone [77]. *Pseudoterranova decipiens* E requires a pinniped definitive host, specifically the Weddell Seal (*Leptonychotes weddellii*) [76, 78]. The occurrence of *P. decipiens* E is limited by depth, they are found at the shallow shelf, because deep waters are not frequented by hunting Weddell seals [77]. *Pseudoterranova decipiens* E is restricted to benthic or benthopelagic fish hosts, it does not occur in pelagic fishes [77, 79]. Most seal species hunt in the water column [10, 80, 81] but isotopic analyses by Burns *et al.* [82] showed that *Leptonychotes weddellii* also consumes benthic prey. A more recent study by Daneri *et al.* [83] analysed the fish prey of *L. weddellii* at Hope Bay and showed that its main food were Nototheniidae (80%). *Nototheniops larseni* seemed to be an important food item (normalised IRI = 13.9%), while *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons* were rarer prey of *Leptonychotes weddellii* [83]. The parasitological data from our study suggest that all examined fish hosts contribute to the transmission of *P. decipiens* E to its definitive host at the respective sampling site.

Contracaecum osculatum (s.l.) also uses seals as definitive host. Co-infections of the fish host, as observed in this study, are common, and suggestions of *Contracaecum* spp. outcompeting *Pseudoterranova* spp. in the definitive hosts have been questioned [25]. Similar to *Pseudoterranova decipiens* E, the life cycle of *Contracaecum osculatum* involves demersal intermediate hosts, while its congener *C. radiatum* (not detected in this study) is found in pelagic intermediate hosts [84].

Since anisakid nematodes tend to be less specific regarding paratenic fish hosts [85], they have been

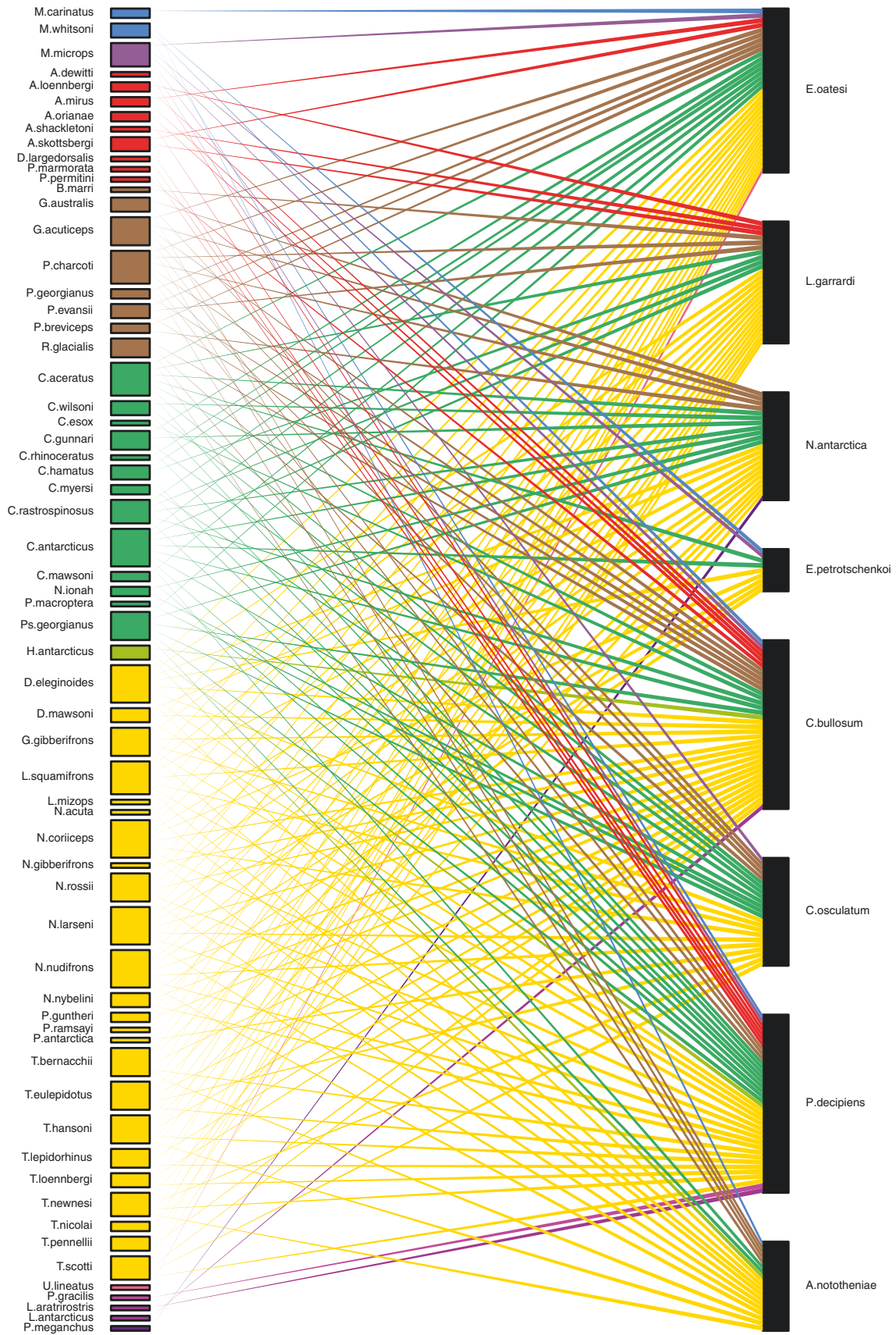


Fig. 4 Reported host spectrum of the parasites of *Nototheniops larseni*, *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons* detected in this study represented as a bipartite network plot. Ray and box color indicates the host family, box size increases with the number of connections (colour figure online)

recorded in a wide range of hosts from the Southern Ocean.

The cystidicolid nematode *Ascarophis nototheniae* was only detected in *N. nudifrons* in this study. It is one of six Antarctic nematodes maturing in fish and is common in Notothenioidei, especially Nototheniidae [86]. *Ascarophis* spp. have been described to use Decapoda as their intermediate host [87]. This indicates that *N. nudifrons* infected by *A. nototheniae* have been feeding on its reported benthic shrimp hosts, such as *Chorismus antarcticus* and *Notocrangon antarcticus* [88].

Acanthocephala

Acanthocephala were abundant parasites of the examined fish species. While *Corynosoma* spp. were more frequent in *Nototheniops nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons*, *Metacanthocephalus* spp. were more prevalent in *N. nudifrons*. The detection of *E. petrotschenkoi* in two specimens of *N. larseni* represents a new host record.

All Acanthocephala maturing in Antarctic fish have two hosts within their life cycle, if the definitive hosts are birds or seals, their life cycle includes three hosts [42, 70]. Antarctic acanthocephalans are frequent in demersal fish hosts and absent in fishes with a pelagic lifestyle, which suggests a benthic intermediate host and a bottom-feeding definitive host [42, 70]. Some Acanthocephala are typical for the region south of the ACC (lower Antarctica), *Metacanthocephalus johnstoni*, *M. dalmori*, *Aspersentis megarhynchus*, *Echinorhynchus petrotschenkoi*, *E. muranolepis*, *Corynosoma bullosum*, *C. arctocephali*, *C. hamanni*, *C. shackletoni* [70]. Most Acanthocephala found in the Southern Ocean are more common in coastal habitats and fish hosts acquire the parasite if they are associated to this habitat permanently or during specific life-history events, e.g. spawning [28].

The life cycle of *Corynosoma* spp. at the South Shetland Islands (Admiralty Bay) involves Amphipoda as intermediate hosts [89]. Cystacanths of *Corynosoma hamanni* and *C. pseudohamanni* were detected in *Prostibbingia brevicornis* and *Cheirimedon femoratus*, *Corynosoma bullosum* occurred in *Waldeckia obesa* and *Bovallia gigantea* [89]. *Corynosoma* spp. have a wide range of teleost hosts ([90], Table S4). *Corynosoma bullosum* is specific to its definitive host, the Southern Sea Elephant *Mirounga leonina* [77, 91], occurring at the lower latitudes of Antarctica, around the Antarctic Peninsula, SSI and Sub-Antarctica [92]. The definitive hosts of *Corynosoma pseudohamanni*, Crab-eater

Seals and Weddell Seals, only occur in higher Antarctica [93]. The reported abundance of *C. bullosum* at shelf and offshore sites matches our findings at shelf sampling sites around Elephant Island. *Corynosoma pseudohamanni* and *C. hamanni* rarely occur in fishes from shelf areas [28]. The infection of *Nototheniops larseni* and *N. nudifrons* and *Lepidonotothen squamifrons* with *Corynosoma* spp. points to a trophic connection as prey of pinnipeds.

The definitive hosts of *Metacanthocephalus* spp. (Rhadiorhynchidae) are fish [94, 95]. The genus occurs in 2–3 families belonging to the Notothenioidei [42, 70]. *Metacanthocephalus johnstoni* occurs in *Cheirimedon femoratus*, while *M. dalmori* has been found in deeper living Crustacean hosts, indicating different depth ranges [94]. Zdzitowiecki and Laskowski [96] reported that the infection intensity of *N. nudifrons* with Acanthocephala had increased compared to findings from 1978/1979. Similar to our findings, Rhadiorhynchida (*Metacanthocephalus* spp.) were more numerous in *N. nudifrons* than Polymorphida (*Corynosoma* spp.) [96].

Echinorhynchus spp. are known as parasites of gadiform fishes [28]. *Echinorhynchus petrotschenkoi* occurs in the Antarctic species from this taxonomic order, *Muraenolepis microps* and *M. whitsoni* (Macrouridae), but has also been reported in various Nototheniidae, e.g. *Nototheniops nudifrons* [28, 70, 97]. A connection between the infection intensity of *Echinorhynchus* sp. in nototheniids to the diversity of Crustacea in their habitat has been shown [74]. The prevalence of *Echinorhynchus* spp. is unusual in fjords and near shore habitats [28], the infection of *N. larseni* was acquired from an intermediate host at an offshore site and could be an indicator for migrations.

Parasite Specificity

A common feature of all parasites infecting hosts from the present study is their low host specificity regarding the teleost host. All parasites have a host spectrum including more than one taxonomic family, qualifying as ‘euryxenous’ [98]. Most hosts belong to the suborder Notothenioidei and the family Nototheniidae, which constitute the largest proportion of Antarctic fish diversity. Rohde and Heap [99] stated that the parasite fauna of one Antarctic fish species could be dominated by different parasite taxa, resulting in individual-specific parasitisation patterns.

Including previous records on the parasite fauna of the three species examined in this study (see Table S3), there seems to be a connection with parasite diversity and sampling effort (number of host species and number of sampling sites) but also host size, since the larger species *Lepidonotothen squamifrons* has a lot more parasite records than the smaller species *Nototheniops larseni*, which has also been less studied. The parasite diversity reported in *L. squamifrons* is probably owed to a higher trophic level and a

sampling bias in favour of larger fish species. The parasite fauna of the Southern Ocean's largest teleosts, *Dissostichus* spp., is well studied due to commercial interest in these species as a fishery resource [32]. Possibly due to the top position in the food web and also a larger number of studies, a large number of parasites have been described for *Dissostichus* spp. (357 entries in Oğuz *et al.* [37]).

Observations of site effects on parasite patterns in Antarctic Nototheniidae have been made in previous studies. A site variability of infection patterns with Digenea and Acanthocephala has previously been described for *N. nudifrons* [31] and other Nototheniids [100] and could explain observations made in this study. Laskowski & Zdzitowiecki [31] found a site effect comparing the infection of *N. nudifrons* with the digeneans *Lepidapedon garrardi*, *Elytrophalloides oatesi* and *Neolebouria antarctica*. Also, the infection with the acantocephalan *Corynosoma pseudohamanni* varied between sites. This suggests that these parasites might use different macroinvertebrate hosts that thrive differently at the respective sampling sites. Opportunistic food choice and adaptation to different feeding strategies of the fish hosts resulting from the structural features (rocky, sandy, slope) of a site could also result in varying infection intensities between studies. Studies by Moser and Cowen [74] and Münster *et al.* [101] observed site effects in the parasite communities of *Trematomus bernacchii* and *Macrourus whitsoni*. The design of future studies using fish parasite communities as indicators of ecosystem changes needs to account for site effects.

Conclusion

Polar ecosystems are currently subject to the serious effects of climate change. Parasite communities and their patterns and distributions in particular can be used for the management of Antarctic marine resources and the monitoring of climate change effects on biotic communities. However, biomonitoring of parasite communities in model host species should take into account potential site effects on infection numbers. Thus, despite the challenges and limited opportunities for fishing in these remote areas, biomonitoring must ideally be carried out periodically in a predefined range of habitats and sites, including as many levels as possible, to be able to track, compare, and better understand changes in the future.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00455-8>.

Acknowledgements The authors are grateful to all participants of the ANT-XXVIII/4 expedition of the RV Polarstern. We thank Jan N. Zaabe who examined the fish samples and Birgit Nagel and Gabriele Elter for their contribution to the laboratory work.

Author contributions KGA, SC, JK and SK conceived of the study and wrote the manuscript. KGA carried out the analysis and SC created the figures. JK revised the manuscript.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors declare they do not have competing interests.

Ethics approval Approval of our present study by a review board institution or ethics committee was not necessary because all fish were caught during a regular research cruise onboard the RV Polarstern. No living animals were used. All fish were expertly killed according to the German Animal Protection Law (§4) and the ordinance of slaughter and killing of animals (Tierschlachtverordnung § 13).

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication All authors gave final approval for publication and agree to be held accountable for the work performed therein.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Orsi AH, Whitworth T, Nowlin WD (1995) On the meridional extent and fronts of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep Sea Res Part I* 42:641–673. [https://doi.org/10.1016/0967-0637\(95\)00021-W](https://doi.org/10.1016/0967-0637(95)00021-W)
- Kock K-H (1992) Antarctic fish and fisheries. Cambridge University Press, Cambridge
- Rogers AD, Tyler PA, Connelly DP, Copley JT, James R, Larter RD, Linse K, Mills RA, Garabato AN, Pancost RD, Pearce DA, Polunin NVC, German CR, Shank T, Boersch-Supan PH, Alker BJ, Aquilina A, Bennett SA, Clarke A, Dinley RJJ, Graham AGC, Green DRH, Hawkes JA, Hepburn L, Hilario A, Huvenne VAI, Marsh L, Ramirez-Llodra E, Reid WDK, Roterman CN, Sweeting CJ, Thatje S, Zwirgmaier K (2012) The discovery of new deep-sea hydrothermal vent communities in the Southern Ocean and implications for biogeography. *PLoS Biol* 10:e1001234. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001234>
- Foppert A, Donohue KA, Watts DR (2016) The polar front in drake passage: a composite-mean stream-coordinate view. *J Geophys Res Oceans* 121:1771–1788. <https://doi.org/10.1002/2015JC011333>
- Atkinson A, Siegel V, Pakhomov E, Rothery P (2004) Long-term decline in krill stock and increase in salps within the Southern

- Ocean. Nature 432:100–103. <https://doi.org/10.1038/nature02996>
6. Marr JWS (1962) The natural history and geography of the Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana). Discovery Rep 32:33–464
 7. Siegel V (2000) Krill (Euphausiacea) demography and variability in abundance and distribution. Can J Fish Aquat Sci 57:151–167. <https://doi.org/10.1139/f00-184>
 8. Quetin LB, Ross RM (2003) Episodic recruitment in Antarctic krill *Euphausia superba* in the Palmer LTER study region. Mar Ecol Prog Ser 259:185–200. <https://doi.org/10.3354/meps259185>
 9. Hofmann EE, Hüsrevoğlu YS (2003) A circumpolar modeling study of habitat control of Antarctic krill (*Euphausia superba*) reproductive success. Deep Sea Res Part II 50:3121–3142. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2003.07.012>
 10. Eastman JT (1993) Antarctic fish Biology—Evolution in a unique environment. Academic Press Inc, San Diego
 11. Hahn-Woernle L, Powell B, Lundesgaard Ø, van Wessem M (2020) Sensitivity of the summer upper ocean heat content in a Western Antarctic Peninsula fjord. Prog Oceanogr 183:102287. <https://doi.org/10.1016/j.pcean.2020.102287>
 12. Turner J, Marshall GJ, Clem K, Colwell S, Phillips T, Lu H (2020) Antarctic temperature variability and change from station data. Int J Climatol 40:2986–3007. <https://doi.org/10.1002/joc.6378>
 13. Barrera-Oro E (2002) The role of fish in the Antarctic marine food web: differences between inshore and offshore waters in the southern Scotia Arc and west Antarctic Peninsula. Antarct Sci 14:293–309. <https://doi.org/10.1017/S0954102002000111>
 14. Eastman JT, Clarke A (1998) A comparison of adaptive radiations of Antarctic fish with those of NonAntarctic fish. In: Di Prisco G, Pisano E, Clarke A (eds) Fishes of Antarctica: a biological overview. Springer Milan, Milano, pp 3–26
 15. Gon O, Heemstra PC (1990) Fishes of the Southern Ocean, 1st edn. J. L. B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown
 16. Near TJ, Pesavento JJ, Cheng C-HC (2004) Phylogenetic investigations of Antarctic notothenioid fishes (Perciformes: Notothenioidei) using complete gene sequences of the mitochondrial encoded 16S rRNA. Mol Phylogenet Evol 32:881–891. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.01.002>
 17. Eastman JT (2005) The nature of the diversity of Antarctic fishes. Polar Biol 28:93–107. <https://doi.org/10.1007/s00300-004-0667-4>
 18. Hewitt GC, Hine PM (1972) Checklist of parasites of New Zealand fishes and of their hosts. N Z J Mar Freshw Res 6:69–114. <https://doi.org/10.1080/00288330.1977.9515410>
 19. Hine M, Jones JB, Diggles BK (2000) A checklist of the parasites of New Zealand fishes including previously unpublished records. The National Institute of Water and Atmospheric Research, Wellington
 20. Grabda J, Ślósarczyk W (1981) Parasites of marine fishes from New Zealand. Acta Ichthyol Piscat XI:85–102
 21. Kock K-H, Stransky C (2000) The composition of the coastal fish fauna around Elephant Island (South Shetland Islands, Antarctica). Polar Biol 23:825–832. <https://doi.org/10.1007/s00300-00000159>
 22. Tiedtke JE, Kock K-H (1989) Structure and composition of the demersal fish fauna around Elephant Island. Arch Fisch 39:143–169
 23. Busch MW, Kuhn T, Münster J, Klimpel S (2012) Marine crustaceans as potential hosts and vectors for metazoan parasites. In: Mehlhorn H (ed) Arthropods as vectors of emerging diseases. Springer, Berlin, pp 329–360
 24. Marcogliese DJ (1995) The role of zooplankton in the transmission of helminth parasites to fish. Rev Fish Biol Fisheries 5:336–371. <https://doi.org/10.1007/BF00043006>
 25. Marcogliese DJ (1996) Transmission of the sealworm, *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe), from invertebrates to fish in an enclosed brackish pond. J Exp Mar Biol Ecol 205:205–219. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02613-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02613-5)
 26. Zdzitowiecki K, Pisano E, Vacchi M (1993) Antarctic representatives of the genus *Neolebouria* Gibson, 1976 (Digenea, Opecoelidae), with description of one new species. Acta Parasitol 38:11–14
 27. Zdzitowiecki K (1988) Occurrence of digenetic trematodes in fishes off South Shetlands (Antarctic). Acta Parasitologica Polonica 33:155–167
 28. Zdzitowiecki K (1990) Occurrence of acanthocephalans in fishes of the open sea off the South Shetlands and South Georgia (Antarctic). Acta Parasitologica Polonica 35:131–141
 29. Zdzitowiecki K (1998) Diversity of Digenea, parasites of fishes in various areas of the Antarctic. In: Di Prisco G, Pisano E, Clarke A (eds) Fishes of Antarctica: a biological overview. Springer Milan, Milano, pp 87–94
 30. Palm HW, Klimpel S, Walter T (2007) Demersal fish parasite fauna around the South Shetland Islands: high species richness and low host specificity in deep Antarctic waters. Polar Biol 30:1513–1522. <https://doi.org/10.1007/s00300-007-0312-0>
 31. Laskowski Z, Zdzitowiecki K (2005) The helminth fauna of some notothenioid fishes collected from the shelf of Argentine Islands, West Antarctica. Pol Polar Res 26:315–324
 32. Froese R, Pauly D (2021) FishBase. World wide web electronic publication. <https://www.fishbase.org>. Accessed 15 July 2021
 33. WoRMS Editorial Board (2020) World register of marine species. WoRMS Editorial Board, Belgium
 34. Fricke R, Eschmeyer, WN, an der Laan R (2021) Eschmeyer's catalog of fishes: Genera, species, references. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Accessed 15 July 2021
 35. Near TJ, MacGuigan DJ, Parker E, Struthers CD, Jones CD, Dornburg A (2018) Phylogenetic analysis of Antarctic notothenioids illuminates the utility of RADseq for resolving Cenozoic adaptive radiations. Mol Phylogenet Evol 129:268–279. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.09.001>
 36. Miya T, Gon O, Mwale M, Poulin E (2016) Molecular systematics and taxonomic status of three latitudinally widespread nototheniid (Perciformes: Notothenioidei) fishes from the Southern Ocean. Zootaxa 4061:381–396. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4061.4.4>
 37. Oğuz MC, Tepe Y, Belk MC, Heckmann RA, Aslan B, Gürgen M, Bray RA, Akgül Ü (2015) Metazoan parasites of Antarctic fishes. Türkiye parazitolojii dergisi. <https://doi.org/10.5152/tpd.2015.3661>
 38. Gibson DI, Bray RA, Harris EA (2005). Host-parasite database of the natural history museum, London. <https://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/>. Accessed 15 July 2021
 39. Brandl SJ, Casey JM, Meyer CP (2020) Dietary and habitat niche partitioning in congeneric cryptobenthic reef fish species. Coral Reefs 39:305–317. <https://doi.org/10.1007/s00338-020-01892-z>
 40. Hyslop EJ (1980) Stomach contents analysis - a review of methods and their application. J Fish Biol 17:411–429. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb02775.x>
 41. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. J Parasitol 83:575. <https://doi.org/10.2307/3284227>
 42. Zdzitowiecki K (1991) Antarctic Acanthocephala. Koeltz Scientific Books, Königstein
 43. Zdzitowiecki K (1997) Antarctic digenea parasites of fishes. Koeltz Scientific Books, Königstein

44. Klimpel S, Kleinertz S, Hanel R, Rückert S (2007) Genetic variability in *Hysterothylacium aduncum*, a raphidascarid nematode isolated from sprat (*Sprattus sprattus*) of different geographical areas of the northeastern Atlantic. *Parasitol Res* 101:1425–1430. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0662-0>
45. Zhu X, Gasser RB, Jacobs DE, Hung G-C, Chilton NB (2000) Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitol Res* 86:738–744. <https://doi.org/10.1007/PL00008561>
46. Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB (1998) Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 28:1911–1921. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00150-7)
47. Shih H-H (2004) Parasitic helminth fauna of the cutlass fish, *Trichiurus lepturus* L., and the differentiation of four anisakid nematode third-stage larvae by nuclear ribosomal DNA sequences. *Parasitol Res*. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1095-7>
48. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
49. Richardson MG (1975) The dietary composition of some Antarctic fish. *Br Antarct Surv Bull* 41:113–120
50. Targett TE (1981) Trophic ecology and structure of coastal Antarctic fish communities. *Mar Ecol Prog Ser* 4:243–263
51. Curcio N, Tombari A, Capitano F (2014) Otolith morphology and feeding ecology of an Antarctic nototheniid, *Lepidonotothen larseni*. *Antarct Sci* 26:124–132. <https://doi.org/10.1017/S0954102013000394>
52. Blasina G, Cazorla AL, Antoni MD, Bruno D, Delpiani M, de Astarloa JMD (2017) Ontogenetic changes in the feeding strategy of *Lepidonotothen nudifrons* (Pisces, Nototheniidae) off the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Res* 36:1331558. <https://doi.org/10.1080/17518369.2017.1331558>
53. Deli Antoni MY, Delpiani SM, González-Castro M, Blasina GE, Spath MC, Depiani GE, Ashikaga FY, Cruz VP, Oliveira C, de Astarloa JMD (2019) Comparative populational study of *Lepidonotothen larseni* and *L. nudifrons* (Teleostei: Nototheniidae) from the Antarctic Peninsula and the South Shetland Islands. *Antarctica Polar Biol* 42:1537–1547. <https://doi.org/10.1007/s00300-019-02540-1>
54. Casaux R, Barrera-Oro E, Baroni A, Ramón A (2003) Ecology of inshore notothenioid fish from the Danco Coast, Antarctic Peninsula. *Polar Biol* 26:157–165. <https://doi.org/10.1007/s00300-002-0463-y>
55. Moreira E, Juarez M, Barrera-Oro E (2014) Dietary overlap among early juvenile stages in an Antarctic notothenioid fish assemblage at Potter Cove, South Shetland Islands. *Polar Biol* 37:1507–1515. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1545-3>
56. Calbet A, Alcaraz M, Atienza D, Broglio E, Vaqué D (2005) Zooplankton biomass distribution patterns along the western Antarctic Peninsula (December 2002). *J Plankton Res* 27:1195–1203. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi081>
57. Lörz A-N, Brandt A (2003) Diversity of Peracarida (Crustacea, Malacostraca) caught in a suprabenthic sampler. *Antarct Sci* 15:433–438. <https://doi.org/10.1017/S0954102003001536>
58. Linse K, Brandt A, Hilbig B, Wegener G (2002) Composition and distribution of suprabenthic fauna in the south-eastern Weddell Sea and off King George Island. *Antarct Sci* 14:3–10. <https://doi.org/10.1017/S0954102002000512>
59. San Vicente C, Munilla T, Corbera J, Sorbe J-C, Ramos A (2009) Suprabenthic fauna from the Bellingshausen Sea and western Antarctic Peninsula: spatial distribution and community structure. *Sci Mar* 73:357–368. <https://doi.org/10.3989/scimar.2009.73n2357>
60. Kellermann A (1990) Food and feeding dynamics of the larval Antarctic fish *Nototheniopsis larseni*. *Mar Biol* 106:159–167. <https://doi.org/10.1007/BF01314796>
61. Takahashi M, Iwami T (1997) The summer diet of demersal fish at the South Shetland Islands. *Antarct Sci* 9:407–413. <https://doi.org/10.1017/S0954102097000527>
62. Loeb V, Siegel V, Holm-Hansen O, Hewitt R, Fraser W, Trivelpiece W, Trivelpiece S (1997) Effects of sea-ice extent and krill or salp dominance on the Antarctic food web. *Nature* 387:897–900. <https://doi.org/10.1038/43174>
63. Pakhomov EA, Froneman PW, Perissinotto R (2002) Salp/krill interactions in the Southern Ocean: spatial segregation and implications for the carbon flux. *Deep Sea Res Part II* 49:1881–1907. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(02\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(02)00017-6)
64. Perissinotto R, Pakhomov AE (1998) The trophic role of the tunicate *Salpa thompsoni* in the Antarctic marine ecosystem. *J Mar Syst* 17:361–374. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(98\)00049-9](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(98)00049-9)
65. Gutt J, Siegel V (1994) Benthopelagic aggregations of krill (*Euphausia superba*) on the deeper shelf of the Weddell Sea (Antarctic). *Deep Sea Res Part I* 41:169–178. [https://doi.org/10.1016/0967-0637\(94\)90031-0](https://doi.org/10.1016/0967-0637(94)90031-0)
66. Kawaguchi K, Matsuda O, Ishikawa S, Naito Y (1986) A light trap to collect krill and other micronektonic and planktonic animals under the Antarctic coastal fast ice. *Polar Biol* 6:37–42. <https://doi.org/10.1007/BF00446238>
67. Kock K-H (1985) Krill consumption by Antarctic notothenioid fish. In: Siegfried WR, Condy PR, Laws RM (eds) *Antarctic nutrient cycles and food webs*. Springer, Berlin, pp 437–444
68. Marin VH, Brinton E, Huntley M (1991) Depth relationships of *Euphausia superba* eggs, larvae and adults near the Antarctic Peninsula, 1986–87. *Deep Sea Res Part A Oceanogr Res Papers* 38:1241–1249. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(91\)90104-N](https://doi.org/10.1016/0198-0149(91)90104-N)
69. Jezewski W, Zdzitowiecki K, Laskowski Z (2014) Digenea in notothenioid fish in the Beagle Channel (Magellanic sub-region, sub-Antarctica). *Acta Parasitol* 59:42–49. <https://doi.org/10.2478/s11686-014-0208-4>
70. Rocka A (2006) Helminths of Antarctic fishes: Life cycle biology, specificity and geographical distribution. *Acta Parasitol* 51:26–35. <https://doi.org/10.2478/s11686-006-0003-y>
71. Campbell RA (1983) Parasitism in the deep sea. In: Rowe G (ed) *The Sea. Deep-sea biology*. Wiley, New York, pp 473–552
72. Walter T, Palm H, Piepiorka S, Rückert S (2002) Parasites of the Antarctic rattail *Macrourus whitsoni* (Regan, 1913) (Macrouridae, Gadiformes). *Polar Biol* 25:633–640. <https://doi.org/10.1007/s00300-002-0407-6>
73. Bray RA, Gibson DI (1990) The Lepocreadiidae (Digenea) of fishes of the North-East Atlantic—Review of the genera *Opechona* Looss, 1907 and *Prodistomum* Linton, 1910. *Syst Parasitol* 15:159–202. <https://doi.org/10.1007/BF00010135>
74. Moser M, Cowen RK (1991) The effects of periodic eutrophication on parasitism and stock identification of *Trematodus bernacchii* (Pisces: Nototheniidae) in McMurdo Sound, Antarctica. *J Parasitol* 77:551–556. <https://doi.org/10.2307/3283158>
75. Gaevskaya AV (1982) The discovering of the trematode metacercariae in mysids of the South Georgia Island. *Nauchnye Doklady Vysshey Shkoly, Biologicheskije Nauki* 8:27–29
76. Palm HW (1999) Ecology of *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) (Nematoda: Anisakidae) from Antarctic waters. *Parasitol Res* 85:638–646. <https://doi.org/10.1007/s004360050608>
77. Rocka A (2004) Nematodes of the Antarctic fishes. *Pol Polar Res* 25:135–152
78. McClelland G (2002) The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review.

- Parasitology 124:183–203. <https://doi.org/10.1017/S0031182002001658>
79. Bartsch A (1985) (in German) Comparative examinations of the parasite infection of *Pleurogramma antarcticum* and *Trematomus scottii* (Pisces: Nototheniidae) from eastern and southern Weddell Sea (Antarctica). Diploma Thesis, University of Bochum
 80. Cherel Y, Koubbi P, Giraldo C, Penot F, Tavernier E, Moteki M, Ozouf-Costaz C, Causse R, Chartier A, Hosie G (2011) Isotopic niches of fishes in coastal, neritic and oceanic waters off Adélie land, Antarctica. *Polar Sci* 5:286–297. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2010.12.004>
 81. La Mesa M, Eastman JT, Vacchi M (2004) The role of notothenioid fish in the food web of the Ross Sea shelf waters: a review. *Polar Biol* 27:321–338. <https://doi.org/10.1007/s00300-004-0599-z>
 82. Burns JM, Trumble SJ, Castellini MA, Testa JW (1998) The diet of Weddell seals in McMurdo Sound, Antarctica as determined from scat collections and stable isotope analysis. *Polar Biol* 19:272–282. <https://doi.org/10.1007/s003000050245>
 83. Daneri GA, Negri A, Coria NR, Negrete J, Libertelli MM, Corbalán A (2018) Fish prey of Weddell seals, *Leptonychotes weddellii*, at Hope Bay, Antarctic Peninsula, during the late summer. *Polar Biol* 41:1027–1031. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2255-z>
 84. Klöser H, Plötz J, Palm H, Bartsch A, Hubold G (1992) Adjustment of anisakid nematode life cycles to the high Antarctic food web as shown by *Contracaecum radiatum* and *C. osculatum* in the Weddell Sea. *Antarct Sci* 4:171–178
 85. Klimpel S, Busch MW, Sutton T, Palm HW (2010) Meso- and bathy-pelagic fish parasites at the Mid-Atlantic Ridge (MAR): low host specificity and restricted parasite diversity. *Deep Sea Res Part I* 57:596–603. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2010.01.002>
 86. Rocka A (2017) Cestodes and nematodes of Antarctic fishes and birds. In: Klimpel S, Kuhn T, Mehlhorn H (eds) Biodiversity and evolution of parasitic life in the Southern Ocean. Springer International Publishing, Cham, pp 77–107
 87. Holloway HL, Spence JA (1980) Ecology of animal parasites in McMurdo Sound, Antarctica. *Comp Physiol Ecol* 5:262–284
 88. Dambach J, Thatje S, Rödder D, Basher Z, Raupach MJ (2012) Effects of late-cenozoic glaciation on habitat availability in Antarctic benthic shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea). *PLoS ONE* 7:e46283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046283>
 89. Zdzitowiecki K, Presler P (2001) Occurrence of Acanthocephala in intermediate hosts, Amphipoda, in Admiralty Bay, South Shetland Islands, Antarctica. *Pol Polar Res* 22:205–212
 90. Münster J, Kochmann J, Grigat J, Klimpel S, Kuhn T (2017) Parasite fauna of the Antarctic dragonfish *Parachaenichthys charcoti* (Perciformes: Bathydraconidae) and closely related Bathydraconidae from the Antarctic Peninsula. *Southern Ocean Parasites Vectors* 10:235. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2176-7>
 91. Zdzitowiecki K (1996) Acanthocephala in fish in the Weddell Sea (Antarctic). *Acta Parasitol* 41:199–203
 92. Aznar FJ, de León GP-P, Raga JA (2006) Status of Corynosoma (Acanthocephala: Polymorphidae) based on anatomical, ecological, and phylogenetic evidence, with the erection of Pseudocorynosoma n. gen. para. *J Parasitol* 92:548–564. <https://doi.org/10.1645/GE-715R.1>
 93. Zdzitowiecki K (1984) Redescription of *Corynosoma hamanni* (Linstow, 1892) and description of *C. pseudohammi* sp. n. (Acanthocephala) from the environs of the South Shetlands (Antarctic). *Acta Parasitologica Polonica* 29:379–393
 94. Laskowski Z, Zdzitowiecki K (2010) Contribution to the knowledge of the infection with Acanthocephala of a predatory Antarctic ice-fish *Chaenocephalus aceratus*. *Pol Polar Res* 31:303–308. <https://doi.org/10.2478/v10183-010-0007-z>
 95. Zdzitowiecki K (1983) Antarctic acanthocephalans of the genus *Metacanthocephalus*. *Acta Parasitologica Polonica* 28:38–52
 96. Zdzitowiecki K, Laskowski Z (2013) New data on the occurrence of Acanthocephala in some fish in Admiralty Bay (South Shetland Islands). *Acta Parasit* 58:547–550. <https://doi.org/10.2478/s11686-013-0175-1>
 97. Zdzitowiecki K, White MG (1992) Acanthocephalan infection of inshore fish in two fjords at South Georgia. *Antarct Sci* 4:197–203. <https://doi.org/10.1017/S0954102092000300>
 98. Palm HW, Caira JN (2008) Host specificity of adult versus larval cestodes of the elasmobranch tapeworm order Trypanorhyncha. *Int J Parasitol* 38:381–388. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.08.011>
 99. Rohde K, Heap M (1998) Latitudinal differences in species and community richness and in community structure of metazoan endo- and ectoparasites of marine teleost fish. *Int J Parasitol* 28:461–474. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00209-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00209-9)
 100. Muñoz G, Rebolledo M (2019) Comparison of the parasite community of two nototheniids, *Notothenia rossii* and *N. coriiceps* (Pisces: Nototheniidae), from King George Island. *Antarctica J Helminthol* 93:732–737. <https://doi.org/10.1017/S0022149X18000858>
 101. Münster J, Kochmann J, Klimpel S, Klapper R, Kuhn T (2016) Parasite fauna of Antarctic *Macrourus whitsoni* (Gadiformes: Macrouridae) in comparison with closely related macrourids. *Parasit Vectors* 9:403. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1688-x>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Erklärung der Autorenanteile und Publikation "Improving species distribution models of zoonotic marine parasites" (II)

Alt KG, Kochmann J, Klimpel S, Cunze S (2019) Improving species distribution models of zoonotic marine parasites. *Scientific Reports* 9:9851. DOI: 10.1038/s41598-019-46127-

6

Anlage 2

Erklärung zu den Autorenanteilen an der Publikation / an dem Manuskript (Titel):

Improving species distribution models of zoonotic marine parasites

Status (*submitted, under review, in revision, accepted*): accepted

Ab *accepted* Name der Zeitschrift: Scientific Reports

Beteiligte Autoren (Namen mit eindeutigen Kürzeln):

Katharina G. Alt (Promovierender), Judith Kochmann (JK), Sven Klimpel (SK), Sarah Cunze (SC)

Was hat der Promovierende bzw. was haben die Koautoren beigetragen?

(1) zu Entwicklung und Planung

Promovierender: 20 %
Co-Autor JK: 15 %
Co-Autor SK: 15 %
Co-Autor SC: 50 %

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

Promovierender: 50 %
Co-Autor SC: 50 %

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

Promovierender: 55 %
Co-Autor SC: 35 %
Co-Autor SK: 10 %

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

Promovierender: 35 %
Co-Autor JK: 15 %
Co-Autor SK: 10 %
Co-Autor SC: 40 %

(5) zum Verfassen des Manuskripts

Promovierender: 60 %
Co-Autor JK: 15 %
Co-Autor SK: 10 %
Co-Autor SC: 25 %

Zustimmende Bestätigungen der oben genannten Angaben:

Datum/Ort

Unterschrift Promovend

Datum/Ort


Unterschrift Betreuer

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Improving species distribution models of zoonotic marine parasites

Katharina G. Alt , Judith Kochmann, Sven Klimpel & Sarah Cunze

Environmental niche modelling is an acclaimed method for estimating species' present or future distributions. However, in marine environments the assembly of representative data from reliable and unbiased occurrences is challenging. Here, we aimed to model the environmental niche and distribution of marine, parasitic nematodes from the *Pseudoterranova decipiens* complex using the software Maxent. The distribution of these potentially zoonotic species is of interest, because they infect the muscle tissue of host species targeted by fisheries. To achieve the best possible model, we used two different approaches. The land distance (LD) model was based on abiotic data, whereas the definitive host distance (DHD) model included species-specific biotic data. To assess whether DHD is a suitable descriptor for *Pseudoterranova* spp., the niches of the parasites and their respective definitive hosts were analysed using ecospat. The performance of LD and DHD was compared based on the variables' contribution to the model. The DHD-model clearly outperformed the LD-model. While the LD-model gave an estimate of the parasites' niches, it only showed the potential distribution. The DHD-model produced an estimate of the species' realised distribution and indicated that biotic variables can help to improve the modelling of data-poor, marine species.

Ecological niche modelling (ENM) is a popular tool to examine the ecological and spatial limitations of species^{1,2}. Thus, the availability of representative occurrence data is crucial for good modelling outcomes³. In times of global change during which species are facing climate shifts and habitat loss, models help identify suitable habitats for species and project potential distributions of species in the future^{4–6}. The motivation of modelling a species' niche can be diverse, from conservation approaches of endangered species^{7–9} to the risk assessments of disease vectors and zoonotic agents^{10–13}.

While niche modelling is widely applied and well established for terrestrial species^{14–17}, aquatic, especially marine organisms pose additional challenges. Data is not only rarer because marine species are hard to monitor, but also the marine environment itself is less well studied, because we can only observe a small fragment of it. Thus, for marine species it may be even more difficult to obtain good and meaningful occurrence data than for terrestrial species¹⁸. As a result, there are much fewer studies using ENM for marine species compared to terrestrial species (e.g.^{19–27}). In particular, there are only few studies focussing on the distribution of marine endoparasites²⁸. Marine endoparasites are harder to observe than other marine organisms, because they are concealed within their host. Their complex life cycles result in a degree of dependency on other organisms. It seems therefore unlikely to describe the niche of a parasite in a meaningful way without taking into account biotic interactions.

Most parasites are only host-specific regarding their definitive host, but not regarding intermediate hosts, which means that intermediate host interactions are less suitable descriptors. If the definitive host is a marine mammal, data acquisition of parasites is problematic, because of the boundaries of non-invasive detection methods. However, including parasite occurrence data from intermediate hosts (especially fishes) and definitive host distribution data separately could improve the ENM of marine parasites.

To evaluate the applicability of this concept, we chose the ascaridoid nematode species complex *Pseudoterranova decipiens* (s.l.). The so-called codworm is a parasite of commercially relevant gadid fish species that can be found in the shelf regions throughout almost all latitudes. Apart from high infection levels in their teleost hosts that lead to a contamination of the fish filet and thus, a decrease in value, *Pseudoterranova* spp. are

Goethe-University, Institute for Ecology, Evolution and Diversity; Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung; Max-von-Laue-Str. 13, D-60438, Frankfurt/Main, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to K.G.A. (email: Katharina.Alt@senckenberg.de)

known as cause of the zoonotic disease Anisakidosis^{29–32}. Hence, knowledge of the distribution of these parasites is of interest to identify fishing areas at risk for a high parasite load in the respective food fish.

Previously described as a single species, *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) has become recognised as a complex of species. The genus now includes species from different regions, *P. azarasi* YAMAGUTI & ARIMA, 1942; n. comb. MATTIUCCI *et al.*, 1998, *P. bulbosa* MATTIUCCI *et al.*, 1998, *P. cattani* GEORGE-NASCIMENTO & URRUTIA, 2000, *P. decipiens* (s.s.) and *P. krabbei* PAGGI *et al.*, 2000^{33–36}. Moreover, *P. decipiens* E has been described as a species candidate from the Southern Ocean^{37,38}. All these species have different geographical distributions (which could suggest different climatic tolerances) and definitive hosts, which means they cannot be modelled together as a species complex.

After a benthic larval stage during which the larvae are attached to bottom substrate the life cycle of the genus *Pseudoterranova* includes three hosts. Like all nematodes of the family Anisakidae, *Pseudoterranova* spp. require a first crustacean host (copepod) and optionally other macroinvertebrates, a second teleost (or squid) host, and a marine mammal as definitive host, more precisely Pinnipedia³⁹. The ecology of seals involves the formation of terrestrial colonies (some species also use pack ice) during the mating season, which are used as haul out sites⁴⁰. In consequence, the concentration of the parasites' eggs should be high in areas where the definitive hosts aggregate^{41–45}. A connection between the presence of pinniped colonies and the codworm burden in fish has been made ever since protective measures following commercial seal hunt led to the recovery of seal populations⁴⁶. This makes definitive host occurrences a potentially well-suited indicator for codworm distribution^{41,46,47}, which can be used in modelling the parasites' ecological niches. A benefit of this approach is that most seals are much better monitored and recorded than other marine mammals that do not have terrestrial haul out sites.

Based on this knowledge we aim at comparing the niches of potentially zoonotic marine parasites from the *Pseudoterranova decipiens* complex with those of their definitive hosts, in both, geographical and ecological space. The overall aim was to reveal whether ecological niche models of marine parasites can benefit from including definitive hosts, thus, better project distributional patterns of marine parasite species than those models including only abiotic variables.

Results

Georeferenced, molecularly identified occurrences of *Pseudoterranova decipiens* (s.s.) (n = 46), *P. bulbosa* (n = 31), *P. cattani* (n = 15), *P. krabbei* (n = 8), *P. azarasi* (n = 5) and *P. decipiens* E (n = 4) were compiled from published literature (Table S1)^{30,32,33,35–37,48–75}. Parasite and host occurrence data were plotted on maps to visualise their distribution (Fig. S1, S2). The results are depicted in Fig. 1.

Species distribution model improvement. The mapped habitat suitability for the six *Pseudoterranova* species, based on the land distance model (LD-model), did not differentiate between the northern and southern hemisphere. The LD-model for *P. decipiens* (s.s.) showed the highest habitat suitability in the temperate regions of the northern hemisphere, increasing towards the coast. Regions with high habitat suitability were in the Baltic Sea and the North Sea. Other modelled habitats were mapped in the North Atlantic, the North Pacific, along the coast of the Gulf of Alaska, the Sea of Okhotsk and in the Sea of Japan. Despite the sampling points being only from the northern hemisphere, modelled habitat suitability was also high around the coast off Patagonia and the Falkland Islands. The modelled habitat suitability of *P. bulbosa* was similar to *P. decipiens* (s.s.) but shifted towards the poles, into colder regions.

Pseudoterranova cattani had an austral distribution with high modelled habitat suitability in South America, especially in coastal regions off Peru, Chile, Argentina and the Rio de la Plata area. In the East Atlantic, the Benguela and the Canary Current region a very high habitat suitability was modelled. Furthermore, a high habitat suitability was found in the North Sea, Chinese Sea and the Atlantic and Pacific coasts off North America.

A high habitat suitability for *P. krabbei* was detected in the North Sea, the North East Atlantic and the North West Atlantic. In the Pacific, high habitat suitability was detected at the coast off Alaska and in the Sea of Japan west off Hokkaido and in the northern Chinese Sea. The suitable habitats in the southern hemisphere were off the Chilean and Argentinean coasts and the waters of the Bass Strait between Australia and Tasmania.

The habitat suitability for *P. azarasi* based on the LD-model was not able to provide any biogeographical information. High habitat suitability was modelled for *P. azarasi* in coastal regions in all geographical latitudes. This was unaffected by other environmental factors.

The modelled habitat suitability for *P. decipiens* E was highest in the polar regions. It covered the Southern Ocean with the habitat suitability increasing towards the land mass. A high habitat suitability was detected east of the Antarctic Peninsula, which is also the area where the samples originated from. In the northern hemisphere, the LD-model predicted a high habitat suitability in the Arctic Sea and the Barents Sea.

The habitat suitability models of the parasites gained accuracy through the introduction of definitive host distance (DHD), as indicated by the increase of area under the curve (AUC) values (Table 1). The AUC-values of the LD-model are > 0.9 for all *Pseudoterranova* species. In the DHD-model, AUC-values significantly increased (p < 0.05, Wilcoxon test). Maxent response curves of DHD showed the same effect for all analysed parasite species: with increasing DHD modelled probability of parasite presence monotonously decreased (Fig. S3).

The DHD-model maps of all *Pseudoterranova* species seem to be more geographically accurate than the maps based on the LD-model, reflecting the observed realised distribution of the parasites (Fig. S1). In particular, the representation in the geographical space is changed, the hemisphere in which the species and its hosts do not occur is not included, despite its apt abiotic conditions. For example, the DHD-model for *P. bulbosa* only includes suitable habitats in the North Atlantic and North Pacific. This corresponds to where the specimens of *P. bulbosa* have actually been sampled (Fig. S1). Furthermore, the DHD-model reduces the habitat suitability projection from the whole North-Russian coast to the Barents Sea.

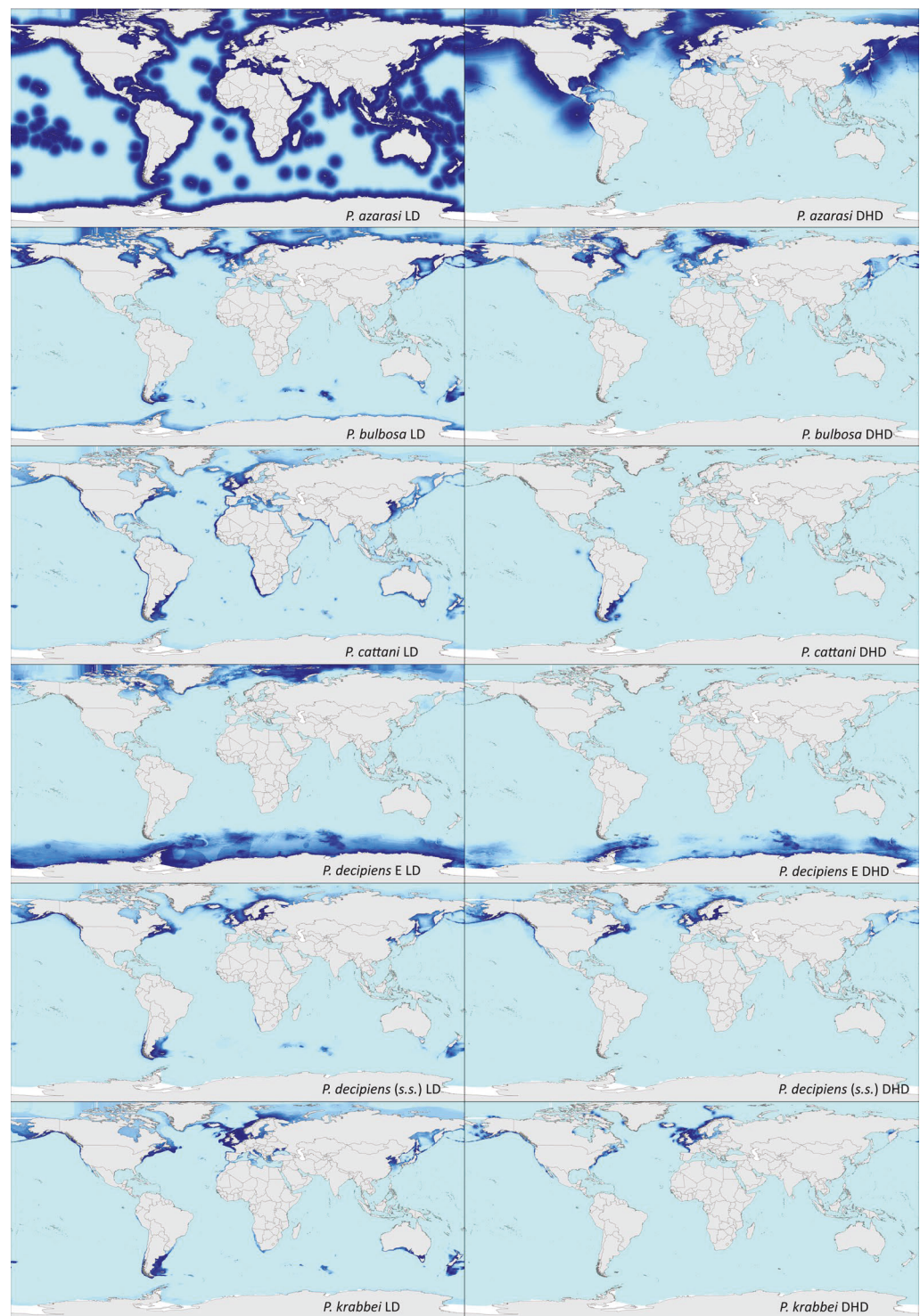


Figure 1. Modelled distribution of *Pseudoterranova* spp. Habitat suitability maps (WGS-84 projection) of *Pseudoterranova azarasi*, *P. bulbosa*, *P. cattani*, *P. decipiens* E, *P. decipiens* (s.s.) and *P. krabbei*, using the LD-model and the DHD-model. The modelled habitat suitability proportionally increases with colour intensity.

The variable contribution of the LD-model was incoherent between the six different *Pseudoterranova* species (Table S2). The DHD-model had a clear pattern, which can be attributed to DHD becoming the most important variable of the model. The Maxent response curves for all modelled parasites show that the habitat suitability monotonously decreased with increasing distance to a definitive host (Fig. S3).

The information of DHD contributed to all modelled species (Table S2), which makes this model superior to the LD-model which lacks this information entirely. This also applies to the species with the fewest occurrences,

Species	n	LD AUC	DHD AUC
<i>P. azarasi</i>	5	0.912	0.950
<i>P. bulbosa</i>	31	0.973	0.985
<i>P. cattani</i>	15	0.991	0.998
<i>P. decipiens</i> E	4	0.984	0.995
<i>P. decipiens</i> (s.s.)	46	0.980	0.987
<i>P. krabbei</i>	8	0.995	0.998

Table 1. Area under the curve (AUC) values for the different modelling approaches. AUC-values of the Maxent LD-model and DHD-model of *Pseudoterranova azarasi*, *P. bulbosa*, *P. cattani*, *P. decipiens* E, *P. decipiens* (s.s.) and *P. krabbei*.

P. decipiens E, which relied almost exclusively on SST in the LD-model. Through the introduction of DHD, all other variables gain contribution (Table S2).

Principal components analysis and niche plots. To compare the niches of the parasites and their respective definitive hosts, a PCA_env was calculated for the *Pseudoterranova* species with most occurrences, *P. bulbosa*, *P. cattani* and *P. decipiens* (s.s.). In this analysis the environmental variables of the LD-model (depth, land distance, mean sea surface temperature, primary production, salinity) were included.

Schoener's D was calculated as a measure of niche overlap. This revealed a high overlap of the niches of *P. bulbosa* and its definitive host *Erignathus barbatus* ($D = 0.543$), but a much lower overlap ($D = 0.018$) with the host *Pusa hispida* (Table S3, Fig. 2).

The niche plots generated in ecospat reveal the proportion of the parasite niche that is covered by the host niche, indicated by niche overlap between the parasite and its host (Fig. 2). Niche unfilling (green) indicates the proportion of the parasite niche that is not explained by the niche of the respective host. The niche of the parasite *Pseudoterranova bulbosa* is entirely covered by the niche of the ringed seal (*Pusa hispida*), resulting in no unfilling. The same applies to *P. cattani* and the South American fur seal (*Arctocephalus australis*). The niche of *P. decipiens* (s.s.) is modelled broader than the niches of the other parasite species. The host with the largest niche overlap is the grey seal (*Halichoerus grypus*), with the lowest unfilling of the parasite niche. The niche plots visualise that the definitive hosts cover different regions of the niche of *P. decipiens* (s.s.), resulting in a full niche cover of the parasite by a combination of its definitive host niches.

Discussion

The approach undertaken here was based on the assumption that reproduction is the most basic requirement to sustain a population. In case of endohelminths, the reproduction depends on the availability of a definitive host, which enables the parasite to mature, mate and release eggs into the environment³⁹. Hence, we regard the presence of definitive hosts as a suitable descriptor to help refine the models of *Pseudoterranova* species. We analysed whether including specific host presence records would improve the species distribution models of the parasites.

The modelling approach in Maxent was based on environmental variables available in the database GMED. The outcome for the different species varied depending on the occurrence sample size and quality. Most inaccuracies occurred for the species *Pseudoterranova azarasi*, which had the fewest and most inconsistent occurrence data, and would normally be considered unfit for modelling. As a result of data deficiency, the occurrences of this parasite could not be linked to all environmental variables in a meaningful way, hence, the model was exclusively based on land distance, with no other differentiation. But even the models of species with more occurrences were geographically inaccurate, because habitats which are out of the range of a species (by distance or continental barriers) were considered as suitable. Even if the model projected a high habitat suitability for a species from the North Atlantic in the southern hemisphere, the requirements of an endoparasite with a complex multi-host life cycle are likely not fulfilled. For non-parasitic species, the prediction of the LD-model might be sufficient, with mobility as the single limiting factor, preventing the species to colonise the modelled habitat³. But even then, biotic interactions and competition for resources might be further limiting factors. Since the life cycles of *Pseudoterranova* spp. are dependent on definitive host availability, potential niches need to include the host, as performed in an approach published by Kuhn *et al.*²⁸. While the LD-model might give reasonable information on the potential distribution of a parasite, the DHD-model shows its realised distribution.

If a model were able to represent the fundamental niche of an organism (sensu Hutchinson⁷⁶), its mapped habitat suitability would represent all potential habitats disregarding constraints by biotic interactions and mobility restrictions^{77–79}. However, identifying the fundamental niche would only be possible under ideal circumstances, as it is combined from an organism's realised response, ecological response and physiological response to its environment^{80,81}. Species distribution models based on distributional data result in a representation of the species' realised niche. To describe the ecological niches of the *Pseudoterranova* species, we need to acknowledge the life cycle of the parasite by using an approach accounting for the species' biotic requirements. Georeferenced samples were taken from intermediate hosts, so these data are not necessarily useful in defining the niche of the hatched, free-living larval stage (which could be argued as the "abiotic" niche of the parasite). Working with occurrences from intermediate host stages is not ideal. However, if the model includes the definitive host data, by using DHD, it considers the paramount factor, for the parasite to reproduce. Hence, the resulting model should be a representation of the species' realised geographical distribution.

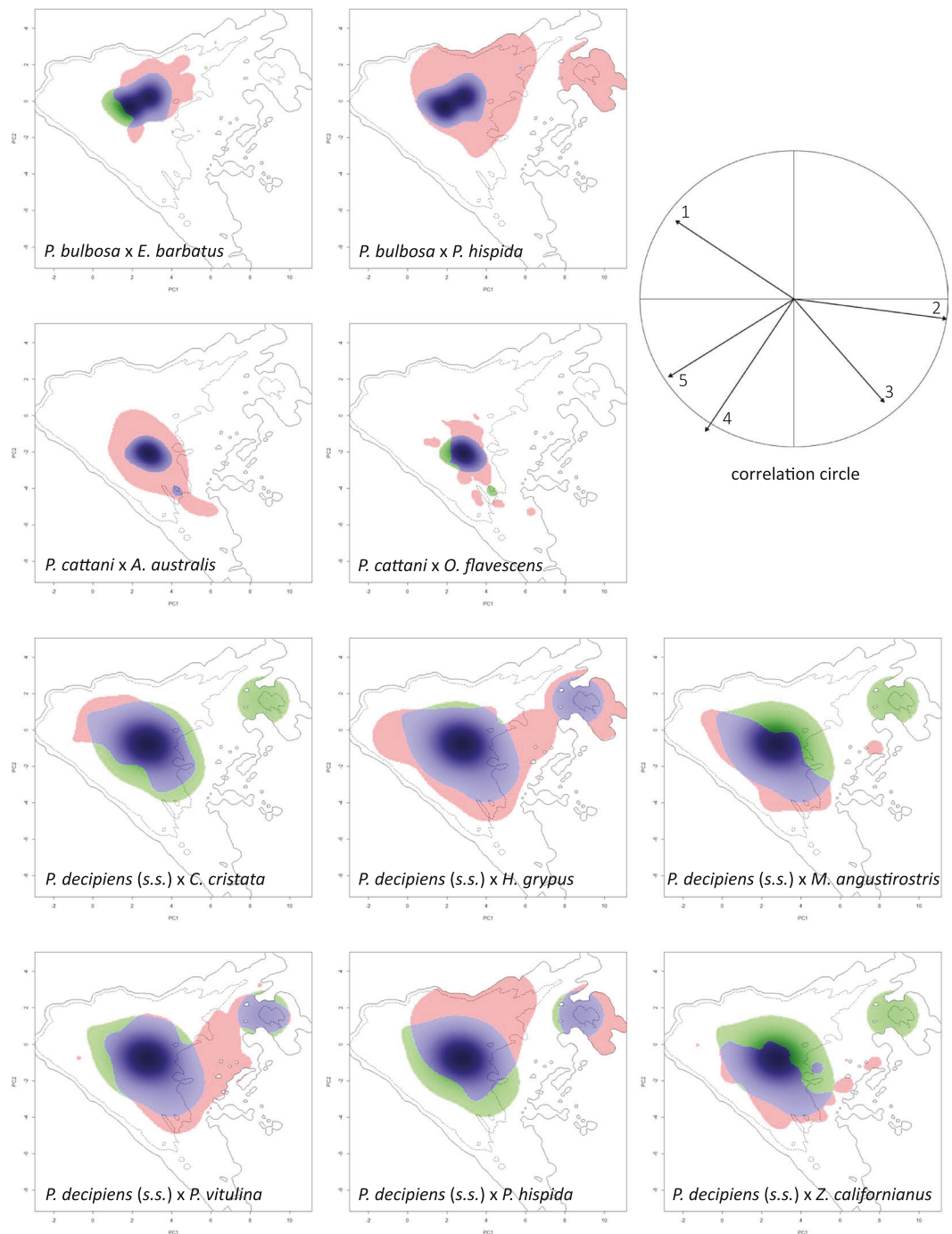


Figure 2. Parasite and definitive host niches in niche space. Niche plots of *Pseudoterranova bulbosa*, *P. cattani* and *P. decipiens* (s.s.) and their respective hosts in niche space, defined through principal components PC1 (x-axis) and PC2 (y-axis). Correlation circle of the variables used to calculate the principal components (axis 1 = 41.64%, axis 2 = 26.3%). Blue = niche overlap, green = parasite/unfilling, red = host/expansion, 1 = LD, 2 = Depth, 3 = Primary Production, 4 = mean Sea Surface Temperature, 5 = Salinity.

The DHD-model considers the circumstance that the presence of host colonies has an impact on the concentration of larvae attached to the sea floor³⁹. A study by McConnell, Marcogliese & Stacey⁸² investigated the sedimentation rate of *Pseudoterranova* spp. eggs. The benthic life cycle of *Pseudoterranova* requires the eggs to reach the seabed, which means their density needs to be higher than sea water. Structural factors like depth (which usually increases with increasing land distance) and currents are crucial factors for the sedimentation rate, while processes like upwelling could be an inhibitor. A high density of eggs and hatched larvae at the sea floor influences the prevalence of the parasite in its invertebrate intermediate host, and thus in the teleost host, where it is noticed because it decreases the commercial value of a fish and its relevance regarding food safety.

Seal hunting depleted the number of seals worldwide to 33 extant species. After hunting was widely abolished, regular monitoring has been conducted within the scope of conservation efforts. As seals are semi-terrestrial, monitoring them is much easier than other marine mammals. Therefore, seals are well monitored and there are many reliable presence records in databases like GBIF. A considerable advantage of the DHD-model is the data foundation, because the definitive hosts are much easier monitored than the parasites. Due to this advantage concerning the definitive host data, this study differs from the approach suggested by Kuhn *et al.*²⁸, who used modelled definitive host habitat suitability as a predictor for the nematode genus *Anisakis*. Compared to pinnipeds, the occurrence data for some long-distance migrating cetaceans tend to be much more biased and are more difficult to acquire in the first place. In our case, the life cycle and ecology of *Pseudoterranova* allows us to use DHD. This approach removes the level of uncertainty created by using modelled host distributions, which might however be inevitable in other studies (e.g.^{27,28}). We chose to favour DHD as a direct variable over modelling definitive host distribution, to reduce geographical misrepresentation and to avoid an additional modelling step, which would create an additional level of uncertainty. Using DHD provides a species-specific descriptor, which adds spatial information to the model. This spatial component may not be relevant to the parasite's ecological requirements, but it is highly relevant for providing a realistic representation of the realised, geographical distribution. Using a modelled definitive host descriptor would not have included this kind of spatial information.

The difference in variable contribution between the LD-model and the DHD-model highlights the explanatory power of the DHD variable in lieu of land distance. While land distance had the highest variable contribution to the models of two species (*P. azarasi* and *P. cattani*), DHD was the most important descriptor of all analysed species except *P. decipiens* E, where it, together with SST, still contributed equally to the model. The quality of a single model cannot be assessed by its AUC-value, because it might be increased by a uniform (small) set of data. However, the AUC-value can be used to compare the effect of new descriptors on the same distributional data⁸³. The increased AUC-values of all species models clearly show that the model was improved by the use of DHD instead of LD.

Due to the parasite specimens originating from intermediate instead of definitive hosts, we needed to show that a definitive host can occur at each parasite's sampling site. If this is the case, there should be a clear overlap between the niches of the parasite and its associated definitive hosts. To evaluate the eligibility of DHD as a descriptor, we examined the niches of the *Pseudoterranova* species and their documented definitive hosts in ecological niche space. We used the R-package *ecospat*⁸⁴, which is based on a principal components analysis (PCA), with the advantage of removing correlations among the predictor variables, creating the most informative descriptors, based on the original variables.

The PCA-based niche analyses, including Schoener's D and niche stability, expansion and unfilling, support the concept of the DHD-model. Despite a lower overlap between parasites and some individual hosts, the parasites' niches are covered completely by the combination of the associated definitive hosts' niches. Host species with a geographical distribution that is much broader than the parasites' could result in expansion. This may be the case for *Pusa hispida* and its parasites *Pseudoterranova bulbosa* and *P. decipiens* (s.s.), or *Arctocephalus australis* and *P. cattani*. Niche unfilling could indicate that the definitive host spectrum of the parasite might not have been exhaustively recorded yet. There may also be other explanations for niche unfilling, e.g. if the parasites were sampled from a migrating intermediate host. The definitive hosts are still the best option to represent the biotic requirements of the *Pseudoterranova* species, because of the parasites' low specificity regarding their intermediate hosts.

Under ideal circumstances, data used for habitat suitability models should be sampled with a study design that results in random, unbiased occurrences⁸⁵. Observations should be independent from each other and the data should represent the niche adequately⁷⁹. Therefore, sampling should not be performed in sink populations and the fitness of the sampled population should be assessed^{12,86}. However, real-life data does not easily fulfil these requirements. Endoparasites do not allow a direct sampling which is non-invasive to the host species. Considering this, sampling from intermediate hosts is not ideal, because it cannot be assumed that the parasite larva retrieved in a fish will reach maturity. However, since the reproductive stages occur in seals, sufficient sampling from the definitive hosts is not an option. All data occurrences used in this study are independent, since they were sampled in different projects. However, they are not unbiased, since most examined host species are commercially relevant and so are the sampling sites. The demerit of the data available for *Pseudoterranova* spp. is that specimens are rarely identified to species level, even though this is the only way to distinguish larval stages from intermediate hosts. Since only few are molecularly identified, the required number of samples is not available for every species. Occurrence data of the species resident in less accessible areas, as the Southern Ocean, are scarce (e.g. all occurrences of *P. decipiens* E were sampled on the route of the German RV Polarstern). Despite these circumstances, we decided to include all species which use seals as definitive hosts in the study, because it is illustrative to compare the LD- and the DHD-model in species with a range of available occurrences. To account for small sample sizes we used Maxent, which has been reported to perform well in this case^{87–90}. We modelled with presence only data, therefore the degree of overprediction cannot be quantified⁹⁰. Galante *et al.*⁹⁰ suggest a combination of model selection and spatial filtering for data-poor species. This approach only works for species whose ecology is well known.

Conclusion

The life cycle of a parasite is tied to its (several) mandatory hosts. The definitive host is indispensable for the completion of a parasites' life cycle. Hence, to a certain degree, the distribution of a parasite is determined by the availability of its definitive host. In consequence, the habitat suitability model for a parasite species can be improved by taking into account definitive host distribution. This was done by replacing land distance (used in the LD-models) by definitive host distance (used in the DHD-model). The LD-model shows the potential distribution of *Pseudoterranova* spp., while the DHD-model gives an estimate of its realised distribution.

By including the variable DHD into the model, the Maxent habitat suitability model more represents the observed occurrence of the parasite species. Habitats for boreal and austral species are only modelled in the hemisphere where their hosts actually occur.

Material and Methods

Maxent approach. Ecological niche modelling is a correlative approach to assess the present or future habitat suitability of a given geographic area for a certain species. The method links occurrence data to the environmental conditions (most often represented by abiotic descriptors such as climate data) of the sampling area and calculates probabilities of a species' presence^{2,5,91}.

The ENM was performed using Maxent, a machine learning algorithm which assumes that among all models, meeting certain constraints, the model with the highest entropy is most suitable to describe the data^{91–93}. Standard settings of Maxent (version 3.3.3) were to calculate linear, quadratic and product features based on Cunze & Tackenberg⁹⁴. In addition, we enhanced the number of iterations in order to ensure convergence. Maxent includes the area under the curve value (AUC-value), which indicates the quality of the model fit. The AUC-value ranges from 0–1 with a value of 0.5 representing a random model⁹⁵. The higher the value the better the specimens are represented by the model. The AUC-values of two models of the same species were compared using the Wilcoxon test.

In order to compile georeferenced reports of *Pseudoterranova* spp., a literature research was conducted (Table S1, Fig. S1). The keyword 'Pseudoterranova' was used in the query on Web of Science and Google Scholar. The identification to species level needed to be validated either through molecular methods (such as direct sequencing, PCR-RFLP, enzyme electrophoresis), or by morphological identification of adult stages from definitive hosts. Occurrences referenced as *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) were not included into the dataset. Spatial autocorrelation was accounted for following the method described in Pearson *et al.*⁸⁸.

The environmental variables used in the model were taken from the global marine environment datasets (GMED). A set of ecologically meaningful factors was chosen to represent the most important factors for the modelling of the parasites and hosts. To avoid overfitting, a correlation analysis of the environmental variables was performed, excluding one variable from a pair of highly intercorrelated variables. In this process, five variables with a Pearson correlation coefficient < 0.51 were chosen: mean sea surface temperature (SST), bottom salinity (Sal), land distance (LD), depth (D) and primary production (PrimProd) with a spatial resolution of 0.083 decimal degrees (5 arc-minutes).

To improve the model consisting solely of abiotic variables (LD-model), definitive host distance (DHD) was included as a biotic predictor, replacing land distance in a new modelling approach (DHD-model). The DHD was created in ESRI ArcGIS by calculating for each gridcell (same spatial resolution as the GMED data) the distance to the nearest gridcell containing at least one definitive host occurrence record. The variable includes the occurrence data of all respective definitive hosts for each *Pseudoterranova* species. The reported definitive host spectrum of the *Pseudoterranova* species was compiled by Mattiucci & Nascetti⁹⁶ (and references therein^{33,48,49,97}) and includes 11 different species (*Arctocephalus australis*, *Cystophora cristata*, *Halichoerus grypus*, *Erignathus barbatus*, *Eumetopias jubatus*, *Leptonychotes weddelli*, *Mirounga angustirostris*, *Otaria flavescens*, *Phoca vitulina*, *Pusa hispida*, *Zalophus californianus*). The host occurrence data (Fig. S2) were retrieved from GBIF.org and Aquamaps.org.

For both models (LD + DHD), the Maxent variable contribution and permutation importance were taken as measures of the relative contributions of the environmental variables to the Maxent models⁹¹. To review whether the presence of hosts is a positive predictor for parasite presence, the one-variable response curves for the DHD variable are shown. Habitat suitability maps were generated using Esri ArcGIS.

Ecospat approach. In order to test our hypothesis that the biotic DHD-variable includes more information than LD, we compared the ecological niches of the parasites and associated definitive hosts. We visualized the species' realized niches based on the PCA_env approach suggested by Broennimann *et al.*⁹⁸ and implemented in the R package "ecospat"⁹⁸. The considered niche space is spanned by the first two principal components of the principal component analysis (PCA) on the five GMED variables used in the abiotic model: mean sea surface temperature (SST), salinity (Sal), land distance (LD), depth (D) and primary production (PrimProd). We calculated Schoener's D^{99,100}, a measure for niche overlap to estimate the extent a parasite's niche is included in its related definitive host's niche, niche unfilling, niche expansion and niche stability¹⁰¹. This comparison was only shown for *Pseudoterranova bulbosa*, *P. cattani*, *P. decipiens* (s.s.), as only for these species a sufficient amount of occurrence data was available. The niches of *P. bulbosa*, *P. cattani* and *P. decipiens* (s.s.) were analysed with reference to their definitive host niches. Here, niche expansion can be interpreted as the parasite's niche proportion that does not overlap with the host niche. Niche unfilling is the proportion of the host's niche that does not overlap with the parasite's niche^{101,102}.

References

- Guisan, A. & Zimmermann, N. E. Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecol. Model.* **135**, 147–186 (2000).
- Guisan, A. & Thuiller, W. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecol. Lett.* **8**, 993–1009 (2005).
- Elith, J. *et al.* Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* **29**, 129–151 (2006).
- Peterson, A. T. *et al.* Future projections for Mexican faunas under global climate change scenarios. *Nature* **416**, 626–629 (2002).
- Pearson, R. G. & Dawson, T. P. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Glob. Ecol. Biogeogr.* **12**, 361–371 (2003).
- Cunze, S., Kochmann, J., Koch, L. K. & Klimpel, S. *Aedes albopictus* and its environmental limits in Europe. *PLOS ONE* **11**, e0162116 (2016).
- Guo, J.-L. *et al.* Conservation strategy for aquatic plants: endangered *Ottelia acuminata* (Hydrocharitaceae) as a case study. *Biodivers. Conserv.* **28**, 1533–1548 (2019).
- Bosso, L. *et al.* Nature protection areas of Europe are insufficient to preserve the threatened beetle *Rosalia alpina* (Coleoptera: Cerambycidae): evidence from species distribution models and conservation gap analysis. *Ecol. Entomol.* **43**, 192–203 (2018).

9. Marx, M. & Quillfeldt, P. Species distribution models of European Turtle Doves in Germany are more reliable with presence only rather than presence absence data. *Sci. Rep.* **8**, 16898 (2018).
10. Tjaden, N. B., Caminade, C., Beierkuhnlein, C. & Thomas, S. M. Mosquito-Borne Diseases: Advances in Modelling Climate-Change Impacts. *Trends Parasitol.* **34**, 227–245 (2018).
11. Acharya, B. K. *et al.* Present and Future of Dengue Fever in Nepal: Mapping Climatic Suitability by Ecological Niche Model. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**, 187 (2018).
12. Cunze, S. *et al.* Spatial and temporal patterns of human Puumala virus (PUUV) infections in Germany. *PeerJ* **6**, e4255 (2018).
13. Koch, L. K., Kochmann, J., Klimpel, S. & Cunze, S. Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe. *Sci. Rep.* **7**, 13325 (2017).
14. Kearney, M. R., Munns, S. L., Moore, D., Malishev, M. & Bull, C. M. Field tests of a general ectotherm niche model show how water can limit lizard activity and distribution. *Ecol. Monogr.* **88**, 672–693 (2018).
15. Su, J. *et al.* Decreasing brown bear (*Ursus arctos*) habitat due to climate change in Central Asia and the Asian Highlands. *Ecol. Evol.* **8**, 11887–11899 (2018).
16. Smeraldo, S. *et al.* Ignoring seasonal changes in the ecological niche of non-migratory species may lead to biases in potential distribution models: lessons from bats. *Biodivers. Conserv.* **27**, 2425–2441 (2018).
17. Kabir, M. *et al.* Habitat suitability and movement corridors of grey wolf (*Canis lupus*) in Northern Pakistan. *PLOS ONE* **12**, e0187027 (2017).
18. Wiley, E. O., McNyset, K. M., Townsend Peterson, A., Richard Robins, C. & Stewart, A. M. Niche modeling and geographic range predictions in the marine environment using a machine-learning algorithm. *Oceanography* **16**, 120–127 (2003).
19. Kaschner, K., Watson, R., Trites, A. W. & Pauly, D. Mapping world-wide distributions of marine mammal species using a relative environmental suitability (RES) model. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **316**, 285–310 (2006).
20. MacLeod, C. D., Mandleberg, L., Schweder, C., Bannon, S. M. & Pierce, G. J. A comparison of approaches for modelling the occurrence of marine animals. In *Essential Fish Habitat Mapping in the Mediterranean* (Valavanis, V. D. ed.) 21–32, https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9141-4_3 (Springer Netherlands, 2008).
21. Maxwell, D. L., Stelzenmüller, V., Eastwood, P. D. & Rogers, S. I. Modelling the spatial distribution of plaice (*Pleuronectes platessa*), sole (*Solea solea*) and thornback ray (*Raja clavata*) in UK waters for marine management and planning. *J. Sea Res.* **61**, 258–267 (2009).
22. Morissette, L., Kaschner, K. & Gerber, L. R. Ecosystem models clarify the trophic role of whales off Northwest Africa. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **404**, 289–302 (2010).
23. Sundblad, G., Bergström, U. & Sandström, A. Ecological coherence of marine protected area networks: a spatial assessment using species distribution models. *J. Appl. Ecol.* **48**, 112–120 (2011).
24. Reiss, H., Cunze, S., König, K., Neumann, H. & Kröncke, I. Species distribution modelling of marine benthos: a North Sea case study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **442**, 71–86 (2011).
25. Reiss, H. *et al.* Benthos distribution modelling and its relevance for marine ecosystem management. *ICES J. Mar. Sci.* **72**, 297–315 (2015).
26. Fernandes, J. A. *et al.* Modelling the effects of climate change on the distribution and production of marine fishes: Accounting for trophic interactions in a dynamic bioclimate envelope model. *Glob. Change Biol.* **19**, 2596–2607 (2013).
27. Gherghel, I., Brischoux, F. & Papeş, M. Using biotic interactions in broad-scale estimates of species' distributions. *J. Biogeogr.* **45**, 2216–2225 (2018).
28. Kuhn, T., Cunze, S., Kochmann, J. & Klimpel, S. Environmental variables and definitive host distribution: a habitat suitability modelling for endohelminth parasites in the marine realm. *Sci. Rep.* **6**, 30246 (2016).
29. Hochberg, N. S. & Hamer, D. H. Anisakidosis: Perils of the deep. *Clin. Infect. Dis.* **51**, 806–812 (2010).
30. Arizono, N., Miura, T., Yamada, M., Tegoshi, T. & Onishi, K. Human infection with *Pseudoterranova azarasi* roundworm. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 555–556 (2011).
31. Torres, P., Jercic, M. I., Weitz, J. C., Dobrew, E. K. & Mercado, R. A. Human Pseudoterranovosis, an emerging infection in Chile. *J. Parasitol.* **93**, 440–443 (2007).
32. Weitzel, T. *et al.* Human infections with *Pseudoterranova cattani* nematodes, Chile. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1874–1875 (2015).
33. Mattiucci, S. *et al.* Allozyme and morphological identification of shape *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). *Syst. Parasitol.* **40**, 81–92 (1998).
34. Yamaguti, S. & Arima, S. *Porrocaecum azarasi* n.sp. (Nematoda) from the Japanese seal. *Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc.* **17**, 113–116 (1942).
35. George-Nascimento, M. & Urrutia, X. *Pseudoterranova cattani* sp. nov. (Ascaridoidea: Anisakidae), un parásito del lobo marino común *Otaria byronia* De Blainville en Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **73**, 93–98 (2000).
36. Paggi, L. *et al.* *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda, Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. *Syst. Parasitol.* **45**, 185–197 (2000).
37. Bullini, L. *et al.* Genetic and ecological research on anisakid endoparasites of fish and marine mammals in the Antarctic and Arctic-Boreal regions. in *Antarctic Communities: Species, Structure and Survival* (Battaglia, B., Valencia, J. & Walton, D. W. H. eds) 39–44 (Cambridge University Press, 1997).
38. Palm, H. W. Ecology of *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) (Nematoda: Anisakidae) from Antarctic waters. *Parasitol. Res.* **85**, 638–646 (1999).
39. McClelland, G. The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. *Parasitology* **124**, 183–203 (2002).
40. Atkinson, S. Reproductive biology of seals. *Rev. Reprod.* **2**, 175–194 (1997).
41. Aspholm, P. E., Ugland, K. I., Jødestøl, K. A. & Berland, B. Sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infection in common seals (*Phoca vitulina*) and potential intermediate fish hosts from the outer Oslofjord. *Int. J. Parasitol.* **25**, 367–373 (1995).
42. Olafsdottir, D. & Hauksson, E. Anisakid nematodes in the common seal (*Phoca vitulina* L.) in Icelandic waters. *Sarsia* **83**, 309–316 (1998).
43. Johansen, C. E., Lydersen, C., Aspholm, P. E., Haug, T. & Kovacs, K. M. Helminth parasites in ringed seals (*Pusa hispida*) from Svalbard, Norway with special emphasis on nematodes: Variation with age, sex, diet, and location of host. *J. Parasitol.* **96**, 946–953 (2010).
44. Hauksson, E. The prevalence, abundance, and density of *Pseudoterranova* sp. (p) larvae in the flesh of cod (*Gadus morhua*) relative to proximity of grey seal (*Halichoerus grypus*) colonies on the coast off Drangar, northwest Iceland. *J. Mar. Biol.* 1–8, <https://doi.org/10.1155/2011/235832> (2011).
45. Lunneryd, S.-G., Boström, M. K. & Aspholm, P. E. Sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infection in grey seals (*Halichoerus grypus*), cod (*Gadus morhua*) and shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) in the Baltic Sea. *Parasitol. Res.* **114**, 257–264 (2015).
46. Jensen, T. & Idås, K. Infection with *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) larvae in cod (*Gadus morhua*) relative to proximity of seal colonies. *Sarsia* **76**, 227–230 (1992).
47. Des Clers, S. & Andersen, K. Sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) transmission to fish trawled from Hvaler, Oslofjord, Norway. *J. Fish Biol.* **46**, 8–17 (1995).

48. Paggi, L. *et al.* Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the North Atlantic and Norwegian and Barents Seas. *Int. J. Parasitol.* **21**, 195–212 (1991).
49. Brattey, J. & Stenson, G. B. Host specificity and abundance of parasitic nematodes (Ascaridoidea) from the stomachs of five phocid species from Newfoundland and Labrador. *Can. J. Zool.* **71**, 2156–2166 (1993).
50. Ferrantelli, V. *et al.* Anisakid nematodes as possible markers to trace fish products. *Ital. J. Food Saf.* **4** (2015).
51. Bilska-Zajac, E. *et al.* High prevalence of Anisakidae larvae in marketed frozen fillets of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Food Control* **68**, 216–219 (2016).
52. Klapper, R., Kochmann, J., O'Hara, R. B., Karl, H. & Kuhn, T. Parasites as biological tags for stock discrimination of beaked redfish (*Sebastes mentella*): Parasite infra-communities vs. limited resolution of cytochrome markers. *PLOS ONE* **11**, e0153964 (2016).
53. Zuo, S. *et al.* Host size-dependent anisakid infection in Baltic cod *Gadus morhua* associated with differential food preferences. *Dis. Aquat. Organ.* **120**, 69–75 (2016).
54. Alarcos, A. J., Pereira, A. N., Taborda, N. L., Luque, J. L. & Timi, J. T. Parasitological evidence of stocks of *Paralichthys isosceles* (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) at small and large geographical scales in South American Atlantic coasts. *Fish. Res.* **173**, 221–228 (2016).
55. Najda, K. *et al.* Anisakidae in beluga whales *Delphinapterus leucas* from Hudson Bay and Hudson Strait. *Dis. Aquat. Organ.* **115**, 9–14 (2015).
56. Liu, S.-S., Liu, G.-H., Zhu, X.-Q. & Weng, Y.-B. The complete mitochondrial genome of *Pseudoterranova azarasi* and comparative analysis with other anisakid nematodes. *Infect. Genet. Evol.* **33**, 293–298 (2015).
57. Karpiej, K., Simard, M., Pufall, E. & Rokicki, J. Anisakids (Nematoda: Anisakidae) from ringed seal, *Pusa hispida*, and bearded seal, *Erigonathus barbatus* (Mammalia: Pinnipedia) from Nunavut region. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **94**, 1237–1241 (2014).
58. Mehrdana, F. *et al.* Occurrence of zoonotic nematodes *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatum* and *Anisakis simplex* in cod (*Gadus morhua*) from the Baltic Sea. *Vet. Parasitol.* **205**, 581–587 (2014).
59. Skrzypczak, M., Rokicki, J., Pawliczka, I., Najda, K. & Dzido, J. Anisakids of seals found on the southern coast of Baltic Sea. *Acta Parasitol.* **59**, 165–172 (2014).
60. Timi, J. T. *et al.* Molecular identification, morphological characterization and new insights into the ecology of larval *Pseudoterranova cattani* in fishes from the Argentine coast with its differentiation from the Antarctic species, *P. decipiens* sp. E (Nematoda: Anisakidae). *Vet. Parasitol.* **199**, 59–72 (2014).
61. Rengifo-Herrera, C. *et al.* Helminth parasites found in faecal samples of phocids from the Antarctic Peninsula. *Polar Biol.* **37**, 685–695 (2014).
62. Karpiej, K., Dzido, J., Rokicki, J. & Kijewska, A. Anisakid nematodes of Greenland halibut *Reinhardtius hippoglossoides* from the Barents Sea. *J. Parasitol.* **99**, 650–654 (2013).
63. Hernández-Orts, J. S. *et al.* Description, microhabitat selection and infection patterns of sealworm larvae (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda: Ascaridoidea) in fishes from Patagonia, Argentina. *Parasit. Vectors* **6**, 252 (2013).
64. Hernández-Orts, J. S. *et al.* Intestinal helminth fauna of the South American sea lion *Otaria flavescens* and fur seal *Arctocephalus australis* from northern Patagonia, Argentina. *Journal of Helminthology* Available at: /core/journals/journal-of-helminthology/article/intestinal-helminth-fauna-of-the-south-american-sea-lion-otaria-flavescens-and-fur-seal-arctocephalus-australis-from-northern-patagonia-argentina/528A883C751D308F4850F8AA5C6393D9. (Accessed: 10th November 2016) (2013).
65. Kuhn, T., Benninghoff, T., Karl, H., Landry, T. & Klimpel, S. Sealworm *Pseudoterranova decipiens* s.s. infection of European smelt *Osmerus eperlanus* in German coastal waters: ecological implications. *Dis. Aquat. Organ.* **102**, 217–224 (2013).
66. Buchmann, K. & Kania, P. Emerging *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) problems in Baltic cod, *Gadus morhua* L., associated with grey seal colonization of spawning grounds. *J. Fish Dis.* **35**, 861–866 (2012).
67. Kellermanns, E., Klimpel, S. & Palm, H. W. Molecular identification of ascaridoid nematodes from the deep-sea onion-eye grenadier (*Macrourus berglax*) from the East Greenland Sea. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* **54**, 2194–2202 (2007).
68. Nadler, S. A. *et al.* Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova* and *Contracaecum* from Northern Pacific marine mammals. *J. Parasitol.* **91**, 1413–1429 (2005).
69. George-Nascimento, M. & Llanos, A. Micro-evolutionary implications of allozymic and morphometric variations in sealworms *Pseudoterranova* sp. (Ascaridoidea: Anisakidae) among sympatric hosts from the Southeastern Pacific Ocean. *Int. J. Parasitol.* **25**, 1163–1171 (1995).
70. Zhu, X. Q. *et al.* SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Parasitology* **124**, 615–623 (2002).
71. Brattey, J. & Davidson, W. S. Genetic variation within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Ascaridoidea) from Canadian Atlantic marine fishes and seals: characterization by RFLP analysis of genomic DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53**, 333–341 (1996).
72. Bristow, G. A. & Berland, B. On the ecology and distribution of *Pseudoterranova decipiens* C (Nematoda: Anisakidae) in an intermediate host, *Hippoglossoides platessoides*, in northern Norwegian waters. *Int. J. Parasitol.* **22**, 203–208 (1992).
73. Paggi, L. *et al.* Molecular genetics in anisakid nematodes from the Pacific Boreal Region. in *Host Response to International Parasitic Zoonoses* (Ishikura, H., Aikawa, M., Itakura, H. & Kikuchi, K. eds) 83–107 (Springer Japan, 1998).
74. Jacobus, K. *et al.* Identification of respiratory and gastrointestinal parasites of three species of pinnipeds (*Arctocephalus australis*, *Arctocephalus gazella*, and *Otaria flavescens*) in Southern Brazil. *J. Zoo Wildl. Med.* **47**, 132–140 (2016).
75. Münster, J., Kochmann, J., Klimpel, S., Klapper, R. & Kuhn, T. Parasite fauna of Antarctic *Macrourus whitsoni* (Gadiformes: Macrouridae) in comparison with closely related macrourids. *Parasit. Vectors* **9**, 403 (2016).
76. Hutchinson, G. E. Concluding remarks. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **22**, 415–417 (1957).
77. Clark, J. S. *et al.* Resolving the biodiversity paradox. *Ecol. Lett.* **10**, 647–659 (2007).
78. Barve, N. *et al.* The crucial role of the accessible area in ecological niche modeling and species distribution modeling. *Ecol. Model.* **222**, 1810–1819 (2011).
79. Guisan, A., Thuiller, W. & Zimmermann, N. E. *Habitat Suitability And Distribution Models: With Applications in R*. (Cambridge University Press, 2017).
80. Austin, M. P. Community theory and competition in Vegetation. in *Perspectives On Plant Competition* (Grace, J. B. & Tilman, D. eds) 215–238 (Academic Press, Inc., 1990).
81. Austin, M. P. & Gaywood, M. J. Current problems of environmental gradients and species response curves in relation to continuum theory. *J. Veg. Sci.* **5**, 473–482 (1994).
82. McConnell, C. J., Marcogliese, D. J. & Stacey, M. W. Settling rate and dispersal of sealworm eggs (Nematoda) determined using a revised protocol for myxozoan spores. *J. Parasitol.* **83**, 203–206 (1997).
83. Lobo, J. M., Jiménez-Valverde, A. & Real, R. AUC: a misleading measure of the performance of predictive distribution models. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **17**, 145–151 (2008).
84. Di Cola, V. *et al.* Ecospat: an R package to support spatial analyses and modeling of species niches and distributions. *Ecography* **40**, 774–787 (2017).
85. Graham, C. H., Ferrier, S., Huettman, F., Moritz, C. & Peterson, A. T. New developments in museum-based informatics and applications in biodiversity analysis. *Trends Ecol. Evol.* **19**, 497–503 (2004).
86. Pulliam, H. R. On the relationship between niche and distribution. *Ecol. Lett.* **3**, 349–361 (2000).
87. Hernandez, P. A., Graham, C. H., Master, L. L. & Albert, D. L. The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography* **29**, 773–785 (2006).

88. Pearson, R. G., Raxworthy, C. J., Nakamura, M. & Peterson, A. T. Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *J. Biogeogr.* **34**, 102–117 (2007).
89. Thibaud, E., Petitpierre, B., Broennimann, O., Davison, A. C. & Guisan, A. Measuring the relative effect of factors affecting species distribution model predictions. *Methods Ecol. Evol.* **5**, 947–955 (2014).
90. Galante, P. J. *et al.* The challenge of modeling niches and distributions for data-poor species: a comprehensive approach to model complexity. *Ecography* **41**, 726–736 (2018).
91. Elith, J. *et al.* A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Divers. Distrib.* **17**, 43–57 (2011).
92. Phillips, S. J., Anderson, R. P. & Schapire, R. E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol. Model.* **190**, 231–259 (2006).
93. Phillips, S. J., Anderson, R. P., Dudík, M., Schapire, R. E. & Blair, M. E. Opening the black box: an open-source release of Maxent. *Ecography* **40**, 887–893 (2017).
94. Cunze, S. & Tackenberg, O. Decomposition of the maximum entropy niche function – A step beyond modelling species distribution. *Environ. Model. Softw.* **72**, 250–260 (2015).
95. Myerson, J., Green, L. & Warusawitharana, M. Area under the curve as a measure of discounting. *J. Exp. Anal. Behav.* **76**, 235–243 (2001).
96. Mattiucci, S. & Nascetti, G. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. in *Advances In Parasitology* (Rollinson, D. & Hay, S. I. eds) **66**, 47–148 (Academic Press, 2008).
97. Paggi, L. & Bullini, L. Molecular taxonomy in anisakids. *Bull. Scand. Soc. Parasitol.* **4**, 25–39 (1994).
98. Broennimann, O. *et al.* Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **21**, 481–497 (2012).
99. Schoener, T. W. The anolis lizards of Bimini: Resource partitioning in a complex fauna. *Ecology* **49**, 704–726 (1968).
100. Warren, D. L., Glor, R. E. & Turelli, M. Environmental niche equivalency versus conservatism: Quantitative approaches to niche evolution. *Evolution* **62**, 2868–2883 (2008).
101. Guisan, A., Petitpierre, B., Broennimann, O., Daehler, C. & Kueffer, C. Unifying niche shift studies: insights from biological invasions. *Trends Ecol. Evol.* **29**, 260–269 (2014).
102. Petitpierre, B. *et al.* Climatic niche shifts are rare among terrestrial plant invaders. *Science* **335**, 1344–1348 (2012).

Acknowledgements

We thank Maximilian Dedo Lübben for his contribution to the literature research of georeferenced parasite occurrences.

Author Contributions

K.G.A., J.K., S.K. and S.C. conceived of the study and wrote the manuscript. K.G.A. carried out the analysis and created the figures. J.K. revised the manuscript. S.C. participated in the data analysis. All authors gave final approval for publication and agree to be held accountable for the work performed therein.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46127-6>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Erklärung der Autorenanteile und Publikation "Gene expression and allergenic potential of *Pseudoterranova bulbosa* L3 from different infection sites in North Atlantic cod (*Gadus morhua*)" (III)

Alt KG, Feldmeyer B, Kochmann J, Klimpel S (2022) Gene expression and allergenic potential of *Pseudoterranova bulbosa* L3 from different infection sites in North Atlantic cod (*Gadus morhua*). Journal of Fish Diseases JFD13630. DOI: 10.1111/jfd.1363

Anlage 3

Erklärung zu den Autorenanteilen an der Publikation / an dem Manuskript (Titel):

Gene expression and allergenic potential of *Pseudoterranova bulbosa* L3 from different infection sites in North Atlantic cod (*Gadus morhua*)

Status (*submitted, under review, in revision, accepted*): accepted

Ab *accepted* Name der Zeitschrift: Journal of Fish Diseases

Beteiligte Autoren (Namen mit eindeutigen Kürzeln):

Katharina G. Alt (Promovierender), Barbara Feldmeyer (BF), Judith Kochmann (JK), Sven Klimpel (SK)

Was hat der Promovierende bzw. was haben die Koautoren beigetragen?

(1) zu Entwicklung und Planung

Promovierender: 40 %
Co-Autor BF: 30 %
Co-Autor JK: 20 %
Co-Autor SK: 10 %

(2) zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und Experimente

Promovierender: 70 %
Co-Autor BF: 30 %

(3) zur Erstellung der Datensammlung und Abbildungen

Promovierender: 75 %
Co-Autor BF: 25 %

(4) zur Analyse und Interpretation der Daten

Promovierender: 60 %
Co-Autor BF: 25 %
Co-Autor JK: 15 %

(5) zum Verfassen des Manuskripts

Promovierender: 60 %
Co-Autor BF: 15 %
Co-Autor JK: 15 %
Co-Autor SK: 10 %

Zustimmende Bestätigungen der oben genannten Angaben:

Datum/Ort

Unterschrift Promovend

Datum/Ort

Unterschrift Betreuer

RESEARCH ARTICLE

Gene expression and allergenic potential of *Pseudoterranova bulbosa* L3 from different infection sites in North Atlantic cod (*Gadus morhua*)

Katharina G. Alt¹  | Barbara Feldmeyer²  | Judith Kochmann² | Sven Klimpel^{1,2,3}

¹Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Goethe University, Frankfurt/Main, Germany

²Senckenberg Biodiversity and Climate Research Centre, Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung, Frankfurt/Main, Germany

³LOEWE Centre for Translational Biodiversity Genomics (LOEWE TBG), Frankfurt/Main, Germany

Correspondence

Katharina G. Alt, Institute for Ecology, Evolution and Diversity, Goethe University, Frankfurt/Main D-60438, Germany.
Email: alt@bio.uni-frankfurt.de

Funding information

The present study is a result of the Centre for Translational Biodiversity Genomics (LOEWE-TBG) and was supported through the program LOEWE-Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz of Hesse's Ministry of Higher Education, Research and the Arts

Abstract

The recent advances in molecular methods and data processing have facilitated research on anisakid nematodes. While most research efforts were made regarding the genus *Anisakis*, since this genus is held responsible for the majority of reported clinical signs, there is still a demand for data on the genus *Pseudoterranova*. Several case studies of severe invasive anisakidosis affecting various organs caused by species of the *P. decipiens* complex have been described. To better understand the way these parasites might infest their fish host, we examined whether parasite location within the fish host affects gene expression. A de novo assembly of the transcriptome of *Pseudoterranova bulbosa*, isolated from North Atlantic cod, was analysed for patterns of differential gene expression between samples taken from liver and viscera. We additionally searched for homologs to known nematode allergens, to give a first estimate of the potential allergenicity of *P. bulbosa*. There was a subtle difference in the gene expression of samples taken from liver and viscera. Seventy genes were differentially expressed, 32 genes were upregulated in parasites isolated from liver and 38 genes were upregulated in parasites from viscera. Homologs of five nematode allergens were identified among the genes expressed by *P. bulbosa*. Our transcriptome of *P. bulbosa* will be a valuable resource for further meta-analyses and resequencing projects.

KEYWORDS

Anisakidae, differentially expressed genes, human pathogenic Nematoda, seafood allergy, transcriptome

1 | INTRODUCTION

The occurrence of zoonotic nematodes of the family Anisakidae in food fish has gained awareness during the 1990s (Bouree et al., 1995; Hochberg & Hamer, 2010), and not only provoked a high research interest but also the establishment of food safety measures. While past studies on human-pathogenic anisakids mainly focused on

molecular species identification (Bullini et al., 1997; D'Amelio et al., 2000; Mattiucci et al., 1998, 2001, 2002, 2005, 2009, 2014, 2016; Nascetti et al., 1986, 1993; Paggi et al., 1991, 2000; Paggi & Bullini, 1994; Santoro et al., 2010; Timi et al., 2014; Umehara et al., 2008; Zhu et al., 2002), the recent advances of sequencing methods and computing power have made molecular studies more affordable and have opened up new perspectives for the research

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2022 The Authors. *Journal of Fish Diseases* published by John Wiley & Sons Ltd.

on parasites, including genomic, proteomic and transcriptomic studies (Baird et al., 2016; Bušelić et al., 2018; Cavallero et al., 2018, 2020; Consortium International Helminth Genomes, 2017; D'Amelio et al., 2020; Fæste et al., 2014; Kim et al., 2018; Kochanowski et al., 2019, 2020; Nam et al., 2020).

Anisakidosis is a collective term for different clinical pictures caused by marine Nematoda from the family Anisakidae (Hochberg & Hamer, 2010). It includes signs caused by the tissue invasion behaviour of the worms causing lesions in the invaded tissues and allergic signs caused by parasitic antigens present in the family Anisakidae (Hochberg & Hamer, 2010). Most cases of Anisakidosis are attributed to the eponymous genus *Anisakis*, but morphological or molecular identification methods are rarely applied (Rahmati et al., 2020). Clinical signs have been linked to *A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* spp. infections (Buchmann & Mehrdana, 2016; Rahmati et al., 2020; Shamsi & Sheorey, 2018). Medical case studies of *Pseudoterranova* infections show their pathogenic potential and relevance (Arcos et al., 2014; Arizono et al., 2011; Brunet et al., 2017; Cavallero et al., 2016; Llorens et al., 2018; Menghi et al., 2020; Mercado et al., 1997, 2001; Mitsuboshi et al., 2017; Murata et al., 2018; Nordholm et al., 2020; Pinel et al., 1996; Ramanan et al., 2013; Sánchez-Alonso et al., 2020; Suzuki et al., 2021; Timi et al., 2014; Torres et al., 2007; Weitzel et al., 2015).

The migrating behaviour of Anisakidae within the fish host leads to infections of muscle tissue and has therefore become a major concern for seafood safety. The phenomenon of migrating from common infection sites within the body cavity (e.g., liver and viscera) into muscle tissue has mostly been observed after the host's death, in positive relation to storage temperature and duration (Cattan & Carvajal, 1984; Cipriani et al., 2016; Šimat et al., 2015; Smith & Wootten, 1975). Processing and gutting fish promptly after catching has proven to be an effective prevention of heavy infestation of fish fillets with anisakid nematodes (Klapper et al., 2015). Food safety institutions impose visual inspections and requirements for storage (deep freezing at -20°C for 7 days, freezing at -35°C until solid and subsequently store either at -35°C for 15 h or at -20°C for 24 h) and preparation (cooking for at least 1 min at 60°C) to prevent transmission of live larvae to humans when consuming fishery products (FDA, 2021).

The understanding of the pathogenicity of anisakid nematodes was facilitated by the published genome of *Anisakis simplex* s.s. (Consortium International Helminth Genomes, 2017) and transcriptomes of *A. simplex* s.s. (Baird et al., 2016), *A. pegreffii* (Nam et al., 2020) and their hybrids (Cavallero et al., 2018), which enabled resequencing projects and meta-analyses. However, there is still a demand for data on other pathogenic marine nematodes relevant for food-safety.

The drivers for parasite migration and distribution within their host are still under debate. Hypotheses discussed in the literature are physical proximity of organs or tissues adjacent to the stomach (Quiazon et al., 2011; Strømnes & Andersen, 1998;

Sukhdeo & Sukhdeo, 1994; Young, 1972), nutrient uptake (Strømnes & Andersen, 2003), evasion of the host's immune system (Buchmann, 2012) and beneficial properties, e.g., lipid tissue (Strømnes, 2014). Our study set out to assess whether and how parasite larval gene expression differs between infection sites within their intermediate host. We observed a distribution of *Pseudoterranova bulbosa* in different microhabitats, liver and viscera, within the body cavity of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) caught off Greenland. Since aggregations of anisakid larvae have often been observed in the liver of fish hosts (Klapper et al., 2018; Muñoz-Caro et al., 2022; Nadolna & Podolska, 2014; Najda et al., 2018; Severin et al., 2020), we hypothesized that this effect could become visible in a differential gene expression analysis, giving insight into the activities (e.g., feeding on blood or tissue in the liver) of anisakid L3 within their paratenic fish host.

Trace amounts of allergens can represent a health hazard to sensitized patients. Currently, 19 nematode allergens are known (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database; Pomés et al., 2018), which are potentially cross-reactive with other allergens and have known homologs in other nematodes and invertebrates. Therefore, we screened the *P. bulbosa* transcriptome to assess whether homologs of these allergens were expressed.

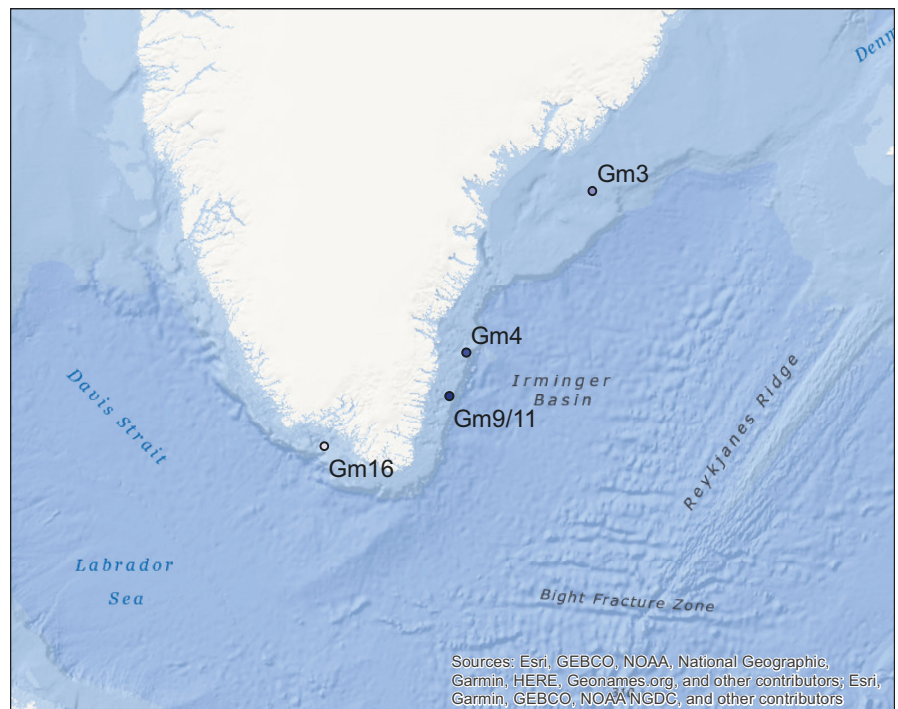
2 | MATERIAL AND METHODS

In this study, we analysed the transcriptomes of *Pseudoterranova bulbosa* samples taken from different infection sites (liver and viscera) in their intermediate fish host, *Gadus morhua*. The transcriptomes were screened for the expression of anisakid allergens to study their potential release into fishery products for human consumption.

2.1 | Sampling

Parasite samples ($n = 54$) were taken during the 341st expedition of the German fishery research vessel Walther Herwig III in October 2019 during a bottom-fish survey off Greenland (Figure 1; Table S1; Table S2). Live *Pseudoterranova* sp. were isolated from twelve Atlantic cod (*Gadus morhua*) individuals, with coincident infections of liver and viscera. Host tissue and cyst tissue were removed in a petri dish with autoclaved 0.9% saline solution, using tweezers. The parasite individuals were washed in fresh saline solution. A sample for molecular barcoding was taken at the apical end of the worm, measuring approximately 1/5 of the parasite's length. Tweezers and scissors were cleaned between each sample. Barcoding samples were stored in individual reaction tubes with 99% ethanol. To preserve RNA and inhibit RNase activity, samples were treated with RNeasy Lysis Buffer (Thermo Fisher Scientific) or TRIreagent (Sigma-Aldrich) (Table S1) according to the manufacturer's protocol and stored at -20°C during the expedition and subsequently at -80°C . The choice of RNA stabilizing media was arbitrary.

FIGURE 1 Sampling sites of *P. bulbosa* from their intermediate host *Gadus morhua* off Greenland coast. Sampling point and host identifier (Gm3, Gm4, Gm9, Gm11 and Gm16). Figure created with Esri ArcGIS



2.2 | Sample selection

Parasite species were identified with DNA-barcoding of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) marker (COLf 5'-CTACTACTAAGAATTTGCGT-3', COLr 5'-AATCCAAACTACTTACGAGGA-3', Arizono et al., 2011). The parasites were genotyped using the internal transcribed spacer (ITS+; NC5 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3', NC2 5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3'; Zhu et al., 1998). Anisakid nematode larvae have a relatively long residence time within their fish host (Smith, 1984). Genotyping was used to select parasite samples from the same population. To reduce the genetic variation of 'host reaction' parasite gene expression, which could influence gene expression patterns, only sample pairs of both infection sites from the same host individual, with the same genotype (according to the ITS+ marker) were selected for RNA sequencing. This selection resulted in 14 samples from five host individuals (Table S1, Figure S1).

2.3 | RNA isolation and sequencing

To extract mRNA from the samples a TRIreagent phenole-chloroform extraction for tissue was performed according to the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) with 95 µl TRIreagent used as lysis buffer. The purity of the RNA isolates was assessed through optical density measuring using a spectrophotometer (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). RNA contents were quantified with the Qubit fluorometric quantitation assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Library preparation and sequencing of seven sample pairs from both infection sites (liver, viscera) in the same host fish was carried out by the external service provider Novogene UK Company Limited (Cambridge, United Kingdom). The library was prepared with the NEB Next® Ultra™ RNA Library Preparation Kit using a 250–300 bp insert. Sequencing of 150 bp paired end reads was carried out on the Illumina NovaSeq 6000 platform (Illumina Inc., San Diego, USA) for each of the individual 14 samples. The aimed sequencing yield was 8 Gb which we obtained for 13 samples (Table S1, Figure S1).

Data are available under study accession number PRJEB42010.

2.4 | Transcriptome assembly, mapping and annotation

The quality of raw reads for each sample was assessed with FastQC version 0.11.9 (Andrews, 2019). As the overall quality was very high, all further steps were performed with untrimmed reads. To identify potential contamination as such, and putative fish transcripts stemming from food uptake, a taxonomic classification was performed using the tool Kraken 2 version 2.1.0 (Wood et al., 2019). The aim of filtering was a dataset including all unclassified reads combined with nematode reads, and a read count for fish reads. As a reference for the most likely contamination, transcripts of cod (Table S3) and a standard library for protozoa and humans were used. A positive control for nematode sequences was designed by including Ascaridoid nematode transcripts (Table S3) accessed through WormBase ParaSite (Howe et al., 2016, 2017). The R-package pavian version 1.0 (Breitwieser & Salzberg, 2020) was used to get an overview of the Kraken 2 output. To filter all reads classified as Nematoda, we

used kraken-tools version 0.1-alpha (Lu et al., 2020) and extracted reads with the respective taxon-ID.

The software Trinity version 2.11.0 was used to assemble the de novo transcriptome of *Pseudoterranova bulbosa* (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013) including all filtered reads of the 13 samples and using standard settings. To assure that filtering the raw data did not limit the quality of the reference transcriptome, we created and compared the assembly based on the filtered transcript to an assembly based on raw reads. The filtered and raw transcripts were translated into the predicted protein code with TransDecoder version 5.5.0 (Haas, 2018), which accounts for both read directions and all three different reading frames.

The Benchmarking Universal Single-Copy Ortholog (BUSCO, <http://busco.ezlab.org>) version 4.1.4 was used as a tool for the quality control of the assembly (Simão et al., 2015), to assess the completeness and number of conserved genes in the NCBI nematoda_odb10 reference database (downloaded 27. Nov. 2019). HISAT2 version 2.2.1 (Kim et al., 2019) was used to map the raw reads to the transcriptome. The software Kallisto version 0.46.1 was used to quantify the read counts of the filtered assembly (Bray et al., 2016). Output data were processed into a matrix of isoform counts using a perl script provided with Trinity. Isoforms were chosen to account for different possible splice variants of genes.

Annotation of the filtered transcriptome was performed using BLASTX version 2.12.0 using the invertebrate protein database, downloaded from NCBI (10 Nov. 2020, ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/invertebrate/*protein.faa.gz; Altschul et al., 1990; Gish & States, 1993). Protein classification was predicted using InterProScan version 5.47–82.0 (Jones et al., 2014).

2.5 | Differential gene expression and enrichment analysis

Even though 14 samples were sequenced we finally decided to choose one liver and one viscera sample from four individual fish ($n = 4+4 = 8$) to obtain a balanced sample design for further analyses. We used a random sample pair (R10 and R14) from Gm3, which had three replicate sample pairs, and excluded four samples from this host individual. Sample R28 from Gm9 was removed from the dataset, because it was paired with sample R29, for which RNA-sequencing was unsuccessful (Table S1, Figure S1). DESeq2 version 3.1.2 (Love et al., 2014) was used to analyse differential gene expression in the eight nematode samples using a paired design with 'site' as the main factor but accounting for 'host'.

A PCA was run with variance stabilized count data to identify potential outliers and visualize effects of infection sites (R-package ggplot2, Wickham, 2011). Differential gene expression analysis was performed and filtered with standard settings of the DESeq2 results function and adjusted p -value $< .05$ (FDR) cutoff (Love et al., 2014). The results were processed into a volcano plot and a heatmap of differentially expressed genes (DEGs) with indication of infection site and host-ID (R-packages pheatmap, RColorBrewer, viridisLite).

A functional enrichment analysis was performed with the R-package topGO, for DEGs upregulated in liver or viscera using the 'weight01' algorithm (Alexa & Rahnenfuhrer, 2022). Significant results were filtered using a $p < .05$ level (Fisher statistic). Gene ontology terms of enriched DEGs were summarized in REVIGO and exported as tree maps using the R-scripts for plotting (Supek et al., 2011).

2.6 | Allergen screen

In order to identify the allergenic potential of *Pseudoterranova bulbosa*, nematode allergen protein sequences listed in the WHO/IUIS Allergen Nomenclature database (Pomés et al., 2018) were collated from NCBI-Genbank (accessions are stated in the results section). These allergens were used as reference data for a BLASTX search of the assembled transcriptome. Sequences with an identity $>80\%$ and a match length \geq reference length were considered as potential homologs and putative allergens.

3 | RESULTS

All sampled specimens were assigned to the species *Pseudoterranova bulbosa* (NCBI Reference Sequence: NC_031643.1) using molecular barcoding of the CO1 marker (Data S1). The samples chosen for RNA-seq belonged to the same ITS-genotype (Data S2).

3.1 | Taxonomic classification and filtering of reads

The data used in the transcriptome assembly consisted of reads assigned as Nematoda (from our reference database of 28 spp.; Table S3) and unclassified reads, which included between 88.7 and 97.34% (mean $96.11 \pm 2.42\%$, 5.86% variance). Unclassified reads were included into the assembly because we assume they also belong to nematodes.

Reads assigned to Protozoa (mean $0.73 \pm 0.07\%$, 0.005% variance), *Homo sapiens* (mean $1.49 \pm 0.2\%$, 0.04% variance) and the fish host (*Gadus morhua*, Atlantic cod) were excluded from the dataset. Contamination with cod reads was below 1% in all samples except R12 where 8.22% of reads were assigned to *G. morhua*. Detailed taxonomic filtering results are provided in Table S4.

3.2 | Transcriptome

The assembly of the taxonomically filtered data consisted of 25,405 genes from 65,146 transcripts with 40.54% GC content (Table S5). While the unfiltered assembly included a higher number of bases/reads, which resulted in a higher total number of transcripts and genes, contig N50 and contig length were higher in the filtered assembly, based on all transcripts as well as the longest isoform per

gene. The analysis using BUSCO revealed that taxonomic filtering improved the contents of expected single-copy conserved genes (Table S6), and we thus continued with the assembly based on filtered reads in all downstream analyses.

Peptide prediction with BLASTX resulted in 92.3% annotation (7.7% unknown/missing/new/unique) and 61.1% of the transcripts were functionally annotated with InterProScan (38.9% unknown/missing/new/unique).

Metabolic processes (9.93%, P), binding (19.86%, F) and catalytic activity (31.21%, F) were the most frequent annotation categories.

3.3 | Differential gene expression and functional enrichment

Seventy differentially expressed genes (DEGs) were detected, 32 significantly upregulated in samples from liver and 38 significantly upregulated in specimens from viscera (Table S7, Figure 2). The PCA grouped three sample pairs according to their respective hosts (R19 & R22, R35 & R4, R44 & R46), while the sample pair from Gm3 (R10 & R14) showed a bigger variance. The principal components explained 17 and 20% of the variation and indicated a stronger 'host' than 'site' effect (Figure S2).

Most BLAST hits of the DEGs were obtained in other Nematoda (e.g., *Loa loa* and *Brugia malayi*), and many corresponded to hypothetical proteins, which have not been described further (Table S7). Gene Ontology (GO) terms assigned to the differentially expressed genes in nematode larvae infecting cod liver included metabolic

and catabolic processes, protein degradation (proteasome complex GO:0000502), cellular organization (GO:0045104), RNA processing and regulation (mediator complex, GO:0016592). Genes upregulated in larvae isolated from viscera genes were involved in metabolic (organic acid, GO0006082) and catabolic processes (aldehydes, GO:0046185, macromolecules GO:0009057), the processing of small nuclear RNAs (integrator complex, GO:0032039, protein import into the nucleus) and cellular detoxification (Table S8, Figure 3).

3.4 | Putative allergens

The allergen screening of the *Pseudoterranova bulbosa* transcripts identified five putative allergens: Ani s 2, Ani s 3, Ani s 7, Ani s 13 and Asc s 13 (Table 1, additional information included in Table S9).

The highest match identity was discovered for tropomyosin, with 98.94–91.54% identity and 3–24 mismatches, depending on query isoform. Tropomyosin has been identified as an allergen in vertebrates (Teleostei) and invertebrates (Acari, Insecta, Crustacea, Bivalvia, Gastropoda, Cephalopoda). The WHO database includes 37 homolog air- and food-borne allergens. Five homologs of paramyosin from other invertebrates (Acari and Gastropoda) are recognized air- or food-borne allergens (allergen.org). Glutathione-S-transferase (GST) from three taxonomic kingdoms (Plantae, Fungi, Animalia) acts as an allergen, with ten recognized homologs. Haemoglobin from *Anisakis simplex* is a homolog to *Chironomus thummi thummi* (Insecta) (Pomés et al., 2018). The function of Ani s 7 has not been discovered, yet.

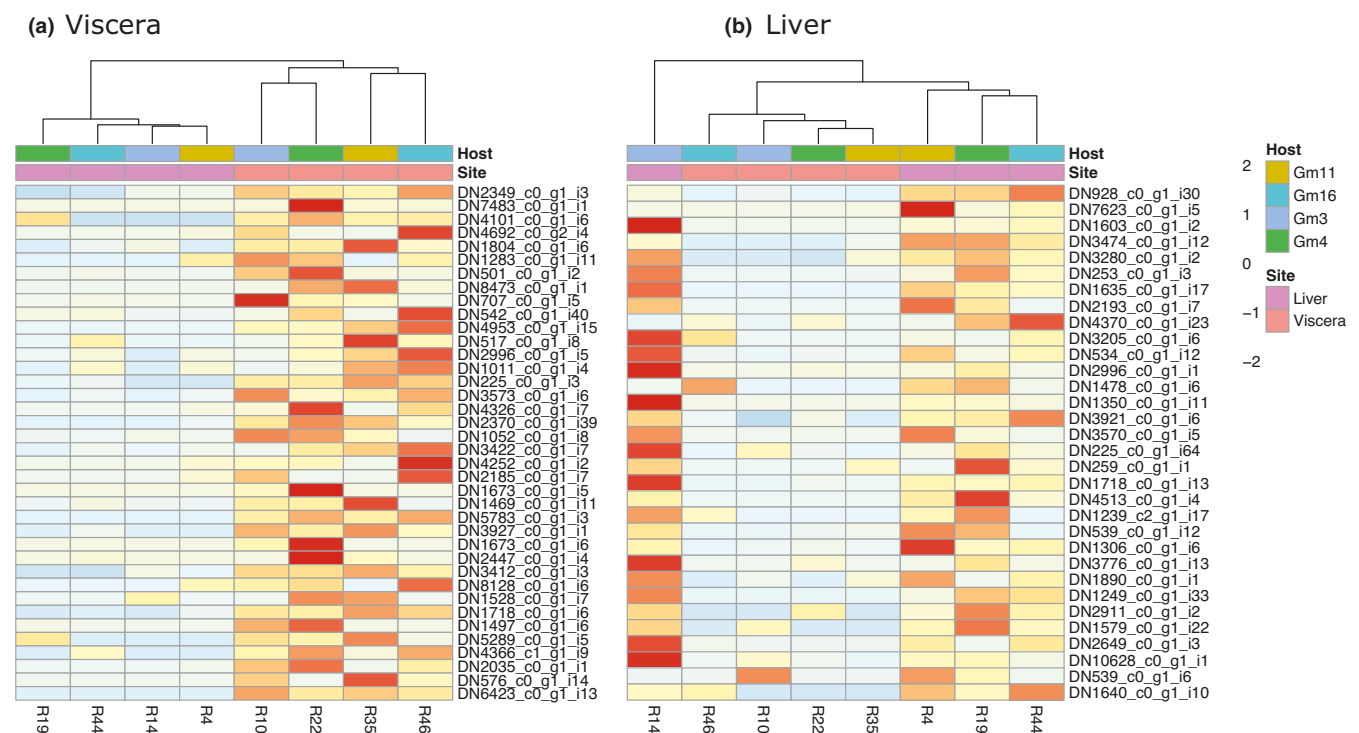


FIGURE 2 Heatmap of differentially expressed genes (rows) of the different samples (columns) in (a) viscera and (b) liver with indication of host-ID (row no. 1) and infection site (row no. 2). Warm colours imply a gene that was significantly upregulated in a sample

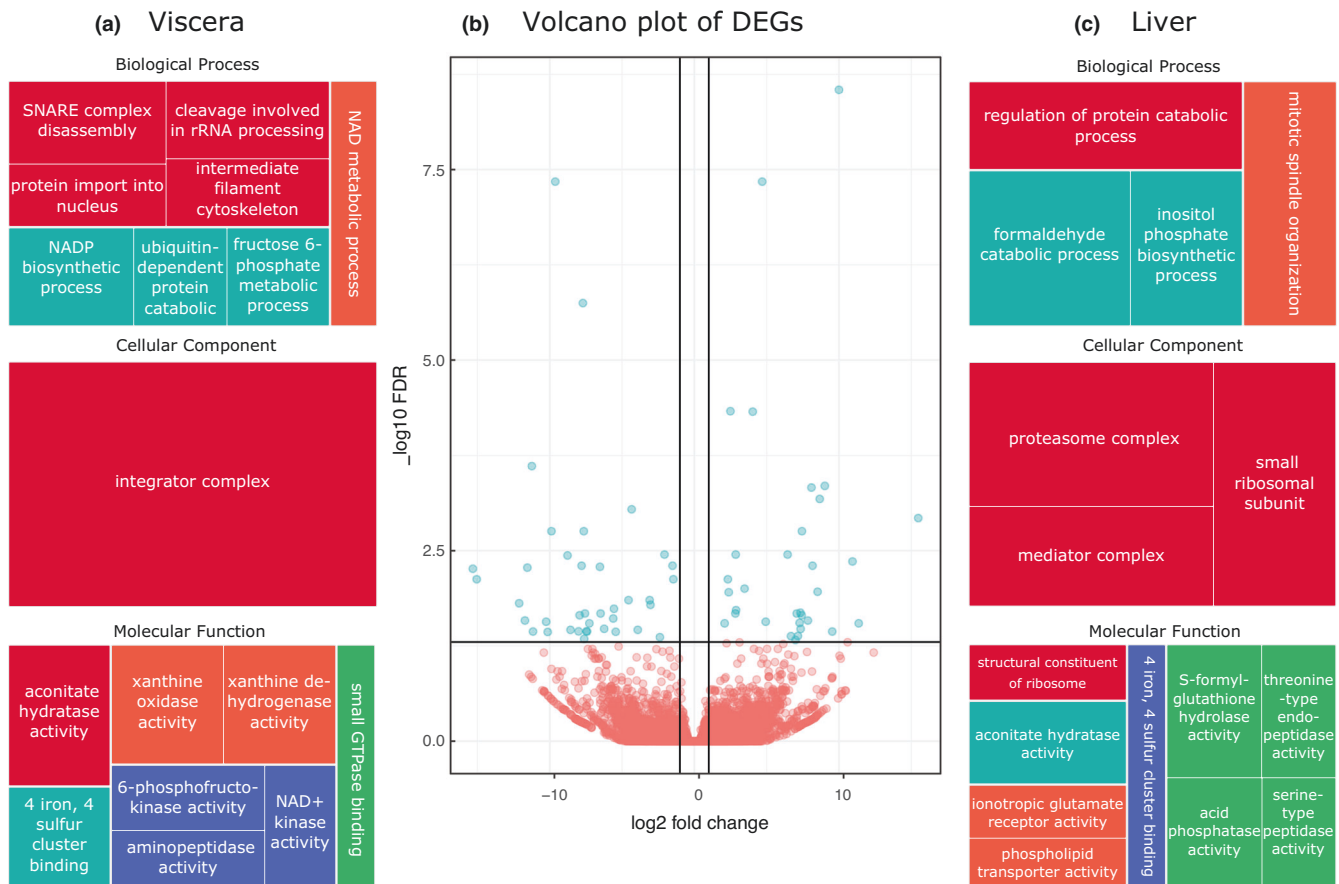


FIGURE 3 Treemaps of significantly over-expressed GO terms in *P. bulbosa* from (a) viscera and (c) liver and (b) volcano plot of differentially expressed genes, negative log₂ fold change corresponding to genes upregulated in viscera samples and positive log₂ fold change corresponding to genes upregulated in liver samples. Treemap colours are arbitrary in (a) versus (b). Volcano plot colour: blue = above FDR cut-off, red = below FDR cut-off

4 | DISCUSSION

We assembled and annotated the first transcriptome of the zoonotic anisakid genus *Pseudoterranova*. The differential gene expression analysis between samples from liver and viscera of *P. bulbosa* in *Gadus morhua* revealed only slight gene expression differences between infection sites. We here discuss our results in the light of published (experimental) research on this life cycle stage and its tissue invasion behaviour and presumed preferences.

As a starting point for the evaluation of the allergenic potential of *P. bulbosa*, we discuss the homologs of nematode allergens expressed by *P. bulbosa* in its fish host.

4.1 | Differential gene expression between infection sites

Anisakid larvae have been reported from different infection sites within their teleost hosts (Gay et al., 2018; Najda et al., 2018). The movement patterns of the larvae within the host after their ingestion have been attributed to the temperature difference between mammalian definitive hosts and teleost paratenic hosts (Smith &

Wootton, 1975). Hake gutted and examined after different time periods and kept at environmental temperature or on ice did not show significant variation/increase of nematode larvae in muscle (Cattan & Carvajal, 1984). Cipriani et al. (2016) reported that high storage temperatures (14°C) led *Anisakis pegreffii* to leave the fish host body, while temperatures between 2 and 7°C promoted a migration into muscle tissue. The motility and mobility of anisakid larvae strongly correlated with temperature in an experimental study by Guan et al. (2021). Šimat et al. (2015) were able to establish a strong connection between 'post mortem' migration of *Anisakis* sp. and the concentration of biogenic amines and dependent change of pH-value during decomposition of the host rather than temperature. Muscle infections with anisakids also occur in fish frozen or examined immediately after catching, suggesting there are other factors than temperature influencing migration in live hosts.

The distribution of *Pseudoterranova* stage three larvae (L3) infecting Atlantic cod (*Gadus morhua*) within the host's body cavity is primarily focused on liver and liver parenchyma and scarcer in viscera (own observation, Klapper et al., 2018; Mehrdana et al., 2014; Nadolna & Podolska, 2014). If the larval distribution is not coincidental, it can either be explained by the migrating distances defined by the host's anatomy or by the specific preference of liver.

TABLE 1 Putative allergens of *P. bulbosa* expressed in L3 from Atlantic cod. Count avg. = count average, Ident. = identity, Mism. = mismatch, Gap = alignment gap, identity cut-off = 80%. Asterisks indicate transcripts with a count average >1000

Query	Reference	Count avg.	Ident.	Length	Mism.	Gap	Annotation	Allergen
DN6446_c0_g1_i26 *	CAB93501.1	7518.46	98.944	284	3	0	Tropomyosin	Ani s 3
DN6446_c0_g1_i33	CAB93501.1	107.08	98.8	250	3	0	Tropomyosin	Ani s 3
DN7685_c0_g1_i1 *	AAF72796.1	3003.85	97.583	869	21	0	Paramyosin	Ani s 2
DN7685_c0_g1_i2 *	AAF72796.1	12,679.08	97.583	869	21	0	Paramyosin	Ani s 2
DN7685_c0_g1_i4	AAF72796.1	340.77	97.583	869	21	0	Paramyosin	Ani s 2
DN6446_c0_g1_i16 *	CAB93501.1	1894.38	91.549	284	24	0	Tropomyosin	Ani s 3
DN5493_c0_g1_i3	AAF72796.1	155.46	84.977	872	124	2	Paramyosin	Ani s 2
DN5493_c0_g1_i2	AAF72796.1	327.00	84.977	872	124	2	Paramyosin	Ani s 2
DN5493_c0_g1_i4 *	AAF72796.1	28,865.54	84.977	872	124	2	Paramyosin	Ani s 2
DN15669_c0_g1_i5 *	AFY98826.1	7159.69	84.848	297	45	0	Haemoglobin	Ani s 13
DN15669_c0_g1_i8	AFY98826.1	6.00	84.848	297	45	0	Haemoglobin	Ani s 13
DN15669_c0_g1_i2 *	AFY98826.1	7052.62	84.848	297	45	0	Haemoglobin	Ani s 13
DN15669_c0_g1_i7	AFY98826.1	11.38	84.848	297	45	0	Haemoglobin	Ani s 13
DN409_c0_g1_i4	ABL77410.1	25.92	84.593	675	102	1	-	Ani s 7
DN409_c0_g1_i233	ABL77410.1	53.69	84.593	675	102	1	-	Ani s 7
DN409_c0_g1_i79	ABL77410.1	12.23	84.593	675	102	1	-	Ani s 7
DN409_c0_g1_i23	ABL77410.1	19.62	84.546	893	136	1	-	Ani s 7
DN409_c0_g1_i10	ABL77410.1	1.69	84.546	893	136	1	-	Ani s 7
DN409_c0_g1_i129	ABL77410.1	74.00	84.489	1096	168	1	-	Ani s 7
DN409_c0_g1_i56	ABL77410.1	17.77	84.489	1096	168	1	-	Ani s 7
DN409_c0_g1_i169	ABL77410.1	33.00	84.389	442	69	0	-	Ani s 7
DN8128_c0_g1_i4 *	CAA53218.1	1837.69	83.193	119	20	0	Glutathione S-transferase	Asc s 13
DN409_c0_g1_i185	ABL77410.1	48.38	81.514	1136	168	2	-	Ani s 7
DN409_c0_g1_i75	ABL77410.1	7.38	81.514	1136	168	2	-	Ani s 7
DN409_c0_g1_i60	ABL77410.1	0.00	81.514	1136	168	2	-	Ani s 7

Anisakid larvae infect cod through the ingestion of infected invertebrate hosts or the ingestion of a paratenic fish host. The parasites leave the alimentary tract by penetrating the stomach or intestine wall and infecting the body cavity. Young (1972) suspected that a high infection intensity of the liver was a result of the short distance between the fish's stomach and the surrounding lobes of the liver (Young, 1972). Following studies assumed more complex underlying mechanisms, which have been conserved throughout the evolutionary adaptation of the parasite to its paratenic host (Sukhdeo & Sukhdeo, 1994). Here, the host was considered as a habitat with predictable anatomical and chemical structure, where certain stimuli provoke a fixed behavioural pattern of the parasite. Experimental studies showed that the larval response differed when infecting accidental hosts, e.g., freshwater species which they were not adapted to. In these studies, infection was irregular (remaining in the digestive tract) or the parasites did not survive (Quiazon et al., 2011; Sukhdeo & Sukhdeo, 1994). But differences in the distribution of larvae between organ and muscle tissues have also been reported within their adequate intermediate hosts (Strømnes & Andersen, 1998). Fat content of the infected tissue was identified to be positively correlated with the number of anisakid larvae (Strømnes & Andersen, 1998,

2003). Anisakids have been found to sometimes cause severe diseases in other accidental hosts, such as granulomatosis and necrosis in sea turtles (*Caretta caretta*) (Santoro et al., 2010) but were non-pathogenic in others (Shamsi et al., 2017). An experimental study by Bušelić et al. (2018) examined Wistar rats infected with *Anisakis pegreffii* L3 and showed that 30% of nematode larvae penetrated the stomach mucosa or abdominal muscle tissue, causing proinflammatory activity and induced the expression of cuticula degrading enzymes in the host. Stomach tissue reacted with ribosomal stress, while a T-helper 17-type inflammatory response was found in muscle tissue. No consistent behaviour of infective larvae pointing to aimed tissue migration was observed during infection experiments in rats (Bušelić et al., 2018), suggesting, that it could also be arbitrary in human patients.

Our DGE-analysis shows that gene expression patterns of *P. bulbosa* L3 from cod only differed in seventy genes between parasites infecting liver or viscera. Concerning the life-history of *P. bulbosa*, we conclude that during the L3 stage infecting paratenic fish hosts, similar biological processes take place regardless of the infection site. One way to interpret our data is in support of an arbitrary distribution of L3 *P. bulbosa* in cod, which could be a result of the physical proximity

between the host's stomach and liver (Young, 1972). In this case, most larvae remain in the adjacent liver after penetrating the stomach, while a smaller proportion of larvae leave the alimentary tract during the gut passage, thereupon residing in viscera tissue. However, the distribution of anisakid larvae in other fish species challenges this hypothesis (Strømnes & Andersen, 1998) and it does not provide explanatory approaches for the invasion of fish muscle tissue.

It is under debate whether anisakid larvae feed while infecting their fish host. Larval growth has been reported from fish hosts (Strømnes & Andersen, 2003), which would require nutrient uptake. During our sampling of live larvae immediately after capture of the fish, observations were made that could indicate that individual parasites may have fed on host blood. The consumption of cod tissue or blood prior to encapsulation would be supported by the cod reads discovered in the filtering step of this study (Table S4), but they could also be a result of contamination. If true, however, feeding does not occur exclusively in parasites infecting liver, as no differentially expressed genes with a direct link to digestion could be identified. Granted, that conditions in liver are beneficial to the parasite larvae, this benefit was not clearly reflected by their gene expression patterns in our study. Still there are findings pointing to better larval growth and more beneficial conditions, such as lipid content, at certain infection sites (Strømnes & Andersen, 2003). Respective experimental evidence on a transcriptomic level could be achieved by a setup similar to Strømnes (2014), who examined the migration of *Anisakis* on agar with a lipid gradient, accompanied by RNA sampling. Since our study did not include the apical part of the worm into the RNA samples, we recommend to future research of the gene expression of L3 from fish hosts in this body part. Genetic material for genotyping could also be acquired from residual DNA during RNA extraction, before DNase treatment.

Another possible explanation for the subtle DEG-pattern of *P. bulbosa* in our study could be explained by a dauer-phase of the larvae in both examined microhabitats (Hand et al., 2016). To prevent the release of antigens, hosts encapsulate invasive parasites instead of digesting them (Buchmann, 2012). The sheath covering the parasite is composed of host tissue (Buchmann, 2012), which could be the source of the cod reads found in some of our samples. The parasites undergo a diapause which is regulated by small RNAs and chromatin modifications (Hand et al., 2016). The expression of transcription regulating genes (integrator complex) in our analysis could be connected to this stage. Since the capsule is composed of host tissue, incomplete removal is one possible reason for the high number of cod reads in two of the samples (Table S4).

4.2 | Putative allergens

An important factor of anisakid pathogenicity is allergenic potential. We compared WHO-recognized Nematode allergens to proteins from *P. bulbosa*. Among five putative allergens, the protein tropomyosin showed a high similarity to Ani s 3 from *Anisakis* spp. which

has already been detected in *P. decipiens* (s.s.). Homologs of four nematode allergens were expressed in all samples. This finding suggests an allergenic potential of *P. bulbosa* which should be a subject of future research.

The putative allergens detected in this study were homologs of tropomyosin, paramyosin, glutathione-S-transferase (GTS), haemoglobin and Ani s 7. Since homology between biomolecules does not directly infer cross-reactive IgE binding, candidate allergens need to be validated by serological studies to verify their activity (Guarneri et al., 2007). Nevertheless, the identification of homologues is another line of evidence for the proposed allergenic properties of *P. bulbosa*.

Tropomyosin is essential to muscle function and cell division (cytoskeleton) in all eukaryotes (Sereda et al., 2008). Nematode tropomyosin is located in the muscle and under the basal layer of the cuticle (Asnoussi et al., 2017). Parasite tropomyosin can regulate host immune molecules through the simultaneous expression of tetraspanin (Monteiro et al., 2010). While vertebrate tropomyosins are non-allergenic to humans due to a closer homology (Sereda et al., 2008), invertebrate tropomyosin and paramyosin are considered pan-allergens (Pérez-Pérez et al., 2000). Anisakid tropomyosin is suspected to be heat-resistant which is relevant for food-safety considerations (Guarneri et al., 2007). Tropomyosin has been debated to be involved in fish allergy (González-Fernández et al., 2018; Keshavarz et al., 2020). Cross-reaction to invertebrate tropomyosins has also been described between house dust mite and nematodes (Acevedo et al., 2009; Bernardini et al., 2005). However, ascribed cross-reaction cannot always be validated through immunoblotting, despite the similarity of the epitopes, e.g., *Anisakis pegreffii* tropomyosin and polyclonal antibodies from crustacean tropomyosin (Asnoussi et al., 2017). Still, cross-reactivity of anisakid tropomyosin and paramyosin with frequent arthropod allergens led to diagnostic problems of allergic anisakidosis (Guarneri et al., 2007), which required a search for a specific diagnostic allergen (Acevedo et al., 2009).

The enzyme glutathione-S-transferase (GST) serves as a catalyst of detoxification processes in eukaryotes (Eaton & Bammler, 1999). Parasite GST is involved in the suppression of the host's inflammatory response to the infection (Mehrdana & Buchmann, 2017; Pritchard, 1995), i.e., by neutralizing oxygen radicals (Mehrdana & Buchmann, 2017; Nielsen & Buchmann, 1997). Several homologs of arthropod GST act as respiratory allergens, causing reactions to cockroaches and mites (Mueller et al., 2015). Acevedo et al. (2013) described allergenic GST from *Ascaris lumbricoides* which was serum cross-reactive with tropical house dust mites. It is a recognized allergen of anisakids and has been proposed by Fæste et al. (2014) and considered a putative allergen of *Pseudoterranova decipiens* (Kochanowski et al., 2020). Cross-reactivity between GTS homologues of invertebrates from different taxonomic groups has been suspected but not confirmed as yet (Mueller et al., 2015).

The identification of the allergenic agent Ani s 7 provided a new candidate for a reliable serum-indicator of acute *Anisakis* infections

(Acevedo et al., 2013; Anadón et al., 2009). Sera acquired through infection experiments of rats with *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* showed that Ani s 7 was genus specific to *Anisakis*. Because *Pseudoterranova* infections did not result in the sensitization to Ani s 7, antibodies to Ani s 7 were considered an indicator of infections with live larvae from the genus *Anisakis* (Anadón et al., 2009). Later, the role of Ani s 7 as standard indicator for the identification of *Anisakis* infections has been debated to be cross-reactive in serodiagnosis, possibly due to glycosylation (González-Fernández et al., 2017; Lorenzo et al., 2000). Based on these findings, the *Pseudoterranova bulbosa* homolog of Ani s 7 identified in this study has probably lower similarity or different surface structure and may not have the allergenic properties described for *Anisakis*.

The haemoglobins of nematodes are large molecules with a high structural diversity and multiple subunits and domains (Weber, 1980; Weber & Vinogradov, 2001). They are characterized by a high O₂ binding affinity and low dissociation (Coletta et al., 1986; Gibson et al., 1965, 1993; Weber & Vinogradov, 2001), playing role in the neutralization of free radicals and therefore mitigating a host's response to parasite infections (Madala et al., 2008; Nieuwenhuizen et al., 2013). Some invertebrate parasites' haemoglobin has allergenic potential within their vertebrate hosts, i.e., as the main allergenic agent of chironomids (Baur et al., 1986; Mazur et al., 1987, 1990). *Pseudoterranova* spp. haemoglobin accounts for more than 30% of the protein within the nematode's pseudocoel (Dixon et al., 1993). Grey seals (*Halichoerus grypus*), the definitive host of *Pseudoterranova decipiens* (s.s.) and *P. krabbei*, produce antibodies against parasite haemoglobin (Dixon et al., 1991; Frenkel et al., 1992; Weber & Vinogradov, 2001). The sensitization of the host only takes place during the exposure with a live parasite (Nieuwenhuizen et al., 2013). Studies by González-Fernández et al. (2015, 2017) suggested that haemoglobin could be used to increase diagnostic sensitivity for the identification of the source of chronic urticaria caused by *Anisakis* infections, because it does not cross-react with *Ascaris*, a parasite genus from the same clade. Our results indicate that a specificity to genus levels within the family Anisakidae should be examined further.

Chen et al. (2015) hypothesized that heat stress could play a role in the allergenicity of anisakids, as a side effect of their reaction to the definitive host's body temperature and may be beneficial in the competition with other gastro-intestinal parasites of their definitive hosts. Temperature seemed to influence the expression of antigenic proteins, when simulating cold stress and body temperatures of intermediate and definitive hosts. Low storage temperatures could reduce the expression of excretory-secretory products (Palomba et al., 2019). However, fast freezing rates of 0.2–0.3°C/min at –10°C seemed to be sufficient to inactivate the nematodes and preserve the quality of the seafood, but rapid freezing kinetics also increased the expression of the allergen Ani s 4. Thus, freezing kinetics may have a bigger effect on allergenicity of anisakids than differences between species (Sánchez-Alonso et al., 2020).

Examining allergenic potential based on transcriptomic instead of genomic data is advantageous, because it reveals the allergens which are acutely expressed under certain conditions. Our data

therefore give information on the trace allergen homologs potentially present in fish after the manual removal of *P. bulbosa* larvae. Genomic data would enable to screen for all potential allergen homologs, but like transcriptomic data, they can only be used as an indication for future serological studies.

5 | CONCLUSION

This study provides an annotated de novo transcriptome of the marine parasite *Pseudoterranova bulbosa*, which contributes to resources on Nematoda with human-pathogenic potential. The data can be used in meta-analyses, as a basis for tissue-specific gene expression analysis and as a starting point for resequencing projects.

Our DGE-analysis revealed only slightly differing expression patterns of *P. bulbosa* L3 from cod liver or viscera. Concerning the life-history of *P. bulbosa*, we conclude that during the L3 stage infecting paratenic fish hosts, similar biological processes take place regardless of infection site. Our findings either support the hypothesis that parasite distribution results from the liver's physical proximity to the stomach or is driven by beneficial properties of liver, such as a high lipid content. Allergen traces from *P. bulbosa* contaminating fishery products are a potential food-hazard.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank all members of the 341st expedition of RV Walther Herwig III, especially Dr. Heino Fock from the Johann Heinrich von Thünen Institute. We are grateful to Dr. Carola Greve, Damian Baranski, Dr. Tilman Schell and Deepak Kumar Gupta for their support in sample submission. Open access funding enabled and organized by ProjektDEAL.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare they do not have competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

KGA, BF, JK and SK conceived the study and wrote the manuscript. KGA carried out the sampling, bioinformatic analysis and created the figures. BF supported the data analysis. BF and JK commented and revised the manuscript.

CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

CONSENT FOR PUBLICATION

All authors gave final approval for publication and agree to be held accountable for the work performed therein.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Transcriptomic raw data generated for this study are available at the European Nucleotide Archive database (ENA) under Project number: PRJEB42010. Sequences used for DNA-barcoding are included in the supplemental information (Data S1 and S2).

ORCID

Katharina G. Alt  <https://orcid.org/0000-0003-2950-6470>Barbara Feldmeyer  <https://orcid.org/0000-0002-0413-7245>

REFERENCES

- Acevedo, N., Mohr, J., Zakzuk, J., Samonig, M., Briza, P., Erler, A., Pomés, A., Huber, C. G., Ferreira, F., & Caraballo, L. (2013). Proteomic and immunochemical characterization of glutathione transferase as a new allergen of the nematode *Ascaris lumbricoides*. *PLoS One*, 8(11), e78353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078353>
- Acevedo, N., Sánchez, J., Erler, A., Mercado, D., Briza, P., Kennedy, M., Fernandez, A., Gutierrez, M., Chua, K. Y., Cheong, N., Jiménez, S., Puerta, L., & Caraballo, L. (2009). IgE cross-reactivity between *Ascaris* and domestic mite allergens: The role of tropomyosin and the nematode polyprotein ABA-1. *Allergy*, 64(11), 1635–1643. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02084.x>
- Alexa, A., & Rahnenfuhrer, J. (2022). *topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology* (2.46.0) [Computer software]. Bioconductor version: Release (3.14). <https://doi.org/https://doi.org/10.18129/B9.bioc.topGO>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anadón, A. M., Romarís, F., Escalante, M., Rodríguez, E., Gárate, T., Cuéllar, C., & Ubeira, F. M. (2009). The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clinical & Experimental Immunology*, 156(3), 471–478. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03919.x>
- Andrews, S. (2019). *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data* (version 0.11.9). <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arcos, S. C., Ciordia, S., Roberston, L., Zapico, I., Jiménez-Ruiz, Y., Gonzalez-Muñoz, M., Moneo, I., Carballeda-Sangiao, N., Rodriguez-Mahillo, A., Albar, J. P., & Navas, A. (2014). Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex sensu stricto* and *A. pegreffii*. *Proteomics*, 14(12), 1547–1568. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300529>
- Arizono, N., Miura, T., Yamada, M., Tegoshi, T., & Onishi, K. (2011). Human infection with *Pseudoterranova azarasi* roundworm. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3), 555–556. <https://doi.org/10.3201/eid1703.101350>
- Asnoussi, A., Aibinu, I. E., Gasser, R. B., Lopata, A. L., & Smooker, P. M. (2017). Molecular and immunological characterisation of tropomyosin from *Anisakis pegreffii*. *Parasitology Research*, 116(12), 3291–3301. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5642-4>
- Baird, F. J., Su, X., Aibinu, I., Nolan, M. J., Sugiyama, H., Otranto, D., Lopata, A. L., & Cantacessi, C. (2016). The *Anisakis* transcriptome provides a resource for fundamental and applied studies on allergy-causing parasites. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(7), e0004845. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004845>
- Baur, X., Aschauer, H., Mazur, G., Dewair, M., Prelicz, H., & Steigemann, W. (1986). Structure, antigenic determinants of some clinically important insect allergens: Chironomid hemoglobins. *Science*, 233(4761), 351–354. <https://doi.org/10.1126/science.2425431>
- Bernardini, R., Mistrello, G., Novembre, E., Roncarolo, D., Zanotta, S., Lombardi, E., Cianferoni, A., Pucci, N., De Martino, M., & Vierucci, A. (2005). Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis simplex* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 18(4), 671–675. <https://doi.org/10.1177/039463200501800408>
- Bouree, P., Paugam, A., & Petithory, J.-C. (1995). Anisakidosis: Report of 25 cases and review of the literature. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 18(2), 75–84. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(95\)98848-C](https://doi.org/10.1016/0147-9571(95)98848-C)
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, 34(5), 525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2020). Pavian: Interactive analysis of metagenomics data for microbiome studies and pathogen identification. *Bioinformatics*, 36(4), 1303–1304. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz715>
- Brunet, J., Pesson, B., Royant, M., Lemoine, J.-P., Pfaff, A. W., Abou-Bacar, A., Yera, H., Fréalle, E., Dupouy-Camet, J., Merino-Espinosa, G., Gómez-Mateos, M., Martin-Sanchez, J., & Candolfi, E. (2017). Molecular diagnosis of *Pseudoterranova decipiens* s.s. in human, France. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 397. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2493-7>
- Buchmann, K. (2012). Fish immune responses against endoparasitic nematodes – experimental models. *Journal of Fish Diseases*, 35(9), 623–635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2012.01385.x>
- Buchmann, K., & Mehrdana, F. (2016). Effects of anisakid nematodes *Anisakis simplex* (s.l.), *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) and *Contracaecum osculatum* (s.l.) on fish and consumer health. *Food and Waterborne Parasitology*, 4(Supplement C), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.07.003>
- Bullini, L., Arduino, P., Cianchi, R., Nascetti, G., D'Amelio, S., Mattiucci, S., Paggi, L., Orecchia, P., Plotz, J., Smith, J. H., & Bratley, J. (1997). Genetic and ecological research on anisakid endoparasites of fish and marine mammals in the Antarctic and Arctic-Boreal regions. In B. Battaglia, J. Valencia, & D. W. H. Walton (Eds.), *Antarctic Communities: Species, Structure and Survival* (pp. 39–44). Cambridge University Press.
- Bušelić, I., Trumbić, Ž., Hrabar, J., Vrbatović, A., Bočina, I., & Mladineo, I. (2018). Molecular and cellular response to experimental *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) third-stage larval infection in rats. *Frontiers in Immunology*, 9, 2055. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02055>
- Cattan, P. E., & Carvajal, J. (1984). A study of the migration of larval *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridida) in the Chilean hake, *Merluccius gayi* (Guichenot). *Journal of Fish Biology*, 24(6), 649–654. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1984.tb04835.x>
- Cavallero, S., Lombardo, F., Salvemini, M., Pizzarelli, A., Cantacessi, C., & D'Amelio, S. (2020). Comparative Transcriptomics Reveals Clues for Differences in Pathogenicity between *Hysterothylacium aduncum*, *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii*. *Genes*, 11(3), 321. <https://doi.org/10.3390/genes11030321>
- Cavallero, S., Lombardo, F., Su, X., Salvemini, M., Cantacessi, C., & D'Amelio, S. (2018). Tissue-specific transcriptomes of *Anisakis simplex* (*sensu stricto*) and *Anisakis pegreffii* reveal potential molecular mechanisms involved in pathogenicity. *Parasites & Vectors*, 11(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2585-7>
- Cavallero, S., Scribano, D., & D'Amelio, S. (2016). First case report of invasive pseudoterranoviasis in Italy. *Parasitology International*, 65(5, Part A), 488–490. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.07.003>
- Chen, H.-Y., Cheng, Y.-S., & Shih, H.-H. (2015). Expression patterns and structural modelling of Hsp70 and Hsp90 in a fish-borne zoonotic nematode *Anisakis pegreffii*. *Veterinary Parasitology*, 212(3), 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.006>
- Cipriani, P., Acerra, V., Bellisario, B., Sbaraglia, G. L., Chelieschi, R., Nascetti, G., & Mattiucci, S. (2016). Larval migration of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy, *Engraulis encrasicolus*: Implications to seafood safety. *Food Control*, 59, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.043>
- Coletta, M., Falcioni, G., Concetti, A., Ascoli, F., & Brunori, M. (1986). Ligand-dependent behavior of the hemoglobin from the ascarid

- Parascaris equorum*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 870(1), 169–175. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(86\)90021-X](https://doi.org/10.1016/0167-4838(86)90021-X)
- Consortium International Helminth Genomes (2017). Comparative genomics of the major parasitic worms. *BioRxiv*, 236539, <https://doi.org/10.1101/236539>
- D'Amelio, S., Lombardo, F., Pizzarelli, A., Bellini, I., & Cavallero, S. (2020). Advances in Omic studies drive discoveries in the biology of anisakid nematodes. *Genes*, 11(7), 801. <https://doi.org/10.3390/genes11070801>
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K. D., Santos, C. P., Pugachev, O. N., Webb, S. C., Picanço, M., & Paggi, L. (2000). Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology*, 30(2), 223–226. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00178-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00178-2)
- Dixon, B., Kimmins, W., & Pohajdak, B. (1993). Variation in colour of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Anisakidae) larvae correlates with haemoglobin concentration in the pseudocoelomic fluid. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50(4), 767–771. <https://doi.org/10.1139/f93-088>
- Dixon, B., Walker, B., Kimmins, W., & Pohajdak, B. (1991). Isolation and sequencing of a cDNA for an unusual hemoglobin from the parasitic nematode *Pseudoterranova decipiens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), 5655–5659. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5655>
- Eaton, D. L., & Bammler, T. K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences*, 49(2), 156–164. <https://doi.org/10.1093/toxsci/49.2.156>
- Fæste, C. K., Jonscher, K. R., Dooper, M. M. W. B., Egge-Jacobsen, W., Moen, A., Daschner, A., Egaas, E., & Christians, U. (2014). Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. *EuPA Open Proteomics*, 4, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.06.006>
- FDA. (2021). *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. <https://www.fda.gov/media/80637/download>
- Frenkel, M. J., Dopheide, T. A. A., Wagland, B. M., & Ward, C. W. (1992). The isolation, characterization and cloning of a globin-like, host-protective antigen from the excretory-secretory products of *Trichostrongylus colubriformis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 50(1), 27–36. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90241-B](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90241-B)
- Gay, M., Bao, M., MacKenzie, K., Pascual, S., Buchmann, K., Bourgau, O., Couvreur, C., Mattiucci, S., Paoletti, M., Hastie, L. C., Levsen, A., & Pierce, G. J. (2018). Infection levels and species diversity of ascaridoid nematodes in Atlantic cod, *Gadus morhua*, are correlated with geographic area and fish size. *Fisheries Research*, 202, 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2017.06.006>
- Gibson, Q., Regan, R., Olson, J., Carver, T., Dixon, B., Pohajdak, B., Sharma, P., & Vinogradov, S. (1993). Kinetics of Ligand-Binding to *Pseudoterranova decipiens* and *Ascaris suum* Hemoglobins and to Leu-29-tyr sperm whale myoglobin mutant. *Journal of Biological Chemistry*, 268(23), 16993–16998.
- Gibson, Q. H., Smith, M. H., & Roughton, F. J. W. (1965). Rates of reaction of *Ascaris* haemoglobins with ligands. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 163(991), 206–214. <https://doi.org/10.1098/rspb.1965.0067>
- Gish, W., & States, D. J. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics*, 3(3), 266–272. <https://doi.org/10.1038/ng0393-266>
- González-Fernández, J., Alguacil-Guillén, M., Cuéllar, C., & Daschner, A. (2018). Possible allergenic role of tropomyosin in patients with adverse reactions after fish intake. *Immunological Investigations*, 47(4), 416–429. <https://doi.org/10.1080/08820139.2018.1451882>
- González-Fernández, J., Daschner, A., Nieuwenhuizen, N. E., Lopata, A. L., Frutos, C. D., Valls, A., & Cuéllar, C. (2015). Haemoglobin, a new major allergen of *Anisakis simplex*. *International Journal for Parasitology*, 45(6), 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.01.002>
- González-Fernández, J., Rivas, L., Luque-Ortega, J. R., Núñez-Ramírez, R., Campioli, P., Gárate, T., Perteguer, M. J., Daschner, A., & Cuéllar, C. (2017). Recombinant vs native *Anisakis* haemoglobin (Ani s 13): Its appraisal as a new gold standard for the diagnosis of allergy. *Experimental Parasitology*, 181, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.08.010>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., ... Regev, A. (2011). Trinity: Reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Guan, A., Van Damme, I., Devlieghere, F., & Gabriël, S. (2021). Effect of temperature, CO2 and O2 on motility and mobility of Anisakidae larvae. *Scientific Reports*, 11(1), 4279. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83505-5>
- Guarneri, F., Guarneri, C., & Benvenega, S. (2007). Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: Possible role of Ani s 2 and Ani s 3. *International Journal of Dermatology*, 46(2), 146–150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2006.03091.x>
- Haas, B. J. (2018). TransDecoder (version 5.5.0). <https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/releases/tag/TransDecoder-v5.5.0>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., Williams, T., Dewey, C. N., ... Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Hand, S. C., Denlinger, D. L., Podrabsky, J. E., & Roy, R. (2016). Mechanisms of animal diapause: Recent developments from nematodes, crustaceans, insects, and fish. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(11), R1193–R1211. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00250.2015>
- Hochberg, N. S., & Hamer, D. H. (2010). Anisakidosis: Perils of the deep. *Clinical Infectious Diseases*, 51(7), 806–812. <https://doi.org/10.1086/656238>
- Howe, K. L., Bolt, B. J., Cain, S., Chan, J., Chen, W. J., Davis, P., Done, J., Down, T., Gao, S., Grove, C., Harris, T. W., Kishore, R., Lee, R., Lomax, J., Li, Y., Muller, H.-M., Nakamura, C., Nuin, P., Paulini, M., ... Sternberg, P. W. (2016). WormBase 2016: Expanding to enable helminth genomic research. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D774–D780. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1217>
- Howe, K. L., Bolt, B. J., Shafie, M., Kersey, P., & Berriman, M. (2017). WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 215, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.11.005>
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A. F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.-Y., Lopez, R., & Hunter, S. (2014). InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236–1240. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>
- Keshavarz, B., Rao, Q., Jiang, X., & Hsieh, Y.-H.- P. (2020). Immunochemical analysis of pepsin-digested fish tropomyosin. *Food Control*, 118, 107427. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107427>
- Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., & Salzberg, S. L. (2019). Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nature Biotechnology*, 37(8), 907–915. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>

- Kim, J.-H., Kim, J.-O., Jeon, C.-H., Nam, U.-H., Subramaniam, S., Yoo, S.-I., & Park, J.-H. (2018). Comparative transcriptome analyses of the third and fourth stage larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 226, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.10.002>
- Klapper, R., Carballeda-Sangiao, N., Kuhn, T., Jensen, H. M., Buchmann, K., Gonzalez-Muñoz, M., & Karl, H. (2018). Anisakid infection levels in fresh and canned cod liver: Significant reduction through liver surface layer removal. *Food Control*, 92, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.029>
- Klapper, R., Kuhn, T., Münster, J., Levsen, A., Karl, H., & Klimpel, S. (2015). Anisakid nematodes in beaked redfish (*Sebastes mentella*) from three fishing grounds in the North Atlantic, with special notes on distribution in the fish musculature. *Veterinary Parasitology*, 207(1–2), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.11.017>
- Kochanowski, M., Dąbrowska, J., Różycki, M., Karamon, J., Sroka, J., & Cencek, T. (2020). Proteomic Profiling Reveals New Insights into the Allergomes of *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens*, and *Contracaecum osculatum*. *Journal of Parasitology*, 106(5), 572–588. <https://doi.org/10.1645/19-75>
- Kochanowski, M., González-Muñoz, M., Gómez-Morales, M. Á., Gottstein, B., Dąbrowska, J., Różycki, M., Cencek, T., Müller, N., & Boubaker, G. (2019). Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* and *Contracaecum osculatum* regarding their applicability for specific serodiagnosis of human anisakidosis based on IgG-ELISA. *Experimental Parasitology*, 197, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.12.004>
- Llorens, C., Arcos, S. C., Robertson, L., Ramos, R., Futami, R., Soriano, B., Ciordia, S., Careche, M., González-Muñoz, M., Jiménez-Ruiz, Y., Carballeda-Sangiao, N., Moneo, I., Albar, J. P., Blaxter, M., & Navas, A. (2018). Functional insights into the infective larval stage of *Anisakis simplex* s.s., *Anisakis pegreffii* and their hybrids based on gene expression patterns. *BMC Genomics*, 19(1), 592. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4970-9>
- Lorenzo, S., Romarís, F., Iglesias, R., Audicana, M. T., Alonso, J. M., Leiro, J., & Ubeira, F. M. (2000). O-glycans as a source of cross-reactivity in determinations of human serum antibodies to *Anisakis simplex* antigens. *Clinical and Experimental Allergy*, 30(4), 551–559. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.2000.00758.x>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, J., Pockrandt, C., Steingegger, M., van Heusden, P., Cudahy, P., & Rincon, N. (2020). KrakenTools (versio 0.1-alpha). <https://github.com/jenniferlu717/KrakenTools>
- Madala, S. K., Hodges, M., Shweta, T., Virgilio, B., Urban, J. F., & Keane-Myers, A. (2008). The parasitic nematode *Ascaris suum* secretes a hemoglobin that scavenges host derived free radicals and activates dendritic cells through TLR4. *The FASEB Journal*, 22(S1), 11–674. https://doi.org/10.1096/fasebj.22.1_supplement.674.11
- Mattiucci, S., Acerra, V., Paoletti, M., Cipriani, P., Levsen, A., Webb, S. C., Canestrelli, D., & Nascetti, G. (2016). No more time to stay 'single' in the detection of *Anisakis pegreffii*, *A. simplex* (s.s.) and hybridization events between them: A multi-marker nuclear genotyping approach. *Parasitology*, 143(8), 998–1011. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000330>
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S. C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisario, B., Gibson, D. I., & Nascetti, G. (2014). Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *Journal of Parasitology*, 100(2), 199–214. <https://doi.org/10.1645/12-120.1>
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Dailey, M., Webb, S. C., Barros, N. B., Cianchi, R., & Bullini, L. (2005). Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: Morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology*, 61(3), 157–171. <https://doi.org/10.1007/s11230-005-3158-2>
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Abollo, E., Webb, S. C., Pascual, S., Cianchi, R., & Bullini, L. (2001). Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *International Journal for Parasitology*, 31(1), 9–14. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00125-9)
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Ishikura, H., Kikuchi, K., Sato, N., Cianchi, R., & Bullini, L. (1998). Allozyme and morphological identification of shape *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). *Systematic Parasitology*, 40(2), 81–92. <https://doi.org/10.1023/A:1005914926720>
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Santos, C. P., Costa, G., Benedetto, A. P. D., Ramos, R., Argyrou, M., Cianchi, R., & Bullini, L. (2002). Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): Larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology*, 51(3), 159–170. <https://doi.org/10.1023/A:1014554900808>
- Mattiucci, S., Paoletti, M., & Webb, S. C. (2009). *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: Morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology*, 74(3), 199–217. <https://doi.org/10.1007/s11230-009-9212-8>
- Mazur, G., Baur, X., & Liebers, V. (1990). Hypersensitivity to hemoglobins of the Diptera family Chironomidae: Structural and functional studies of their immunogenic/allergenic sites. *Monographs in Allergy*, 28, 121–137.
- Mazur, G., Becker, W.-M., & Baur, X. (1987). Epitope mapping of major insect allergens (chironomid hemoglobins) with monoclonal antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 80(6), 876–883. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(87\)80280-4](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(87)80280-4)
- Mehrdana, F., Bahlool, Q. Z. M., Skov, J., Marana, M. H., Sindberg, D., Mundeling, M., Overgaard, B. C., Korbut, R., Strøm, S. B., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2014). Occurrence of zoonotic nematodes *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatum* and *Anisakis simplex* in cod (*Gadus morhua*) from the Baltic Sea. *Veterinary Parasitology*, 205(3–4), 581–587. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.027>
- Mehrdana, F., & Buchmann, K. (2017). Excretory/secretory products of anisakid nematodes: Biological and pathological roles. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0310-3>
- Menghi, C. I., Gatta, C. L., Arias, L. E., Santoni, G., Nicola, F., Smayevsky, J., Degese, M. F., & Krivokapich, S. J. (2020). Human infection with *Pseudoterranova cattani* by ingestion of "ceviche" in Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina De Microbiología*, 52(2), 118–120. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.005>
- Mercado, R., Torres, P., & Maira, J. (1997). Human case of gastric infection by a fourth larval stage of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae). *Revista De Saude Publica*, 31(2), 178–181. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101997000200012>
- Mercado, R., Torres, P., Muñoz, V., & Apt, W. (2001). Human infection by *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) in Chile: Report of seven cases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 653–655. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000500010>
- Mitsuboshi, A., Yamaguchi, H., Ito, Y., Mizuno, T., Tokoro, M., & Kasai, M. (2017). Extra-gastrointestinal anisakidosis caused by *Pseudoterranova azarasi* manifesting as strangulated inguinal hernia. *Parasitology International*, 66(6), 810–812. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.09.008>
- Monteiro, K. M., de Carvalho, M. O., Zaha, A., & Ferreira, H. B. (2010). Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics*, 10(10), 1985–1999. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900506>

- Mueller, G. A., Pedersen, L. C., Glesner, J., Edwards, L. L., Zakzuk, J., London, R. E., Arruda, L. K., Chapman, M. D., Caraballo, L., & Pomés, A. (2015). Analysis of glutathione S-transferase allergen cross-reactivity in a North American population: Relevance for molecular diagnosis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(5), 1369–1377. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.03.015>
- Muñoz-Caro, T., Machuca, A., Morales, P., Verdugo, J., Reyes, R., García, M., Rutaihua, L., Schindler, T., Poppert, S., Taubert, A., & Hermosilla, C. (2022). Prevalence and molecular identification of zoonotic *Anisakis* and *Pseudoterranova* species in fish destined to human consumption in Chile. *Parasitology Research*, 121(5), 1295–1304 <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07459-x>
- Murata, Y., Ando, K., Usui, M., Sugiyama, H., Hayashi, A., Tanemura, A., Kato, H., Kuriyama, N., Kishiwada, M., Mizuno, S., Sakurai, H., & Isaji, S. (2018). A case of hepatic anisakiasis caused by *Pseudoterranova decipiens* mimicking metastatic liver cancer. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 619. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3540-8>
- Nadolna, K., & Podolska, M. (2014). Anisakid larvae in the liver of cod (*Gadus morhua*) L. from the southern Baltic Sea. *Journal of Helminthology*, 88(2), 237–246. <https://doi.org/10.1017/S0022149X13000096>
- Najda, K., Kijewska, A., Kijewski, T., Plauška, K., & Rokicki, J. (2018). Distribution of ascaridoid nematodes (Nematoda: Chromadorea: Ascaridoidea) in fish from the Barents Sea. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 47(2), 128–139. <https://doi.org/10.1515/ohs-2018-0014>
- Nam, U.-H., Kim, J.-O., & Kim, J.-H. (2020). De novo transcriptome sequencing and analysis of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) third-stage and fourth stage larvae. *Journal of Nematology*, 52, 1–16 <https://doi.org/10.21307/jofnem-2020-041>
- Nascetti, G., Cianchi, R., Mattiucci, S., D'Amelio, S., Orecchia, P., Paggi, L., Bratney, J., Berland, B., Smith, J. W., & Bullini, L. (1993). Three sibling species within *Contracaecum osculatatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic-Boreal region: Reproductive isolation and host preferences. *International Journal for Parasitology*, 23(1), 105–120. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(93\)90103-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(93)90103-6)
- Nascetti, G., Paggi, L., Orecchia, P., Smith, J. W., Mattiucci, S., & Bullini, L. (1986). Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *International Journal for Parasitology*, 16(6), 633–640. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(86\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(86)90032-9)
- Nielsen, M. E., & Buchmann, K. (1997). Glutathione-s-transferase is an important antigen in the eel nematode *Anguillicola crassus*. *Journal of Helminthology*, 71(4), 319–324. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00016138>
- Nieuwenhuizen, N. E., Meter, J. M., Horsnell, W. G., Hoving, J. C., Fick, L., Sharp, M. F., Darby, M. G., Parihar, S. P., Brombacher, F., & Lopata, A. L. (2013). A cross-reactive monoclonal antibody to nematode haemoglobin enhances protective immune responses to *Nippostrongylus brasiliensis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(8), e2395. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002395>
- Nordholm, A., Kurtzhals, J. A. L., Karami, A. M., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2020). Nasal localization of a *Pseudoterranova decipiens* larva in a Danish patient with suspected allergic rhinitis. *Journal of Helminthology*, 94, e187 <https://doi.org/10.1017/S0022149X20000681>
- Paggi, L., & Bullini, L. (1994). Molecular taxonomy in anisakids. *Bulletin of the Scandinavian Society of Parasitology*, 4(2), 25–39.
- Paggi, L., Mattiucci, S., Gibson, D. I., Berland, B., Nascetti, G., Cianchi, R., & Bullini, L. (2000). *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda, Ascaridoidea): Nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. *Systematic Parasitology*, 45(3), 185–197. <https://doi.org/10.1023/A:1006296316222>
- Paggi, L., Nascetti, G., Cianchi, R., Orecchia, P., Mattiucci, S., D'Amelio, S., Berland, B., Bratney, J., Smith, J. W., & Bullini, L. (1991). Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the North Atlantic and Norwegian and Barents Seas. *International Journal for Parasitology*, 21(2), 195–212. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90010-5](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90010-5)
- Palomba, M., Paoletti, M., Colantoni, A., Ruggetti, A., Nascetti, G., & Mattiucci, S. (2019). Gene expression profiles of antigenic proteins of third stage larvae of the zoonotic nematode *Anisakis pegreffii* in response to temperature conditions. *Parasite*, 26, 52. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019055>
- Pérez-Pérez, J., Fernández-Caldas, E., Marañón, F., Sastre, J., Bernal, M. L., Rodríguez, J., & Bedate, C. A. (2000). Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 123(2), 120–129. <https://doi.org/10.1159/000024442>
- Pinel, C., Beaudévin, M., Chermette, R., Grillot, R., & Ambroise-Thomas, P. (1996). Gastric anisakidosis due to *Pseudoterranova decipiens* larva. *The Lancet*, 347(9018), 1829. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)91648-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)91648-7)
- Pomés, A., Davies, J. M., Gadermaier, G., Hilger, C., Holzhauser, T., Lidholm, J., Lopata, A. L., Mueller, G. A., Nandy, A., Radauer, C., Chan, S. K., Jappe, U., Kleine-Tebbe, J., Thomas, W. R., Chapman, M. D., van Hage, M., van Ree, R., Vieths, S., Raulf, M., & Goodman, R. E. (2018). WHO/IUIS allergen nomenclature: Providing a common language. *Molecular Immunology*, 100, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.003>
- Pritchard, D. I. (1995). The survival strategies of hookworms. *Parasitology Today*, 11(7), 255–259. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(95\)80206-1](https://doi.org/10.1016/0169-4758(95)80206-1)
- Quiazon, K. M. A., Yoshinaga, T., & Ogawa, K. (2011). Experimental challenge of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitology International*, 60(2), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.11.007>
- Rahmati, A. R., Kiani, B., Afshari, A., Moghaddas, E., Williams, M., & Shamsi, S. (2020). World-wide prevalence of *Anisakis* larvae in fish and its relationship to human allergic anisakiasis: A systematic review. *Parasitology Research*, 119(11), 3585–3594. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06892-0>
- Ramanan, P., Blumberg, A. K., Mathison, B., & Pritt, B. S. (2013). Parametrial anisakidosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3430–3434. <https://doi.org/10.1128/JCM.01398-13>
- Sánchez-Alonso, I., Carballada-Sangiao, N., González-Muñoz, M., Navas, A., Arcos, S. C., Mendizábal, A., Cuesta, F., & Careche, M. (2020). Freezing kinetic parameters influence allergenic and infective potential of *Anisakis simplex* L3 present in fish muscle. *Food Control*, 118, 107373 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107373>
- Santoro, M., Mattiucci, S., Paoletti, M., Liotta, A., Uberti, B. D., Galiero, G., & Nascetti, G. (2010). Molecular identification and pathology of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) infection in the Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Veterinary Parasitology*, 174(1), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.018>
- Sereda, M. J., Hartmann, S., & Lucius, R. (2008). Helminths and allergy: The example of tropomyosin. *Trends in Parasitology*, 24(6), 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.03.006>
- Severin, N. L., Yurchenko, M., Sørensen, J. S., Zuo, S., Karami, A. M., Kania, P. W., & Buchmann, K. (2020). Anisakid nematode larvae in the liver of Atlantic cod *Gadus morhua* L. from West Greenland. *Parasitology Research*, 119(10), 3233–3241. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06807-z>
- Shamsi, S., Briand, M. J., & Justine, J.-L. (2017). Occurrence of *Anisakis* (Nematoda: Anisakidae) larvae in unusual hosts in Southern hemisphere. *Parasitology International*, 66(6), 837–840. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.08.002>

- Shamsi, S., & Sheorey, H. (2018). Seafood-borne parasitic diseases in Australia: Are they rare or underdiagnosed? *Internal Medicine Journal*, 48(5), 591–596. <https://doi.org/10.1111/imj.13786>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Šimat, V., Miletić, J., Bogdanović, T., Poljak, V., & Mladineo, I. (2015). Role of biogenic amines in the post-mortem migration of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) larvae into fish fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.008>
- Smith, J. W. (1984). *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878): Length distribution and viability of L3 of known minimum age from herring *Clupea harengus* L. *Journal of Helminthology*, 58(4), 337–340. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00025232>
- Smith, J. W., & Wootten, R. (1975). Experimental studies on the migration of *Anisakis* sp. Larvae (Nematoda: Ascaridida) into the flesh of herring, *Clupea harengus* L. *International Journal for Parasitology*, 5(2), 133–136. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(75\)90019-3](https://doi.org/10.1016/0020-7519(75)90019-3)
- Strømnes, E. (2014). An in vitro study of lipid preference in whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) third-stage larvae. *Parasitology Research*, 113(3), 1113–1118. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3748-x>
- Strømnes, E., & Andersen, K. (1998). Distribution of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematoda, Ascaridoidea) L3 larvae in three species of marine fish; saithe (*Pollachius virens* (L.)), cod (*Gadus morhua* (L.)) and redfish (*Sebastes marinus* (L.)) from Norwegian waters. *Parasitology Research*, 84(4), 281–285. <https://doi.org/10.1007/s004360050396>
- Strømnes, E., & Andersen, K. (2003). Growth of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematodes, Ascaridoidea, Anisakidae) third-stage larvae in paratenic fish hosts. *Parasitology Research*, 89(5), 335–341. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0756-7>
- Sukhdeo, M. V. K., & Sukhdeo, S. C. (1994). Optimal habitat selection by helminths within the host environment. *Parasitology*, 109(S1), S41–S55. <https://doi.org/10.1017/S0031182000085073>
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*, 6(7), e21800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>
- Suzuki, S., Bandoh, N., Goto, T., Uemura, A., Sasaki, M., & Harabuchi, Y. (2021). Severe laryngeal edema caused by *Pseudoterranova* species. *Medicine*, 100(4), <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000024456>
- Timi, J. T., Paoletti, M., Cimmaruta, R., Lanfranchi, A. L., Alarcos, A. J., Garbin, L., George-Nascimento, M., Rodríguez, D. H., Giardino, G. V., & Mattiucci, S. (2014). Molecular identification, morphological characterization and new insights into the ecology of larval *Pseudoterranova cattani* in fishes from the Argentine coast with its differentiation from the Antarctic species, *P. decipiens* sp. E (Nematoda: Anisakidae). *Veterinary Parasitology*, 199(1–2), 59–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.033>
- Torres, P., Jercic, M. I., Weitz, J. C., Dobrew, E. K., & Mercado, R. A. (2007). Human Pseudoterranovosis, an emerging infection in Chile. *Journal of Parasitology*, 93(2), 440–443. <https://doi.org/10.1645/GE-946R.1>
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., & Uchida, A. (2008). Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International*, 57(1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.08.003>
- Weber, R. E. (1980). Functions of invertebrate hemoglobins with special reference to adaptations to environmental Hypoxia1. *American Zoologist*, 20(1), 79–101. <https://doi.org/10.1093/icb/20.1.79>
- Weber, R. E., & Vinogradov, S. N. (2001). Nonvertebrate hemoglobins: Functions and molecular adaptations. *Physiological Reviews*, 81(2), 569–628. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.569>
- Weitzel, T., Sugiyama, H., Yamasaki, H., Ramirez, C., Rosas, R., & Mercado, R. (2015). Human infections with *Pseudoterranova cattani* nematodes, Chile. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1874–1875. <https://doi.org/10.3201/eid2110.141848>
- Wickham, H. (2011). Ggplot2. *Wires Computational Statistics*, 3(2), 180–185. <https://doi.org/10.1002/wics.147>
- Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
- Young, P. C. (1972). The relationship between the presence of larval anisakine nematodes in cod and marine mammals in british home waters. *Journal of Applied Ecology*, 9(2), 459–485. <https://doi.org/10.2307/2402446>
- Zhu, X. Q., D'Amelio, S., Palm, H. W., Paggi, L., George-Nascimento, M., & Gasser, R. B. (2002). SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Parasitology*, 124, 615–623. <https://doi.org/10.1017/S0031182002001579>
- Zhu, X., Gasser, R. B., Podolska, M., & Chilton, N. B. (1998). Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 28(12), 1911–1921. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00150-7)

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Alt, K. G., Feldmeyer, B., Kochmann, J., & Klimpel, S. (2022). Gene expression and allergenic potential of *Pseudoterranova bulbosa* L3 from different infection sites in North Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Fish Diseases*, 00, 1–14. <https://doi.org/10.1111/jfd.13630>