

Actividad anti-*Anisakis* de diversos productos, epidemiología molecular y nuevos métodos de identificación de las especies hermanas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*

## TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Farmacia

**Magdalena Gómez-Mateos Pérez**



### Directores:

Adela Valero López

Concepción Navarro Moll

Departamentos de Parasitología y Farmacología

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Magdalena Gómez-Mateos Pérez  
ISBN: 978-84-1306-177-1  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/55632>



Actividad anti-*Anisakis* de diversos productos, epidemiología molecular y nuevos métodos de identificación de las especies hermanas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Lda.

Magdalena Gómez-Mateos Pérez para aspirar al grado de  
Doctora por la Universidad de Granada

Esta tesis ha sido posible gracias a la subvención de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía Ref. nº P07-CVI-03249, del proyecto de Investigación "Estudio epidemiológico y profiláctico de dos parasitosis emergentes: Leishmaniosis y Anisakiosis".

Granada, 18 de Enero de 2019

Universidad de Granada

©Copyright 2019. Esta tesis doctoral está protegida por derechos de autor.





Esta tesis doctoral no hubiera sido posible sin la **colaboración** de las siguientes personas e instituciones:

La profesora Dra. Joaquina Martín Sánchez, del departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, que permitió realizar algunos ensayos financiados por el grupo de Investigación de la Junta de Andalucía BIO-176.

El profesor Dr. Francisco Arrebola Vargas, del departamento de Histología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, quien llevó a cabo el procesamiento de las muestras histológicas utilizadas en esta tesis, a la vez que me enseñó a evaluar los resultados obtenidos.





Menos mal que los **agradecimientos** se escriben en primer lugar.

Porque ante todo esta tesis ha resultado en mi construcción personal, siendo éste el único apartado que no se puede discutir ni comparar ni reprochar.

De nada sirve introducir.

Pues aquellos que me han tendido generosamente su ayuda, impulsaron mi evolución de tal forma que han podido observar los cambios a los que pretendo aludir.

Volvería a escribir agradecimientos como apartado final del manuscrito.

Porque en mi caso estaré agradecida eternamente de la mañana a la noche, como cada día que pasé unida mentalmente a estas investigaciones; entendiendo que no solo es importante el comienzo aunque encuentres muchos parásitos a lo largo de los procedimientos.

Quiero nombrar en letras mayúsculas a mi directora Adela Valero; gracias por todo "grosso modo", y por el enorme esfuerzo y sacrificio realizados para que esta tesis saliera adelante. También a mi "jefa" del departamento de Farmacología, Concha Navarro, por la gran dirección y coordinación de los trabajos, y sus maravillosas enseñanzas.

Doy las gracias al departamento de Parasitología al completo, por acogerme tan bien en su casa y hacerme sentir parte de ella, y aguantarme tantas horas, días, etc. Gracias a Joaquina Martín por la satisfacción que me ha producido trabajar bajo su liderazgo y generosidad, y de la que me llevo varias lecciones aprendidas a la par que emocionantes momentos. Agradecer a Victoriano Díaz su dirección y dedicación para mi TFM, y sus constantes mensajes de ánimo.

Menciones especiales a Paco, Rocío y Javier, quienes siempre han estado para apoyar y dar. Luis, Marga y Pepa han sido unos estupendos motivadores y cooperadores, entre otros adjetivos. Gracias.

A mis compañeros de laboratorio, Gema, Lola, Víctor, Patri, Manolo, Sergio, Isa, Nieves, porque han sido mi referencia, ejemplo, compañía y complicidad, y grandes partícipes de mi trabajo. Además de los buenos ratos que hemos compartido dentro y fuera del departamento. A mi maestra en *Anisakis*, Mamen, que hizo tanto como pudo para que aprendiera las técnicas de laboratorio.

Gracias al departamento de Farmacología, por haber posibilitado la realización de algunos ensayos, y en especial a José Garrido y Miguel Romero. Al departamento de Microbiología, en particular a la profesora Teresa de la Rubia por su instrucción en una parte de mi TFM. A toda la Facultad de Farmacia y la Universidad de Granada, quienes con sus más y sus menos han permitido que mi trabajo acabe por materializarse en esta tesis doctoral. Un gran colaborador ha sido el profesor Francisco Arrebola, a quien agradezco su trabajo y dedicación en la parte de histología, así como sus consejos.

A mi familia, mis padres Eduardo y Rosario, mi hermano Eduardo, y a mi tía M<sup>a</sup> Dolores, por la comprensión y generosidad para que pudiera seguir adelante con todo. Así como al resto de mis tíos, y a mis primos, por el apoyo mostrado siempre que los necesito.

Pido disculpas también, por mis errores, y por mis momentos de parsimonia, que han prorrogado demasiado este culmen.





# Índice

<b>Introducción</b>	1
1. Generalidades	3
2. Taxonomía	5
3. Identificación (ID)	8
3.1. ID Morfológica	8
3.2. ID Genética	13
4. Relaciones genéticas entre las especies de <i>Anisakis</i> spp.	18
5. Aspectos ecológicos y epidemiológicos	21
5.1. Ciclo biológico	21
5.2. Distribución geográfica y hospedadores	23
5.3. Principales hospedadores intermediarios y/o paraténicos infectados	25
5.4. Factores de infección	33
5.5. Localización de las larvas y su patología en el pescado	35
5.5.1. Localización de las larvas	35
5.5.2. Patología en hospedadores intermediarios y/o definitivos	37
6. Anisakiasis humana	40
6.1. Casos epidemiológicos	40
6.2. Sintomatología y patología	43
6.3. Alérgenos de <i>Anisakis</i> spp.	48
6.4. Diagnóstico	50
7. Prevención y control de la anisakiasis	53
7.1. Legislación	53
7.2. Medidas profilácticas	56
8. Tratamiento farmacológico	61
8.1. Fármacos convencionales	62
8.2. Preparados fitoterápicos	65
<b>Justificación y objetivos</b>	69
<b>Material y métodos</b>	75
<b>Capítulo 1.</b> Tratamiento experimental de la anisakiasis aguda	77

1. Fármacos antiácidos y antihelmínticos	81
2. Enzimas proteolíticas	86
3. Extractos de granada ( <i>Punica granatum</i> )	88
4. Aceites esenciales sobre musculatura de pescado infectado	90
5. Disoluciones oleosas de tres saponinas	95
<b>Capítulo 2.</b> Epidemiología y factores de riesgo en la infección de la bacaladilla en el golfo de Cádiz	105
<b>Capítulo 3.</b> Gen $\beta$ -tubulina como marcador nuclear para la identificación de las especies hermanas <i>A. simplex</i> s.s. y <i>A. pegreffii</i>	109
<b>Resultados</b>	117
<b>Capítulo 1.</b> Tratamiento experimental de la anisakiasis aguda	119
1. Fármacos antiácidos y antihelmínticos	119
2. Enzimas proteolíticas	130
3. Extractos de granada ( <i>Punica granatum</i> )	135
4. Aceites esenciales sobre sobre musculatura de pescado infectado	137
5. Disoluciones oleosas de tres saponinas	145
<b>Capítulo 2.</b> Epidemiología y factores de riesgo en la infección de la bacaladilla en el golfo de Cádiz	155
<b>Capítulo 3.</b> Gen $\beta$ -tubulina como marcador nuclear para la identificación de las especies hermanas <i>A. simplex</i> s.s. y <i>A. pegreffii</i>	165
<b>Discusión</b>	185
1. Antiácidos y antihelmínticos	187
2. Enzimas proteolíticas	190
3. <i>Punica granatum</i>	194
4. Aceites esenciales	195
5. Saponinas	200
6. Epidemiología en la infección de la bacaladilla en el golfo de Cádiz	203

7. Identificación molecular de las especies hermanas <i>A. simplex</i> s.s. y <i>A. pegreffii</i>	207
<b>Conclusiones</b>	217
<b>Bibliografía</b>	221





# INTRODUCCIÓN



### 1. Generalidades

Las especies del género *Anisakis* son nematodos de vida marina cuyo ciclo biológico heteroxeno incluye hospedadores tales como crustáceos, peces, cefalópodos y mamíferos marinos, en los cuales se desarrolla hasta el estado adulto. El tercer estadio larvario (L3) puede infectar al hombre cuando éste ingiere pescado crudo, poco cocinado, ahumado, adobado, conservado en vinagre, o cocinado según otras especialidades gastronómicas, pudiendo ocasionarle un cuadro de síntomas conocido como “anisakiasis”.

La primera descripción de un gusano en un pez fue en el siglo XIII; sin embargo, no fue hasta 1845 cuando Dujardin describió un gusano en delfines como *Anisakis* (del griego *anisos* = desigual and *akis* = punto). Este nematodo se incluyó dentro de la clase Nematoda, Orden Ascaridida, y Familia Anisakidae (Boureé et al. 1995). A mediados del siglo XX empezó a comunicarse la existencia de prevalencias importantes en un gran número de pescados, valorándose entonces las pérdidas financieras en la industria del bacalao y sus efectos negativos en la salud pública (Smith and Wootten 1978).

El principal factor de riesgo para la infección y/o sensibilización a *Anisakis* es el consumo de pescado, un alimento básico de la pirámide alimentaria, para el que los estudios nutricionales avalan su aporte de proteínas de alto valor biológico y su riqueza en vitaminas, minerales y ácidos grasos  $\omega$ -3, a la vez que presenta un bajo contenido calórico. El consumo total de pescado ha ido aumentando a una tasa media de 1,5% por año desde 1961, hasta alcanzar los 20,2 kg per cápita en 2015, y actualmente está sobre 20,5 kg; dos tercios de este pescado se obtienen de la pesca de captura en aguas marinas y de interior, con el riesgo de que los peces puedan contener nematodos parásitos (Baird et al. 2014; FAO 2018). España es el segundo país consumidor de pescado de la UE per cápita/per año, con una cifra alrededor de 45 kg, la cual es similar a la de Japón; por delante se encuentra Portugal, donde a pesar de existir una de las tasas de consumo más altas del mundo (55,3 kg), solo se han

registrado algunos casos de anisakiasis (Marques et al. 2006; FAO 2016). La diferencia en la aparición de casos clínicos entre estas poblaciones podría radicar en la manera de cocinar el pescado, dado que los japoneses tienen la costumbre de comerlo crudo, como el sushi y el sashimi, mientras que los portugueses lo cocinan a elevada temperatura; en España a menudo se come una especialidad de pescado crudo marinado, los boquerones en vinagre, principal fuente e infección (Audicana and Kennedy 2008). Otros platos tradicionales con riesgo de provocar anisakiasis son el alici italiano (anchoas marinadas), el gravlax de los países nórdicos (salmón crudo), los arenques ahumados en Holanda, el lomi-lomi de Hawai (salmón crudo), el ceviche de América latina (pescado crudo aderezado con zumo de limón y especias), y el kinilaw de Filipinas (pescado crudo aderezado con vinagre y especias).

La primera regulación relativa al control de la anisakiasis en Europa la llevaron a cabo las autoridades sanitarias de Holanda en los años 1968-69, que permitía el comercio de arenques salados sólo si previamente se sometían a tratamientos para la desvitalización de las larvas (Panebianco and Lo Schiavo 1985); de esta forma se redujeron los casos de anisakiasis, que comenzaban a hacerse notables entre la población. La salazón y el marinado, utilizados en los métodos tradicionales, no eran eficaces para destruir las larvas de *Anisakis*, altamente resistentes y capaces de sobrevivir desde días hasta semanas, dependiendo de la concentración de sal y el tiempo de exposición; sin embargo, se ha observado que el proceso de salazón causa cambios estructurales en la cutícula de la larva, así como daño osmótico que modifica la permeabilidad de la membrana y provoca la liberación de iones y otros contenidos celulares (Karl et al. 1994; Sánchez-Monsalvez et al. 2005; Giarratana et al. 2012; Anastasio et al. 2016).

Recientemente, la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea ha subrayado la necesidad de nuevas investigaciones científicas encaminadas al desarrollo de métodos alternativos al tratamiento de congelación, el cual altera a las características organolépticas de los productos de pesca (Anastasio et al. 2016).

La acuicultura, una actividad en auge en el mundo desarrollado desde 1990, cuando empezó a superar las capturas globales en mar abierto (FAO 2016), presenta la ventaja de controlar la alimentación de las especies de peces cultivadas, posibilitando productos libres de *Anisakis* spp., lo cual evitaría no sólo la congelación, sino que permitiría la venta de pescado fresco caracterizado por un mayor atractivo comercial (D'amico et al. 2014).

## 2. Taxonomía

El sistema taxonómico seguido para *Anisakis* se basa principalmente en una filogenia apoyada en las secuencias 18S, incorporando además caracteres ontogénicos, biológicos y morfológicos (Blaxter et al. 1998; De Ley and Blaxter 2002, 2004; Navas 2012), y de acuerdo con los criterios de Mattiucci et al. (2005, 2018) para la identificación de las especies. Más recientemente, mediante la revisión taxonómica llevada a cabo por Ruggiero et al. (2015), se han realizado modificaciones hasta el nivel de infraorden.

Reino Animalia

Subreino Bilateria

Infrareino Protostomia

Superphylum Ecdysozoa

Phylum Nematoda

Clase Chromodorea

Subclase Plectia

Superorden Rhabditica

Orden Rhabditida

Suborden Spirurina

Infraorden Ascaridomorpha

Familia Anisakidae

Subfamilia Anisakinae

**Género *Anisakis***

*Clado 1:*

*Anisakis simplex* s.s.

*Anisakis pegreffii*

*Anisakis berlandi* (*simplex* C)



**Complejo *Anisakis simplex* s.l.**

*Clado 2:*

*Anisakis zaphidarum*

*Anisakis nascetti*

*Clado 3:*

*Anisakis physeteris*

*Anisakis brevispiculata*

*Anisakis paggiae*

*Clado 4:*

*Anisakis typica*

Inicialmente, la clasificación de *Anisakis* se realizó de acuerdo con las características morfológicas de las formas larvarias y de los adultos. Berland (1961), teniendo en cuenta la longitud del ventrículo esofágico, clasificó las larvas de *Anisakis* en tipo I, correspondiente a *A. simplex*, y tipo II, a *A. physeteris*. Davey (1971) aceptó tres especies válidas, *A. simplex*, *A. typica* y *A. physeteris*, utilizando como criterio la

longitud y el diámetro del ventrículo, el tamaño de las espículas y la distribución de las papilas caudales en el macho, así como la posición de la vulva en la hembra. Más adelante, Shiraki (1974), reconoce cuatro tipos de *Anisakis* atendiendo a características del ventrículo, mucrón, diente, porción terminal y estriaciones cuticulares de las larvas. Grabda (1976) catalogó la larva tipo I como *A. simplex* y la larva tipo II como *A. physeteris*, a partir de adultos obtenidos mediante cultivo *in vitro*.

Ninguna de las anteriores clasificaciones resultó útil para la identificación hasta la categoría de especie. A principios de los años 80, con la introducción de los métodos electroforéticos de isoenzimas, el panorama cambió radicalmente, y la detección de especies biológicas de anisákidos a través de la variación genética condujo al concepto de especie biológica (BSC) (Mattiucci and Nascetti 2008). Orecchia et al. (1986), a través de esta técnica, definieron la existencia de dos especies dentro del complejo *A. simplex* s.l., idénticas morfológicamente pero isoenzimáticamente distintas y con diferente localización geográfica: *A. simplex* A en zonas mediterráneas, principalmente, y *A. simplex* B en el mar del Norte. Más adelante, se sustituyó la denominación de *A. simplex* A por *A. pegreffii* (Campana-Rouget and Biocca 1955) y *A. simplex* B por *A. simplex* s.s. (Nascetti et al. 1986), y se halló el genotipo recombinante de ambas especies (Abollo et al. 2003). Mattiucci et al. (1997) descubrieron una nueva especie gemela dentro del complejo, *A. simplex* C, que fue renombrada como *A. berlandi* (Mattiucci et al. 2014). Estas tres especies del complejo habían sido anteriormente incluidas dentro de *A. simplex* Rudolphi (1809). En 1986 también, Mattiucci et al. habían caracterizado *A. physeteris* Baylish (1923) de la ballena *Physeter macrocephalus* L. Posteriormente, en 1998, Paggi et al. hallaron *A. ziphidarum*, una nueva especie aislada en ballenas de la familia Ziphiidae. Y en 2001, Mattiucci et al. separan reproductivamente *A. brevispiculata* Dolfus (1966) de *A. physeteris*, ambas del morfotipo II. Seguidamente, se incluye en el tipo I a *A. typica* Diesing (1860) (Mattiucci et al. 2002), y en 2005 se detecta *A. paggiae*, agrupada en el tipo II (Mattiucci et al. 2005). La última especie nominada fue *A. nascetti* (Mattiucci et al. 2009), previamente

descrita (Pontes et al. 2005; Valentini et al. 2006; Iglesias et al. 2008) aislándola reproductivamente de *A. ziphidarum*.

Mediante análisis aloenzimáticos y del ADN, se han descrito nuevos taxones que podrían ser especies hermanas, estrechamente relacionados con *A. ziphidarum* y *A. typica* dentro del clado I, y con *A. physeteris* dentro del clado II (Valentini et al. 2006; Mattiucci and Nascetti 2008).

### 3. Identificación (ID)

Conocer las principales características del parásito puede facilitar llevar a cabo una profilaxis adecuada y realizar el diagnóstico de la enfermedad, tanto en peces como en humanos. La identificación específica de la L3 según sus características morfológicas es limitada, mientras que resulta más fácil realizar la diferenciación mediante observación al microscopio en el estado adulto, especialmente de los machos. En ambas fases del ciclo biológico, las de mayor interés en los ámbitos epidemiológico (en donde la larva L3 ocupa toda la importancia sanitaria) y ecológico, se precisa de metodología molecular para una correcta distinción de la especie en cada morfotipo *sensu* Berland, el morfotipo I representado por las especies de los clados 1, 2 y 4, y el morfotipo II, formado por el clado 3.

#### 3.1. ID Morfológica

Como hemos dicho, en la L3 de estos nematodos no se observan apenas diferencias en su morfología, sino que se separan en morfoespecies (Mattiucci and Nascetti 2008).

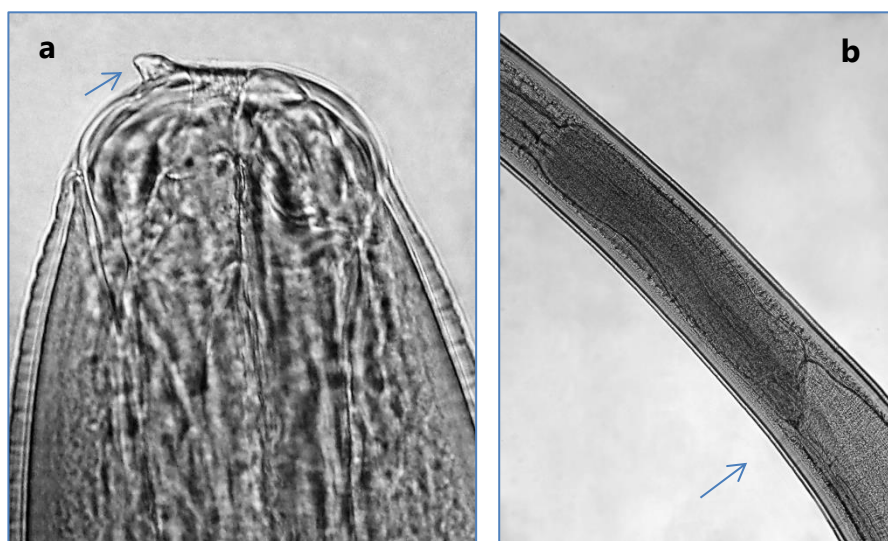
##### **La larva L3:**

El tercer estadio larvario es filiforme y puntiagudo en sus extremos. Su longitud puede variar desde 7 mm a más de 30 mm y con un diámetro de 0,40 a 0,55 mm, el cual es mayor en la parte media del cuerpo (Shiraki 1974; Huang 1988; Huang and



Bussiéras 1988; Sanmartín et al. 1994; Murata et al. 2011). El tamaño de las larvas tipo II es, por lo general, mayor que el de las tipo I, pero a veces esta diferenciación no es clara y dificulta su identificación.

En el extremo anterior presenta un diente de forma triangular, situado en posición ventral respecto a la boca, que usa para invadir los tejidos del hospedador, y una boca rodeada de tres prominencias prelabiales, una bilobulada dorsal y dos subventrales monolobuladas, entre cuya base se encuentra el poro excretor (Grabda 1976). Según Murata et al. (2011) hay variaciones en el tamaño y la posición del diente entre las especies de larvas tipo II, más paralelo al eje del cuerpo comparado con las de tipo I (Shiraki 1974).



**Fig. 1 (a) Morfología del diente situado en la parte anterior de la L3 de *Anisakis* tipo I. (b) Ventrículo esofágico de *Anisakis* tipo I observado al microscopio óptico (40x), donde se resalta la unión oblicua al intestino (flecha).**

De acuerdo con los trabajos de Buzzell and Sommerville (1985) el esófago está constituido por tres regiones: una primera preventricular, que es la más larga y está formada por células musculares radiales y una glándula en la parte dorsal; a continuación le sigue una pequeña región de transición con una glándula subventral

que termina en el intestino; y finalmente aparece el "**ventrículo**", una región de naturaleza glandular que se une con el intestino. La larva tipo I tiene un ventrículo largo (0,50-1,5 mm), y la unión con el intestino es de forma oblicua, mientras que en la de tipo II, la longitud del ventrículo es menor (0,22-0,75 mm), y la unión con el intestino es recta (Berland 1961; Koyama et al. 1969; Quiazon et al. 2008; Murata et al. 2011). Dentro del morfotipo I, las L3 de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* pueden diferenciarse en función de la longitud del ventrículo, siendo más largo el de la primera, entre 0,90 y 1,50 mm, que el de la segunda, entre 0,50 y 0,78 mm; este aspecto también se refleja en la relación esófago/ventrículo, que es mayor en *A. pegreffii* (1:3,08-1:4,7) comparado con *A. simplex* s.s. (1:1,9-1:2,8) (Quiazon et al. 2008). Por tanto, el rango de longitud del ventrículo de las larvas tipo II se solapa con el de *A. pegreffii*.

El extremo posterior de la larva es redondeado, y termina en una espina o mucrón en la larva tipo I; mientras que las del clado 3 (morfotipo II) carecen de este mucrón, o pueden tenerlo diminuto en el caso de *A. brevispiculata*, siendo el extremo de forma cónica en *A. phyteteris* y *A. paggiae*, pero en ésta última es más largo, lo cual hace que estas especies sean más fácilmente distinguibles (Berland 1961; Oshima 1972; Shiraki 1974; Murata et al. 2011). El recto está constituido por un canal oblicuo que finaliza en el ano. Existen tres glándulas rectales con forma de pera: dos dorsales y una ventral (Grabda 1976).

Aunque no permite establecer diferencias, la L3 está rodeada de la **cutícula**, de 1,5 µm de grosor (Fredericksen and Specian 1981), la cual es una matriz extracelular protectora requerida para mantener la forma del cuerpo y la interacción con el medio exterior, y de cuya integridad depende la viabilidad de la larva en gran medida. Cambia en cada estadio larvario mediante un proceso conocido como muda (Page et al. 2014). Algunos autores han sugerido que este parásito podría utilizar la cutícula para la absorción de nutrientes, ya que carecen de un intestino funcional (Mladineo et al. 2018).

### **El adulto:**

La identificación en esta fase es morfológicamente posible en algunas especies del morfotipo I, y ciertas características morfométricas se comparten entre las especies que pertenecen al mismo clado. Este estado está diferenciado en macho y hembra, siendo el macho más estudiado debido a que posee más características distintivas.

La longitud total del cuerpo de los machos es mayor en el tipo I que en el tipo II. En el complejo *A. simplex* s.l. esta longitud varía desde 26 a 112 mm, menor en *A. simplex* C, seguido por *A. pegreffii*, y mayor en *A. simplex* s.s. (Mattiucci et al. 2014); aunque también se han observado longitudes menores en *A. pegreffii* (14,30-20,55 mm) y *A. simplex* s.s. (17,68-29,65 mm) (Quiazon et al. 2008). En el tipo II, el de menor longitud es *A. paggiae* que mide 23-50 mm (Mattiucci et al. 2009).

Otro elemento diferenciador es el ventrículo glandular situado en la parte anterior, el cual es más largo que ancho en el morfotipo I (*sensu* Berland) y a menudo con forma sigmoide en el clado 1, mientras que es corto, nunca sigmoide, y más ancho que largo en el tipo II (clado 3). Mattiucci et al. (2005) indicaron que la longitud del ventrículo de *A. brevispiculata* es de 0,56-0,60 mm, y la de *A. paggiae*, de 0,35-0,40 mm y éste tiene forma de violín. En el clado 1, la longitud del ventrículo es de 0,55-0,90 en *A. pegreffii*, de 0,80-1,35 en *A. simplex* C, y de 1,08-1,44 en *A. simplex* s.s. (Mattiucci et al. 2014), de acuerdo con los valores reportados por Quiazon et al. (2008), quienes indicaron que la longitud del ventrículo se mantiene constante a medida que los gusanos crecen en longitud y se desarrollan desde la L3 al estado adulto.

En el extremo posterior, el macho adulto posee dos espículas u órganos genitales accesorios, las cuales varían en longitud y grosor. Éstas son cortas, gruesas y de longitud similar en el morfotipo II; en *A. physeteris* son más largas (0,35-0,40 mm), en *A. brevispiculata* algo menores (0,30-0,34 mm), y más cortas en *A. paggiae* (0,17-0,22 mm) (Mattiucci et al. 2005). En el morfotipo I, las espículas son largas y finas, en el clado 1 la longitud de las mismas es distinta, siendo esta diferencia más marcada en el

clado 4, y son de igual tamaño en el clado 2 (1,40-1,55 mm) (Mattiucci et al. 2009; Mattiucci et al. 2014).

Otra característica distintiva de los machos en el extremo caudal es el patrón de distribución de las papilas post-anales. Según Fagerholm (1989) se disponen así: numerosas papilas proximales en una fila ventrolateralmente, una papila mediana, un par de papilas proximales al lado de la cloaca, un par de papilas dobles procloacales, y cuatro pares de papilas distales que van desde el ano al final del extremo. En el tipo I, el tercer par de las papilas distales se localiza ventralmente dentro del cuarto par en *A. simplex* s.s., de manera similar que en *A. ziphidarum*, mientras que se encuentra fuera en *A. pegreffii* y *A. paggiae*; pudiendo diferenciarse *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* de las otras dos especies según la localización del primer y segundo par de las papilas distales (Davey 1971; Paggi et al. 1998; Quiazon et al. 2008). Por su parte, Mattiucci et al. (2014) encontraron una distribución similar de las papilas distales entre *A. pegreffii* y *A. simplex* C, no pudiendo considerar este carácter para distinguir las especies del complejo *A. simplex* s.l. En *A. nascetti*, el segundo, tercer y cuarto par de papilas se encuentran próximos entre sí (Mattiucci et al. 2009). En el morfotipo II, el primer y segundo par de papilas son del mismo tamaño y más grandes que el tercer y cuarto par, mientras que el segundo y cuarto están más cerca entre sí. Otros datos alométricos relativos a las papilas que se han evaluado son la anchura y la distancia entre ellas.

Los plectanes o placas cuticulares también se encuentran en el extremo caudal y funcionan como apoyo para las papilas genitales del macho. Son tres, y su forma y anchura son específicas en algunas especies, siendo un elemento clave para distinguir entre las especies del complejo *A. simplex* s.l., y entre *A. nascetti*, *A. ziphidarum* y *A. paggiae* (Mattiucci et al. 2005; Mattiucci et al. 2009; Mattiucci et al. 2014).

Se han determinado más caracteres morfométricos y alométricos en los machos de estas especies, como son anchura del cuerpo, longitud del esófago, longitud y forma de la cola y de la cabeza cefálica.

En la hembra, de mayor tamaño, la longitud del cuerpo y del ventrículo, así como la posición de la vulva, situada en el medio o primer tercio del cuerpo, son los principales caracteres estudiados en algunas especies.

### 3.2. ID Genética

La adopción de nuevas tecnologías ha solventado toda la controversia existente en relación a las especies de *Anisakis*, encontrando, primero en el análisis de isoenzimas y más tarde en la metodología molecular basada en el análisis de ADN, las claves para su caracterización hasta la categoría de especie.

#### **Isoenzimas/aloenzimas**

Las isoenzimas son enzimas que difieren en la secuencia de sus aminoácidos, pero que catalizan la misma reacción química. Presentan una carga eléctrica en solución, y, al aplicar un campo eléctrico se desplazan hacia el ánodo o el cátodo, lo cual, unido a su capacidad catalítica, permite obtener un conjunto de bandas característico. Los fenotipos hallados pueden traducirse en términos de genes y alelos, de forma que un genotipo homocigótico se representa con una sola banda, mientras que los individuos heterocigóticos presentan un número de bandas que será igual al número de subunidades proteicas que componen la enzima más uno.

Desde los primeros estudios, los análisis se han llevado a cabo utilizando hasta 19-24 loci aloenzimáticos (Nascetti et al. 1986; Mattiucci et al. 1986, 1997, 2001, 2002, 2005, 2009; Paggi et al. 1998), algunos de los cuales han permitido diferenciar el clado I del clado II, y entre algunas especies del clado I. El análisis de los loci Sod, Lap-1 y Adk-2 consigue distinguir *A. simplex* s.s. de *A. pegreffii* (Nascetti et al. 1986).

#### **Marcadores derivados del ADN**

##### *-Fragmento ITS 1-5, 8S-ITS 2 del ADN ribosómico*

El ADN ribosómico (ADNr) es una secuencia de ADN que codifica ARN ribosómico, y sus segmentos se agrupan en tándem. Estas secuencias contienen segmentos espaciadores transcritos (ITS) y no transcritos. Los espaciadores transcritos internos (ITS) se encuentran entre las regiones que codifican la subunidad menor (18S) y la

subunidad mayor (28S) del ARNr, y están divididos en ITS-1 e ITS-2 y separados por el gen que codifica el 5.8S del ARNr. El nivel bajo de polimorfismo permite la caracterización de cada especie usando sólo unos pocos ejemplares y hace que este ADN sea útil para la comparación interespecífica. Además, las repeticiones de las diferentes regiones de codificación del ADNr muestran distintas tasas de evolución. Como resultado de ello, este ADN puede proporcionar información sobre casi cualquier nivel sistemático (Hillis and Dixon 1991). El método consiste en el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism, por sus siglas en inglés, RFLP), obtenidos mediante digestión enzimática de los amplicones procedentes de la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés, PCR); el ADN fragmentado se somete a electroforesis en un gel de agarosa y el patrón de bandas resultante se observa en un transiluminador. Esta técnica permite la detección del ADN del parásito en pequeñas cantidades y en poco tiempo (Gasser et al. 1993), resultando fácil de ejecutar e interpretar.

Una de las primeras y destacadas caracterizaciones de un nematodo del género *Anisakis* a través de este método la llevaron a cabo Zhu et al. (1998), quienes utilizaron los cebadores NC5 (hacia adelante o forward, 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') y NC2 (reverso o reverse, 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') para realizar la PCR y establecieron las condiciones del termociclado. Con el objetivo de diferenciar las especies de *Anisakis*, poco después, D'Amelio et al. (2000) eligieron otros cebadores, A (hacia adelante o forward, 5'-GTCGAATTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA-3') y B (reverso o reverse, 5'-GCCGGATCCGAATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCT-3'), y probaron 16 enzimas de restricción distintas. Por tanto, la metodología de estos autores fue subsecuentemente implementada por otros investigadores (Kijewska et al. 2002; Abollo et al. 2003; Martín-Sánchez et al. 2005; Pontes et al. 2005; Marques et al. 2006; Farjallah et al. 2008a; Ceballos-Mendiola et al. 2010), indicando algunos que con los cebadores NC5/NC2 se consiguen mejores resultados que con los A/B. En cuanto a las enzimas de restricción, *TaqI* e *HinfI*, junto con *CfoI* han resultado ser las más útiles

para distinguir entre las especies, originando patrones moleculares específicos de especie (D'Amelio et al. 2000; Kijewska et al. 2002; Pontes et al. 2005; Farjallah et al. 2008a,b; Iglesias et al. 2008; Quiazon et al. 2009; Cavallero et al. 2011, 2012; Murata et al. 2011). La amplificación de esta región del ADN<sub>r</sub> produce un fragmento de aproximadamente 1 kb, en el que la longitud del ITS-1 en *A. simplex* s.l. es de 392 pares de bases (pb) y el contenido G+C, de 46,4%; el gen 5.8 S mide 157 pb, con un 51,6% de G+C; mientras que el ITS-2, 309 nucleótidos y 42,4% (Abattouy et al. 2016).

El análisis de las secuencias del fragmento ITS-1, 5, 8S, ITS-2 confirma la existencia de dos diferencias fijas en **ITS-1** entre las especies crípticas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* en las posiciones nucleotídicas 255 y 271, las cuales son dos transiciones C/T (Abollo et al. 2003; Abe et al. 2005; Ceballos-Mendiola et al. 2010). Así, mientras *A. simplex* s.s. tiene una T en ambas posiciones, *A. pegreffii* tiene una C. La existencia de estas dos diferencias permite distinguir ambas especies mediante la digestión enzimática del ADN; *TaqI* corta la secuencia correspondiente al nucleótido 271, e *HinfI*, al 255 (Abattouy et al. 2016). No hay diferencias fijas en los fragmentos 5,8S e ITS-2, por lo que su estudio no permite distinguir entre las dos especies. Desde la primera detección en 2003 (Abollo et al. 2003), muchos investigadores han encontrado un patrón genético combinado entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* en larvas L3 procedentes de peces capturados en las costas mediterráneas y atlánticas españolas (Martín-Sánchez et al. 2005; Marques et al. 2006), en aguas japonesas (Umehara et al. 2006), así como en el norte de África (Farjallah et al. 2008b); también se ha identificado este genotipo en adultos de *Anisakis*, en aguas de Japón y del norte de la Península Ibérica (Umehara et al. 2006; Cavallero et al. 2012). Estos individuos recombinantes se caracterizan por tener una hebra de ADN típica de *A. simplex* s.s. (T, T en posiciones 255 y 271) y otra hebra de *A. pegreffii* (C, C), y generan un patrón RFLP que es la suma de las bandas de ambas especies. En los últimos tiempos se está poniendo en tela de juicio su valor como método; sin embargo posee capacidad de desentrañar las causas de polimorfismos compartidos, como ha ocurrido en otras especies parásitas (Criscione et al. 2007; Steinauer et al. 2008).

Una herramienta de genotipaje post-PCR descrita para la diferenciación de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, es la fusión de alta resolución (High Resolution Melting, HRM), en la que se prueban los perfiles de fusión de los genotipos híbridos entre ambas especies (Cavallero et al. 2014). El ADN del ITS1 amplificado se somete a disociación en una PCR a tiempo real, en el que la fusión se lleva a cabo mediante incrementos de temperatura de 60 °C a 95 °C, y los perfiles se analizan mediante un *software*. Las dos especies y sus putativos híbridos mostraron perfiles claramente distintos para cada genotipo, coincidente con el análisis de sus secuencias nucleotídicas.

Este fragmento ribosómico o parte de él, también se ha utilizado para llevar a cabo otras técnicas basadas en la amplificación mediante PCR, como el polimorfismo conformacional de una sola banda (Single-Strand Conformational Polymorphism, SSCP), el cual detecta variaciones de un solo nucleótido que proporcionan una mayor variabilidad intraespecífica (Zhu et al. 1998); requiere mayor complejidad tanto en su realización como en su análisis.

#### *-Cox-2 del ADN mitocondrial*

Debido a su estructura relativamente conservada y a su mayor tasa de evolución, permite conseguir mayor variabilidad genética que con los genes nucleares, y tiene la ventaja de su mayor número de copias, lo cual se traduce en una amplificación mayor y más simple. Además, el ADN mitocondrial (ADNmt) tiene herencia materna, por lo que sus genes representan loci genéticamente independientes de los genes del núcleo, y por ello, carecen de recombinación genética.

El genoma mitocondrial de *A. simplex* s.l. es circular, tiene un tamaño de 13.916 pb y consta de 36 genes (Kim et al. 2006a). La subunidad II de la enzima citocromo oxidasa (**Cox-2**) es un elemento importante dentro de la cadena transportadora de electrones durante la respiración aeróbica, y de entre los loci del ADNmt, es el gen más ampliamente usado. Para su amplificación por PCR, se describieron los cebadores 211 (hacia delante o forward, 5'-TTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT-3') y 210 (reverso o



reverse, 5'-CACCAACTCTTAAAATTATC-3') (Nadler and Hudspeth 2000), los cuales amplifican a todos los Ascaridida y que permitieron obtener el 90% de su secuencia; las secuencias obtenidas mostraron un contenido A+T muy elevado (Nadler and Hudspeth 2000; Kim et al. 2006a). El análisis de las secuencias del gen *cox-2* de *Anisakis* spp. ha señalado la existencia de diferentes haplotipos dentro de las especies, poniendo de manifiesto variabilidad intraespecífica en las especies de este género (Ceballos-Mendiola et al. 2010; Mattiucci et al. 2014; Abattouy et al. 2016). Entre las especies hermanas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, se han detectado 11 diferencias fijas, siendo 10 transiciones y una transversión G/T en la posición 449 (Abattouy et al. 2016). Este método se ha utilizado para llevar a cabo estudios de filogenia y genética poblacional de *A. simplex* s.l. (Valentini et al. 2006; Kijewska et al. 2009; Baldwin et al. 2011; Cavallero et al. 2011). El fenómeno de introgresión mitocondrial observado entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, que también ha sido debatido por algunos autores, podría tener repercusión en la ecología de este parásito (Ceballos-Mendiola et al. 2010; Abattouy et al. 2016)

### -Otros genes nucleares

Los genes 18S y 28S del ADNr están muy conservados en las especies *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, por lo que se han empleado en la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD). Esta técnica se caracteriza por mostrar la variabilidad de un gran número de loci anónimos, teóricamente distribuidos por todo el genoma del parásito, dando lugar a marcadores genéticos polimórficos que son muy útiles para el estudio genético de las poblaciones (Martín-Sánchez et al. 2005).

Más recientemente, teniendo en cuenta la naturaleza críptica de las especies del complejo *A. simplex* s.l. y el conocimiento de la existencia de zonas simpátricas para *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, varios autores han intentado desentrañar la controversia generada debido a la detección del genotipo híbrido entre estas dos especies. Para lo cual, Mattiucci et al. (2016) han sugerido utilizar un nuevo locus del ADN nuclear, el

gen  $\alpha$ -1 del factor de elongación 1, cuya secuencia parcial de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* muestra una variación de nucleótidos fija para cada especie.

En esta dirección, otros autores han desarrollado el primer panel de microsatélites para *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, el cual es altamente polimórfico y sensible para ambas especies (Mladineo et al. 2017a). Se basa en el polimorfismo de un conjunto de repeticiones en la secuencia simple no codificante (SSR), los cuales son muy variables y no tienen utilidad para diferenciar entre las especies, pero podrían servir de ayuda para establecer la estructura genética de los anisákidos.

Otro gen es **Beta-tubulina** ( $\beta$ -TUB), el cual codifica para una de las dos subunidades esenciales de los microtúbulos presentes en las células eucarióticas, que constituyen uno de los componentes principales del citoesqueleto de estas células (Weisenberg 1972). Aunque esta proteína tiene un origen muy antiguo, su secuencia está altamente conservada en metazoos, incluidos los nematodos. Las diferencias son en su mayoría pronunciadas en las partes carboxi-terminales de la proteína, pero el fragmento N-terminal de la secuencia tiene una variación mínima (Kwa et al. 1994). Este alto grado de conservación sería impuesto por las limitaciones estructurales del ensamblaje y el desmontaje de microtúbulos (Burns 1991), y podría ser utilizado para la identificación de especies (Hansen et al. 2013; Tydén et al. 2013). La secuencia completa del gen de *A. simplex* ha sido descrita (GenBank® KP326559).

#### 4. Relaciones genéticas entre las especies de *Anisakis* spp. (Genética de poblaciones)

La **Genética de Poblaciones** es una rama de la ciencia que cuantifica la variabilidad mediante la descripción de los cambios en la frecuencia alélica, a través del tiempo, respecto a un carácter en particular, y analiza las causas que conducen a esos cambios. Una población se define como un grupo de individuos que comparten un ancestro común y tienen la posibilidad de aparearse. Los tres niveles de estructura poblacional

están constituidos por la población total, la cual se subdivide en subpoblaciones, compuestas a su vez de organismos individuales, entre los cuales existe un flujo de los genes característicos mediante la hibridación y el retrocruzamiento para el establecimiento de la población. Una población genética es la suma de las frecuencias alélicas de todos los genes en esa población, las cuales pueden cambiar como consecuencia de factores, como la diversidad genética, encontramos la mutación, migración, recombinación, selección y deriva genética (De Vicente et al. 2004). La estructura de la población genética de una especie se revela por la distribución de la variación genética entre especímenes en diferentes escalas espaciales y está muy influenciada por la metodología del estudio, es decir, isoenzimas frente a ADN y marcadores individuales o múltiples, que pueden ser nucleares o mitocondriales. Los marcadores utilizados deberían poder determinar con precisión si los polimorfismos compartidos detectados se deben a procesos de clasificación incompleta de linaje, introgresión histórica o hibridación contemporánea. La **hibridación** tiene consecuencias ecológicas y evolutivas debido a la introgresión de genes novedosos, lo que podría resultar en la evolución de genotipos más patógenos o genotipos con especificidad de huésped reducida (Seehausen 2004; King et al. 2015). Este hecho destaca la necesidad de centrarse en fenómenos aparentes de hibridación en el complejo *A. simplex*.

La filogenética es la parte de la biología evolutiva que se encarga de trazar la relación existente entre los ancestros y descendientes de los organismos, la filogenia, representando las relaciones evolutivas en forma de árbol. Los árboles filogenéticos surgen a partir de la teoría de que todos los seres orgánicos provienen del mismo ancestro común, que se ha diversificado evolutivamente a lo largo del tiempo. Los grupos se clasifican según su origen en monofiléticos, parafiléticos o polifiléticos. La realización de este tipo de estudios requiere emplear muchos caracteres, utilizándose actualmente los moleculares. La afinidad entre los individuos se calcula usando un coeficiente que se elige en función del estudio (índice de Jaccard, Nei, Manhattan, etc.), se selecciona el método de construcción de árboles (UPGMA, Neighbor-Joining

(NJ), análisis de parsimonia o de máxima verosimilitud, inferencia Bayesiana), y se verifica la fiabilidad del árbol construido, siendo el *bootstrap* uno de los métodos, el cual es un estadístico que determina los límites de confianza de las ramas internas del árbol. Todo ello es posible gracias al empleo de programas informáticos específicos que permiten su realización automática.

En la filogenia de *Anisakis*, los estudios realizados han utilizado la electroforesis de isoenzimas, el RAPD, y las secuencias ITS del ADNr y *cox-2* del ADNmt para generar los caracteres necesarios para la construcción de árboles, que nos muestran las relaciones entre los anisákidos (Martín-Sánchez et al. 2005; Nadler et al. 2005; Valentini et al. 2006; Farjallah et al. 2008a,b; Iglesias et al. 2008; Mattiucci et al. 2009; Quiazon et al. 2009; Romero López 2014; Abattouy et al. 2016). En los árboles se observan ramas separadas en función de los clados, donde el clado I está compuesto por los tres miembros del complejo *A. simplex* s.l., apareciendo una ramificación entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* soportada por el análisis de bootstrap (>50%) (Mattiucci 2018). La concordancia entre los árboles generados a partir de caracteres distintos (datos isoenzimáticos, secuencias ITS, *Cox-2*, etc...) o diferentes métodos (UPGMA, árboles consenso NJ, análisis máxima parsimonia, etc.) suele inspirar mayor confianza en los resultados obtenidos.

Para análisis intra-específicos, se utiliza el *cox-2* del ADNmt con el fin de mostrar la distribución de los haplotipos, la cual es panmíctica en las especies del complejo *A. simplex* en las costas pacíficas (Baldwin et al. 2011). Siguiendo el principio de parsimonia estadística, el método de Templeton, Crandall and Sing (TCS) determina la genealogía en el nivel poblacional incluyendo multifurcaciones y/o reticulaciones, es decir, redes, para lo que se utiliza el *software* TCS; tiene el inconveniente de clasificar las posiciones ambiguas como datos perdidos (Clement et al. 2000). Otro método para construir redes de datos de población es el *Median-joining* (MJ); combina características del algoritmo de Krustal para encontrar los árboles de alcance mínimo, favoreciendo las conexiones cortas, y el algoritmo heurístico de máxima parsimonia de Farris, el cual secuencialmente añade nuevos vértices llamados "vectores medianos"; el

programa asociado puede aplicarse a grandes tamaños de muestra y pequeñas distancias genéticas, ejecutando el estudio de forma rápida (Bandelt et al. 1999).

Otros algoritmos y programas empleados para investigar la estructura genética de la población a partir de caracteres moleculares e identificar la presencia de flujo génico entre las especies son la inferencia Bayesiana mediante el programa *Structure*, el cual usa genotipos multi-locus individuales para identificar el número óptimo de agrupaciones o *clusters* en un conjunto de datos, minimizando la teoría del equilibrio de Hardy-Weinberg (Pritchard et al. 2000).

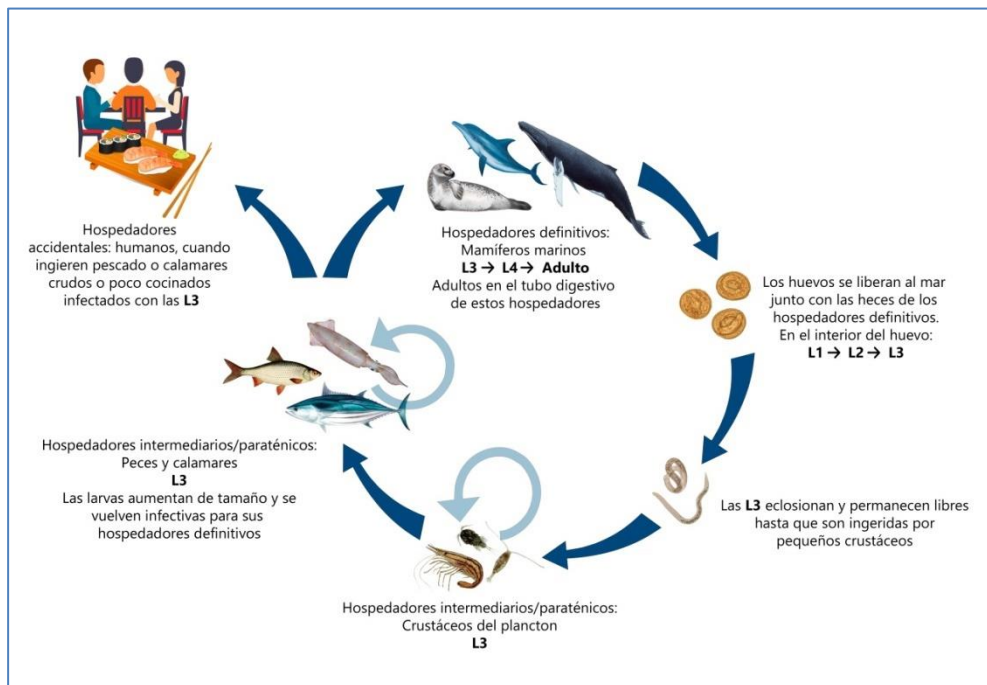
## 5. Aspectos ecológicos y epidemiológicos

### 5.1. Ciclo Biológico

Los parásitos adultos copulan dentro del hospedador definitivo, que son mamíferos marinos del Orden Cetacea (ballenas, delfines, orcas, cachalotes...) y, en ocasiones, pinípedos del Orden Carnívora (focas, leones marinos...). La hembra adulta deposita sus huevos de alrededor de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, que están cubiertos por una pared gruesa, en el estómago; estos huevos son eliminados por las heces del hospedador al mar, donde embrionarán. La viabilidad de los huevos en este medio varía en función de la temperatura del agua (Højgaard 1998). Dentro del huevo, el parásito sufre dos mudas, de L1 a L2, y de L2 a L3. Los huevos eclosionan y dejan libres a estas larvas L3 que pueden subsistir en el medio marino gracias a que aún permanecen envueltas en la cutícula de la larva L2, la cual le confiere resistencia al medio durante 6-7 semanas a una temperatura comprendida entre 5-7 °C, o durante 3-4 semanas a 13-18 °C (Van Banning 1971). Las larvas permanecen libres en el agua hasta que son ingeridas directamente por pequeños crustáceos, sobre todo eufáusidos del plancton (géneros *Thysanoessa*, *Euphassia*, *Nyctiphanes*, etc.) o indirectamente, a través de un copépodo que actúa como transportador, del cual se alimentan los crustáceos, los cuales juegan un papel intermediario y dentro de ellos la larva L3 se despoja de la cutícula de la larva

L2, crece y se hace infectiva para peces teleósteos y cefalópodos, entre los que pueden incluirse una gran diversidad de especies; la larva liberada en su tracto digestivo atraviesa la pared y se localiza en la cavidad corporal, donde no experimenta muda aunque puede aumentar su tamaño. Cuando los mamíferos marinos ingieren peces y cefalópodos con la L3, el parásito sufre dos mudas en el estómago antes de llegar al estado adulto, alcanza la madurez sexual y finaliza el ciclo.

Una persona puede convertirse en hospedador accidental del parásito si consume peces y cefalópodos infectados con la larva L3. En este caso la larva no evoluciona a la forma adulta y muere en pocas semanas (Smith and Wootten 1978; Cheng 1982; Petithory and Marty 1988), aunque se ha encontrado algún caso de desarrollo de la larva a L4 y al estado de transición entre L3 y L4 (Kagei and Isogaki 1992; Rosales and Mascaró 1999).



**Fig. 2** Ciclo de vida de *Anisakis* spp. (tomado de la Tesis doctoral de Molina Fernández 2018).

### 5.2. Distribución geográfica y hospedadores

En la distribución de estos helmintos marinos intervienen las condiciones climáticas e hidrográficas, así como las relaciones tróficas entre sus hospedadores. Parece existir un patrón de distribución de *Anisakis* spp. específico de especie en las distintas zonas geográficas, de acuerdo a las de sus respectivos hospedadores definitivos, lo cual debe tenerse en cuenta para comprender la ocurrencia y predecir la probabilidad de infecciones en una determinada área. Hasta la fecha, se ha verificado por métodos moleculares que unos 37 mamíferos marinos y más de 100 especies de peces pueden ser potenciales hospedadores de las especies anisákidas, con evidencias de que las especies más relacionadas genéticamente comparten preferencias de hospedador (Mattiucci and Nascetti 2008; Kuhn et al. 2011, 2013). Las especies del complejo *A. simplex* s.l. habitan grandes poblaciones de mamíferos de las familias Dolphinidae, Monodontidae y Phococeanidae, cuya materia fecal provocaría la dispersión de los parásitos, siendo las únicas especies que parasitan estos cetáceos, en todas las aguas oceánicas. A menudo ocurren en sintopía en la misma especie de hospedador definitivo en áreas donde sus rangos geográficos se superponen (Mattiucci et al. 2018).

***A. simplex* s.s.** se extiende entre 35 °N y el círculo Polar Ártico (80 °N), en las aguas del Atlántico y del Pacífico, este y oeste. Sus límites en el océano Atlántico nordeste son las aguas del estrecho de Gibraltar, pero puede encontrarse ocasionalmente en la parte oeste del mar Mediterráneo debido a la migración de peces pelágicos al mar de Alborán, e incluso alcanzar la costa de Túnez en el Mediterráneo central (Farjallah et al. 2008a), el mar Adriático (Mladineo et al. 2017a) o el mar Egeo (Chaligiannis et al. 2012; Pekmezci 2014). Esta especie ha sido notificada en 14 especies de cetáceos como hospedadores definitivos, principalmente delfines oceánicos, mientras que se ha albergado en su estado larvario en cuatro especies de cefalópodos y alrededor de 50 especies de peces (Mattiucci et al. 2018).

***A. pegreffii***, por su parte, es la especie dominante en el mar Mediterráneo, y también se distribuye ampliamente en el Atlántico entre 30 ° y 60 ° hasta la Península Antártica, aunque se ha encontrado en aguas chinas y japonesas. Su límite superior está representado por el noreste atlántico de las costas de la península Ibérica. Se ha notificado en el estado adulto en 10 especies de cetáceos, y las larvas en más de 60 especies de peces y en 5 de calamar. Los hospedadores definitivos *Delphinus delphis*, *Globicephala melas*, *Stenella coeruleoalba*, *Phocoena phocoena* y *Tursiops truncatus*, y unos 31 intermediarios/paraténicos (dos especies de cefalópodos y 29 peces, entre los cuales destacan *Trachurus trachurus*, *Micromesistius poutassou*, *Scomber scombrus* y *Lepidorhombus boschii*), comparten con *A. simplex* s.s. en el área de contacto de las aguas atlánticas portuguesas y españolas (Mattiucci and Nascetti 2006; Cavallero et al. 2011; Picó-Durán et al. 2016; Mattiucci et al. 2018). En efecto, las aguas de la Península Ibérica han mostrado ser una zona de confluencia de estas dos especies en condiciones de **simpatria**, con diferencias en la proporción de cada una de ellas entre las distintas zonas costeras (Martín-Sánchez et al. 2005; Hermida et al. 2012; Molina-Fernández et al. 2015). También la costa japonesa del Pacífico es una zona donde ambas especies comparten el hospedador *S. coeruleoalba* (Mattiucci et al. 2018).

*A. berlandi* (simplex C) muestra un rango discontinuo, incluyendo las aguas del Pacífico en Canadá/US, Chile y Nueva Zelanda, y la costa atlántica de Sudáfrica. Se ha aislado en el estado adulto de tres mamíferos de la familia Delphinidae y otras 3 especies de cetáceos, y en el estado larvario, en 11 especies de peces, cinco en sintopía con *A. pegreffii* (Mattiucci et al. 2018).

El rango de *A. typica* está comprendido entre 35-40 °N y 25 °S en clima cálido y aguas tropicales, donde se ha encontrado en estado adulto en 13 especies de delfines, y en el cachalote de la familia Kogiidae, y en estado larvario en unas 34 especies de peces (Anshary et al. 2014; Quiazon 2016).

Las especies hermanas *A. nascetti* y *A. ziphidarum* se distribuyen en el océano Atlántico este, cerca de las costas de Madeira y Marruecos, el Pacífico occidental entre



Nueva Zelanda y Australia, y la punta de Sudáfrica. Ambas especies comparten su preferencia por zífidos del género *Mesoplodon* spp.; sin embargo, hay escasos datos relativos a su infección de peces y cefalópodos (Mattiucci et al. 2018).

El complejo *A. physeteris* (*A. physeteris*, *A. paggiae* y *A. brevispiculata*) presenta una distribución homogénea en el océano Atlántico central, y en el mar Mediterráneo. Todas muestran preferencia por el cachalote enano *Kogia sima*, y el cachalote pigmeo *K. breviceps*. Se ha encontrado larvas de este complejo en pocas especies de hospedadores intermediarios/paraténicos, *A. physeteris* en 16 especies de peces, y 5 de cefalópodos, y *A. paggiae* y *A. brevispiculata* en unas 5-7 especies de peces (Mattiucci et al. 2018).

### 5.3. Principales hospedadores intermediarios/paraténicos infectados

Se han detectado alrededor de 155 especies de peces teleósteos, siendo las familias más representadas Scombridae (12), Gadidae (10), Carangidae (8), Clupeidae (7), Pleuronectidae (6), Lophiidae (4), Merluccidae (4) y Salmonidae (5) (Kuhn et al. 2013; Mattiucci et al. 2018). El ciclo de vida de *Anisakis* spp. incluye cadenas tróficas a través de la columna de agua, en consonancia con la ocurrencia de infección de crustáceos en todos los niveles de la columna; por ello se teoriza que *Anisakis* spp. podría tener menor especificidad por sus hospedadores intermediarios (Busch et al. 2012; Kuhn et al. 2013). En el caso de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, suelen ser peces bentopelágicos, pero con alta frecuencia también, pelágicos y demersales (Kuhn et al. 2013; Mladineo and Poljak 2014).

En el **hemisferio Sur**, donde se han llevado a cabo un menor número de estudios, se han registrado prevalencias de 98-100% para la merluza sudafricana (*Merluccius capensis*), el pez cinto (*Lepidopus caudatus*), la sardina angoleña (*Etrumeus whiteheadi*) y la sierra (*Thyrssites atun*) de las costas de Sudáfrica con elevadísimas abundancias medias (80,8-212), y de 95% para la merluza argentina (*Merluccius hubbsi*) de las islas Malvinas con alto valor de abundancia (90,5); en estos

hospedadores *A. pegreffii* fue la principal especie identificada (Mattiucci and Nascetti 2007). En Brasil se encontró una prevalencia entre 40 y 100% en los productos de pesca (Manfredi et al. 1994). La corvina de río (*Plagioscion squamosissimus*) ha presentado prevalencias dispares hacia el norte del Brasil, de 26, 100 y 10% (Melo et al. 2014; Vaz et al. 2015; Fontenelle et al. 2016); en otros pescados comercializados en Río de Janeiro también se encontró parasitación, como en el rape pescador (*Lophius gastrophysus*), congrio rosa (*Genypterus braziliensis*) y la pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*), aunque con baja prevalencia (1-14%) (Knoff et al. 2007, 2013; Fontenelle et al. 2013). Entre los peces de la costa de Chile se han registrado alrededor de 35 hospedadores para *A. simplex*, y 5 para *A. physeteris* (Fernandez and Villalba 1985; Riffo 1991; Torres et al. 1993; Oliva et al. 1996), alcanzándose prevalencias notables en la musculatura del congrio dorado (*Genypterus blacodes*) (Torres et al. 1983) y la merluza del Pacífico sur (*Merluccius gayi*) (Carvajal et al. 1979). Más recientemente en Australasia se han demostrado prevalencias del 100% en algunas especies de peces como *Neoplatycephalus richardsoni* y *Sillago flindersi* de aguas templadas, y *Scomberomorus commerson* y *Sphyræna forsteri* de aguas tropicales (Shamsi et al. 2011; Jabbar et al. 2012, 2013). En aguas de Indonesia, *Katsuwonus pelamis*, *Euthynnus affinis*, *Caranx* sp., y *Auxis thazard* tuvieron altas prevalencias de infección por *A. typica*, con intensidad media de 49,7 y 5,6 para *K. pelamis* y *A. thazard*, respectivamente (Anshary et al. 2014).

En el **hemisferio Norte** encontramos que en Japón, primer país consumidor de pescado crudo, los principales peces implicados en la infección humana son el estornino (*Scomber japonicus*) y el calamar (*Todarodes pacificus*) (Sugimachi et al. 1985; Oshima 1987; Muraoka et al. 1996). Las especies más importantes encontradas en el estornino, que ha mostrado un 100% de parasitación, han sido *A. simplex* s.s. en la costa Pacífica del mar de Japón, y *A. pegreffii* en la parte este del mar de China Oriental (Arizono et al. 2012). También epidemiológicamente relevantes son el bacalao del Pacífico (*Gadus morhua macrocephala*), el rodaballo del Pacífico (*Hippoglossus stenolepis*) y el greenling japonés (*Hexagramos otakii*) (Oshima 1987). En el mar

Amarillo de China, se registró una prevalencia de *A. pegreffii* de más del 25% en ocho especies de pescado, congrio del Pacífico (*Conger myriaster*), arenque del Pacífico (*Clupea pallasii*), dorado o pez-delfín (*Coryphaena hippurus*), rape chino (*Lophius litulon*), mújol (*Mugil cephalus*), *Pneumatophorus japonicus*, pez espada japonesa (*Scomberomorus niphonius*) y *Sebastiscus marmoratus*, aunque se han encontrado más de 100 especies de pescado infectadas con *Anisakis* spp. (Zhang et al. 2007). En el sur de Corea, la tasa de infección del congrio del Pacífico fue del 100%, con una intensidad de 8 larvas por pez, principalmente correspondientes a *A. pegreffii* y un 8% a *A. typica*; también se han encontrado prevalencias de infección importantes en el mar del Este y el mar del Sur, con una intensidad de 17 y 6 larvas en peces y cefalópodos del mar del Sur, respectivamente (Choi et al. 2011; Cho et al. 2012). *A. pegreffii* también ha sido la principal especie parásita de *Scomber japonicus*, *Trichurus lepturus* y otras 10 especies, y del cefalópodo *Todarodes pacificus* del mar Amarillo y mercados de Corea (Lee et al. 2009; Sohn et al. 2014), mientras que *A. simplex* lo fue del salmón chum (*Oncorhynchus keta*) de la costa este de Corea (Setyobudi et al. 2011).

En EEUU distintas especies de salmón (*Oncorhynchus nerka*, *O. keta* and *O. gorbuscha*) de la costa de Cordova (Alaska) mostraron una prevalencia de 100%, con más del 90% de las L3 de *A. simplex* s.s. presentes en el músculo de los peces (Karl et al. 2011). La sardina del Pacífico (*Sardinops sagax*), capturada en cinco zonas distintas a lo largo de la corriente de California, mostró una prevalencia de infección de 9,1%, sin diferencias entre las zonas y con una intensidad de 1-4 parásitos por pez, que albergó solamente a las tres especies del complejo *A. simplex* s.l. (Baldwin et al. 2011). El 41,6% del pescado de interés comercial capturado en Boston, San Francisco y Los Ángeles presentó anisákidos (Marquardt 2000).

En el norte de África, los parámetros de infección por estos parásitos han sido intermedios y bajos. Así, la abundancia de la infección por *Anisakis* en jurel (*Trachurus trachurus*) de la costa mediterránea africana fue de 0,92 (Farjallah et al. 2008a). Este mismo hospedador, junto con la merluza (*Merluccius merluccius*) y caballa (*Scomber*

*scombrus*), capturados en las costas de Mauritania y Marruecos, también mostraron abundancia media baja, siendo causada la parasitación principalmente por *A. pegreffii*, aunque intervinieron otras especies en menor medida como *A. typica* (Farjallah et al. 2008b). En el caso de la caballa, otro estudio registró diferencias en la prevalencia de infección entre las costas de Tetuán (57%) y Tánger (67,9%), también con bajos valores de abundancia y predominancia de *A. pegreffii* en ambas zonas, y prevalencia en el músculo de 98%; en estas costas, mediterránea y atlántica, se encontraron diferencias no significativas en la prevalencia del jurel, 52,8 y 56,8%, respectivamente, y reducida abundancia (Abattouy et al. 2011, 2014). La prevalencia de la merluza en la costa atlántica de Marruecos fue elevada, de casi un 88%; en las costas de Túnez, Argelia y Libia también tiene relevancia epidemiológica, donde la especie predominante es *A. pegreffii* (Valero et al. 2006b). En Egipto, en la merluza del mar Rojo se encontró una parasitación media-baja por *A. simplex* (Abou-Rahma et al. 2016).

Mientras que en Europa se ha encontrado una gran variedad de especies parasitadas, entre las cuales el arenque (*Clupea harengus*) tiene una prevalencia próxima al 100% (Van Thiel 1976; Mudry et al. 1986; Verhamme and Ramboer 1988; Campbell et al. 2007; Levsen and Lunestad 2010), el salmón noruego (*Salmo salar*), de 83,3% (Holst et al. 1993), y el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), de 88-100% (Perdiguero-Alonso et al. 2008; Nadolna and Podolska 2014). Otras especies epidemiológicamente relevantes son la caballa, la merluza, el carbonero (*Pollachius virens*) (Mudry et al. 1986; Chord-Auger et al. 1995), y la gallineta nórdica (*Sebastes marinus*) (Strømnes and Andersen 1998), con alta parasitación. La merluza, una especie muy consumida por los europeos, ha presentado prevalencias y abundancias elevadas en distintas zonas de las aguas atlánticas, donde *A. simplex* s.s. es la especie dominante (Huang 1988; Pereira-Bueno 1992; Mattiucci and Nascetti 2007; Henríquez-Santana and Villafruela-Cives and Henríquez-Santana 2009; Ceballos-Mendiola et al. 2010). Por su parte, la caballa es una especie comúnmente infectada, presentando prevalencia e intensidad intermedias-bajas en aguas escocesas y en el mar de Noruega (Petrie et al. 2005; Pekmezi et al. 2014), aunque también se ha encontrado un

registro con prevalencia de 52,6% (Levsen et al. 2005). En la zona mediterránea, varias especies de pescado con una alta prevalencia de *Anisakis* y notable intensidad de infección, principalmente *A. pegreffii*, se han encontrado en el mar Egeo, el mar de Liguria, el Adriático y las costas de Cerdeña, como jurel, estornino, caballa, bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), merluza, boquerón (*Engraulis encrasicolus*), doblada (*Oblada melanura*) y atún de granja (Lecis et al. 1996; Manfredi et al. 2000; MacKenzie et al. 2008; Angelucci et al. 2011; Chaligiannis et al. 2012; Smrzlić et al. 2012; Mladineo and Poljak 2014; Piras et al. 2014; Cipriani et al. 2015), mientras que no se encontraron infecciones en el mar Negro (Pekmezi et al. 2014). Sólo un 8,4% de prevalencia de la sardina (*Sardina pilchardus*) se ha indicado en la costa italiana del Adriático, incluso otros autores han indicado prevalencias casi nulas (Fioravanti et al. 2006). En cuanto a la prevalencia de infección del cefalópodo *Illex coindetii*, se han mostrado resultados diversos en el Mediterráneo, 30,5% en el mar Adriático (Petrić et al. 2011), 4,8% (Gestal et al. 1999), 25% en las aguas de Cerdeña (Angelucci et al. 2011) e incluso su nula presencia en el mar de Liguria (Serracca et al. 2013); en el Atlántico, se han registrado prevalencias de 10,6% (Abollo et al. 1998; Abollo et al. 2001). En la península Ibérica, en la costa atlántica de Portugal, la prevalencia de infección de la solleta (*Citharus linguatula*) fue elevada y alcanzó hasta el 85,3% en Peniche, donde sólo se encontró *A. pegreffii*, este hospedador también presentó infección por *A. simplex* s.s. y genotipo recombinante *A. simplex* s.s.-*A. pegreffii* en Figueira da Foz y Aveiro (Marques et al. 2006). En la costa atlántica portuguesa de la península Ibérica y Madeira se han encontrado prevalencias de infección de 73-100% para el besugo (*Pagellus bogaraveo*), una especie muy capturada en Portugal y España, y una intensidad de infección de 43,4 en Peniche, mientras que estos parámetros se redujeron significativamente en las islas Azores (36% y 2,7, respectivamente) (Hermida et al. 2012); la gallineta (*Helicolenus dactylopterus*) mostró prevalencias de 90-100% en estas zonas, alcanzado la mayor abundancia en Peniche (21,2). En estos estudios, en la mayor parte de las aguas portuguesas de la península sólo se encontraron larvas del complejo *A. simplex* s.l. incluyendo el genotipo híbrido *A. simplex* s.s.-*A. pegreffii*,

mientras que en las Azores, principalmente se halló *A. physeteris*, pero también hubo gran diversidad de especies, como en Sagres y Madeira (Sequeira et al. 2010; Hermida et al. 2012). En la costa norte de Portugal se ha indicado una prevalencia de infección de la sardina de 28,1%, y una intensidad media entre 1-7 parásitos (Silva and Eiras 2003).

En **España**, se han descrito prevalencias de infección en la mayoría de las especies de consumo habitual, mostrando un alto grado de infección jurel, bacaladilla y merluza, con diferencias entre la zona atlántica y mediterránea; en el caso de infección de la bacaladilla, la prevalencia de infección en el mar Mediterráneo fue de 66,7%, 19% o 9,3% (Valero et al. 2000; Madrid et al. 2012; Piras et al. 2014) frente al 80-100% en el Océano Atlántico (Viu et al. 1996; González Quijada et al. 2005; Chía et al. 2010; Madrid et al. 2012; Cipriani et al. 2015), o para la merluza, la capturada en el Atlántico presentó una prevalencia de 88% mientras que la del Mediterráneo, de 41,3% (Valero et al. 2006a); también se observó esta tendencia en el jurel (Adroher et al. 1996). En Galicia concretamente, cinco especies tuvieron prevalencias del 100%, tintorera (*Prionace glauca*), aguja (*Belone belone*), merluza, rape (*Lophius piscatorius*), y cabracho (*Scorpaena scrofa*), del 75-90%, bacaladilla, jurel, chopo (*Spondylisoma cantharus*) y caballa, y en torno al 30% para los cefalópodos *Todarodes sagittatus* y *T. eblanae*; *A. simplex* s.s. se encontró en el doble de especies de pescado que *A. pegreffii*, la cual además, no parasitó ningún cefalópodo, aunque sí compartieron algunos hospedadores (Abollo et al. 2001). Sin embargo, se ha observado una escasa o nula infección de sardinas en las costas españolas (De la Torre Molina et al. 2000; Viu et al. 1996; Abollo et al. 2001; Rello et al. 2008; Gutiérrez-Galindo et al. 2010), aunque con mayor prevalencia en la costa noroeste de la Península Ibérica (Molina-Fernández et al. 2015). En el golfo de Cádiz, se encontró una alta prevalencia de *Anisakis* en la bacaladilla pero la abundancia representa un valor intermedio a los encontrados en aguas atlánticas y mediterráneas (Ojeda-Torrejón et al. 2001), con un porcentaje de *A. pegreffii* ligeramente superior al de *A. simplex* s.s.. Los cefalópodos, por su parte, constituyen una porción importante de las especies capturadas en el mar

Mediterráneo español, donde se ha encontrado una prevalencia en *Anisakis* de 12% en la pota *Illex coindetii*, siendo la infección principalmente provocada por *A. pegreffii* (Pico-Durán et al. 2016), pero no en otras especies de cefalópodos. Otro pez muy relevante en la gastronomía española es el boquerón, en el cual se ha encontrado baja prevalencia de infección (<5,6%) en estudios de pescados comercializados en distintos puntos del país, Madrid, Córdoba, Bilbao y Zaragoza (Cuellar et al. 1991; De la Torre-Molina et al. 2000; Pereira-Bueno 1992; Viu et al. 1996), así como en las costas de Cataluña (Osanz Mur 2001; Rello et al. 2009) y del mar de Alborán (Rello et al. 2009); sin embargo en la costa atlántica del golfo de Cádiz fue más elevada (13,1%) (Rello et al. 2009). También se realizó un estudio de este hospedador y de faneca (*Trisopterus luscus*) adquiridos en Merca-Granada, registrándose una prevalencia de *Anisakis* de 9,3 y 25%, respetivamente (Rello et al. 2004).

La **bacaladilla (*M. poutassou*)** es un pez común en el océano Atlántico nordeste y en el mar Mediterráneo. Es una especie batipelágica de la familia de los gádidos que puede vivir entre 150 y 3000 m de profundidad, más frecuentemente entre 200 y 400 m; se alimenta fundamentalmente de pequeños crustáceos, aunque los individuos de mayor tamaño también son depredadores de pequeños peces y cefalópodos (Cohen et al. 1990; Svetovidov 1986). Este hospedador tiene una gran importancia comercial y pesquera, con altas cuotas de captura anuales; según Food and Agriculture Organization of the United Nations, fue la quinta especie de captura con mayor importancia en 2006 (FAO, SOFIA). Este hecho, unido a su bajo precio en el mercado hace que sea un pescado muy consumido en el sur de Europa.

**Tabla 1 Resumen de los estudios epidemiológicos de la infección por *Anisakis* en la bacaladilla (*M. poutassou*). Ensayos publicados.<sup>a</sup> (Molina-Fernández et al. 2018).**

Reference	Hosts analyzed	Origin-FAO fishing zone	Prevalence of L3 <i>Anisakis</i> spp.	Mean intensity (range)	Parasites in muscle P; MI <sup>b</sup> (range)	Species
Poljanskij, 1955	5	Barents Sea-27.I	40%	1		<i>Anisakis</i> sp.
Berland, 1961	12 3	Hordaland, W Norway-27.IVa Tromsø. N Norway-27.IIa	58.3% 100%			<i>Anisakis</i> sp. Type I <i>Anisakis</i> sp. Type I
Raitt, 1968 <sup>c</sup>	20 20	Faroe Islands-27.Vb W Scotland-27.VIa	100% 25%	14 1	Yes	<i>Anisakis</i> sp. <i>Anisakis</i> sp.
Reimer et al., 1971	80 100	W Ireland-27.Va NW Iceland-27.Va	67.8% 70%			<i>A. simplex</i> <i>A. simplex</i>
Wootten and Smith, 1976	610	W Scotland-27.VIIb	97.4%	54.9	MI= 5.2-18-6	<i>Anisakis</i> type I
Richards, 1977	? ?	W Scotland-27.VIIb Faroe Islands-27.Vb	13-24% 27-32%			<i>Anisakis</i> sp. <i>Anisakis</i> sp.
Bussmann and Ehrich, 1978	4100	Faroe Islands-27.Vb	High		MI= 3.5-7.2	<i>Anisakis</i> sp.
Grabda, 1978	50	N Ireland-27.VIa	98%	(7-679)	P= 88%; MI= 5.6 (1-20)	<i>Anisakis</i> sp.
Smith and Wootten, 1978	980	W and Scotland-27.VIa	92.3%	(1-583)	Yes	<i>Anisakis</i> sp.
Mackenzie, 1979	74	W and N Scotland-27. VIa	74.3%		Yes	<i>Anisakis</i> sp.
Højgaard, 1980	458	Faroe Islands-27.Vb	High		P= 83.6%	<i>A. simplex</i>
HghKusz and Treder, 1980	30	Faroe Islands-27.Vb	100%	60 (1-239)	P= 63.3%; MI= 4.3 (1-19)	<i>A. simplex</i>
Schultz et al., 1980	829	Norwegian Sea-27.IIa	Yes		Yes	<i>Anisakis</i> sp.
Zubchenko et al., 1980	175	Norwegian Sea-27.IIa	Yes		P= 99.4%; MI= 5.5 (1-34)	<i>Anisakis</i> sp.
Giedz, 1981	67 1235	Celtic Shelf-27.IVa Faroe Islands-27.Vb	Yes Yes		P= 27% P= 33.3%	<i>Anisakis</i> spp. <i>Anisakis</i> spp.
Karasev et al., 1981	269	Norwegian Sea-27.IIa	99.2%	43.8	P= 37.9%; MI= 1.5	<i>Anisakis</i> sp.
Dumke, 1988	2107	North Atlantic-27.IIa, IIb, III., Vb, XIVa	Yes		P= 54.1-99.5%	<i>Anisakis</i> sp.
Orecchia et al., 1989	487	Italian waters, Mediterranean Sea 37.1.3 and 37.2	Yes			<i>A. pegreffii</i> <sup>h</sup> (P= 62.1%) <i>A. physeteris</i> <sup>g</sup> (P= 2.7%)
Sanmartín Durán et al., 1989	67	W Galicia, NW Spain-27.VIIIc, IXa	62.3%	5.8		<i>Anisakis</i> type I
Cuéllar et al., 1991	40	Valencia Gulf, E Spain-37.1.1	30.3%	(1-10)		<i>Anisakis</i> type I
Pereira-Bueno, 1992	42	Bilbao (Spain) fishmarket	88.1%	33.5	P= 52.4%; MI= 21.9	<i>A. simplex</i>
Ruiz-Valero et al., 1992	299	Granada (Spain) fishmarket	Yes	13.3	P= 29.1; MI= 7.0 (1-56)	<i>A. simplex</i> (P= 67.9%) <i>Anisakis</i> sp. (P= 2.3%)
Køie, 1993	10	Faroe Islands-27.Vb	100%			<i>A. simplex</i> s.l.
López Giménez and Castell Monsalve, 1994	82	Castilla La Mancha (Spain) fishmarkets	29.3%			<i>Anisakis</i> spp.
Sanmartín et al. 1994	179	W Galicia, NW Spain-27.VIIIc, IXa	67%	5.9	P= 20%	<i>A. simplex</i>
Viu et al., 1996	62	Zaragoza (Spain) fishmarket	85.5%	7.1 (1-61)	P= 9.4%	<i>Anisakis</i> type I <i>Anisakis</i> type II
Pereira-Bueno and Ferre-López, 1997	11	Castilla y León (Spain) fshmakerts	63.6%			<i>A. simplex</i>
Manfredi et al., 2000	345	Ligurian Sea-37.1.3	32.4-65.5%	1.5-2.3		<i>A. simplex</i>
Valero et al., 2000 <sup>d</sup>	301	Motril Bay, N Alborán Sea-37.1.1	9%	1.2 (1-4)	P= 0.3%; MI= 1.0	<i>A. pegreffii</i> <sup>h</sup> (P= 6.7%) <i>A. physeteris</i> s.l. (P= 2.7%)
Ojeda-Torrejón et al., 2001	390	Gulf of Cádiz, SW Spain-27.IXa	53.6%		Yes	<i>A. simplex</i>
Osanz-Mur. 2001	562	Tarragona waters, E Spain-37.1.1	25.1%	1.3 (1-3)	Yes	<i>Anisakis</i> spp.
Silva and Eiras, 2003	65	W Portugal-27.IXa	93.8%	14.3 (1-89)	Yes	<i>Anisakis</i> sp.
Fernández et al., 2005	400	Rias Baixas, Galicia, NW Spain-27.IXa	99.3%	11.1	Yes	<i>A. simplex</i> s.l. <i>A. physeteris</i> <sup>g</sup> (P= 0.25%; La= 0.04%)
Martín-Sánchez et al., 2005	401	Mediterranean coasts of Spain-37.1.1	9.1%			<i>A. pegreffii</i> <sup>h</sup> (La= 59.3%) <i>A. simplex</i> s.s. <sup>g</sup> (La= 18.5%) Hybrids <sup>h,g</sup> (La= 18.5%) New genotype type I <sup>h</sup> (La= 3.7%) <i>A. pegreffii</i> <sup>h</sup> (La= 20%) <i>A. simplex</i> s.s. <sup>g</sup> (La= 66.7%) Hybrids <sup>g</sup> (La= 13.3%)
		Atlantic coasts of Spain-27.VIIIc, IXa	81.7%			



<b>Cruz et al., 2007</b>	238	Matosinhos, NW Portugal-27.IXa	77.7%	5.8 (1-122)	P= 27.7%; MI= 2.0	<i>Anisakis</i> sp.
<b>Mattiucci and Nascetti, 2007</b>	?	Mediterranean Sea-37	48.5%	(1-12)		<i>A. pegreffii</i> <sup>f</sup>
<b>Chía et al., 2011</b>	16	NW Spain-27.VIIIc, IXa	100%	55.9	P= 37%; MI= 24.2 (1-327)	<i>Anisakis</i> type I
<b>Angelucci et al., 2011</b>	16	Sardinia-37.1.3	87.5%	10	P= 62.5%; MI= 1.4	<i>Anisakis</i> type I (P= 81.2%) <i>Anisakis</i> type II (P= 12.5%)
<b>Meloni et al., 2011</b>	17	Sardinia-37.1.3	82.4%			<i>A. pegreffii</i> <sup>f</sup> (La= 90.6%) <i>A. physeteris</i> <sup>g</sup> (La= 1.3%) Hybrids <sup>g</sup> (La= 8.1%)
<b>Tedde et al., 2011</b>	57	N Sardinia-37.1.3	61.4%	3.9 (1-50)	P= 10.5%	<i>A. pegreffii</i> <sup>fh</sup> <i>A. physeteris</i> <sup>g</sup> (P= 5.3%)
<b>Madrid et al., 2012</b>	169	NE Atlantic-27.VIIIc, IXa	78%	(1-95)	P= 39%	<i>A. simplex</i> s.l.
<b>Romero et al., 2013<sup>d</sup></b>	115 ? ?	W Mediterranean Sea-37.1 Mediterranean coast of Spain-37.1.1  Atlantic coasts of Iberian Peninsula-27.VIIIc, IXa	19% Only surveyed type I "	(1-219)	P= 7%	<i>A. simplex</i> s.l. <i>A. pegreffii</i> <sup>f</sup> (La= 64%) <i>A. simplex</i> s.s. <sup>g</sup> (La= 19%) Hybrids <sup>g</sup> (La= 17%) <i>A. pegreffii</i> <sup>f</sup> (La= 28%) <i>A. simplex</i> s.s. <sup>g</sup> (La= 49%) Hybrids <sup>g</sup> (La= 23%)
<b>Romero et al., 2014<sup>d</sup></b>	?	Mediterranean coast of Spain-37.1.1  Atlantic coast of Iberian Peninsula-27.VIIIc, IXa	Only surveyed type II "			<i>A. physeteris</i> <sup>g</sup> (La= 55%) <i>A. paggiae</i> <sup>g</sup> (La= 45%) <i>A. physeteris</i> <sup>g</sup> (La= 45%) <i>A. paggiae</i> <sup>g</sup> (La=50%) <i>A. brevispiculata</i> <sup>g</sup> (La= 5%)
<b>Piras et al., 2014</b>	57	Gulf of Asinara, N Sardinia-37.1.3	High	(1-50)	P= 14%; MI= 1	<i>A. pegreffii</i> <sup>gh</sup> (P> 66.7%) <i>A. physeteris</i> <sup>g</sup> (P= 10.5%)
<b>Gómez-Mateos et al., 2016</b>	100	Gulf of Cadiz, SW Spain-27.IXa	82%	16 (1-328)	P= 38%	<i>A. simplex</i> s.s. <sup>g</sup> (La= 50%) <i>A. pegreffii</i> <sup>fh</sup> (La= 42.7%) Hybrids <sup>gh</sup> (La= 7%) <i>A. typica</i> (La= 0.25%)
<b>Molina-Fernández et al., 2018</b>	140	Villajoyosa port (E Spain)-37.1.1	29.3%	1.8 8 (1-12)	P= 2.1%; MI= 1.3 (1-2)	<i>A. pegreffii</i> <sup>fh</sup> (P= 19.3%; La= 55.4%) <i>A. simplex</i> s.s. <sup>gh</sup> (P= 0.7%; La= 1.3%) Hybrids <sup>g</sup> (P= 2.1%; La= 4.1%) <i>A. physeteris</i> <sup>g</sup> (P= 10%; La= 39.2%)

<sup>a</sup> In some surveys the occurrence of other anisakids has been studied: *Hysterothylacium aduncum* L3 has been detected with high prevalence, and less frequently L4 and adults of *H. aduncum*. Also, the presence of L3 of *Hysterothylacium* sp., *Contracaecum* sp., *C. osculatum*, and *Pseudoterranova decipiens* has been occasionally reported. See also Karasev (1990).

<sup>b</sup> P. prevalence; MI. mean intensity.

<sup>c</sup> Data from Dr. Kabata.

<sup>d</sup> Data calculated from the reference.

<sup>e</sup> La= percentage of *Anisakis* larvae.

<sup>f</sup> Hybrids: recombinant genotype of *A. pegreffii* and *A. simplex* s.s.

<sup>g</sup> Molecular identification.

<sup>h</sup> Also detected in muscle.

En productos de acuicultura, la infección por *Anisakis* se ha observado en el pulpo común (*Octopus vulgaris*) cultivado en aguas de Galicia, siendo la fuente infectiva la alimentación con peces marinos infectados (Abollo et al. 2001).

#### 5.4. Factores de infección

Uno de principales factores que se han relacionado con los parámetros de infección de hospedadores intermediarios/paraténicos de *Anisakis* spp. es el área de pesca. Las prevalencias registradas para varias especies de pescado fueron diferentes

según la **localización geográfica**, mayores en la región atlántica y más bajas en la costa Mediterránea, como ocurre en la bacaladilla (Valero et al. 2000; Chía et al. 2010), merluza (Valero et al. 2006a), sardina (Karl 2008; Molina-Fernández et al. 2015), estornino (Abattouy et al. 2011), caballa (Levsen et al. 2017), boquerón (Rello et al. 2009) o jurel (Adroher et al. 1996). Sin embargo, Abattouy et al. (2014) no registraron diferencias entre las aguas atlánticas y mediterráneas de las costas de Marruecos.

La asociación entre la parasitación y el **tamaño del pez** ha sido muy estudiada, encontrándose una mayor tasa de infección en los peces más grandes (longitud o peso), dándose este hecho en la bacaladilla (Bussman and Ehrich 1978; Valero et al. 2000; Cruz et al. 2007; Madrid et al. 2012) y en otras especies (Adroher et al. 1996; Rello et al. 2009; Abatouy et al. 2011, 2014; Setyobudi et al. 2011; Madrid et al. 2012; Hermida et al. 2012; Anshary et al. 2014; Molina-Fernández et al. 2015; Bušelić et al. 2018a). La correlación positiva entre este factor y la carga parasitaria es consecuencia directa de la acumulación de parásitos a lo largo de la vida del pez de acuerdo a sus hábitos alimentarios, y dependerá a su vez de la edad del pez; el cambio ontogénico en la alimentación a presas de mayor tamaño está relacionado en esta dirección (Klapper et al. 2015). Otros autores no han encontrado esta correlación positiva, así en caballas se dio mayor prevalencia en las de menor longitud, sugiriéndose que las más jóvenes tienen menor resistencia inmunológica al parásito (Levsen et al. 2017). Otros factores asociados al **peso y longitud total** del pescado son el peso tanto del hígado como de las gónadas, dos parámetros implicados en la preparación para la reproducción, cuyo aumento está relacionado con un mayor riesgo de infección (Abattouy et al. 2011, 2014). Por el contrario, el sexo del pescado no ha sido asociado con la parasitación (Silva and Eiras 2003; Abattouy et al. 2011, 2014).

Respecto a los registros de valores de parasitación según la **época del año**, los estudios sugieren que la prevalencia es mayor en primavera y menor en otoño (Strømnes and Andersen 2000; De la Torre-Molina et al. 2000). También se ha registrado un aumento de los parámetros de parasitación en la estación más cálida (Gutiérrez-Galindo et al. 2010; Mladineo et al. 2012), y otros autores lo han detectado

en invierno y otoño (Abattouy et al. 2011), pudiendo esto explicarse por cambios en la población de eufásidos infectados (Smith and Wootten 1978).

### 5.5. Localización de las larvas y su patología en el pescado

#### 5.5.1. *Localización de las larvas*

Tras penetrar la pared del estómago en el pez, normalmente la larva se halla **encapsulada** en forma de espiral aplanada bajo el tejido conectivo de las vísceras, como el hígado o las gónadas, entre los mesenterios o en la pared externa del sistema digestivo, aunque también podemos encontrarla **libre** en la cavidad corporal y dentro de los órganos viscerales, o en la musculatura ventral y dorsal (libre o enrollada), siendo la infección de la musculatura de gran importancia porque es la parte de habitual consumo humano (Smith and Wootten. 1978; Petersen et al. 1993; Abollo et al. 2001). De cualquier modo, la ubicación del parásito está sujeta a una serie de factores, como son: la especie del pescado. la alimentación (en los peces piscívoros las larvas suelen estar presentes también en la musculatura hipoaxial que rodea la cavidad corporal, mientras que en los no piscívoros tienden a acumularse principalmente en las vísceras y en la cavidad corporal), el tamaño, la edad, el grado de infección (generalmente se encuentra un mayor número de parásitos en el músculo cuanto mayor número de larvas presenten las vísceras del pescado. y mayor sea el peso total del hospedador o su edad), y las condiciones de almacenamiento después de su captura, entre otros (Smith 1984; Valero et al. 2006a; Chía et al. 2010; Gutiérrez-Galindo et al. 2010). Dado la observación de larvas en la carne de ejemplares recién pescados, se ha planteado la **migración de las larvas a la musculatura** del pez como un proceso natural del ciclo de vida de estos nematodos (Šimat et al. 2015), aunque la migración tras la muerte del pez es un tema controvertido, en el que se discute la influencia de algunos de los factores descritos. Entre ellos, la reducción del tiempo entre la captura del pescado y su evisceración se considera una de las principales medidas profilácticas de la anisakiasis. También se ha encontrado relación con la temperatura de almacenaje (Cipriani et al. 2016), pudiendo retrasarse la migración de

la L3 de *A. pegreffii* en boquerones 3-5 días mantenidos a 0 °C; cambios en el pH y el contenido en aminos biogénicos durante este tiempo podrían afectar a la capacidad migratoria de las larvas, aunque también al deterioro del pescado (Šimat et al. 2015). Según otros autores, las larvas migran *post-mortem* hacia el músculo en especies grasas como el arenque o el pescado azul en general, y no lo hacen en pescados no grasos como la bacaladilla o el abadejo (Arthur et al. 1982; Smith 1984); de acuerdo con esto. Rello et al. (2009) observaron que el 52,7% de las larvas habían penetrado la musculatura de los boquerones, registrando una intensidad de la infección de 2,8, y Píras et al. (2014) encontraron altas prevalencias en el músculo de jureles y estorninos, pero ésta hipótesis ha quedado en ocasiones anulada, ya que la bacaladilla, siendo un pez de carne blanca puede albergar numerosas larvas en su musculatura (Silva and Eiras 2003; Chía et al. 2010). La frecuencia de infección de las distintas partes de la bacaladilla es, en general, de 17,5% en las vísceras, 22,7% en la musculatura ventral, y 4,1% en la musculatura dorsal (Mattiucci et al. 2018). Numerosos trabajos describen la presencia de la larva en la musculatura del pescado, principalmente en la parte ventral, sobre todo rodeando a las aletas, por ser la zona más próxima que encuentra la larva en su migración desde la cavidad corporal, encontrando prevalencias dispares en la carne en peces distintos, como merluza, bacaladilla, caballa y boquerón (Valero et al. 2000; Abollo et al. 2001; Rello et al. 2009; Chía et al. 2010; Angelucci et al. 2011; Madrid et al. 2012; Pekmezi et al. 2014; Molina-Fernández et al. 2015; Cipriani et al. 2017). Además, hay estudios que describen una notable prevalencia de infección del músculo dorsal (38,5%) (Cipriani et al. 2015). La variación de prevalencias mostradas por los autores también podrían deberse a diferencias en el método de detección utilizado (Angelucci et al. 2011), siendo la observación directa y el *candling* inadecuados para detectar larvas de *Anisakis* en la musculatura (Levsen et al. 2005; Llarena-Reino et al. 2015). Otro factor a tener en cuenta se ha sugerido desde que Umehara et al. (2007) responsabilizó a la especie *A. simplex* s.s. de tener mayor capacidad de atravesar la musculatura del pez que *A. pegreffii*, y otros trabajos han apoyado la teoría (Suzuki et al. 2010; Quiazon et al. 2011; Arizono et al. 2012; Romero et al. 2013; Arcos et al. 2014),

por lo que la especie larvaria podría ser una cuestión importante en la infección humana. Como posible explicación se ha postulado la mayor actividad proteolítica detectada en *A. simplex* s.s. frente a *A. pegreffii*, en particular de metalo-proteasas y serín-proteasas relacionadas con la invasión de los tejidos del hospedador (Molina Fernández 2018).

### *5.5.2. Patología en hospedadores paraténicos/intermediarios y definitivos*

La parasitación masiva por *Anisakis* en los peces puede provocar lesiones, como el síndrome *stomach cráter* encontrado en el bacalao Atlántico, con reacción inflamatoria y deformación del tejido estomacal, y el síndrome *red-vent* en la musculatura de la zona de ventilación del salmón salvaje, en el cual aparecen pequeñas manchas rojas, con hemorragia, erosión, pérdida de escamas y dermatitis (Beck et al. 2008; Larrat et al. 2013). Algunos autores han registrado infecciones accidentales de la L3 de *Anisakis* en distintas especies de tortugas marinas, en las que se han observado úlceras con focos hemorrágicos (Orós et al. 2005; Santoro et al. 2010).



**Fig. 3 Síndrome *red-vent* en el salmón del Atlántico (tomada de Measures 2014/foto por el Ministère des ressources naturelles et de la faune [Station piscicole de Tadoussac]).**

El estado adulto de *Anisakis* spp., por su parte, se encuentra en los compartimentos del estómago de los mamíferos marinos, anclado a la mucosa o dentro del lumen (Stroud and Daley 1978; Geraci and St. Aubin 1987). En general, hay una falta de información histopatológica acerca del daño que causan los helmintos a estos grandes animales, que pueden sufrir anomalías directamente asociadas con el parásito o con una infección oportunista secundaria, limitando su condición de vida (Abollo et al. 1998; Motta et al. 2008). Los parásitos podrían causar la ulceración de la mucosa y submucosa gástricas durante la migración, después de clavarse y generar desde úlceras superficiales a una intensa gastritis ulcerativa (Cattan et al. 1976; Raga et al. 2002; Hrabar et al. 2017). Las úlceras pueden ser agudas y hemorrágicas, o crónicas con curación mediante fibrosis y granulación; en casos graves se ha producido la perforación de la pared gástrica, con peritonitis y muerte (Geraci and St. Aubin 1987; Motta et al. 2008).



Fig. 4 Adulto de *Anisakis simplex* en el estómago de una ballena piloto (tomada de Measures 2014/foto por Lena Measures).



Fig. 5 Mucosa del píloro estomacal del espécimen *Peponocephala electra* con edema, hyperemia y cuatro úlceras (1,0 – 1,5 cm de diámetro) con tejido necrótico y *Anisakis* spp. incrustado en él (tomada de Motta et al. 2008).

## 6. Anisakiasis humana

### 6.1. Casos epidemiológicos

Probablemente, el primer caso de anisakiasis humana fue comunicado en 1876 en Groenlandia (EFSA-BIOHAZ 2010), si bien se registró por primera vez en 1955 en Holanda, cuando se detectó la presencia de un nematodo en el centro de un granuloma eosinofílico intestinal; el nematodo responsable se identificó como *Anisakis* y a la enfermedad se le denominó anisakiasis (Van Thiel et al. 1962). Además, en 1965, año en el cual se notificó la anisakidosis en Japón, los sanitarios de este país revisaron los casos de úlcera gástrica o duodenal, apendicitis aguda y tumor gástrico, y comprobaron que cientos de ellos se habían diagnosticado erróneamente (Asami et al. 1965; Cheng 1982). Siguiendo esta línea, en 1968 se utilizó la gastroendoscopia por primera vez en Japón para observar una larva de *Anisakis* (Namiki et al. 1969). En países como Francia y EEUU los primeros casos indicados fueron un granuloma eosinofílico ileal en 1969 en el primero, y forma aguda intestinal en 1975 en el último (Calvet et al. 1969; Pinkus et al. 1975).

Desde entonces, se han descrito más de 34.000 casos, de los cuales, más del 90% se han localizado en Japón, donde se ha estimado una incidencia de unos 2000-3000 casos anuales (Oshima 1972; Sugimachi et al. 1985; Chai et al. 2005; Umehara et al. 2007; Hochberg and Hamer 2010; Arizono et al. 2012). En este país, Japón, la anisakiasis es causada casi exclusivamente por *A. simplex* s.s. (99%), ocurriendo muchos casos en los populares "sushi" bar (Oshima 1987). En los últimos años, se han diagnosticado unos 200 casos/año en Corea del Sur (Lim et al. 2015), y se ha registrado en China el primer caso de anisakiasis (Qin et al. 2013). También en Taiwán han comenzado a notificarse casos de esta parasitosis (Li et al. 2015), y más recientemente, en Malasia (Amir et al. 2016).

En algunos países de Europa occidental se diagnostican el resto de los casos anuales de anisakiasis, como son Holanda, Alemania y España, donde se estiman unos 20 casos/año, Francia, unos 8 casos/año, e Italia, algo más de 10 casos anuales



(Petithory et al. 1986; Feldmeier et al. 1993; Chord-Auger et al. 1995; Moschella et al. 2004; Petithory 2007; Mattiucci and Nascetti 2007; Fumarola et al. 2009; Mattiucci et al. 2013; Yera et al. 2016); también se han referido casos en Noruega, Dinamarca, Bélgica y Reino Unido (Smith and Wootten 1978; Petithory and Marty 1988; Vercammen et al. 1997). En los últimos 10 años, los Servicios Sanitarios y de Salud Nacional de Europa e Italia han reportado unos 100 casos de intoxicación alimentaria donde la sintomatología era propia de un cuadro de anisakiasis aguda o crónica, siendo en este último país *A. pegreffii* la principal especie responsable de la infección; además, se han comunicado tanto casos de patología gastro-intestinal (GI) como de cuadro alérgico (D'Amelio et al. 1999; Fumarola et al. 2009; AAITO-IFIACI Anisakis Consortium 2011; Mattiucci et al. 2013; Heffler et al. 2016).

De forma más aislada se han notificado también casos en Nueva Zelanda (Paltridge et al. 1984), Australia (Shamsi and Butcher 2011), EEUU (Amin et al. 2000; Hochberg and Hamer 2010; Carlin et al. 2018), Rusia (Karmanova et al. 2002); Chile (Torres et al. 2007), Brasil (Rosa Da Cruz et al. 2010); Perú (Céspedes et al. 2011), Canadá (Couture et al. 2003), Croacia (Jurić et al. 2013; Mladineo et al. 2016), Austria (Kapral et al. 2009), Egipto (Cocheton et al. 1991), Portugal (Carmo et al. 2017; Baptista-Fernandes et al. 2017) y Sudáfrica (Nieuwenhuizen et al. 2006).

El mayor índice de incidencia de anisakiasis en Europa lo tiene España, segundo en el mundo, donde el principal plato de pescado crudo responsable son los boquerones en vinagre, sobre todo cuando se comen en la casa, donde la congelación no viene impuesta por ninguna legislación (EFSA-BIOHAZ 2010). Un modelo actual de evaluación del riesgo que tiene esta especialidad culinaria para provocar la enfermedad en los españoles (QRA), ha estimado que éstos últimos consumen una media de 0,66 *Anisakis* por ración de boquerones no congelada crudos o marinados, teniendo en cuenta que el 38,5% de estas raciones contienen al menos una larva viable; este modelo predice un número anual de casos que requieren atención médica comprendido entre 7700 y 8320, con mayor ocurrencia en Andalucía, seguida por Madrid (Bao et al. 2017). Un estudio retrospectivo de los casos de anisakiasis que

habían tenido lugar entre 1997-2015, estimó que entre 6370-12870 requirieron atención médica, calculando unos 10383-20978 casos, con mayor presentación de anisakiasis gastro-alérgica; la parte oriental fue la más afectada, seguido de Madrid, Castilla-León y La Rioja (Herrador et al. 2018).

El primer caso de anisakiasis publicado en nuestro país fue en 1991 por Arenal Vera et al., y la descripción del primer caso de anafilaxia en un paciente no alérgico al pescado en el País Vasco, en 1995 (Audicana et al. 1995). Desde entonces se han notificado un gran número de casos, tanto de infecciones como de reacciones alérgicas debido al elevado consumo de pescado en la población española, la mayoría de los cuales se han producido por la ingesta de boquerones en vinagre, si bien están implicadas otras especies de pescado, como la merluza o la sardina, u otras especialidades crudas como el ceviche (Fernández de Corres et al. 1996; Del Olmo Escribano et al. 1998; Del Olmo Martínez et al. 2000; Daschner et al. 1998, 2000a; López Peñas et al. 2000; López-Serrano et al. 2000; Valiñas et al. 2001; Castán et al. 2002; Repiso Ortega et al. 2003; Alonso-Gómez et al. 2004; González Quijada et al. 2005; Puente et al. 2008; Riu Pons et al. 2015). En Andalucía, donde es una enfermedad de declaración obligatoria desde 2003, se han registrado 50 casos entre 2005 y 2009 (Servicio Andaluz de Salud 2007, 2008, 2009).

Las notificaciones registradas de anisakiasis han aumentado exponencialmente en muchas partes del mundo desde 1980, debido al desarrollo de mejores herramientas de diagnóstico y a una mayor conciencia de esta enfermedad, y a la popularidad de la comida a base de productos marinos crudos o poco cocinados (Herrador et al. 2018).

También debemos tener en cuenta la implantación de un gran número de restaurantes que ofrecen platos de pescado crudo baratos, descuidando la calidad (D'Amico et al. 2014).

Otros factores que han podido contribuir al aumento de la enfermedad está relacionado con el agotamiento de las fuentes marinas y la subsecuente reducción de las especies que actúan como hospedadores intermediarios/paraténicos de *Anisakis*, lo

que ha conllevado a un aumento de las especies comerciales afectadas y de la prevalencia e intensidad de parasitación (Limbery and Cheah 2007).

### 6.2. Sintomatología y Patología

La infección humana provocada por este parásito suele ser transitoria debido a que el hombre es un hospedador accidental, por lo que la larva muere a las pocas semanas de permanecer en el organismo, destruido por las defensas de éste (Petithory and Marty 1988; Zuloaga et al. 2004). Los cambios patológicos ocurridos en el tracto digestivo durante la infección aparecen como resultado combinado de la acción directa de la larva durante la invasión tisular y la interacción compleja entre el sistema inmunológico del hospedador y las sustancias liberadas por el parásito o contenidas en él (Audícana and Kennedy 2008; Morsy et al. 2017).

Curiosamente, más del 90% de las infecciones están causadas por una sola larva (Ikeda et al. 1989), aunque también se han indicado casos de parasitación múltiple, donde los pacientes presentaron 20, 56, 140 o incluso 200 larvas (Kagei and Isogaki 1992; Noh et al. 2003; Jurado-Palomo et al. 2010; Baptista-Fernandes et al. 2017) parece que la única diferencia observada respecto a la infección por una larva reside en la mayor gravedad de los síntomas (Shimamura et al. 2016a).

La larva puede producir enfermedad en el ser humano mediante dos mecanismos: a) por hipersensibilidad inmediata mediada por IgE, como respuesta inmune Th2 típica frente a helmintos parásitos, y b) mediante el efecto directo del parásito sobre la pared del tubo digestivo. En cuanto al primer mecanismo, siendo el más frecuente, el parásito posee varios antígenos capaces de inducir la síntesis de IgE y ocasionar diversos cuadros alérgicos, cuya gravedad varía desde una simple urticaria hasta un angioedema e incluso shock anafiláctico (Zuloaga et al. 2004; Baird et al. 2014). Además, su invasión provoca una fuerte reacción pro-inflamatoria local que parece promover una respuesta tipo Th17 (Bušelić et al. 2018b). La afección del tubo digestivo se produce con menor frecuencia, pudiendo clasificarse inicialmente en cuadros gástricos e intestinales; las lesiones histopatológicas observadas en estos órganos se

caracterizan principalmente por la reacción inflamatoria desencadenada en respuesta a la penetración de la larva (Tabla 2, Audicana and Kennedy 2008).

Tiempo tras la ingesta	Evento(s) de la infección	Factores liberados o respuesta inmune	Eventos histológicos
<b>&lt;1h</b>	Adhesión a la mucosa	Enzimas proteolíticas	Lesiones hemorrágicas, excavación de la larva y formación de túnel
<b>4h-6 días</b>	Penetración de la mucosa y submucosa	Factores quimiotácticos	Flemón eosinofílico, lesiones erosivas
<b>7-14 días</b>	Formación de granuloma	Reacción de hipersensibilidad	Lesiones ulcerosas
<b>&gt;14 días</b>	Muerte de la larva	Inflamación persistente o granuloma	Pérdida del parásito o ulceración crónica alrededor de él

**Tabla 2. Eventos fisiopatológicos en respuesta a la infección por *Anisakis*.**

Dependiendo del grado de invasión de las larvas en el tracto GI, se diferencian varias formas clínicas:

-No invasiva o luminal, ocurre cuando las larvas, tras la ingestión, ocasionan un proceso irritativo (normalmente digestivo) con molestias retroesternales, que se atribuyen a su migración a la orofaringe. En esta forma las larvas son expulsadas del organismo a través de la tos, vómitos y heces (Sapunar et al. 1976; Kliks 1983; Field-Cortazares and Calderón-Campos 2009).

-Con carácter invasivo, origina sintomatología de naturaleza diversa que puede resumirse en digestiva, extra-digestiva, alérgica y gastro-alérgica. En cualquier caso, todas son debidas a la patología que ocasiona la larva cuando se adhiere con el diente y/o penetra a través de la mucosa digestiva, gracias al movimientos mecánico, y porque es capaz de segregar enzimas hialuronidasas que facilitan su paso a través de los tejidos, y metalo-proteinasas y serín-proteasas que llevan a cabo la destrucción tisular (Hotez et al. 1994; Suzuki et al. 2010; Lee et al. 2017). Si la larva muere dentro del hombre, los antígenos liberados de los remanentes del parásito puede inducir

respuestas inflamatorias responsables de síntomas difíciles de diferenciar de otros trastornos, como colecistitis, neoplasia, apendicitis, o enfermedad de Crohn, entre otros (Repiso Ortega et al. 2003; Montalto et al. 2005).

El curso clínico de las anisakiasis indicadas puede presentarse variado, desde agudo y autolimitado a subagudo y crónico, aunque en nuestro medio predominan las formas clínicas agudas (Del Rey Moreno 2003).

a) Anisakiasis gástrica: es la localización más frecuente, representando el 95% de los casos (Ishikura et al. 1993; Vallejo Rodríguez et al. 2006; Shimamura et al. 2016b). La forma aguda se caracteriza por la presencia de dolor epigástrico intenso, que puede ir acompañado de náuseas, vómitos, diarreas y fiebre, y suele aparecer normalmente en las 12 primeras horas tras la ingestión (Shibata et al. 2014; Takabayashi et al. 2014). Puede provocar ulceración y/o hemorragia, por lo que algunos de ellos presentan hematemesis (Lee et al. 2009). Se trata de un cuadro clínico muy común, por lo que puede confundirse con gastritis, úlcera péptica, colelitiasis e incluso con tumor gástrico, etc. (Pinel et al. 1996; Muraoka et al. 1996; Shimamura 2016b), ya que en el caso de cronificarse la enfermedad, ocasiona síntomas inespecíficos y recidivantes similares a los del cuadro agudo, que pueden evolucionar durante meses o años, provocando tumores submucosos (Yokogawa and Yoshimura 1967; Esteve et al. 2000). Aunque la mayoría de los casos de estos tumores gástricos comúnmente presentes en la submucosa se caracterizan por granuloma eosinofílico con edema, también pueden cursar con ulceración y hemorragia; un tiempo después de la retirada del parásito de la lesión, el tumor desaparece, de ahí que se conozcan con el nombre de "tumores fantasma" (Yamazaki et al. 1976; Takeuchi et al. 2000; Hiramatsu et al. 2004). Llama la atención la preferencia de las larvas de penetrar una mucosa gástrica normal sobre una mucosa atrófica, como es el caso de los pacientes de *Helicobacter pylori*, por lo que estas personas tendrían inmunidad frente a *Anisakis* y no presentarían síntomas (Arai et al. 2014; Shimamura et al. 2016b).

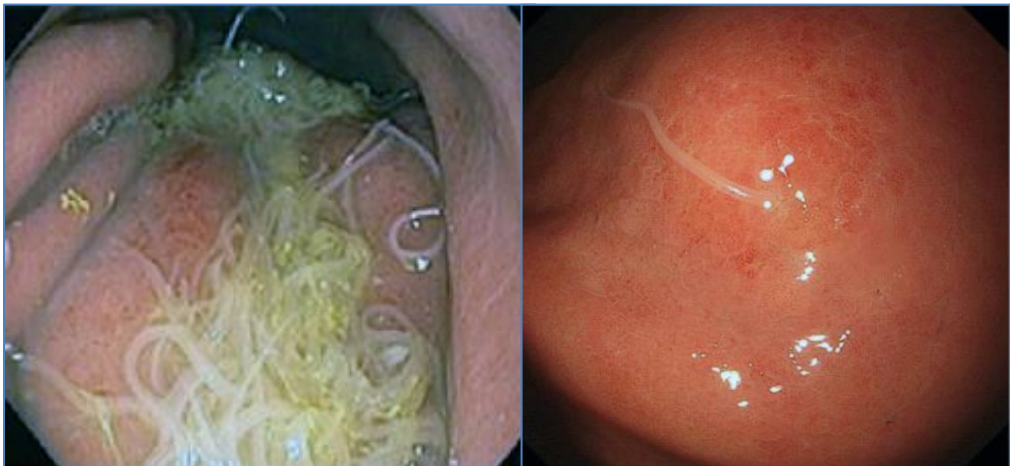


Fig. 6 (a) Mucosa gástrica hiperémica y edematosa con infección masiva de larvas de *Anisakis* (tomada de Baptista-Fernandes et al. 2017). (b) Larva de *Anisakis* anclada a la mucosa gástrica, donde se observa hiperemia y edema (tomada de Matsuura and Moritou 2017).

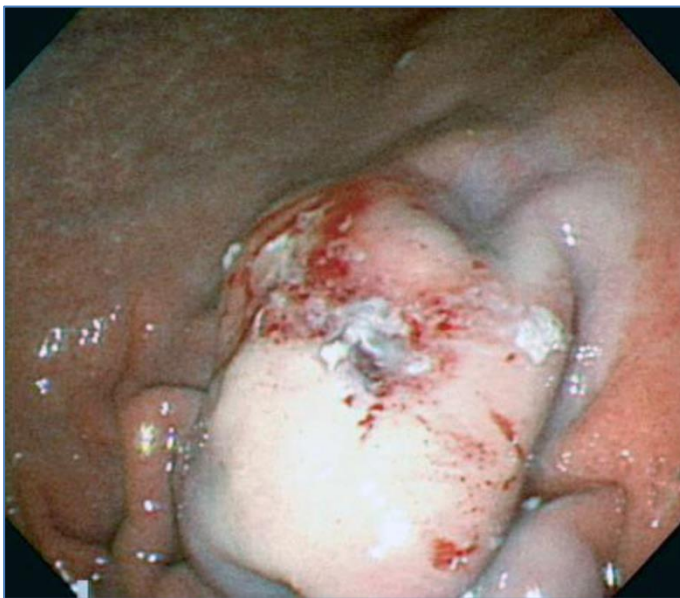


Fig. 7 Úlcera central en una lesión tumoral submucosa con edema mucoso circundante en la curvatura mayor del cuerpo gástrico (tomada de Kang et al. 2014).

b) Anisakiasis intestinal: representa aproximadamente el 4% de los casos (Carbotta et al. 2016). En la forma aguda, la sintomatología aparece en los primeros 5-7 días de la ingesta de pescado parasitado, con pico entre las 12-48 h y afectación principal del

íleon distal (López-Vélez et al. 1992; Takabayashi et al. 2014). Presenta un cuadro clínico de dolor abdominal difuso o tipo cólico, náuseas, vómitos y heces sanguinolentas; puede afectar al ritmo intestinal y provocar peritonitis, perforación u obstrucción por estenosis del segmento intestinal donde se asienta el parásito, además de úlceras con focos de hemorragia (Louredo Méndez et al. 1997; Repiso Ortega et al. 2003; Navarro Cantarero et al. 2005; Field-Cortazares and Calderón-Campos 2009; Yasunaga et al. 2010). Esta forma simula una apendicitis, ileitis, diverticulitis, enfermedad inflamatoria intestinal, oclusión intestinal y síndrome tumoral, entre otros, y puede convertirse en una enfermedad crónica y originar granulomas, además de síntomas inespecíficos como dolor abdominal vago que puede permanecer durante meses o años (Cocheton et al. 1991; Eskesen et al. 2001; Mattiucci et al. 2011; Shimamura et al. 2016b).

En algunos casos, puede producirse la invasión simultánea del estómago y el colon u otras zonas del intestino de un mismo individuo por diversas larvas de *Anisakis* (Kim et al. 2013).

c) Anisakiasis extra-digestiva o ectópica: es menos frecuente que las anteriores, alrededor del 1% (Smith and Wootten 1978; Cocheton et al. 1991; Carbotta et al. 2016). Tiene lugar cuando la larva perfora la pared del tubo digestivo y migra a otras zonas como pulmón, hígado u otros órganos, originando una sintomatología distinta en función de su localización (Matsuoka et al. 1994; Field-Cortazares and Calderón-Campos 2009), o incluso puede volver hacia el esófago y la laringe y alojarse allí (Kwak and Yoon 2012). En este tipo de anisakiasis también es frecuente la formación de granulomas con restos de larva en su interior (Yokogawa and Yoshimura 1967), además de la liberación de antígenos que sensibilizan al paciente ante una nueva exposición al parásito (Ishikura et al. 1993).

d) Alergia a *Anisakis*: se distinguen dos cuadros clínicos, anisakiasis gastro-alérgica y alergia e hipersensibilidad al parásito.

-Anisakiasis gastro-alérgica (GA): se caracteriza por un cuadro alérgico agudo mediado por la Ig E, acompañado de síntomas digestivos gástricos. El síntoma alérgico más frecuente es la urticaria y en menor grado el angioedema, la hipotensión arterial y el broncoespasmo. El tiempo de latencia para la sintomatología GI es de 3 a 6 h y para los síntomas alérgicos de 5 h, pudiendo aparecer muchas horas después de la ingestión del pescado (Alonso et al. 1997; López-Serrano et al. 2000).

-Hipersensibilidad a *Anisakis*: algunos pacientes sensibilizados al parásito en los que no se manifiesta sintomatología digestiva, pueden presentar reacciones alérgicas, es decir, de hipersensibilidad tipo I (mediada por Ig E), con episodios de urticaria y/o angioedema, anafilaxia, hipotensión y choque anafiláctico, e incluso asma o empeoramiento de un asma previo (López-Sáez et al. 2003; Choi 2009). El grado de intensidad de estas reacciones alérgicas es muy variable, pudiendo alcanzarse hipersensibilidad de tipo III y IV (Asaishi et al. 1980; Ishikura 1990), y los síntomas pueden comenzar a las 5-8 h tras la ingestión de pescado congelado y/o cocinado o enlatado (Daschner et al. 1998, 2000a).

-Otro tipo de alergias producidas por los antígenos de *Anisakis* ocurren por la exposición a través de otras vías distintas a la del tracto GI como la piel o el tracto respiratorio, dando lugar a síntomas como dermatitis, rinoconjuntivitis, asma, y manifestaciones reumáticas en forma de artralgias/artritis; principalmente se han indicado entre los profesionales que manipulan productos marinos tanto en la industria como en pescadería o restauración (alergia ocupacional), pero también en no profesionales en contacto con pescado contaminado con los alérgenos del parásito (Añibarro and Seoane 1998; Nieuwenhuizen et al. 2006; Barbarroja-Escudero et al. 2018).

### 6.3. Alérgenos de *Anisakis*

La respuesta inmune humoral humana frente a *Anisakis* se debe al reconocimiento de diversos antígenos del parásito, que pueden ser altamente inmunogénicos y producir varios tipos de inmunoglobulinas, principalmente la Ig E. Desde un punto de



vista estructural y funcional se distinguen tres tipos de antígenos dentro de la larva de *Anisakis*:

1. Antígenos somáticos: son los más abundantes y tienen un peso molecular (PM) comprendido entre 13-150 KDa (Iglesias et al. 1995); algunos presentan reacciones cruzadas con otros ascáridos en su unión a la Ig E. Sólo resultan funcionales después de la muerte y degradación del parásito, pero se utilizan en el diagnóstico para realizar la prueba cutánea conocida como "Prick-test" (Lozano-Maldonado et al. 2004)

2. Antígenos de superficie: son moléculas expresadas en la cutícula del parásito cuando ha tenido lugar la ecdisis, el paso de L3 a L4. Aunque se encuentran en otros nematodos y tienen un menor poder antigénico que los anteriores, parece que juegan un papel importante en el desarrollo de la estimulación crónica como es el caso de los granulomas (Baeza et al. 2001).

3. Antígenos de excreción-secreción (ES): son moléculas que la larva viva sintetiza en la glándula esofágica dorsal o las células secretoras del tracto digestivo y libera al medio; facilitan la penetración de parásito en el hospedador y provocan la degranulación de los mastocitos, siendo los anticuerpos frente a estos antígenos los primeros en aparecer (Iglesias et al. 1993). Además, producen una respuesta inmunológica más fuerte que la inducida por los antígenos somáticos, de ahí que sean preferentemente utilizados en los tests de diagnóstico (Baeza et al. 2004; Chung and Lee 2014).

Con el fin de realizar un diagnóstico específico de la anisakiasis, desde el año 2000 se estudia la caracterización de estos alérgenos, lo cual ha dado lugar a la identificación de 14 proteínas de *Anisakis simplex*, el único anisákido responsable de reacciones alérgicas en los humanos, aprobadas por la WHO/IUIS *Allergen Nomenclature Sub-Committee* (web). Los antígenos Ani s 1, Ani s 2, Ani s 7, y Ani s 11-14 se han denominado alérgenos mayores porque son reconocidos por más del 50% de los pacientes alérgicos a *Anisakis simplex* (Moneo et al. 2017). Sin embargo, las moléculas altamente conservadas, Ani s 2 y Ani s 3, debido posiblemente a su

semejanza con las proteínas de otras especies de invertebrados, principalmente artrópodos, provocan reacciones cruzadas y posibilidad de falsos positivos (Johansson et al. 2001; Guarneri et al. 2007; Baldwin et al. 2011). Una de las características de mayor importancia es la resistencia al calor, la pepsina o incluso a la congelación que han mostrado algunos alérgenos (Merhdana and Buchmann 2017), lo cual podría explicar la aparición de síntomas alérgicos en individuos sensibilizados tras la ingestión de pescado bien cocinado o enlatado, sin la presencia de larvas vivas (Rodríguez-Mahillo et al. 2010; Moneo et al. 2017). Algunos de estos alérgenos, sin embargo, podrían tener potencial terapéutico en enfermedades inflamatorias debido a sus propiedades inmunorreguladoras, lo cual se está probando en modelos experimentales de asma y colitis, entre otros (Merhdana and Buchmann 2017).

#### 6.4. Diagnóstico

Se trata de un diagnóstico complicado debido a que las manifestaciones clínicas producidas por este parásito son comunes a la mayoría de afecciones digestivas y/o alérgicas. Por tanto, la certeza de la infección por *Anisakis* sólo puede alcanzarse mediante la visualización de la larva y la identificación de sus características morfológicas, lo cual requiere de su extracción, y esto puede ser complicado cuando la larva se aloja en ciertos segmentos intestinales, migra a zonas extra-digestivas, o cuando la infección se cronifica y la larva se destruye.

-Anamnesis y exploración clínica: conocer el cuadro clínico y el antecedente dietético del paciente es fundamental para realizar el seguimiento terapéutico. La ingesta de pescado crudo o poco cocinado en las horas previas y la presencia de manifestaciones alérgicas de cualquier tipo, son datos clínicos sospechosos de haber contraído anisakiasis.

-Analítica estándar: es asimismo inespecífica, dándose con frecuencia leucocitosis con neutrofilia; sin embargo no siempre se asocia con eosinofilia periférica, y cuando aparece suele ser más tardía, por lo que su valor diagnóstico es escaso (López Peñas et al. 2000; Kim et al. 2013). Los pacientes afectados de anisakiasis intestinal tienen mayor

posibilidad de tener elevado el conteo de leucocitos y proteína c-reactiva, respecto a la anisakiasis gástrica (Kim et al. 2013; Takabayashi et al. 2014).

-Endoscopia: permite la visualización directa de la larva, posibilitando su extracción y el posterior estudio identificativo. Debido a ello, esta es la técnica de elección en el caso de anisakiasis gástrica, duodenal o de colon, donde puede observarse endoscópicamente el edema de la capa mucosa alrededor del área de penetración de la larva (Kakizoe et al. 1995; Lee et al. 2009). La tecnología de imagen de banda estrecha ofrece un potente aumento de imagen, mejorando la visualización de la larva cuando se lleva a cabo la endoscopia (Taranto et al. 2011).

-Pruebas de diagnóstico por imagen:

a) Radiología: permite observar la larva como una figura filiforme de relleno, de unos 30 mm de longitud, y el edema mucoso y/o submucoso que provoca (Nakata et al. 1980). Norma

La tomografía axial computarizada (TAC) abdominal es muy útil para descartar otras causas de dolor abdominal intenso; también posibilita advertir una disminución de la grasa adyacente y ascitis, siendo considerada la técnica de elección en el departamento de urgencias, reemplazando a los estudios radiológicos con sulfato de bario (Takabayashi et al. 2014). En la anisakiasis intestinal permite visualizar el edema del segmento con dilatación proximal (Shibata et al. 2014).

b) Ecografía: se utiliza en la forma intestinal para apreciar un posible engrosamiento de la pared intestinal, estrechamiento de la luz y/o disminución del peristaltismo, principalmente cuando el TAC no esté disponible, ya que es más sensible a interferencias GI (Shirama et al. 1992; Ogata et al. 2015).

-Diagnóstico post-operatorio: consiste en el estudio de la larva tras la extirpación de la zona dañada. Se recurre a ella en caso de infección masiva o afectación de zonas de difícil acceso o cuando se ha originado una intususcepción intestinal, ya que se

trata del método más invasivo (Ido et al. 1998; Yorimitsu et al. 2013; Carbotta et al. 2016).

-Diagnóstico inmunológico: la anisakiasis se manifiesta por una elevación en el suero de los niveles de Ig E específica, que aumentan rápidamente durante los primeros días y permanecen altos durante meses o años (Daschner et al. 2000b; Cho et al. 2006; Carballeda-Sangiao et al. 2016). En el curso de esta enfermedad también se desencadenan otros procesos inmunopatológicos, como producción de Ig G1 e Ig A (Gutiérrez and Cuéllar 2002; Audicana and Kenndy, 2008), por lo que encontramos diferentes alternativas entre los métodos utilizados.

a) Prueba cutánea o "Skin Prick-Test" (SPT): se realiza introduciendo antígenos somáticos de *A. simplex* s.l. en la piel del paciente. Desde que Audicana et al. (1995) la aplicaran por primera vez, su uso se ha extendido presentándose como una herramienta muy útil, aunque presenta baja especificidad (Weiler 2007).

b) Pruebas celulares: en concreto, la detección de la activación de basófilos (TAB) inducida por alérgenos mediante citometría de flujo. Tiene una sensibilidad del 95-100% y un 100% de especificidad (Gonzalez-Muñoz et al. 2005).

c) Pruebas serológicas: se realizan para determinar los niveles de Ig E específica y total frente a *A. simplex* s.l., o el título de Ig G/A. Poseen elevada sensibilidad (Kasuya et al. 1990; Audicana et al. 1995), pero baja especificidad y la posibilidad de ofrecer falsos positivos debido a la reactividad cruzada con antígenos de otros nematodos u otros alérgenos (Lorenzo et al. 2000; Horchbeg and Hamer 2010). Por ello, la Ig E se ha detectado en individuos sanos que consumen frecuentemente pescado crudo, y ha sido difícil discriminar entre pacientes sintomáticos y asintomáticos (Daschner and Pascual 2005; Chung and Lee 2014). Con el fin de mejorar las técnicas de serodiagnóstico se han desarrollado antígenos recombinantes, algunos comercialmente disponibles (kits), que aumentan la especificidad (Moneo et al. 2017; Merhdana and Buchmann 2017). Las pruebas más utilizadas son el InmunoCAP, inmunoblotting y ELISA.

-PCR (Polymerase Chain Reaction): es útil para el diagnóstico pero aún no se encuentra disponible de forma generalizada (Chen et al. 2008). Ha permitido la identificación molecular de las especies de *Anisakis*, como se ha explicado en el apartado de identificación. Cuando se dispone de una baja cantidad de ADN en la muestra, la realización de la técnica a tiempo real (RT-PCR) podría facilitar la identificación (Mattiucci et al. 2017).

## 7. Prevención y control de la anisakiasis

### 7.1. Legislación

Desde las primeras medidas adoptadas por las autoridades holandesas en 1968/69, consistentes en la congelación del pescado a -20 °C durante 24 h, salazón con una concentración de NaCl mayor al 6,5% durante 30 días, y ahumado a una temperatura de 50 °C, los gobiernos europeos fueron dictando medidas tendentes a minimizar el riesgo de infección y disminuir los casos de anisakiasis. A partir de entonces, Alemania, Francia e Italia dispusieron ordenanzas frente al pescado que contenía nematodos y su comercialización. La primera legislación en el ámbito europeo tuvo lugar en 1993, cuando la presencia del parásito comenzó a hacerse muy patente en los gádidos, dirigiendo la atención a la prevención de esta zoonosis. Toda la legislación europea relativa al control de la presencia de *Anisakis* en el pescado y de su inactivación para la prevención sanitaria, recoge un amplio número de medidas que han evolucionado con la mejora del conocimiento del parásito y su enfermedad (D'Amico et al. 2014). España, como país miembro de la UE, ha adoptado estas medidas, cuyo orden cronológico es el siguiente:

-La Decisión de la Comisión 93/140/CEE del 19 de Enero de 1993, por el cual se establecen las definiciones de "parásito visible" e "inspección visual" para detectarlos en los productos de pesca.

Con la entrada en vigor de esta normativa europea, España publicó en 1993 el Real Decreto (RD) 143/92 del 27 de noviembre, por el que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de acuicultura.

-El Reglamento (CE) 2406/96 del Consejo, de 26 de Noviembre de 1996, por el que hace público el impacto negativo de los parásitos sobre la calidad de los productos alimentarios.

-El Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril de 2004, por el que se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, y se indica que, para la eliminación de parásitos, el pescado destinado a consumirse crudo o prácticamente crudo debe congelarse a temperaturas iguales o inferiores a -20 °C en la totalidad del producto, y mantenerse a tal temperatura durante al menos 24 h, como es el caso de aquellas especies destinadas a procesos de ahumado por debajo de 60 °C, marinado, escabechado y/o salado. También se incluyen los objetivos del operador de la empresa, quien debe asegurar que los productos de pesca sean sujetos a examen visual para la detección de endoparásitos visibles, no debiendo colocar en el mercado productos de pesca que estén claramente contaminados con parásitos; para éstos últimos, se establece la prohibición de comerciar con ellos.

-El Reglamento (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. En España estos controles se realizan mediante programas de control ejecutados por las comunidades autónomas.

-El Reglamento (CE) 2074/2005 de la Comisión del 5 de Diciembre de 2005, por el que se aclaran la definición de "parásito visible" y la realización de la inspección visual.

En España, adicionalmente a la normativa comunitaria, con el objeto de contribuir a la solución del problema, el Ministerio de Sanidad y Consumo publicó en 2006 el RD

1420/2006, de 1 de Diciembre, el cual recogió la normativa relativa a la obligación de congelar el pescado dispuesto a consumirse crudo, semicrudo, ahumado, marinado o salado, en restaurantes, hospitales, colegios y centros similares, exigiendo a estos establecimientos informar a los consumidores del cumplimiento de dicho RD. También solicitó al comité científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) un informe sobre medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de *Anisakis*, facilitando recomendaciones concernientes a los tratamientos térmicos más seguros para cocinar el pescado y al mejor criterio para determinar si la congelación es necesaria en productos de pescado marinados o sazonados, el cual se publicó en Noviembre de 2007 (AESAN 2007). Para responder a las acciones previstas en el RD, la AECOSAN elaboró el "Programa de Control de *Anisakis*", que figura en el Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria, actualmente vigente.

-El Reglamento (CE) 1020/2008 de la Comisión, de 17 de Octubre de 2008, el cual obliga a todos los operadores de base fija a llevar a cabo el control visual, incluyendo a los que operan en la venta al por menor.

De acuerdo con la opinión científica de la Autoridad de la Seguridad Alimentaria Europea (EFSA), protección y prevención son prioridades en el control parásito-zoosanitario de productos de la pesca para el consumo humano (EFSA-BIOHAZ 2010).

-El Reglamento (UE) 1276/2011 de la Comisión, en el que se extiende el riesgo de *Anisakis* a los cefalópodos, se dispone orientar los tratamientos preventivos a destruir los parásitos viables, y se recomienda congelar el pescado a -35 °C durante al menos 15 h.

El último informe de la AECOSAN, publicado en septiembre de 2016, aborda los recientes avances en relación al conocimiento de la alergia a *Anisakis* (AECOSAN 2016).

En Estados Unidos, desde 1987, US Food and Drug Administration (FDA) exige que todos los productos de pesca que no vayan a ser cocinados o procesados a temperaturas superiores a 60 °C, sean sometidos previamente a congelación normal

a -20 °C durante un período mínimo de 7 días, a ultracongelación a -35 °C durante al menos 15 h, o a -35 °C seguido de un mantenimiento a -20 °C durante 24 h (FDA 2011).

## 7.2. Medidas profilácticas

La única medida profiláctica eficaz frente a la infección consiste en evitar el consumo de pescado crudo o insuficientemente cocinado o proceder, antes de ello, a una congelación que destruya las larvas; la alergia al parásito sólo parece remediarse evitando la exposición repetida a sus alérgenos. Pero para asegurar una baja prevalencia de anisakiasis se han estipulado unas medidas de control que abarcan todo el proceso que va desde la producción primaria hasta el uso que realiza el usuario del pescado.

### a. Medidas pre-captura

Son muy limitadas, estando principalmente relacionadas con la acuicultura. La fundamental es evitar faenar en determinadas áreas donde existan especies o tallas que están parasitados con mayor frecuencia. Respecto a los cultivos, debe tenerse en cuenta la alimentación, la cual es esencial que se realice mediante *pellets* para que la dieta esté libre de parásitos. En ellos también es importante la zona geográfica, ya que cabe la posibilidad de que otros peces e invertebrados puedan entrar en las jaulas dispuestas en mar abierto y transferir las larvas a las especies cultivadas; la EFSA sólo considera despreciable el riesgo para el salmón del Atlántico, basándose en evidencias científicas. En España, lubina, brema, rodaballo y corvina de acuicultura han mostrado estar libres de *Anisakis* spp., y se ha hipotetizado que su venta y consumo pudieran realizarse sin necesidad de congelación (D'Amico et al. 2014).

### b. Medidas post-captura

#### 1) Manipulación del pescado a bordo

Dado que ningún área puede considerarse libre de parásitos, son cruciales las medidas dirigidas a romper el ciclo del parásito, por lo cual se recomienda eviscerar el



pescado inmediatamente después de su captura, aunque en algunos peces los parásitos ya se encuentran en la musculatura en el momento de ésta (Huss et al. 1992) y no arrojar las vísceras al mar (D'Amico et al. 2014). Asimismo, se debe eliminar la musculatura hipoaxial en las especies más infectadas.

### 2) Inspección

Sería conveniente examinar el pescado ya eviscerado y eliminar aquellos peces muy parasitados, pero este aspecto es difícil de llevarlo a la práctica. La inspección se puede llevar a cabo visualmente en el punto de desembarco, cuyos procedimientos de muestreo se encuentran internacionalmente aceptados, como el protocolo establecido por la comisión del *Codex Alimentarius* (1989), en el que la presencia de dos o más parásitos por kg de unidad de muestra, con un diámetro capsular mayor de 3 mm, o la detección de un parásito no encapsulado y mayor de 10 mm de longitud, determina la disconformidad del producto. El término "obviamente contaminado", introducido en el Reglamento europeo de 2004, ha sido un tema de discusión en Europa, siendo interpretado de forma distinta por cada estado miembro; si durante la inspección visual las larvas se encuentran en partes comestibles, como la musculatura, el producto se considera obviamente contaminado, mientras que si sólo se observan en las partes no comestibles, como las vísceras, no se considera como tal y puede comercializarse. El operador es la nueva figura que ha reemplazado al veterinario en el sistema de control del parásito en los productos de pesca, siendo actualmente el primer responsable de manejar el riesgo de colocar en el mercado productos "obviamente contaminados" (D'Amico et al. 2014). La observación sólo detecta el 50% de los parásitos detectados por otros métodos industriales basados en la inspección visual, cuya aplicabilidad está limitada por el tiempo que conlleva en los comercios que mueven grandes masas de pescado (EFSA-BIOHAZ 2010), tales como:

-Transparentado o "candling" (Smith and Wootten 1978), consiste en observar las larvas de *Anisakis* en filetes del pescado mediante proyección de luz por la parte inferior del filete. Este método se consideró oficial por el *Codex Alimentarius* (1995).

Sin embargo, la FDA la interpretó como una técnica subjetiva (FDA 2001), ya que el resultado está afectado por el grosor del filete, el contenido en aceite, presencia de piel, pigmentación y nivel de entrenamiento y competencia del operador (Angellucci et al. 2011; Milligan 2008).

-Iluminación con luz ultravioleta aplicada a unos diez cm de distancia sobre la superficie de pescado fileteado y aplastado en plancha, permitiendo observar las larvas de color fluorescente azulado (Karl and Leinemann 1993). Este método se ha validado recientemente a través de una prueba llevada a cabo en el marco de un proyecto europeo (PARASITE), en comparación con el método de digestión péptica. Los resultados obtenidos indicaron que ambos métodos comparten la misma precisión en la detección de larvas de *Anisakis* spp. (Gómez-Morales et al. 2017).

-Digestión por jugo gástrico artificial: es un método destructivo en el que se somete al pescado (vísceras y musculatura) a la actuación de una solución de pepsina-ClH, detectando de forma sensible los parásitos (Huang 1990, D'Amico et al. 2014). En 2005, esta técnica basada en el Codex Alimentarius fue regulado por la UE N° 2075/2005.

Otras tecnologías de inspección que se han diseñado para evitar la destrucción del pescado y/o facilitar el trabajo, y se han probado en condiciones industriales incluyen, entre otras:

-Diferencias de conductividad entre el músculo del pescado y los parásitos encontrados, detectando en este caso diferencias en el campo magnético (Nilsen et al. 2008).

-Técnica de Baermann, basada en la migración de las larvas del hospedador bajo el hidrotropismo positivo (Cavallero et al. 2015).

-PCR a tiempo real del ADN mitocondrial y nuclear para la detección cuantitativa y cualitativa de los parásitos en filetes y otros subproductos de pescado contaminado; uno de estos kits comerciales, el "PATHfinder *Anisakis/Pseudoterranova* DNA

detection assay", ha sido validado en cuanto a su sensibilidad y robustez en bastantes especies de pescado (Cavallero et al. 2017; Godínez-González et al. 2017).

### 3) Inactivación de los parásitos

Debería tenerse en cuenta que los tratamientos destinados a la destrucción de las larvas, o incluso los tratamientos que se aplican al pescado, podrían romper la cutícula de los parásitos y liberar gran cantidad de alérgenos responsables de provocar síntomas alérgicos (Sánchez-Alonso et al. 2018).

#### -Cocinado

Las larvas L3 de *Anisakis* son sensibles al calor, inactivándose cuando se somete el pescado a  $\geq 70$  °C durante  $\geq 1$  min, sin embargo varios antígenos del parásito presentan alta termoestabilidad por lo que podrían provocar síntomas alérgicos en consumidores sensibilizados (Audicana et al. 1995; Vidacek et al. 2010). El ahumado de tipo inglés a 80 °C mata al parásito, mientras que el preparado al microondas no es eficaz en cortos espacios de tiempo (Adams et al. 1999); la plancha o la brasa no muestran seguridad, incluso la fritura, cuando no alcanzan las temperaturas requeridas para inviabilizar las larvas (Lane et al. 1988).

#### -Congelación

Estos parásitos son fáciles de destruir manteniendo el producto de consumo a temperaturas de congelación durante un periodo de tiempo específico, el cual depende de la temperatura a la cual se congela el centro de dicho producto (Beldsoe and Oria 2001). El tiempo requerido para ello y el contenido de grasa del pescado suelen afectar el tratamiento de congelación, teniendo en cuenta que estos nematodos poseen estrategias para sobrevivir al efecto de la formación de cristales intracelulares, encontrándose una supervivencia del 50% de las larvas a -10 °C, aunque su capacidad de penetración *in vitro* se reduce drásticamente (Sánchez-Alonso 2018). A la hora de cumplir con la legislación vigente y evitar la infección, hay que tener en cuenta que la congelación industrial no es igual que la doméstica; ciertos estudios

indican que más del 30% de los congeladores domésticos en UK operarían por encima de -18 °C, e incluso a -10 °C en más del 10% de los hogares en Grecia (Taoukis et al. 2011; Evans et al. 2014). Los datos relativos al proceso deben de acompañar al producto hasta su venta, sin embargo esta información normalmente se omite debido a la desconfianza que genera el término “descongelado” al consumidor, quien lo considera de menor categoría que el pescado fresco, mostrando reticencia a comprarlo (D’Amico et al. 2014).

#### -Salazón y marinado

Aunque se ha comprobado que *Anisakis* es sensible a la sal, la elevada concentración de sal y tiempo de exposición del parásito requeridos, convierte al salazón en un método de inactivación inadecuado (Beldsoe and Oria 2001). Algunos países europeos como Francia y España han determinado las condiciones técnicas de salazón y marinado para matar las larvas del parásito, evitando la congelación de los productos. En España, el Comité Científico de la AECOSAN asegura que la congelación no es necesaria para aquellos productos de pesca que alcanzan una concentración de NaCl por encima del 9% durante al menos seis semanas, entre el 10 y 20% durante 4-5 semanas, o de más del 20% durante al menos tres semanas (AESAN 2007). Respecto a este punto, la Agencia de Seguridad Alimentaria Francesa (AFSSA) indicaron que en preparados tradicionales y pequeñas cantidades, un porcentaje de sal del 20% durante 21 días provoca la inactivación del parásito, mientras que concentraciones del 15% requieren 28 días. Además señala que marinar el pescado con 10% de ácido acético y 12% de sal durante 5 días a 4 °C no es lesivo para la salud, así como con 6% de ácido acético y 12% de sal durante 13 días a 4 °C (AFSSA 2007). Estudios más recientes muestran la eficacia del salazón con una concentración de sal de 21% durante más de dos semanas (Anastasio et al. 2016) y de 18,6% 15 días (Smaldone et al. 2017).

#### -Irradiación

Es un método eficaz para la inactivación de estos parásitos, pero parece inducir cambios en las características organolépticas de los productos (Farkas 1998). Los

primeros estudios mostraron la necesidad de utilizar dosis muy elevadas en arenques salados, de 6 a 10 kg (Mameren and Houwing 1968), al igual que otros estudios más recientes (Beldsoe and Oria 2001). Además, la radiación ionizante para los productos de pesca no está aprobada por la mayoría de los países de la UE (D'Amico et al. 2014).

### -Elevación de la presión hidrostática

Se utiliza normalmente en tecnología alimentaria para inhibir enzimas endógenas e inactivar microorganismos, pero también se ha empleado frente a *Anisakis* spp. (Vidacek et al. 2009). Para la inactivación de *Anisakis* spp. se necesita una presión mucho menor, de 200 MPa durante 10 min y 207 MPa durante 3 min para matar el 100% de las larvas aisladas y/o contenidas en la musculatura del pescado (Molina-García and Sanz 2002). Al igual que la irradiación, puede afectar negativamente a la función y sensorialidad del pescado, provocando cambios en su textura, color y oxidación lipídica, que pueden variar según el tiempo y presión aplicados (Vidacek et al. 2009).

### -Aditivos químicos o naturales

En relación a los aditivos químicos, sólo el peróxido de hidrógeno ha sido reconocido por su efecto frente a las larvas de *Anisakis* spp., pero su uso no está permitido en la UE. Más recientemente, varios estudios han señalado el efecto de varios productos naturales, incluyendo los aceites esenciales de diferentes plantas, con actividad anti-*Anisakis*, que podrían utilizarse como prevención de la anisakiasis (Topuz and Gökoğlu 2017).

## 8. Tratamiento farmacológico

A pesar del tiempo transcurrido, algo más de 50 años desde el primer caso de anisakiasis denunciado en el hombre, aún no se encuentra en el mercado un fármaco eficaz frente a esta parasitosis digestiva; es más, los antihelmínticos que actúan frente

a otros nematodos del tracto gastro-intestinal no son capaces de matar las L3 de *Anisakis*.

### 8.1. Fármacos convencionales

**Ensayos *in vitro*.** Un conjunto amplio de antihelmínticos, eficaces frente a gusanos intestinales, se han ensayado *in vitro* frente a larvas de anisákidos con resultados contradictorios; así, en el grupo de los benzimidazoles: el tiabendazol (a 110 mg/ml y 10 mg/ml) fue prácticamente ineficaz (Kasuya et al. 1988, 1990); de igual manera, el mebendazol, oxibendazol, albendazol, flubendazol, oxfendazol y fenbendazol (1,5 g/ml) resultaron totalmente inactivos, salvo el triclabendazol (Tojo et al. (1992). Sin embargo, en otras condiciones de trabajo (Oshima et al. 1972), el mebendazol reduce la movilidad de las larvas; de igual modo (Dziekonska-Rynko et al. 2002), el albendazol es capaz de disminuir la movilidad de las larvas tras un tiempo de 24 h a pH 7 y a partir de una concentración de 5 µg/ml de forma dosis dependiente. Esta actividad del albendazol se mantiene incluso a un pH cercano al gástrico. Con este mismo antihelmíntico, las observaciones llevadas a cabo por Arias-Díaz et al. (2006) y Lin et al. (2014) indican efectos nocivos frente a las larvas de *Anisakis* (500 mg y 200 µM, respectivamente).

También se han probado derivados fenólicos (nitroxinil, niclofolán, bitionol sulfóxido) que presentaron actividad anti-*Anisakis* a partir de 0,05 g/l (Tojo et al. 1992). De los ensayos *in vitro* con el grupo de la salicilanilidas (cloxantel, rafoxanida, niclosamida) sólo las dos primeras mostraron alguna acción (>1g/l) a partir de las 12 h. Así mismo, estos autores constataron que la actividad de los derivados piperacínicos (sales citratos dihidroclorhídrica y la dietilcarbamacina) fue nula. Dentro de las lactonas macrocíclicas, Tojo et al. (1992) ensayaron la ivermectina, que tuvo eficacia frente a las larvas a concentraciones de 1,5 g/l; también, Dziekonska-Rynko et al. (2002) reconocen que las larvas de *Anisakis* en soluciones de ivermectina tan bajas como 10 µg/ml, presentan una inmovilidad total cuando el pH es de 7 y el tiempo aplicado, de 24 h, muriendo todas las larvas tras exponerlas 48 h incluso a concentraciones menores, y a

50 µg/ml cuando el pH es de 2. Sin embargo, en las experiencias realizadas por Suzuki et al. (1994) este fármaco no resultó letal ni incluso a la concentración de 1000 µg/ml, mientras que en otro estudio a 1000 mg/ml tuvo una eficacia del 70% tras 96 h (Lopieńska-Biernat et al. 2018). En lo que se refiere al grupo isotiocianato, el nitroscanato fue 100% mortal a las 12 h a 2 g/l Tojo et al. (1992). Con respecto, a la capacidad biocida del palmoato de pirantel, una tetrahidropirimidina, fue muy escasa a concentraciones de 1 mg/ml, según las experiencias de Kasuya et al. (1990) y Tojo et al. (1992). Por lo que respecta a la acción nematocida del prazicuantel, fármaco del grupo de las isoquinolonas y estudiado por (Tojo et al. 1992), se demostró que ejerce una acción discreta frente a *Anisakis*.

Por otro lado, Suzuki et al. (1994) testaron *in vitro* determinados conservantes de productos alimenticios, como el ácido benzoico y el mismo en forma de sales de sodio; los resultados obtenidos indicaron que ambos productos no mostraron efectividad frente a las larvas de *Anisakis*, incluso a concentraciones de 1000 µg/ml.

**Ensayos *in vivo*.** En animales de experimentación, Oshima et al. (1990) apuntan la posible eliminación de las larvas de *Anisakis* del tracto digestivo, tras la administración del mebendazol. Asimismo, Dziekonska-Rynko et al. (2002) han comprobado la eficacia del albendazol y la ivermectina en distintos ensayos, al administrar *per os* a cobayas 16,6-23,3 mg/kg del primero durante 3 días consecutivos, y una sola dosis de 3,3 mg/kg del último vía oral, aunque la viabilidad sólo se ve mermada tras completar el tratamiento con albendazol y 72 h después del tratamiento con ivermectina. Mientras que una dosis de 36 mg/kg vía oral a ratas Wistar produjo lesiones GI a los animales en el 46,7% de los casos (Romero et al. 2014).

**Uso en humanos.** Con respecto a los fármacos que ya han sido objeto de uso en el tratamiento de la anisakiasis humana, en un principio, para aquellos casos en los que se habían detectado granulomas eosinofílicos intestinales con sospecha de origen parasitario, se recomendaron una serie de fármacos. Así, Kuipers et al. (1960), de los 30 casos recopilados de granulomas eosinofílicos, encontraron que solo en uno de

ellos en el que se había observado la presencia de una larva en una úlcera intestinal, se prescribió penicilina y estreptomina, tras resección de la zona inflamada; posteriormente Oshima (1972), aconsejó el uso de antibióticos tales como la estreptomina combinada con eritromicina. Otros autores, ante la presencia de granulomas eosinofílicos del tracto digestivo, concluyeron que la mayoría de ellos estaban ocasionados a *Eustoma rotundatum* (= *Anisakis*), aconsejando el uso de ACTH (hormona adrenocorticotropa), sola o asociada con corticoides sobre todo en las formas difusas de granulomas eosinofílicos intestinales (Orr 1954; Kuipers et al. 1960; Boquien et al. 1966). Los corticoides por vía intravenosa también se han utilizado en caso de obstrucción intestinal producida por la larva de *Anisakis*, con una mejoría del paciente y por tanto, como alternativa a la intervención quirúrgica (Ramos et al. 2005); además se han prescrito tratamientos con antiespasmódicos (Asaishi et al. 1980), antiinflamatorios, e incluso algunos optan por una actitud más conservadora como dieta absoluta, fluidoterapia y tratamiento sintomático (Sterry Ashby 1964; Oshima 1972; Nakata et al. 1980; Castán et al. 2002; Ponferrada et al. 2005; Theodore 2005; Yasunaga et al. 2010). Otros fármacos indicados en las formas de anisakiasis no complicadas y poco dolorosas, han sido analgésicos y antiácidos, remitiendo el dolor una semana después (Nakata et al. 1980; Sugimachi et al. 1985); los inhibidores de la bomba de protones se han usado para disminuir la inflamación y con ello la epigastralgia producida por la acción local del parásito en la zona de fijación y penetración en la pared gástrica (Villafruela-Cives and Henríquez-Santana 2010).

Los antihelmínticos han formado parte del tratamiento farmacológico más frecuente para mejorar los síntomas en la anisakiasis crónica; de este modo, ante la posibilidad de que los granulomas eosinofílicos fueran de origen parasitario, fue recomendada la piperacina por Boquien et al. (1966); también López-Peñas et al. (2002) y Field-Cortazares and Calderón-Campos (2009) citan este fármaco. Otros autores han propuesto el uso del flubendazol (Petithory and Marty 1988), tiabendazol (Petithory and Marty 1988; Jira 1998; Fraj-Lázaro et al. 1998) y el mebendazol (Mochella et al. 2004; Ponferrada et al. 2005) o la ivermectina (Field-Cortazares and



Calderón-Campos 2009). Dentro de los antihelmínticos, el más recomendado en el momento actual es el albendazol (Ioli et al. 1988; Moore et al. 2002; Magnaval et al. 2002; Pacios et al. 2005; Nawa et al. 2005; Kim et al. 2006b; Filauro et al. 2011; Pontone et al. 2012; Carlin et al. 2018).

### 8.2. Preparados fitoterápicos

Nuestro grupo de investigación realizó una interesante revisión de los estudios llevados a cabo para la inactivación de las larvas de *Anisakis* spp., la cual incluye el extenso trabajo de nuestro grupo en este área (Valero et al. 2015), y que se presenta a continuación, con alguna modificación.

#### ***Estudios in vitro.***

Los ensayos con **extractos** de plantas han comprobado que las larvas L3 de *Anisakis* pierden totalmente la movilidad a las 24 h de entrar en contacto con extractos salinos de *Zingiber officinale* (5% y 2,5%), *Perilla frutescens* (5%), *Wasabia japonica* (5%) y *Allium sativum* (5%), mientras que otros resultaron ineficaces a las citadas concentraciones (*Allium fistulosum*, *Petroselinum sativum*, *Raphanus sativus*, *Brassica oleracea*, *Spinacia oleracea*, *Laminaria angustata*, *Capsicum annum* y *Thea sinensis*). Posteriormente, otros autores refrendaron los datos obtenidos por Kasuya et al. (1988) con *A. sativum*. También mostró gran eficacia larvicida el extracto de nuez moscada (*Myristica fragans*) a concentraciones de 0,5-0,7 mg/ml (López et al. 2015). Sin embargo, el extracto de *Tagetes lucida* no fue eficaz frente a las L3 de *Anisakis*.

También se ha puesto de manifiesto la eficacia *in vitro* de diversos **aceites esenciales (AEs)** frente a *Anisakis*, entre ellos destaca el aceite del árbol del té (*Melaleuca alternifolia*), que fue capaz de matar a las 48 h a la totalidad de las larvas, a concentraciones de 7 y 10 µg/ml. De igual manera, han resultados letales a las 4-48 h (125 µg/ml) los AEs de una serie de plantas, cuyo consumo, en algunos casos, está ampliamente extendido entre la población como condimentos o infusiones; entre ellas se encuentran el comino (*Cuminum cuminum*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), palmarrosa (*Cymbopogon martinii*), verbena exótica (*Litsea cubeba*), geranio

(*Pelargonium graveolens*), orégano (*Origanum vulgare*) y la manzanilla (*Matricaria chamomilla*). El AE de menta (*Mentha piperita*) fue letal a concentraciones de 250 µg/ml, y la mezcla de este AE con el de manzanilla presentó actividad con 125 µg/ml; en relación con el AE de *Thymus vulgaris*, se encontró que era activo sobre las larvas L3 al adicionarlo al 10% en aceite de girasol a la musculatura del pescado parasitado. En la mayoría de los casos se observaron alteraciones en la morfología de la larva que interesaban fundamentalmente a la cutícula y al tracto digestivo, sobre todo a la zona ventricular. El AE de *Piper nigrum* no tuvo una actividad importante a la concentración de 125 µg/ml, y el de *Myristica fragans* no mostró ninguna actividad. Tras una evaluación reciente del AE de *Tagetes minuta* L. sobre las larvas, se produjo una inactivación del 100% a las concentraciones de 1 y 5% v/v en solución salina después de 2 h, pero la actividad larvicida disminuyó a las mismas concentraciones de AE en aceite de girasol (Giarratana et al. 2017).

Por lo que respecta a los **componentes de los AE**, mostraron el 100% de eficacia larvicida los presentes en *Zingiber officinale* y *Perilla frutescens*, tales como [6]-shogaol (62,5 µg/ml), [6]-gingerol (250 µg/ml), perillaldehído (125 µg/ml) y perillil alcohol (250 µg/ml). En otro estudio de *Zingiber officinale*, [10]-shogaol, [6]-shogaol, [10]-gingerol y [6]-gingerol, tuvieron efecto larvicida, destacando el [10]-gingerol y el [10]-shogaol a 200 µM que provocaron la muerte de entre el 80 y 100% de las larvas entre 48-72 h. En el AE del rizoma de *Curcuma longa*, la (+)-ar-turmerona fue eficaz a 25 µg/ml a las 24 h; otros compuestos menos letales fueron paeonol, (-) mentol, mentiléster, trans-anetol, alil isotiocianato, eugenol, isoeugenol, metil eugenol, safrol, aldehído cinámico, geraniol and linalol), necesitando concentraciones comprendidas entre 125 µg/ml y 500 µg/ml para matar las larvas, entre 24-48 h. La santonina, dihidrosantonina y el (-)-8-fenilmetiléster, no tuvieron ninguna actividad.

Posteriormente, se han ensayado *in vitro* diversos **terpenos**, destacando la acción del α-pineno, ocimeno, geraniol, carvacrol, timol, citronelol, citral, nerolidol, farnesol y α-bisabolol, todos los cuales produjeron una mortalidad del 100% a 125 µg/ml a las 4 h del inicio de la experiencia; en todos los casos, los estudios histológicos mostraron

una alteración de la cutícula del parásito y/o de la pared del intestino. La carvona (125 µg/ml), monoterpene oxidado presente en diversos AEs (*Carum carvi*, *Anethum graveolens*, *Mentha* spp.), no mostró actividad significativa hasta transcurridas 48 h desde el inicio de la experiencia (resultados no publicados). Para β-pineno, mirceno y eucaliptol, no se observó actividad biocida frente a las larvas L3 de *A. simplex*.

### **Estudios *in vivo***

En los estudios de los AEs de menta (*Mentha piperita*) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*) se observó que en las ratas a las que se administró el AE de manzanilla junto con las larvas, tan sólo se aparecieron lesiones en la mucosa gástrica en un 2,2% de los animales, frente al 93,3% del grupo control. En las ratas tratadas con el AE de menta, no se apreciaron lesiones en el tracto GI ni larvas clavadas en el tracto digestivo de los animales, por lo que se puede deducir que este AE reduce significativamente ( $p < 0,001$ ) la capacidad patogénica de las larvas frente al control. Para el α-bisabolol, uno de los principales componentes del AE de manzanilla se encontraron lesiones tan solo en el 5,5% de los animales del grupo tratado; el mentol, acetato de mentilo y mentona, principales componentes del AE de menta, protegieron totalmente frente a esta parasitosis.

Por otra parte, en diversos ensayos se ha puesto de manifiesto la actividad larvicida de distintos derivados monoterpénicos presentes en distintos AEs, destacando la importante actividad larvicida *in vivo* de algunos monoterpenos, tales como timol, geraniol, citronelol, citral, y perillaldehído; no se observó ninguna lesión en los animales y la mortalidad de las larvas alcanzó con alguno de ellos hasta un 92,8%, a diferencia de lo observado para α-pineno, mirceno, ocimeno, carvacrol, cineol, aldehído cumínico y acetato de geranilo. Según el estudio histológico de las L3, la alteración en intestino y cutícula pudiera ser la causa de la muerte.

En cuanto a nerolidol y farnesol, derivados sesquiterpénicos testados en las pruebas *in vivo*, se encontró que el 20% de las ratas del grupo tratado presentó lesiones, siendo todavía menor la actividad larvicida *in vivo* del elemol, ya que el 40%

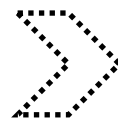
de las ratas a las que se administró este sesquiterpeno mostraron lesiones, frente al 86,6% del grupo control.

Además de los AEs y sus principales componentes, existen otros productos de origen natural con actividad antihelmíntica. En este sentido, cabe citar a las saponinas, grupo fitoquímico presente en la composición de un alto número de especies vegetales y para las cuales ha sido demostrada su actuación sobre distintos nematodos GI (Pérez-Pérez et al. 2014).

Por otra parte, los extractos de papaya y piña, y/o sus enzimas cisteín-proteinasas, han mostrado actividad frente a nematodos GI de roedores, cerdos, ovejas y humanos, tanto *in vitro* como *in vivo*, causando daños severos en la cutícula de los nematodos, como por ejemplo, en *Heligmosomoides polygyrus* (Salas et al. 2008; Luoga et al. 2015).

Por su parte, la utilidad del extracto de la fruta de la granada (*Punica granatum*) y/o de sus partes como antiparasitario, ha sido probada en protozoos, cestodos, trematodos y nematodos (Dell'Agli et al. 2009; Abdel-Ghaffar et al. 2010; Dkhil 2013). El extracto alcohólico del pericarpio de granada *in vitro* fue eficaz para producir la parálisis y muerte del nematodo de tierra adulto de *Allolobophora caliginosa* (Dkhil 2013).

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





Tal y como se ha descrito detalladamente en la parte introductoria, a día de hoy no se dispone de ningún fármaco realmente eficaz frente a la anisakiasis humana. Ello determina la necesidad de proceder a la investigación de nuevos productos que pudieran ser de interés en la resolución de esta parasitosis. En este sentido, el análisis de la bibliografía especializada en el tema, brinda la oportunidad de indagar el posible efecto de productos de distinto tipo frente a las larvas de *Anisakis*.

Así, la existencia de estudios *in vitro* indicativos del mayor desarrollo de la larva en el medio ácido (Iglesias et al. 2001), abre una vía de investigación mediante la cual se exploraría la posibilidad de que el aumento del pH gástrico, tras la administración de distintos antiácidos, fuera eficaz en el tratamiento de esta parasitosis.

En la búsqueda de nuevos antihelmínticos, las enzimas cisteín-proteinasas de algunas plantas han sido objeto de estudio por diferentes autores, causando daños severos en la cutícula de los nematodos (Stepek et al. 2005; Stepek et al. 2007b). Ello ha derivado en la realización, por nuestra parte, de ensayos de viabilidad y eficacia frente *Anisakis*, de la papaína y la bromelaína, dos de las enzimas vegetales más estudiadas, con propiedades antiinflamatorias conocidas (Salas et al. 2008).

La granada (*P. granatum*) es una planta cuyo fruto ha adquirido importancia en la preparación de zumos frescos y bebidas enlatadas, entre otros, del sector industrial (Fadavi et al. 2005). Es conocida su actividad antiinflamatoria, antibacteriana y antiulcerosa, parcialmente justificada por su efecto antioxidante (Lansky and Newman 2007; Jasuja et al. 2012). La utilización del extracto de la fruta y/o de sus partes como antiparasitario, frente a protozoos, cestodos, trematodos y nematodos (Dell'Agli et al. 2009; Abdel-Ghaffar et al. 2010; Dkhil 2013) nos ha conducido a testar su aplicación como anisakicida.

Otros productos naturales que han suscitado interés como agentes biocidas son los aceites esenciales y sus principales componentes, algunos de los cuales han sido activos *in vitro* frente a larvas de *Anisakis* (Valero et al. 2015); estos hechos permiten suponer la posible actuación de determinadas esencias sobre las larvas presentes en la musculatura de los peces.

De igual modo, la actuación frente a la inflamación gástrica de otro grupo de productos naturales tales como las saponinas, sugiere la posibilidad de que estos compuestos muestren un efecto positivo en el proceso inflamatorio característico de la anisakiasis, teniendo también en cuenta que, según algunos autores, pueden alterar los procesos biológicos de algunos nematodos (Pérez-Pérez et al. 2014).

Otro punto a destacar es el alto índice de parasitación por *Anisakis* en los peces que habitan en las aguas de la península Ibérica, en particular en la bacaladilla (*M. poutassou*) (Valero et al. 2000; Chía et al. 2010). Esta especie tiene una gran importancia comercial y es muy consumida debido a su bajo precio. Por ello, se precisa realizar estudios epidemiológicos moleculares, a fin de conocer en profundidad distintos parámetros de infección de *Anisakis simplex* s.s. y *A. pegreffii* en este hospedador, en aguas atlánticas y mediterráneas, y una zona de confluencia entre ambas.

La detección de híbridos *A. simplex* s.s.-*A. pegreffii* ha sido un tema de controversia a pesar de que la hibridación natural es un proceso extendido entre los organismos parásitos y de vida libre. En ambas especies se han hallado diferencias de importancia biomédica, tanto en la expresión génica de sus alérgenos como en su poder patógeno/invasivo (Romero et al. 2013; Arcos et al. 2014; Llorens et al. 2018), lo cual subraya la necesidad de centrarnos en este fenómeno mediante la búsqueda de nuevas dianas moleculares identificativas de estas especies y sus híbridos.

Todo lo anteriormente expuesto se traduce en el establecimiento de los siguientes objetivos:



1. Conocer si ciertos **fármacos inhibidores de la secreción gástrica ácida**, en concreto omeprazol y ranitidina, así como un **protector de la mucosa gástrica**, sucralfato, podrían tener una acción frente a la permanencia de las larvas en el tracto gastro-intestinal. Valorar los resultados obtenidos en el caso de animales infectados con larvas de *Anisakis* y tratados con estos fármacos.

2. Determinar la eficacia anisakicida *in vitro* de las enzimas proteolíticas **papaína y bromelaína**, y evaluar su hipotética aplicación *in vivo*.

3. Valorar los ensayos de actividad biocida de distintos extractos del fruto de la **granada (*P. granatum*)** frente a larvas de *Anisakis*.

4. Investigar la posible actuación de los **aceites esenciales** de cantueso (*Lavandula stoechas*), comino (*Cuminum cyminum*), espliego (*Lavandula spica*), mejorana (*Origanum marjorana*), orégano (*Origanum vulgare*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre las larvas de *Anisakis* presentes en la **musculatura del pescado**. Evaluar la infectividad de las larvas tratadas con los aceites en animales de experimentación.

5. Evaluación de las **saponinas** diosgenina, ácido  $\beta$ -glicirretínico y sarsasapogenina en un modelo experimental de anisakiasis.

6. Estudiar la epidemiología molecular y los factores de riesgo para la infección de la **bacaladilla** de *Anisakis* en una zona de confluencia del océano Atlántico y el mar Mediterráneo, el **golfo de Cádiz**. Obtener valores de varios indicadores del parasitismo y factores ecológicos de las especies *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, e investigar posibles diferencias entre ellas.

7. Evaluar por primera vez la utilidad del **gen  $\beta$ -tubulina** como marcador nuclear para la identificación de las **especies hermanas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii***, y de individuos de genotipo mixto *A. simplex* s.s.- *A. pegreffii*.

8. Analizar las **poblaciones de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*** en las aguas que rodean la Península Ibérica y sus procesos de hibridación.

# MATERIAL Y MÉTODOS

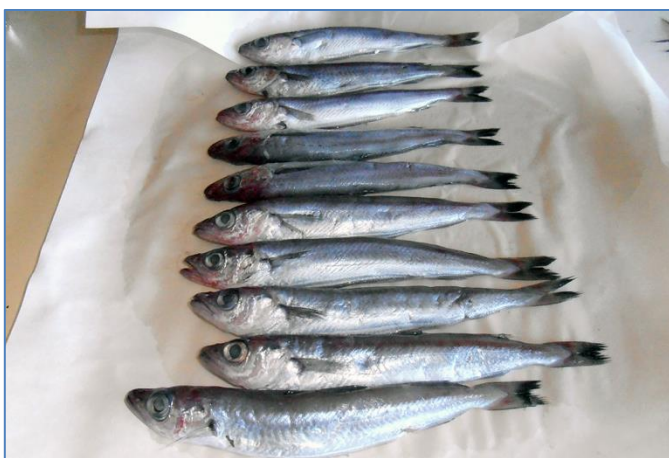




## Capítulo 1. Tratamiento *experimental* de la anisakiasis aguda

### Hospedador

**Bacaladillas (*M. poutassou*):** de entre 15 y 40 cm de longitud, capturadas en aguas del Atlántico Norte (mar Cantábrico), y adquiridas en diferentes pescaderías de Granada (España).

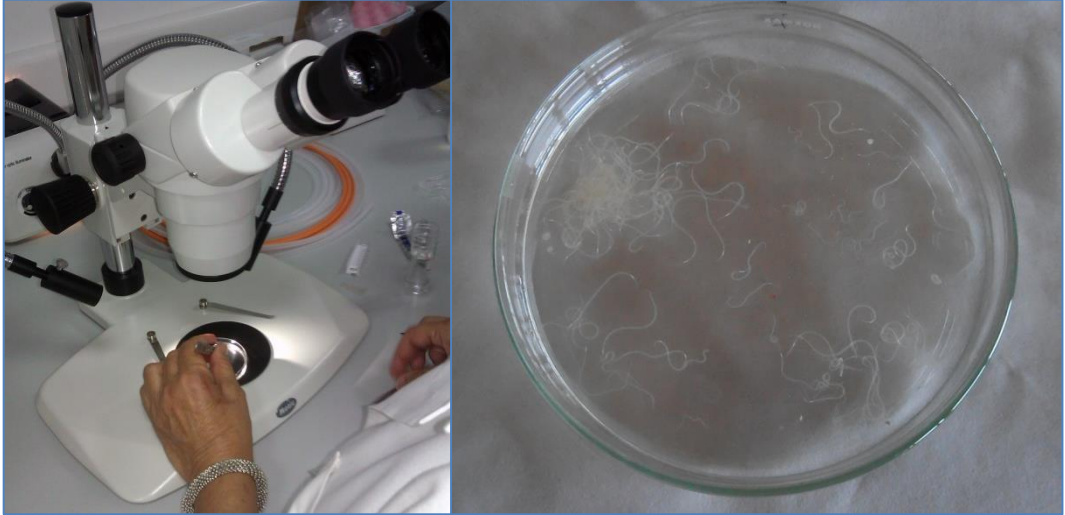


**Fig. 8 Bacaladillas dispuestas en fila para su procesado.**

### Parásitos

**Larvas L3 *Anisakis* Tipo I:** de un tamaño > 2 cm, en buen estado físico y provistas de una gran movilidad.

Se aislaron de las vísceras y cavidad abdominal del hospedador, seguidamente se depositaron en una placa Petri con solución de NaCl al 0,9% y se lavaron varias veces en la solución. Mediante microscopio estereoscópico se procedió a la identificación y selección de las larvas. Éstas se conservaron a 4 °C.



**Fig. 9 Microscopio estereoscópico (a la izqda.) para visualizar las larvas dispuestas en placas Petri (a la dcha.) obtenidas del hospedador y llevar a cabo su identificación y selección.**

### **Estudio *in vitro***

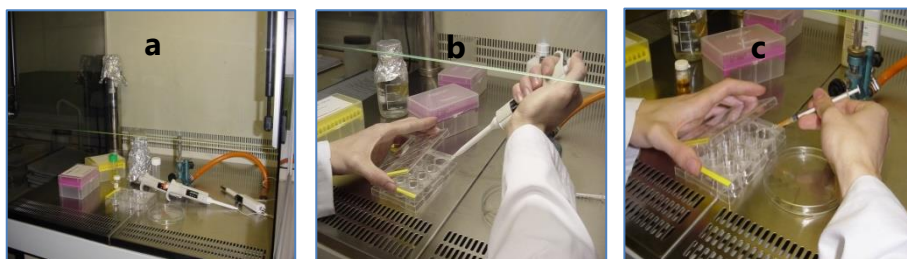
Para determinar la actividad de los fármacos y productos ensayados frente a las larvas de *Anisakis* tipo I, éstas se axenizaron en solución antibiótica (1 ml: 10.000 U de penicilina, 10 mg estreptomina, 25 µg anfotericina B, Sigma-Aldrich, EEUU) durante 20 minutos. Seguidamente, se depositaron individualmente en placas de poliestireno (Greiner, Alemania) con 2 ml de NaCl al 0,9% estéril y la dosis elegida del producto a ensayar o 2 ml del producto directamente; estos procedimientos se realizaron en la cámara de flujo laminar. A continuación, se procedió a la incubación a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

De forma paralela, para constatar el estado óptimo de las larvas, se realiza un ensayo control con solución de NaCl al 0,9% u otro vehículo, según el caso, siguiendo la pauta antes señalada.

La observación de los parásitos se realizó mediante microscopio estereoscópico a las 4, 8, 24 y 48 h.

Cada producto se ensayó cuatro veces en días diferentes con el fin de asegurar que las larvas mueren por acción del químico.

**Criterio de mortalidad:** se establece como la falta de movilidad de la larva o reducción drástica de la misma, y/o la ruptura de la integridad o fragmentación de la cutícula de la larva y/o de partes internas, como el ventrículo esofágico y el intestino.



**Fig. 10 (a) Material utilizado en ensayo *in vitro* en la cámara de flujo laminar. (b) Introducción de los productos en los pocillos de la placa con pipeta. (c) Deposición de las larvas en los pocillos de la placa, una vez axenizadas.**

### **Estudio *in vivo***

Se llevó a cabo para determinar la eficacia de los fármacos y compuestos frente al parásito en un modelo animal de roedor, para lo cual los productos se administraron a la dosis convenientemente establecida mediante sonda flexible de 2 mm de diámetro.

La infección de los animales se realizó con seis larvas de *Anisakis* junto con 0,5 ml de agua o del producto objeto de estudio, dependiendo de las características del ensayo; las larvas se depositaron en el tracto digestivo con sonda gástrica. Transcurridas 4 h post-infección, se sacrificaron los animales y se llevó a cabo la necropsia. Seguidamente, se realizó un examen minucioso de los órganos en busca de aquellas larvas que pudieran haber atravesado la pared del tracto gastro-intestinal (GI). Por último, se retiró el paquete digestivo y se procedió a su

apertura bajo microscopio estereoscópico, anotando la localización y número de larvas en cada parte del tracto GI, y la posible presencia de lesiones GI así como la medida de su tamaño mediante un micrómetro ocular.

### **Animales de experimentación**

La manipulación, alojamiento y sacrificio de los animales de experimentación se realizó acorde a la normativa vigente y siguiendo las recomendaciones éticas de FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Associations).

**Ratas Wistar:** Se adquirieron de Harlan Ibérica SA, ratas hembra de unos 150 g de peso. Se trata de un tipo de rata no consanguíneo ampliamente utilizado en estudios farmacológicos.

**Alojamiento:** Las ratas se alojaron en las instalaciones pertinentes, en jaulas de 1000 y 2500 cm<sup>2</sup> de forma que no excedieran el número aconsejado por superficie. Dispusieron de agua y comida estándar (Harlan Ibérica SA) *ad libitum* así como climatización (22 °C, 55% humedad) y ciclos luz/oscuridad de 12 h.

**Sacrificio:** Se optó por el procedimiento de dislocación cervical al ser el más rápido e indoloro, además de no necesitar anestesia.

**Autorización:** Los experimentos realizados en roedores fueron autorizados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Granada con el código de registro de entrada de documentos 294-2007-CEEA.



## 1. Fármacos antiácidos y antihelmínticos

**Omeprazol.** Se empleó una preparación del fármaco en suspensión (2 mg/ml) a partir de Ceprandal®, Alfasigma SL, España.

### *Preparación según la Guía de elaboración, control y registro de Fórmulas Magistrales (Hospital Universitario San Cecilio):*

*Machacar las cápsulas de omeprazol con un mortero.*

*Verter junto con el bicarbonato sódico 8,4% en agua destilada en un vaso de precipitado.*

*Dejar en el agitador magnético durante 1 h aproximadamente.*

*Agitar y conservar a 4 °C hasta el tiempo de un mes.*

Se administró la dosis de 3,6 mg/kg a los animales en ayuno de 4-6 h, 30 min antes de la infección (Medlineplus, omeprazol).

**Ranitidina.** Para la administración de este compuesto se preparó un jarabe (10 mg/ml) a partir de Ranitidina Cinfa®, Cinfa SA, España.

### *Preparación según la Guía de elaboración, control y registro de Fórmulas Magistrales (Hospital Universitario San Cecilio):*

*Pulverizar el polvo de las cápsulas de ranitidina en el mortero para homogeneizar el tamaño.*

*Añadir agua destilada al 50% del volumen final, y disolver con ayuda de un pistilo.*

*Añadir jarabe simple (64 g de sacarosa y 36 g de agua, para 100 ml), al 50% del volumen final, y disolver.*

*Traspasar a un vaso de precipitado, y colocar en el agitador durante unos minutos. Envasar en un frasco topacio para proteger de la luz, con ayuda de un embudo de vidrio, y conservar a 4 °C.*

Se suministró a cada animal una dosis de 27 mg/kg, 30 min antes de la toma de las larvas (Medlineplus, ranitidina).

**Sucralfato.** Este fármaco se utilizó directamente del envase del medicamento Urbal®, Merck SL (España), conservado a temperatura ambiente, a la dosis de 90 mg/kg, y se administró 30 min antes de la infección (Medlineplus, sucralfato).

**Mebendazol.** Se adquirió de Esteve Pharmaceuticals SA (España), con el nombre registrado de Lomper®; disponible en un envase en forma de suspensión y conservado a temperatura ambiente.

Se utilizó una dosis única de 500 mg, siendo ésta la recomendada por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EEUU (CDC) (CDC, helmintos), ajustada al peso de los animales (45 mg/kg); su administración se realizó al mismo tiempo que la infección (Medlineplus, mebendazol).

**Flubendazol.** Se empleó un medicamento de uso veterinario adquirido de Esteve Pharmaceuticals SA (España), con el nombre registrado de Flubenol®; disponible en un envase en forma de pasta y conservado a 4 °C.

Se utilizó a la dosis de 45 mg/kg, siguiendo la misma pauta que para el mebendazol, y se administró al mismo tiempo que la infección, según la pauta encontrada en el prospecto.

En todos los casos, las dosis de los distintos medicamentos ensayados fueron calculadas a partir de las empleadas en humanos, con excepción del Flubendazol en el que realizó la transformación a partir de la dosificación establecida para gatos (Ruckebusch 1977).

### **Características del ensayo *in vitro***

Se emplearon las concentraciones de 0,5 y 2,5 mg/ml de omeprazol y ranitidina en NaCl 0,9%, añadiendo 2ml a cada pocillo de la placa de poliestireno con una larva de *Anisakis*.

El ensayo con sucralfato no pudo realizarse debido a la densidad del producto.

### **Características del ensayo *in vivo***

Cada uno de los ensayos estuvo constituido por lotes de 20 ratas, a las que se administró una sola dosis de cada fármaco. Adicionalmente, se realizó un tratamiento de larga duración (TLD) con omeprazol, ranitidina y sucralfato; estos medicamentos se administraron durante 14 días consecutivos, practicando la infección el día 15.

Paralelamente, se llevó a cabo un lote **control** de 20 animales en el ensayo de cada fármaco.

### **Mortalidad de las larvas**

Para determinar la viabilidad entre 0 y 48 h de las larvas obtenidas de los animales tratados y controles, se mantuvieron en placas de poliestireno estériles de 12 pocillos con solución de NaCl 0,9%, a 36 °C y 5 % de atmósfera de CO<sub>2</sub>, como en el ensayo *in vitro*, y transcurrido ese tiempo, se observaron al microscopio estereoscópico atendiendo su movilidad y estado físico.

### **Medida del pH gástrico**

El pH se midió con papel indicador (Panreac Química SLu, España), con medición de valores entre 0,5-5,5 y 5,5-7,0. Los valores obtenidos corresponden al pH del cuerpo del estómago, de los animales tratados con omeprazol, ranitidina o sucralfato, así como de los controles.

### **Estudio histológico**

Se aplicaron en tres grupos de animales, a) no infectados sin tratamiento, b) infectados sin tratamiento, c) infectados y tratados. Las secciones se tomaron de las distintas áreas del estómago: el área no glandular que contiene una mucosa de

epitelio escamoso estratificado recubierto de mucosidad, y el área glandular con una mucosa de epitelio columnar simple con glándulas gástricas.

Procesamiento: realizado por el **Prof. Francisco Arrebola Vargas** del departamento de Histología de la Facultad de Farmacia.

Las muestras se fijaron en formol tamponado al 10% y se procesaron para su estudio histológico mediante deshidratación en etanol e inclusión en parafina. Se obtuvieron secciones de 5 µm de grosor con microtomo, que fueron teñidas con hematoxilina-eosina y con Tricrómico de Masson, y estudiadas mediante microscopía óptica de campo claro.

***Hematoxilina-eosina:** La hematoxilina no es un colorante en sentido estricto sino que es la hemateína, su producto oxidado, la que teñirá estructuras ácidas como los núcleos celulares. La eosina, colorante ácido, se une a elementos del citoplasma y de la matriz extracelular.*

*Resultado:*

*Núcleo celular= violeta o púrpura (sólo se tiñe la cromatina)*

*Citoplasma= rosado*

*Glóbulos rojos= color cereza*

*Musculatura= rosa fuerte*

*Colágeno= rosa pálido*

***Tricrómico de Masson:** compuesto por hematoxilina férrica de Weigert, fucsina escarlata y colorante verde azul.*

*Resultado:*

*Núcleo celular= lila, marrón, negro*

*Citoplasma= rosado*

*Estructuras oxidadas + Citoplasma (queratina, glóbulos rojos, tejido muscular)= rojo*

*Músculo= rojo, marrón*

*Colágeno= verde azulado*

### **Análisis estadístico**

Los datos se han analizado utilizando el programa SPSS 20.0.

a) Una vez realizado el ensayo *in vivo*, se lleva a cabo una regresión logística binaria, usando la presencia o no de lesión GI como variable dependiente y el uso de tratamiento o no como variable explicativa, con el fin de determinar la influencia de los medicamentos ensayados en la aparición de lesiones GI debido a la infección por *Anisakis*.

b) También se ha evaluado el papel del pH gástrico en la ocurrencia y tamaño de lesiones mediante el coeficiente de correlación.

## 2. Enzimas proteolíticas

**Papaína** (aislada de polvo liofilizado de látex de papaya 3,36 U/mg proteína; [CAS Number: 9001-73-4]), conservada a 4 °C, y **bromelaína** (aislada de polvo liofilizado de tallo de piña 6 U/mg, CAS Number: 37189-34-7), adquiridas de Sigma-Aldrich (MO, EEUU).

### **Características del ensayo *in vitro***

Dosis: el extracto en polvo de papaína se utilizó a las concentraciones de 50, 25 y 2,5 mg/ml en NaCl 0,9%, y el de bromelaína, a 25 mg/ml en NaCl 0,9%.

Atendiendo al **criterio de integridad**, se marcaron en cada intervalo de tiempo las larvas que no se habían fragmentado (vivas) y aquellas que aparecieron fragmentadas (muertas).

Los parámetros determinados en este ensayo son: **Supervivencia Media** ( $S_m$  = % de L3 vivas) a las 4, 8, 24 y 48 h del inicio de la experiencia; **Supervivencia 50** ( $S_{50}$  = tiempo en el cual la mitad de las L3 están vivas) y **Supervivencia Máxima** ( $S_{max}$  = número de L3 vivas a las 48 h).

### **Características del ensayo *in vivo***

En este caso, sólo se realiza una prueba en 6 animales de experimentación del extracto de papaína, a la dosis de 80 mg/Kg. De forma paralela, se realizó un ensayo control.

### **Análisis estadístico**

Los datos se han analizado utilizando el programa SPSS 20.0.

a) Tras el ensayo *in vitro*, se realiza una comparación de muestras independientes (test de Mann-Whitney), utilizando el % de mortalidad de las larvas en cada intervalo de tiempo.

b) Una vez realizado el ensayo *in vivo*, se lleva a cabo una regresión logística binaria, usando: la presencia o no de lesión GI como variable dependiente y el uso de tratamiento o no como variable explicativa, con el fin de determinar la influencia de la papaína en la aparición de lesiones GI debido a la infección por *Anisakis*.

### **3. Extractos de granada (*Punica granatum*)**

Se utilizan dos tipos de productos a base de granada: granadas (variedad Mollar Elche) y zumo 100% de granada (Granatum plus®, Antioxidantes Naturales del Mediterráneo SL, España).

Los ensayos se realizaron usando: el extracto de la fruta (zumo y arilos) más el pericarpio, y de la fruta solamente, y directamente del envase, el zumo de la fruta.

Procedimiento: lavar y pesar la fruta, y obtención del extracto mediante una licuadora, dividiendo los preparados según se conserven a 4 °C o se congelen previamente a -18 °C.

#### **Características del ensayo *in vitro***

Para determinar su actividad frente a las larvas, todos los productos se depositaron en las placas sin diluir (100% de concentración), y como control se utilizó NaCl 0,9%.

#### **Análisis estadístico**

Tras el ensayo, se realiza una comparación de muestras independientes (test de Mann-Whitney), utilizando el % de mortalidad de las larvas en cada intervalo de tiempo.





**Fig. 11 Fruto de granada (*Punica granatum*) de la variedad Mollar Elche (a la izqda.). Microscopio estereoscópico donde se observan las larvas dentro de los pocillos de la placa; se le añade luz para mejorar la visión (a la dcha.).**

#### 4. Aceites esenciales sobre musculatura de pescado infectado

Los siguientes aceites esenciales (AEs) se ensayaron frente a las larvas de *Anisakis* presentes en la **musculatura de la bacaladilla**: cantueso (*Lavandula stoechas*), comino (*Cuminum cyminum*), espliego (*Lavandula spica*), mejorana (*Origanum marjorana*), orégano (*Origanum vulgare*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). Estos productos fueron suministrados por Sensient Fragrances (Granada, España).

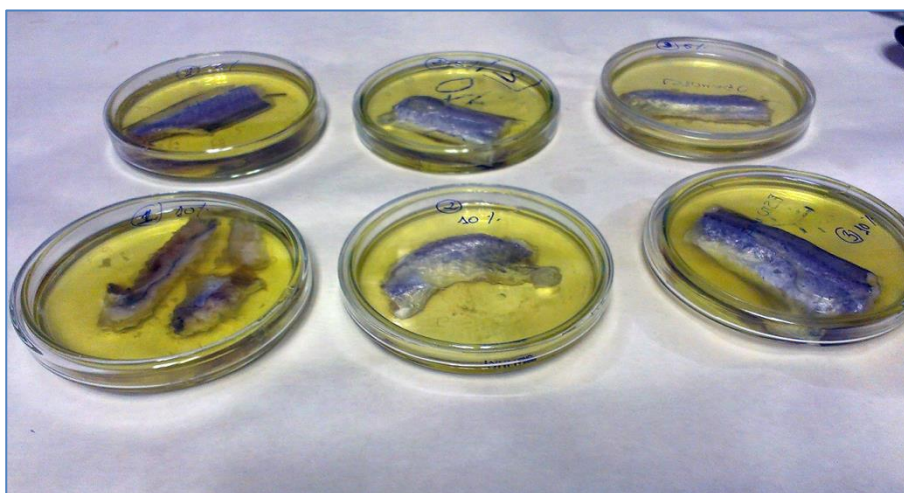


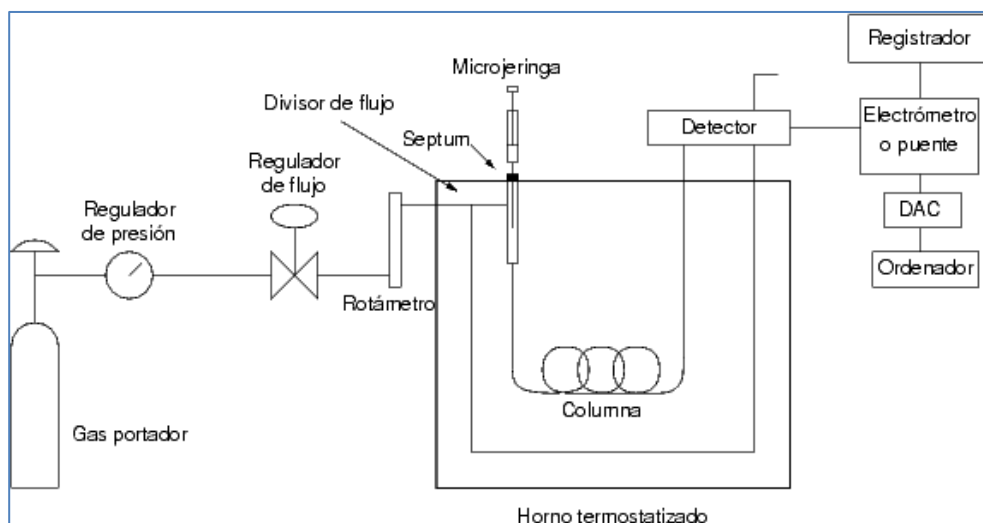
Fig. 12 Recipientes de vidrio con la musculatura del pescado expuesta a las disoluciones de aceites esenciales.

#### Análisis de la composición de los AEs

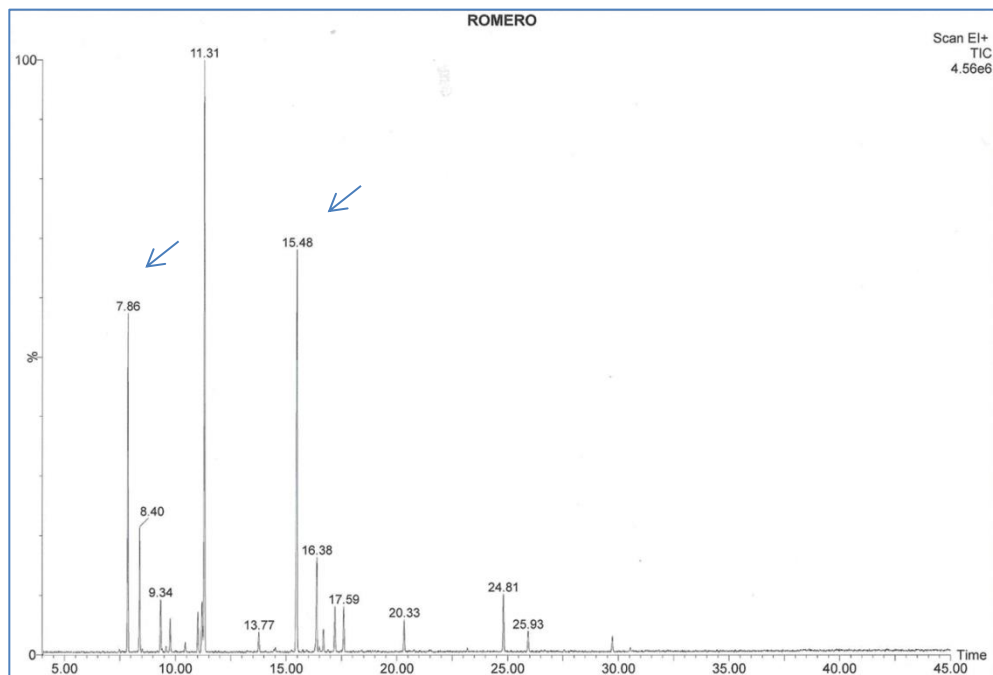
Se realizó una cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), utilizando un sistema Agilent 7890A (CA, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas Water Quattro Micro GC (Cerdanyola del Vallés, España). La columna usada fue la columna capilar ZB-5MS de fenil dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25  $\mu\text{m}$  de grosor), provisionado por Phenomenex (CA, EEUU), con helio como gas portador

(tasa de flujo = 1mL/min). Las muestras se inyectaron usando el modo Split (Split ratio 1:1000), con una temperatura de inyección a 200 °C. La temperatura del horno se programó desde 50 °C (2,5 min) hasta 200 °C a una ratio de 4° C/min, y se mantuvo a 200 °C durante 8 min. Para el análisis cualitativo se empleó el tiempo de retención, que es característico de cada compuesto en condiciones determinadas (mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo), y se cuantificaron las áreas de cada compuesto con los calibrados adecuados.

El espectro de masas se obtuvo en modo de impacto de electrones (70eV). Los componentes se identificaron por fragmentación espectral de masas, mediante comparación con aquellos constituyentes conocidos, y utilizando un sistema de búsqueda de bibliotecas de espectro de masas (Adams 2007).



**Fig. 13 Diagrama de un cromatógrafo de gases. Imagen libre bajo licencia de Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0.**



**Fig. 14** Ejemplo de cromatograma obtenido de los componentes del AE de romero, en el cual los números (flechas) indican el tiempo de retención en la columna de cada componente.

### **Estudio *in vitro***

Se realizaron ensayos de eficacia de los **AEs** al 5% (v/v), **en aceite de oliva** como diluyente.

La presencia de larvas parásitas en la musculatura de los hospedadores fue confirmada mediante observación directa.

Procedimiento:

1º Sobre 7-9 peces se usaron para cada AE, los cuales se evisceraron, lavaron y depositaron en recipientes de vidrio cubiertos con cada una de las soluciones de

aceite esencial. Los recipientes se cerraron y mantuvieron durante 24 h a la temperatura de 4 °C.

2º Trascurrido este tiempo, se recogieron las larvas que habían abandonado la musculatura procediéndose al lavado del pescado para asegurar que todas las larvas tienen la misma procedencia. Inmediatamente después, se realizó una digestión artificial con una solución de pepsina-HCl (pH 2-2,4, modificado de McGladdery 1986) durante 45 min a 36 °C.

### ***Pepsina-Hcl:***

*Pepsina en polvo 2,5 g (Panreac Química SLu, España)*

*Ácido clorhídrico 2 ml*

*Agua c.s.p. 1l*

3º Seguidamente, se llevó a cabo el conteo de las larvas encontradas libres en el recipiente y de las obtenidas tras la digestión del músculo.

De forma paralela se realizaron los siguientes ensayos **control**:

a) depositando 2 ml de aceite de oliva en los pocillos de una placa con una larva en cada uno.

b) sumergiendo el pescado infectado sólo en aceite de oliva (vehículo), con el fin de verificar que el vehículo no tiene efecto sobre las larvas.

c) sumergiendo el pescado infectado sólo en líquido de digestión.

El estado de los parásitos se determinó bajo el microscopio estereoscópico, atendiendo a **criterios de movilidad**: muertas si no se movían, ni respondían a ningún estímulo; aparentemente vivas tras estímulo con pincel, y vivas las que presentaban movimiento espontáneo.

### **Características del ensayo *in vivo***

Se infectaron 44 ratas, cada una con 4-8 larvas L3 activas, según el caso, junto con 0,5 ml de agua. Los ensayos se han realizado conforme al siguiente protocolo:

a) un lote de animales se infectaron con las larvas vivas que habían abandonado la musculatura durante el tiempo de permanencia/inmersión en cada uno de los AEs.

b) otro lote estuvo constituido por los animales que se infectaron con las larvas recuperadas del pescado tratado y posterior digestión del mismo.

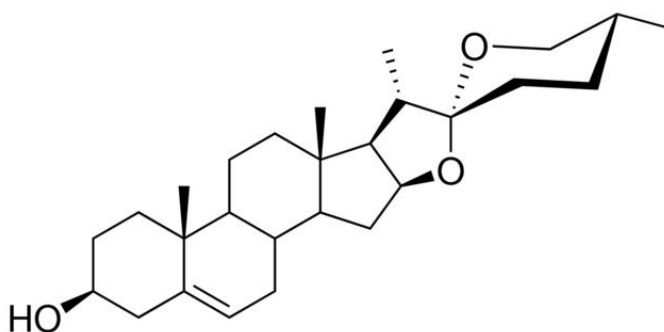
Con el fin de establecer la posible influencia del vehículo sobre la viabilidad de las larvas se diseñó un lote **control** constituido por roedores a los que se les introdujeron las larvas obtenidas tras digestión del pescado sumergido sólo en aceite de oliva.

## 5. Disoluciones oleosas de tres saponinas

### Saponinas empleadas

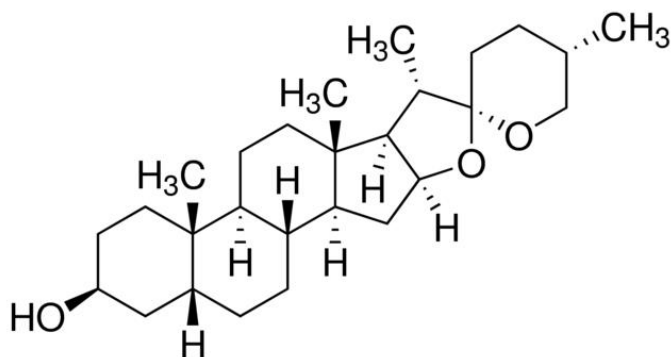
*Diosgenina*: sapogenina obtenida por hidrólisis de la saponina dioscina, y que está presente principalmente en el género *Dioscorea* spp..

Fórmula química: 3 $\beta$ -hidroxi-5-estirostano (3 $\beta$ , 25R)-estirostan-5-en-3-ol (nitogenina)



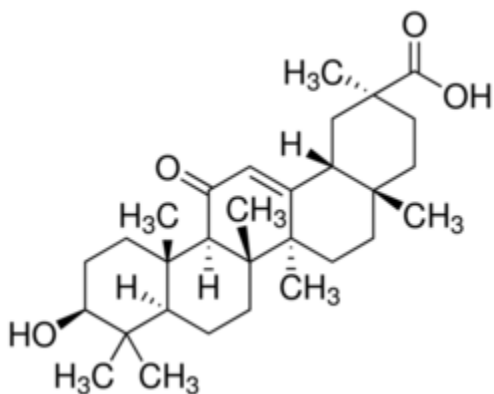
*Sarsapogenina*: es el primer estirostano identificado como tal. Es una sapogenina que se encuentra en la raíz de muchas especies de plantas, como *Yucca* y *Trigonella* spp..

Fórmula química: (25S)-estirostano-3 $\beta$ -ol (parigenina)



*Ácido 18-β glicirretínico*: saponina que se obtiene de la hidrólisis de la glicirricina, principal constituyente de la planta del regaliz (*Glycyrrhiza glabra*).

Fórmula química: ácido 3β-Hidroxi-11-oxo-18β,20β-olean-12-en-29-oico (enoxolona)



**Diosgenina** (95% pureza, CAS Number: 512-04-9), **ácido 18-β glicirretínico** (97% pureza, CAS Number: 471-53-4) y **sarsasapogenina** (98% pureza, CAS Number: 126-19-2), adquiridas de Sigma-Aldrich (MO, EEUU).

Las tres saponinas se disolvieron en aceite de oliva y 1% de alcohol 96°, en condiciones de calor sin llegar a ebullición y agitación magnética.





Fig. 15 Vaso de precipitado con disolución de diosgenina en agitación.

### **Características del ensayo *in vitro***

Se realizó un **control** del efecto del **aceite de oliva** sobre las larvas en placas de poliestireno.

Se probaron las **sapogeninas** a la concentración de 12,5 µg/ml.

### **Características del ensayo *in vivo***

Dosis de 5 y 2,5 mg/kg de peso corporal para diosgenina se eligieron para evaluar su actividad (Matsuda et al. 2003). En el caso de sarsasapogenina y ácido glicirretínico, se probaron 5 mg/kg y la fracción de 1/16 de la DL<sub>50</sub> (DL<sub>50</sub>= 980

mg/kg para la primera y 2450 mg/kg para la segunda) (Hu et al. 2005; Kalaiarasi and Pugalendi 2009).

Se utilizaron 20 ratas, a las que se les administraron simultáneamente las larvas y 0,5 ml de cada solución de saponina.

De forma paralela, se realizó un ensayo **control** en 20 ratas, a las que sólo se administraron las larvas mediante sonda gástrica con 0,5 ml de agua.

### **Estudio histológico**

En todos los grupos de animales, se tomaron porciones de las distintas áreas del estómago de las estructuras estomacales dañadas de las ratas infectadas con *Anisakis* y tratadas con **cada una de las saponinas a su dosis más eficaz**, y las muestras fueron procesadas (ver pág. 83).

### **Medida de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO)**

Con el objetivo de conocer si estos compuestos dañan el tracto GI, se llevó a cabo la determinación de la actividad MPO, cuyo método utilizado fue descrito por Krawisz et al. (1984). La MPO es una enzima presente predominantemente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos (aunque no exclusivamente), la cual cataliza la producción de HClO y constituye un marcador sensible de la infiltración de neutrófilos e inflamación.

En nuestro estudio se han medido los niveles de MPO de los tejidos del tracto GI, utilizando para ello **una porción de estómago, otra de intestino delgado y una de intestino grueso** de los animales a los que se les administró cada uno de los compuestos objeto de experimentación. Como referencia, se midieron los niveles de MPO de porciones del tracto digestivo de ratas que no fueron tratadas con ningún compuesto. Los valores de MPO se expresaron en miliunidades (mU).

**Reactivos:**

-Tampón de homogeneización HTAB:

*Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTBA, Sigma) 0,5% (p/v)*

*Tampón fosfato sódico 50 mM (pH= 6,0)*

-Tampón fosfato sódico (50 mM, pH= 6,0):

*KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 6,8 g/l en agua destilada*

*K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 8,7 g/l en agua destilada*

-Tampón de reacción (extemporáneo):

*O-dianisidina 0,167 mg/ml (Sigma)*

*Tampón fosfato sódico 50 mM (pH= 6,01)*

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,005% (p/v)*

-MPO de rábano (para curva patrón, extemporáneo, Sigma) 0,1U/ml:

*Reconstituir en tampón acetato sódico*

*Realizar 7 diluciones ½ seriadas en tampón HTAB*

**Procedimiento:**

-Homogeneización:

*Picar los fragmentos de tejido (congelados a -20 °C) sobre una placa Petri con hielo y guardar a -80 °C.*

*Homogeneizar durante un minuto con un homogeneizador automático Heidolph con tampón HTAB (precalentado a 37 °C) a una dilución 1:20 (p/v) -> g muestra/0,05= ml HTAB.*

*Congelar las muestras a -80 °C*

*-Preparación de las muestras:*

*Descongelar y centrifugar 7000 G durante 10 min a 4 °C, para la obtención del sobrenadante*

*-Medida de la actividad:*

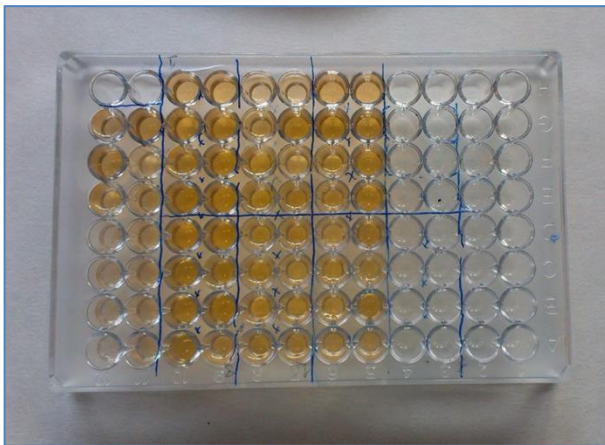
*Añadir a la placa microtiter, por duplicado: 10 µl solución HTAB (blanco), 10 µl de cada dilución del patrón, y 10 µl de muestras (directamente del centrifugado).*

*Añadir 200 µl/pocillo del tampón de reacción, y medir inmediatamente.*

*Lectura de la absorbancia a 450 nm, a 37 °C.*

*La actividad se calcula por interpolación en una curva patrón realizada con la MPO procedente de rábano.*

*Se obtiene una recta de regresión, buscando un buen ajuste, mediante el programa Microsoft® Office Excel. Una vez obtenida la ecuación, se calculan las mU MPO de cada muestra/g de tejido = mU/ 10 µl: 0,0005 g/ 10 µl (1g/ 20 ml).*



**Fig. 16** Placa microtiter de 96 pocillos tras la reacción colorimétrica.

### **Identificación de las larvas por técnicas moleculares**

Las L3 de *Anisakis* tipo I obtenidas de la necropsia de los animales se recogieron y se mantuvieron a -20 °C hasta su identificación genética.

El estudio comprendió **las dos larvas causantes del daño en los animales tratados con diosgenina**, y 18/28 larvas patógenas en los animales controles –12 larvas fijas al tracto GI y 6 larvas aisladas de la cavidad. Además, se identificaron 32 larvas presentes en el tracto GI que no fueron responsables de lesión, 23 de estómago, y 9 de intestino.

### ***Extracción de ADN***

Para ello, primero cada tubo Eppendorf que contiene una larva se mantuvo en nitrógeno líquido unos segundos para facilitar la ruptura de las membranas celulares. El tejido fue molido con un pistilo y el ADN genómico se extrajo usando el kit RealPure para extracción de ADN genómico (REAL Laboratory SL, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. El pellet precipitado se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada y fue mantenido a -20 °C hasta su uso.

Se tomaron ciertas precauciones para evitar contaminaciones cruzadas, incluyendo el uso de habitaciones separadas para los procesos de extracción de ADN así como la división de los reactivos en alícuotas pequeñas, el cambio de guantes frecuente, y el uso de controles negativos de los procesos de extracción de ADN (un tubo vacío cada 6 tubos de muestra). Tras esto, se midió la cantidad de ADN (µg) utilizando un nanodrop, para asegurar una cantidad suficiente de muestra,

### ***Identificación molecular mediante PCR-RFLP del ITS de ADNr***

Posteriormente se llevó a cabo la amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) de la región ITS-5S, 8-ITS2 del ADNr (ribosómico), utilizando los

cebadores NC5 (forward), 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3', y NC2 (Reverse), 5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3', (Zhu et al. 1998), adheriéndose a las condiciones de amplificación establecidas por los mismos autores: primer ciclo desnaturante de 94 °C durante 10 min, luego 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s en la fase de hibridación, 72 °C durante 60 s; y elongación final a 72 °C durante 5 min, y se mantuvieron a 4 °C hasta que los tubos se retiraron (Zhu et al. 2000).

### **Reactivos:**

*El volumen final de cada reacción, de 50 µl, estuvo compuesta por: 5 µl de tampón de reacción 10x, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2 µl de mix de nucleótidos 10 mM, 1 µl de cebadores NC2 (forward) y NC5 (reverse), 25 µM (Tib Molbiol, Alemania), 1,25 U de ADN polimerasa Biotaq (Bioline, Francia), y 2 µl de ADN genómico*

Los amplicones resultantes de la PCR, teñidos con tampón de carga se confirmaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio, y se utilizó el estándar de pesos moleculares HyperLadder 100 pares de bases (pb) (Bioline, Francia).

### **Tampón de carga:**

*Sacarosa 20% (p/v) (Panreac Química SLU, España)*

*Azul bromofenol 0,2% (p/v) (Sigma-Aldrich, EEUU)*

### **Gel de agarosa 1,5%:**

*Agarosa estándar baja EEO (Ecogen, España) 1,5 g*

*Tampón TAE 50x -> 500 ml: 121 g Tris, 28,55 ml Ácido acético glacial y 50 ml EDTA 0,5 M; pH= 8 (suministrados por Panreac Química SLU, España)*

*Bromuro de etidio (1%, Fluka, Suiza) 5 µl*

*Agua destilada c.s.p. 100 ml*

La digestión mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymrase) se llevó a cabo independientemente usando las enzimas de restricción *TaqI* (5'...T↓CGA...3') e *HinfI* (5'...G↓ANT...3') (Fastdigest, Thermo Scientific, Alemania) (D'Amelio et al. 2000). La digestión se realizó a 65 °C (*TaqI*) o 37 °C (*HinfI*) durante 10 min, tras la cual los resultados se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%, que permitió identificar a las especies del complejo de acuerdo al patrón de bandas (D'Amelio et al. 2000; Kijewska et al. 2000; Martín-Sánchez et al. 2005; Pontes et al. 2005; Umehara et al. 2006).

*HinfI* reconoce las diferencias fijas entre las especies hermanas del complejo *A. simplex* en la posición nucleotídica 255, y *TaqI* en la posición 271; debido a ello en los controles de *A. simplex* s.s., la digestión con la enzima *HinfI* produce dos fragmentos de 620 y 250 pb, así como una más débil de 100 pb; la endonucleasa *TaqI* origina tres fragmentos: uno de 430 pb, uno de 400 pb y uno débil de 100 pb. Los controles de *A. pegreffii* presentan un patrón de bandas de 370, 300 y 250 pb para la enzima *HinfI*, y tres de 400, 320 y 150 pb para la enzima *TaqI*. Para los individuos híbridos entre ambas especies, el patrón de bandas RFLP con las dos enzimas de restricción, *HinfI* y *TaqI*, es la suma de los patrones generados para *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*.

**Reactivos:** 10 U de enzima digieren completamente 1 µg de sustrato de ADN en 20 µl de tampón Fastdigest 10x

**Gel de agarosa 3%:** se utiliza el doble del peso de agarosa que el utilizado al 1,5%

### **Análisis estadístico**

El programa IBM SPSS Statistics 20.0. se usó para el análisis de los datos.

a) El análisis de los factores de riesgo de la patogenicidad se llevó a cabo mediante un modelo de regresión logística binaria univariante, en el cual se investigó la asociación entre el tratamiento con cada saponina (variable independiente) y las siguientes variables dependientes –presencia de lesiones, patogenicidad de las larvas, y localización de las mismas; los resultados se presentaron como odds ratios (OR).

b) Las diferencias significativas entre los valores medios de mieloperoxidasa (MPO) en las muestras GI de los animales tratados y no tratados se analizaron mediante el t-test de Student para muestras independientes, después de comprobar que los valores de las muestras seguían una distribución normal.



## Capítulo 2. Epidemiología y factores de riesgo en la infección de la bacaladilla en el golfo de Cádiz

### Área de pesca

El golfo de Cádiz es un entrante del océano Atlántico en la costa del suroeste de la Península Ibérica ( $36^{\circ}49'60''\text{N}$ ,  $71^{\circ}10'00''\text{W}$ ), y sus aguas convergen con las del mar Mediterráneo (Fig. 17). El pescado se obtuvo mediante pesca de cerco y se compró en un mercado de la ciudad Sanlúcar de Barrameda; el origen y método de recolección se verificaron en el punto de venta por el identificador que acompaña al producto y asegura su trazabilidad desde la captura.



**Fig. 17** Mapa de la zona de captura, el golfo de Cádiz. Imagen libre bajo licencia Creative Commons Attribution-Noncommercial-Share Alike 4.0.

## **Características y procesamiento del hospedador**

Se obtuvieron larvas de *Anisakis* del tercer estadio (L3) de 100 bacaladillas (*M. Poutassou*) capturadas en las aguas del Golfo de Cádiz en las estaciones de otoño, primavera e invierno, entre los años 2013-2014.

Preparación para la obtención de las larvas del hospedador:

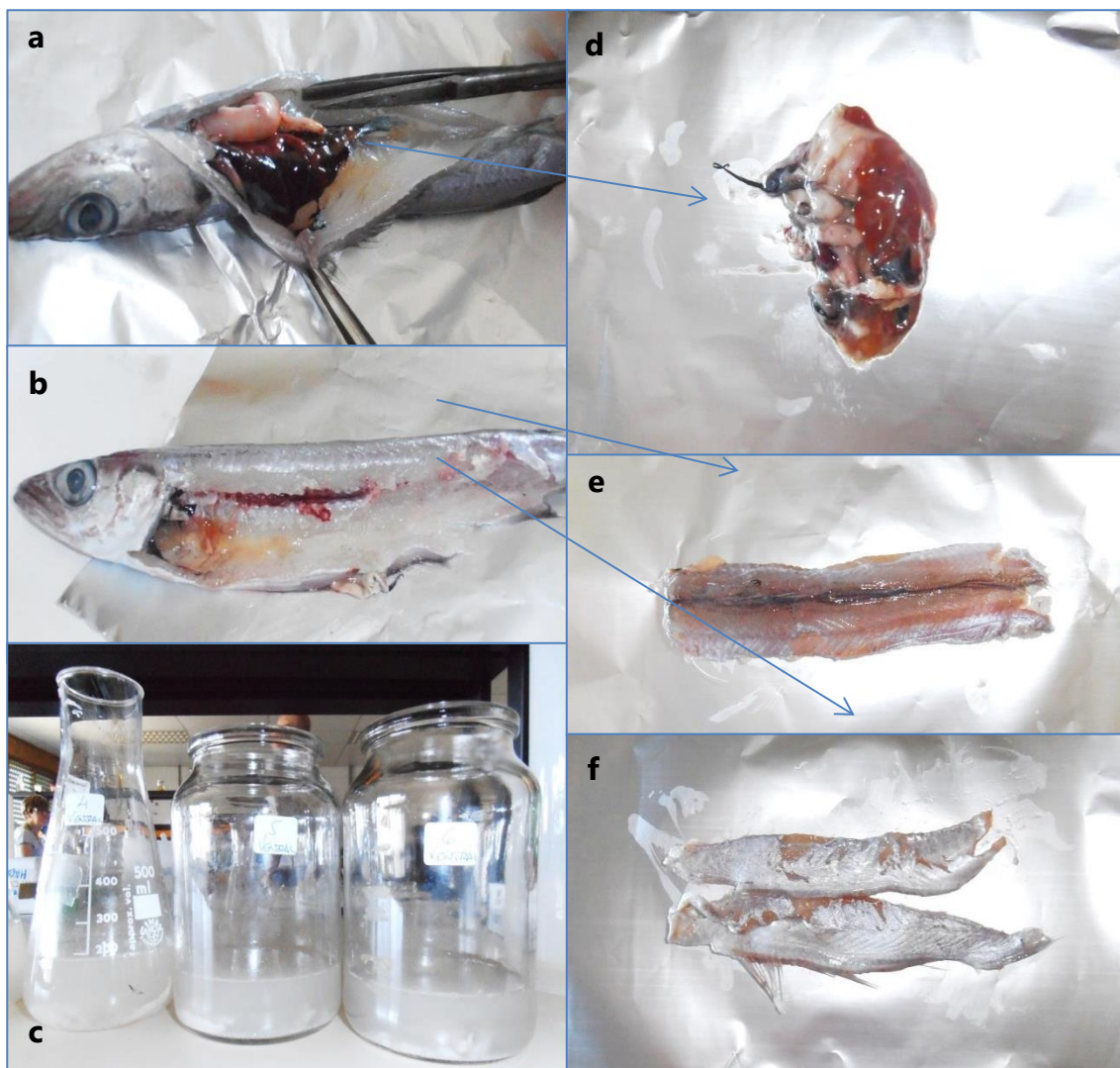
1º Se abrieron longitudinalmente a lo largo del abdomen para extraer las larvas libres en la cavidad corporal.

2º Las vísceras se colocaron en un solución salina 0,9% para aislar los parásitos de esta parte del pescado. Para obtener las posibles larvas retenidas dentro de las vísceras, éstas se dispusieron en solución de pepsina-HCl para simular condiciones digestivas (modificado de McGladdery 1986, ver pág. 93) a 36 °C durante 2 h.

3º La cavidad corporal del pescado se lavó para asegurarnos de que habíamos obtenido todas las larvas libres.

4º Las musculaturas ventral y dorsal se retiraron del pescado separadamente, y se sometieron a digestión, a 36 °C con agitación periódica durante 3 h.

5º El resultado de cada digestión se observó a través de un microscopio estereoscópico, y se procedió al recuento de las larvas.



**Fig. 18** Procesamiento del hospedador para la obtención de las larvas: (a) cavidad corporal y vísceras, (b) cavidad corporal del pescado sin una de las partes ventrolaterales, (c) digestiones de vísceras, y ambas musculaturas, (d), (e) y (f) vísceras, musculatura dorsal y ventral, respectivamente.

### **Identificación genética de los parásitos**

Se extrajo el ADN genómico de las larvas previamente identificadas morfológicamente y congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se llevó a cabo la PCR-FLRP de la región ITS-5S, 8-ITS2 del ADNr (ver pág. 101).

## **Epidemiología Cuantitativa**

Se calcularon los siguientes parámetros epidemiológicos: Prevalencia de infección (P), intensidad media (I) y abundancia media (A), definidos por Bush et al. (1997).

$P = \text{n}^\circ \text{ de hospedadores parasitados} / \text{n}^\circ \text{ de hospedadores analizados} \times 100 (\%)$

$I = \text{n}^\circ \text{ de parásitos} / \text{n}^\circ \text{ de hospedadores infectados}$

$A = \text{n}^\circ \text{ de parásitos} / \text{n}^\circ \text{ de hospedadores analizados}$

## **Análisis de los Factores de Riesgo**

Se identificaron los factores de riesgo de la infección por *Anisakis* realizando un análisis de regresión logística univariante y multivariante. Se ha investigado la asociación de cada una de las siguientes variables dependientes: a. Parasitación total, b. Parasitación de las vísceras, c. Parasitación de la musculatura ventral, d. Parasitación de la musculatura dorsal, e. Parasitación con *A. pegreffii* respecto a *A. simplex* s.s.. Como variables independientes se utilizaron diferentes parámetros relacionados con el pescado (peso, longitud), su captura (estación) y el parásito (ubicación, genotipo, número de larvas totales). El programa IBM SPSS Statistics 20.0 ha sido el empleado para el análisis de datos.

## **Capítulo 3. Gen $\beta$ -tubulina como marcador nuclear para la identificación de las especies hermanas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii***

### **Parásitos, peces y áreas geográficas**

Las larvas de *Anisakis* se obtuvieron de bacaladillas (*M. poutassou*), merluzas (*M. merluccius*), y boquerones (*E. encrasicolus*), capturados de las costas de la Península Ibérica, Italia y Croacia, y del Océano Atlántico Norte (área de pesca Little Sole Bank). Se seleccionaron las aguas de la Península Ibérica debido a su condición de áreas simpátricas para las especies *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, y las costas del Océano Atlántico Norte y del mar Adriático de Italia y Croacia, las cuales parecen ser zonas alopátricas para *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, respectivamente (Ceballos-Mendiola et al. 2010; Mladineo et al. 2017b).

Las larvas aisladas de cada especie de pescado se identificaron morfológicamente como L3 tipo I. Seguidamente se colocaron individualmente en tubos Eppendorf de 1,5 ml etiquetados y se conservaron a -20 °C hasta su identificación molecular.

### **Extracción de ADN**

(ver pág. 101)

### **Identificación molecular mediante PCR-RFLP del ITS de ADNr**

(ver pág. 101)

### **Identificación molecular mediante el gen Cox-2 de ADNmt: PCR-secuenciación, análisis comparativo de secuencias y diseño de una PCR-RFLP**

La amplificación del gen mitocondrial Cox-2 se llevó a cabo usando los cebadores 211 (forward), 5' GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT 3', y 210

(reverse), 5' TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT 3' (Nadler and Hudspeth 2000), cumpliendo las condiciones de amplificación establecidas por los mismos autores: 3 min a 94 °C, luego 34 ciclos de 30 s a 94 °C, 60 s a 46 °C, y 90 s a 72 °C, seguido de una elongación final de 10 min a 72 °C. Los reactivos utilizados son los mismos que se usan para la PCR del gen ITS, con excepción de los cebadores. Los amplicones se observan y confirman por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio.

Los productos de PCR se purificaron usando el kit Real Clean Spin (REAL, España), y tras esto se secuenciaron directamente en ambas direcciones en un secuenciador automático (3130XL Applied Biosystems), utilizando los mismos cebadores que para la amplificación del ADN. Las secuencias se editaron y alinearon para identificar los haplotipos (= secuencias únicas) usando el software de alineamiento múltiple Clustal-X 1.81, y se ajustaron en caso necesario.

Se compararon las secuencias completas del Cox-2 del ADNmt obtenidas para 11 *A. pegreffii*, 8 *A. simplex* s.s. y 1 individuo híbrido (As/Ap), así identificados de acuerdo a la PCR-RFLP del ITS, y se detectaron 10 diferencias fijas (Abattouy et al. 2016). Los programas informáticos Webcutter 2.0 (Heimann 1997) y ApE (Wayne 2017) nos permitieron predecir potenciales enzimas endonucleasas de restricción, entre las que se seleccionaron: *AccI* (5'...T↓CGA...3') y *AvrII* (5'...G↓ANT...3') (Thermo Scientific, Alemania), como potenciales enzimas de diagnóstico. *AccI* cortaría el ADNmt de *A. simplex* s.s. pero no cortaría el de *A. pegreffii*, mientras que *AvrII* haría lo opuesto. Hemos empleado ambas enzimas para la identificación mediante PCR-RFLP del Cox-2 del ADNmt. Tras la digestión a 37 °C durante 3 h, los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 3% y se asignó un patrón de bandas identificativo de cada especie.

**Reactivos:** 10 U de enzima digieren completamente 1 µg de sustrato de ADN en 20 µl de tampón Fastdigest 10x

### **Optimización del gen $\beta$ -TUB como un marcador nuclear diferencial: PCR-secuenciación, análisis comparativo de secuencias y diseño de una PCR-RFLP**

Hemos diseñado una PCR que amplifica el gen nuclear de la  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -TUB), empleando los cebadores degenerados 5' CAAAGTGGAGCKGGHCACAACCTGGC 3' (forward) y 5' CGBAGATCHGCATTTCAGCTGHCCAGG 3' (reverse) (K= G/T; H= A/C/T; B= C/G/T) (Diawara et al. 2009).

#### ***Reactivos:***

*El volumen final de la reacción, de 25  $\mu$ l, estuvo compuesto por: 2,5  $\mu$ l de tampón de reacción 10x, 1  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50 mM, 1  $\mu$ l de mix de nucleótidos 10 mM, 0,5  $\mu$ l de cebadores Tubulinasense o Nestubusense (forward) y Tubulinaantisense (reverse), 25  $\mu$ M (Tib Molbiol, Berlín), 1,25 U de ADN polimerasa Biotaq (Bioline, Francia), y 2  $\mu$ l de ADN genómico.*

Para la primera amplificación, las condiciones de la PCR fueron: una desnaturalización inicial de 95 °C, seguido de 35 ciclos de 95 °C durante 45 s, 60 °C 45 s, 72 °C 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 5 min (modificadas de las de Diawara et al. 2009).

Cuando se necesitó realizar una segunda amplificación, se usó una muestra de 5  $\mu$ l de producto de PCR para la reacción de nested-PCR; las condiciones de PCR fueron las mismas que para la primera PCR, excepto la temperatura de hibridación, que fue 62 °C.

Los amplicones resultantes de la PCR, teñidos con tampón de carga, se han confirmado por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, y se han purificado utilizando el kit RealClean Spin (REAL Laboratory SL, España).

Los fragmentos amplificados  $\beta$ -TUB se secuenciaron del mismo modo que los del gen Cox-2, y las secuencias se editaron y alinearon para identificar los

genotipos (= secuencias únicas) utilizando el software de alineamiento múltiple Clustal-X 1.81, y se ajustaron en caso necesario.

Hemos obtenido las secuencias completas  $\beta$ -TUB para los individuos *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* y de genotipo mixto (As/Ap), previamente identificadas mediante PCRR-RFLP del gen ITS. Tras su análisis, hemos detectado un número de diferencias fijas en sus secuencias. Mediante los programas Webcutter 2.0 (Heimann 1997) y ApE (Wayne 2017) pudimos seleccionar las siguientes endonucleasas de restricción: *TscAI* (5'...NNCASTGNN↓...3') e *Hin1II* (5'...CATG↓...3') (FastDigest, ThermoScientific, Alemania), entre las potenciales enzimas de diagnóstico. *TscAI* cortaría las secuencias  $\beta$ -TUB de *A. simplex* s.s. pero no cortaría el ADN de *A. pegreffii*, mientras que *Hin1II* cortaría las secuencias  $\beta$ -TUB de ambas especies. Se evaluaron ambas enzimas para la identificación de las especies hermanas mediante PCR-RFLP del gen  $\beta$ -TUB como marcador nuclear diferencial. Después de la digestión a 65 °C (*TscAI*) o 37 °C (*Hin1II*) durante 10 min, los resultados se visualizaron a través de electroforesis en un gel de agarosa al 3% y se asignó un patrón de bandas a cada una de las especies.

*Reactivos: 10 U de enzima digieren 1  $\mu$ g de sustrato de ADN en 20  $\mu$ l de tampón Fastdigest 10x*

## **Análisis poblacional**

### **1. Equilibrio Hardy-Weinberg (HW)**

Hemos utilizado los datos del gen TUB para realizar la prueba exacta del Equilibrio HW en cada posición polimórfica diferencial: 33, 75, 86, 269, 297, 394, 451, 496, en cada área geográfica estudiada: costa atlántica española (SpAt), costa mediterránea española (SpMed), zona de confluencia atlántico-mediterránea (Atl-Med, golfo de Cádiz), mar Adriático (Adr), y Little Sole Bank (LSB). Se realizaron



pruebas de desequilibrio genotípico entre cada par de posiciones dentro de las poblaciones por el método Monte Carlo vía cadenas de *Markov*, 1000 cadenas y 1000 iteraciones por lote, utilizando el *software* GENEPOP (versión web; Rousset 2008). Se ajustaron los niveles exactos de significación de las pruebas mediante corrección secuencial de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice 1989). Estos estadísticos se calcularon considerando las cinco poblaciones objeto de estudio.

## 2. Análisis bayesiano

Para explorar la estructura de las subpoblaciones de anisákidos analizadas, se utilizó el método del análisis de *cluster*, basado en modelos implementados en el programa STRUCTURE v.2.3.1 (Pritchard et al. 2000). Este programa calcula un valor de probabilidad para un número de poblaciones K (o *cluster*) pre-determinado, y asigna la parte del genoma de cada individuo que deriva de cada *cluster*. La estructuración poblacional fue evaluada desde K= 1 hasta K= 5, con 10 réplicas independientes, consistentes en 100.000 cadenas de *Markov*. Se asumió que las frecuencias alélicas de las poblaciones actuales estaban correlacionadas y que podían haberse originado a partir de más de una población ancestral. El valor más probable de K se determinó según el método de (Evanno et al. 2005) implementado en el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl and VonHoldt 2012). El parámetro Q define qué proporción del genoma de un individuo pertenece a los distintos *clusters* (K) pre-definidos.

Para el análisis se utilizaron los individuos de las cinco poblaciones objeto de estudio, y las posiciones polimórficas de los genes del ADNn, siete posiciones TUB (correspondiente a las siete diferencias fijas) u ocho posiciones TUB (analizando la posición 451) e ITS (dos posiciones). También se trabajó pre-definiendo cinco poblaciones relativas a las cinco áreas geográficas de las muestras.

### 3. NewHybrids

Hemos aplicado el programa NEWHYBRIDS (Anderson and Thompson 2002) para asignar individuos a clases híbridas en función de sus genotipos. Hemos analizado el conjunto de datos utilizando 6 categorías (2 parentales, generaciones F1 y F2, y retrocruzamientos de primera y segunda generación), prior de Jeffreys y con 100000 rondas después de un *burn-in* de 100000 generaciones. El análisis se realizó con tres entradas diferentes: a) con análisis de la posición 451 TUB con designación de especímenes de poblaciones alopátricas como parentales puros y b) sin designación, y c) sin tener en cuenta la posición 451. Los individuos de LSB con diferencias en la posición 451 se consideraron parentales sólo cuando no se analizó esa posición. Los individuos fueron asignados a categorías específicas, de acuerdo a cálculos probabilísticos *a posteriori*, utilizando los individuos de las cinco poblaciones objeto de estudio, y las posiciones polimórficas de los genes del ADNn, TUB (ocho posiciones) e ITS (dos posiciones).

### 4. Árboles y redes

La construcción de árboles se realizó usando Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (ML) y dos métodos basados en matrices de distancia (UPGMA y NJ). Los análisis se llevaron a cabo utilizando PHYLIP version 3.65 (Felsenstein 1980) y PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010).

*A. physteris* fue el grupo externo o *outgroup* elegido como referencia de la secuencia nucleotídica (Genbank®: LT970890). Como medida de estabilidad de los brazos internos de los árboles se usó el *bootstrap* (1000 replicaciones); un porcentaje de *bootstrap* mayor o igual a 50% se consideró suficiente robusto.

El análisis MP se realizó usando el programa DNAPARS, el cual busca el árbol más parsimonioso vía un algoritmo heurístico; en este análisis, las posiciones del

codón no se tuvieron en cuenta, y las transiciones y transversiones tuvieron equivalente peso.

Para el análisis ML, el modelo de sustitución nucleotídica empleado fue GTR+G+I con frecuencias de base nucleotídica empíricas, siguiendo una distribución gamma de cuatro categorías.

Para los métodos basados en matrices de distancias, utilizamos el modelo F84 de sustitución nucleotídica (el método por defecto del programa); este modelo incorpora diferentes tasas de transición y transversión, y frecuencias distintas para los cuatro nucleótidos, y además permite el uso de codones ambiguos (Y, R...).

Se evaluó la estructura y complejidad de la población utilizando el análisis de redes "median-joining" (MJN) implementado en Network v. 5.0, usando un valor de  $\epsilon$  de 0 (Bandelt et al. 1999), y asignando pesos por defecto (10) a las posiciones nucleotídicas de los individuos. El algoritmo MJN permite datos multi-estado para reconstruir todos los posibles árboles genealógicos más cortos y menos complejos.

Todos los análisis se llevaron a cabo usando secuencias  $\beta$ -TUB individuales. Adicionalmente, se emplearon los datos ensamblados formados por las secuencias  $\beta$ -TUB y los patrones de variación en las posiciones nucleotídicas de diagnóstico de los marcadores ITS1-5,8S-ITS2 y Cox-2. Las bases heterocigotas se codificaron con los códigos IUPAC apropiados (Y, R...), y se emplearon las secuencias consenso.



# RESULTADOS



# Capítulo 1. Tratamiento experimental de la anisakiasis aguda

## 1. Fármacos antiácidos y antihelmínticos

### 1.1. Protectores de la mucosa gástrica a la acción del pH ácido

#### **Ensayos *in vitro***

A todos los tiempos observados (0-48 h) y a las dos concentraciones probadas (0,5 y 2,5 mg/ml), las larvas tratadas con omeprazol o ranitidina presentaron movilidad totalmente activa.

#### **Ensayos *in vivo***

En los ensayos llevados a cabo en los animales infectados y tratados con los medicamentos testados se observó que en todos los lotes de ratas se presentaron lesiones en el tracto digestivo, principalmente en el cuerpo gástrico. En la tabla 3 se muestra el porcentaje de animales con lesiones y la ubicación de éstas, así como los resultados relativos a la localización de las larvas en las ratas, tanto en los lotes problemas como en el lote control.

Las lesiones observadas estuvieron constituidas, en ocasiones, por túneles ligeramente hemorrágicos, de diversa longitud (entre 3-15 mm) y entre 0,5-1 mm de diámetro, en donde en uno de los extremos se encontraba la larva alojada parcialmente, entre la mucosa y submucosa del estómago, y del colon en un solo animal. En otros casos se produjeron úlceras donde el parásito se encontraba fijo por el extremo anterior, acompañado de un halo fuertemente enrojecido; a veces algunas úlceras no mostraron signos aparentes de hemorragia (Fig. 19).

		Omeprazol	Omeprazol TLD	Ranitidina	Ranitidina TLD	Sucralfato	Sucralfato TLD	Control
<b>Lesiones</b>	Total (%)	75	45	50	40	65	80	95
	Localización(nº):							
	Estómago	14	9	7	7	13	16	18
	Intestino	-	-	2	-	-	-	1
	Ciego	1	-	1	1	-	1	-
<b>Localización de las larvas (%)</b>	Cavidad	5,8	1,7	5,8	4,2	3,3	2,5	3,3
	<i>Estómago:</i>	28,3	34,2	21,7	35,8	52,5	67,5	41,7
	No fijas	61,8	78,1	84,6	88,4	82,5	51,9	66
	Fijas	38,2	22	15,4	11,6	17,5	48,2	34
	<i>Intestino delgado:</i>	50,8	45,8	40	34,2	20	15,8	30,
	No fijas	100	98,2	98	100	100	100	100
	Fijas	-	1,8	2,1	-	-	-	-
	<i>Intestino grueso:</i>	9,2	9,2	25,8	20	18,3	8,33	20,8
	No fijas	81,8	100	100	100	100	80	100
	Fijas	18,2	-	-	-	-	20	-
	No recuperadas	5,8	6,7	6,7	5,8	5,8	5,8	3,3

**Tabla 3 Localización de las lesiones encontradas en los animales (nº) y de las larvas recogidas (%), para cada uno de los protectores de la mucosa gástrica, para una dosis y TLD, y el control. Omeprazol= omeprazol, Ranitidina= ranitidina, Sucralfato= sucralfato. TLD= tratamiento de larga duración.**





**Fig. 20 (a) Larva incrustada en la pared gástrica de un animal, provocando una erosión. (b) Zona de erosión donde la larva está penetrando la pared gástrica al microscopio estereoscópico**

### **Omeprazol:**

Cuando se administró *una sola dosis* se visualizaron varias lesiones próximas en el mismo animal, en siete de las 15 ratas afectadas (46,7%): cinco tenían dos larvas fijas en la pared del estómago, otra mostró cinco lesiones de igual localización, y una última con dos lesiones en ciego. El tamaño medio del daño vascular en estos animales fue  $x = 3,1 \pm 2,5 \times 1,4 \pm 1,0$  mm, superando las lesiones los tres milímetros en el 53,3% (8/15) de los animales; 6 de éstas fueron de tipo túnel, descrito arriba.

El mismo medicamento administrado *durante 14 días*, provocó lesiones de un tamaño medio  $x = 3,1 \pm 2,6 \times 2,0 \pm 1,4$ , presentándose casi en el 45% (4/9) daño de tamaño puntual ( $x \leq 1$ mm); un mismo animal mostró dos lesiones gástricas (11,1%).

**Ranitidina:**

Las ratas que tomaron *una dosis* mostraron lesiones con un tamaño medio de  $x=3,5\pm3,5 \times 1,8\pm1,8$  mm, presentando estos animales daños puntuales en el 50% (5/10) de los casos afectados. No se manifestaron lesiones múltiples en el tracto gastro-intestinal (GI) de los animales.

Respecto al tratamiento de *larga duración*, ocurrieron lesiones de tamaño homogéneo,  $x= 2,3\pm1,0 \times 1,8\pm0,7$  mm, y sólo el 12,5% de los animales (1/8) presentó una hemorragia superior a los 3 mm. Uno de los animales mostró dos lesiones en su estómago.

**Sucralfato:**

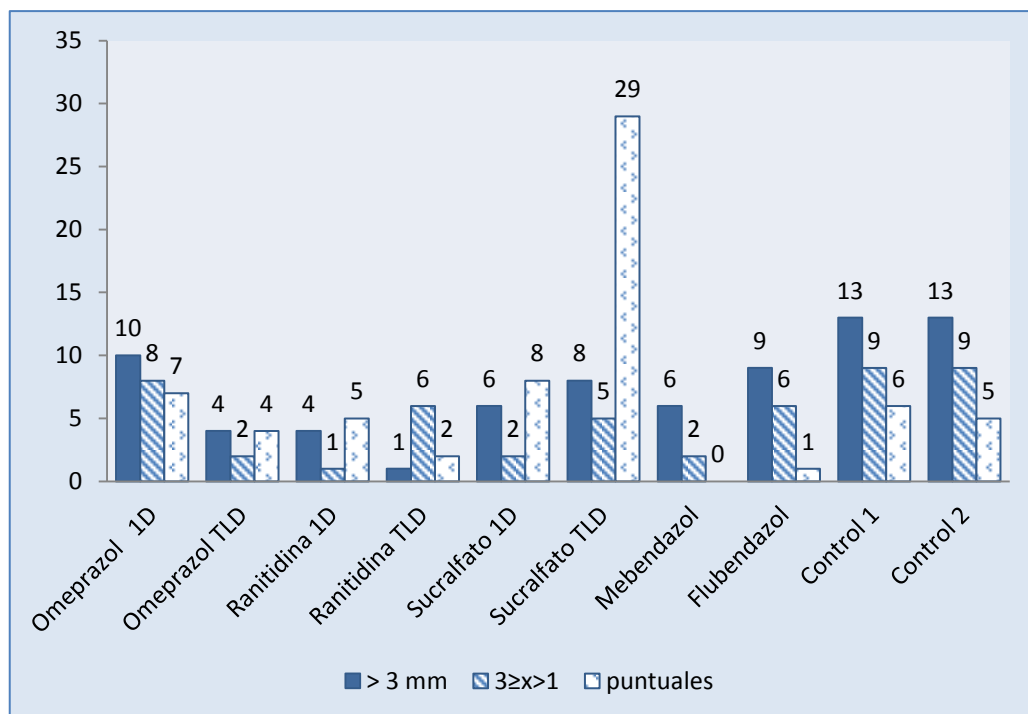
Cuando se administró *una dosis*, las lesiones fueron de un tamaño medio de  $x= 5,3\pm6,7 \times 3,2\pm4,1$  mm, y siete lesiones fueron de tipo túnel. El 46,2% (6/13) de los animales sólo tuvieron daño GI de tipo puntual, y solo tres animales mostraron dos lesiones gástricas.

La *administración prolongada* de este fármaco causó lesiones GI múltiples en el 56,25% (9/16) de los animales, observándose hasta 4-6 úlceras a la vez, en cinco de ellos, principalmente éstas últimas de tipo puntual (23/26), y todas con larvas fijadas adheridas a cada lesión. En este caso, el tamaño medio del daño vascular fue  $x= 2,0\pm2,8 \times 1,1\pm1,4$  mm, ocasionado por un total de 44 larvas que se hallaron en fase de penetración GI, aunque 6 de ellas no provocaron hemorragia visible.

**Control:**

El daño vascular observado estuvo comprendido entre  $4,5\pm3,6 \times 3,1\pm2,7$  mm, y en el 36,8% (7/19) de los animales concurren más de una lesión, mostrando uno de ellos hasta 4 úlceras gástricas.

En la Fig. 20 se comparan las lesiones (%) de todos los grupos tratados con estos fármacos y no tratados.



**Fig. 20** Porcentaje (%) de lesiones GI de tamaño  $>3$ ,  $3 \leq x < 1$  y  $\geq 1$  mm, cuando se administraron los distintos tratamientos farmacológicos, y sin tratamiento (controles 1 y 2).

Respecto al efecto larvicida de los fármacos, la administración de estos tres medicamentos no produjo alteración en la viabilidad de las larvas, encontrándose vivas y sin alteraciones después de su mantenimiento en la estufa a  $36^{\circ}$  C, durante 48 h.

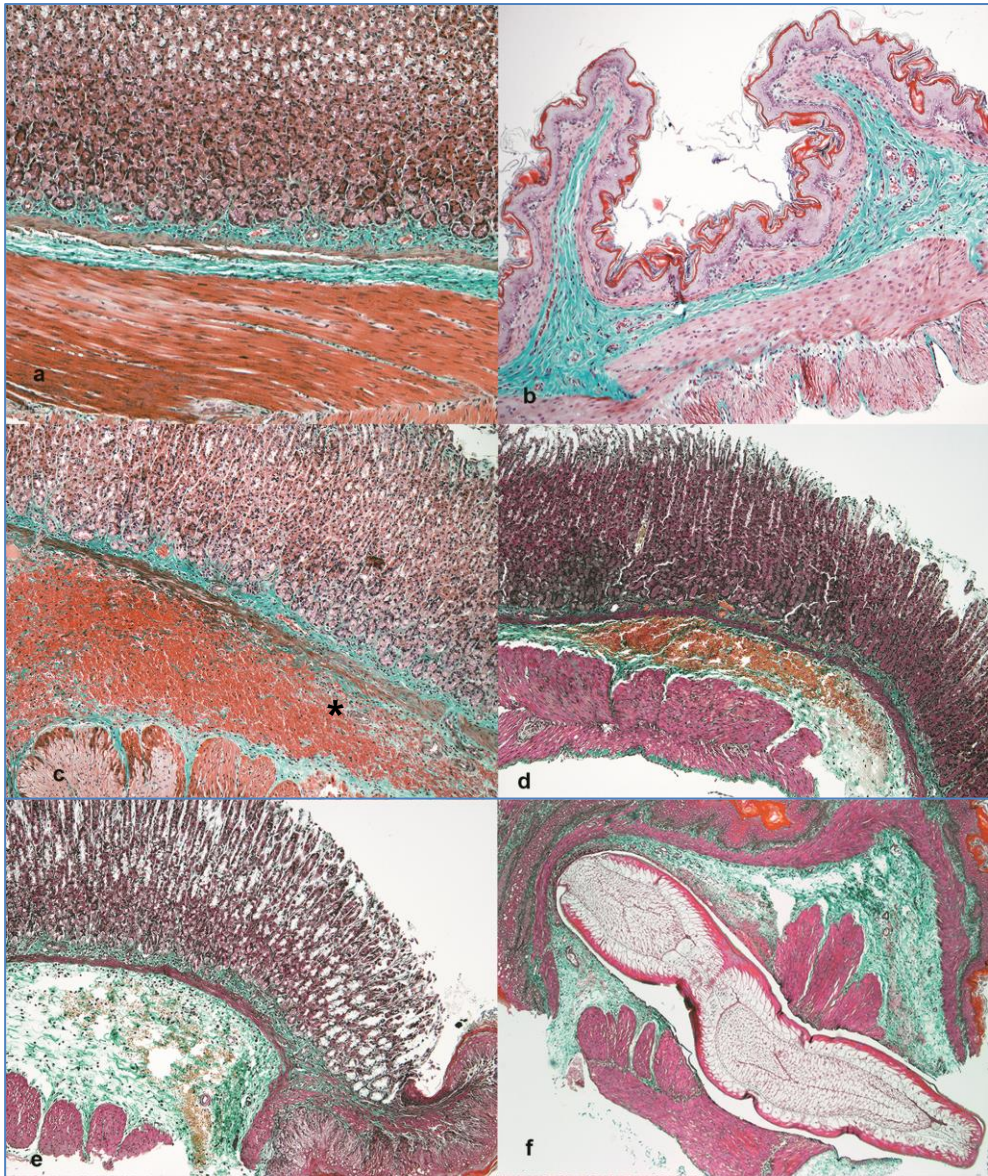
Por otro lado, en todos los lotes de los animales infectados y tratados con los fármacos inhibidores de la secreción gástrica y protectores de la mucosa gástrica así como los del lote control, se observaron larvas incrustadas en la pared del tracto digestivo o en la cavidad corporal que presentaban una especie de capuchón rodeando la zona próxima a la boca, o parte de ésta.

### **Medición del pH gástrico**

Los valores medios de pH gástrico de los animales cuando se administraron los medicamentos fueron: 5,0 (una dosis) and 5,3 (TLD) para omeprazol, 4,8 (una dosis) and 5,0 (TLD) para ranitidina, and 3,3 (una dosis) and 3,0 (TLD) para sucralfato (valores medios). En los controles, el valor medio de pH gástrico fue 3,2.

### **Análisis histológico**

Respecto al análisis de las lesiones en todos los grupos de animales (tratados y no tratados), el sitio de penetración de la larva en el estómago se produjo con mayor frecuencia en la zona glandular del mismo (84,6%); 7,7% de las lesiones se encontraron en la región no glandular, y 11,5%, en el anillo limitante entre ambas regiones. El estudio histológico reveló un área de erosión causada por la larva, en la cual la mucosa gástrica estaba destrozada; la submucosa mostró un gran infiltrado linfocitario y una importante hemorragia acompañada de edema y engrosamiento de la misma, según los casos, en la zona adyacente a los vasos sanguíneos (Fig. 21, asterisco). Estos detalles pudieron observarse en las muestras de animales infectados tratados con omeprazol (Fig. 21d) y sucralfato (Fig. 21f), y no tratados con ningún fármaco (Fig. 21c), en los cuales las lesiones macroscópicas fueron de gran tamaño. Sin embargo, en los casos donde las lesiones fueron puntuales (ranitidina), la hemorragia fue relativamente leve (Fig. 21e). Las muestras de estómago de animales no infectados usados como control, inalteradas en la estructura histológica, se presentan en la Fig. 21a (área glandular) y 21b (área no glandular).



**Fig. 21 Examen histológico del estómago. Secciones histológicas del grupo control:** (a) sección histológica no dañada del área glandular del estómago, teñida con TM; (b) sección histológica no dañada del área no glandular del estómago, teñida con TM; (c) sección histológica teñida con TM del área glandular del estómago del grupo control infectado con el parásito pero no tratado, en la cual se observa una severa hemorragia en la túnica submucosa. Secciones histológicas de los grupos infectados con el parásito y tratados, teñidas con TM, del área glandular del estómago: (d) sección correspondiente al grupo tratado con omeprazol, la cual muestra una moderada hemorragia en la túnica submucosa; (e) sección correspondiente al grupo tratado con ranitidina, en la que se observa una leve hemorragia de la submucosa; (f) sección correspondiente al grupo tratado con sucralfato, donde se observa una larva de *Anisakis* en la túnica submucosa.

## **Estadística**

a) Los datos obtenidos de la regresión logística indican que la ocurrencia de lesiones GI en los animales tratados **una sola vez** con ranitidina fue menor, en comparación con el lote control, resultando la administración de dichos fármacos estadísticamente significativa ( $p= 0,009$ ); con el sucralfato, el p-valor adquirió significación ligeramente ( $p= 0,024$ ), no ocurriendo lo mismo con el omeprazol ( $p=0,108$ ).

Cuando se utilizaron los mismos tratamientos administrados **durante 14 días**, la reducción de las lesiones fue significativa respecto al control con el omeprazol ( $p=0,005$ ) y ranitidina ( $p=0,003$ ), pero no para el sucralfato ( $p= 0,18$ ).

b) Respecto a la correlación del pH gástrico de los animales con el tamaño medio de las lesiones GI encontradas cuando se administraron los distintos tratamientos, no se encontró relación lineal con ninguno de ellos (coeficiente de Spearman  $p= 0,85$ ), así como no hubo asociación con el n° de lesiones (coeficiente de Spearman  $p= 0,054$ ).

## **1.2. Estudio comparativo con fármacos antihelmínticos**

### **Ensayos *in vivo***

La tabla 4 muestra los datos relativos al porcentaje de animales con lesiones y la ubicación de éstas, así como los resultados relativos a la localización de las larvas en las ratas tanto en los lotes tratados con mebendazol y flubendazol como en el control.

Los daños generados por la larva tuvieron, en general, una localización gástrica y el tamaño medio fue de  $x=5,8 \times 2,9 \pm 3,6 \times 2,5$  mm y  $x=5,5 \times 3,5 \pm 4,1 \times 2,9$  mm, para el **mebendazol** y **flubendazol**, respectivamente. Los animales no mostraron

lesiones de tipo puntual cuando se administró mebendazol, y solo una lesión (1/16) fue de este tipo en el caso del flubendazol (Fig. 20). En ambos ensayos se observaron lesiones múltiples: en el caso del mebendazol en una misma rata se presentaron dos úlceras con las larvas fijadas en la pared gástrica, y en el caso del flubendazol se localizaron tres lesiones en el estómago de un mismo animal y en otro dos gástricas y una en intestino delgado. El tamaño de las zonas hemorrágicas en el lote control fue de  $x = 4,5 \times 3,2 \pm 3,4 \times 2,5$  mm.

Hay que indicar también, que si bien la administración de estos medicamentos no produjo, aparentemente alteraciones morfológicas en las larvas que fueron obtenidas de los animales, si se observó que aquellas que fueron tratadas con mebendazol tenían una menor movilidad, aunque sólo un 1,67% murió después de su mantenimiento en estufa durante 48 h.

		Mebendazol	Flubendazol	Control
<b>Lesiones</b>	Total (%)	35	60	85
	Localización (n°):			
	Estómago	7	12	17
	Intestino	-	1	-
	Ciego	-	-	-
<b>Localización de las larvas (%)</b>	Cavidad	1,7	6,7	4,2
	Estómago:			
	No fijas	34,2	28,3	46,7
	Fijas	85,4	85,3	69,6
	Intestino delgado:			
	No fijas	59,2	54,2	27,5
	Fijas	100	98,5	100
	Intestino grueso:			
	No fijas	3,3	9,2	18,3
	Fijas	100	100	100
	No recuperadas	-	-	-
		1,7	1,7	3,3

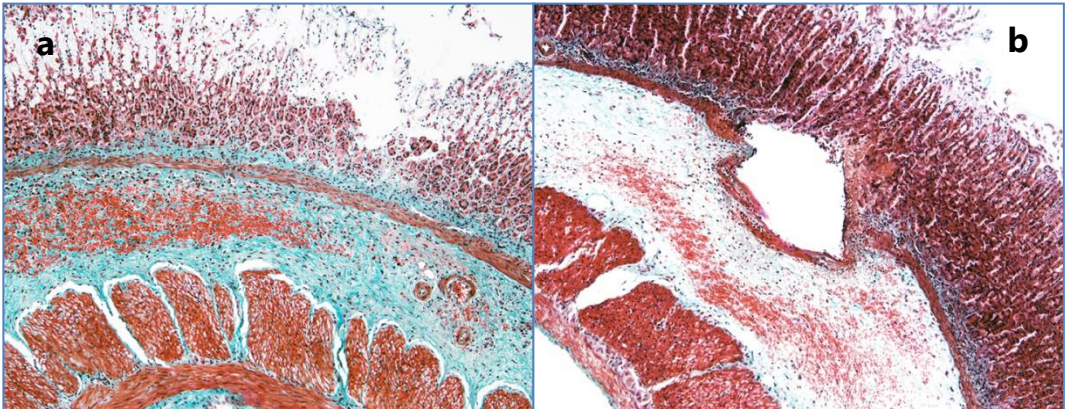
**Tabla 4 Localización de las lesiones encontradas en los animales (n°) y de las larvas recogidas (%), para cada uno de los antihelmínticos, y el control.**

### **Estudio histológico**

Como en el caso anterior, la mayoría de las lesiones se encontraron en el área glandular del estómago (86,1%), mientras que la región no glandular tuvo 8,3% y el anillo limitante, 13,9%. El estudio puso de manifiesto alteraciones histológicas del estómago coincidentes con las descritas en el apartado anterior (Fig. 22).



Cuando la larva se encontró alojada entre la mucosa y submucosa gástricas (túnel) también se produjo la destrucción de la mucosa con la formación de un edema importante de origen hemorrágico (Fig. 22b). Las lesiones de los animales control siguieron el mismo patrón descrito para los animales tratados.



**Fig. 22** Secciones histológicas del área glandular del estómago: (a) teñida con TM, del grupo tratado con flubendazol e infectado con el parásito, que muestra la destrucción de la mucosa y hemorragia moderada en la túnica submucosa; (b) teñida con HE, del grupo tratado con mebendazol e infectado con el parásito, en la cual puede observarse una hemorragia débil en la túnica submucosa.

### **Estadística**

La ocurrencia de lesiones GI en los animales tratados respecto a los no tratados, presentó diferencias estadísticamente significativas sólo cuando se administró mebendazol ( $p= 0,003$ ), y no flubendazol ( $p= 0,086$ ).

## 2. Enzimas proteolíticas

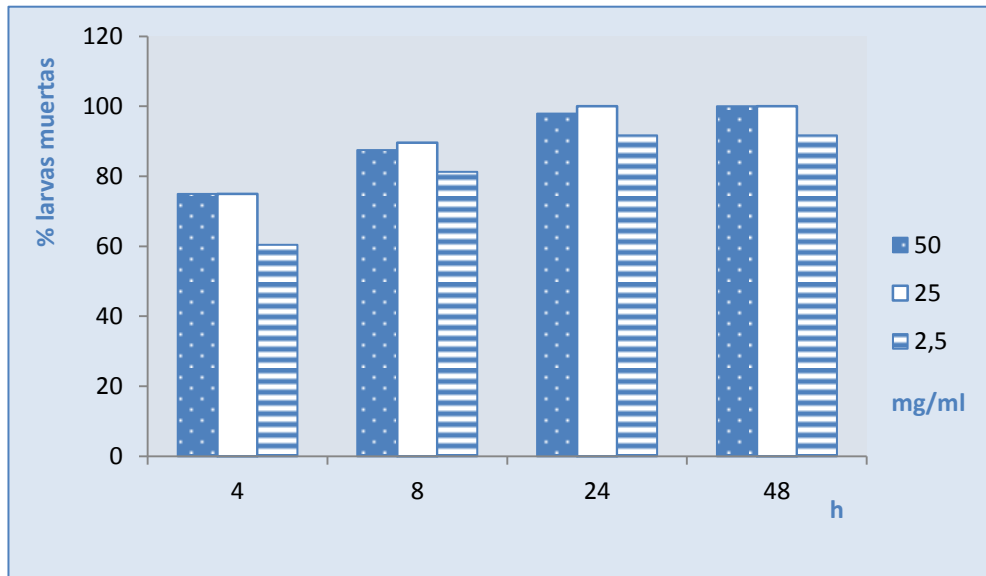
### Estudio *in vitro*

#### **Papaína:**

Presentó una eficacia larvicida del 75% a las 4 h del inicio de la experiencia a la mayor concentración (50 mg/ml). La concentración intermedia (25 mg/ml) ejerció la misma actividad que la anterior, presentando ambas el 100% a las 48 h. A la menor concentración (2,5 mg/ml) se reduce en un 15% la eficacia larvicida, siendo máxima (91,7%) tanto a las 24 h como a las 48 h, y con una  $S_{50}$  de 3 h (Fig. 23, Tabla 5).

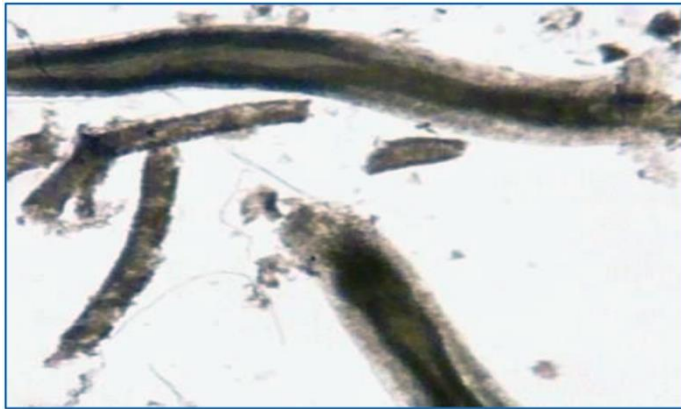
Papaína (mg/ml)	N° L3	Supervivencia <sub>media</sub> %				$S_{50}$ (h)	$S_{max}$ (n°)
		4h	8h	24h	48h		
<b>50</b>	48	25	12,5	2,1	0	2,4	0
<b>25</b>	48	25	10,4	0	0	2,2	0
<b>2,5</b>	48	39,6	18,8	8,3	8,3	3	4

**Tabla 5 Actividad anisakida *in vitro* de papaína a distintas concentraciones: supervivencia<sub>media</sub> a 4, 8, 24 y 48 h, supervivencia<sub>50</sub> ( $S_{50}$ ) y supervivencia<sub>máxima</sub> ( $S_{max}$ ).**



**Fig. 23 Mortalidad de las la larvas de *Anisakis* a las 4, 8, 24 y 48 h de exposición al extracto de papaína, según las dosis ensayadas.**

El mecanismo de acción del producto provoca la ruptura y fragmentación de las larvas, desde el inicio de la experiencia, por ello se observa un alto porcentaje de larvas muertas a las 4 h, y a todas las concentraciones. A la ruptura de la cutícula le sigue la desestructuración y digestión de sus órganos, lo que provoca la inactivación del parásito (Fig. 24).



**Fig. 24** Larvas de *Anisakis* tipo I fracturadas y desintegradas, tras su exposición al extracto de papaína.

### **Bromelaína:**

A la única concentración ensayada, 25 mg/ml, los parámetros determinados fueron:

Bromelaína (mg/ml)	Nº L3	Supervivencia <sub>media</sub> %				S <sub>50</sub> (h)	S <sub>max</sub> (nº)
		4h	8h	24h	48h		
<b>25</b>	48	70,8	66,7	60,4	60,4	-	29

**Tabla 6** Actividad anisakicida *in vitro* de bromelaína 25 mg/ml: supervivencia<sub>media</sub> a 4, 8, 24 y 48 h, supervivencia<sub>50</sub> (S<sub>50</sub>) y supervivencia<sub>máxima</sub> (S<sub>max</sub>).

Este compuesto, a pesar de provocar una acción larvicida inferior al 50% de eficacia (L3 muertas), lleva también a cabo la ruptura de la integridad de las larvas, provocando su fragmentación mediante la digestión de los tejidos, a medida que aumenta el tiempo de exposición.

**Estudio *in vivo***

El 50% (3/6) de los animales tratados con el extracto de **papaína** (80 mg/kg) presentaron lesiones en la zona muscular del estómago. Éstas consistieron en una lesión puntual (1,5 x 1,5 mm), una de 5 x 2 mm, y otra de 6 x 2 mm.

Todas las larvas estaban libres: en la cavidad peritoneal tras haber penetrado la pared, dos de las tres larvas que atravesaron, dos lo hicieron por la misma úlcera; o en la luz GI. Es posible que una larva encontrada en estómago se hubiera fijado previamente, provocando la lesión puntual que mostró un individuo, ya que no se encontró la larva patógena responsable. La localización de las mismas se expone en la tabla 7.

El 100% de las larvas recogidas se observaron vivas y en buen estado físico.

		Papaína	Control
<b><u>Lesiones</u></b>	Total (%)	50	100
	Localización (n°):		
	Estómago	3	6
<b><u>Localización de las larvas (%)</u></b>	Cavidad	8,3	8,3
	<i>Estómago:</i>	41,7	54,3
	Fijas	-	26,3
	<i>Intestino delgado:</i>	36,1	31,4
	<i>Intestino grueso:</i>	11,1	5,7
	No recuperadas	2,8	2,8

**Tabla 7 Localización de las lesiones encontradas en los animales (n°) y de las larvas recogidas (%), tras la administración de papaína, y sin ella (control).**

## **Estadística**

a) El análisis estadístico de los porcentajes de mortalidad de las larvas tratadas con papaína y bromelaína *in vitro*, muestra:

1. El porcentaje de mortalidad ocasionado a las diferentes dosis de papaína fue significativamente distinto respecto al control ( $p < 0,05$ ): a 50 mg/ml, tuvo valores de p-valor entre 0,011-0,014 a 4, 8, 24 y 48 h; a 25 mg/ml, valores de  $p = 0,008-0,014$ ; y a 2,5 mg/ml,  $p = 0,013-0,014$ . Por su parte, la bromelaína a la dosis utilizada también tuvo una eficacia significativa respecto al control, a todos los tiempos determinados ( $p = 0,014$ ).
2. Si comparamos los dos productos ensayados a igual dosis (25 mg/ml) entre sí, los valores son diferentes a todos los tiempos observados: a 4 h,  $p = 0,021$ ; a 8 h,  $p = 0,020$ ; a 24 h,  $p = 0,014$ ; a 48 h,  $p = 0,014$ . Por tanto, existe una diferencia significativa en la mayor actividad anisakicida de papaína respecto a bromelaína, a la misma dosis.
3. Incluso utilizando una dosis menor de papaína, 2,5 mg/ml, 10 veces menor a la de bromelaína, la diferencia en los valores de mortalidad es significativa: a 4 h,  $p = 0,020$ ; a 8 h,  $p = 0,020$ ; a 24 h,  $p = 0,019$ ; a 48 h,  $p = 0,019$ , con mayor eficacia en favor de la papaína.
4. Las distintas dosis de papaína analizadas no produjeron valores de mortalidad diferentes entre sí estadísticamente significativos, siendo iguales las de 50 y 25 mg/ml a todos los tiempos. Entre las de 50 y 2,5 mg/ml: a 4 h  $p = 0,17$ ; a 8 h  $p = 0,46$ ; a 24 h  $p = 0,32$ ; a 48 h  $p = 0,13$ . Y entre las dosis de 25 y 2,5 mg/ml: a 4 h  $p = 0,14$ ; a 8 h  $p = 0,38$ ; a 24 h  $p = 0,13$ ; a 48 h  $p = 0,13$ .

b) El análisis de regresión logística indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,99$ ), entre la ocurrencia de lesiones GI *in vivo* hallada cuando se administró esta dosis de papaína respecto al control.

### 3. Extractos de granada (*Punica granatum*)

#### Estudio *in vitro*

##### **Extracto de zumo, arilos y pericarpio:**

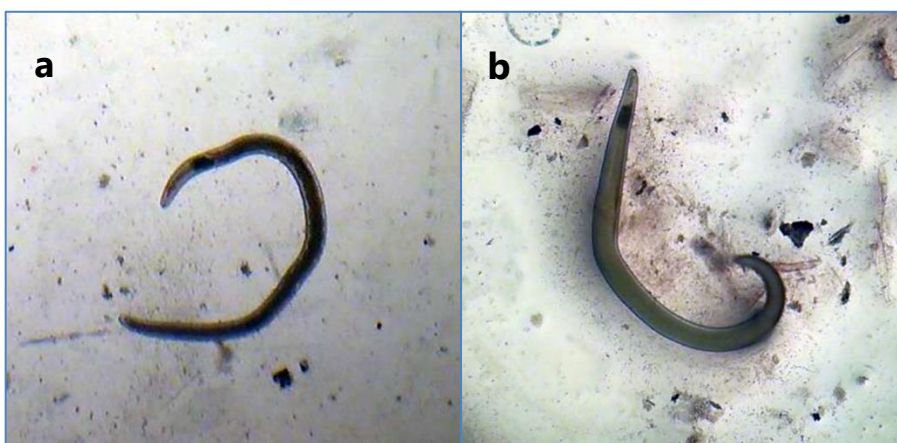
El ensayo *in vitro* sobre las larvas mostró alteraciones de sus estructuras internas de leves a moderadas. La movilidad de las larvas se redujo desde las 24 h, y a las 48 h se recogieron 4/48 larvas muertas, tres correspondientes al extracto congelado y una al extracto fresco (Fig. 25a).

##### **Extracto de zumo y arilos:**

Se encontró una situación similar a la del extracto anterior, iniciándose una ligera actividad larvicida a las 24 h (Fig. 25b). A las 48 h observamos 2/48 larvas muertas cuando usamos el extracto congelado, mientras que 7/48 sufrían alteraciones graves en su estructura, correspondientes al extracto fresco.

##### **Zumo embotellado:**

Todas las larvas estaban vivas y sin alteración.



**Fig. 25** Larvas de *Anisakis* tras su exposición a: (a) el extracto congelado de fruta más pericarpio, (b) el extracto fresco de fruta. Pueden advertirse alteraciones morfológicas, donde la larva ha perdido la turgencia de su cutícula y la estructura de sus órganos internos.

## **Estadística**

El análisis estadístico de los porcentajes de mortalidad de las larvas tratadas con extracto de arilos y pericarpio, y extracto de arilos sólo, fresco y congelado en ambos casos, tras 48 h de exposición, indica: una actividad biocida significativa de los extractos de zumo y pericarpio congelado y extracto de arilos fresco, respecto al control ( $p= 0,046$  y  $p= 0,011$ , respectivamente). Al comparar la eficacia de ambos preparados entre sí, no se encontraron diferencias significativas ( $p= 0,16$ ).

El zumo embotellado de granada quedó fuera del estudio, dado que las muestras eran iguales entre sí y en comparación con el control.



#### 4. Aceites esenciales sobre musculatura de pescado infectado

##### Análisis cromatográfico

Compuesto (%)	Cantueso	Comino	Espliego	Mejorana	Orégano	Romero	Tomillo
$\alpha$ -tujeno					0,49		0,02
$\alpha$ -pineno	1,06	0,28	0,53	1,51	0,30	13,47	0,05
Campheno	1,30		0,24	0,37		5,86	0,06
Sabineno				1,54			
$\beta$ -pineno		7,30	0,55	2,38		2,39	
$\beta$ -mirceno		0,33		0,77	0,63	1,58	0,17
$\alpha$ -terpineno					0,47		0,13
p-cimeno		12,25	0,18	0,49	3,32	2,15	17,74
Limoneno	0,75		0,18	1,83		3,06	0,04
1,8-cineol	5,17		19,58	68,05		27,98	0,14
Ocimeno				0,48			
$\Delta$ 4-careno		10,47			1,30		0,41
Óxido de linalilo			0,28	0,37	0,23		0,10
Fenchona	48,68		0,09				
Linanool			52,59	9,53	0,91	1,20	1,39
Alcanfor	39,98		17,33	0,73		23,32	
Lavandulol			1,79				
Santolina alcohol				1,25			
Borneol			1,71	0,76	0,09	4,97	0,47
Terpinen-4-ol		0,39	0,35	0,84	0,46	1,11	
$\alpha$ -terpineol		0,82		4,83			
o-cresol		0,24					
Formato de isobornilo							0,05
Cuminaldehído		34,11					
Antranilato de linalilo				2,29			
Formato de bornilo	1,89						
$\Delta$ 2-careno-10-al		20,78				1,64	0,04
$\Delta$ 3-careno-10-al		11,80					
Timol					0,22		76,31
Carvacrol					88,39		2,41
Acetato de terpenilo				1,00			
Aromadendreno				1,01	2,42	3,26	0,29

Tabla 8 Composición cuali-cuantitativa de los aceites esenciales (AEs) ensayados frente a larvas de *Anisakis*, analizada mediante CG-EM.

### **Estudio *in vitro***

En los ensayos llevados a cabo con los peces parasitados y en contacto con los AEs probados se observó en general, el desplazamiento de una gran parte de las larvas desde los tejidos parasitados al recipiente en el cual se llevó a cabo el experimento. Además, en la mayoría de los AEs ensayados se produjo una reducción de la supervivencia de las larvas (Tabla 9, Fig. 26).

#### **Cantueso:**

El 71,9% de las larvas se desplazaron al recipiente contenedor, en el cual solo el 17,1% de ellas necesitó estímulo para mostrar una movilidad activa. En cuanto a las larvas halladas tras la digestión de la musculatura del pescado, el 100% tenían movilidad sin necesidad de estimulación. La utilización de este AE produjo una tasa de mortalidad similar de las larvas del recipiente y las del músculo, ya que en ambos casos fue irrelevante (3,5% entre los dos).

#### **Comino:**

En este caso el 82,7% de las larvas abandonaron la musculatura, y un alto porcentaje de larvas necesitó estímulo para moverse, el 62,8% de las larvas del contenedor, y el 80,5% de las de la musculatura. El valor de letalidad obtenido en las larvas que se desplazaron al recipiente (23%) fue mayor que el de las larvas que permanecieron en el músculo (7,3%), siendo en total de 20,3%; las larvas muertas mostraron una gran alteración del ventrículo esofágico.

#### **Espliego:**

El porcentaje de larvas desplazadas al recipiente fue de 84,9%, donde el 33,7% tuvieron movilidad con estímulo, frente al 21,1% de las larvas retenidas en la musculatura. No se produjo la mortalidad de las larvas en ningún caso.

### **Mejorana:**

El 87,6% de las larvas migraron del músculo al recipiente. La supervivencia de las larvas fue del 100%, así como su movilidad, sin necesidad de estímulo.

### **Orégano:**

El porcentaje de migración de las larvas fue el menor de todos los AEs (60,8%). El resto de larvas vivas del recipiente no presentó movilidad activa (14,5%), mientras que tampoco lo tuvieron el 57,5% de las larvas que permanecieron en el músculo.

La exposición a este AE provocó el mayor porcentaje de mortalidad (53,9%), siendo más elevado en las larvas del recipiente (85,5%) que en las del músculo (5%), mostrando las larvas muertas un alto deterioro esofágico (Fig. 27).

### **Romero:**

El porcentaje de desplazamiento al recipiente fue de 69,4%. Todas las larvas sobrevivieron a la exposición, y mostraron movilidad espontánea.

### **Tomillo:**

Se produjo un desplazamiento de las larvas del músculo del 78,4%. Similar porcentaje de larvas necesitaron estímulo para moverse, tanto las del músculo (47,4%) como las del recipiente (55,1%).

El valor de letalidad hallado fue discreto (14,5%), y solo en las larvas del recipiente.

### **Control (aceite de oliva):**

Todas las larvas estaban vivas

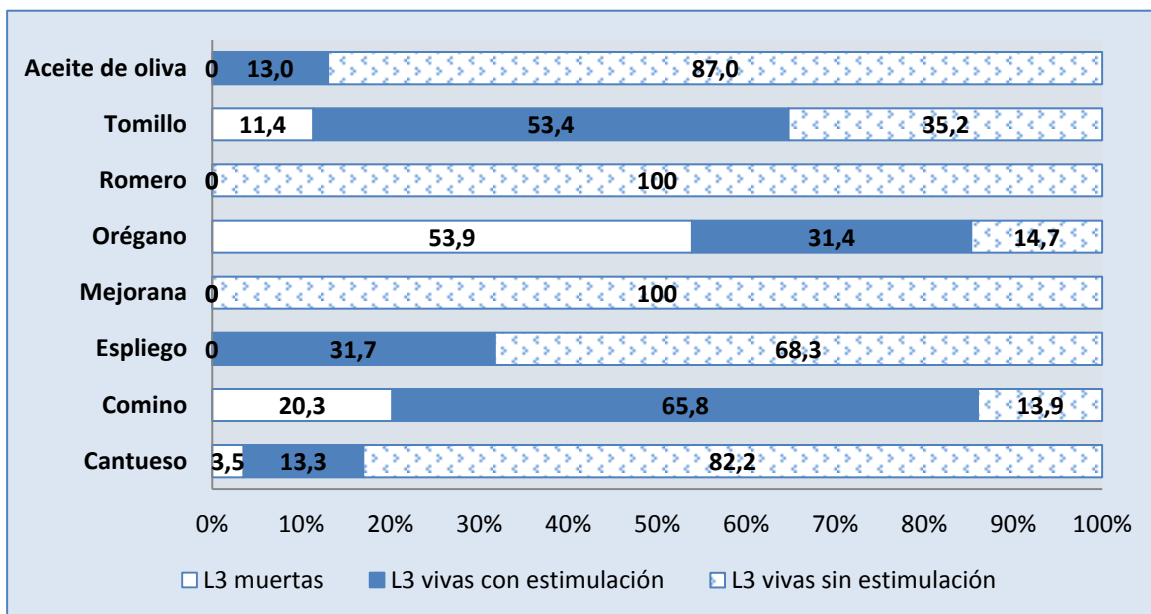
a) Aceite de oliva en placa sin pescado: 48 L3 vivas, sólo una de ellas necesitó estimulación para moverse.

b) Pescado infectado en aceite de oliva: se produjo el desplazamiento del 47,8% de las larvas a la placa, donde 18/22 larvas eran móvilmente activas, siendo esta cifra de 22/24 en la musculatura.

c) Pescado infectado en líquido de digestión: el 38/43 (79,1%) presentaron movilidad sin presencia de estimulación.

	L3 Total	Contenedor				Musculatura			
		Total	SEs	Es	X	Total	SEs	Es	X
<b>Cantueso</b>	57	41 (71,9%)	32 (78,1%)	7 (17,1%)	2 (4,9%)	16 (28,1%)	16 (100%)	-	-
<b>Comino</b>	237	196 (82,7%)	28 (14,3%)	123 (62,8%)	45 (23,0%)	41 (17,3%)	5 (12,2%)	33 (80,5%)	3 (7,3%)
<b>Espliego</b>	126	107 (84,9%)	71 (66,4%)	36 (33,7%)	-	19 (15,1%)	15 (79,0%)	4 (21,1%)	-
<b>Marjorana</b>	89	78 (87,6%)	78 (100%)	-	-	11 (12,4%)	10 (100%)	-	-
<b>Orégano</b>	102	62 (60,8%)	-	9 (14,5%)	53 (85,5%)	40 (39,2%)	15 (37,5%)	23 (57,5%)	2 (5%)
<b>Romero</b>	49	34 (69,4%)	33 (100%)	-	-	15 (30,6%)	15 (100%)	-	-
<b>Tomillo</b>	88	69 (78,4%)	21 (30,4%)	38 (55,1%)	10 (14,5%)	19 (21,6%)	10 (52,6%)	9 (47,4%)	-
<b>Control</b>	46	22 (47,8%)	18 (81,8%)	4 (18,8%)	-	24 (52,2%)	22 (91,7%)	2 (8,3%)	-

**Tabla 9 Número y porcentaje (%) de larvas de *Anisakis* tipo I, que abandonaron o permanecieron en la musculatura del pescado (recogidas del recipiente) o permanecieron en la musculatura del pescado (recogidas de la digestión), según la observación de su movilidad y estado físico. SEs= L3 vivas sin estimulación; Es= L3 vivas con estimulación; X= L3 muertas.**



**Fig. 26** Porcentaje (%) de larvas totales según su movilidad, tras la actuación de los AEs sobre el pescado infectado.



**Fig. 27** Larva L3 of *Anisakis* después de la exposición al aceite esencial de orégano. Puede observarse el daño en esófago e intestino.

### **Identificación morfológica**

El examen microscópico puso de manifiesto que las **784 larvas L3 de *Anisakis*** obtenidas de la **musculatura** de *M. poutassou* pertenecían al Tipo I.

### **Estudio *in vivo***

Dicho estudio ha estado condicionado por los resultados *in vitro*, es decir por el número de larvas vivas y activas que resultaron tras la exposición del pescado a los diferentes AEs.

Un total de 44 animales se infectaron con 218 larvas obtenidas de los ensayos *in vitro*, pero sólo en cinco de ellos (11,4%) los parásitos penetraron en la pared del tracto digestivo.

En una rata la lesión estuvo constituida por un túnel de 2 x 1,5 mm, ligeramente hemorrágico y localizado en la curvatura mayor del estómago, con incrustación parcial de la larva en el extremo del túnel. Esta lesión estuvo originada por una de las L3 sometidas al AE de **espliego** y recogidas del recipiente tras abandonar la musculatura.

Las larvas tratadas con el AE de **romero** produjeron en otro animal una lesión semejante a la anterior, aunque de una longitud algo mayor (4 x 1 mm) y una úlcera de pequeño tamaño (1,5 x 1 mm) rodeada de un halo hemorrágico; las larvas se visualizaron clavadas, al igual que en el animal anterior, en la curvatura mayor del estómago. En este mismo roedor, también se observó una tercera úlcera en el intestino delgado acompañada de signos hemorrágicos. Estas lesiones estuvieron ocasionadas en el primer caso, por una de las L3 que habían abandonado la musculatura del pescado tratado; las otras dos lesiones fueron ocasionadas por L3 que habían permanecido en el músculo. Además, las L3

tratadas con este mismo AE y procedentes de la musculatura, produjeron dos pequeñas úlceras (1 x 1 mm) en otra rata infectada; en una de estas úlceras el parásito se encontró clavado en la pared gástrica de la curvatura mayor, no mostrando signos visibles de hemorragia, y en la otra se localizó en una zona rojiza del intestino delgado.

Por su parte, en los animales infectados con las larvas expuestas a la acción del AE de **tomillo** y recogidas en el recipiente se encontró, en uno de ellos, una lesión de 2 x 1 mm en el fundus gástrico.

Por último indicar, que en otro roedor se halló una larva en la cavidad corporal sin que se observase lesión alguna; esta larva había sido tratada con aceite de **mejorana** y durante el proceso había abandonado el músculo del pez.

Todos los parásitos recuperados de los roedores procedentes de la musculatura de los peces tratados con los AEs se hallaron vivos, excepto el 22,9% de las larvas que habían estado en contacto con el AE de **comino**. El mayor número de larvas se recuperaron del intestino delgado (49,1%), seguido del estómago (41,3%) y sólo un 5,96% del intestino grueso (ciego). En la Tabla 10 se indica el número de roedores infectados y larvas inoculadas, las lesiones producidas y sus localizaciones, así como la localización de las larvas recogidas.

En cuanto al lote **control**, formado por animales que fueron infectados con larvas de pescados no tratados y cuya musculatura se sometió a digestión, se observaron lesiones en todos los casos. Éstas consistieron en túneles y úlceras similares a las descritas anteriormente y se encontraron ubicadas preferentemente en el cuerpo gástrico (72,7%) e intestino delgado (27,3%).

Producto	Origen de L3	Nº de roedores	Nº de L3 inoculadas	Lesiones (número/ localización )		Localización de las L3		
				E	ID	E	ID	IG
<b>Cantueso</b>	Contenedor	3	16	-	-	4	12	-
	Músculo	2	10	-	-	7	3	-
<b>Comino</b>	Contenedor	7	28	-	-	19	9	-
	Músculo	2	5	-	-	2	3	-
<b>Espliego</b>	Contenedor	4	25	1	-	11	7	6
	Músculo	3	15	-	-	4	9	2
<b>Mejorana</b>	Contenedor	6	30	-	-	15	15	-
	Músculo	2	10	1	-	4	5	-
<b>Orégano</b>	Contenedor	-	-	-	-	-	-	-
	Músculo	3	15	-	-	6	7	2
<b>Romero</b>	Contenedor	4	20	2	-	4	12	2
	Músculo	3	14	1	1	4	7	-
<b>Tomillo</b>	Contenedor	3	17	1	-	6	10	-
	Músculo	2	10	-	-	2	7	1
<b>Control</b>	Músculo	6	36*	8	3	5	17	1

**Tabla 10 Sinopsis de los ensayos *in vivo*. E= estómago; ID= intestino delgado; IG= intestino grueso. \*Dos larvas no se recuperaron tras la necropsia de los animales control.**



## 5. Disoluciones oleosas de tres saponinas

### **Prueba *in vitro***

#### **Control**

El aceite de oliva no tuvo efecto sobre las larvas, ya que éstas estaban vivas tras 48 h de exposición.

#### **Sapogeninas**

El medio enturbiado no permitió observar las L3 en los pocillos, por lo que se descartaron estas pruebas.

### **Análisis de la patogenicidad *in vivo***

#### **Diosgenina:**

Dosis de 2,5 mg/kg. El 65% (13/20) de los animales presentaron lesiones localizadas principalmente en el estómago, excepto 2 en el intestino. El % total de larvas en la luz GI fue de 79,2% (95/120), 70,5% (67/95) de las cuales estaban en el estómago, y 5,8% no se recogieron (Tabla 11). Teniendo en cuenta el alto % de animales con daño GI, se descarta esta dosis para el resto de los compuestos testados.

Dosis de 5 mg/kg. El 10% (2/20) mostraron lesiones inducidas por la fijación de la larva en la pared gástrica. En esta misma experiencia, el 90% (108/120) de larvas se encontraron libres, de las cuales el 64,1% (75/108) en el estómago y el resto en el intestino. El porcentaje de larvas no recuperadas fue de 8,3%.

### **Sarsasapogenina:**

Dosis de 5 mg/kg. Un 60% (12/20) de los animales sufrió lesiones principalmente gástricas, a excepción de una intestinal. Sin embargo, hay que señalar que el número de lesiones no se correspondió con las larvas encontradas en dicha localización, ya que en dos animales no se visualizó el daño GI a pesar de haber encontrado larvas en cavidad. También, en ratas con lesiones características en forma de túnel (cinco en estómago y una en intestino), no se encontraron larvas fijas ni en cavidad abdominal, mientras que cinco animales presentaron más de una lesión. Es conviene señalar que en una rata con dos lesiones gástricas en las cuales se encontraban fijas sendas larvas, se halló una tercera en la luz del estómago que tenía la parte bucal rodeada de un capuchón prominente; además, en una misma lesión estomacal se observaron dos larvas fijas. El porcentaje total de larvas libres fue de 81,7% (98/120), encontrándose en el estómago el 69,4% (68/98), y no recuperándose el 5,8%.

Dosis 1/16 DL<sub>50</sub>. El 25% (5/20) de las ratas mostraron lesiones, todas en estómago excepto una en el intestino. Una larva no se localizó a pesar de estar presente la lesión en la pared gástrica del animal. El 81,7% (98/120) de los parásitos estaban libres en el estómago y el resto en el intestino.

### **Ácido glicirretínico:**

Dosis de 5 mg/kg. El 50% (10/20) de ratas presentaron lesiones, sobre todo gástricas. En esta experiencia se encontraron tres ratas con dos lesiones: en dos de ellas las lesiones se ubicaban en el estómago, y en la tercera, en estómago e intestino. Al igual que en caso de la sarsasapogenina, no se localizó la larva causante del daño en cinco de los animales y en uno de ellos no se observó la lesión aun teniendo una larva en cavidad abdominal. El porcentaje de larvas libres fue de 85,8% (103/120), de éstas el 67% se localizó en estómago, no recuperándose el 6,7% de ellas.

Dosis 1/16 DL<sub>50</sub>. El porcentaje de lesiones en las ratas fue del 30% (6/20), todas ellas en la pared del estómago. Una larva no se observó a pesar de la lesión existente en el estómago de la rata. El porcentaje de larvas libres en estómago fue 85% (102/120), y el resto, en el intestino.

### **Control**

El 100% (20/20) de las ratas presentaban daños GI; dichas lesiones se localizaron principalmente en la pared estomacal, excepto dos en el intestino. Siete animales mostraron más de una lesión (tres en dos de ellos) y, en otro, aunque el daño estaba presente no se halló la larva ni fijada a la pared GI ni en la cavidad abdominal. El porcentaje de larvas libres en el tracto digestivo fue del 75% (90/120), de las cuales el 37,8% (34/90) se hallaron en el estómago y no se recuperaron el 1,7%.

A la vista del número de lesiones observadas en los animales tratados bien con sarsapogenina, bien con ácido glicirretínico, muy superior al detectado en el caso de la diosgenina, se optó por la realización de nuevos ensayos con sarsapogenina y ácido glicirretínico, a dosis equivalentes a 1/16 de la DL<sub>50</sub> (61,25 mg/kg y 153,12 mg/kg respectivamente).

El número y localización de las larvas adheridas a la pared GI y aisladas de la cavidad abdominal de los animales tratados y no tratados en estos ensayos, están presentados en la Tabla 11.

	Lesiones en animales (tamaño)	Adherencia/fijación (L3)		Perforación (L3)
		Estom	Int	
<b>Control</b>	20/20 (4,1x2,9 mm)	18/120	1/120	9/120
<b>Diosgenina</b>	<b>2,5 mg/kg</b>	13/20 (4,9x2,1 mm)	12/120	1/120
	<b>5 mg/kg</b>	2/20 (5,5x1 mm)	2/120	-
<b>Sarsasapogenina</b>	<b>5 mg/kg</b>	12/20 (5,7x2,3 mm)	9/120	1/120
	<b>1/16 LD<sub>50</sub></b>	5/20 (2,1x1,1 mm)	1/120	1/120
<b>Ácido glicirretínico</b>	<b>5 mg/kg</b>	10/20 (6,6.x2,3 mm)	5/120	-
	<b>1/16 LD<sub>50</sub></b>	6/20 (5,1x1,8 mm)	4/120	-

**Tabla 11 Asociación de cada saponina ensayada a los resultados obtenidos de la necropsia: el número de animales que presentaron lesiones GI y el tamaño medio del conjunto de la lesión, y el número y ubicación de las larvas patógenas, las que se encontraron adheridas a la pared GI (estómago o intestino) y aquellas que la atravesaron y se aislaron de la cavidad abdominal de los animales. Estom= estómago; Int= intestino.**

### **Estudio histológico**

En relación con el análisis en todos los grupos de animales (no tratados y tratados), se determinó que el área más afectada del estómago fue la región glandular (76,8%).

El estudio histológico de la mayoría de las lesiones en el grupo control reveló un área erosionado de diferente tamaño causado por la larva. En esta zona, se podía observar la destrucción de la mucosa junto con la desaparición del epitelio de revestimiento e infiltración linfocítica, alineándose varias capas de células

inflamatorias en la base del sitio de penetración (Fig. 28, flecha); además, la capa submucosa mostró edema, hemorragia e infiltración linfocítica (Fig. 28a).

En los grupos tratados, especialmente en el caso de la diosgenina, la larva principalmente se alojó entre los tejidos de la mucosa y la submucosa gástricas, y su migración a través de estos tejidos dio lugar a lesiones tipo túnel; sin embargo, incluso aunque estas capas también se vieron dañadas, el edema y la hemorragia fueron menos severos (Fig. 28b).

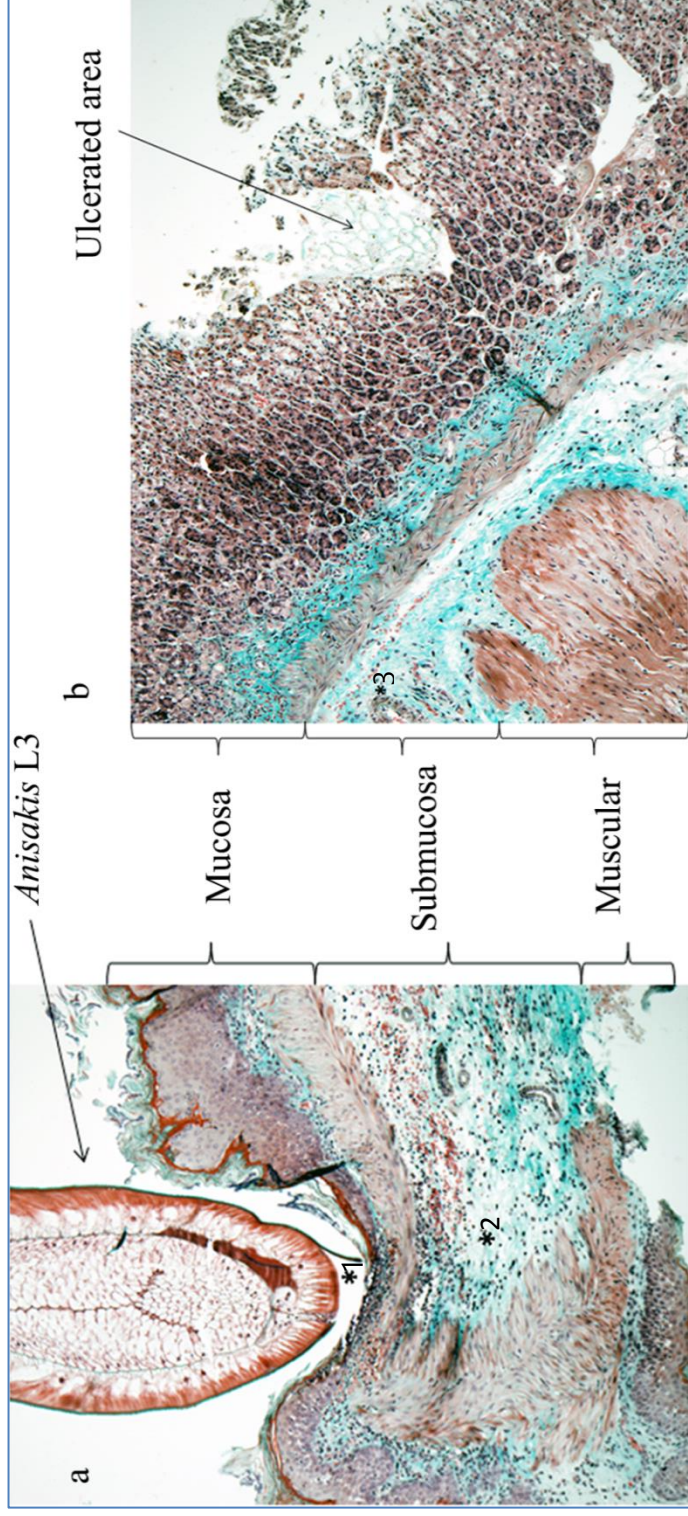


Fig. 28 (a) Área glandular del estómago de un animal no tratado: se observa destrucción de la mucosa en el sitio de penetración de la larva con infiltrado linfocítico (\*1), y gran edema en la capa submucosa (\*2). (b) Área glandular del estómago de un animal tratado con diosgenina: puede observarse una úlcera sin hemorragia, edema ni infiltración linfocitaria en la capa submucosa. Capilar con sangre roja (\*3).

### **Análisis de la enzima Mieloperoxidasa (MPO)**

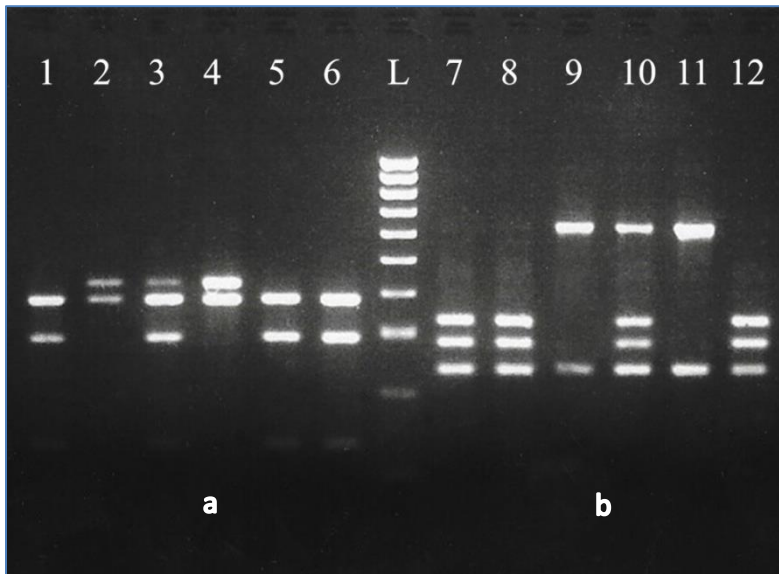
Los resultados de todos los t-tests realizados tuvieron p-valor  $\geq 0,01$  para un nivel de confianza del 99%, por tanto, no hubo diferencias significativas entre los valores de MPO en los animales tratados y los controles (Tabla 12).

	mU MPO estómago	mU MPO intestino delgado	mU MPO intestino grueso
<b>Control (aceite de oliva)</b>	588,3	1556,5	2585,5
<b>Diosgenina</b>	1307,0	1670,8	1722,2
<b>Sarsapogenina</b>	567,8	2648,0	1731,0
<b>Ácido glicirretínico</b>	582,3	4855,0	3855,5

**Tabla 12 Valores de mieloperoxidasa (MPO) en los tejidos del tracto gastrointestinal, expresados en miliunidades (mU)/ g de tejido.**

### **Identificación de las larvas**

Las larvas responsables del daño en el estómago de los animales que fueron tratados con diosgenina (2/2) mostraron un patrón RFLP como el de *A. simplex* s.s.. En los animales controles, teniendo en cuenta que todos los animales mostraron daño, el 66,7% (8/12) de las larvas fijadas a las paredes del estómago fueron *A. simplex* s.s. y el 33,3% (4/12), *A. pegreffii*; igualmente, el 83,3% (5/6) de las larvas encontradas en la cavidad fueron *A. simplex* s.s., y el 16,7% (1/6), *A. pegreffii*. De las larvas encontradas libres en el tracto digestivo de los animales, 50% (16/32) pertenecieron a *A. pegreffii*, 40,6% (13/32) a *A. simplex* s.s., y el resto (3/32) fueron formas híbridas de *A. simplex* s.s.-*A. pegreffii*.



**Fig. 29** Perfiles RFLP obtenidos por digestión de la región ITS con las enzimas de restricción *HinfI* (a) y *TaqI* (b). Líneas: 1, 7 *A. pegreffii*; 2, 9 *A. simplex* s.s.; 3, 10 genotipo híbrido *A. simplex* s.s.–*A. pegreffii*; L Estándar de pesos moleculares de 100 pb.

### **Análisis de factores de riesgo**

Por una parte, la presencia de lesiones estuvo inversamente asociada con la administración de diosgenina a la dosis de 5 mg/kg ( $p < 0,001$ ), siendo la oportunidad (OR) de que "la larva no produzca lesión" cuando se administra el producto 19 veces mayor que en el control. También, la asociación de la variable "fijación y/o perforación de la pared GI por la larva" –larvas fijas a la pared GI y/o aisladas de la cavidad abdominal- cuando se administra esta saponina, resultó significativa ( $p < 0,001$ , OR=18,8). En cuanto a la variable "localización de las larvas", sólo los valores del estómago resultaron significativos ( $p = 0,015$ ), en comparación con el control. Por otro lado, en el caso de administrar sarsasapogenina, a la citada dosis (5 mg/kg), no hubo asociación inversa con la



presencia de lesión ( $p= 0,051$ ), ni con la capacidad de la larva de fijarse y/o penetrar el tracto GI ( $p= 0,031$ ); ahora bien, sí hubo asociación lineal con la localización de la larva en estómago ( $p= 0,001$ ). Por su parte, la "ausencia de lesión" al utilizar ácido glicirretínico a la misma dosis (5 mg/kg), estuvo asociada ( $p= 0,008$ , siendo OR= 2,6 veces mayor que sin el citado producto); de igual modo, los valores fueron significativos ( $p= 0,001$ ) en el caso de no presentarse larvas fijadas o aisladas de la cavidad abdominal (OR= 3,8), y cuando *Anisakis* se localizó en el estómago ( $p= 0,004$ ), cuando se administró el producto.

En relación con los animales infectados y a los que se le administró una dosis 1/16 de la  $DL_{50}$  de sarsasapogenina o ácido glicirretínico, hubo una fuerte conexión con la falta de lesiones para ambos productos ( $p < 0,001$ ; OR= 7,3 y OR= 6, respectivamente). De igual modo, la ausencia de fijación y penetración de la larva a través de la pared GI estuvo significativamente asociada con la administración de las dos saponinas ( $p < 0,001$ : OR= 7 para la sarsasapogenina, y OR= 8,8 para el ácido glicirretínico). En cuanto a la localización de las larvas en el estómago fue también diferente entre los animales tratados y el grupo control ( $p < 0,001$ ).



## Capítulo 2. Epidemiología y factores de riesgo en la infección de la bacaladilla en el golfo de Cádiz

### Hospedador

Las bacaladillas analizadas midieron entre 17,5 y 28,5 cm de longitud (valor medio: 22,7 cm +/- 1,9) y pesaron entre 29,7 y 110,5 g de peso (valor medio: 73,8 g +/- 17,5). Ambas variables estuvieron fuertemente correlacionadas: correlación de Pearson = 0,89,  $p < 0,001$ ; correlación entre peso y longitud al cuadrado es ligeramente menor (correlación de Pearson = 0,88,  $p < 0,001$ ). El 63% de los peces se capturaron en otoño, el 17% en invierno, y el 20% restante en primavera.

### Parámetros epidemiológicos

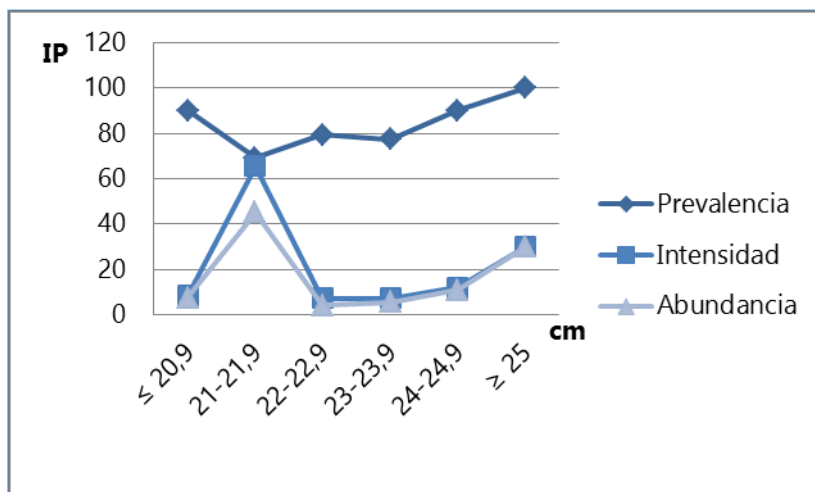
El 82% (82/100) de las 100 bacaladillas inspeccionadas estaban parasitadas. En la Tabla 13 se muestran los valores de parasitación (prevalencia, intensidad y abundancia) totales y según la estación del año, señalando la localización del parásito en el hospedador. En la Fig. 30 se muestra la variación de los parámetros de infección con el peso y longitud de la bacaladilla.

El número de larvas L3 de *Anisakis* recogidas fue de 1350. Todas ellas fueron identificadas morfológicamente como L3 tipo I. Sólo tres pescados se encontraron con más de 150 parásitos, concretamente 171, 229 y 328 larvas, mientras que en el resto el número osciló entre 0 y 78 parásitos (valor medio: 13,5 +/- 43,5).

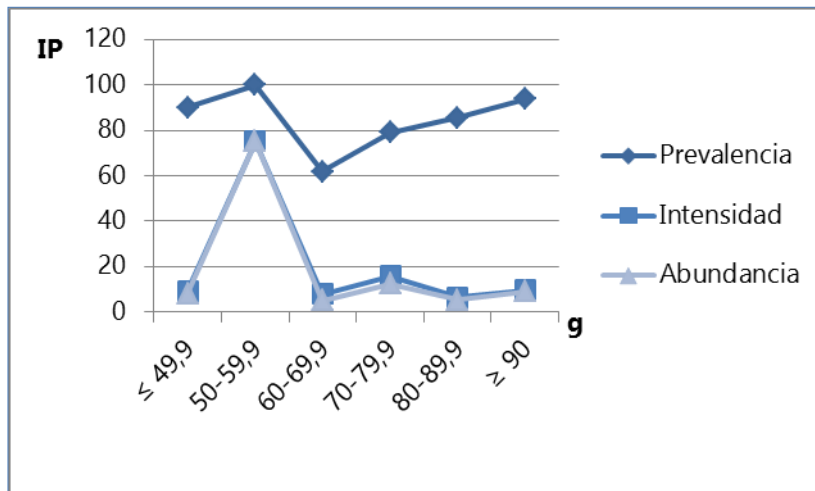
	Parámetros de infección	Total	Cavidad Corporal	Visceras	M Ventral	M Dorsal
<b>Total</b>	P	82% (82/100)	32% (32/100)	73% (73/100)	37% (37/100)	18% (18/100)
	I	16	0,65	13	7,4	2,9
	A	13,5	0,54	9,71	2,72	0,53
	N	1350	54	971	272	53
<b>Otoño</b>	P	75% (47/63)	27% (17/63)	63% (40/63)	14% (9/63)	5% (3/63)
	I	2,7	1,2	2,3	1	1
	A	2,0	0,32	1,5	0,19	0,1
	N	128	20	93	12	3
<b>Invierno</b>	P	88% (15/17)	35% (6/17)	76% (13/17)	65% (11/17)	35% (6/17)
	I	46	2	47	3,7	3
	A	40	0,5	36	2,4	1,2
	N	682	9	612	41	20
<b>Primavera</b>	P	100% (20/20)	50% (10/20)	100% (20/20)	85% (17/20)	45% (9/20)
	I	27	2,5	13	13	3
	A	27	1,3	13	11	1,5
	N	540	25	266	219	30

**Tabla 13 Valores de parasitación totales, según la estación del año, y de acuerdo a la localización dentro del hospedador. M Ventral= musculatura ventral, M Dorsal= musculatura dorsal; P= prevalencia, I= intensidad media, A= abundancia media, N= número de larvas.**

**Longitud**



**Peso**



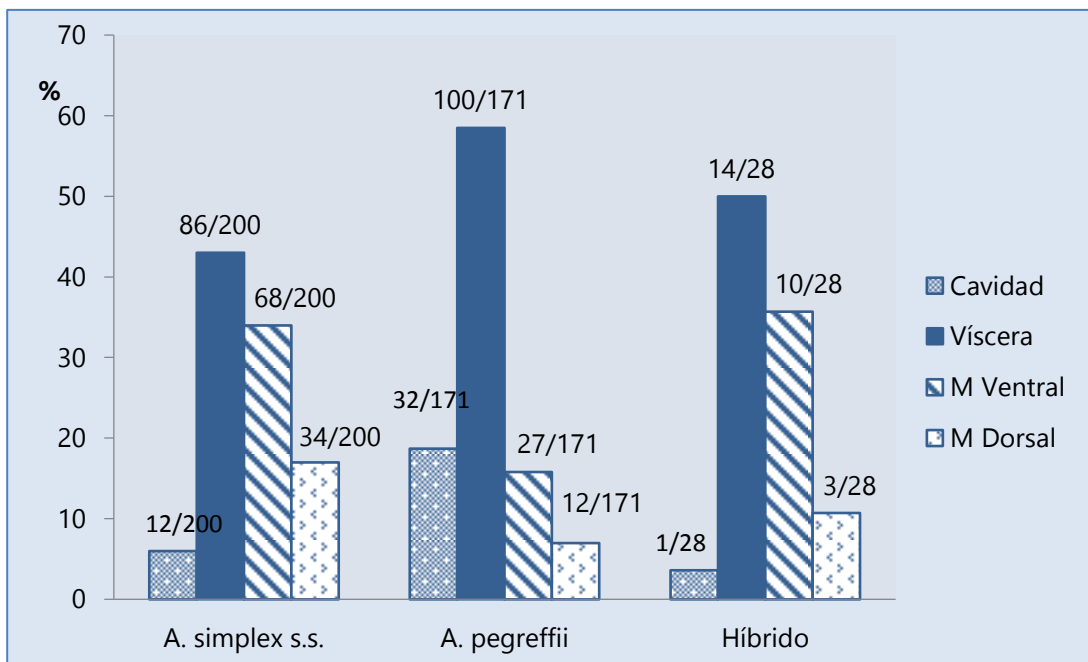
**Fig. 30** Parámetros de infección (P, I, A) de acuerdo al peso (g) y la longitud (cm) del hospedador.

**Identificación genética de larvas de *Anisakis* a través de PCR-RFLP del ITS**

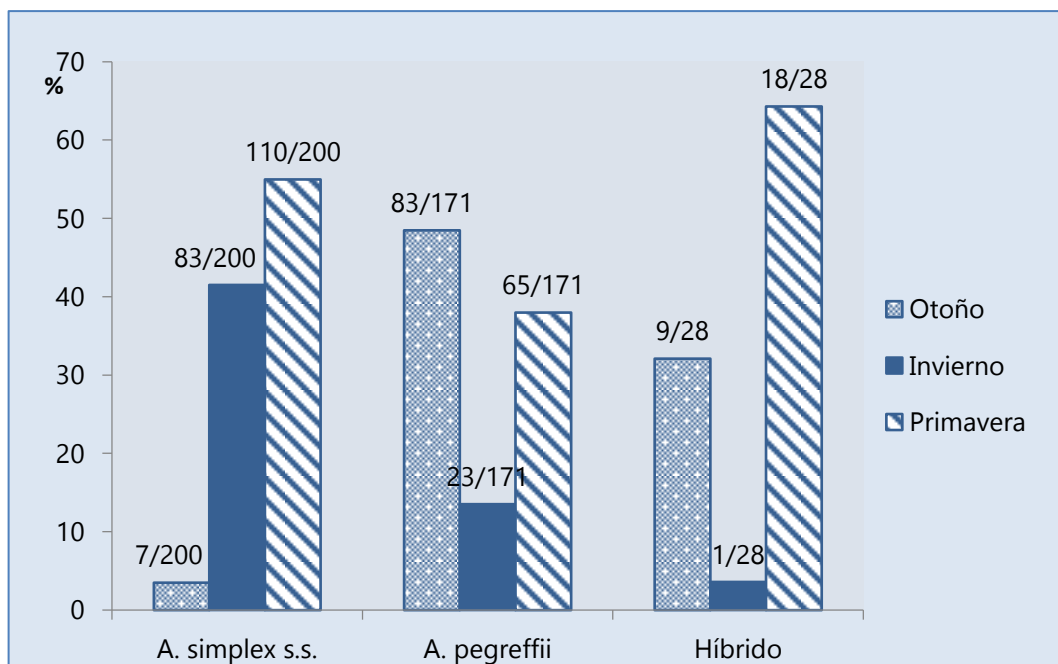
Un número de larvas seleccionadas al azar, de cada pez y cada localización, fueron identificadas por técnicas moleculares, en total 400 de las 1350 larvas recogidas (29,6%); por su implicación en la infección en el hombre, se identificó

una alta proporción (47,7%) de las larvas recogidas de la musculatura (155/325). En conjunto, la distribución fue la siguiente: 11% de larvas encontradas libres en la cavidad corporal (45/400), 50% larvas enquistadas en las vísceras (200/400), 26,5% larvas halladas en musculatura ventral (106/400) y 12% en la musculatura dorsal (49/400). Por estación, en otoño se analizó el 25% de larvas L3 de *Anisakis* tipo I (99/400), en invierno el 26,8% (107/400), y en primavera 48,5% (194/400).

La distribución de las especies de *Anisakis* identificadas fue la siguiente: 99,7% (399/400) de las larvas se correspondió con el complejo *A. simplex* s.l., de forma que sólo 1 de las 400 larvas (0,3%) se identificó como una especie distinta, *A. typica*. Dentro del complejo *A. simplex* s.l., el 50,1% (200/399) de las larvas corresponde a *A. simplex* s.s., el 42,9 % (171/399) a *A. pegreffii* y el 7% restante (28/399) son genotipos híbridos de las anteriores especies. La proporción de larvas pertenecientes a los diferentes genotipos del complejo *A. simplex* s.l. de acuerdo a su sus distintas localizaciones dentro del hospedador (cavidad, vísceras, musculatura ventral y musculatura dorsal) se muestra en la Fig. 31, y la identificación de los genotipos por estación, en la Fig. 32. La proporción de especies de *A. simplex* s.l. según la longitud del hospedador está descrita en la Tabla 14.



**Fig. 31** Porcentaje (%) de infección por los distintos genotipos de *Anisakis* spp. en las diferentes localizaciones del pescado. M Ventral= musculatura ventral, M Dorsal= musculatura dorsal.



**Fig. 32** Porcentaje (%) de genotipos de *A. simplex* s.l. identificados, según la estación del año.

Longitud (cm)	Nº L3	As (%)	Ap (%)	H (%)
≤20,9	38	4,3 (17/400)	5,3 (21/400)	-
21-21,9	76	15 (58/400)	3,8 (15/400)	0,8 (3/400)
22-22,9	74	5,5 (22/400)	11 (42/400)	2,5 (10/400)
23-23,9	58	6,5 (26/400)	7,3 (29/400)	0,8 (3/400)
24-24,9	48	2,5 (10/400)	8 (32/400)	2 (6/400)
≥25	106	17 (67/400)	8 (32/400)	2 (6/400)

**Tabla 14** Porcentaje (%) de genotipos de *A. simplex* s.l. de acuerdo a la longitud (cm) del hospedador. As= *A. simplex* s.s., Ap= *A. pegreffii*, H= híbrido *A. simplex* s.s.-*A. pegreffii*.

Los pescados parasitados han presentado tanto infecciones por una sola especie de *Anisakis* como infecciones mixtas en todas las combinaciones posibles. El 6% (6/100) de los pescados estaban parasitados únicamente por *A. simplex* s.s., 33% (33/100) por *A. pegreffii*, 4% (4/100) por el genotipo híbrido, 19% (19/100) por *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, 10% (10/100) por *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* y el híbrido, 2% (2/100) por *A. simplex* s.s. y el híbrido, 7% (7/100) por *A. pegreffii* y el híbrido, y el 1% (1/100) por *A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, el híbrido y *A. typica* (Tabla 15).



	Cavidad	Viscera	M Ventral	M Dorsal	Total
<b>As</b>	6	8	12	5	6
<b>Ap</b>	23	43	8	5	33
<b>As+Ap</b>	2	9	9	4	19
<b>H</b>	1	3	3	1	4
<b>As+Ap+H</b>	-	1	1	1	10
<b>As+H</b>	-	2	2	1	2
<b>Ap+H</b>	-	7	1	-	7
<b>As+Ap+At+H</b>	-	-	1	-	1
<b>Total</b>	32	73	37	17	82

**Tabla 15 Prevalencia (%) de infección por los distintos genotipos de *Anisakis* spp. en las diferentes localizaciones del pescado. M Ventral= musculatura ventral, M Dorsal= musculatura dorsal; As= *A. simplex* s.s., Ap= *A. pegreffii*, H= híbrido, At= *A. typica*; As+Ap= infección mixta por *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii*; As+Ap+H= infección mixta por *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* e híbrido; As+H= infección mixta por *A. simplex* s.s. e híbrido; Ap+H= infección mixta por *A. pegreffii* e híbrido; As+Ap+At+H= infección mixta por *A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. typica* e híbrido.**

### **Análisis de los factores de riesgo**

*a. Factores asociados a la parasitación general.* El peso de la bacaladilla no está asociado a la parasitación general del pez por *A. simplex* s.l. ( $p = 0,61$ ). Tampoco están asociadas la longitud ( $p = 0,47$ ) ni la estación del año en la que se realiza la captura ( $p = 0,51$ ). Las demás variables no han podido tenerse en consideración.

*b. Factores asociados a la presencia de la larva en vísceras.* El 100% de las larvas localizadas en vísceras estaban enquistadas. Con respecto a las demás variables independientes investigadas, el análisis univariante mostró asociación con la longitud de la bacaladilla ( $p = 0,045$ ), el genotipo ( $p = 0,010$ ) y la estación del año ( $p < 0,001$ ).

En la construcción del modelo multivariante se ha tenido en cuenta la posible existencia de interacciones entre las distintas variables. En el modelo final perdió su significación la variable longitud, permaneciendo en él las variables "genotipo" ( $p = 0,004$ : ref. *A. simplex* s.s.: *A. pegreffii*,  $p < 0,001$ , OR= 2,9; híbrido,  $p = 0,47$ ), y

"estación del año" ( $p < 0,001$ : ref. primavera; otoño,  $p = 0,26$ ; invierno,  $p < 0,001$ , OR= 3,3), con interacción entre ambas ( $p = 0,005$ : otoño X *A. pegreffii*,  $p = 0,64$ ; otoño X híbridos,  $p = 0,47$ ; invierno X *A. pegreffii*,  $p = 0,001$ , OR= 0,1; invierno X híbridos,  $p = 1,0$ ).

*c. Factores asociados a la presencia de la larva en musculatura ventral.* El análisis univariante mostró asociación con el genotipo ( $p < 0,001$ ) y la estación del año ( $p < 0,001$ ). El peso de la bacaladilla estuvo próximo a la significación ( $p = 0,10$ ), por lo que se ha tenido en cuenta para la construcción del modelo multivariante, así como la posible existencia de interacción entre las variables "genotipo" y "estación del año".

El modelo multivariante final estuvo constituido por las variables "genotipo" ( $p = 0,20$ : ref. *A. simplex* s.s.: *A. pegreffii*,  $p = 0,077$ ; híbrido,  $p = 0,25$ ), "estación del año" ( $p < 0,001$ : ref. otoño; invierno,  $p = 0,063$ ; primavera,  $p = 0,59$ ), con la existencia de interacción entre ambas ( $p = 0,011$ : invierno X *A. pegreffii*,  $p = 0,030$ , OR= 9,1; invierno X híbridos,  $p = 1,0$ ; primavera X *A. pegreffii*,  $p = 0,99$ ; primavera X híbridos,  $p = 0,30$ ), y la variable "peso" ( $p = 0,006$ , OR= 0,98).

*d. Factores asociados a la presencia de la larva en musculatura dorsal.* El análisis univariante mostró asociación con el número total de larvas en la bacaladilla ( $p < 0,001$ ), genotipo ( $p = 0,018$ ) y la estación del año ( $p = 0,010$ ). No hubo interacción entre estas dos últimas variables ( $p = 0,82$ ). La longitud tuvo un valor más próximo a la significación ( $p = 0,17$ ), por lo que se ha tenido en cuenta para la construcción del modelo multivariante.

El modelo multivariante final quedó constituido por las variables "estación del año" ( $p = 0,036$ : ref. otoño; invierno,  $p = 0,097$ ; primavera,  $p = 0,016$ , OR= 6,1) y la variable "número total de larvas L3" ( $p = 0,005$ , OR= 1).

*e. Factores asociados a la parasitación por A. pegreffii respecto a A. simplex s.s.*

El análisis univariante muestra asociación con el peso de la bacaladilla ( $p < 0,001$ ), número total de larvas L3 en el pez ( $p < 0,001$ ), estación del año de la captura ( $p < 0,001$ ), localización de la larva,  $p < 0,001$ , y la interacción entre las variables "estación del año" y "localización" ( $p = 0,005$ ).

El modelo multivariante final estuvo constituido por "número total de larvas L3 en el pez" ( $p < 0,001$ , OR= 0,96), y "estación del año de captura" ( $p = 0,017$ : ref otoño; invierno,  $p = 0,011$ , OR= 0,033; primavera,  $p = 0,49$ ), existiendo una interacción de esta última variable con la localización ( $p = 0,013$ : invierno X musculatura ventral,  $p = 0,067$ , OR= 19).



### Capítulo 3. Utilidad del gen $\beta$ -tubulina como marcador nuclear para la identificación de las especies hermanas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*

#### *Anisakis simplex* s.l. obtenidos e identificados por PCR-RFLP de la región ITS del ADNr

Se identificaron un total de **104 individuos** en las áreas geográficas seleccionadas mediante PCR-RFLP del gen ITS: 31,7% (33/104) *A. simplex* s.s., 37,5% (39/104) *A. pegreffii*, y 30,8% (32/104) híbrido *A. simplex* s.s./*A. pegreffii* (As/Ap). Las proporciones de estos genotipos en cada área se muestran en la Fig. 33.

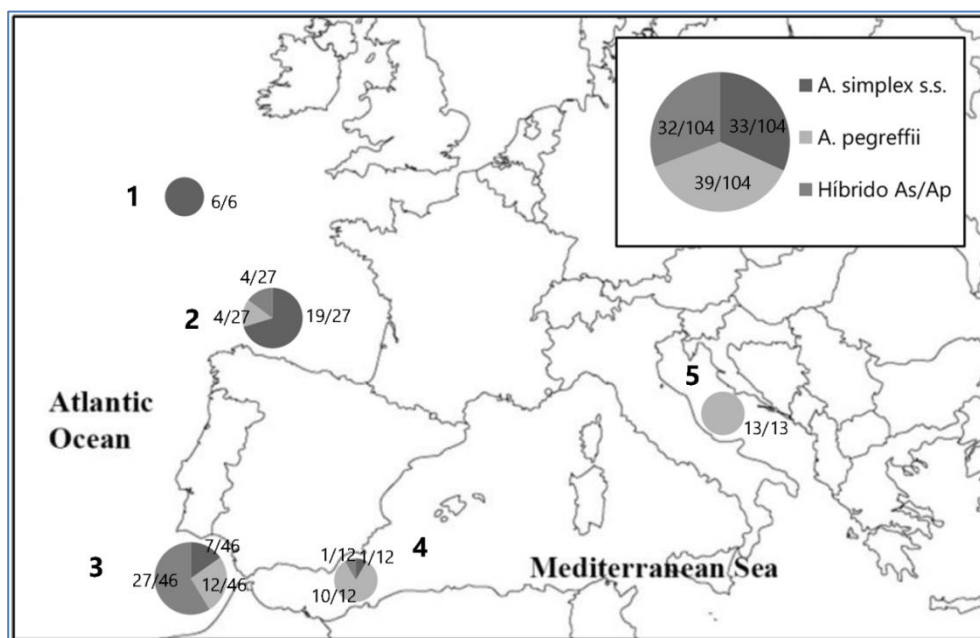


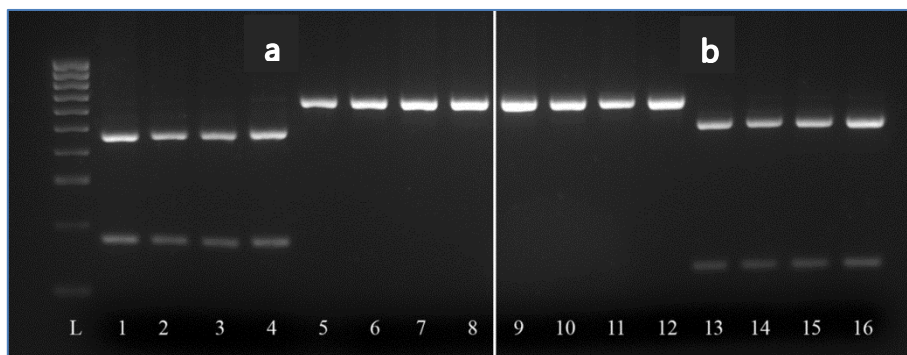
Fig. 33 Áreas geográficas de las diferentes zonas de captura del pescado y proporciones relativas de *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* y genotipo mixto As/Ap identificadas por PCR-RFLP del ITS. 1 Área de pesca Little Sole Bank, 2 costa Atlántica española, 3 Zona de confluencia entre el Atlántico y el Mediterráneo, 4 costa Mediterránea española, 5 mar Adriático.

## **Identificación molecular por PCR-RFLP del gen mitocondrial Cox-2**

La PCR-RFLP optimizada del gen Cox-2 del ADNmt utilizando ambas enzimas de restricción *AccI* y *AvrII*, identificó el 100% (20/20) de las larvas para las cuales se obtuvo una secuencia del gen Cox2 (números de acceso Genbank®: LT976530-LT976537, LT976539, LT976541, LT976542, LT976544 -LT976551).

El patrón de bandas obtenido con la enzima *AccI* para *A. simplex* s.s. mostró dos bandas de 130 y 500 pares de bases (pb), y un fragmento sin digerir de 640 pb con la enzima de restricción *AvrII*. El patrón generado por la enzima *AvrII* para *A. pegreffii* está compuesto por dos bandas de 170 y 470 pb, y por un fragmento sin digerir de 640 pb con la enzima de restricción *AccI*.

La técnica diseñada se verificó con ambas enzimas de restricción en **104 especímenes**, previamente identificados por PCR-RFLP del gen ITS. Esta técnica permitió reconocer los patrones de bandas pertenecientes a ambas especies de *Anisakis* para 101 de las 104 larvas (97,1%), 52 reconocidas como *A. simplex* s.s. y 49 como *A. pegreffii*. Solo tres individuos no pudieron ser identificados: en dos especímenes las enzimas no produjeron ningún corte, y en una tercera larva se obtuvo un patrón distinto de dos bandas de alrededor de 200 y 400 pb cuando se empleó *AccI*, y un fragmento sin digerir con *AvrII*. Las secuencias Cox-2 de estos tres individuos mostraron la presencia de las posiciones nucleotídicas de diagnóstico características de *A. pegreffii*, y la existencia de un polimorfismo individual en su secuencia como la causa de la ausencia de digestión con ambas enzimas o el diferente patrón de bandas (números de acceso Genbank® LT976538, LT976540 y LT976543).



**Fig. 34** Perfiles RFLP obtenidos por digestión del Cox-2 con las enzimas de restricción *AvrII* (a) y *AccI* (b). Líneas: 1-4, 9-12 *A. pegreffii*; 5-8, 13-16 *A. simplex* s.s.; L Estándar de pesos moleculares 100 pb.

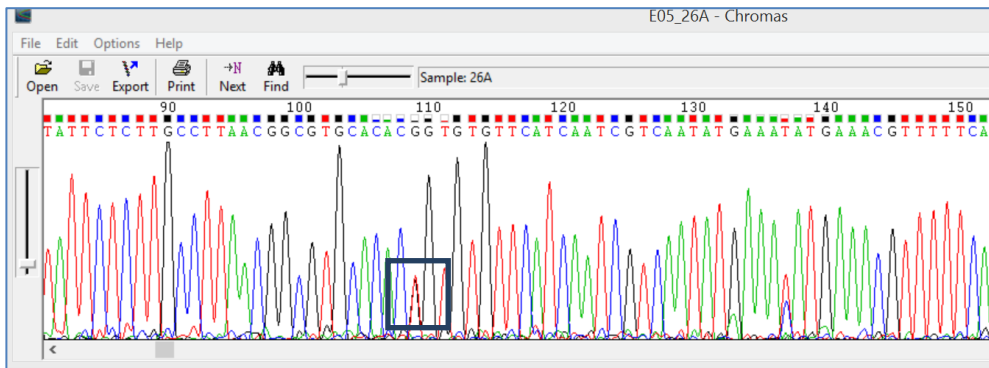
### Análisis del gen nuclear $\beta$ -TUB

El análisis comparativo de las secuencias  $\beta$ -TUB se llevó a cabo en **41 especímenes** identificados como *A. pegreffii* (18), *A. simplex* s.s. (8) y genotipos mixtos As/Ap (15) de acuerdo al análisis PCR-RFLP del ITS. Se obtuvo un fragmento de 650 pb de longitud para la mayoría de las larvas, mientras que tuvo que realizarse una nested-PCR en 11 larvas amplificándose de este modo un fragmento de 450 pb (números de acceso Genbank®: LT970873-74, LT970876-79, LT970881-89).

Se detectaron 21 posiciones polimórficas en el alineamiento practicable de 534 pb de estas secuencias  $\beta$ -TUB, y se identificaron 15 genotipos (Tabla 16). Se obtuvieron 7 diferencias fijas entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, una transversión en la posición 269 (T en *A. simplex* s.s. y G en *A. pegreffii*), y 6 transiciones en las posiciones 33 (G en *A. simplex* s.s. y A en *A. pegreffii*), 75 y 297 (C en *A. simplex* s.s. y T en *A. pegreffii*), 86, 394 y 496 (T en *A. simplex* s.s. y C en *A. pegreffii*). La posición 451 no fue consistentemente diferente entre ambas especies hermanas: 4 especímenes de *A. simplex* s.s. mostraron un nucleótido típicamente observado en

*A. pegreffii* (A en vez de G propio de *A. simplex* s.s.). Dentro de cada especie de *Anisakis*, los genotipos difirieron en 1, 2 o 5 bases (Tabla 16).

El genotipo heterocigoto TUB (Fig. 35) se detectó en las 7 posiciones nucleotídicas de diagnóstico, en 3 larvas de las 15 identificadas como genotipo híbrido mediante PCR-RFLP del gen ITS. En estos 3 individuos, la posición 451 fue también heterocigota; adicionalmente se observó un genotipo heterocigoto A/G en la posición 451 de un espécimen, obtenido de aguas españolas, con nucleótidos típicos de *A. simplex* s.s. en las 7 posiciones diagnósticas (Tabla 16)



**Fig. 35** Espectro de la secuencia  $\beta$ -TUB (programa Chromas), donde puede observarse la superposición de los nucleótidos T/G (rectángulo) en una posición alélica, correspondiente a un individuo híbrido.

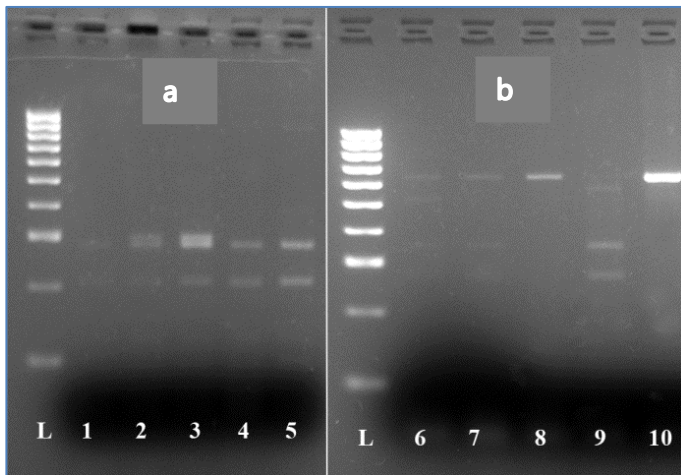
**Tabla 16** Alineamiento de las posiciones polimórficas detectadas en los 15 genotipos  $\beta$ -TUB identificados en las 41 larvas, para las cuales se obtuvo un secuencia  $\beta$ -TUB; las diferencias fijas aparecen en **negrita**. Se usaron los códigos IUPAC estándar: R= A/G, Y= C/T, K= G/T, M= A/C, S= G/C. El número de larvas se muestra dentro de cada genotipo: Ap 1-7= 7 genotipos de *A. pegreffii*, As 1-6= 6 genotipos de *A. simplex* s.s., AsAp 1-2= 2 genotipos híbridos de *A. simplex* s.s.- *A. pegreffii*. El área geográfica de captura se indica de acuerdo a la Fig. 33: Adr= mar Adriático, SpMed= costa mediterránea española, SpAtl= costa atlántica española, Atl-Med= costa atlántico-mediterránea, LSB= Little Sole Bank. La identificación de las larvas de acuerdo a la PCR-RFLP (*Hinf*I, corresponde al nucleótido 255, y *Taq*I, al 271) del fragmento ITS1-5,8S-ITS2 se muestra en la columna ITS.



Resultados

Genotipos	ITS	Posiciones Nucleotídicas TUB																				Nº de Larvas	Área Geográfica			
		255	271	33	60	75	86	100	119	127	136	139	142	145	157	166	266	269	297	394	429			451	496	508
Ap1	Ap	Ap	Ap	A	C	T	C	T	A	A	C	A	G	C	A	G	C	A	G	C	G	T	C	T	13	Adr:11, SpMed:1, SpAtl:1 Atl-Med Adr Atl-Med Adr Atl-Med SpMed SpMed
Ap2	H	H																						5	Atl-Med	
Ap3	Ap	Ap																						1	Atl-Med	
Ap4	H	H																						1	Atl-Med	
Ap5	Ap	Ap																						1	Atl-Med	
Ap6	H	H																						1	Atl-Med	
Ap7	Ap	Ap																						1	Atl-Med	
As1	Ap	Ap																						2	SpMed SpMed	
As2	As	As																						3	LSB	
As3	H	H																						3	Atl-Med	
As4	As	As																						1	LSB	
As5	As	As																						1	LSB	
As6	As	As																						1	Atl-Med	
AsAp1	H	H																						2	Atl-Med	
AsAp2	H	H																						1	SpMed	

La PCR-RFLP diseñada nos permitió identificar el 100% de las larvas, para las cuales se obtuvo una secuencia  $\beta$ -TUB (Tabla 16). El patrón de bandas en *A. simplex* s.s. se caracterizó por dos fragmentos de 280 y 350 pb cuando se empleó la enzima *TscAI*, mientras que *A. pegreffii* mostró un fragmento sin digerir de 650 pb. Con La enzima *Hin1II*, *A. simplex* s.s. se caracteriza por dos bandas de 200 y 280 pb; *A. pegreffii* mostró dos bandas de 280 y 300 pb. En el caso de los híbridos observamos tres fragmentos, de 280, 350 y 650 pb (con *TscAI*) o 200, 280 y 300 pb (con *Hin1II*), es decir, tuvieron patrones resultantes de la suma de los patrones generados para *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*.



**Fig. 36. Perfiles RFLP obtenidos por digestión de  $\beta$ -TUB con las enzimas de restricción *Hin1II* (a) and *TscAI* (B). Líneas 1, 4-5, 9: *A. simplex* s.s.; 8, 10: *A. pegreffii*; 2-3, 6-7: híbrido *A. simplex* s.s.-*A. pegreffii*, L= Estándar de pesos moleculares 100 pb.**

## **Análisis poblacional**

### **1. Equilibrio Hardy-Weinberg (HW)**

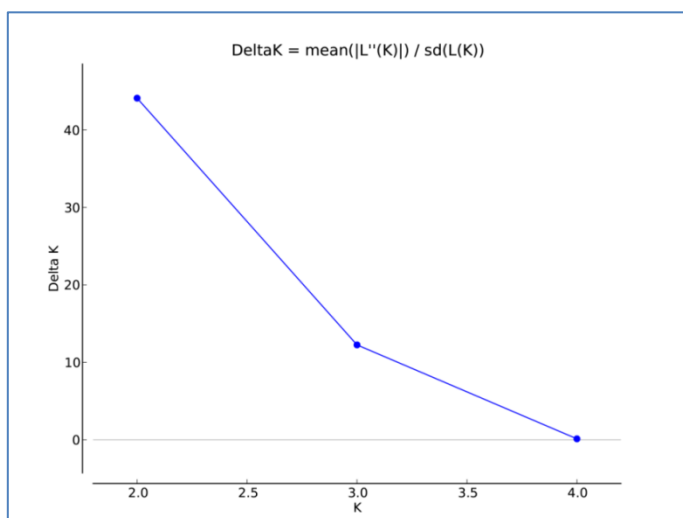
Todas las posiciones polimórficas diferentes en el gen  $\beta$ -TUB entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* mostraron desviaciones significativas del equilibrio ( $p < 0,001$ ) en

el área de confluencia atlántico-mediterránea (golfo de Cádiz): p-valor de cada posición entre 0,0001-0,003. La población del Atlántico norte (LSB) también se desvió estadísticamente del equilibrio en la posición 451. En ninguna de las otras muestras se observó desviación.

Paralelamente, el desequilibrio de unión sólo se detectó entre todos los pares de posiciones en el área atlántico-mediterránea ( $p < 0,001$ ), excepto cuando se comparó la posición 451 (p-valor entre 0,0036-0,0047). En el resto de las poblaciones, no se encontró desequilibrio estadísticamente significativo.

## 2. Análisis bayesiano

a) El análisis bayesiano de estructuración utilizando los genes  $\beta$ -TUB e ITS muestra que las poblaciones de *Anisakis* analizadas se dividen preferentemente en dos grandes grupos genéticos o *cluster* ( $K = 2$ ). Teniendo en cuenta los alelos analizados en los distintos individuos, se obtiene la mayor probabilidad para una población  $K = 2$  (delta-K= 44,10), seguida de  $K = 3$  (12,25), siendo el resto de posibilidades próximas a 0 (Fig. 37).



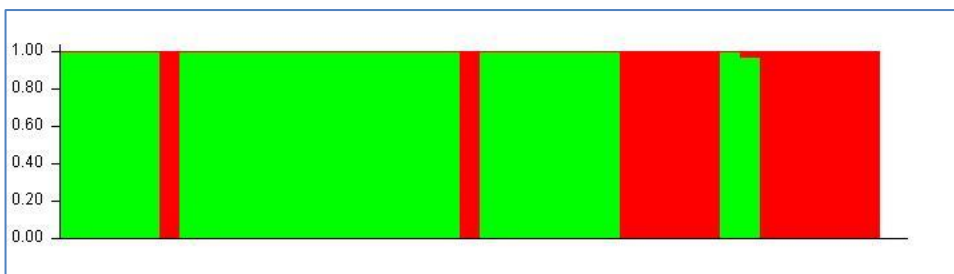
**Fig. 37 Probabilidad de asignación de las poblaciones según el valor de Delta-k. El mayor valor se obtiene para  $K = 2$ , correspondientes a *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*.**

Los valores de afiliación a uno de los dos *clusters* (Q) para un valor de K= 2, son superiores a 0,998 en todas las muestras de las cinco áreas geográficas estudiadas, menos en un individuo del golfo de Cádiz (0,969). El *cluster* 1 tuvo una proporción de afiliación total de 0,32 y engloba a los individuos *A. simplex* s.s., representados exclusivamente en la zona de Little Sole Bank, mientras que el segundo fue el mayoritario (0,68) y corresponde a la especie *A. pegreffii*, alopáticamente figurada en el mar Adriático (Fig. 38).

Tres poblaciones tienen una distribución mixta: las costas atlántica y mediterránea españolas y el golfo de Cádiz. Se observa, asimismo, que los individuos de estas poblaciones se agrupan preferentemente en uno u otro *cluster*. Sólo un individuo híbrido  $\beta$ -TUB/ITS del golfo de Cádiz perteneciente al *cluster* 2 se agrupó con el *cluster* 1 (Fig. 38), mientras que los otros dos híbridos detectados con la  $\beta$ -TUB no presentaron introgresión en el *cluster*. Estos tres individuos con genotipo heterocigoto fueron asignados al grupo *A. pegreffii* (*cluster* 2).

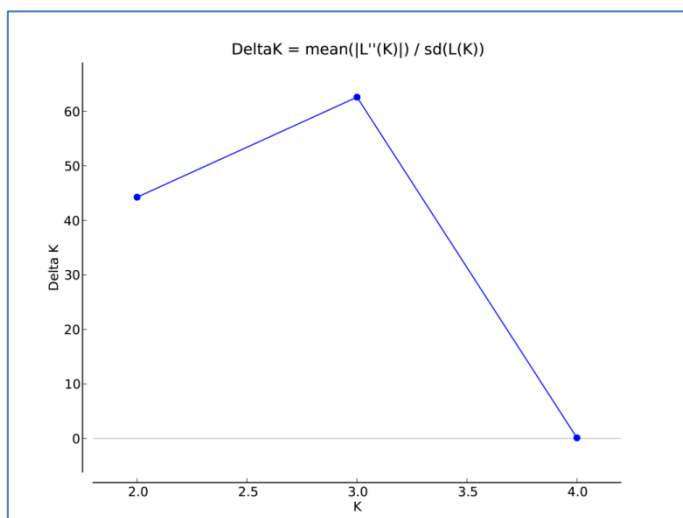
En cada *cluster*, el programa calculó el valor medio del coeficiente de endogamia  $F_{st}$ , siendo 0,86 en el primer *cluster*, y 0,55 en el segundo.

Se observaron 3 tipos de alelos dentro de los dos loci, aunque en el ITS hubo una mayor proporción de alelos mixtos.



**Fig. 38 Distribución del genoma de cada individuo cuando los *clusters* inferidos son 2 (K= 2). El ancho del color de las barras en el eje vertical define la proporción de afiliación (Q) al *cluster* 1 (rojo) o *cluster* 2 (verde).**

b) Cuando añadimos al programa las variaciones en la posición 451  $\beta$ -TUB se obtuvo una estructuración de la población dividida en 3 *clusters* ( $K= 3$ ). El test de Evanno nos proporcionó las mayores probabilidades de agrupación para la población  $K= 3$  (delta- $K= 62,59$ ), seguida de  $K= 2$  (44,25), siendo el resto de posibilidades próximas a 0 (Fig. 39)



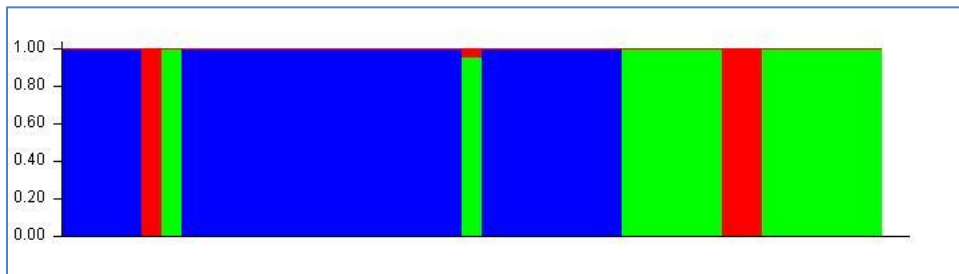
**Fig. 39 Probabilidad de asignación de poblaciones según el valor de Delta-k. El mayor valor se obtiene para  $K= 3$ , *clusters* de *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* e híbridos As/Ap.**

Los valores de afiliación de cada individuo a uno de los tres *clusters* para un valor de  $K= 3$ , son superiores a 0,993 en las cinco áreas geográficas estudiadas, excepto para el individuo de la costa atlántica española con alelos recombinantes en la posición TUB 451 (0,954). El *cluster* 1 fue el minoritario y tuvo una proporción de afiliación total de 0,076, donde se incluyeron a los híbridos As/Ap, el *cluster* 2 tuvo una proporción total de 0,31 y engloba a los individuos *A. simplex* s.s., representados de nuevo exclusivamente en la zona de Little Sole Bank,

mientras que el *cluster* 3 fue el mayoritario (0,68) y corresponde a la especie *A. pegreffii*, alopáticamente figurada en el mar Adriático (Fig. 40).

Los individuos de la costa atlántica española se distribuyen entre los *clusters* 2 y 3, mientras que los de la costa mediterránea española y el golfo de Cádiz se reparten entre los tres *clusters*.

En cada *cluster*, el programa calculó el valor medio del coeficiente de endogamia  $F_{st}$ , siendo 0,70 en el primer *cluster*, 0,80 en el segundo, y 0,89 en el tercero.

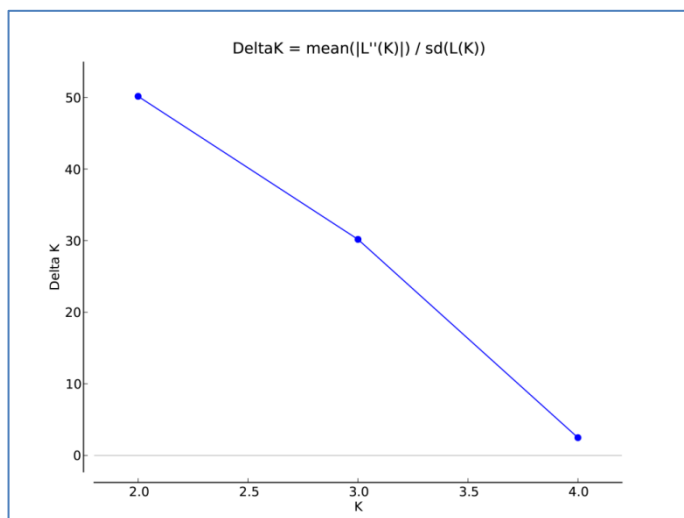


**Fig. 40** Distribución del genoma de cada individuo cuando los *clusters* inferidos son 3 ( $K=3$ ). El ancho del color de las barras en el eje vertical define la proporción de afiliación ( $Q$ ) al *cluster* 1 (rojo), *cluster* 2 (verde), o *cluster* 3 (azul).

c) En esta simulación, se tuvo en cuenta la variación de la posición 451, y se pre-definieron cinco poblaciones de acuerdo a las áreas geográficas correspondientes: 1 costa mediterránea española (SpMed), 2 mar Adriático (Adr), 3 costa atlántica española (SpAtl), 4 costa atlántico-mediterránea (golfo de Cádiz, Atl-Med), 5 Little Sole Bank (LSB).

El análisis bayesiano estructuró a los individuos en dos *clusters* ( $K=2$ ) con la mayor probabilidad ( $\Delta K=50,16$ ), seguida de  $K=3$  ( $\Delta K=30,17$ ), y  $K=4$  ( $\Delta K=2,48$ ), siendo el resto de posibilidades próximas a 0 (Fig. 41). Los valores

de afiliación de cada individuo a uno de los dos *clusters* para un valor de  $K= 2$ , son superiores a 0,995 en las cinco áreas geográficas estudiadas, menos en un individuo del golfo de Cádiz (0,971). El primer *cluster* 1 corresponde a la especie *A. pegreffii*, alopáticamente figurada en el mar Adriático (población Adr), y el *cluster* 2 engloba a los individuos *A. simplex* s.s., representados exclusivamente en la zona de Little Sole Bank (población LSB).



**Fig. 41 Probabilidad de asignación de poblaciones según el valor de Delta-k en la simulación c, que considera la posición  $\beta$ -TUB 451 y pre-define cinco poblaciones. El mayor valor se obtiene para  $k= 2$ , *clusters* de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*.**

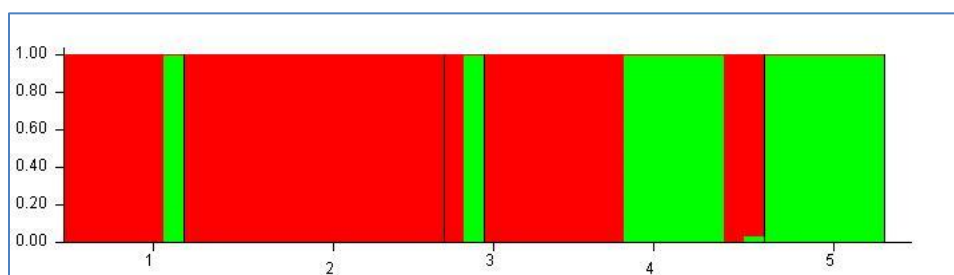
En este caso, se determinó la proporción de afiliación a cada *cluster*, de cada población pre-definida, que se recoge en la Tabla 17.

Población	Cluster 1	Cluster 2
<b>1 SpMed</b>	0,832	0,168
<b>2 Adr</b>	0,999	0,001
<b>3 SpAtl</b>	0,501	0,499
<b>4 Atl-Med</b>	0,640	0,360
<b>5 LSB</b>	0,002	0,998

**Tabla 17 Valores de afiliación (Q) para las cinco poblaciones pre-definidas a los *clusters* 1 y 2.**

Cuando se observan las proporciones de afiliación para cada individuo (Q), se obtienen resultados muy similares a los de la primera simulación (apartado a): los individuos de tres poblaciones, las costas atlántica y mediterránea españolas y el golfo de Cádiz, se distribuyen entre los 3 *clusters*; un individuo híbrido perteneciente al golfo de Cádiz presentó introgresión del *cluster* 1 en el *cluster* 2 (Fig. 42). Los tres individuos con genotipo heterocigoto se incluyeron en el grupo *A. pegreffii* (*cluster* 1, en este caso).

En cada *cluster*, el programa calculó el valor medio del coeficiente de endogamia  $F_{st}$ , siendo 0,55 en el primer *cluster*, y 0,80 en el segundo.



**Fig. 42 Distribución del genoma de cada individuo en los *clusters* inferidos (K= 2). La longitud del color de las barras en el eje vertical define la proporción de membresía (Q) al *cluster* 1 (rojo) o *cluster* 2 (verde). Los números indican las cinco poblaciones pre-definidas en el análisis: 1 SpMed, 2 Adr, 3 SpAtl, 4Atl-Med, 5 LSB.**



### **3. NewHybrids**

Todos los análisis llevados a cabo utilizando los genes  $\beta$ -TUB e IT mostraron resultados similares, tanto utilizando o no la posición TUB 451, y/o designando o no los individuos parentales. La mayoría de los individuos tuvieron una probabilidad posterior de 0,99 de pertenecer a una de las clases parentales puras: cuando se analizó la posición 451, se categorizaron como parentales 0 (Ap) los individuos del 13-24, y como parental 1 (As), del 29-37 (Tabla 18). Sin la posición 451 se obtuvieron los mismos resultados, excepto para las muestras 33 y 34 que se habían designado previamente como parentales.

Los análisis detectaron los tres individuos restantes (38, 39, 40, Tabla 18) como híbridos putativos en los tres modos programados. Estos individuos se clasificaron como F1 con una alta probabilidad posterior, mayor de 0,99.

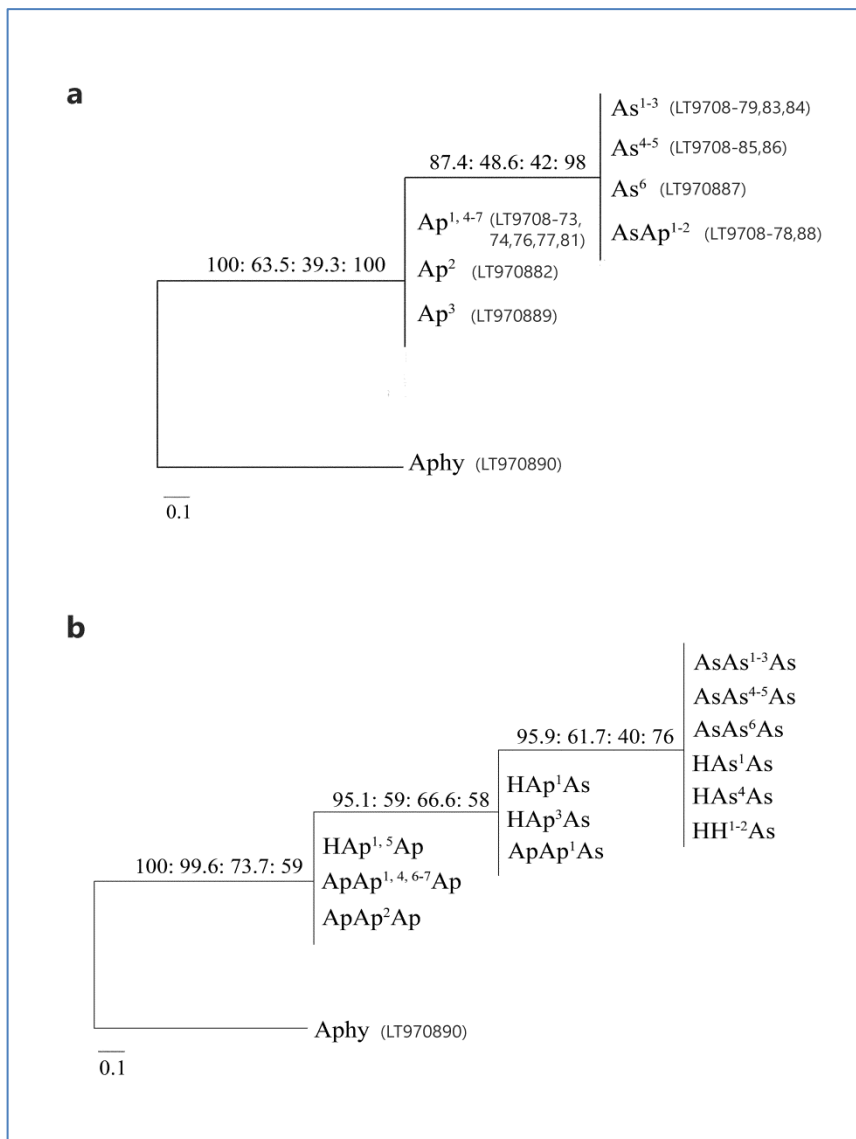
Individuos	Población	Ap 0	As 1	F1	F2	0_Bx	1_Bx
0	Adr	0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
1		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
2		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
3		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
4		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
5		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
6		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
7		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
8		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
9		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
10		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
11		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
12		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
13	Mo	0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
14		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
15		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
16		0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
17	SpMed	0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002	0,00000
18	Atl-Med	0,99980	0,00000	0,00000	0,00000	0,00020	0,00000
19		0,99980	0,00000	0,00000	0,00000	0,00020	0,00000
20		0,99980	0,00000	0,00000	0,00000	0,00020	0,00000
21		0,99980	0,00000	0,00000	0,00000	0,00020	0,00000
22		0,99980	0,00000	0,00000	0,00000	0,00020	0,00000
23		0,99980	0,00000	0,00000	0,00000	0,00020	0,00000
24		0,99980	0,00000	0,00000	0,00000	0,00020	0,00000
25	LSB	0,00000	0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002
26		0,00000	0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002
27		0,00000	0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002
28		0,00000	0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002
29	Mo	0,00000	0,99998	0,00000	0,00000	0,00000	0,00002
30	Atl-Med	0,00000	0,99978	0,00000	0,00000	0,00000	0,00022
31		0,00000	0,99978	0,00000	0,00000	0,00000	0,00022
32		0,00000	0,99978	0,00000	0,00000	0,00000	0,00022
33	LSB	0,00000	0,99991	0,00000	0,00000	0,00000	0,00009
34		0,00000	0,99991	0,00000	0,00000	0,00000	0,00009
35	Atl-Med	0,00000	0,99906	0,00000	0,00002	0,00000	0,00092
36		0,00000	0,99906	0,00000	0,00002	0,00000	0,00092
37	SpMed	0,00000	0,99995	0,00000	0,00000	0,00000	0,00005
38	Atl-Med	0,00000	0,00000	0,99930	0,00022	0,00016	0,00032
39		0,00000	0,00000	0,99930	0,00022	0,00016	0,00032
40	Mo	0,00000	0,00000	0,99930	0,00022	0,00016	0,00032

**Tabla 18 Probabilidades posteriores de cada individuo de pertenecer a las diferentes generaciones. Las categorías parentales fueron designadas como z= 0 los individuos del 0-12, *A. pegreffii* puros, y z= 1, del 25-28, *A. simplex* s.s. puros. Adr= mar Adriático, SpMed= costa mediterránea española, SpAtl= costa atlántica española, Atl-Med= costa atlántico-mediterránea, LSB= Little Sole Bank.**

#### 4. Árboles de distancias, ML y MP

La topología de los árboles  $\beta$ -TUB usando los métodos genéticos de distancias (UPGMA y NJ), análisis MP y ML fue muy similar. En los cuatro casos, se produjo separación entre los genotipos *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, mientras que los individuos heterocigotos (genotipo As/Ap) se unieron al grupo de *A. simplex* s.s. (Fig. 43a).

Cuando se consideraron los 3 genes, los individuos *A. pegreffii*  $\beta$ -TUB (incluyendo híbridos y *A. pegreffii* con el gen ITS) que contenían herencia materna de *A. simplex* s.s. (genotipos HApAs y ApApA) cayeron en una rama entre las dos muestras parentales puras (genotipos ApApAp and AsAsAs). Los individuos identificados como híbridos con el gen ITS cayeron en los 3 grupos, mientras que los híbridos con el gen  $\beta$ -TUB (genotipo HHAs) se agruparon con el genotipo puro *A. simplex* s.s. (Fig. 43b, Tabla 19).

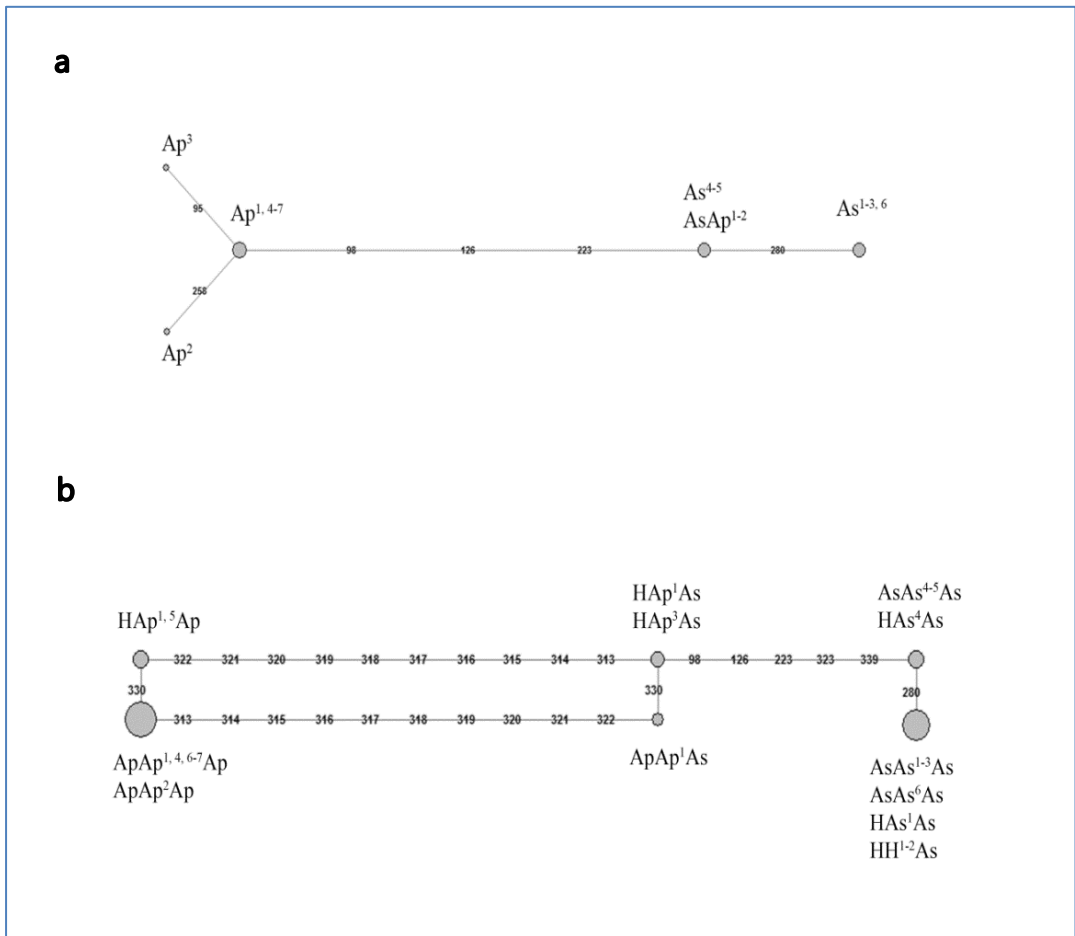


**Fig. 43 (a)** Árbol de Máxima-verosimilitud basado en el alineamiento de 317 pb de las secuencias del gen  $\beta$ -TUB. Se obtuvo la misma topología para los árboles MP, NJ y UPGMA. La nomenclatura usada es la misma que se utiliza en la Tabla 16, y los números en superíndice se refieren a los genotipos  $\beta$ -TUB (b) Árbol de Máxima-verosimilitud basado en el alineamiento de 317 pb de las secuencias del gen  $\beta$ -TUB y los patrones de variación de las posiciones de diagnóstico de los marcadores ITS1 y Cox-2. Los nombres de los códigos son los mismos que los usados en la Tabla 19, y se refieren al genotipo ITS, genotipo TUB (los polimorfismos se muestran con números superíndices), y haplotipo Cox en este orden. Se obtuvo la misma topología en los árboles MP, NJ y UPGMA. En ambas figuras, a) y b), los valores (%) de los nodos son valores de *bootstrap* para los árboles NJ y UPGMA, MP y ML, respectivamente.

## 5. Redes Median-joining

Los análisis genealógicos implementados mediante la red Median-joining de las secuencias  $\beta$ -TUB, mostraron una única red integrada por dos subpoblaciones. Los individuos híbridos (genotipos AsAp 1 y 2) se agruparon con la subpoblación *A. simplex* s.s. que apareció conectada a la subpoblación representada por *A. pegreffii* (Fig. 44a).

Por su parte, el análisis realizado con los tres genes combinados mostró también una única red constituida por 3 subpoblaciones distintas pero íntimamente relacionadas. Los individuos ApApAs y HApAs formaron el grupo intermedio conectado a los especímenes puros, ApApAp and AsAsAs. Los híbridos HHAs and HASAs se clasificaron en el grupo AsAsAs, sin embargo HApAp se agrupó con ApApAp (Fig. 44b, Tabla 19).



**Fig. 44** (a) Red Median-joining de las especies del complejo *A. simplex* s.l. construida a partir de los datos de las secuencias  $\beta$ -TUB de 317 pb. La nomenclatura usada es la misma que se utiliza en la Tabla 16, y los números en superíndice se refieren a los genotipos  $\beta$ -TUB. Los porcentajes de uniones y combinaciones posibles resultaron ser de 98 y 100%, respectivamente. (b) Red Median-joining de las especies del complejo *A. simplex* s.l. construida a partir de las secuencias ensambladas formadas por las secuencias de 317 pb  $\beta$ -TUB, y los patrones de variación de las posiciones de diagnóstico de los marcadores ITS1 y Cox-2. Los nombres de los códigos son los mismos que los usados en la Tabla 19, y se refieren al genotipo ITS, genotipo TUB (los polimorfismos se muestran con números superíndices), y haplotipo Cox en este orden. Se calcularon *links* y combinaciones de 100% en los dos casos. En ambas redes (a) and (b), cada nodo representa un único genotipo dentro de la población anisákida. El tamaño del nodo refleja la frecuencia, en números absolutos, de cada variante. La longitud del *link* representa la diferencia de nucleótidos entre los dos genotipos diferentes.

### **Técnica de genotipaje mediante RFLP de marcadores múltiples**

El genotipaje mediante RFLP con marcadores múltiples de **104 especímenes** considerando dos tipos de genes, los nucleares ITS y  $\beta$ -TUB, y el mitocondrial Cox-2, identificó 8 genotipos (Tabla 19). 37 especímenes se reconocieron como *A. pegreffii* (genotipo ApApAp) y 33 como *A. simplex* s.s. (genotipo AsAsAs), con la conformidad de los tres marcadores.

Se observó discordancia entre los marcadores nucleares y mitocondriales en tres larvas identificadas como *A. pegreffii* por los dos genes nucleares y como *A. simplex* s.s. por el mitocondrial (genotipo ApApAs). Tres especímenes mostraron características heterocigotas en ambos marcadores nucleares y ADNmt de *A. simplex* s.s. (genotipo HHAs). Cuatro híbridos ITS se identificaron como *A. pegreffii* por el marcador  $\beta$ -TUB, y *A. simplex* s.s. por el ADNmt (genotipo HApAs); mientras que existió concordancia entre los marcadores  $\beta$ -TUB y ADNmt en los otros (8 HAsAs y 15 HApAp). Un individuo procedente de la costa mediterránea española se identificó como *A. pegreffii* por el marcador ITS, *A. simplex* s.s. por el Cox2 mt e híbrido con el gen  $\beta$ -TUB (ApHAs).

Genotipo	Nº Individuos	Localización
<b>ITS-TUB-COX</b>		
<b>As As As</b>	33	6 LSB, 7 Atl-Med, 19 SpAtl, 1 SpMed
<b>Ap Ap As</b>	3	2 Adr, 1 Atl-Med
<b>Ap Ap Ap</b>	37	11 Adr, 9 SpMed, 13 Atl-Med, 4 SpAtl
<b>H As As</b>	8	6 Atl-Med, 2 SpAtl
<b>H Ap As</b>	4	3 Atl-Med, 1 SpAtl
<b>H Ap Ap</b>	15	14 Atl-Med, 1 SpAtl
<b>H H As</b>	3	2 Atl-Med, 1 SpMed
<b>Ap H As</b>	1	1 SpMed

Tabla 19 Genotipos detectados usando la herramienta multi-marcador con ITS,  $\beta$ -TUB y Cox2 en 104 individuos. Se designaron con una secuencia de tres abreviaturas correspondientes a los resultados de la PCR-RFLP con cada uno de los tres marcadores en este orden: ITS,  $\beta$ -TUB y Cox-2. As= *A. simplex* s.s., Ap= *A. pegreffii*, H= híbrido *A. simplex* s.s./*A. pegreffii*, SpAtl= costa atlántica española, Atl-Med= zona de confluencia atlántica-mediterránea, SpMed= costa mediterránea española, Adr= mar Adriático, LSB= Little Sole Bank. Los especímenes designados como AsAsAs y ApApAp se consideraron las especies parentales.



# DISCUSIÓN



## 1. Antiácidos y antihelmínticos

Las infecciones accidentales del tracto digestivo humano por anisákidos son consecuencia del efecto que ejerce la larva al fijarse y penetrar en las tónicas del tracto gastro-intestinal (GI), mediante un complejo mecanismo fisiopatológico (Audicana and Kenndy 2008). Se han propuesto varios tratamientos con el objetivo de evitar la intervención quirúrgica. Así, no pocos clínicos se han inclinado, en los casos gástricos y no complicados, por el tratamiento con los inhibidores de la bomba de protones para disminuir la inflamación y con ello la epigastralgia (Nakata et al. 1980; Cocheton et al. 1991; Henríquez-Santana and Villafruela-Cives and Henríquez-Santana 2010; De la Fuente et al. 2013), a lo que se une la observación de que el desarrollo de la larva está favorecido por el pH ácido del medio (Iglesias et al. 2001). Por otra parte se ha relacionado una edad superior a 60 años con una menor incidencia de casos de anisakiasis, circunstancia que podría estar justificada por el aumento de pH gástrico en estas edades, aunque no se han encontrado estudios recientes que apoyen esta teoría (Muraoka et al. 1996; Monroy Gómez et al. 2014). Teniendo en cuenta estas premisas, hemos intentado conocer si estos fármacos podrían tener una acción desfavorable para la permanencia de las larvas en el tracto GI, si bien los resultados obtenidos mostraron la ausencia de efecto larvicida *in vitro* de estos fármacos. Además, dichos resultados muestran porcentajes de lesiones elevados al tratar a los animales infectados con **una sola dosis** de omeprazol, ranitidina y sucralfato, alcanzándose en el caso de **omeprazol** el 75%, sin diferencias estadísticamente significativas con respecto al lote control ( $p=0,108$ ), y de 65% para el **sucralfato**; éste último dato fue ligeramente significativo ( $p=0,024$ ). Al comparar los resultados entre ellos podemos decir que la **ranitidina** propició unas condiciones del medio gástrico menos favorables para el parásito, encontrando un menor porcentaje de larvas en la luz del estómago cuando se administró una dosis de

este medicamento (21,7%) que en los animales control (41,7%), sin aparición de lesiones múltiples. Con respecto a los animales tratados con sucralfato, el elevado porcentaje de larvas en la luz del estómago podría haber provocado, en cierto modo, el mayor número de lesiones gástricas (65%); esto podría explicarse debido al característico efecto muco-adhesivo del sucralfato, el cual forma complejos con proteínas tisulares y con el moco gástrico (Medlineplus, sucralfato). En el caso de los animales tratados con omeprazol, éstos tuvieron similar pH gástrico (de 5) y larvas en la luz del estómago (28,3%, ligeramente superior) que aquellos a los que se administró ranitidina; sin embargo, el porcentaje de animales con lesiones fue mayor (70% versus 35%), así como el número de éstas, siendo algo más abundantes las lesiones de mayor tamaño (>3mm) y las de tamaño  $3 \geq x > 1$  mm, pero menores que las ocurridas en los controles (Tabla 3, Fig. 20).

El **TLD** (Tratamiento de larga duración) resultó en una ligera disminución del porcentaje de animales con lesión respecto a una sola dosis de **omeprazol** y **ranitidina**; de hecho, la reducción en la ocurrencia de lesiones fue estadísticamente significativa respecto al control ( $p=0,005$  y  $p=0,003$ , respectivamente), y también se redujo el tamaño de las lesiones, principalmente con el omeprazol. El caso del **sucralfato** el TLD fue particular, ya que los animales presentaron, al igual que con una dosis, un elevado porcentaje de larvas en la luz gástrica (67,5%); esta permanencia en el estómago habría facilitado la fijación de un mayor número de larvas a la mucosa (48,2%), aunque la viscosidad del fármaco pudo dificultar su penetración en capas más profundas, conduciendo a un mayor porcentaje de lesiones más superficiales de tipo puntual (80%) (Tabla 3, Fig. 20). En general, el tratamiento farmacológico con omeprazol, ranitidina o sucralfato aplicado en el estudio provocó modificaciones en la prevalencia de lesiones GI en los animales respecto al estudio control. Los TLD con omeprazol y ranitidina dieron lugar a una menor ocurrencia de lesiones, pero sin influir en el tamaño e inflamación de las mismas una vez la larva adherida a la mucosa.

En el caso de los **antihelmínticos**, aunque se han prescrito algunos de ellos frente a la anisakiasis humana, los resultados descritos por diversos autores son contradictorios (Fraj-Lazaro et al. 1998; Castán et al. 2002; Ponferrada et al. 2005; Field-Cortazares and Calderón-Campos 2009). En este trabajo, solo el tratamiento con mebendazol y no con flubendazol resultó significativo en la reducción de animales infectados (35% y 60%;  $p= 0,003$  y  $p= 0,086$ , respectivamente); la eficacia pudo haberse reducido debido a que algunas larvas pudieron ocultarse entre los pliegues internos de la mucosa, escapando al efecto antihelmíntico. En cuanto al tamaño de las lesiones provocadas por las larvas, más del 50% tuvo un tamaño superior a 3 mm en ambos tratamientos; según estos datos, el tamaño de las lesiones podría estar influenciado tanto por la capacidad inmunológica del hospedador como por el potencial infectivo del parásito. El albendazol ha sido uno de los antihelmínticos más prescritos frente a la anisakiasis (Moore et al. 2002; Nawa et al. 2005; Pacios et al. 2005; Kim et al. 2006b; Kim et al. 2013; Filauro et al. 2011; Pontone et al. 2012; Carlin et al. 2018); sin embargo nuestras experiencias llevadas a cabo con otro antihelmíntico, mebendazol, en ratas Wistar infectadas y tratadas con dicho fármaco, muestran un porcentaje de lesiones del 35%, inferior al encontrado en experiencias anteriores realizadas por este mismo grupo de trabajo con el albendazol (Romero et al. 2014), en las que el porcentaje de lesiones fue del 46,7%.

Aunque no se han identificado las especies de L3 de *Anisakis* tipo I responsables de las lesiones, las infecciones se han realizado con L3 de peces del norte de España (Ondarroa), donde la proporción de *A. pegreffii* y *A. simplex* s.s. es de 8% y 90,7%, respectivamente (Molina-Fernández et al. 2018); dado que para *A. simplex* s.s. se ha indicado una mayor capacidad infectiva (Romero et al. 2013; Arcos et al. 2014), las larvas empleadas en el estudio tendrían un alto potencial de infección.

El examen histológico del estómago lesionado de las ratas no mostró diferencias entre las alteraciones histológicas de las muestras de los animales tratados y las de aquellos que no recibieron tratamiento farmacológico (Fig. 21). Los daños descritos concuerdan con los observados en la infección temprana por casi la totalidad de los autores (Jones et al. 1990; Boureé et al. 1995; Field-Cortazares and Calderón-Campos 2009; Baron et al. 2014; Bušelić et al. 2018b). Con frecuencia se encontró la larva alojada en las tunicas del estómago, entre la mucosa y submucosa gástricas formando una lesión en forma de túnel (Fig. 22b). En este caso, se podría hipotetizar que permaneciese allí dentro, provocando una infección crónica, con muerte de la larva, formación de granuloma alrededor y necrosis del tejido (Oshima 1972; Jones et al. 1990; Boureé et al. 1995; Field-Cortazares and Calderón-Campos 2009; Bušelić et al. 2018b). Con relación a la preferencia de las larvas por la región glandular del estómago, se podría argumentar que en nuestro caso la fijación de las larvas ha podido verse favorecida por la menor resistencia del epitelio de la mucosa en esta área (tejido epitelial de revestimiento simple), y las invaginaciones propias de la estructura de las glándulas gástricas.

## **2. Enzimas proteolíticas**

Papaína y bromelaína son proteinasas de cisteína de la familia C1 de las peptidasas, que actúan en las plantas como freno de agentes patógenos mediante la actividad proteolítica (Salas et al. 2008). Presentan múltiples aplicaciones clínicas e industriales, con un perfil de seguridad elevado por prolongados períodos de tiempo (Luoga et al. 2015).

En el ensayo con **papaína** a la concentración de 25 mg/ml, el efecto biocida fue del 100%, mientras que en las mismas condiciones, la actividad larvicida de la **bromelaina** fue mucho menor (39,6%) y estadísticamente significativa a todos los tiempo observados. Aunque ambos productos tuvieron una eficacia significativa respecto al control entre 4-48 h de observación.

Respecto a los resultados obtenidos con la papaína *in vitro*, a las concentraciones de 50 y 25 mg/ml, ésta posee una actividad relativamente alta desde el inicio de las experiencias que va incrementándose hasta conseguir el 100% a las 48 h. A la dosis de 2,5 mg/ml se alcanzó el 91,7% a las 48 h, sin diferencias significativas en la eficacia respecto a las concentraciones anteriores (Fig. 23). El producto de su actuación es interesante, ya que provoca una desestructuración y fragmentación de las larvas, que, de este modo, van perdiendo movilidad hasta su muerte (Fig. 24). Se ha considerado el criterio de fragmentación para la determinación de su inviabilidad debido a que es obvio pensar que las larvas en este estado son potencialmente inactivas (Kroeger et al. 2018).

La actuación de la papaína sobre la L3 de *Anisakis* parece ir más allá de lo descrito por Stepek et al. (2007a), en su estudio de extractos que contenían varias cisteín-proteinasas sobre el nematodo del estómago de ratón *Protospirura muricola*. Estos autores describieron una pérdida de movilidad, así como la abrasión en varios puntos de la superficie del nematodo, que con el tiempo provocó ampollas cuya explosión permitió la salida de las estructuras internas del parásito. Este efecto fue tiempo-dependiente, por lo que el proceso de fragmentación que observamos en un alto número de larvas de *Anisakis* pudo deberse a la mayor duración de exposición, dado que nuestra primera observación se realizó a las 4 h del inicio del ensayo, mientras que estos autores indicaron un tiempo total de 2 h, tiempo en el cual la inactivación de los parásitos no fue del

100% pero sí bastante significativa. En ambos casos se produjo un progresivo daño cuticular, por lo que la diversa composición de la cutícula entre ambos nematodos, muy gruesa en *P. muricola*, podría ser una diferencia que conferiría una mayor resistencia frente a la papaína a este parásito de rata.

La digestión de las proteínas cuticulares también ha sido referida en otros nematodos GI parásitos, como *Heligmosomoides polygyrus*, en ensayos *in vitro* de papaína 25  $\mu\text{M}$  y bromelaína del tallo de la piña 100  $\mu\text{M}$ , ambas concentraciones de enzima activa; la primera enzima provocó el inicio de signos de daños cuticulares y de pérdida de movilidad a los 15 min, mientras que la segunda mostró daño cuticular a los 15 min si bien la reducción de la movilidad comenzó a los 45 min. Estos autores señalaron una aparición inicial de pliegues y arrugas en la cutícula, a la que continuó la disolución de la misma y desprendimiento de las estructuras internas, indicando que la rápida pérdida de movilidad de estos nematodos incubados con estas proteinasas ocurre siempre y cuando la cutícula protectora sea dañada, la cual consta en gran parte de colágenos entrecruzados por puentes disulfuro, pero se desconoce el resto de proteínas constituyentes comunes en los nematodos de distintas especies; este mecanismo difiere del resto de drogas antihelmínticas conocidas (Steppek et al. 2005, 2007b).

Si consideramos la eficacia larvicida de la *bromelaína* en nuestro estudio, ésta ha dado lugar a la inviabilidad de menos del 50% de las larvas; sin embargo, al igual que la anterior, el efecto anisakicida ocurre con fragmentación y desintegración cuticular mediante la digestión de los tejidos. Otros autores también encontraron un comienzo de acción de esta proteínasa a los 30-40 min a dosis de 200-4000  $\mu\text{M}$  de enzima activa sobre el nematodo GI *Heligmosomoides bakeri* (Luoga et al. 2015).



La diferencia de eficacia hallada en la actividad larvicida de las dos enzimas papaína y bromelaína, ensayadas a las mismas concentraciones, podría residir en las moléculas diana de la cutícula de los parásitos; así, estas proteinasas tendrían diferente especificidad de sustrato y por tanto, se unirían con mayor o menor restricción a las secuencias peptídicas de las proteínas de la cutícula, con el fin de hidrolizar a un mayor o menor número de uniones (Luoga et al. 2015).

En lo que respecta a los ensayos *in vivo*, las pruebas preliminares fueron indicativas de la baja eficacia de las enzimas proteolíticas, en concreto de la papaína, en este modelo experimental, sin resultados significativos respecto al control ( $p=0,99$ ). Esto limitó nuestro estudio, en el cual las larvas recogidas de la necropsia no presentaron los daños estructurales mostrados en las pruebas *in vitro*. Por otro lado, papaína, como otras enzimas de su grupo, es inestable a pH ácido, así que en nuestro estudio donde los animales tenían un pH gástrico de 4 pudo existir este obstáculo. En este sentido, ciertos autores señalaron que la bromelaína retenía su actividad en el tracto GI de ratones cuando se administraba junto a un antiácido, por lo que, aunque es difícil comparar la dosis administrada, otros estudios previos reportaron un incremento de la eficacia frente al nematodo estomacal *P. muricola* cuando las enzimas se combinaron con cimetidina (Stepek et al. 2007a).

Un estudio con papaína purificada (124 nmol) sobre el nematodo *H. polygyrus*, que coloniza el lumen intestinal, sólo mostró un 14% de eficacia antihelmíntica. Además, estos autores indicaron que el contacto directo con el parásito es esencial para la actividad, siendo las cisteín-proteinasas ineficaces sobre especies y estadios de desarrollo de parásitos presentes en la mucosa (Stepek et al. 2007b). Este hecho también podría ocurrir en la anisakiasis, donde las larvas se refugiarían en la mucosa GI y en sus pliegues, escapando al efecto del tratamiento.

Un factor a tener en cuenta en estos ensayos de actividad es el estado físico en que se encuentran las larvas en el momento de su aislamiento, lo cual puede originar algunas variaciones en los resultados obtenidos y en la comparación con otros estudios realizados, debido a su mayor o menor resistencia frente al producto. Aunque se han seleccionado aquellas larvas de más de 2 cm de longitud y con buena movilidad, se ha observado una relativa menor eficacia de los compuestos cuando las dimensiones de las larvas son superiores.

### **3. *Punica granatum***

En la medicina moderna, los metabolitos de *P. granatum* se han utilizado en una amplia variedad de tratamientos farmacológicos. Estos constituyentes químicos se han identificado y aislado en distintas partes de la planta, siendo los principales: punicalagina, ácidos gálico y elágico, luteolina, quercetina, kaempferol, elagitaninos, antocianinas (delfinidina, cianidina y pelargonidina), y glicósidos de ácido elágico, varios ácidos grasos, triterpenos y taninos flavonoides (Jasuja et al. 2012).

Los resultados obtenidos con el fruto de *P. granatum* (zumo y extracto de los arilos, con o sin extracto de la piel), revelan una limitada eficacia antihelmíntica frente a las L3 de *Anisakis*. Al término de las experiencias (48 h), sólo los extractos de arilos y pericarpio congelado y de arilos fresco presentaron eficacia contrastada respecto al control, por lo que las muestras frescas y congeladas ejercieron una actividad inconsistentemente diferente. El extracto del zumo, semillas y pericarpio preparado en el laboratorio provocó mayor alteración de la integridad de las larvas que el extracto de los arilos solo; este efecto se observó en el primer tiempo de exposición a las 24 h. Podría ocurrir que cuando se utilizaron varias fracciones de la planta, sus constituyentes actuaran de forma sinérgica. De hecho, tanto el zumo, las semillas y el pericarpio son ricos en ácidos grasos (ácido punícico) y

compuestos fenólicos con conocida acción antioxidante, principalmente en elagitaninos (punicalagina y punicalina), ácidos gálico y elágico, antocianinas como cianidina, y flavonoides como catequina y quercetina (Jasuja et al. 2012). Algunos autores han señalado las punicalaginas como las moléculas más eficaces de la granada en relación con sus propiedades antimicrobianas, con un amplio espectro de acción, como por ejemplo en cepas multi-resistentes del tracto urinario (Dell'Agli et al. 2009; Endo et al. 2010); además, las punicalaginas han ejercido actividad antifúngica frente a *Candida* sp. (El-Sherbini et al. 2010). El extracto del pericarpio provocó la inactivación de los virus del herpes simple-2, y de la hepatitis-B *in vitro*, mediante inhibición de la ADN polimerasa; así mismo, varios polifenoles de la granada mostraron eficacia sobre el virus de la influenza, principalmente la punicalagina (Jasuja et al. 2012). El pericarpio también se utilizó en el estudio de la actividad antihelmíntica *in vitro* sobre *Aporrectodea caliginosa*, donde los nematodos adultos morían a los 16 min de exposición (Dhkill 2013); en este caso los autores utilizaron un extracto metanólico.

El zumo de granada embotellado no produjo ningún cambio en la movilidad y morfología de los parásitos. Por tanto, a pesar de tener capacidad antioxidante y reducir la lipoperoxidación gracias a su contenido en polifenoles (Jasuja et al. 2012), este producto no tiene efecto anisakícida. Quizás sus efectos podrían tener utilidad en la prevención del cáncer GI, teniendo en cuenta que tanto el zumo, la piel y la semilla del fruto poseen actividades inmuno-estimulantes, anti-inflamatorias y anti-cancerosas, tal y como ha podido observarse en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Lansky et al. 2007).

## 4. Aceites esenciales

Durante años se ha señalado a los aceites esenciales como importantes antimicrobianos de origen vegetal, empleados en la conservación de alimentos.

Algunos de ellos podrían representar una estrategia eficiente para desvitalizar las larvas, aunque sin eliminar el riesgo en pacientes alérgicos debido a larvas muertas, y constituir una alternativa a la elevada duración de los procesos de marinado tradicionales y de congelación del pescado, el cual afecta a las características organolépticas del mismo (Trabelsi et al. 2018). En cambio, diversos aceites aromatizados con extractos de plantas como el comino y el tomillo han aprobado las evaluaciones de sensorialidad en estudios de marinado frente al parásito (Trabelsi et al. 2018).

Cabe señalar que los siete aceites esenciales testados en nuestras experiencias con aceite de oliva parecen promover, de alguna manera, la salida de las L3 presentes en la musculatura del pescado, de tal forma que un alto porcentaje abandonaron esta localización para **migrar al contenido del recipiente**; los valores alcanzados son  $\geq$  al 70% en el caso de los AEs de espliego, cantueso, mejorana, comino, y romero, e inferiores para el de orégano (60,8%) (Tabla 9, Fig. 26). Este hecho no está exento de interés, puesto que la musculatura es la parte del pescado que ingiere el hombre y por tanto, la menor presencia de parásitos en ella disminuiría el riesgo de contraer esta enfermedad. Una hipótesis es que las larvas salieron del músculo repudiadas por el aroma que desprenden los AEs. Es posible que las larvas sintieran menos rechazo a la exposición al AE de romero, debido a una composición menos concentrada en activos. Mientras que la menor migración cuando se sometieron al AE de orégano, pudo deberse a que las larvas perdieron movilidad más rápidamente dentro del músculo.

En este proceso se produce la muerte de un determinado número de larvas presentes en el pez, o la **pérdida espontánea de movilidad** al ponerse en contacto con los aceites testados. Así, en las larvas que permanecieron vivas se observó una disminución del movimiento espontáneo (L3 vivas Es), que fue máxima (65,8%) para las larvas tratadas con el AE de comino, mínima (12,3%) para

el de cantueso, y nula para la mejorana y el romero; resultados intermedios se obtuvieron con el del tomillo (53,4%), espliego (31,7%) y orégano (31,4%).

Respecto a la **actividad larvicida**, los AEs que tuvieron una actuación más eficaz frente a las larvas de *Anisakis* fueron el de comino y orégano, con los que sólo un 13,9% y 14,7% de las larvas, respectivamente, exhibieron un movimiento espontáneo (L3 vivas SEs); los buenos resultados obtenidos con estos dos AEs se encuentran en consonancia con los descritos por Valero et al (2006), aunque este estudio se llevó a cabo en otras condiciones de trabajo. El análisis GC-MS de AE de **comino** reveló la presencia de sus principales componentes: cuminaldehído (34,1%), 2 - caren - 10 - al (20,8%), *p*- cimeno (12,3%) y 3 - caren - 10 - al (11,8%); en el aceite de **orégano** se detectó carvacrol en una proporción alta (88,4%), mientras el *p*-cimeno (3,3%) y aromadendreno (2,4%) se encontraron en baja proporción (Tabla 8). Estos compuestos han sido identificados en otros estudios de ambos AEs, mostrando actividad inhibitoria frente a ciertos agentes patógenos (Martinez-Velazquez et al. 2011; Dussault et al. 2014; Kedia et al. 2014; Fournomiti et al. 2015). En otro estudio, el aceite especiado con comino provocó la muerte de las larvas de *Anisakis* en el interior del pescado después de cinco días de marinado (Trabelsi et al. 2018). El perfil químico del aceite esencial de una especie de planta en particular presenta diferentes variaciones quimiotípicas debido a las condiciones geográficas y ecológicas, edad de la planta y tiempo de cosecha (Prakash et al. 2010). Tales variaciones quimiotípicas podrían afectar de algún modo la actividad biológica del aceite esencial (Kedia et al. 2014). El AE de **tomillo** exhibió menos actividad anti-*Anisakis*: sólo logró la muerte del 11,4% de larvas, pero un alto porcentaje de las larvas (53,4%) necesitó estímulo para moverse. Para el AE de tomillo a la misma concentración (5%), Giarratana et al. (2014) indicaron una mortalidad del 100% después de 14 h de tratamiento; esta diferencia en la actividad larvicida podría deberse a las condiciones del experimento y a la

composición del aceite esencial utilizado por estos autores [timol (50%), linalol (7%), carvacrol (3%), a-pineno y b-pineno (6%)], en comparación con el AE de tomillo empleado por nuestro grupo [timol (76,3%), p-cimeno (17,7%), carvacrol (2,4%) y linalol (1,4%)]. Los monoterpenos fenólicos isoméricos, timol y carvacrol se comportaron como los constituyentes más activos, los cuales son responsables de una extensa actividad antimicrobiana y antihelmíntica, incluso su actividad anisakícida era ya conocida (Hierro et al. 2004; Di Pasqua et al. 2005; Fournomiti et al. 2015; Trailović et al. 2015; López et al. 2018). El resto de los AEs no mostraron actividad biocida contra las L3s.

Nuestros resultados refieren diferentes tasas de movilidad y mortalidad de las larvas del recipiente y de la musculatura, mostrando mayor pérdida de movilidad aquellas que migraron al recipiente; esto sería una consecuencia, posiblemente, de una mayor acción antiparasitaria del AE cuando las larvas se encuentran libres en contacto directo con el marinado. En otros estudios de marinado se ha señalado que la localización de las larvas bajo la musculatura del pescado podría prevenir una penetración rápida de aceite, ácido acético y sal, y, por tanto, de un acción anisakícida dependiente de la química del compuesto, ofreciendo el músculo del pescado una protección natural a los parásitos (Sánchez-Monsálvez et al. 2005; Trabelsi et al. 2018).

Por lo que respecta a los ensayos *in vivo*, la actuación de los AEs de orégano, comino y cantueso sobre las L3 presentes en la musculatura del pescado fue tal, que dichas larvas no causaron ninguna lesión en el aparato digestivo de los animales (Tabla 10). La actividad antimicrobiana de los AEs está relacionada con su composición química, en la cual existe un predominio de derivados terpénicos (mono- y sesquiterpenos). En relación con su mecanismo de acción, el cual no se conoce completamente, es probable que en la mayoría implique ruptura de las membranas celulares, aumentando su permeabilidad y desestabilizando

actividades enzimáticas y respiratorias (Cowan 1999; Burt 2004; Bakkali et al. 2008). La adición de grupos metilo provoca una disminución en la hidrofobicidad de ciertos terpenos, reduciendo su actividad antimicrobiana (Mendoza et al. 1997; Usano Alemany 2012). Además, se sabe que el componente principal del AE de orégano, carvacrol (88,4%), interactúa con la membrana celular de algunos organismos y se disuelve en la bicapa de fosfolípidos; como consecuencia de la distorsión de la estructura física se produce la expansión de la membrana, provocando un aumento de la permeabilidad (García-García and Palou-García 2008). Algunos autores han revelado otro modo de acción de timol y carvacrol, principalmente de este último, una actividad inhibitoria sobre la enzima acetilcolinesterasa, que disminuiría la función neuromuscular del parásito (Jukic et al. 2007; López et al. 2018). En otro trabajo, carvacrol y 1,8-cineol (De Sousa et al. 2015), solos o en combinación, afectaron seriamente a la viabilidad de las bacterias debido a cambios drásticos en la permeabilidad de la membrana celular.

En el caso del AE de **comino**, la actividad de su componente principal, cuminaldehído, frente a diversos agentes patógenos que incluyen la L3 de *Anisakis*, ha sido descrita, aunque la forma exacta en que actúa es aún desconocida (Hierro et al. 2004; Yeom et al. 2012).

Con respecto a la acción del AE del **cantueso**, debemos señalar que, aunque no mostró acción larvicida *in vitro*, en los ensayos *in vivo* no se observaron lesiones en los animales infectados con larvas tratadas con este AE. La composición química de este aceite fue: fenchona (48,7%), alcanfor (40%) y 1,8-cineol (5,2%), por lo que dicho AE podría considerarse un quimiotipo alcanfor-fenchona, de acuerdo con Granger et al. (1973). Teniendo en cuenta la alta cantidad de fenchona detectada en nuestro AE, la diferencia de actividad entre los ensayos *in vitro* e *in vivo* para este AE puede estar relacionada con una posible conversión, facilitada por el pH gástrico, de fenchona en su derivado alcohólico, fenchol, un

compuesto que ha demostrado ser eficaz contra bacterias G+ y G-, así como contra diversos hongos (Kotan et al. 2007; Guleria et al. 2013).

También debe destacarse que en el caso de las larvas tratado con el AE de **mejorana**, aunque se encontró una larva en la cavidad corporal del animal, no había signos visibles de lesiones en el tracto digestivo. Esto nos lleva a especular que este AE, cuyo componente principal es 1,8-cineol (68,1%), podría haber favorecido la reabsorción de la hemorragia. Esto se debería a la actividad antiinflamatoria del 1,8-cineol que, de acuerdo con los resultados obtenidos por Abu-Darwish et al. (2013) ejerce un efecto antiinflamatorio a través de un mecanismo que implica la inhibición de la producción de óxido nítrico inducida por el lipopolisacárido.

## 5. Saponinas

Las saponinas son compuestos glucósidos cuya estructura química se compone de un núcleo soluble en grasa llamado aglicona o genina, que puede ser un esteroide (C-27) o un triterpenoide (C-30); tienen la capacidad de unirse a los esteroides de las membranas celulares, alterando la permeabilidad de las mismas y desorganizando su función (Hassan 2008). Nuestros ensayos se llevaron a cabo utilizando geninas libres de azúcar (sapogeninas), diosgenina y sarsapogenina, las cuales pertenecen al grupo de los esteroides, y ácido glicirretínico, de tipo triterpenoide.

En las experiencias de actividad biológica de las saponinas ensayadas, se observó que la **diosgenina**, a la dosis de 5 mg/kg fue la que presentó mayor actividad frente a *Anisakis*, ya que fue capaz de reducir el número de lesiones en los roedores en un 90% respecto al control; por ello, el análisis univalente muestra asociación entre el tratamiento de los animales con dicha saponina y la ausencia



de lesiones ( $p < 0,001$ ). Esta misma asociación se encontró para la variable fijación y/o penetración en la cavidad abdominal.

La infiltración de células del sistema inmune observada en el estudio histológico de las ratas tratadas y la menor respuesta inflamatoria ante la agresión del parásito, podría ser debida, al menos en parte, al efecto modulador de la respuesta inmunológica y a la actividad antiinflamatoria de la diosgenina (Lee et al. 2010; Jesus et al. 2016).

Respecto al tratamiento con la **sarsasapogenina** y **ácido glicirretínico** a dosis de 5 mg/kg, si bien ambas reducen el número de lesiones frente al control en un 40% y 50%, respectivamente, hay que indicar sólo en el caso del ácido glicirretínico hubo asociación con las variables estudiadas ("ausencia de lesión"  $p < 0,008$  y "no fijación o penetración en cavidad corporal"  $p < 0,001$ ). Sin embargo, la administración de estos productos a dosis mayores, (sarsasapogenina a 61,25 mg/kg y ácido glicirretínico a 153,13 mg/kg), redujo 2,4 y 1,7 veces la aparición de lesiones observada cuando se administró la dosis menor (5 mg/kg), y 2,4 y 2,3 veces, respectivamente, la capacidad de la larva para fijarse o penetrar el tracto GI; en todos los casos, los factores asociados a estas variables adquieren significación. En cuanto a la eficacia gastroprotectora de la sarsasapogenina, podría estar relacionada, al menos en parte, con su estructura de espirostano, tal como indicaron Matsuda et al. (2003) en su estudio del efecto de varias saponinas sobre mucosa gástrica dañada por indometacina y alcohol. El ácido glicirretínico ha sido objeto de uso en terapéutica debido a su efecto protector de la mucosa gástrica, mediante el aumento de la secreción y la viscosidad del moco gástrico, así como a su actividad antiinflamatoria, por reducción de las enzimas degradantes de los corticoesteroides (Bruneton 2001).

Otros datos a tener en cuenta son: la localización de las lesiones que en todos los lotes de animales fueron predominante gástricas (91,7%) y en menor

porcentaje intestinales (8,3%), datos coincidentes con los aportados por otros autores (Romero et al. 2012); un hecho parecido se indica en el hombre (Zuloaga et al. 2004; Hernández-Prera and Polydorides 2012; Shimamura et al. 2016b). También hay que tener en cuenta la localización de *Anisakis* en la cavidad abdominal de los roedores, no coincidente con el número de lesiones observadas en la pared del tracto digestivo; este hecho pudiera deberse a la fijación y posterior penetración en dicha cavidad de una primera larva y la posterior fijación de una segunda a la úlcera ya formada; así, en una rata se observaron dos larvas fijadas a la misma úlcera. Los datos de esta hipótesis son compatibles con lo que ocurre con la frecuencia en el estómago de los hospedadores definitivos del parásito, donde un gran número de *Anisakis* se fija a la misma zona ulcerada (Young and Lowe 1969; Smith and Wootten 1978; Smith 1989; Hojgaard 1999), así como con las observaciones en un paciente con anisakiasis gastroalérgica (Daschner et al. 2000a). Contrariamente, la detección de lesiones en el animal sin el hallazgo de larvas fijadas a ellas, podría atribuirse a la liberación de la larva una vez originado el daño; así, en los resultados presentados, se señala la presencia en la luz gástrica de una larva provista de un prominente capuchón; esta estructura podría ser indicativa de la fijación a la pared GI y posterior liberación de la citada larva (Bier and Raybourne 1988). Por otro lado, las lesiones observadas al administrar diosgenina y sarsapogenina, a la dosis mayor, consistieron, en todos los casos, en túneles en los cuales estaba alojada la larva; dichos túneles iban acompañados de escasa hemorragia (Fig. 28b). Sin embargo, en los animales control, en todos los casos se observaron úlceras rodeadas de un halo hemorrágico, en general de gran intensidad (Fig. 28a). En estos animales, la especie larvaria que se adhirió y/o atravesó su estómago fue principalmente (72,2%) *A. simplex* s.s., y el resto de lesiones (5/18) fueron causadas por su especie hermana *A. pegreffii*. En los animales tratados con diosgenina, en cambio, todas las larvas responsables del daño estomacal se identificaron como *A. simplex* s.s.

(2/2). Incluso aunque ambas especies están implicadas en la patología de la anisakiasis (Umehara et al. 2007; Mattiucci et al. 2013; Mladineo et al. 2016), nuestros resultados muestran una mayor incidencia de penetración de la mucosa gástrica por *A. simplex* s.s. en los animales de experimentación estudiados. Tales resultados han sido previamente demostrados en otros ensayos de patogenicidad GI causada por estas especies de anisákidos (Suzuki et al. 2010; Romero et al. 2013). Sin embargo, una proporción similar de ambas especies de *Anisakis*, 50% para *A. pegreffii* y 40,6% para *A. simplex* s.s., estaba alojada libremente en el tracto digestivo de los animales empleados.

## 6. Epidemiología en la infección de la bacaladilla en el golfo de Cádiz

El golfo de Cádiz es un lugar de gran interés ecológico, debido a la confluencia de las aguas mediterráneas y atlánticas, cálidas y frías respectivamente, situado en la costa sureste de la Península Ibérica. Numerosas especies de mamíferos marinos que viven o transitan por esta zona pueden actuar como hospedadores definitivos de *Anisakis* spp. (Raga and Pantoja 2004; Mattiuci and Nascetti 2008); esta densidad de mamíferos marinos se puede explicar por la presencia de masas de agua fría, acompañadas de fuertes vientos en esta zona, que provocan el fenómeno de afloramiento de aguas profundas, ricas en nutrientes y zooplacton disponibles de este modo para su alimentación (Molina Fernández 2018), y repercute en la parasitación de los peces que actúan como hospedadores intermediarios o paraténicos. En este estudio hemos encontrado en *Micromesistius poutassou*, un pescado muy consumido en el sur de Europa, una **prevalencia de parasitación total** por *A. simplex* s.l. del 82%. En bacaladillas del océano Atlántico se han descrito prevalencias del 85% al 100% (Viu et al. 1996, Fernández et al. 2005, Chía et al. 2010); mientras que las registradas en el mar

Mediterráneo para esta misma especie de pescado son inferiores, por ejemplo, 66,7% encontrado por Piras et al. (2014), 19% por Madrid et al. (2012) o el 10,6% por Valero et al. (2000). La cifra de prevalencia encontrada en este trabajo está más próxima a las citadas en aguas atlánticas. Por el contrario la abundancia media (13,5 parásitos/hospedador) representa un valor intermedio a los encontrados en aguas atlánticas y mediterráneas. Así, en la costa mediterránea del norte de África, Farjallah et al. (2008a) indicaron una abundancia media en *Anisakis* de 0,92 para este hospedador, y Valero et al. (2000), en la mediterránea costa de Motril (España), de 0,14. Estos valores son menores comparados con los hallados en el litoral atlántico por Chía et al. (2010), los cuales refieren una abundancia media de 55,89. Similar situación observamos respecto a la presencia de estos nematodos en la musculatura; así, la prevalencia detectada en este estudio (38%), es similar a la encontrada en peces del Atlántico: 37% por Chía et al. (2010) y 39% por Madrid et al. (2012), frente al 7% de las costas mediterráneas (Madrid et al. 2012). Por el contrario, la intensidad de infección (8,6), es inferior a la encontrada en aguas atlánticas (24,2) (Chía et al. 2010) y más parecida a las cifras detectadas en peces de las costas mediterráneas (Madrid et al. 2012; Piras et al. 2014). El conocimiento del comportamiento y los movimientos de la bacaladilla no se conocen en su totalidad, pero estos valores de los parámetros epidemiológicos, intermedios entre los presentados por bacaladillas de aguas atlánticas y mediterráneas, podrían ser reflejo de la migración de las bacaladillas del Golfo de Cádiz tanto a aguas atlánticas como mediterráneas; una de estas migraciones correspondería a la intensa corriente que tiene lugar cuando el agua del Atlántico ingresa en el mar Mediterráneo a través del estrecho de Gibraltar, la cual se asocia con un intenso afloramiento (Molina Fernández 2018).

Las prevalencias de infección obtenidas han sido elevadas en las **tres estaciones del año analizadas**, alcanzándose el 100% en primavera, teniendo en cuenta que la bacaladilla adulta deposita sus huevos en el agua del mar a una

profundidad de 300-500 m durante esta estación (FAO, bacaladilla). Según la **localización de las larvas en el pescado**, la más alta prevalencia de parasitación se ha dado en vísceras (73%) con valores elevados en las tres estaciones del año analizadas, y las más bajas en musculatura dorsal. La parasitación de la musculatura ventral es considerablemente mayor que la de la musculatura dorsal en las tres estaciones. En primavera los parámetros de infección en musculatura ventral son muy elevados y similares a los de vísceras. En otoño se observan los valores de parasitación de la musculatura dorsal más bajos (Tabla 13).

Nuestros resultados muestran una **mayor prevalencia de *A. pegreffii***, de forma que un 70% de los peces están parasitados por esta especie, el 33% en infección simple, frente al 38% de prevalencia de *A. simplex* s.s., un 6% con infección simple. En lo que se refiere a la musculatura, las prevalencias de infección por *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* tienden a igualarse con ligero predominio de la primera (Fig. 31). Pero sobre todo, se detecta una marcada diferencia en la intensidad de infección por ambas especies, de forma que el número de larvas de *A. simplex* s.s. duplica al de *A. pegreffii* en esta localización. Estos datos son concordantes con la menor capacidad de penetración atribuida a *A. pegreffii* tanto en tejidos de peces como de animales de experimentación (Quiazon et al. 2008; Suzuki et al. 2010; Arizono et al. 2012; Romero et al. 2013).

La parasitación general por *A. simplex* s.l. de las bacaladillas de esta zona de confluencia atlántico-mediterránea, no mostró linealidad con el peso ni la longitud del pez, ni tampoco con la estación del año, probablemente debido a los altos valores de prevalencia durante las tres estaciones muestreadas (Fig. 30). Otros autores tampoco han encontrado estacionalidad asociada a la infección por *Anisakis* spp. en peces Pleuronectiformes (Valero et al. 2000; Marques et al. 2006) y bacaladillas (Madrid et al. 2012); sin embargo, Farjallah et al. (2006) asociaron el incremento de la prevalencia e intensidad a la estación de mayor actividad

reproductiva del hospedador. En nuestro estudio, la prevalencia es aparentemente mayor en primavera, pero no se constatan diferencias estadísticamente significativas, sí coincidiendo con la época posterior al desove de la bacaladilla. Otros autores han señalado la existencia de parámetros de parasitación más elevados en las bacaladillas de mayor longitud y edad (Valero et al. 2000, Cruz et al. 2007, Madrid et al. 2012), así como en otras especies de pescado (Rello et al. 2009; Abatouy et al. 2011, 2013; Hermida et al. 2012; Molina-Fernández et al. 2015). La causa de este incremento se ha atribuido al acúmulo de estos nematodos en los pescados de mayor edad, donde las larvas pueden vivir hasta tres años (Macpherson 1978; Strømnes and Andersen 2003), y a la incorporación a la dieta del hospedador de mayor edad de eufásidos como adecuados hospedadores intermediarios de *Anisakis* (Palomera et al. 2007). Las bacaladillas de dos años miden unos 17 cm de largo, las de tres años, unos 20 cm, y las de 7-8 años, unos 30 cm (FAO, bacaladilla). En nuestro estudio cabe destacar las elevadas cifras de intensidad y abundancia medias, principalmente debidas a *A. simplex* s.s., en bacaladillas de 21-21,9 cm que son ejemplares relativamente pequeños con aproximadamente 3 años de edad; estas cifras son netamente superiores a las que presentan las bacaladillas de mayor longitud  $\geq 25$  cm con 7-8 años de edad, y es posible que estos valores estén reflejando diferencias en las rutas migratorias, ya que su alimentación está ampliamente distribuida. También podría darse que los machos analizados hayan alcanzado la madurez en su tercer año, pudiendo alimentarse de krill y peces mictófidios (FAO, bacaladilla).

Sin embargo, cuando diferenciamos entre las especies de *A. simplex* s.l. o analizamos localizaciones concretas del parásito, la incidencia de los factores cambia. Así, la presencia en vísceras de *A. simplex* s.l. varía con el genotipo y la estación del año: en primavera y otoño, *A. pegreffii* es casi tres veces más frecuente que *A. simplex* s.s. en vísceras, mientras que en invierno ocurre lo

contrario, y *A. simplex* s.s. es dos veces más frecuente que *A. pegreffii* en esta localización. Los factores asociados a la presencia del parásito en musculatura ventral o dorsal son distintos; en invierno, la musculatura ventral de la bacaladilla alberga 9 veces más larvas de *A. pegreffii* que de *A. simplex* s.s.. Por el contrario, en musculatura dorsal, la mayor presencia de parásitos (*A. simplex* s.l.) se produce en primavera (seis veces más que en otoño o invierno). Además, por cada larva que incrementa la parasitación del pez, aumenta un 1% la probabilidad de que esté en musculatura dorsal. Los híbridos han mostrado un comportamiento similar a *A. simplex* s.s. en todas las localizaciones. Las bacaladillas capturadas durante el invierno están principalmente parasitadas por *A. simplex* s.s.; *A. pegreffii* es un 97% menos abundante que su especie hermana en esta estación, pero tiende a acumularse en la musculatura ventral, localización en la que predomina sobre *A. simplex* s.s..

## **7. Identificación molecular de las especies hermanas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii***

Aquí se describe el primer análisis molecular de *A. simplex* s.l. procedente de diferentes peces y lugares de captura, como son las aguas del Mediterráneo y el Atlántico, utilizando secuencias de  **$\beta$ -tubulina como marcador nuclear**. *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* difieren al menos en 7 bases: posiciones 33, 75, 86, 269, 297, 394 y 496 de la región estudiada. La posición 451 no fue diferente en todos los individuos de ambas especies (cuatro individuos *A. simplex* s.s. tenían en esta posición nucleótidos típicos de *A. pegreffii*), lo que hace que la interpretación de este nucleótido sea ambigua.

Las tubulinas  $\beta$  y  $\alpha$  se polimerizan en microtúbulos dinámicos que son elementos estructurales y funcionales esenciales de todas las células eucariotas. Las secuencias de  $\beta$ -TUB están altamente conservadas en metazoos, incluidos los nematodos, y las diferencias se detectan principalmente en la región carboxi-terminal. En base a esta región, se han descrito seis grupos de isotipos de  $\beta$ -tubulina de vertebrados (denominados isotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6), que se comparten entre especies y son producto de genes distintos. Los nematodos no muestran este patrón y normalmente se detectan uno o dos isotipos, con frecuencia el isotipo 1 (Diawara et al. 2009; Tydén et al. 2013). No se han observado variaciones dentro de los Ascaridoidea *Parascaris equorum* y *Ascaridia galli*, a pesar de secuenciar un gran número de nematodos adultos individuales de cada especie (Tydén et al. 2013). Del mismo modo, se encontró una baja diversidad de nucleótidos en el gen de la  $\beta$ -tubulina en *Trichuris trichiura*. La variación genética relativamente alta observada en el gusano látigo del camello árabe en comparación con otros *Trichuris* spp. se ha relacionado con el flujo de genes entre múltiples especies: *T. ovis*, *T. globulosa* y *T. cameli* (Hansen et al. 2013).

Por lo tanto, el análisis de la secuencia del gen de  $\beta$ -tubulina corrobora que ***A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*** pertenecen a dos especies diferentes. Sin embargo, también encontramos tres individuos **híbridos** que muestran genotipo heterocigoto en las 7 posiciones de diagnóstico. También detectamos variación en otras posiciones de la secuencia  $\beta$ -TUB, concretamente en las posiciones 60, 67, 100, 119, 121, 128, 136, 139, 142, 145, 157, 166, 179, 214, 229, 266, 429, 508 y 523. La posición 451, que como se ha indicado antes no se considera una diferencia fija, fue heterocigota en los especímenes identificados como híbridos, así como en un individuo identificado como *A. simplex* s.s. (Tabla 16).

Sólo se han encontrado individuos **híbridos As/Ap** en aguas ibéricas, que son áreas de simpatria de ambas especies. No se encontró ninguno en las áreas



alopátricas del océano Atlántico nororiental o el mar Adriático, aunque en este último el número de larvas estudiadas fue bajo. Mediante PCR-RFLP del gen ITS1 se identificó el patrón heterocigoto As/Ap con una prevalencia de 30,8% (32/104). En ITS1 solo existen dos diferencias fijas entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, no habiendo diferencias en ITS2 (Ceballos-Mendiola et al. 2010). El marcador ITS1 ha sido útil para distinguir híbridos y su progenie retrocruzada en una gran variedad de eucariotas, incluidos parásitos (Steinauer et al. 2008; Cavallero et al. 2014). Cada organismo contiene múltiples copias de secuencias ITS1 y se ha demostrado que los híbridos y su progenie retrocruzada pueden retener ambas secuencias parentales durante varias generaciones antes de que se homogenicen, como se indica para *Schistosoma mansoni* y *S. rodhaini* (Steinauer et al. 2008). Esta evolución concertada altamente eficiente en el conjunto de ADNr conduce a una homogeneización muy rápida, manteniéndola con repeticiones casi idénticas (Ganley and Kobayashi 2007). Por lo tanto, los polimorfismos entre individuos en una población representan casos en que la homogeneización ha extendido una mutación a todas las repeticiones en el conjunto de un individuo, creando un polimorfismo fijo entre individuos como un primer paso para convertirse en una diferencia fija entre especies (Steinauer et al. 2008). Sin embargo, han surgido voces discordantes sobre el uso de la región ITS de ADN ribosómico como marcador nuclear para la identificación de estas dos especies crípticas, *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* (Mattiucci et al. 2016). La controversia sobre la existencia de estos híbridos dura más de una década. La existencia de fenómenos de hibridación se ha evidenciado de forma gradual con otros marcadores, lo que indujo a antiguos autores detractores a aceptar su existencia (Mattiucci et al. 2014, 2016).

Cuando se utilizó el marcador  $\beta$ -TUB, se detectaron menos híbridos que con el marcador ITS1;  $\beta$ -TUB clasificó 8 de los híbridos identificados por ITS1 como *A. simplex* s.s. y 19 como *A. pegreffii*. Los linajes maternos de los híbridos ITS1 fueron

tanto *A. simplex* s.s. como *A. pegreffii*. El marcador  $\beta$ -TUB identificó cuatro híbridos ITS1 con matrilineaje de *A. simplex* s.s. como *A. pegreffii*. Sólo tres especímenes mostraron genotipos heterocigotos con ambos marcadores nucleares, y una larva fue híbrida con el marcador  $\beta$ -TUB, mientras que el marcador ITS lo identificó como *A. pegreffii* y el Cox-2 como *A. simplex* s.s.

La optimización de la técnica de PCR-RFLP del gen  $\beta$ -TUB supuso una reducción de la concentración de cebador con el objetivo de conseguir un perfil de bandas más limpio. Algunas muestras 11/41, requirieron para su amplificación una nested-PCR, donde la temperatura de hibridación subió a 62 °C, haciendo las condiciones menos astringentes. Esta limitación pareció deberse a la alteración del ADN de los individuos, debido a una conservación inadecuada.

Respecto al análisis poblacional, si tenemos únicamente en cuenta las posiciones fijas del gen  $\beta$ -TUB, todas las poblaciones geográficas de *A. simplex* s.l. investigadas están en **equilibrio Hardy-Weinberg** (HW), excepto la población del golfo de Cádiz, una zona de confluencia atlántico-mediterránea. *A. simplex* s.s y *A. pegreffii* se encuentran en equilibrio HW en el Atlántico norte y en el Adriático, lógicamente de acuerdo a su predominio respectivo en estas zonas; así como en las costas españolas del Atlántico y del Mediterráneo, donde ambas especies se encuentran en distintas proporciones. La zona de confluencia se halló en desequilibrio debido posiblemente al mayor número de individuos heterocigotos analizados, sugiriendo que la elevada recombinación no ha permitido eliminar aún el desequilibrio inicial entre estas dos poblaciones con diferentes frecuencias génicas y en continuo flujo génico, indicando que *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* son dos especies distintas.

El **análisis de clusters** mediante el programa *Structure* mostró diferentes probabilidades de agrupación según si la posición 451  $\beta$ -TUB fue introducida en el

programa o no, y si se pre-definieron poblaciones según la pertenencia de los individuos a las cinco áreas geográficas estudiadas. Cuando no se incluyó la posición 451 en el estudio, se obtuvo con la mayor probabilidad la existencia de dos poblaciones de *Anisakis* ( $K= 2$ ), correspondientes a las especies *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*. En las aguas simpátricas de la Península Ibérica, la población ha experimentado una distribución mixta en uno u otro *cluster*, como cabría esperar, aunque sólo un individuo del golfo de Cádiz con genotipo heterocigoto con ambos marcadores nucleares presentó introgresión de uno dentro de otro en una débil proporción (0,03) (Fig. 38). Los tres especímenes híbridos quedaron asignados al grupo de *A. pegreffii*, lo cual parece sugerir que los híbridos comparten más alelos con *A. pegreffii* en estas áreas debido al retrocruzamiento con este parental; resultados similares se han obtenido de estudios de genética poblacional de *Anisakis* en Marruecos (Abattouy et al. 2016). La posibilidad de una tercera población constituida por individuos con caracteres heterocigotos de las especies parentales no tuvo un valor de delta-K negativo, sino que puso en evidencia la existencia de tal población; sin embargo, ciertas limitaciones conducen a una falta de estructura genética de esta población de híbridos As/Ap, que les releva a una existencia intermedia entre las poblaciones parentales. Esta misma situación se determinó cuando sí se analizó la posición 451  $\beta$ -TUB, y además se pre-definieron cinco poblaciones según la pertenencia de los individuos a las cinco áreas geográficas estudiadas (Fig. 42). Parece que en este caso, esta posición no fue determinante en las poblaciones designadas para que los híbridos constituyeran un *cluster*, porque esta posición no mostró ser diferente en todas las poblaciones definidas. En el caso de analizar la posición 451 sin pre-designación de poblaciones, nos encontramos con una mayor probabilidad de que los individuos de nuestra muestra se dividan en 3 *clusters*, correspondientes a los 3 genotipos hallados con los dos marcadores nucleares, *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* e híbridos As/Ap (Fig. 40), aunque la probabilidad de agrupación en dos

poblaciones ( $K= 2$ ) no fue irrelevante. La posición 451 tendría, de este modo, un papel más importante en la población total, generando esta estructura carente de aislamiento reproductivo. Sin embargo, esta situación no es del todo real, ya que no se manifiesta en todas las áreas geográficas, dando lugar a estructuras genéticas dependientes de simpatria.

El programa **Newhybrids** nos proporcionó la asignación de los individuos a las clases parentales o híbridas correspondientes utilizando la información de los dos genes nucleares, ITS1 y  $\beta$ -TUB; el programa categorizó a los tres híbridos putativos como F1, los cuales habían mostrado carácter heterocigoto con ambos marcadores. Los individuos no designados como parentales se asignaron a una u otra clase parental, con elevada probabilidad (0,99). Algunos de estos individuos (6) habían mostrado genotipo parental con los dos marcadores, mientras que del resto, 12 individuos procedentes del golfo de Cádiz eran parentales con  $\beta$ -TUB, pero con genotipo heterocigoto en las posiciones de diagnóstico del ITS; la baja probabilidad asignada por el programa de estos individuos a categorías retrocruzadas de F1 con uno u otro parental (0\_Bx o 1\_Bx, Tabla 18) podría explicarse por el bajo número de posiciones de diagnóstico del ITS en relación con las utilizadas en el  $\beta$ -TUB, lo cual ha podido constatarse mediante pruebas con distintas proporciones de loci en el programa. Con el objetivo de aclarar las diferencias encontradas en la posición 451, los tres individuos restantes correspondían a aquellos *A. simplex* s.s., dos de zona alopátrica y uno simpátrica, con nucleótidos como *A. pegreffii* en los primeros y heterocigoto en el último; sin embargo fueron clasificados como parentales, dejando una mínima posibilidad de asignación a la categoría de retrocruzamiento con el parental.

Los híbridos detectados con  $\beta$ -TUB se agruparon con los individuos *A. simplex* s.s. en los **árboles consenso**, mientras que el **análisis genealógico** mostró esta misma situación en una sola red de conexión (Fig. 43a, 44a). Cuando se

ensamblaron los tres genes  $\beta$ -TUB, ITS y Cox-2, los híbridos detectados con el gen  $\beta$ -TUB se agruparon también en este caso con el genotipo puro *A. simplex* s.s., mientras que los híbridos con el ITS cayeron acordemente en los tres grupos, los dos parentales puros (HApAp, HAsAs) y los individuos con introgresión mitocondrial situados entre los parentales (HApAs). Estos mismos grupos poblacionales figuraron en la red *Median-Joining*, íntimamente conectados entre sí, los cuales integraron a los híbridos de la misma forma que las ramas del árbol (Fig. 43b, 44b). La mayor diversidad genética encontrada en torno a la posición 451 del gen  $\beta$ -TUB en los individuos *A. simplex* s.s. podría ser motivo por el cual estos análisis hallaran menor distancia genética entre los híbridos y este parental.

Algunos autores han detectado mediante el marcador ITS1, híbridos con un genotipo mixto en sólo una de las dos posiciones de diagnóstico de este marcador; su abundancia relativa es mayor en las áreas parapátricas a lo largo de la costa marroquí, donde *A. simplex* s.s. es raro o está ausente. Según los autores, estos individuos representaban retrocruzamientos de los híbridos F1 y generaciones posteriores con las especies parentales, principalmente *A. pegreffii* (Abattouy et al. 2016). Una situación similar es descrita por Steinauer et al. (2008) en una zona híbrida natural entre el parásito trematodo humano, *S. mansoni*, y su especie hermana, el parásito roedor *S. rodhaini*. La clonación y la secuenciación de este ITS1 de individuos híbridos de *Schistosoma* mostraron múltiples secuencias de ITS1 que incluyen las de *S. mansoni*, *S. rodhaini* y variaciones de las dos resultantes de la recombinación. Estos autores consideraron que debido a su alto número de copias, los datos de ITS1 son más sensibles a la detección de híbridos que otros marcadores, como los datos de microsatélites, e identificaron la mayoría de los híbridos putativos en el estudio. Aunque es muy poco probable, otra interpretación alternativa podría ser la retención del polimorfismo ancestral en este marcador. Esta posibilidad se ha presentado para desalentar el uso de ITS1

como el único marcador para la identificación de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* (Mattiucci et al. 2016). Como consecuencia, es necesario un procedimiento de **genotipaje con marcadores múltiples**. Partiendo de la necesidad del uso de metodologías comunes para identificar las dos especies hermanas y sus híbridos en estudios epidemiológicos, el genotipaje por PCR-RFLP es un procedimiento simple y reproducible en cualquier laboratorio; por el contrario la técnica de genotipaje basada en aloenzimas usadas en algunos estudios, es un análisis demasiado laborioso y restringido a muy pocos laboratorios, por tanto no puede elegirse como parte de este enfoque de marcadores múltiples.

La **PCR-RFLP** de ambos loci nucleares, ITS1 y  $\beta$ -TUB, y la Cox-2 mitocondrial nos permitió detectar las dos especies parentales puras (AsAsAs y ApApAp), híbridos F1 (HHAs), progenie híbrida retrocruzada (HAsAs, HApAs, HApAp y ApHAs) y los individuos con introgresión mitocondrial única (ApApAs, no se detectaron individuos AsAsAp) (Tabla 19). Todos los híbridos F1 e híbridos resultantes de retrocruzamiento de híbridos F1 con la especie parental se detectaron en las áreas simpátricas para ambas especies parentales representadas por aguas ibéricas. En el caladero de Little Sole Bank en el Atlántico nororiental, donde solo *A. simplex* s.s. ha sido identificado (Ceballos-Mendiola et al. 2010), las 6 larvas estudiadas fueron identificadas como *A. simplex* s.s. (AsAsAs). Once de las 13 larvas estudiadas del área alopátrica del Mar Adriático se identificaron como *A. pegreffii* puro (ApApAp) mientras que las dos restantes fueron *A. pegreffii* con herencia materna mitocondrial de *A. simplex* s.s. (ApApAs); dicha introgresión mitocondrial fue descrita previamente por Mladineo et al. (2017a). Ceballos-Mendiola et al. (2010) describieron la existencia de larvas *A. simplex* s.s. con ADN mitocondrial de *A. pegreffii* del Atlántico Nordeste. La discordancia mitocondrial/nuclear es una herramienta comúnmente utilizada para identificar supuestos híbridos (Detwiler and Criscione 2010).

Algunos autores han utilizado dos nucleótidos de diagnóstico entre ambas especies en la región de ADN n-1 de EF1 para la identificación de las dos especies parentales puras y los genotipos heterocigotos en ambas posiciones (Mattiucci et al. (2016). De 30 individuos que mostraban el patrón ITS heterocigoto, solo 11 individuos de áreas simpátricas presentaban un genotipo heterocigoto en los otros loci de diagnóstico nuclear (alfa-1 y 4 alozimas EF1). Debido a la aparente falta de otras generaciones híbridas, estos autores sugirieron que algunos factores selectivos disminuyen la aptitud del híbrido F1. Sin embargo, de acuerdo con Steinauer et al. (2008), los híbridos F1 y los retrocruzamientos de generación posterior pueden detectarse con marcadores ITS. Además, se ha detectado discordancia mitocondrial/nuclear en algunos de estos híbridos ITS (HApAs) e híbridos  $\beta$ -TUB (ApHAs), lo que respalda su carácter híbrido. Estos fenómenos de retrocruzamiento inducirían a la recuperación de las características genéticas de las especies parentales. De hecho, *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* parecen ser dos especies separadas en la mayor parte de su rango, e incluso en áreas simpátricas cada especie pura representa aproximadamente 31% (27 AsAsAs y 26 ApApAp de 85 larvas de aguas ibéricas). El proceso de especiación no está tan avanzado como para evitar el intercambio de información genética entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, que aparecieron íntimamente interconectados en una red de población única que muestra la ausencia de una barrera genética importante entre estos dos taxones. Un escenario similar que también se ha descrito en otras especies de parásitos como *Ascaris lumbricoides* y *A. suum*, *Schistosoma mansoni* y *S. rodhaini* o *Anopheles gambiae* y *A. coluzzii* (King et al. 2015), y en una amplia variedad de especies de vida libre (Arnold 2004; Seehausen 2004).





# CONCLUSIONES



1. Las larvas de *Anisakis* resisten, en mayor o menor medida, la acción que producen los **fármacos que modifican el pH gástrico o protegen la mucosa gástrica**. El tratamiento conservador con estos fármacos no distó mucho del efecto ejercido por los antihelmínticos usados en este estudio. La administración de **ranitidina**, tanto una dosis como el tratamiento de larga duración, mostró una discreta eficacia en la reducción/prevención del daño en los animales y no dio lugar a lesiones múltiples.

2. Las enzimas proteolíticas **papaína y bromelaína**, a la dosis de 25 mg/ml *in vitro*, presentaron efecto anisakicida, siendo del 100% con la primera cisteinasa a las 48 h; ambas provocan la desintegración de la cutícula del nematodo, dando lugar a la fragmentación de las larvas.

3. El extracto de zumo, arilos y pericarpio, así como el zumo obtenido del **fruto de la granada (*P. granatum*)** mostró una limitada eficacia *in vitro* sobre *Anisakis*, aunque provocó mayor alteración de la integridad de las larvas que el extracto de los arilos solo; mientras que el zumo embotellado no ejerció ninguna actividad frente al parásito.

4. Los **aceites esenciales** ensayados al 5% en aceite de oliva, provocaron una migración del 60,8-87,6% de las larvas de *Anisakis* del pescado hacia el recipiente. Particularmente, los de **orégano, tomillo y comino** presentaron además una acción larvicida *in vitro*, por lo que se presentan como aditivos interesantes para el marinado de pescado crudo. Tras la infección *in vivo* con larvas vivas tratadas con los aceites esenciales de cantueso, comino y orégano, no se detectaron lesiones en el tracto digestivo de los animales de experimentación, a diferencia de lo observado con los AEs de espliego, mejorana, romero y tomillo.

5. La **diosgenina** ejerció un efecto beneficioso sobre la mucosa digestiva de los animales infectados, en los cuales disminuyó

significativamente el número de lesiones y la intensidad hemorrágica de las mismas, a la menor dosis utilizada (5 mg/kg). La **sarsasapogenina** y el **ácido glicirretínico**, no fueron eficaces a la citada dosis. A dosis mayores (1/16 DL<sub>50</sub>, 61,25 y 153,13 mg/kg, respectivamente) también resultaron útiles en la anisakiasis aguda. A sus dosis eficaces, la administración de las tres sapogeninas se asoció significativamente con la ausencia de larvas capaces de provocar patogenicidad gastro-intestinal.

6. El **golfo de Cádiz** es una zona de simpatría para las especies hermanas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* donde los parámetros de infección de la bacaladilla son intermedios entre los del océano Atlántico y el mar Mediterráneo. La tasa de parasitación es elevada, incluso en la musculatura, donde predomina *A. simplex* s.s. significativamente en primavera; esta tasa de parasitación no mostró linealidad con el peso ni la longitud del pez.

7. El gen nuclear **β-tubulina** resultó útil para la identificación de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* como dos especies distintas. Este marcador se integró en una técnica de genotipaje mediante PCR-RFLP con marcadores múltiples, dos nucleares, ITS1 y β-TUB, y el Cox-2 mitocondrial, herramienta que permitió diferenciar ambas especies, híbridos F1, retrocruzamientos e introgresiones.

8. El **análisis poblacional** llevado a cabo mediante *clusters*, árboles y redes, apoya la existencia de hibridación contemporánea entre las especies hermanas, *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, en áreas de simpatría, donde los patrones observados parecen estar motivados por el retrocruzamiento de los individuos híbridos de ambas especies con sus parentales, tendiendo así a recuperar las características de los individuos puros.

# BIBLIOGRAFÍA





- AAITO-IFIACI *Anisakis* Consortium (2011) *Anisakis* hypersensitivity in Italy: prevalence and clinical features: a multicenter study. *Allergy* 66:1563–9. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02691.x
- Abattouy N, Valero A, Benajiba MH, et al (2011) *Anisakis simplex* s.l. parasitization in mackerel (*Scomber japonicus*) caught in the North of Morocco —Prevalence and analysis of risk factors. *Int J Food Microbiol* 150:136–9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.026
- Abattouy N, Valero A, Lozano J, et al (2014) Epidemiology and molecular identification of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in the horse mackerel *Trachurus trachurus* from northern Morocco. *J Helminthol* 88:257–63. doi: 10.1017/S0022149X13000102
- Abattouy N, Valero A, Lozano J, et al (2016) Population genetic analysis of *Anisakis simplex* s. l. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) from parapatric areas and their contact zone. *Parasite Epidemiol Control* 1:169–76. doi: 10.1016/j.parepi.2016.02.003
- Abe N, Tominaga K, Kimata I (2005) Usefulness of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer region of rDNA for identification of *Anisakis simplex* complex. *Jpn J Infect Dis* 59.
- Abdel-Ghaffar F, Semmler M, Al-Rasheid KA, et al (2010) The effects of different plant extracts on intestinal cestodes and on trematodes. *Parasitol Res* 108:979–84.
- Abollo E, D'Amelio S, Pascual S (2001) Fitness of the marine parasitic nematode *Anisakis simplex* s.str. in temperate waters of the NE Atlantic. *Dis Aquat Organ* 45:131–9. doi: 10.3354/dao045131
- Abollo E, López A, Gestal C, et al (1998) Macroparasites in cetaceans stranded on the northwestern Spanish Atlantic coast. *Dis Aquat Organ* 32:227–31. doi: 10.3354/dao032227
- Abollo E, Paggi L, Pascual S, D'Amelio S (2003) Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infect Genet Evol* 3:175–81.
- Abou-Rahma Y, Abdel-Gaber R, Kamal Ahmed A (2016) First record of *Anisakis simplex* third-stage larvae (Nematoda, Anisakidae) in European hake *Merluccius merluccius lessepsianus* in Egyptian water. *J Parasitol Res*. doi: 10.1155/2016/9609752
- Abu-Darwish MS, Cabral C, Ferreira I V, et al (2013) Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2013/538940
- Adams AM, Miller KS, Wekell MM, Dong FM (1999) Survival of *Anisakis simplex* in microwave-processed arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *J Food Prot* 62:403–9.
- Adams RP (2007) Review of identification of essential oil components by gas chromatography/Mass Spectrometry, 4th Edition. *Am Soc Mass* 001:803–6. doi: 10.1016/j.jasms.2007.01.001
- Adroher FJ, Valero A, Ruiz-Valero J, Iglesias L (1996) Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). *Parasitol Res* 82:253–6. doi: 10.1007/s004360050105
- AECOSAN (2016) Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y

Nutrición (AECOSAN) en relación a la alergia a *Anisakis*.

AESAN (2007) Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición sobre medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de *Anisakis*. AESAN 6:59–65.

AFSSA (2007). Opinion of the French Food Safety Agency (AFSSA) on a risk assessment request concerning the presence of anisakidae in fishery products and the extension of the exemption from the freezing sanitary obligation of fishery products whose feeding is under control and for certain species of wild fish. Request no. 2007-SA- 0379.

Alonso A, Daschner A, Moreno-Ancillo A (1997) Anaphylaxis with *Anisakis simplex* in the gastric mucosa. N Engl J Med 337:350-1. doi:10.1056/NEJM199707313370518

Alonso-Gómez A, Moreno-Ancillo A, López-Serrano MC, et al (2004) *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. Parasitol Res 93:378–84. doi: 10.1007/s00436-004-1085-9

Amin O, Eidelman W, Domke W, et al (2000) An unusual case of anisakiasis in California. Comp Parasitol 67:71–5.

Amir A, Ngui R, Lau YL, et al (2016) Anisakiasis causing acute dysentery in Malaysia. Am J Trop Med Hyg 95:410–2. doi: 10.4269/ajtmh.16-0007

Anastasio A, Smaldone G, Cacace D, et al (2016) Inactivation of *Anisakis pegreffii* larvae in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) by salting and quality assessment of finished product. Food Control 64:115–9. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.12.026

Anderson EC, Thompson EA (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. Genetics 160:1217–29.

Angelucci G, Meloni M, Merella P, et al (2011) Prevalence of *Anisakis* spp. and *Hysterothylacium* spp. larvae in teleosts and cephalopods sampled from waters off Sardinia. J Food Prot 74:1769–75. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-482

Anshary H, Sriwulan, Freeman MA, Ogawa K (2014) Occurrence and molecular identification of *Anisakis* Dujardin, 1845 from marine fish in southern Makassar Strait, Indonesia. Korean J Parasitol 52:9–19. doi: 10.3347/kjp.2014.52.1.9

Añibarro B, Seoane FJ (1998). Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*. J Allergy Clin Immunol 102:331–2.

Arai T, Akao N, Seki T, et al (2014) Molecular genotyping of anisakis larvae in middle eastern japan and endoscopic evidence for preferential penetration of normal over atrophic mucosa. PLoS One 9:1–5. doi: 10.1371/journal.pone.0089188

Arcos SC, Ciordia S, Roberston L, et al (2014) Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex* sensu stricto and *A. pegreffii*. Proteomics 14:1547–68. doi: 10.1002/pmic.201300529

Arias-Diaz J, Zuloaga J, Vara E, et al (2006) Efficacy of albendazole against *Anisakis simplex* larvae *in vitro*. Dig



- Liver Dis 38:24–6. doi: 10.1016/j.dld.2005.09.004
- Arizono N, Yamada M, Tegoshi T, Yoshikawa M (2012) *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii*: biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. Foodborne Pathog Dis 9:517–21. doi: 10.1089/fpd.2011.1076
- Arnold ML (2004) Natural hybridization and the evolution of domesticated, pest and disease organisms. Mol Ecol 13:997–1007. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02145.x
- Arthur JR, Margolis L, Whitaker DJ, McDonald TE (1982) A quantitative study of economically important parasites of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) from British Columbian waters and effects of postmortem handling on their abundance in the musculature. Can J Fish Aquat Sci 39:710–26.
- Asaishi K, Nishino C, Ebata T, et al (1980) Studies on the etiologic mechanism of anisakiasis. Immunological reactions of digestive tract induced by *Anisakis* larva. Gastroenterol Jpn 15:120–7.
- Asami K, Watanuki T, Sakai H, et al (1965) Two cases of stomach granuloma caused by *Anisakis*-like larval nematodes in Japan. Am J Trop Med Hyg 14:119–23.
- Audicana MT, Fernández de Corres L, Muñoz D, et al (1995) Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish. J Allergy Clin Immunol 96:558–60. doi: 10.1016/S0091-6749(95)70301-2
- Audicana MT, Kennedy MW (2008) *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. Clin Microbiol Rev 21:360–79. doi: 10.1128/CMR.00012-07
- Baeza ML, Zubeldia JM, Rubio M (2001) *Anisakis simplex* allergy. ACI Int 13: 242-9.
- Baeza ML, Rodríguez A, Matheu V (2004). Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. Clin Exp Allergy 34: 296-302.
- Baird FJ, Gasser RB, Jabbar A, Lopata AL (2014) Foodborne anisakiasis and allergy. Mol Cell Probes 28:167–74. doi: 10.1016/j.mcp.2014.02.003
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils—a review. Food Chem Toxicol 46:446–75.
- Baldwin RE, Rew MB, Johansson ML, et al (2011) Population structure of three species of *Anisakis* nematodes recovered from Pacific sardines (*Sardinops sagax*) distributed throughout the California current system. J Parasitol 97:545–54. doi: 10.1645/GE-2690.1
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol 16:37–48. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Bao M, Pierce GJ, Pascual S, et al (2017) Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis. Sci Rep 7:43699. doi: 10.1038/srep43699
- Baptista-Fernandes T, Rodrigues M, Castro I, et al (2017) Human gastric hyperinfection by *Anisakis simplex*: a severe and unusual presentation and a brief review. Int J Infect Dis 64:38–41. doi: 10.1016/j.ijid.2017.08.012

- Barbarroja-Escudero J, Asúnsolo-Del-Barco A, Sánchez-González M, et al (2018) Heterogeneous predisposing factors and etiology in uvula edema patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 29:0. doi: 10.18176/jiaci.0324
- Baron L, Branca G, Trombetta C, et al (2014) Intestinal anisakidosis: histopathological findings and differential diagnosis. *Pathol Res Pract* 210:746–50. doi: 10.1016/j.prp.2014.06.022
- Beck M, Evans R, Feist SW, et al (2008) *Anisakis simplex* sensu lato associated with red vent syndrome in wild adult Atlantic salmon *Salmo salar* in England and Wales. *Dis Aquat Organ* 82:61–5. doi: 10.3354/dao01979
- Beldsoe GE, Oria MP (2001) Potential hazards in cold-smoked fish: parasites. *J Food Science* 66:S1100- 3.
- Berland B (1961) Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2:1–50. doi: 10.1080/00364827.1961.10410245
- Bier JW, Raybourne RB (1988) *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridoides): formation of immunogenic attachment caps in pigs. *Proc Helminthol Soc Wash* 55:91–4.
- Blaxter ML, De Ley P, Garey JR, et al (1998) A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392:71–5. doi: 10.1038/32160
- Boquien Y, Kernéis JP, Malvy P, et al (1966) Eosinophilic granuloma of the digestive tract. A propos of 15 cases. *Arch Fr Mal App Dig* 55:977-98.
- Boureé P, Paugam A, Petithory JC (1995) Anisakidosis: report of 25 cases and review of the literature. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 18:75–84.
- Bruneton J (2001) Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2nd edn. Acribia SA, Zaragoza, pp 1100.
- Burns RG (1991) alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cell Motil Cytoskeleton* 20:181–9. doi: 10.1002/cm.970200302
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int J Food Microbiol* 94:223–53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Bušelić I, Botić A, Hrabar J, et al (2018a) Geographic and host size variations as indicators of *Anisakis pegreffii* infection in European pilchard (*Sardina pilchardus*) from the Mediterranean Sea: food safety implications. *Int J Food Microbiol* 266:126–32. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.021
- Bušelić I, Trumbić Ž, Hrabar J, et al (2018b) Molecular and cellular response to experimental *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) third-stage larval infection in rats. *Front Immunol* 9:2055.
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 83:575-83.
- Bussmann B, Ehrich S (1978) Larval nematodes *Anisakis* sp. in blue whiting from waters around the Faeroe-Islands. *Int Counc Explor Sea CM1978/H13*, pp 11.
- Buzzel GR, Sommerville RT (1985) The structure of the esophagus in the third-stage larva of *Anisakis* sp. (Nematoda: Anisakidae). *Transactions of the Am Microscopical Society* 104:86-94.

- Calvet JP, Zuckman P, Texier J (1969) Parasitic allergic eosinophilic granuloma of the ileum. *Mem Acad Chir* 95:648–51.
- Campana-Rouget PY, Biocca E (1955) Une nouvelle espece d'*Anisakis* chez un phoque. *Mediterranean. Ann Parasitol* 30:477–80.
- Campbell N, Cross MA, Chubb JC, et al (2007) Spatial and temporal variations in parasite prevalence and infracommunity structure in herring (*Clupea harengus* L.) caught to the west of the British Isles and in the North and Baltic Seas: implications for fisheries science. *J Helminthol* 81:137–46. doi: 10.1017/S0022149X07747454
- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, et al (2016) 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
- Carbotta G, Laforgia R, Milella M, et al (2016) Small bowel obstruction caused by *Anisakis* and Meckel's diverticulum: a rare case. *G Chir* 37:281–3. doi: 10.11138/gchir/2016.37.6.281
- Carlin AF, Abeles S, Chin NA, et al (2018) Case Report: a common source outbreak of Anisakidosis in the United States and postexposure prophylaxis of family collaterals. *Am J Trop Med Hyg.* doi: 10.4269/ajtmh.18-0586
- Carmo J, Marques S, Bispo M, Serra D (2017) Anisakiasis: a growing cause of abdominal pain! *BMJ Case Rep* bcr2016218857. doi: 10.1136/bcr-2016-218857
- Carvajal P, Cattán P, Castillo C, Schatte P (1979) Larval anisakids and other helminths in the hake, *Merluccius gayi* (Guichenot) from Chile. *J Fish Biol* 15:671–7.
- Castán B, Borda F, Iñarrairaegui M, et al (2002) Digestive anisakiasis: clinical manifestations and diagnosis according to localization. *Rev Esp Enferm Dig* 94:463–72.
- Cattán PE, Babero BB, Torres D (1976) The helminth fauna of Chile: IV. Nematodes of the genera *Anisakis* Dujardin, 1845 and *Phocanema* Myers, 1954 in relation with gastric ulcers in a South American Sea Lion, *Otaria byronia*. *J Wildl Dis* 12:511–5.
- Cavallero S, Bruno A, Arletti E, et al (2017) Validation of a commercial kit aimed to the detection of pathogenic anisakid nematodes in fish products. *Int J Food Microbiol* 257:75–9. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2017.06.011
- Cavallero S, Costa A, Caracappa S, et al (2014) Putative hybrids between two *Anisakis* cryptic species: molecular genotyping using high resolution melting. *Exp Parasitol* 146:87–93. doi: 10.1016/j.exppara.2014.08.017
- Cavallero S, Ligas A, Bruschi F, D'Amelio S (2012) Molecular identification of *Anisakis* spp. from fishes collected in the Tyrrhenian Sea (NW Mediterranean). *Vet Parasitol* 187:563–6. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.01.033
- Cavallero S, Magnabosco C, Civettini M, et al (2015) Survey of *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. in sardines and anchovies from the North Adriatic Sea. *Int J Food Microbiol* 200:18–21. doi: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.01.017

- Cavallero S, Nadler SA, Paggi L, et al (2011) Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from southeastern Atlantic coasts of USA, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Parasitol Res* 108:781–92. doi: 10.1007/s00436-010-2226-y
- Ceballos-Mendiola G, Valero A, Polo-Vico R, et al (2010) Genetic variability of *Anisakis simplex* s.s. parasitizing European hake (*Merluccius merluccius*) in the Little Sole Bank area in the Northeast Atlantic. *Parasitol Res* 107:1399–404. doi: 10.1007/s00436-010-2009-5
- Céspedes RE, Iannacone J, Salas A (2011) Helmintos prásitos de *Dosidicus gigas* “pota” eviscerada en Arequipa, Perú. *Ecol Apl* 10:1–11.
- Chai JY, Murrell KD, Lymbery AJ (2005) Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Int J Parasitol* 35:1233–54. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.013
- Chaligiannis I, Lalle M, Pozio E, Sotiraki S (2012) Anisakidae infection in fish of the Aegean Sea. *Vet Parasitol* 184:362–6. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.09.007
- Chen Q, Yu HQ, Lun ZR, et al (2008) Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodes with zoonotic potential. *Parasitol Res* 104:79–84. doi: 10.1007/s00436-008-1161-7
- Cheng TC (1982) Anisakiasis. In: Steele JH (ed), *Handbook Series in Zoonoses, Section C: Parasitic Zoonoses*. CRC Press, Boca Raton, Fla, pp 37–54.
- Chía N, Romero MC, Polo-Vico R, et al (2010) Epidemiological study of *Anisakis* type I in blue whiting (*Micromesistius poutassou*) captured in northwestern Spain. *Ars Pharma* 51: 829-34.
- Cho SH, Lee SE, Park OH, et al (2012) Larval anisakid infections in marine fish from three sea areas of the Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 50:295–9. doi: 10.3347/kjp.2012.50.4.295
- Cho TH, Park HY, Cho S, et al (2006) The time course of biological and immunochemical allergy states induced by *Anisakis simplex* larvae in rats. *Clin Exp Immunol* 143:203–8. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02981.x
- Choi SJ, Lee JC, Kim MJ, et al (2009) The clinical characteristics of *Anisakis* allergy in Korea. *Korean J Intern Med* 24:160-3.
- Choi SH, Kim J, Jo JO, et al (2011) *Anisakis simplex* larvae: infection status in marine fish and cephalopods purchased from the cooperative fish market in Busan, Korea. *Korean J Parasitol* 49:39. doi: 10.3347/kjp.2011.49.1.39
- Chord-Auger S, Miegerville M, Le Pape P (1995) Anisakiasis in the Nantes area. From fishmongers' stalls to medical offices. *Parasite* 2:395-400.
- Chung YB, Lee J (2014) Clinical Characteristics of gastroallergic anisakiasis and diagnostic implications of immunologic tests. *Allergy Asthma Immunol Res* 6:228. doi: 10.4168/aaair.2014.6.3.228
- Cipriani P, Acerra V, Bellisario B, et al (2016) Larval migration of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy, *Engraulis encrasicolus*: implications to seafood safety. *Food Control* 59:148–57. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2015.04.043
- Cipriani P, Sbaraglia GL, Paoletti M, et al (2017) The Mediterranean European hake, *Merluccius merluccius*.

- detecting drivers influencing the *Anisakis* spp. larvae distribution. Fish Res.
- Cipriani P, Smaldone G, Acerra V, et al (2015) Genetic identification and distribution of the parasitic larvae of *Anisakis pegreffii* and *Anisakis simplex* (s. s.) in European hake *Merluccius merluccius* from the Tyrrhenian Sea and Spanish Atlantic coast: implications for food safety. Int J Food Microbiol 198:1–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.019
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Mol Ecol 9:1657–1659. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x
- Cocheton JJ, Cabou I, Lecomte I (1991) Anisakiasis and *Anisakis* infections. Ann Médecine Interne 142:121–30.
- Codex Alimentarius Commission (1995). Codex general standard for quick frozen fish fillets. CODEX STAN 190-1995.
- Codex Alimentarius Commission (1989). Codex standard for quick frozen blocks of fish fillet, minced fish flesh and mixtures of fillets and minced fish flesh. CODEX STAN 165-1989.
- Cohen DM, Inada T, Iwamoto T, et al (1990) FAO species catalogue. Vol. 10. Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. FAO Fisheries Synopsis No. 125, FAO, Rome.
- Commission Decision 93/140/EEC (19 January 1993) Laying down the detailed rules relating to the visual inspection for the purpose of detecting parasites in fishery products. OJ EU L56:50–2.
- Commission Regulation (EU) No. 1276/2011 (8 December 2011). Amending Annex III to Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the treatment to kill viable parasites in fishery products for human consumption. OJ EU L327:39–41.
- Commission Regulation (EC) No. 1020/2008 (17 October 2008) Amending Annexes II and III to Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific hygiene rules for food of animal origin and Regulation (EC) No. 2076/2005 as regards identification marking, raw milk and dairy products, eggs and egg products and certain fishery products. OJ EU L277:8–14.
- Commission Regulation (EC) No. 2074/2005 (05 December 2004) Laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No. 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No. 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No. 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No. 853/2004 and (EC) No. 854/2004. OJ EU L338:27–59.
- Council Regulation (EC) No. 2406/96 (26 November 1996) Laying down common marketing standards for certain fishery products. OJ EU L334.
- Couture C, Measures L, Gagnon J, Desbiens C (2003) Human intestinal anisakiosis due to consumption of raw salmon. Am J Surg Pathol 27:1167–72. doi: 10.1097/00000478-200308000-00017
- Cowan MM (1999) Plant Products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 12:564–82.
- Criscione CD, Anderson JD, Sudimack D, et al (2007) Disentangling hybridization and host colonization in

- parasitic roundworms of humans and pigs. Proc R Soc B Biol Sci 274:2669–77. doi: 10.1098/rspb.2007.0877
- Cruz C, Barbosa C, Saraiva A (2007) Distribution of larval anisakids in blue whiting off Portuguese fish market. Helminthol 44, 21-24.
- Cuéllar M, Fontanilla JC, Pérez-Fuentes J, Pérez-Tauler MP (1991) Biología y epidemiología de la anisakidosis larvaria. Enfermedad del arenque. Ciencias Vet 4: 57–63
- D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Brandonisio O, et al (1999) Diagnosis of a case of gastric anisakidosis by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. Parasitologia 41:591–3.
- D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP, et al (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. Int J Parasitol 30:223–6.
- D'Amico P, Malandra R, Costanzo F, et al (2014) Evolution of the *Anisakis* risk management in the European and Italian context. Food Res Int 64:348–62. doi: 10.1016/j.foodres.2014.06.038
- Da Cruz AR, De Sousa Souto PC, Kusano C, et al (2010) Endoscopic imaging of the first clinical case of anisakidosis in Brazil. Sci Parasitol 11:97–100.
- Daschner A, Alonso-Gómez A, Caballero T, et al (1998) Gastric anisakiasis: an underestimated cause of acute urticaria and angio-oedema? Br J Dermatol 139:822–8.
- Daschner A, Alonso-Gómez A, Cabañas R, et al (2000a) Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. J Allergy Clin Immunol 105:176–81.
- Daschner A, Alonso-Gómez A, López Serrano C (2000b) What does *Anisakis simplex* parasitism in gastro-allergic anisakiasis teach us about interpreting specific and total IgE values? Allergol Immunopathol 28:67–70.
- Daschner A, Pascual CY (2005) *Anisakis simplex*: sensitization and clinical allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol 5:281–5.
- Davey JT (1971) A Revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridata). J Helminthol 45:51. doi: 10.1017/S0022149X00006921
- Del Olmo Escribano M, Cózar Ibáñez A, Martínez de Victoria JM, Ureña Tirao C (1998) Anisakiasis a nivel ileal. Rev Esp Enferm Dig 90:120–3.
- Del Olmo Martínez L, González de Canales P, Sanjosé González G (2000) Anisakiasis gástrica diagnosticada por endoscopia. An Med Interna 17:429–31.
- De la Fuente E, Agudo S, Blasco S, et al (2013) CC003: caso de anisakiasis gastroalérgica documentado endoscópicamente. En: Casos Clínicos. Rev Esp Enferm Dig 105:245-380.
- De la Torre Molina R, Pérez Aparicio J, Hernández Bienes M, et al (2000) Anisakiasis in fresh fish sold in the north of Córdoba. Rev Esp Salud Publica 74:517–26.
- De Ley P, Blaxter M (2004) A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular

- trees, and translating clades into ranks and taxa. In: Cook R, Hunt D (eds), Nematology monographs and perspectives. E.J. Brill, Leiden, pp 633–53.
- De Ley P, Blaxter M (2002) Systematic position and phylogeny. In: Lee D (ed) The biology of nematodes. Taylor & Francis, London, pp 1–30.
- De Sousa JP, de Oliveira KÁ, de Figueiredo RC, de Souza EL (2015) Influence of carvacrol and 1,8-cineole on cell viability, membrane integrity, and morphology of *Aeromonas hydrophila* cultivated in a vegetable-based broth. *J. Food Prot.* 78:424-9.
- Del Rey Moreno A (2003) Estudio parasitológico, epidemiológico y clínico de la anisakidosis en la comarca de Antequera. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- De Vicente MC, López C, Fulton, T (eds) (2004) Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: módulo de aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia.
- Dell'Agli M, Galli G V, Corbett Y, et al (2009) Antiplasmodial activity of *Punica granatum* L. fruit rind. *J Ethnopharmacol* 125:279–85. doi: 10.1016/j.jep.2009.06.025
- Detwiler JT, Criscione CD (2010) An infectious topic in reticulate evolution: Introgression and hybridization in animal parasites. *Genes (Basel)* 1:102–23. doi: 10.3390/genes1010102
- Di Pasqua R, De Feo V, Villani F, Mauriello G (2005) *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Ann Microbiol* 55:139-43.
- Diawara A, Drake LJ, Suswillo RR, et al (2009) Assays to detect  $\beta$ -tubulin codon 200 polymorphism in *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides*. *PLoS Negl Trop Dis* 3:e397. doi: 10.1371/journal.pntd.0000397
- Dkhil MA (2013) Anti-coccidial, anthelmintic and antioxidant activities of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract. *Parasitol Res* 112:2639–46. doi: 10.1007/s00436-013-3430-3
- Dussault D, Vu KD, Lacroix M (2014) In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Sci* 96:514–20. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.08.015
- Dziekonska-Rynko J, Rokicki J, Jablonowski Z (2002) Effects of ivermectin and albendazole against *Anisakis simplex* in vitro and in guinea pigs. *J Parasitol* 88:395–8. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0395:EOIAAA]2.0.CO;2
- Earl DA, VonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–61. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- EFSA-BIOHAZ (2010) Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA J* 8:1543. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1543
- El-Sherbini GM, Ibrahim KM, El Sherbiny ET, et al (2010) Efficacy of *Punica granatum* extract on in-vitro and in-vivo control of *Trichomonas vaginalis*. *J Egypt Soc Parasitol* 40:229–44.

- Endo EH, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, et al (2010) Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. Res Microbiol 161:534–40. doi: 10.1016/j.resmic.2010.05.002
- Eskesen A, Strand EA, Andersen SN, et al (2001) Anisakiasis presenting as an obstructive duodenal tumor. A Scandinavian case. Scand J Infect Dis 33:75–6.
- Esteve C, Resano A, Díaz-Tejeiro P, Fernández-Benítez M (2000) Eosinophilic gastritis due to *Anisakis*: a case report. Allergol Immunopathol 28:21–3.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Mol Ecol 14:2611–20. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Evans JA, Foster AM, Brown T (2014). Temperature control in domestic re-frigerators and freezers. 3rd IIR International Conference on Sustainability and the Cold Chain. Refrigeration Science and Technology: Proceedings 142e149.
- Fadevi A, Barzegar MH, Azizi, Bayat M (2005) Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. Food Sci Technol Int 11:113-19.
- Fagerholm HP (1989) Intra-specific variability of the morphology in a single population of the seal parasite *Contraecum osculatum* (Rudolphi) (Nematoda, Ascaridoidea), with a redescription of the species. Zool Scr 18:33–41.
- FAO (2018) The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals. 210.
- FAO (2016) El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma
- Farjallah S, Busi M, Mahjoub MO, et al (2008b) Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the Moroccan and Mauritanian coasts. Parasitol Int 57:430–6. doi: 10.1016/j.parint.2008.05.002
- Farjallah S, Slimane B Ben, Blel H, et al (2006) Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennooides* and *Phycis phycis*) from the eastern Mediterranean coasts in Tunisia. Parasitol Res 100:11–7. doi: 10.1007/s00436-006-0227-7
- Farjallah S, Slimane B Ben, Busi M, et al (2008a) Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. Parasitol Res 102:371–9. doi: 10.1007/s00436-007-0771-9
- Farkas J (1998) Irradiation as a method for decontaminating food: a review. Int J Food Microbiol 4:189-204.
- FDA (2011) Fish and Fisheries products hazards and controls guidance (4th ed).
- FDA (2001) Processing parameters needed to control pathogens in cold smoked fish. Potential hazards in cold-smoked fish: parasites US. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, Rockville, MD, pp 5-14.
- Feldmeier H, Poggensee G, Poggensee U (1993) The epidemiology, natural history, and diagnosis of human



- anisakiasis. Eur Microbiol 2: 30-8.
- Felsenstein J (1980) PHYLIP, PHYLogeny Inference Package. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip>
- Fernández M, Aznar FJ, Montero FE, Raga JA (2005) Endoparasites of the blue whiting, *Micromesistius poutassou* from north-west Spain. J Helminthol 79:15-21.
- Fernández J, Villalba C (1985) *Proleptus carvajali* n. sp. (Nematoda: Spiruroidea), new records and systematic list of the parasitic nematodes from fishes in Chile. Rev Chil Hist Nat 58:109-20.
- Fernández de Corres L, Audicana M, Del Pozo MD, et al (1996) *Anisakis simplex* induces not only anisakiasis: report on 28 cases of allergy caused by this nematode. J Investig Allergol Clin Immunol 6:315-9.
- Field-Cortazares J, Calderón-Campos R (2009) Intoxicación por Anisakis. Bol Clin Hosp Infant Edo Son 26:43-7.
- Filauro M, Rollandi GA, Cassola G, et al (2011) Gastrointestinal bleeding due to suspected anisakiasis: challenging differential diagnosis for a rare disease. Updates Surg 63:213-7. doi: 10.1007/s13304-011-0055-x
- Fioravanti ML, Caffara M, Florio D, et al (2006) Anisakiasis in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) and sardines (*Sardina pilchardus*) caught along the Adriatic coast.
- Fontenelle G, Knoff M, Felizardo NN, et al (2016) Anisakid larva parasitizing *Plagioscion squamosissimus* in Marajó Bay and Tapajós River, state of Pará, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 25:492-6. doi: 10.1590/s1984-29612016034
- Fontenelle G, Knoff M, Felizardo NN, et al (2013) Nematodes of zoonotic importance in *Cynoscion guatucupa* (Pisces) in the state of Rio de Janeiro. Rev Bras Parasitol Vet 22:281-284. doi: 10.1590/S1984-29612013005000019
- Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani I, et al (2015) Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*. Microb Ecol Health Dis 1:1-7.
- Fraj-Lázaro J, Remacha-Tomey B, Colás-Sanz C, et al (1998) *Anisakis*, anisakiasis and IgE-mediated immunity to *Anisakis simplex*. J Investig Allergol Clin Immunol 8:61-3.
- Fredericksen DW, Specian RD (1981) The value of cuticular fine structure in identification of juvenile anisakine nematodes. J. Parasitol 67:647-55.
- Fumarola L, Monno R, Ierardi E, et al (2009) *Anisakis pegreffii* etiological agent of gastric infections in two Italian women. Foodborne Pathog Dis 6:1157-9. doi: 10.1089/fpd.2009.0325
- Ganley ARD, Kobayashi T (2007) Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. Genome Res 17:184-91. doi: 10.1101/gr.5457707
- García-García RM, Palou-García E (2008) Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Temas Sel Ing Aliment 2:41-51.
- Gasser RB, Chilton NB, Hoste H, Beveridge I (1993) Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of

- parasitic helminths. *Nucleic Acids Res* 21:2525–6.
- Geraci JR, St. Aubin DJ (1987) Effects of parasites on marine mammals. *Int J Parasitol* 17:407–14. doi: 10.1016/0020-7519(87)90116-0
- Gestal C, Belcari P, Abollo E, Pascual S (1999) Parasites of cephalopods in the northern Tyrrhenian Sea (western Mediterranean): new host records and host specificity. *Sci Mar* 63:39–43.
- Giarratana F, Giuffrida A, Gallo F, et al (2012) Study of the resistance variability of *Anisakis* larvae to some technological stressors. In: Pugliese A, Boiti C, Gaiti A (eds) *Veterinary Science: Current Aspects in Biology, Animal Pathology, Clinic and Food Hygiene*, 2012th edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 155–159.
- Giarratana F, Muscolino D, Beninati C, et al (2014) Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. *Exp Parasitol* 142:7–10. doi: 10.1016/j.exppara.2014.03.028
- Giarratana F, Muscolino D, Ziino G, et al (2017) Activity of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil against L3 *Anisakis* larvae type 1. *Asian Pac J Trop Med* 10:461–5. doi: 10.1016/j.apjtm.2017.05.005
- Godínez-González C, Roca-Geronès X, Cancino-Faure B, et al (2017) Quantitative SYBR Green qPCR technique for the detection of the nematode parasite *Anisakis* in commercial fish-derived food. *Int J Food Microbiol* 261:89–94. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.012
- Gómez-Morales MA, Martínez Castro C, Lalle M, et al (2017) UV-press method versus artificial digestion method to detect Anisakidae L3 in fish fillets: comparative study and suitability for the industry. *Fish Res*. doi: 10.1016/j.fishres.2016.12.011
- González-Muñoz M, Luque R, Nauwelaers F, Moneo I (2005) Detection of *Anisakis simplex*-induced basophil activation by flow cytometry. *Cytom Part B Clin Cytom* 68B:31–6. doi: 10.1002/cyto.b.20070
- González Quijada S, González Escudero R, Arias García L, et al (2005) Manifestaciones digestivas de la anisakiasis: descripción de 42 casos. *Rev Clin Esp* 205:311–5. doi: 10.1157/13077114
- Grabda J (1976) Studies on the life cycle and morphogenesis of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) (Nematoda: Anisakidae) cultured in vitro. *Acta Ichthyol Piscat* 6:119–39.
- Granger R, Passet J, Teulade-Arbousset G (1973) A propos d'une labi\_ee cosmopolite: *Lavandula stoechas* L. *Trav Soc Pharm* 33:335–60.
- Guarneri F, Guarneri C, Benvenega S (2007) Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of Anis 2 and Anis 3. *Int J Dermatol* 46:146–50. doi: 10.1111/j.1365-4632.2006.03091.x
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, et al (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–21. <http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>.
- Guleria S, Tiku AK, Koul A, et al (2013) Antioxidant and antimicrobial properties of the essential oil and extracts of *Zanthoxylum alatum* grown in North-Western Himalaya. *Sci World J*. doi: 10.1155/2013/790580
- Gutiérrez-Galindo JF, Osanz-Mur AC, Mora-Ventura MT (2010) Occurrence and infection dynamics of anisakid larvae in *Scomber scombrus*, *Trachurus trachurus*, *Sardina pilchardus*, and *Engraulis encrasicolus* from

- Tarragona (NE Spain). Food Control 21:1550–1555. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.03.019
- Gutiérrez R, Cuéllar C (2002) Immunoglobulins anti-*Anisakis simplex* in patients with gastrointestinal diseases. J Helminthol 76:131–6. doi: 10.1079/JOH2001104
- Hansen TVA, Nejsum P, Olsen A, Thamsborg SM (2013) Genetic variation in codons 167, 198 and 200 of the beta-tubulin gene in whipworms (*Trichuris* spp.) from a range of domestic animals and wildlife. Vet Parasitol 193:141–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.003
- Hassan SM (2008) Antimicrobial activities of saponin-rich guar meal extract. Dissertation. Texas A&M University.
- Heffler E, Sberna ME, Sichili S, et al (2016) High prevalence of *Anisakis simplex* hypersensitivity and allergy in Sicily, Italy. Ann Allergy, Asthma Immunol 116:146–50. doi: 10.1016/j.anai.2015.12.014
- Heimann M (1997) Webcutter 2.0. <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>.
- Henríquez-Santana A, Villafruela-Cives M (2009) Anisakis: past, present and future. Med Clin 132:400–3. doi: 10.1016/j.medcli.2008.11.022
- Hermida M, Mota R, Pacheco CC, et al (2012) Infection levels and diversity of anisakid nematodes in blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, from Portuguese waters. Parasitol Res 110:1919–28. doi: 10.1007/s00436-011-2718-4
- Hernandez-Prera JC, Polydorides AD (2012) Anisakidosis of the sigmoid colon disguising as metastatic carcinoma: a case report and review of the literature. Pathol Res Pract 208:433–5. doi: 10.1016/j.prp.2012.05.004
- Herrador Z, Daschner A, Perteguer MJ, Benito A (2018) Epidemiological scenario of anisakidosis in Spain based on associated hospitalizations: the tipping point of the iceberg. Clin Infect Dis. doi: 10.1093/cid/ciy853
- Hierro I, Valero A, Pérez P, et al (2004) Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. Phytomedicine 11:77–82. doi: 10.1078/0944-7113-00375
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol 66:411–53.
- Hiramatsu K, Kamiyamamoto S, Ogino H, et al (2004) Case report: a case of acute gastric anisakiasis presenting with malignant tumor-like features: a large gastric vanishing tumor accompanied by local lymph node swelling. Dig Dis Sci 49:965–9. doi: 10.1023/B:DDAS.0000034555.55739.3c
- Hochberg NS, Hamer DH (2010) Anisakidosis: Perils of the deep. Clin Infect Dis 51:806–12. doi: 10.1086/656238
- Højgaard DP (1998) Impact of temperature, salinity and light on hatching of eggs of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae), isolated by a new method, and some remarks on survival of larvae. Sarsia 83:21–8. doi: 10.1080/00364827.1998.1041366
- Holst JC, Nielsen F, Hodneland K, Nylund A (1993) Observations of the biology and parasites of postsmolt Atlantic salmon, *Salmo salar*, from the Norwegian sea. J Fish Biol 42:962–6.

- Hotez P, Cappello M, Hawdon J, et al (1994) Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *J Infect Dis* 170:918–26.
- Hrabar J, Bočina I, Gudan Kurilj A, et al (2017) Gastric lesions in dolphins stranded along the Eastern Adriatic coast. *Dis Aquat Organ* 125:125–39. doi: 10.3354/dao03137
- Hu Y, Xia Z, Sun Q, et al (2005) A new approach to the pharmacological regulation of memory: sarsasapogenin improves memory by elevating the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memory-deficit rat models. *Brain Res* 1060:26–39.
- Huang W (1988) Anisakidés et anisakidoses humaines. *Ann Parasitol Hum Comparée* 63:197–208. doi: 10.1051/parasite/1988633197
- Huang W, Bussiéras J (1988) Anisakids and human anisakiasis. 1. Bibliographic data. *Ann Parasitol Hum Comp* 63:119–32. doi: 10.1051/parasite/1988632119
- Huang W (1990) Méthodes de recherche des larves d’anisakidés dans les poissons marins. possibilités d’application à l’inspection des poissons commercialisés en région parisienne. *Rec Méd Vét* 166:895-900.
- Huss H, Roepstorff A, Karl H, Bloemsma B (1992) Handling and processing of hering infected with *Anisakis simplex*. 3rd World Congress on Foodborne Infections and intoxications, Berlin.
- Ido K, Yuasa H, Ide M, et al (1998) Sonographic diagnosis of small intestinal anisakiasis. *J Clin Ultrasound* 26:125–30.
- Iglesias L, Valero A, Benítez R, Adroher FJ (2001) In vitro cultivation of *Anisakis simplex*: pepsin increases survival and moulting from fourth larval to adult stage. *Parasitology* 123:285–91.
- Iglesias R, D’Amelio S, Ingrosso S, et al (2008) Molecular and morphological evidence for the occurrence of *Anisakis* sp. A (Nematoda, Anisakidae) in the Blainville’s beaked whale *Mesoplodon densirostris*. *J Helminthol* 82:305. doi: 10.1017/S0022149X08996978
- Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM, et al (1995) *Anisakis simplex*: stage-specific antigens recognized by mice. *J Helminthol* 69:319–24.
- Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM, et al (1993) *Anisakis simplex*: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunol* 15:243–50.
- Ikeda K, Kumashiro R, Kifune T (1989) Nine cases of acute gastric anisakiasis. *Gastrointest Endosc* 35:304–8.
- Ioli A, Leonaldi R, Gangemi C, et al (1998) A propos d’un cas d’anisakiase contractée en Sicile. *Bull Soc Pathol Exot* 91:232–4.
- Ishikura H, Kikuchi Y, Tokoyawa O, et al (1990) Skin (intra-dermal) testing using several kinds of *Anisakis* larva antigens. In: Ishikura H and Kikuchi K (eds), Intestinal anisakiasis in Japan. Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. Springer-Verlag, Tokyo, pp 159-65.
- Ishikura H, Kikuchi K, Nagasawa K, et al (1993) Anisakidae and anisakidosis. *Prog Clin Parasitol* 3:43–102.
- Jabbar A, Fong RWJ, Kok KX, et al (2013) Molecular characterization of anisakid nematode larvae from 13

- species of fish from Western Australia. *Int J Food Microbiol* 161:247–53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.012
- Jabbar A, Khoon ATW, Hui TX, et al (2012) Mutation scanning-based analysis of anisakid larvae from *Sillago flindersi* from Bass Strait, Australia. *Electrophoresis* 33:499–505. doi: 10.1002/elps.201100438
- Jasuja ND, Saxena R, Chandra S, Sharma R (2012) Pharmacological characterization and beneficial uses of *Punica granatum*. *Asian J Plant Sci* 11:251–67. doi: 10.3923/ajps.2012.251.267
- Jesus M, Martins APJ, Gallardo E, Silvestre S (2016) Diosgenin: recent highlights on pharmacology and analytical methodology. *J Anal Methods Chem* 2016:4156293. doi: 10.1155/2016/4156293
- Jira J (1998) *Medical Helminthologie*. Galen, pp 491.
- Johansson E, Aponno M, Lundberg M, van Hage-Hamsten M (2001) Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy* 56:660–6.
- Jones RE, Deardorff TL, Kayes SG (1990) *Anisakis simplex*: histopathological changes in experimentally infected CBA/J mice. *Exp Parasitol* 70:305–13.
- Jukic M, Politeo O, Maksimovic M, Milos (2007) *In vitro* acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother Res* 21:259–61.
- Jurado-Palomo J, López-Serrano MC, Moneo I (2010) Multiple acute parasitization by *Anisakis simplex*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 20:437–41.
- Jurić I, Pogorelić Z, Despot R, Mrklić I (2013) Unusual cause of small intestine obstruction in a child small intestine anisakiasis: report of a case. *Scott Med J*. doi: 10.1177/0036933012474616
- Kagei N, Isogaki H (1992) A case of abdominal syndrome caused by the presence of a large number of *Anisakis* larvae. *Int J Parasitol* 22:251–3.
- Kakizoe S, Kakizoe H, Kakizoe K, et al (1995) Endoscopic findings and clinical manifestation of gastric anisakiasis. *Am J Gastroenterol* 90:761–3.
- Kalaiarasi P, Pugalendi KV (2009) Antihyperglycemic effect of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid, aglycone of glycyrrhizin, on streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 606:269–73.
- Kang DB, Park WC, Lee JK (2014) Chronic gastric anisakiasis provoking a bleeding gastric ulcer. pISSN 2288–6575. doi: 10.4174/astr.2014.86.5.270
- Kapral C, Haditsch M, Wewalka F, et al (2009) The first case of anisakiasis acquired in Austria. *Z Gastroenterol* 47:1059–61. doi: 10.1055/s-0028-1109468
- Karl H (2008) Nematode larvae in fish on the German market: 20 years of consumer related research. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 59:107–16.
- Karl H, Baumann F, Ostermeyer U, et al (2011) *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: No indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Dis Aquat Organ* 94:201–9. doi: 10.3354/dao02317

- Karl H, Leinemann M (1993) A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products. *Arch. Leb.* 44:105–28.
- Karl H, Roepstorff A, Huss HH, Bloemsmas B (1994) Survival of *Anisakis* larvae in marinated herring fillets. *Int J Food Sci Technol* 29:661–670.
- Karmanova IV, Plashkova VV, Nechaeva OIu, Gubina VV (2002) A case of human anisakiasis in Kamchatka. *Med Parazitol* 2:32–3.
- Kasuya S, Goto C, Ohtomo H (1988) Studies on prophylaxis against anisakiasis—a screening of killing effects of extracts from foods on the larvae. *Kansenshogaku Zasshi* 62:1152–6.
- Kasuya S, Hamano H, Izumi S (1990) Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*. *Lancet* 335:665.
- Kedia A, Prakash B, Mishra PK, Dubey NK (2014) Antifungal and antiaflatoxigenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *Int J Food Microbiol* 168–169:1–7. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.008
- Kijewska A, Dzido J, Rokicki J (2009) Mitochondrial DNA of *Anisakis simplex* s.s. as a potential tool for differentiating populations. *J Parasitol* 95:1364–70. doi: 10.1645/GE-1950.1
- Kijewska A, Rokicki J, Sitko J, Wegrzyn G (2002) Ascaridoidea: a simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. *Exp Parasitol* 101:35–9.
- Kijewska A, Słomińska M, Wegrzyn G, Rokicki J (2000) A PCR-RFLP assay for identification of *Anisakis simplex* from different geographical regions. *Mol Cell Probes* 14:349–54. doi: 10.1006/mcpr.2000.0322
- Kim KH, Eom KS, Park JK (2006a) The complete mitochondrial genome of *Anisakis simplex* (Ascaridida: Nematoda) and phylogenetic implications. *Int J Parasitol* 36:319–28. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.10.004
- Kim T, Lee B, Sohn W (2006b) Three clinical cases of cutaneous larva migrans. *Korean J Parasitol* 44:145–9.
- Kim SH, Park CW, Kim SK, et al (2013) A case of anisakiasis invading the stomach and the colon at the same time after eating anchovies. *Clin Endosc* 46:293–6. doi: 10.5946/ce.2013.46.3.293
- King KC, Stelkens RB, Webster JP, et al (2015) Hybridization in parasites: consequences for adaptive evolution, pathogenesis, and public health in a changing world. *PLoS Pathog* 11:e1005098. doi: 10.1371/journal.ppat.1005098
- Klapper R, Kuhn T, Münster J, et al (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. *Vet Parasitol* 2017:72–80.
- Kliks MM (1983) Anisakiasis in the western United States: four new case reports from California. *Am J Trop Med Hyg* 32:526–32.
- Knoff M, Carmona de São Clemente S, Gonçalves da Fonseca MC, et al (2007) Anisakidae parasitos de congrososa, *Genypterus brasiliensis* Regan, 1903 comercializados no estado do Rio de Janeiro, Brasil de interesse na saúde pública. *Parasitol Latinoam* 62:127–33. doi: 10.4067/S0717-77122007000200005
- Knoff M, Carmona São Clemente S, Gonçalves da Fonseca MC, et al (2013) Anisakidae nematodes in the

- blackfin goosefish, *Lophius gastrophysus* Miranda-Ribeiro, 1915 purchased in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Acta sci Biol sci* 129–33.
- Kotan R, Kordali S, Cakir A (2007) Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Z Naturforsch C* 62:507–13.
- Koyama T, Kobayashi A, Kumada M, et al (1969) Morphological and taxonomical studies on Anisakidae larvae found in marine fishes and squids. *Jpn J Parasitol* 18:466–87.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF (1984) Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87:1344–50.
- Kroeger M, Karl H, Simmler B, Singer P (2018) Viability test device for anisakid nematodes. *Heliyon* 4:e00552. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00552
- Kuhn T, García-Màrquez J, Klimpel S (2011) Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. *PLoS One* 6:e28642. doi: 10.1371/journal.pone.0028642
- Kuhn T, Hailer F, Palm HW, Klimpel S (2013) Global assessment of molecularly identified *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts. *Folia Parasitol* 60:123–34.
- Kuipers FC, Van Thiel PH, Roskam ET (1960) Eosinofiele flegmone van de dunne darm, veroorzaakt door een niet aan het lichaam van de mens sangepaste worm. *Ned T Genesesk* 104:422–7.
- Kwa MS, Veenstra JG, Roos MH (1994) Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol Biochem Parasitol* 63:299–303.
- Kwak SY, Yoon YH (2012) Laryngeal anisakiasis: an unusual cause of foreign-body sensation in the throat. *Otolaryngol Head Neck Surg* 147:588–9. doi: 10.1177/0194599812443512
- Lane CD, Master RN, Tietbolh RH (1988) If your uneaten food moves, take it to a doctor. *J Am Med Assoc* 260:340–1.
- Lansky EP, Newman RA (2007) *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109:177–206. doi: 10.1016/j.jep.2006.09.006
- Larrat S, Bouchard F, Séguin G, Lair S (2013) Relationship between red vent syndrome and anisakid larvae burden in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Wildl Dis* 49:229–34. doi: 10.7589/2011-10-299
- Lecis AR, Figus V, Randaccio A (1996) Indagini sulla presenza di nematodi Anisakidae in alcune specie ittiche del Golfo di Cagliari. *Biol Oggi* 10:137–44.
- Lee B, Trinh HT, Jung K, et al (2010) Inhibitory effects of steroidal timosaponins isolated from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* against passive cutaneous anaphylaxis reaction and pruritus. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 32:357–63. doi: 10.3109/08923970903383889
- Lee J Der, Chung LY, Lin RJ, et al (2017) Excretory/secretory proteases and mechanical movement of *Anisakis pegreffii* infective larvae in the penetration of BALB/c mice gastrointestinal. *Kaohsiung J Med Sci* 33:594–

601. doi: 10.1016/j.kjms.2017.08.002
- Lee M, Cheon DS, Choi C (2009) Molecular genotyping of *Anisakis* species from Korean sea fish by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Food Control* 20:623–6. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2008.09.007
- Levsen A, Cipriani P, Mattiucci S, et al (2017) *Anisakis* species composition and infection characteristics in Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*, from major European fishing grounds —reflecting changing fish host distribution and migration pattern. *Fish Res.* doi: 10.1016/J.FISHRES.2017.07.030
- Levsen A, Lunestad BT (2010) *Anisakis simplex* third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh. *Vet Parasitol* 171:247–53. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.03.039
- Levsen A, Lunestad BT, Berland B (2005) Low detection efficiency of candling as a commonly recommended inspection method for nematode larvae in the flesh of pelagic fish. *J Food Prot* 68:828–32.
- Li SW, Shiao SH, Weng SC, et al (2015) A case of human infection with *Anisakis simplex* in Taiwan. *Gastrointest Endosc* 82:757–8; discussion 758. doi: 10.1016/j.gie.2015.03.1983
- Lim H, Jung BK, Cho J, et al (2015) Molecular diagnosis of cause of anisakiasis in humans, South Korea. *Emerg Infect Dis* 21:342–4. doi: 10.3201/eid2102.140798
- Lin RJ, Wu MH, Ma YH, et al (2014) Anthelmintic activities of aporphine from *Nelumbo nucifera* Gaertn. cv. *Rosa-plena* against *Hymenolepis nana*. *Int J Mol Sci* 15:3624–39. doi: 10.3390/ijms15033624
- Llarena-Reino M, Abollo E, Regueira M, et al (2015) Horizon scanning for management of emerging parasitic infections in fishery products. *Food Control* 49:49–58. doi: 10.1016/J.FOODCONT.2013.09.005
- Llorens C, Arcos SC, Robertson L, Ramos R, et al (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
- López-Sáez MP, Zubeldia JM, Caloto M, et al (2003) Is *Anisakis simplex* responsible for chronic urticaria? *Allergy asthma Proc* 24:339–45.
- López-Serrano MC, Gomez AA, Daschner A, et al (2000) Gastroallergic anisakiasis: findings in 22 patients. *J Gastroenterol Hepatol* 15:503–6.
- López Peñas D, Ramírez Ortiz LM, del Rosal Palomeque R, et al (2000) Estudio de 13 casos de anisakiasis en la provincia de Córdoba. *Med Clin* 114:177–80. doi: 10.1016/S0025-7753(00)71235-8
- López V, Cascella M, Benelli G, et al (2018) Green drugs in the fight against *Anisakis simplex* —larvicidal activity and acetylcholinesterase inhibition of *Origanum compactum* essential oil. *Parasitol Res* 117:861-7. doi: 10.1007/s00436-018-5764-3
- López V, Gerique J, Langa E, et al (2015) Antihelmintic effects of nutmeg (*Myristica fragans*) on *Anisakis simplex* L3 larvae obtained from *Micromesistius potassou*. *Res Vet Sci* 100:148–52. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.03.033



- López-Vélez R, García A, Barros C, et al (1992) Anisakiasis en España. Descripción de 3 casos. *Enf Infecc Microbiol Clin* 10:158-61.
- Lorenzo S, Romarís F, Iglesias R, et al (2000) O-glycans as a source of cross-reactivity in determinations of human serum antibodies to *Anisakis simplex* antigens. *Clin Exp Allergy* 30:551-9.
- Louredo Méndez A, Acedo De la Rosa F, Offibas De Paz V, et al (1997) Anisakidosis of the colon as a cause of acute abdomen. *Rev Esp Enferm Dig* 89:403-6.
- Lozano-Maldonado J, Martín-Hita, L, Díaz-Sáez V, et al (2004) Cross-reactivity between antigens of *Anisakis simplex* s.l. and other ascarid nematodes. *Parasite* 11:219-23.
- Luoga W, Mansur F, Buttle DJ, et al (2015) The relative anthelmintic efficacy of plant-derived cysteine proteinases on intestinal nematodes. *J Helminthol* 89:165-74. doi: 10.1017/S0022149X13000692
- Limbery AJ, Cheah FY (2007) Anisakid nematodes and anisakiasis In: K.D. Murrell, B. Fried (eds), *Food-borne Parasitic Zoonoses: Fish and Plant-borne Parasites*. Springer Science, New York, pp 185-208.
- MacKenzie K, Campbell N, Mattiucci S, et al (2008) Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* L. *Fish Res* 89:136-45.
- Macpherson E (1978) Régimen alimentario de *Phycis blennoides* (Brünich) y *Antonogadus megalokynodon* (Kolombatovic) (Pisces: Gadidae) en el Mediterráneo occidental. *Investig Pesq* 42:455-66.
- Madrid E, Galán-Puchades MT, Fuentes M V. (2012) Risk analysis of human anisakidosis through the consumption of the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, sold at Spanish supermarkets. *Foodborne Pathog Dis* 9:934-8. doi: 10.1089/fpd.2012.1196
- MagnaVal JF, Berry A, Nadrigny M (2002) Anaphylactic shock revealing anisakiasis. *Presse Med* 31:1309-11.
- Mameren JV, Houwing H (1968) Effect of irradiation on *Anisakis* larvae in salted herring, Elimination of Harmful Organisms from Food and Feed by Irradiation. Report of a Panel.
- Manfredi MT, Crosa G, Galli P, Ganduglia S (2000) Distribution of *Anisakis simplex* in fish caught in the Ligurian Sea. *Parasitol Res* 86:551-3.
- Manfredi M, Marone M, Traldi G (1994) Anisakidae nei prodotti itici importanti dopo la caduta delle barrier doganali nella ce quale ruolo per il Servizio Sanitario Nazionale. *Obiettivi e Documenti Veterinari* 15:49-53.
- Marquardt WC (2000) Anisakidosis. In: Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB (eds) *Parasitology and vector biology*. Academic Press, San Diego, Ca, pp 442-4.
- Marques JF, Cabral HN, Busi M, D'Amelio S (2006) Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes off the Portuguese coast. *J Helminthol* 80:47-51.
- Martín-Sánchez J, Artacho-Reinoso ME, Díaz-Gavilán M, Valero-López A (2005) Structure of *Anisakis simplex* s.l. populations in a region sympatric for *A. pegreffii* and *A. simplex* s.s. Absence of reproductive isolation between both species. *Mol Biochem Parasitol* 141:155-62. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.02.005
- Martínez-Velázquez M, Castillo-Herrera GA, Rosario-Cruz R, et al (2011) Acaricidal effect and chemical

- composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res* 108:481–7. doi: 10.1007/s00436-010-2069-6
- Matsuda H, Pongpiriyadacha Y, Morikawa T, et al (2003) Protective effects of steroid saponins from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirement for activity and mode of action. *Bioorganic Med Chem Lett* 13:1101–6. doi: 10.1016/S0960-894X(03)00052-0
- Matsuoka H, Nakama T, Kisanuki H, et al (1994) A case report of serologically diagnosed pulmonary anisakiasis with pleural effusion and multiple lesions. *Am J Trop Med Hyg* 51:819–22.
- Matsuura H, Moritou Y (2017) Gastric anisakiasis. *Int J Med* 110:251. doi: 10.1093/qjmed/hcx009
- Mattiucci S, Acerra V, Paoletti M, et al (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* 143:998–1011. doi: 10.1017/S0031182016000330
- Mattiucci S, Cipriani P, Levens A, et al (2018) Molecular epidemiology of *Anisakis* and Anisakiasis: an ecological and evolutionary Road Map, 1st edn. Elsevier Ltd.
- Mattiucci S, Cipriani P, Webb SC, et al (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). *J Parasitol* 100:199–214. doi: 10.1645/12-120.1
- Mattiucci S, Colantoni A, Crisafi B, et al (2017) IgE sensitization to *Anisakis pegreffii* in Italy: comparison of two methods for the diagnosis of allergic anisakiasis. *Parasite Immunol* 39:e12440. doi: 10.1111/pim.12440
- Mattiucci S, Fazii P, De Rosa A, et al (2013) Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. *Emerg Infect Dis* 19:496–509. doi: 10.3201/eid1903.121017
- Mattiucci S, Nascetti G (2008) Chapter 2 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* pp 47–148.
- Mattiucci S, Nascetti G (2007) Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from Boreal and Austral hemispheres. *Vet Parasitol* 148:43–57. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.05.009
- Mattiucci S, Nascetti G (2006) Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite* 13:99–113. doi: 10.1051/parasite/2006132099
- Mattiucci S, Nascetti G, Bullini L, et al (1986) Genetic structure of *Anisakis physeteris*, and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). *Parasitology* 93:383–7.
- Mattiucci S, Nascetti G, Clanchi R, et al (1997) Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J Parasitol* 83:401–16.
- Mattiucci S, Nascetti G, Dailey M, et al (2005) Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst*

- Parasitol 61:157–71. doi: 10.1007/s11230-005-3158-2
- Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, et al (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). Syst Parasitol 51:159–70.
- Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, et al (2001) Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). Int J Parasitol 31:9–14.
- Mattiucci S, Paoletti M, Borroni F, et al (2011) First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. BMC Infect Dis 11:82. doi: 10.1186/1471-2334-11-82
- 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. Syst Parasitol 74:199–217. doi: 10.1007/s11230-009-9212-8
- McGladdery SE (1986) *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) infection of the musculature and body cavity of atlantic herring (*Clupea harengus*). Can J Fish Aquat Sci 43:1312-7. doi.org/10.1139/f86-164
- Melo FT de V, Rodrigues RAR, Giese EG, et al (2014) Histopathologic aspects in *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1940) induced by *Neoechinorhynchus veropesoi*, metacestodes and anisakidae juveniles. Brazilian J Vet Parasitol Orgao Of do Col Bras Parasitol Vet 23:224–30.
- Mendoza L, Wilkens M, Urzúa A (1997) Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some *Chilean Pseudognaphalium* (Asteraceae). J Ethnopharmacol 58:85–8. doi: 10.1016/S0378-8741(97)00084-6
- Merhdana F, Buchmann K (2017) Excretory/secretory products of anisakid nematodes: biological and pathological roles. Acta Vet Scand 59:42. doi: 10.1186/s13028-017-0310-3
- Milligan RJ (2008) The Occurrence and Behaviour of *Pseudoterranova decipiens* and *Anisakis simplex* (Nematoda) in *Gadus morhua* and their impacts on commercial processing. MSc(R) thesis. University of Glasgow.
- Mladineo I, Bušelić I, Hrabar J, et al (2017a) Population parameters and mito-nuclear mosaicism of *Anisakis* spp. in the Adriatic Sea. Mol Biochem Parasitol 212:46–54. doi: 10.1016/j.molbiopara.2017.01.003
- Mladineo I, Poljak V (2014) Ecology and genetic structure of zoonotic *Anisakis* spp. from adriatic commercial fish species. Appl Environ Microbiol 80:1281–90. doi: 10.1128/AEM.03561-13
- Mladineo I, Popović M, Drmić-Hofman I, Poljak V (2016) A case report of *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) identified from archival paraffin sections of a Croatian patient. BMC Infect Dis 16:42. doi: 10.1186/s12879-016-1401-x
- Mladineo I, Šimat V, Miletić J, et al (2012) Molecular identification and population dynamic of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) isolated from the European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Adriatic Sea. Int J Food Microbiol 157:224–9. doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2012.05.005
- Mladineo I, Trumbić Ž, Hrabar J, et al (2018) Efficiency of target larvicides is conditioned by ABC-mediated

- transport in the zoonotic nematode *anisakis pegreffii*. Antimicrob Agents Chemother 62:1–14. doi: 10.1128/AAC.00916-18
- Mladineo I, Trumbić Ž, Radonić I, et al (2017b) *Anisakis simplex* complex: ecological significance of recombinant genotypes in an allopatric area of the Adriatic Sea inferred by genome-derived simple sequence repeats. Int J Parasitol 47:215–23. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.11.003
- Molina Fernández D (2018) Epidemiología molecular y desarrollo de anisákidos. Expresión diferencial de la actividad proteolítica en especies gemelas de *Anisakis simplex* s.l.. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Molina-Fernández D, Malagón D, Gómez-Mateos M, et al (2015) Fishing area and fish size as risk factors of *Anisakis* infection in sardines (*Sardina pilchardus*) from Iberian waters, southwestern Europe. Int J Food Microbiol 203:27–34. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.024
- Molina-Fernández D, Rubio-Calvo D, Adroher FJ, Benítez R (2018) Molecular epidemiology of *Anisakis* spp. in blue whiting *Micromesistius poutassou* in eastern waters of Spain, western Mediterranean Sea. Int J Food Microbiol 282:49–56. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.026
- Molina-García AD and Sanz PD (2002) *Anisakis simplex* larvae killed by high hydrostatic processing. J Food Protect 65:383–8.
- Moneo I, Carballeda-Sangiao N, González-Muñoz M (2017) New perspectives on the diagnosis of allergy to *Anisakis* spp. Curr Allergy Asthma Rep 17:27. doi: 10.1007/s11882-017-0698-x
- Monroy Gómez C, Santamaría Marín A, Tomé IC, et al (2014) Gastritis aguda por *Anisakis*. 7:56–8.
- Montalto M, Miele L, Marcheggiano A, et al (2005) *Anisakis* infestation: a case of acute abdomen mimicking Crohn's disease and eosinophilic gastroenteritis. Dig Liver Dis 37:62–4. doi: 10.1016/j.dld.2004.05.014
- Moore D, Girdwood R, Chiodini P (2002) Treatment of anisakiasis with albendazole. Lancet 360:54.
- Morsy K, Badr AM, Abdel-Ghaffar F, et al (2017) Pathogenic potential of different administration routes for fresh, frozen and thermally treated *Anisakis simplex* (L3) (Nematoda: Anisakidae) into Wistar rats: histopathological study. J Nematol 49:427-36.
- Moschella CM, Mattiucci S, Mingazzini P, et al (2004) Intestinal anisakiasis in Italy: case report. J Helminthol 78:271–3.
- Motta MR, Pinheiro DC, Carvalho VL, et al (2008) Gastric lesions associated with the presence of *Anisakis* spp. Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in cetaceans stranded on the coast of Ceara, Brazil.
- Mudry J, Lefebvre P, Dei-Cas E, et al (1986) Human anisakiasis: 5 cases in northern France. Gastroenterol Clin Biol 10:83–7.
- Muraoka A, Suehiro I, Fujii M, et al (1996) Acute gastric anisakiasis: 28 cases during the last 10 years. Dig Dis Sci 41:2362–5.
- Murata R, Suzuki J, Sadamasu K, Kai A (2011) Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. Parasitol Int 60:193–8. doi: 10.1016/j.parint.2011.02.008

- Nadler SA, D'Amelio S, Dailey MD, et al (2005) Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from northern Pacific marine mammals. *J Parasitol* 91:1413–29. doi: 10.1645/GE-522R.1
- Nadler SA, Hudspeth DS (2000) Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J Parasitol* 86:380–93. doi: 10.1645/0022-3395(2000)086[0380:POTANA]2.0.CO;2
- Nadolna K, Podolska M (2014) Anisakid larvae in the liver of cod (*Gadus morhua*) L. from the southern Baltic Sea. *J Helminthol* 88:237–246. doi: 10.1017/S0022149X13000096
- Nakata H, Takeda K, Nakayama T (1980) Radiological diagnosis of acute gastric anisakiasis. *Radiology* 135:49–53. doi: 10.1148/radiology.135.1.7360979
- Namiki M, Morooka T, Kawauchi H, et al (1969) Endoscopic observation of anisakis larvae in the stomach and some interesting findings. *Gastroenterol Endosc* 12:302.
- Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, et al (1986) Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida:Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *Int J Parasitol* 16:633–40.
- Navarro Cantarero E, Carro Alonso B, Castillo Lario C, Fernández Gómez JA (2005) Diagnosis of *Anisakis* infestation: experience in our environment. *Allergol Immunopathol* 33:27–30.
- Navas A (2012) Nematodos. In: Vargas P, Zardoya R (eds) *El Árbol de la vida: sistemática y evolución de seres vivos*. Madrid, pp 240–51
- Nawa Y, Hatz C, Blum J (2005) Sushi delights and parasites: the risk of fishborne and foodborne parasitic zoonoses in Asia. *Clin Infect Dis* 41:1297–303. doi: 10.1086/496920
- Nieuwenhuizen N, Lopata AL, Jeebhay MF, et al (2006) Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 117:1098–105. doi: 10.1016/j.jaci.2005.12.1357
- Nilsen H, Heia K, Sivertsen A (2008). Detection of parasites in fish: developing an industrial solution. *Infofish International* 3:26-35.
- Noh JH, Kim B-J, Kim SM, et al (2003) A case of acute gastric anisakiasis provoking severe clinical problems by multiple infection. *Korean J Parasitol* 41:97. doi: 10.3347/kjp.2003.41.2.97
- Ogata M, Tamura S, Matsunoya M (2015) Sonographic diagnosis of intestinal anisakiasis presenting as small bowel obstruction. *J Clin Ultrasound* 43:283–7. doi: 10.1002/jcu.22194
- Ojeda Torrejón AJ, Collado Jara A, Salas Vázquez M (2001) Investigación de parásitos en bacaladillas capturadas en la Bahía de Cádiz. *Med Gen* 38:808–11.
- Oliva ME, Castro RE, Burgos R (1996) Parasites of the flatfish *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) (Pleuronectiformes) from Northern Chile. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:301–6. doi: 10.1590/S0074-02761996000300009
- Orecchia P, Paggi L, Mattiucci S, et al (1986) Electrophoretic identification of larvae and adults of *Anisakis*

- (Ascaridida:Anisakidae). J Helminthol 60:331–9.
- Orós J, Torrent A, Calabuig P, Déniz S (2005) Diseases and causes of mortality among sea turtles stranded in the Canary Islands, Spain (1998-2001). Dis Aquat Organ 63:13–24. doi: 10.3354/dao063013
- Orr IM, Miller AA, Russell JYW (1954) Eosinophilic infiltration of the stomach and bowel. Postgrad Med J 30:485-93.
- Osanz Mur AC (2001) Presencia de larvas de anisákidos (Nematoda: Ascaridoidea) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona. PhD Thesis. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Oshima T (1972) Anisakis and anisakiasis in Japan and adjacent area. In: Morishita K, Komiya Y, Matsubayashi H (eds), Progress of Medical Parasitology in Japan. Meguro Parasitological Museum, Tokyo, pp 301–93.
- Oshima T (1987) Anisakiasis - is the sushi bar guilty? Parasitol Today 3:44–8.
- Oshima T, Nakazawa M, Sugiyama Y (1990) Effect of mebendazole de *Anisakis simplex* larvae *in vitro* and *in vivo*. Proceeding of the 7<sup>th</sup> International Congress of Parasitology. Bull Soc Fr Parasitol 8 suppl 2:1058.
- Pacios E, Arias-Díaz J, Zuloaga J, et al (2005) Albendazole for the treatment of anisakiasis ileus. Clin Infect Dis 41:1825–26. doi: 10.1086/498309
- Page AP, Stepek G, Winter AD, Pertab D (2014) Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? Int J Parasitol Drugs Drug Resist 4:133–41. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.05.003
- Paggi L, Nascetti G, Webb SC, et al (1998) A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae) from beaked whales (Ziphiidae): allozyme and morphological evidence. Syst Parasitol 40:161–74. doi: 10.1023/A:1006093201920
- Palomera I, Olivar MP, Salat J, et al (2007) Small pelagic fish in the NW Mediterranean Sea: an ecological review. Prog Oceanogr 74:377–96.
- Paltridge GP (1984) Anisakiasis: a new New Zealand disease. NZ Med J 97:558-9.
- Panebianco A, Lo Schiavo A (1985) Ricerca di larve di Anisakidi in aringhe salate e affumicate del commercio. Considerazioni di carattere ispettivo. Clin Vet 108:180–4.
- Pekmezci GZ (2014) Occurrence of *Anisakis simplex* sensu stricto in imported Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) represents a risk for Turkish consumers. Int J Food Microbiol 185:64–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.018
- Perdiguero-Alonso D, Montero FE, Raga JA, Kostadinova A (2008) Composition and structure of the parasite faunas of cod, *Gadus morhua* L. (Teleostei: Gadidae), in the North East Atlantic. Parasit Vectors 1:23. doi: 10.1186/1756-3305-1-23
- Pereira-Bueno JM (1992) Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiosis. Consejería de Sanidad y Bienestar Social, Junta de Castilla y León, Valladolid.
- Pérez-Pérez C, Hernández-Villegas MM, De la Cruz-Burelo P, et al (2014) *In vitro* anthelmintic effect of methanolic leaf extract of *Gliricidia sepium* against gastrointestinal nematodes of sheep. Trop Subtrop Agroecosystems 17:105–11.

- Petersen F, Palm H, Möller H, Cuzi MA (1993) Flesh parasites of fish from central Philippine waters. *Dis Aquat Organ* 15:81–6.
- Petithory JC (2007) New data on anisakiasis. *Bull Acad Natl Med* 191:53–65.
- Petithory JC, Marty B (1988) L'anisakiase en France. *La Lett l'Infectiologue* 3:96–99.
- Petithory JC, Lapiere J, Rousseau M, Clique MT (1986) Diagnostic sérologique de l'anisakiase (granulome éosinophile digestif) par précipitation en milieu gélifié (ouchterlony, électrosynérèse, immunoélectrophorèse). *Med Mal Infect* 53:157–62.
- Petrić M, Mladineo I, Šifner SK (2011) Insight into the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda: Ommastrephidae) feeding ecology: is there a link between helminth parasites and food composition? *J Parasitol* 97:55–62. doi: 10.1645/GE-2562.1
- Petrie A, Wootten R, Bruno D, et al (2005) A survey of *Anisakis* and *Pseudoterranova* in Scottish fisheries and the efficacy of current detection methods. [www.foodbase.org.uk/admin/tools/reportdocuments/306-1-618\\_Final\\_Reports\\_S14008\\_Anisakis-pdf](http://www.foodbase.org.uk/admin/tools/reportdocuments/306-1-618_Final_Reports_S14008_Anisakis-pdf)
- Picó-Durán G, Pulleiro-Potel L, Abollo E, et al (2016) Molecular identification of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in commercial cephalopods from the Spanish Mediterranean coast. *Vet Parasitol* 220:47–53. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.02.020
- Pinel C, Beaudévin M, Chermette R, et al (1996) Gastric anisakidosis due to *Pseudoterranova decipiens* larva. *Lancet* 347:1829.
- Pinkus GS, Coolidge C, Little MD (1975) Intestinal anisakiasis. First case report from North America. *Am J Med* 59:114–20.
- Piras MC, Tedde T, Garippa G, et al (2014) Molecular and epidemiological data on *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in commercial fish caught off northern Sardinia (western Mediterranean Sea). *Vet Parasitol* 203:237–40. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.02.003
- Ponferrada A, Matilla A, Borrego GM, et al (2005) Hemoperitoneo espontáneo secundario a yeyunoileítis por *Anisakis*. *Rev Esp Enferm Dig* 97:292.
- Pontes T, D'Amelio S, Costa G, Paggi L (2005) Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. *J Parasitol* 91:1430–4. doi: 10.1645/GE-565R1.1
- Pontone S, Leonetti G, Guaitoli E, et al (2012) Should the host reaction to anisakiasis influence the treatment? Different clinical presentations in two cases. *Rev Esp Enferm Dig* 104:607–10.
- Prakash B, Shukla R, Singh P, Kumar A, Mishra PK, Dubey NK. 2010. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *Int J Food Microbiol* 142:114–9.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–59.

- Puente P, Anadón AM, Rodero M, et al (2008) *Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. *Exp Parasitol* 118:271–4. doi: 10.1016/j.exppara.2007.07.002
- Qin Y, Zhao Y, Ren Y, et al (2013) Anisakiasis in China: the first clinical case report. *Foodborne Pathog Dis* 10:472–4. doi: 10.1089/fpd.2012.1325
- Quiazon KMA (2016) *Anisakis* Dujardin, 1845 infection (Nematoda: Anisakidae) in pygmy sperm whale *Kogia breviceps* Blainville, 1838 from west Pacific region off the coast of Philippine archipelago. *Parasitol Res* 115:3663–8. doi: 10.1007/s00436-016-5169-0
- 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. *Parasitol Int* 60:126–31. doi: 10.1016/j.parint.2010.11.007
- Quiazon KMA, Yoshinaga T, Ogawa K, Yukami R (2008) Morphological differences between larvae and *in vitro*-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitol Int* 57:483–9. doi: 10.1016/j.parint.2008.06.003
- Quiazon KMA, Yoshinaga T, Santos MD, Ogawa K (2009) Identification of larval *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) in Northern Japan using morphological and molecular markers. *J Parasitol* 95:1227–32. doi: 10.1645/GE-1751.1
- Raga JA, Fernández M, Balbuena JA, Aznar J (2002) Parasites. In: Perrin WF, Würsig B, Thewissen HGM (eds), *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, San Diego, CA, pp 867–76.
- Raga JA, Pantoja 2004. Proyecto Mediterráneo. Zonas de especial interés para la conservación de los cetáceos en el Mediterráneo español. Ministerio de Medio Ambiente. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid.
- Ramos L, Alonso C, Guilarte M, et al (2005) *Anisakis Simplex*-induced small bowel obstruction after fish ingestion: preliminary evidence for response to parenteral corticosteroids. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3:667–71. doi: 10.1016/S1542-3565(05)00363-0
- Real Decree 1420/2006 (19 Decembre 2006) On prevention of parasitism by *Anisakis* in fish products provided by establishments that serve food to final consumers or communities. BOE No. 302:44547–9.
- Real Decree 1437/92 (27 Decembre 1992) Laying down the health standards for the production and marketing of fishery products and aquaculture. BOE No. 11.
- Rello Yubero FJ, Adroher Auroux FJ, Valero López A (2004) Anisákidos parásitos de peces comerciales. Riesgos asociados a la salud pública. *An Real Acad Ciencias Vet Andalucía Orient* 17:173–98.
- Rello FJ, Adroher FJ, Benítez R, Valero A (2009) The fishing area as a possible indicator of the infection by anisakids in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) from southwestern Europe. *Int J Food Microbiol* 129:277–81. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.009
- Rello FJ, Adroher FJ, Valero A (2008) *Hysterothylacium aduncum*, the only anisakid parasite of sardines (*Sardina pilchardus*) from the southern and eastern coasts of Spain. *Parasitol Res* 104:117–21. doi: 10.1007/s00436-008-1168-0



- Repiso Ortega A, Alcántara Torres M, González de Frutos C, et al (2003) Anisakiasis gastrointestinal. Estudio de una serie de 25 pacientes. *Gastroenterol Hepatol* 26:341–6. doi: 10.1157/13048887
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–5.
- Riffo R (1991) La fauna de parásitos metazoos del lenguado de ojo grande *Hippoglossina macrops* Steindachner, 1876 (Pisces: Bothidae): una aproximación ecológica. *Medio Ambient* 11:54–60.
- Riu Pons F, Gimeno Beltran J, Albero Gonzalez R et al (2015) An unusual presentation of anisakiasis in the colon. *Gastrointest Endosc* 81:1050–1.
- Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, de las Heras C, et al (2010) Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle. *Foodborne Pathog Dis* 7:967–73. doi: 10.1089/fpd.2009.0517
- Romero López MC (2014) Capacidad infectiva de las larvas L3 de *Anisakis* y búsqueda de nuevos compuestos naturales activos frente a la anisakiosis. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Romero MC, Navarro MC, Martín-Sánchez J, Valero A (2014) Peppermint (*Mentha piperita*) and albendazole against anisakiasis in an animal model. *Trop Med Int Health* 19:1430–6. doi: 10.1111/tmi.12399
- Romero M del C, Valero A, Martín-Sánchez J, Navarro-Moll MC (2012) Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. *Phytomedicine* 19:520–3. doi: 10.1016/j.phymed.2012.02.005
- Romero MC, Valero A, Navarro-Moll MC, Martín-Sánchez J (2013) Experimental comparison of pathogenic potential of two sibling species *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* in Wistar rat. *Trop Med Int Health* 18:979–84. doi: 10.1111/tmi.12131
- Rosales MJ, Mascaró (1999) Acute intestinal anisakiasis in Spain: a fourth-stage *Anisakis simplex* larva.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 103–6.
- Ruckebusch Y (1977) Données numériques et miscellanées. In: *Physiologie pharmacologie thérapeutique animales*, 9th edn. Maloine SA, Paris.
- Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, et al (2015) A higher level classification of all living organisms. *PLoS One* 10:1–60. doi: 10.1371/journal.pone.0119248
- Salas CE, Gomes MTR, Hernandez M, Lopes MTP (2008) Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry* 69:2263–9. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.05.016
- Sánchez-Alonso I, Carballada-Sangiao N, González-Muñoz M, et al (2018) Pathogenic potential of *Anisakis* L3 after freezing in domestic freezers. *Food Control* 84:61–9. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.07.010
- Sánchez-Monsálvez I, de Armas-Serra C, Martínez J, et al (2005) A new procedure for marinating fresh anchovies and ensuring the rapid destruction of *Anisakis* larvae. *J Food Prot* 68:1066–72.
- Sanmartín ML, Iglesias R, Santamaría M, et al (1994) *Nematodos parásitos en peces de las costas gallegas*. Madrid

- Santoro M, Mattiucci S, Paoletti M, et al (2010) Molecular identification and pathology of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) infection in the Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Vet Parasitol* 174:65–71. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.08.018
- Sapunar J, Doerr E, Letonja T (1976) Human anisakiasis in Chile. *Bol Chil Parasitol* 31:79–83.
- Seehausen (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol Evol* 19:198–207. doi: 10.1016/J.TREE.2004.01.003
- Sequeira V, Serrano L, Neves A, et al (2010) Macroparasites as biological tags for stock identification of the bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) in Portuguese waters. *Fish Res* 106:321–28. doi: 10.1016/j.fishres.2010.08.014
- Serracca L, Cencetti E, Battistini R, et al (2013) Survey on the presence of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in fishes and squids caught in Ligurian Sea. *Vet Parasitol* 196:547–51. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.02.024
- Servicio Andaluz de Salud (2007) Conjunto mínimo básico de datos al alta hospitalaria de Analucía (CMBDA).
- Servicio Andaluz de Salud (2008) Conjunto mínimo básico de datos al alta hospitalaria de Analucía (CMBDA).
- Servicio Andaluz de Salud (2009) Conjunto mínimo básico de datos al alta hospitalaria de Analucía (CMBDA).
- Setyobudi E, Jeon CH, Lee CH, et al (2011) Occurrence and identification of *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) isolated from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. *Parasitol Res* 108:585–92. doi: 10.1007/s00436-010-2101-x
- Shamsi S, Butcher AR (2011) First report of human anisakidosis in Australia. *Med J Aust* 194:199–200.
- Shamsi S, Eisenbarth A, Saptarshi S, et al (2011) Occurrence and abundance of anisakid nematode larvae in five species of fish from southern Australian waters. *Parasitol Res* 108:927–34. doi: 10.1007/s00436-010-2134-1.
- Shrestha S, Kisino A, Watanabe M, et al (2014) Intestinal anisakiasis treated successfully with conservative therapy: importance of clinical diagnosis. *World J Gastroenterol* 20:598–602.
- Shibata E, Ueda T, Akaike G, Saida Y (2014) CT findings of gastric and intestinal anisakiasis. doi: 10.1007/s00261-014-0075-3
- Shimamura Y, Ishii N, Ego M, et al (2016a) Multiple acute infection by *A. simplex*: a case series. *Intern Med* 55:907–10. doi: 10.2169/internalmedicine.55.5628
- Shimamura Y, Muwanwella N, Chandran S, et al (2016b) Common symptoms from an uncommon infection: gastrointestinal anisakiasis. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2016:1–7. doi: 10.1155/2016/5176502
- Shiraki T (1974) Larval nematodes of family Anisakidae (Nematoda) in the northern sea of Japan as a causative agent of eosinophilic phlegmone or granuloma in the human gastro-intestinal tract. *Acta Med Biol* 22:57–98.
- Shirama M, Koga T, Ishibashi S, et al (1992) Intestinal anisakiasis: US in dagnosis. *Radiology* 185:789-93
- Silva MER, Eiras JC (2003) Occurrence of *Anisakis* sp. in fishes off the poruguese West coast and evaluation of

- its zoonotic potential. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 23:13-7.
- Šimat V, Miletić J, Bogdanović T, et al (2015) Role of biogenic amines in the post-mortem migration of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) larvae into fish fillets. *Int J Food Microbiol* 214:179–86. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.008
- Smaldone G, Marrone R, Palma G, et al (2017) Preliminary study on the inactivation of anisakid larvae in baccalà prepared according to traditional methods. *Ital J Food Saf* 6:19–22. doi: 10.4081/ijfs.2017.6964
- Smith JW (1984) The abundance of *Anisakis simplex* L3 in the body-cavity and flesh of marine teleosts. *Int J Parasitol* 14:491–5. doi: 10.1016/0020-7519(84)90030-4
- Smith JW (1989) Ulcers associated with larval *Anisakis simplex* B (Nematoda: Ascaridoidea) in the forestomach of harbour porpoises *Phocoena phocoena* (L.). *Can J Zool* 67:2270–6. doi: 10.1139/z89-319
- Smith JW, Wootten R (1978) Anisakis and anisakiasis. *Adv Parasitol* 16:93–163.
- Smrzlić IV, Valić D, Kapetanović D, et al (2012) Molecular characterisation of Anisakidae larvae from fish in Adriatic Sea. *Parasitol Res* 111:2385–91. doi: 10.1007/s00436-012-3094-4
- Sohn WM, Kang JM, Na BK (2014) Molecular analysis of *Anisakis* type I larvae in marine fish from three different sea areas in Korea. *Korean J Parasitol* 52:383–9. doi: 10.3347/kjp.2014.52.4.383
- Steinauer ML, Hanelt B, Mwangi IN, et al (2008) Introgressive hybridization of human and rodent schistosome parasites in western Kenya. *Mol Ecol* 17:5062–74. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03957.x
- Stepek G, Buttle DJ, Duce IR, et al (2005) Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, *in vitro*. *Parasitology* 130:203–11. doi: 10.1017/S0031182004006225
- Stepek G, Lowe AE, Buttle DJ, et al (2007a). Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology* 134:103-12.
- Stepek G, Lowe AE, Buttle DJ, et al (2007b) The anthelmintic efficacy of plant-derived cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, *in vivo*. *Parasitology* 134:1409–19. doi: 10.1017/S0031182007002867
- Sterry Ashby B, Appleton PJ, Dawson I. (1964). Eosinophilic granuloma of gastro-intestinal tract caused by herring parasite *Eustoma rotundatum*. *Br Med* 1:1141-5.
- 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. *Parasitol Res* 84:281–5.
- Strømnes E, Andersen K (2000) "Spring rise" of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematoda, Ascaridoidea) third-stage larvae in some fish species from Norwegian waters. *Parasitol Res* 86:619–624. doi: 10.1007/PL00008541
- Strømnes E, Andersen K (2003) Growth of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematodes, Ascaridoidea, Anisakidae) third-stage larvae in paratenic fish hosts. *Parasitol Res* 89:335–41. doi: 10.1007/s00436-002-

- Stroud RK, Dailey MD (1978) Parasites and associated pathology observed in pinnipeds stranded along the Oregon coast. *J Wildl Dis* 14:292–8. doi: 10.7589/0090-3558-14.3.292
- Sugimachi K, Inokuchi K, Ooiwa T, et al (1985) Acute gastric anisakiasis. Analysis of 178 cases. *JAMA* 253:1012–3.
- Suzuki J, Murata I, Enokida R, Yasuda I (1994) Effects of chinese for helminths minimum lethal concentrations on 3rd stage larvae isolated from crude drugs and several kinds of derivatives. *Am Rep Tokyo* 45:35–41.
- Suzuki J, Murata R, Hosaka M, Araki J (2010) Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *Int J Food Microbiol* 137:88–93. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.001
- Svetovidov AN (1986) Gadidae. In: Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, et al (eds), *Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, Paris, pp 680–710.
- Takabayashi T, Mochizuki T, Otani N, et al (2014) Anisakiasis presenting to the ED: clinical manifestations, time course, hematologic tests, computed tomographic findings, and treatment. *Am J Emerg Med* 32:1485–9. doi: 10.1016/j.ajem.2014.09.010
- Takeuchi K, Hanai H, Iida T, et al (2000) A bleeding gastric ulcer on a vanishing tumor caused by anisakiasis. *Gastrointest Endosc* 52:4.
- Taouki PS, Giannakourou MC, Tsironi TN (2011). Monitoring and control of the cold chain. In Sun DW (ed) *Handbook of frozen food processing and packaging*, 2nd ed. CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton FL, pp 273e299.
- Taranto D, Sessa G, Tortora R, Tremolaterra F (2011) Narrow band imaging enhancement could improve gastric anisakis detection. *Dig Liver Dis* 43:e5. doi: 10.1016/j.dld.2010.02.007
- Theodore E (2005). Anisakiasis. In: Gerald L, John E, Raphael D (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, pp 3295.
- Tojo J, Sanatamarina MT, Peris D, et al (1992) *In vitro* effect of antihelminthics on *Anisakis simplex* survival. *Jpn J Parasitol* 41:473–80.
- Topuz OK, Gökoğlu N (2017) Anisakiasis: parasitic hazard in raw or uncooked seafood products and prevention ways. *J Food Heal Sci* 3:21–8. doi: 10.3153/JFHS17003
- Torres AP, Jercic MI, Weitz JC, et al (2007) Human pseudoterranovosis, an emerging infection in Chile. *J Parasitol* 93:440–3.
- Torres P, Contreras A, Revenga J, et al (1993) Helminth parasites in fishes from Valdivia and Tornagaleones river estuaries in the south of Chile. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88:491–2.
- Torres P, Hernández E, Sndoval I (1983) Anisakiasis and Phocanemiasis in marine fishes from the South of Chile. *Int J Zoonoses* 10:146–50.
- Trabelsi N, Marotta SM, Giarratana F, et al (2018) Use of Tunisian flavored olive oil as anisakicidal agent in

- industrial anchovy marinating process. *J Sci Food Agric* 98:3446–51. doi: 10.1002/jsfa.8857
- Trailović SM, Marjanović DS, Nedeljković Trailović J, et al (2015) Interaction of carvacrol with the *Ascaris suum* nicotinic acetylcholine receptors and gamma-aminobutyric acid receptors, potential mechanism of antinematodal action. *Parasitol Res* 114:3059–68
- Tydén E, Engström A, Morrison DA, Höglund J (2013) Sequencing of the  $\beta$ -tubulin genes in the ascarid nematodes *Parascaris equorum* and *Ascaridia galli*. *Mol Biochem Parasitol* 190:38–43. doi: 10.1016/j.molbiopara.2013.05.003
- Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A (2007) Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol Int* 56:211–5. doi: 10.1016/j.parint.2007.02.005
- Umehara A, Kawakami Y, Matsui T, et al (2006) Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol Int* 55:267–71. doi: 10.1016/j.parint.2006.07.001
- Usano Alemany J (2012) Estudio del efecto de los factores ambientales y agronómicos sobre la producción de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* VAHL. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Valentini A, Mattiucci S, Bondanelli P, et al (2006) Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial Cox2 sequences, and comparison with allozyme data. *92*:156–66.
- Valero A, López-Cuello MM, Benítez R, Adroher F (2006b). *Anisakis* spp. in European hake, *Merluccius merluccius* (L.) from the Atlantic off north-west Africa and the Mediterranean off southern Spain. *Acta Parasitol* 51:209–12.
- Valero A, Martín-Sánchez J, Reyes-Muelas E, Adroher FJ (2000) Larval anisakids parasitizing the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, from Motril Bay in the Mediterranean region of southern Spain. *J Helminthol* 74:361–4.
- Valero A, Paniagua MI, Hierro I, et al (2006a) Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the Mediterranean coasts of Andalucía (Southern Spain). *Parasitol Int* 55:1–5. doi: 10.1016/j.parint.2005.07.001
- Valero A, Romero MC, Gómez-Mateos M, et al (2015) Natural products: perspectives in the pharmacological treatment of gastrointestinal anisakiasis. *Asian Pac J Trop Med* 8:612–7. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.07.017
- Valiñas B, Lorenzo S, Eiras A, et al (2001) Prevalence of and risk factors for IgE sensitization to *Anisakis simplex* in a Spanish population. *Allergy* 56:667–71.
- Vallejo Rodríguez MC, Valero Tena E, Charro Calvillo M, Mur Villacampa M (2006) Recurrent abdominal pain: gastric and ileal manifestations by anisakis. *An Med Interna* 23:556–7.
- Van Banning P (1971) Some notes on a successful rearing of the herring-worm, *Anisakis Marina* L. (Nematoda: Heterocheilidae). *ICES J Mar Sci* 34:84–8. doi: 10.1093/icesjms/34.1.84
- Van Thiel PH, Kuipers FC, Rosman RT (1962) A nematode parasitic to herring causing acute abdominal syndromes in man. *Trop Geogr Med* 2:97–113.

- Van Thiel PH (1976) The present state of anisakiasis and its causative worms. *Trop Geogr Med* 28:75–85.
- Vaz M, Figueiredo JC, Oliveiras CD, et al (2015) Prevalence for nematodes of hygiene-sanitary importance in fish from Colares Island and Vigia, Pará, Brasil. *Prevalência de nematoides de importância higiênico-sanitária em peixes da ilha de Colares e Vigia, Pará, Brasil* 22:124–8. doi: 10.4322/rbcv.2015.364
- Vercammen F, Kumar V, Bollen J, et al (1997) Gastric involvement with *Anisakis* sp. larva in a Belgian patient after consumption of cod. *Acta Gastroenterol Belg* 60:302–3.
- Verhamme M, Ramboer C (1988) Anisakiasis larvae from fish in Adriatic sea. *Gut* 29:843–7.
- Vidacek S, de las Heras C, Solas MT, et al (2010) Antigenicity and viability of *Anisakis* larvae infesting hake heated at different time-temperature conditions. *J Food Prot* 73:62–8.
- Vidacek S, de las Heras C, Solas MT, et al (2009) Effect of high hydrostatic pressure on mortality and allergenicity of *Anisakis simplex* L3 and on muscle properties of infested hake. *J Sci Food Agric* 89:2228–35. doi: 10.1002/jsfa.3712
- Villafuela-Cives M, Henríquez-Santana A (2010) Anisakiasis. *Rev Esp Enferm Dig* 102:216.
- Viu M, Sánchez-Acedo C, Del Cacho E, et al (1996) Occurrence of anisakid larvae (Nematoda: Ascaridida) in fresh market fish from Zaragoza (Spain). *Res Rev Parasitol* 56:25–8.
- Wayne M (2017) ApE, a plasmid editor. <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape>.
- Weiler CR (2007) *Anisakis simplex* and cross-reacting antigens. *Int J Dermatol* 46:224–5. doi: 10.1111/j.1365-4632.2006.03090.x
- Weisenberg RC (1972) Changes in the organization of tubulin during meiosis in the eggs of the surf clam, *Spisula solidissima*. *J Cell Biol* 54:266–78.
- Yamazaki M, Hara K, Hasegawa T, Kanazawa M (1976) Vanishing tumor of the stomach? *Rinsho Hoshasen* 21:47–54.
- Yasunaga H, Horiguchi H, Kuwabara K, et al (2010) Short report: clinical features of bowel anisakiasis in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 83:104–5. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0780
- Yeom HJ, Kang JS, Kim GH, Park IK (2012) Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of apiaceae plant essential oils and their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*). *J Agric Food Chem* 60:7194–203. doi: 10.1021/jf302009w
- Yera H, Fréal E, Dupouy-Camet J (2016) Molecular confirmation of *Anisakis pegreffii* as a causative agent of anisakidosis in France. *Dig Liver Dis* 48:970. doi: 10.1016/j.dld.2016.04.003
- Yokogawa M, Yoshimura H (1967) Clinicopathologic studies on larval anisakiasis in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 16:723–8.
- Yorimitsu N, Hiraoka A, Utsunomiya H, et al (2013) Colonic intussusception caused by anisakiasis: a case report and review of the literature. *Intern Med* 52:223–6. doi: 10.2169/internalmedicine.52.8629
- Young PC, Lowe D (1969) Larval nematodes from fish of the subfamily Anisakinae and gastro-intestinal lesions

- in mammals. *J Comp Pathol* 79:301–13.
- Zhang L, Hu M, Shamsi S, et al (2007) The specific identification of anisakid larvae from fishes from the Yellow Sea, China, using mutation scanning-coupled sequence analysis of nuclear ribosomal DNA. *Mol Cell Probes* 21:386–90. doi: 10.1016/j.mcp.2007.05.004
- Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB (1998) Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal dna sequences. *Int J Parasitol* 28:1911–21. doi: 10.1016/S0020-7519(98)00150-7
- Zuloaga J, Arias J, Balibrea JL (2004) Anisakiasis digestiva. Aspectos de interés para el cirujano. *Cir Española* 75:9–13. doi: 10.1016/S0009-739X(04)72265-4
- CDC, helmintos: [https://www.cdc.gov/parasites/hookworm/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/parasites/hookworm/health_professionals/index.html)
- FAO, SOFIA: <http://www.fao.org/fishery/sofia/e>
- FAO, bacaladilla: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5952e/x5952e01.htm>
- Medlineplus, mebendazol: <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a682315-es.html>
- Medlineplus, omeprazol: <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a693050-es.html>
- Medlineplus, ranitidina: <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a601106-es.html>
- Medlineplus, sucralfato: <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a681049-es.html>
- WHO/IUIS                      Allergen                      Nomenclature                      Sub-committee:  
<http://www.allergen.org/search.php?allergenname=ani&allergensource=&TaxSource=&TaxOrder=&foodallerg=all&bioname=>

