

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**ANÁLISIS GENÉTICO DE PARÁSITOS  
ANISAKIS EN PESCADOS DEL  
CANTÁBRICO**

**TRABAJO FIN DE MASTER  
POR**

**BETSABÉ GEA DÍAZ**

**JULIO, 2015**



# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	10
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS</b> .....	16
<b>2.1 TAXONOMÍA</b> .....	17
<b>2.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS ESPECIES</b> .....	18
<b>2.3 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA</b> .....	21
<b>2.4 CUADRO CLÍNICO</b> .....	24
<b>2.5 LOCALIZACIÓN DE LAS LARVAS EN EL HOSPEDADOR</b> .....	26
<b>2.6 PESCADOS COMERCIALIZADOS EN PESCADERIAS DEL     CANTÁBRICO</b> .....	28
2.5.1 Bacalada.....	28
2.5.2 Merluza.....	29
2.5.3 Caballa.....	30
2.5.4 Boquerón.....	31
2.5.5 Chicharro.....	32
2.5.6 Lubina.....	31
2.5.7 Gallo.....	33
<b>2.7 MEDIDAS PARA LA REDUCCIÓN DEL RIESGO ASOCIADO CON     ANISAKIS</b> .....	34
2.6.1 Prevención en la producción primaria.....	34
2.6.2 Prácticas durante la captura y manipulación a bordo.....	35
2.6.3 Pescado fresco. Manipulación en tierra e inspección.....	35
<b>2.8 TRATAMIENTO UTILIZADO PARA LA INACTIVACIÓN DE     LARVAS DE ANISAKIS</b> .....	35
2.7.1 Congelación.....	35
2.7.2 Tratamiento térmico.....	36

2.7.3	Ahumado.....	37
2.7.4	Altas presiones.....	37
2.7.5	Irradiación.....	38
2.7.6	Adición de salmuera .....	38
2.7.7.	Acidificación, marinado o escabechado.....	38
<b>2.9</b>	<b>TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIS SPP.....</b>	<b>38</b>
<b>2.10</b>	<b>TÉCNICAS MOLECULARES Y GENÉTICAS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIS SPP.....</b>	<b>39</b>
2.10.1	Técnicas Inmunológicas.....	40
2.10.2	Técnicas básicas para el análisis de ácidos nucleicos.....	41
	✓ Extracción y purificación del ADN.....	41
	✓ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	42
	✓ Electroforesis.....	44
	✓ Secuenciación.....	45
2.10.3	Análisis de secuencias mediante software informáticos.....	46
	✓ BioEdit.....	47
	✓ BLAST.....	48
	✓ DNAsp.....	50
	✓ MEGA.....	51
2.10.4	Marcadores moleculares y genéticos para identificar especies.....	52
	✓ ADN mitocondrial.....	52
	✓ Análisis electroforético de isoenzimas.....	53
	✓ RFLP-PCR.....	55
	✓ RAPDS.....	56
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y METODOLOGÍA EMPLEADA.....</b>	<b>58</b>
3.1	RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE TRABAJO.....	59
3.2	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN.....	62
3.3	AMPLIFICACIÓN DEL ADN: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	63
3.4	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	64
3.5	SECUENCIACIÓN Y LECTURA DE SECUENCIAS .....	64
3.6	ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS Y CONSTRUCCIÓN DE ÁRBOL FILOGENÉTICO.....	65

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	66
4.1 ANÁLISIS DE LA CARGA PARASITARIA.....	67
4.2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD INTERESPECÍFICA DE <i>ANISAKIS</i> <i>SP.</i> ....	73
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA RELACIÓN DE LA ESPECIE CON SU HOSPEDADOR .....	78
4.4 ANÁLISIS GENÉTICO DE <i>ANISAKIS SP.</i> .....	79
<b>5 CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES</b> .....	84
<b>6 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	87
<b>ABREVIATURAS</b> .....	86

## **AGRADECIMIENTOS**

Debo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo fin de máster.

En primer lugar debo agradecer a la Dra. Laura Miralles López por estar día a día en el laboratorio con su enseñanza, dedicación, su buena disposición y por compartir su experiencia en el laboratorio, a través de la cual he aprendido enormemente. Sin tus ánimos, paciencia y ayuda, no podría haber realizado este trabajo.

A la Dra. Eva García Vázquez bajo la dirección y supervisión he realizado este trabajo, por su apoyo mostrado y por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio durante estos meses.

A mis compañeros del Laboratorio de genética de recursos naturales por los buenos detalles.

A los pescaderos de Oviedo y Gijón que con toda la amabilidad posible me han aportado información de forma desinteresada.

A mis compañeros del Máster por todos los buenos momentos vividos.

Y como no a mi familia, por su apoyo incondicional.

## RESUMEN

Debido a la creciente incidencia de la presencia de *Anisakis spp.* en pescados, especialmente en las costas del Cantábrico, las investigaciones sobre este parásito han aumentado, así como las medidas de control y prevención establecidas por el gobierno para minimizar cualquier riesgo de enfermedad causado por su presencia accidental.

En el presente trabajo se determina la carga parasitaria de siete especies de pescado comercializadas en Asturias. Se establecieron las frecuencias de parasitación en función del hospedador, resultando ser bacalada y merluza las especies más parasitadas.

Mediante el análisis de secuencia del gen que codifica el enzima mitocondrial Cox 2 se evaluó la diversidad interespecífica del género *Anisakis* y se determinó la existencia de tres especies diferentes, de las cuales dos pertenecen al género *Anisakis* (*A. simplex* y *A. pegreffii*) y una al género *Hysterothylacium* (*Hysterothylacium aduncum*). El estudio reveló que *A. simplex* es la especie predominante en el Cantábrico, ya que de todos los individuos examinados un 87,5 % pertenecían a esta especie, mientras que sólo el 10,5% pertenecían a *A. pegreffii*. La comparación de carga parasitaria entre especies de pescado permite concluir que no se trata de nematodos específicos de las especies de hospedadores estudiados, sino que la presencia del parásito en un hospedador concreto se explica por otros factores como el tamaño o la alimentación.

También se elaboró un árbol filogenético en el que se han reflejado las relaciones evolutivas entre individuos en función de su haplotipo y en el que también se representa el hospedador que lo contenía.

## ABSTRACT

Due to the growing incidence of *Anisakis spp.* in fish, especially in the Cantabrian coast, research on this parasite have increased, as well as the control and prevention measures introduced by the government, to minimize any possible risk of disease caused by accidental presence.

In this document, the parasite load of seven species of fish marketed in Asturias has been determined. Parasitisation frequencies are determined based on the host, being cod and hake, the most parasitized species.

Through genetic analysis of mitochondrial enzyme Cox-2 interspecific diversity of the genus *Anisakis sp* was evaluated and it was concluded that there are three different species, two of which belong to the genus *Anisakis* (*A. simplex* and *A. pegreffii*) and the other belong to the *Hysterothylacium* genus (*Hysterothylacium aduncum*). The study revealed that *A.simplex* is the predominant species in the Cantabrian sea, because of all individual tested, 87.5% belonged to this species, while only 10.5% belonged to *A.pegreffii*.

Comparison of parasite load between different species of fish, leads to the conclusion that the relationship between nematode and fish is not specific, but the parasite in a particular host is explained by other factors such as the size or feeding.

In addition, a tree that reflects the evolutionary relationships between individuals based on their haplotype and the host which contained, was also designed.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Pescado infectado con larvas de <i>Anisakis spp.</i> enrolladas sobre si mismas .....	14
<b>Figura 2.</b> Cladogénesis de las especies del género <i>Anisakis</i> obtenida mediante análisis genéticos (Mattiucci y Nascetti, 2008).....	18
<b>Figura 3.</b> Distribución geográfica mundial de <i>Anisakis spp.</i> (Mattiucci y Nascetti, 2008).....	20
<b>Figura 4.</b> Distribución en la costa Atlántica de la península Ibérica y costa Mediterránea Europea de las especies de larvas de Anisakidos identificadas en un ejemplar de <i>M. merluccius</i> (S. Mattiucci, P. Abaunza, L. Ramadori y G. Nascetti 2003. “ <i>Genetic identification of Anisakis larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition</i> ”).....	21
<b>Figura 5.</b> Morfología de un <i>Anisakis sp</i> .....	22
<b>Figura 6.</b> Ciclo de biológico de <i>Anisakis spp.</i> (Levsen y Lunestad, 2010).....	24
<b>Figura 7.</b> Ejemplar de Bacaladilla ( <i>Micromesistius poutasou</i> ).....	29
<b>Figura 8.</b> Ejemplar de Merluza del Cantábrico ( <i>Merluccius merluccius</i> ).....	30
<b>Figura 9.</b> Ejemplar de Caballa ( <i>Scomber scombrus</i> ).....	30
<b>Figura 10.</b> Ejemplar de Anchoa del Cantábrico ( <i>Engraulis encrasicolus</i> ).....	31
<b>Figura. 11.</b> Ejemplar de Chicharro ( <i>Trachurus trachurus</i> ).....	31
<b>Figura 12.</b> Ejemplar de Lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ).....	33
<b>Figura 13.</b> Ejemplar de Gallo ( <i>Lepidorhombus boscii</i> ).....	33
<b>Figura 14.</b> Termociclador del laboratorio de Genética de Recursos Naturales del departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.....	42

<b>Figura 15.</b> Esquema donde se muestran las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa en ciclos sucesivos, y la amplificación exponencial de las secuencias diana.....	44
<b>Figura 16.</b> Ejemplo de Cromatograma visualizado en el software BioEdit de una secuencia de ADN.....	48
<b>Figura 17.</b> Archivo del programa BioEdit con secuencias alineadas, en las que se muestran las bases nitrogenadas en colores distintos.....	48
<b>Figura 18.</b> Información proporcionada por el BLAST para la identificación de la especie.....	49
<b>Figura 19.</b> Alineamiento y comparación de la secuencia problema con la secuencia de referencia de GenBank.....	49
<b>Figura 20.</b> Análisis de polimorfismos de secuencias de ADN en el programa DNAsp. ....	51
<b>Figura 21.</b> ADN mitocondrial de <i>Anisakis spp.</i> (Kim y col., 2006).....	53
<b>Figura 22.</b> Disposición del ARNr eucariótico 18S, 5,8S, 28S, en tándem.....	55
<b>Figura 23.</b> Sección de merluza donde se muestran los <i>Anisakis</i> enrollados entre el tejido muscular que aparecen al levantar la piel .....	62
<b>Figura 24.</b> Fórmula para calcular el estadístico $\chi^2$ .....	63
<b>Figura 25.</b> Fórmula para calcular los grados de libertad.....	63
<b>Figura 26.</b> Tubo Eppendorf después de la extracción, en el que se observa un sobrenadante acuoso con ADN y un precipitado con CHELEX y tejido celular.....	64
<b>Figura 27.</b> Bandas de ADN correspondiente a 7 individuos de <i>Anisakis sp.</i> .....	69
<b>Figura 28.</b> Musculatura hipoaxial de merluza en la que se observan larvas de Anisákidos en forma de espiral.....	70
<b>Figura 29</b> Vísceras de bacalada infectada altamente parasitada.....	71

<b>Figura 30.</b> En esta imagen se observan los parásitos que han migrado de las vísceras al músculo donde se han incrustado .....	71
<b>Figura 31.</b> . Bacalada antes de comenzar la extracción de las larvas. Se puede observar sin necesidad de abrirla la presencia de parásitos en la zona de la cabeza, lo que a simple vista sugiere una infección masiva .....	71
<b>Figura 32.</b> Árbol filogenético <i>Neighbor-Joining</i> de los haplotipos mitocondriales de <i>Anisakis simplex</i> y <i>A. pegreffii</i> . Las líneas rojas reflejan los haplotipos compartidos. Para facilitar la visualización de la distribución de los haplotipos, cada especie de hospedador se ha representado con un color diferente.....	83
<b>Gráfica1.</b> Frecuencias haplotípicas de <i>Anisakis pegreffii</i> . Se observa que solo hay 2 haplotipos compartidos entre individuos de bacalada.....	81
<b>Gráfica 2.</b> Frecuencias haplotípicas compartidas de <i>Anisakis simplex</i> .....	83

Las figuras de los ejemplares de pescado han sido extraídos de:  
<http://www.pescaderiascorunesas.es/productos/pescados/index2.php>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Especies del estudio, su zona de captura, la lonja de la que proceden y el lugar en el que han sido compradas.....	60
<b>Tabla 2.</b> Ejemplares de pescado muestreado y número de parásitos encontrados según la fracción analizada.....	68
<b>Tabla 3.</b> Porcentajes de parasitación y número medio de parásitos por gramo según la especie de pescado.....	69
<b>Tabla 4.</b> Resultados del análisis genético de los parásitos extraídos de Bacalada 1.....	74
<b>Tabla 5.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Bacalada 2...74	74
<b>Tabla 6.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Bacalada 3....75	75
<b>Tabla 7.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Bacalada 4....75	75

<b>Tabla 8.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Bacalada 5.....	75
<b>Tabla 9.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Merluza.....	76
<b>Tabla 10.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Boquerón 1..	77
<b>Tabla 11.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de caballa 2.....	77
<b>Tabla 12.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de chicharro 3..	77
<b>Tabla 13.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Gallo 1.....	77
<b>Tabla 14.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Gallo 2.....	77
<b>Tabla 15.</b> Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Gallo 3.....	78
<b>Tabla 16.</b> Número de parásitos de cada especie por hospedador.....	78
<b>Tabla 17.</b> Tablas de frecuencias absolutas observadas y esperadas.....	79
<b>Tabla 18.</b> Resultados del programa DnaSP, donde N es el número de secuencias, NH es el número de haplotipos, Hd es la diversidad haplotípica, Hv es la varianza de la diversidad haplotípica y Pi es la diversidad nucleotídica.....	80

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

El pescado es un producto esencial en nuestra dieta, ocupando un lugar destacado en la alimentación humana. En algunos países constituye el principal aporte de proteínas de origen animal, y desde hace tiempo forma parte indiscutible de la dieta Mediterránea. Su consumo ha sido muy recomendado por especialistas, ya que tiene un alto valor nutricional, contiene proteínas de alta digestibilidad y ácidos grasos poliinsaturados que producen un efecto beneficioso en el organismo. A pesar de esto, el pescado también figura entre los alimentos con mayor riesgo de transmisión de parásitos. En muchas ocasiones contienen agentes patógenos que afectan a la seguridad alimentaria, provocando un peligro para la salud.

El parasitismo en peces dulceacuícolas y marinos es señalado como un fenómeno frecuente y constante (Luque y col., 2004). Diferentes tipos de parásitos pueden estar presentes en una misma especie de pescado, o incluso en un solo ejemplar. Dentro de ellos, los nematodos constituyen uno de los grupos de mayor importancia, por su alta prevalencia y capacidad para causar enfermedades (Oliveiro y Baldiris, 2008). Esto provoca fuertes consecuencias negativas a nivel socio-económico en el sector pesquero.

La enfermedad producida por el parásito *Anisakis spp.* se denomina anisakiasis. Es una zoonosis producida por larvas de un nemátodo de la Familia Anisakidae que se encuentran en la cavidad corporal, principalmente en las vísceras (*Figura 1*) y también en el sistema muscular de peces teleósteos como la merluza, y moluscos cefalópodos, que son ingeridas accidentalmente por el hombre cuando consume pescado parasitado insuficientemente cocinado (ahumados, adobo, salazones, etc.) o sobre todo crudo.

La alta prevalencia de estos parásitos en pescados consumidos habitualmente y sus graves consecuencias para la salud humana, ha creado la necesidad de identificar las especies de *Anisakis*.

El primer caso de anisakiasis humana fue descubierto en un niño groelandés en el año 1876, y posteriormente se constató en Holanda en 1960 por consumo de arenque ahumado. En España los casos descritos hasta finales de 1998 fueron 32, siendo Arenal Veral y col. quienes publicaron en 1991 el primer caso de esta enfermedad. En 1992,

Barros y col. publicaron tres casos de anisakiasis humana en España por consumo de sardinas crudas.



Figura 1. Pescado infectado con larvas de *Anisakis spp.* enrolladas.

La presencia de *Anisakis spp.* en productos de la pesca es un peligro para la salud que no se debe subestimar, ya que aunque la mayoría de estos parásitos no son patógenos para el hombre, algunas especies si originan enfermedades graves. Se localizan principalmente en pescados consumidos habitualmente que viven en aguas relativamente frías como el Océano Atlántico Norte y el Mar Cantábrico, por lo que el Gobierno lo ha considerado un problema de salud pública.

Los controles de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición han determinado que en España, el 36 % del pescado de las lonjas está infestado por *Anisakis spp.* La mayoría del pescado parasitado se captura en el Mar Cantábrico y en el Océano Atlántico, mientras que sólo el 6 % proviene del Mediterráneo.

El cuadro clínico se traduce en un síndrome gastrointestinal, oscilando desde una presentación leve con náuseas y dolor abdominal hasta una forma más intensa con sintomatología propia de apendicitis u obstrucción intestinal. También se ha observado que algunos pacientes, sin relación expresa con dicha patología digestiva, presentaban sintomatología alérgica, desde urticaria o angioedema hasta shock anafiláctico. El diagnóstico de la enfermedad es difícil porque suele confundirse con otras patologías,

por ello el número real de casos no aparece reflejado en las estadísticas epidemiológicas, y sólo se confirma con la visualización de las larvas por gastroscopia; no obstante, el antecedente dietético, el cuadro y los hallazgos clínicos, así como exámenes alergológicos, permiten establecer un diagnóstico de sospecha.

La anisakiasis es frecuente en la población japonesa, donde se registra el 95% del total de casos denunciados en todo el mundo (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, AESAN). En Japón, el hábito de consumir pescado crudo está muy extendido, mientras que en Europa y de manera especial en España, la preocupación por este problema ha ido incrementando en los últimos años.

La infestación humana se ha asociado al consumo de platos tradicionales orientales preparados con pescado crudo como el sushi o el sashimi, a la ingestión de pescado ligeramente salado y también a aquellos pescados en los que se emplean técnicas de preparación que no requieren altas temperaturas, como el escabechado entre otras.

Para combatir este problema el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ofrece medidas para reducir la incidencia del parásito en los consumidores del pescado y disminuir el riesgo de enfermedad, tanto a nivel de producción primaria como de manipulación y consumo en tierra.

Desde el descubrimiento del primer caso de esta enfermedad en España, se ha observado un aumento en las investigaciones, lo que ha conllevado una importante sensibilización social y una mejora en las medidas de prevención. Sin embargo, las mismas fuentes consideran que el aumento de la incidencia en aquellos países en los que el consumo de pescado es poco frecuente ha sugerido la posibilidad de que las medidas preventivas no son tan eficaces como se creía.

El objetivo del presente proyecto es hacer una estimación de la carga parasitaria, en concreto del género *Anisakis*, presente en cada hospedador, y averiguar si se trata de especies específicas, también se hará un estudio de la variabilidad genética interespecífica y se concluirá con la elaboración de un árbol filogenético que explique la relación entre individuos. Para llevar a cabo este proyecto, se ha planteado la realización de un trabajo experimental que nos permita conocer la situación real de parasitación, concretamente en nuestra región, de siete especies de pescado hospedadoras de gran importancia comercial en el sector pesquero, como son la merluza, el gallo, la bacalada, el chicharro o jurel, la caballa, el boquerón y la lubina.

# **CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES**

## 2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

### 2.1 TAXONOMÍA

En los últimos años se ha observado un incremento de la prevalencia de la anisakiasis humana en todo el mundo, debido principalmente a la variación de los gustos gastronómicos y la globalización de los viajes entre otras causas. Lo que ha provocado que el interés sanitario por este parásito haya ido en aumento no sólo en países donde tradicionalmente se consume pescado crudo.

La primera descripción de las larvas tuvo lugar en el siglo XIX, pero no fue hasta el siglo XX cuando se conoció el problema sanitario que representa la presencia de estas larvas en el pescado.

Según Anderson y col, 1974, los anisákidos pertenecen al *Phylum Nematelminthes*, Clase *Nematoda*, Subclase *Secernentea*, orden *Ascarida*, Suborden *Ascaridina*, Super familia *Ascaridoidea*, Familia *Anisakidae*, Subfamilia *Anisakinae*, Género *Anisakis*. En 1961, Berland clasificó las distintas especies en dos grupos (Tipo I y Tipo II) en función de la morfología de la larva, correspondiendo la de Tipo I a *A. simplex* y la de Tipo II a *A. physeteris*.

En la década de los setenta, ante la imposibilidad de especificar la identidad de las larvas presentes en el tracto gastro-intestinal humano, gran parte de los autores optaron por identificar los nematodos como larvas *Anisakis* tipo I, tipo II, tipo III, tipo IV, según los criterios morfológicos de Shiraki, 1974.

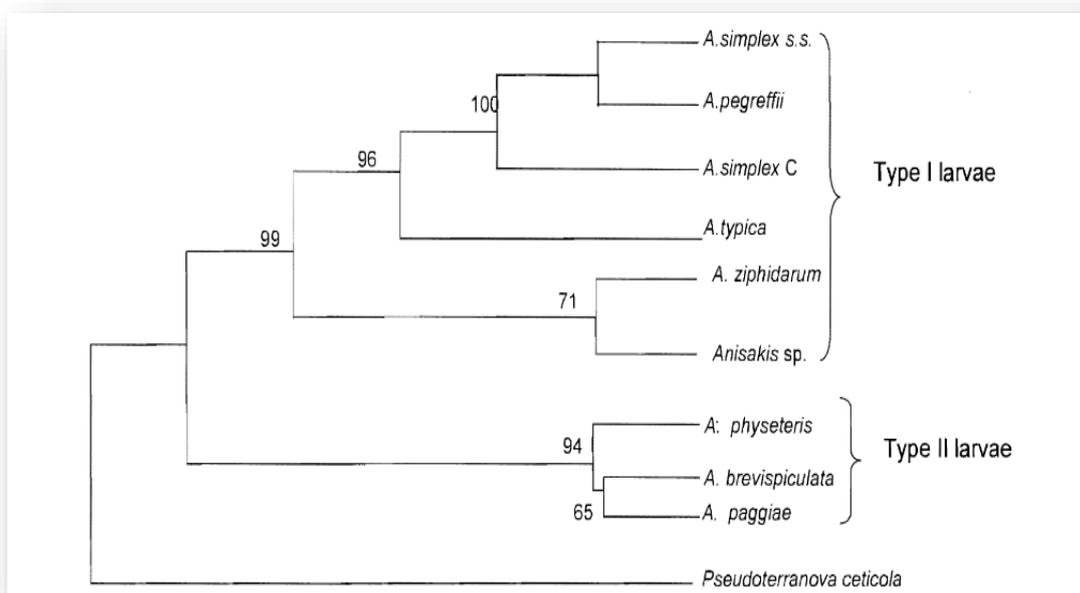
En años posteriores, los estudios *in vitro* permitieron identificar un determinado tipo de individuos como una larva en tercer estadio de *Anisakis simplex* (Pippy y Vann Banning, 1975, Grabda, 1976, Oshima y col., 1982).

En 1998, Paggi y col. descubrieron la especie *A. ziphidarum*, aislada en ballenas del Mar Mediterráneo y de la costa africana.

Sin embargo, no fue hasta las décadas de los ochenta y noventa cuando los análisis electroforéticos de proteínas codificadas por diferentes genes, permitieron confirmar las diferencias entre larvas de tipo I y II, y entre *Anisakis simplex* y *Anisakis physeteris* (Orecchia y col., 1986). Gracias a aspectos ecológicos y a la distribución geográfica de

los hospedadores se han podido reconocer genéticamente 9 especies de nematodos pertenecientes al género *Anisakis* mediante el análisis de marcadores genéticos.

Los análisis basados en la electroforesis de enzimas multilocus (*Figura 2*) ha permitido establecer una clasificación del complejo *Anisakis* distinguiendo al menos tres especies gemelas aisladas reproductivamente: *Anisakis simplex sensu stricto* (s.s.), *Anisakis pegreffii* y *Anisakis simplex C*. Estas especies son iguales morfológicamente, pero existen diferencias genéticas, ecológicas e incluso en la patogenicidad que producen (Kirstein y col., 2007).



*Figura 2.* Cladogénesis de las especies del género *Anisakis* obtenida mediante análisis genéticos (Malttiucci, y Nascetti, 2008).

## 2.2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS ESPECIES

El género *Anisakis* comprende, como se ha dicho anteriormente, muchas especies diferentes, y su distribución geográfica, como se muestra en la *Figura 3*, es especialmente amplia, al tratarse de especies ecológicamente diferentes. Además suelen presentar distintos ciclos de vida y hospedadores definitivos diferentes (Malttiucci y Nascetti, 2008).

Las especies más importantes desde el punto de vista clínico son *A. simplex*, *A. pegreffii* y *A. simplex C.* (<http://www.mncn.csic.es/>). En cuanto al complejo de *Anisakis simplex* al cual pertenecen *A. pegreffii*, *A. simplex s s.* y *A. simplex C.* se ha visto que parasitan principalmente peces pelágicos, demersales, y mesopelágicos como hospedadores intermediarios.

Estudiando otras especies como *A. zhipidarum* se ha visto que en la etapa de maduración a estado adulto parasitan cetáceos de la familia *Zhipiidae*, mientras que en la etapa larvaria viven en calamares.

Las especies del tipo *A. physeteridae* tiene como hospedador intermediarios calamares de aguas profundas, en lugar de peces, y se han encontrado en torno a la costa mediterránea italiana (Malttiucci y Nascettii, 2008).

Se ha concluido que *A. pegreffii* se distribuye principalmente en el mar Mediterráneo, y en el Hemisferio Sur, y *A. simplex s s.* en el Atlántico Norte decreciendo progresivamente desde el norte (sur de la costa de Noruega) hasta el sur (costa del Algarve) y en el Océano Pacífico, mientras que *A. simplex C.* se encuentra en el océano Pacífico y en el hemisferio Sur (Malttiucci y col., 2007; Malttiucci y Nascetti 2008) (*Figura 3*).

Se podría considerar que se trata de especies al menos parcialmente alopátridas; sin embargo, esto podría no ser enteramente cierto porque se observa una superposición en el hábitat de *A. simplex s.s.* y *A. simplex C* ya que se encuentran en simpatria en la costa del Océano pacífico canadiense. Por otro lado, *A. simplex pegreffii* y *A. simplex C.* lo están en el océano Atlántico sur (Malttiucci y Nascetti, 2008). En la costa atlántica de la península Ibérica (*Figura 4*), el sur de Irlanda y de Japón se ha visto simpatria entre *A. pegreffii* y *A. simplex s s.* (Abollo y col., 2003; Martín-Sánchez y col., 2005; Umehara y col., 2006; Marques y col., 2006).

En conclusión, se estima que *Anisakis simplex* tiene una amplia distribución entre el círculo polar Ártico y 30 ° de latitud norte que comprendería la costa de Japón, Canadá (Atlántico y Pacífico), norte de Islandia, Islas Faeroe y Noroeste de España, Mar de Noruega, Mar Báltico y Mar Mediterráneo. En cuanto a la especie de *Anisakis pegreffii* habita en una distribución entre los 35° y 55° de latitud sur ya que ha sido encontrada

en las islas Malvinas, Mar Mediterráneo, Nueva Zelanda, Costas de Sudáfrica, estrecho de Gibraltar y Atlántico Sur.

La mayor implicación de una especie u otra en la enfermedad producida por estas larvas es difícil de saber mediante su identificación con métodos morfológicos, por lo que habría que recurrir a técnicas moleculares que hasta el momento no han sido aplicadas sistemáticamente para la identificación de los patógenos. A pesar de ello, la amplia distribución de *Anisakis simplex* en el hemisferio Norte, que abarca mayor extensión poblacional humana respecto a la distribución de *Anisakis pegreffii*, sugiere que la primera es la mayor causante de esta enfermedad en términos cuantitativos.

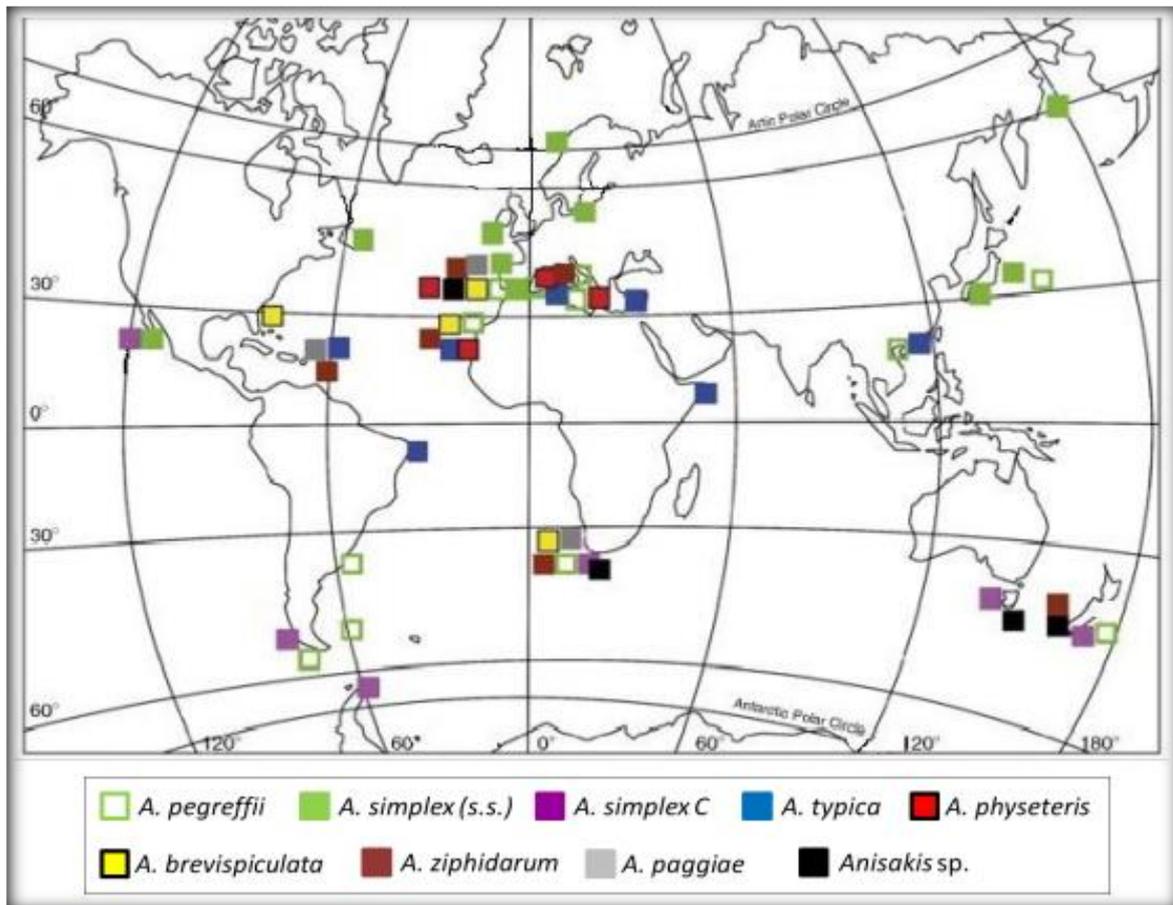


Figura 3. Distribución geográfica mundial de *Anisakis* spp. (Malttucci y Nascetti, 2008).

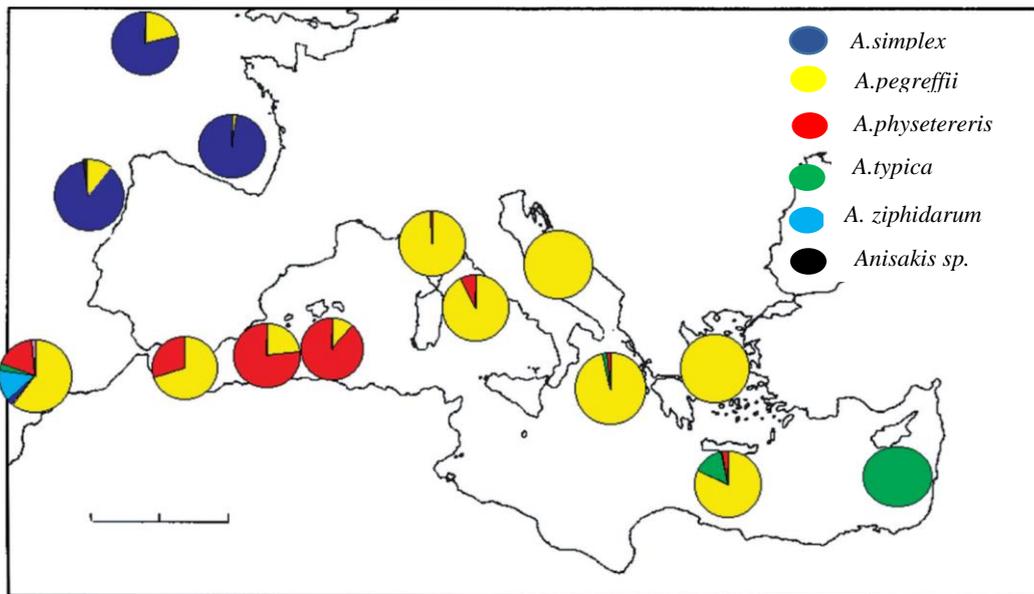


Figura 4. Distribución en la costa Atlántica de la península Ibérica y costa Mediterránea Europea de las especies de larvas de Anisákidos identificadas en un ejemplar de *M. merluccius*.

### 2.3 MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE ANISAKIS

Los anisákidos son organismos dioicos, vermiformes, sin segmentación y con cuerpo en forma de cilindro alargado y afilado en sus extremos (*Figura 5*). Presentan una cutícula gruesa formada por varias capas con estriaciones transversales propias de los nematodos segregada por la epidermis y encargada de proteger al parásito de las condiciones externas. Poseen un sistema digestivo completo, formado por tres labios bien desarrollados y un diente cuticular; el esófago posee dos porciones diferenciadas en proventrículo y ventrículo, intestino con la presencia de un ciego intestinal y ano (Moller y Anders, 1986).

La larva de *Anisakis simplex* es de color blanquecino aunque cuando están encapsuladas en el músculos de los peces puede presentar un tono parduzco), tiene una longitud de entre 18 y 39 mm y un diámetro de 0,14-0,6 mm.



Figura 5. Morfología de un *Anisakis* sp.

Los ciclos de vida de los parásitos pueden ser sumamente complicados. Gran parte de ellos presentan adaptaciones para encontrar e infectar con éxito a sus hospedadores; además, pueden presentar estructuras especializadas que les permiten mantener contacto con ellos (Teresa Valverde y col., 2005).

*Anisakis simplex* es un nematodo de distribución cosmopolita (especialmente abundante en aguas frías y polares) que alcanza la madurez sexual en el estómago de mamíferos marinos cetáceos y pinnípedos (Davey, 1971). Los huevos, que son expulsados al medio marino junto con las heces del hospedador definitivo, son ligeramente ovalados (aproximadamente 45x50  $\mu\text{m}$ ), en el momento de la expulsión no presentan todavía un embrión desarrollado en su interior, y poseen una cáscara fina, lisa y transparente (Van Banning, 1971; Bratney y Clark, 1992). Una vez en el medio marino, los huevos sedimentan mientras tiene lugar el desarrollo embrionario (Sluiter, 1974). El periodo de maduración se ve influenciado por la temperatura del agua, y la eclosión puede ocurrir a los 4-8 días a 13-18 °C, a los 20-27 días a 5-7 °C, y a los 57-82 días, a temperaturas inferiores a 5 °C.

Antes se creía que las larvas que emergían del huevo tras eclosionar pertenecían al segundo estado larvario, sin embargo hoy se ha demostrado que estas larvas son realmente L3 (estadio 3), lo que supone que en el interior del huevo tienen lugar las dos primeras mudas. La primera ecdisis tiene lugar a las dos semanas tras la incubación de los huevos en agua de mar a 6°C, mientras que la segunda ocurre 3 o 4 días después. Las

larvas L3 salen del huevo y permanecen envueltas en la cutícula de la larva L2. Presentan un anillo nervioso, un diente de penetración cefálico y tracto intestinal rudimentario. Su cuerpo es puntiagudo en el extremo posterior y su tamaño suele comprender entre 330-370  $\mu\text{m}$  de largo, incluyendo la cutícula (Van Banning 1971, Smith 1971, Grabda 1976). Estas larvas pueden sobrevivir en el medio marino nadando libremente alrededor de una semana a 24,3°C y entre 8 y 14 semanas a 4-0°C, hasta ser finalmente ingeridas por crustáceos (hospedadores intermediarios), donde pierden la vaina cuticular, migran al hemocele y completan su desarrollo. Según estos autores la capacidad infectante de las larvas L3 para el resto de hospedadores que están implicados en el ciclo biológico de *Anisakis simplex* (peces, cefalópodos y mamíferos marinos) podría estar condicionada por el tamaño de las mismas.

Los peces, principalmente teleósteos, adquieren el tercer grado larvario cuando ingieren crustáceos, aunque también pueden hacerlo cuando se alimentan de otros peces contaminados o cefalópodos. Una vez en el interior, las larvas penetran la pared del tracto gastrointestinal alcanzado la cavidad corporal, donde pueden aumentar de tamaño sin experimentar ningún tipo de muda (Oshima, 1972), o bien pueden sufrir las dos últimas mudas y alcanzar la madurez sexual. En los calamares, las larvas se sitúan en la pared externa del estómago, mientras que en los peces suelen distribuirse en la musculatura enrolladas adquiriendo forma de espiral plano (*Figura 1*) y también bajo el tejido conectivo de las vísceras, como veremos posteriormente en el estudio realizado.

El ciclo del nematodo *Anisakis simplex* se completa cuando los hospedadores definitivos ingieren los peces teleósteos y/o cefalópodos contaminados con las larvas L3 de anisakis. Sin embargo, las larvas contenidas en los crustáceos, también pueden ser directamente infectantes para los mamíferos marinos. El tercer estadio larvario es el típicamente infectivo para los seres humanos, que son hospedadores accidentales.

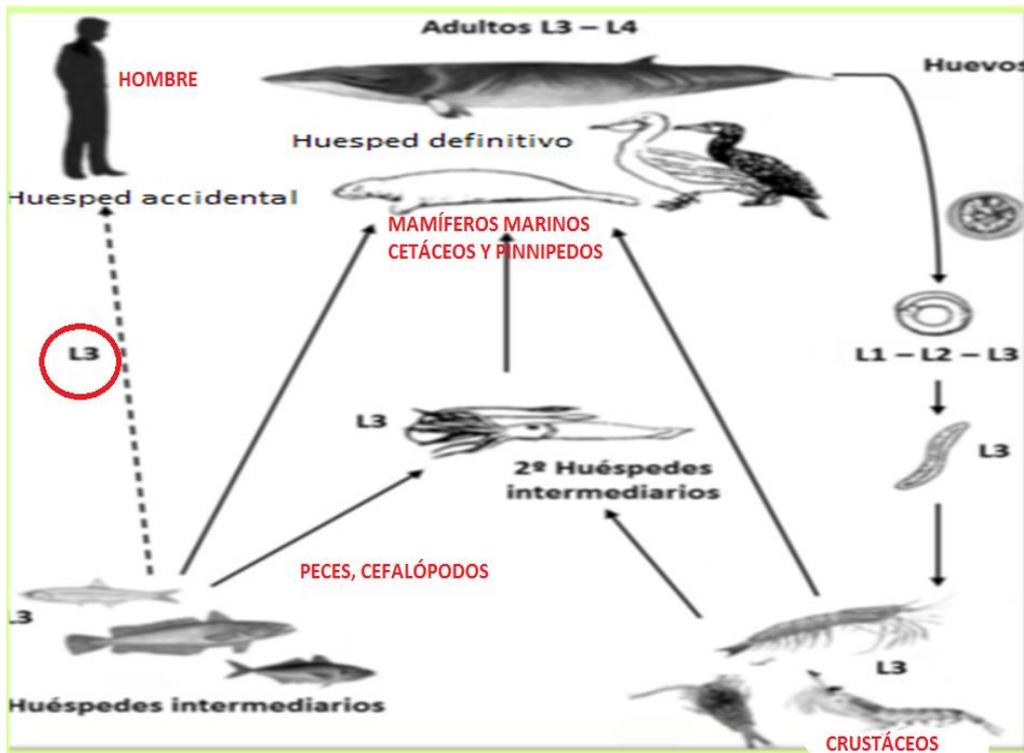


Figura 6. Ciclo de biológico de *Anisakis* spp. (Levsen y Lunestad, 2010).

## 2.4 CUADRO CLÍNICO DE ANISAKIS

Una vez ingeridas por el hombre, las larvas pueden generar diferentes cuadros clínicos:

- Anisakiasis aguda, gástrica e intestinal
- Anisakiasis extraintestinal
- Anisakiasis crónica
- Anisakiasis gastro-alérgica

El asentamiento sobre la pared del estómago produce cambios patológicos. Normalmente se observan grupos de 50-100 parásitos en los estados larvarios L3 y L4, conocidos como granuloma eosinofílico, en el centro de úlceras 1-6 cm de diámetro.

El extremo anterior del nematodo alcanza la submucosa, donde se encuentran rodeados por fibrina e infiltración celular masiva. La acumulación de abundante tejido granulomatoso alrededor de la lesión hace que la mucosa y submucosa se vean engrosadas.

En algunas ocasiones las larvas pueden perforar totalmente la pared del tracto gastrointestinal, alcanzar la cavidad abdominal, y una vez en ella, migrar a diferentes localizaciones donde son destruidas por el sistema inmunitario del hospedador. Aunque

la anisakiasis extraintestinal generalmente se asocia a manifestaciones clínicas leves, la diversidad de tejidos afectados trae consigo mayor heterogeneidad en las alteraciones patológicas.

Actualmente, la toxoinfección producida por *Anisakis* spp. preocupa no solo por la infección parasitaria en el pescado que se consume, sino también por las respuestas alérgicas, que pueden llegar a ser muy graves, por la hipersensibilidad que se produce como consecuencia de la enfermedad gastro-alérgica.

En la forma gastro-alérgica, la exposición al parásito provoca una respuesta Ig E total y específica de gran intensidad, con Ig M e Ig A presentes; la magnitud de la reacción corresponde a una respuesta de memoria, que se propone concurre con una respuesta primaria a nuevos antígenos y desencadena una reacción de tipo Th 1 y Th 2 con hipersensibilidad manifestada como urticaria, angioedema, broncoespasmo, asma y shock anafiláctico.

Estas manifestaciones parecen ser el reflejo sistémico de las manifestaciones alérgicas locales en donde la desgranulación de mastocitos es uno de los mecanismos del hospedador para liberarse de la larva parasitaria y limitar la parasitosis. La forma gastro-alérgica se sospecha tras la aparición de la sintomatología alérgica descrita que se presenta de minutos hasta 24 horas después de la ingesta del pescado contaminado, junto con síntomas abdominales como náusea, vómito, diarrea y dolor abdominal agudo.

El diagnóstico de la anisakiasis se puede establecer con la anamnesis del consumo de pescado, y con la determinación de Ig E total y específica. Asimismo, es de ayuda la determinación de Ig E, Ig G e Ig A, que ayuda a distinguir las reacciones cruzadas que pueden presentarse contra otros parásitos como áscaris, toxocara o *Echinococcus* en la prueba cutánea. (Joseph Bellanti y col., 2008).

El caso más representativo causante de alergia, es el antígeno Ani s 4, se trata de una proteína identificada por investigadores del Hospital Carlos III, que es resistente a tratamientos térmicos, a las altas presiones y a tratamientos con pepsina, puede producir alergia en diferentes grados y en personas sensibilizadas llegar a ocasionar un shock anafiláctico. (<http://dicat.csic.es/rdcsic>)

Según documenta la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010), existe la posibilidad de que se den casos de alergia a *Anisakis simplex* como resultado de la

contaminación de los productos de la pesca con alérgenos, sin necesidad de parásitos vivos para provocar la reacción alérgica.

Sin embargo, hay controversia científica en este punto. Algunos científicos defienden que si la larva está muerta, bien por cocinado o congelación, no se producen cuadros alérgicos, esto ha sido testado con pacientes alérgicos voluntarios, que tras ingerir larvas que habían sido sometidas a tratamientos, ninguno de los voluntarios desarrolló alergia a este parásito. ([www.lavozdegalicia.es](http://www.lavozdegalicia.es))

Una investigación realizada por científicos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y el Instituto de Salud Carlos III ha demostrado mediante la descripción de 28 proteínas que la potencialidad alérgica de Anisakis varía dependiendo de la especie de parásito (Susana C. Arcos y col., 2014).

## **2.5 LOCALIZACIÓN DE LAS LARVAS EN EL HOSPEDADOR**

Conocer la localización del parásito es importante para la población, sobre todo si la infección es en la musculatura del pescado, ya que es la parte que se consume. Las larvas se encuentran formando una espiral plana y apretada sobre las vísceras, principalmente abdominales, sin embargo, también pueden migrar hacia la musculatura de los peces, en primer lugar invaden la musculatura hipoaxial o ventral y posteriormente epiaxial o dorsal penetrando profundamente.

La localización de la larva en el pescado se ve influenciada por distintos factores (Chía y col., 2010, Smith, 1984, Tejada, 2009, Valero y col., 2006), como son:

- La especie de hospedador según su hábitat.
- La alimentación del hospedador: En aquellos pescados que se alimentan de crustáceos eufáusidos como la bacaladilla, el arenque o la caballa, la mayoría de las larvas se encuentran en la cavidad abdominal y vísceras, mientras que los pescados piscívoros como el bacalao o la merluza suelen presentar larvas también en la musculatura hipoaxial que rodea el abdomen.
- El grado de infestación: Un alto número de parásitos en la musculatura indica una infección previa en las vísceras abdominales.

- Edad: Los peces de mayor edad han tenido más posibilidades de adquirir el parásito.
- Condiciones de almacenamiento después de su captura (Congelación, salazón...).

Se han podido comprobar diferencias en la capacidad de penetración en la musculatura del pescado entre *A. simplex* y *A. pegreffii*. Suzuki y col. (2010) demostraron que *A. simplex* s.s penetra a mayor velocidad. Además, Quiazon y col., (2001), vieron que la presencia de Anisakis en la musculatura de los peces obedece también al tiempo que transcurre desde que el hospedador se infecta. Por otra parte se vio que el hígado de la bacalada que es relativamente mayor que el de otras especies, y es el órgano que alberga la mayor parte de las larvas L3 tras aparecer en la cavidad visceral.

Existen estudios que revelan la relación positiva entre el tamaño y la edad del pez con la prevalencia y abundancia media de las larvas en especies de peces que se comercializan en áreas del Atlántico y Mediterráneo (Abbatouy y col., 2011). Se sabe que este parásito es capaz de sobrevivir en estos peces durante al menos 60 semanas; la supervivencia depende de las defensas inmunológicas del pez (Levsen y Midthun, 2007).

Antiguamente, se creía que las larvas migraban a la musculatura pero se detenían una vez muerto el pescado; sin embargo, algunos autores pusieron de manifiesto que la migración puede seguir produciéndose después de su captura, Smith y Wootten (1995), observaron cómo aumentaba significativamente las larvas en el músculo del arenque mientras lo conservaban en hielo durante 48 horas, aunque por otra parte Wharton y col. (1999) observaron que en los pescados congelados en hielo hay menor migración. Otro factor clave que estimula la migración de las larvas es la cantidad de grasa que acumulan algunos pescados en el tejido muscular, como se vio en la caballa (Smith, 1984). Sin embargo, los que almacenan lípidos en el hígado como en el caso de la bacalada esta migración no suele darse, a no ser que la infestación sea masiva.

## **2.6 EJEMPLARES DE PESCADO COMERCIALIZADOS EN ASTURIAS**

### **2.6.1 Bacalada (*Micromesistius poutassou*)**

Conocida también como bacaladilla o lirio (*Figura 7*), pertenece a la familia de los gádidos. Vive principalmente en aguas Atlánticas, Cantábricas (sobretudo en Asturias) y Mediterráneas habita a profundidades considerables entre los 100 y 3000 m en aguas templadas situadas los 79° y 26° de latitud norte donde se alimentan de pequeños crustáceos, peces y cefalópodos. Para alimentarse realizan migraciones diarias, por el día descienden al fondo para alimentarse y por la noche se encuentran en la superficie, los jóvenes se encuentran más cerca de la costa. Se reproduce sobretudo en invierno, finalizando en el mes de mayo. Se trata de una especie muy abundante y de gran importancia comercial, ya que se pesca en grandes cantidades y el precio en el mercado es bajo, lo cual hace que sea un pescado muy consumido entre la población.

Investigaciones realizadas por Universidades españolas y el Centro Nacional de Microbiología han constatado que la media de larvas de *Anisakis* spp. en bacaladillas del Atlántico se ha cuadruplicado en los últimos años ([www.sanycontrol.es/](http://www.sanycontrol.es/))



*Figura 7. Ejemplar de bacaladilla (Micromesistius poutasou)*

### **2.6.2 Merluza (*Merluccius merluccius*)**

La merluza europea También llamada pescadilla (*Figura 8*), es un pescado marino blanco de la familia de los merlúcidos que se distribuye por la costa de Europa y África. Su tamaño oscila entre los 2 y 10 kgs y habita a una profundidad media de 200 metros a una temperatura de unos 5°C, aunque también se han encontrado a una profundidad de hasta 1000 m, vive sobre sustratos blandos de fango o fango arenoso de la plataforma continental, en el Noreste y Norte de la Península Ibérica (Golfo de

Vizcaya y Galicia). Los ejemplares menores de 15 cm se alimentan de crustáceos, y a partir de esta medida su alimentación se basa en peces de unos 20 cm de longitud entre los que destaca la bacaladilla.

Constituye uno de los recursos más importantes para la actividad pesquera europea, al tener un altísimo volumen de captura.

Debido a la parasitación entre otros motivos, las investigaciones se han dirigido a mejorar el conocimiento de la especie para su domesticación y posterior producción en acuicultura (<https://oceanoeccimat.wordpress.com>).



Figura 8. Merluza del Cantábrico (*Merluccius merluccius*)

### 2.6.3 Caballa (*Scomber scombrus*)

También conocida en Asturias como Xarda (*Figura 9*), pertenece a la familia *Scombridae*, suele alcanzar un tamaño de aproximadamente 30 cm y su peso oscila entre 250-300 gr.

Forma parte del grupo de los pescados azules, que presentan gran cantidad de omega 3, lo que hace que su consumo sea muy recomendado. Su distribución es amplia, se encuentra en el Océano Atlántico y el Mar Mediterráneo siendo objeto de una fuerte pesca debido a su apetecible carne.

Se alimenta de otros peces de tamaño inferior, crustáceos y moluscos. Durante el invierno la caballa se encuentra a unos 170 m de profundidad, pero cuando se acerca el buen tiempo asciende a la superficie agrupándose en bancos muy numerosos.

Posee una amplia variedad de usos culinarios, aunque por regla general son empleadas en el enlatado o preparadas en escabeche; en este caso aumentaría el riesgo de anisakiasis. <http://www.pescaderiascorunesas.es/>

Las principales artes de pesca para esta especie son las redes de arrastre y el palangre.



Figura 9. Ejemplar de Caballa (*Scomber scombrus*).

#### **2.6.4 Boquerón (*Engraulis encrasicolus*)**

Conocido también como bocarte o anchoa europea (*Figura 10*), es un pescado azul de unos 15-20 cm de largo, con un alto valor comercial, ya que se captura fundamentalmente para la alimentación humana.

El tamaño de su ojo es grande en proporción a su cuerpo, lo que indica que su hábitat normal está a gran profundidad (pez pelágico y gregario). En los meses cálidos los boquerones ascienden a la superficie para alimentarse y reproducirse, mientras que en invierno permanecen a más de 100 m de profundidad.

La anchoa europea abunda a lo largo del año en todo el Mediterráneo, costa Atlántica de Europa y África y el Mar Negro.

En España se consume principalmente de tres maneras diferentes: fritos previamente rebozados, macerados con vinagre, sal, ajo, perejil y aceite de oliva o como una semiconserva en aceite de oliva previamente desecada en salazón.

Las preparaciones en semiconserva y en vinagre son potencialmente peligrosas para la salud, por la posible presencia del parásito *Anisakis*, por lo que para ser comercializados

en un establecimiento público se exige que sean sometidas previamente a un procesado que elimine el parásito. (AECOSAN)



Figura 10. Anchoa del Cantábrico (*Engraulis encrasicolus*)

#### 2.6.5 Chicharro (*Trachurus trachurus*)

También denominado jurel (*Figura 11*), pertenece a la familia *Carangidae*, tiene un tamaño en torno a 40 cm y su peso suele ser entre 300gr-1kg. Puede encontrarse hasta 200-300 m de profundidad en las aguas del Pacífico Sur, en las costas del Atlántico, Mar Negro y Mediterráneo. Durante los meses de invierno habita lejos de la costa, y cuando comienza el verano se acerca para reproducirse, su alimentación está basada en peces pequeños y crustáceos. <http://www.pescaderiascorunesas.es/>



Figura. 11. Ejemplar de Chicharro (*Trachurus trachurus*)

#### 2.6.6 Lubina (*Dicentrarchus labrax*)

Pertenece a la familia Moronidae, es propia del Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico. Este pescado (*Figura 12*) es muy apreciado por su valor culinario y en la pesca deportiva. Suele encontrarse a una profundidad de entre 0 y 15 metros. La época de pesca transcurre entre enero y marzo, es muy voraz y su dieta se compone de crustáceos, gusanos y otros animales marinos.

Su crianza está ampliamente extendida en muchos países Mediterráneos. Los centros de reproducción producen huevos y larvas a partir de individuos reproductores en condiciones muy controladas. Las instalaciones de engorde se componen de jaulas flotantes en el mar, tanques de hormigón o estanques de tierra. En todos ellos se alimenta a las lubinas con piensos fabricados a harinas y aceites de pescado, la talla comercial va desde los 180 gr hasta más de 1500 gr.

Con la finalidad de comprobar que los peces criados en condiciones controladas por técnicas de acuicultura permite reducir prácticamente a cero las posibilidades de infección por *Anisakis* spp., la asociación empresarial APROMAR llevó a cabo un exhaustivo estudio de dos años de duración, junto con el Instituto de Ciencia y Tecnología de los alimentos y Nutrición del CSIC y con Agrupación de Defensa Sanitaria de la Acuicultura de la Comunidad Valenciana.  
<http://pescadosymariscos.consumer.es/lubina-o-robalo>

Además otro estudio realizado por investigadores de la Universidad de Murcia demostró la ausencia de larvas de *Anisakis* en lubinas cultivadas en piscifactorías del Mediterráneo, por lo que su consumo no supone un riesgo de exposición a este parásito.  
<http://www.laverdad.es/murcia>



Figura 12. Ejemplar de Lubina (*Dicentrarchus labrax*)

### 2.6.7 Gallo (*Lepidorhombus boscii*)

Pertenece a la familia de los peces planos, poseen un tamaño entre 20-30 cm con un peso de 250 gr, cuyas especies se caracterizan por tener los ojos en el lado izquierdo del cuerpo. El gallo (*Figura 13*) se pesca en las aguas del Atlántico Nororiental, en el Mar del Norte y en el Mediterráneo occidental. Habita en profundidades entre 100 y 400 metros. Su alimentación está basada en crustáceos, cefalópodos y peces pequeños.

<http://www.pescaderiascorunesas.es/>



Figura 13. Ejemplar de Gallo (*Lepidorhombus boscii*)

## **2.7 MEDIDAS PARA LA REDUCCIÓN DEL RIESGO ASOCIADO CON *ANISAKIS SPP.***

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010) realizó una evaluación sobre la seguridad alimentaria relacionada con la presencia de parásitos en productos procedentes de la pesca, especialmente en lo referente al riesgo sanitario de producir reacciones alérgicas. Se concluyó que el único parásito presente en estos productos y con posibilidad de causar alergias es *Anisakis spp.* Los casos de alergias se observan con alta frecuencia en algunas regiones europeas, y raramente o nunca en otras. Esto puede ser debido a la diferencia de sistemas de vigilancia y hábitos de consumo del alimento. Se sugirió que, con objeto de reducir la incidencia de las alergias, debe informarse sobre todos los riesgos existentes y los métodos físicos y químicos para eliminarlos, tanto al personal médico, como a los trabajadores de la industria pesquera y a la población en general.

En el año 2011 la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) ha propuesto una serie de pautas para reducir el riesgo asociado a esta problemática, indicando que las medidas deben aplicarse en todos los eslabones de la cadena de producción, desde la captura del pescado (área y tipo de práctica) hasta la manipulación del pescado a bordo y en tierra.

### **2.7.1 Prevención en la producción primaria**

Se considera la etapa más difícil de controlar, pero sirve para reducir la presencia de *Anisakis spp.* en pescados sin eviscerar. Esto se lleva a cabo evitando faenar en determinadas áreas muy contaminadas. Además, en el caso de aquellas especies de peces que con mayor frecuencia estén parasitadas se recomienda capturar sólo a partir de una determinada talla (WHO, 1995). También se debe controlar el impacto de la actividad humana en la incidencia de esta enfermedad en prácticas como eviscerar pescado a bordo y arrojar las vísceras al mar, ya que estas son consumidas por crustáceos y otros peces que a la vez constituyen el alimento de los peces más grandes. Por otro lado, la evisceración del pescado en alta mar puede resultar positivo para el consumidor, ya que cuanto antes se evisceren habrá menos posibilidades de que las larvas lleguen al músculo. Se ha comprobado en pescados, como el salmón de piscifactoría, que se han alimentado exclusivamente de pienso, que la incidencia del parásito es prácticamente nula. Por lo tanto, el pescado debe eviscerarse en alta mar para

evitar posteriores anisakiasis en el consumidor, pero es de suma importancia someter antes las vísceras a un tratamiento de forma que se inactiven las larvas antes de tirarlas al mar, de este modo se evita que vuelvan a ingresar en la cadena trófica.

### **2.7.2 Prácticas durante la captura y manipulación a bordo**

El tiempo que transcurre entre la captura y el eviscerado debe ser mínimo, para reducir la probabilidad de que el parásito emigre a la musculatura (principalmente hipoaxial en algunas especies) del pescado post mortem. Las partidas muy parasitadas se deben desechar (EFSA, 2010).

Se debe congelar el pescado a bordo lo antes posible, de esta forma se consigue inactivar las larvas, aunque puede ser que no se destruya la capacidad de sensibilización de los antígenos de la larva (Solas y col. 2008, 2009; Rodríguez Mahillo y col., 2010).

### **2.7.3 Pescado fresco. Manipulación en tierra e inspección**

En este punto la prevención se basa en el lavado de la cavidad abdominal tras el desembarque, y si es posible eliminación de la musculatura hipoaxial (en caso de que no sea comercializado entero). Se debe realizar un examen visual del pescado entero. Si se trata de filetes y estos contienen larvas, estas deben extraerse con un cuchillo y practicar un examen por transiluminación (consiste en proyectar una fuente luminosa por la parte inferior del pescado, para lo cual se suelen utilizar mesas iluminadas) (Gago Cabezas L. y col.).

## **2.8 TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA LA INACTIVACIÓN DE LARVAS DE ANISAKIS.**

Los métodos empleados en la industria que se han explicado hasta ahora, no son en muchas ocasiones suficientes para evitar el consumo de pescado infectado, por lo que se debe recurrir a tratamientos físicos y químicos como los que se explican a continuación. Hay que tener en cuenta que aunque la larva este inactiva después de haber sometido el pescado a distintos tratamientos, las proteínas de la larva permanecen y pueden producir episodios de alergia en aquellas personas que han sido previamente sensibilizadas por ciertos alérgenos.

### **2.8.1 Congelación**

La eficacia de la congelación para inactivar las larvas de *Anisakis spp.* es incuestionable. De hecho, se considera que la congelación es el único punto crítico de control eficaz para prevenir la infección por nematodos cuando se aplica el sistema Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) a la obtención de determinados productos de la pesca.

La eficacia de este tratamiento depende de varios factores como la temperatura, el tiempo que dura el pescado congelado, y la cantidad de grasa que posee.

Según el reglamento 853/2004 (BOE núm. 302, Martes 19 dic 2006) se establecen normas de higiene de los alimentos de origen animal y establece que los peces y productos a base de ciertos pescados que se vayan a consumir crudos o prácticamente crudos deben alcanzar -20 °C en todos los puntos y mantenerse a esa temperatura durante al menos 24 horas. Este tratamiento también debe aplicarse a productos que se ahuman en frío, en los que la temperatura en el interior no supera los 60 °C, como es el caso de la sardina, la caballa o el salmón salvaje del Atlántico o del Pacífico, y además para aquellos escabechados o salados en los que el procesado no es suficiente para la destrucción de las larvas.

Pero no todos los equipos que se utilizan para congelar son sistemas rápidos, como los utilizados en las industrias. Debe tenerse en cuenta la capacidad de congelación de los equipos domésticos. La FDA especifica; “congelación y almacenamiento <-20°C durante 7 días (tiempo total en congelador convencional), o congelación a -35°C hasta que se solidifique y mantener a la misma temperatura durante 15 horas, o bien congelar a -35°C hasta que se solidifique y mantener a <-20°C durante 24 horas”. (<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM251970.pdf>)

### **2.8.2 Tratamiento térmico**

Las larvas de *Anisakis* son sensibles al calor. Se ha visto que las larvas presentes en el tejido muscular se inactivan a 55°C durante un tiempo entre 10 y 60 segundos, y a 60°C en un segundo. La FDA considera que el tratamiento a 60 °C durante un minuto es suficiente para matar las larvas (Bier, 1976) y la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICMSF) recomienda que debe alcanzarse 70°C en el interior del pescado. Se considera que el pescado frito y hervido, así como aquellos ahumados que superan los 60°C en su interior, los pasteurizados y cocinados al vacío “sous vide” son seguros desde el punto de vista de inactivación del parásito. En cambio no se consideran seguros los ahumados en frío, los cocinados en

plancha (no siempre está “bien hecho”) y los sometidos a microondas, ya que las ondas no llegan hasta el interior, sino que a partir de cierto punto el calor se transmite por conducción, y no se asegura una temperatura mínima necesaria para inactivar el parásito.

Por lo tanto, el tratamiento térmico también es eficaz, y el periodo de tiempo necesario dependerá del tamaño de la pieza, por lo que los peces más finos y pequeños son los más seguros.

### **2.8.3 Ahumado**

Se ha establecido que las condiciones de ahumado en caliente, siempre que el producto se mantenga entre 70-80°C durante un tiempo de 3 a 8 horas, son suficientes para asegurar la muerte de las larvas (FDA/CFSAN, 2001).

### **2.8.4 Altas presiones**

Constituyen un tratamiento eficaz para la inactivación de larvas de *Anisakis spp.* Se ha comprobado que la aplicación de 200 MPa inactiva el 100% de las larvas en 3 a 10 minutos (Molina- García y Sanz, 2002), aunque pueden alterar las propiedades organolépticas del producto al producir la desnaturalización de las proteínas.

### **2.8.5 Irradiación**

Las larvas de *Anisakis spp.* son más resistentes que las de otros parásitos, en algunos casos se requieren tratamientos de hasta 10 KGy (Seo y col., 2006).

### **2.8.6 Adición de salmuera**

Las larvas de *Anisakis spp.* son sensibles a la sal pero sólo bajo ciertas condiciones. Se recomienda concentraciones de cloruro sódico al 6-8% durante al menos 6 semanas. La salazón en seco inactiva eficazmente las larvas de la superficie, pero si se trata de poco tiempo no lo hace en el interior del pescado. La sacarosa durante 35 días al 12% también inactiva las larvas.(ICMSF)

### **2.8.7 Marinado o escabechado, acidificación:**

Un ejemplo son los boquerones en vinagre. La sal y el vinagre pueden reducir el peligro asociado al *Anisakis spp.* pero no lo eliminan ni lo reducen hasta un nivel aceptable, estos productos necesitan ser congelados previamente al procesado del escabechado o

marinado. Para producir la inactivación de las lavas a condiciones de pH ácido se ha propuesto para las anchoas el tratamiento del producto con una alta concentración de ácido acético (10%) y de sal (12%) durante 5 días (Sanchez – Monsálvez y col., 2005).

## **2.9 TÉCNICAS CONVENCIONALES DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIS EN PESCADOS**

Debido a la creciente preocupación por la presencia de parásitos, y especialmente de *Anisakis spp.* en pescado y sus derivados, la ciencia se ha dirigido en los últimos años a la búsqueda de métodos de detección y control, que reduzcan o eliminen la presencia del parásito en los productos procedentes de la pesca. Lo que proporciona un importante beneficio tanto para la industria alimentaria como para el consumidor final.

Existen varios métodos de eficacia y complejidad variables que examinan y detectan la presencia de *Anisakis spp.* en estos productos, entre los que se encuentran la inspección visual simple del pescado entero, fileteado, observarlo al trasluz (transiluminación con luz ultravioleta) prensándolo, digestión, espectroscopia de imagen por absorción /reflexión y conductividad. Todas ellas tienen como objetivo la detección del parásito vivo o muerto.

Por otra parte también se han descrito otros métodos de detección basadas en secuencias de nucleótidos y péptidos pertenecientes a las larvas de *Anisakis spp.*, que mediante marcadores moleculares permiten la identificación del parásito realizando técnicas como la PCR. (López y Pardo, 2010).

Existen técnicas inmunohistoquímicas basadas en anticuerpos policlonales como el ELISA, Western Blot, Dot Blot o tiras cromatográficas, para la extracción de las proteínas causantes de la alergia en el pescado que contenga o haya contenido larvas de *Anisakis spp.* vivas o muertas, para posteriormente inducir la formación de anticuerpos frente a dichos antígenos y/o para que puedan ser detectados mediante los anticuerpos generados anteriormente.

### **2.9.1 Técnicas visuales**

#### **➤ Examen visual simple**

Este examen es el método más sencillo de detección de parásitos y se basa principalmente en la búsqueda de *Anisakis* en la musculatura y en las vísceras. Una inspección ocular en ocasiones es suficiente para saber si el pescado está infestado, principalmente cuando la parasitación es alta, pero es insuficiente para saber si contiene proteínas parasitarias, y tampoco cuando se trata de pescado procesado como puede ser el caso de conservas y surimi. La inspección del pescado fileteado revela la presencia del gusano embebido cerca de la superficie, y se puede sacar fácilmente con un cuchillo. La movilidad de los parásitos una vez que la pieza alcanza la temperatura ambiente, hace que sea fácilmente reconocible.

#### ➤ **Transiluminación**

Esta técnica consiste en exponer el pescado, fileteado, a una luz artificial blanca o luz UV, sabiendo que, en caso de la presencia de parásitos, estos se verán opacos facilitando su detección. Es una técnica de bajo coste y rápida, pero a la vez tiene limitaciones como el grosor del filete, la presencia de piel, el contenido en aceite, y la experiencia del operario, por lo que se considera de baja eficacia.

#### ➤ **Microscopía**

También pueden ser identificadas y caracterizadas por su morfología mediante microscopía óptica y electrónica.

### **2.9.2 Digestión**

La digestión implica el uso de una solución de pepsina/ácido clorhídrico para liberar las lavas del músculo y otros tejidos (Jackson et al., 1981; Smith y Wootten, 1975).

### **2.9.3 Conductividad**

Esta técnica de detección se basa en la diferencia de conductividad de las larvas y el músculo del pescado, siendo mucho mayor en el tejido de peces que en *Anisakis spp.* La conductividad pone de manifiesto las propiedades eléctricas del músculo del pescado, aunque cuenta con limitaciones como la presencia de piel.

## **2.10 TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS Y MOLECULARES**

Las medidas destinadas a la protección de consumidores alérgicos han ido creciendo, esto ha provocado que la detección de alérgenos en los alimentos sea de gran

importancia tanto para la industria como para los organismos legislativos (Van Hengel, 2007).

Las actividades que controlan la producción de estos alimentos se fundamentan en el desarrollo de técnicas dirigidas a la detección de trazas de ingredientes alergénicos. Existen distintos enfoques técnicos para la detección de proteínas alergénicas en pescados. Algunos se dirigen a la proteína específica (como en las técnicas inmunológicas), y otros a un fragmento específico de ADN, un marcador de la presencia del alimento causante de la alergia. Estos métodos amplifican el ADN mediante PCR y posteriormente son visualizados (Poms y col, 2004, Van Hengel, 2007).

### **2.10.1 Técnicas inmunológicas**

Las técnicas inmunológicas permiten detectar y cuantificar los antígenos en el músculo del pescado y también en productos procesados. Además se ha podido comprobar que, en algunos productos enlatados el procesamiento térmico puede hacer que epítomos de antígenos que anteriormente estaban ocultos se muestren y causen nuevas alergias (Van Hengel, 2007).

Según Arlian y col (2003) hay 12 antígenos (Ani1-Ani12) identificados y caracterizados, aunque se sabe que existen un número indefinido de antígenos que aún no se han identificado.

El antígeno Ani s4 ha sido objeto de estudio para evaluar conjuntamente la acción de los tratamientos dados al pescado en el reconocimiento de antígenos al ser una proteína de bajo peso molecular, estable al ácido, pepsina y a elevadas temperaturas, se ha demostrado que su alergenicidad se mantiene después del cocinado (Moneo y col., 2000, Rodríguez Mahillo y col., 2008) y ha sido relacionado con episodios de anafilaxia. Se estima que ha sido reconocido en el 27 % de pacientes alérgicos a *Anisakis spp.* a pesar de ser un antígeno minoritario presenta un alto valor diagnóstico.

Mediante el uso de anticuerpos policlonales se pueden detectar proteínas antigénicas del parásito y anticuerpos policlonales que detecten el antígeno Ani s4 (termorresistente a 100°C durante 30 minutos) en tasas inferiores a 1ppm con tasas de recuperación mayores a 65 % y se ha demostrado que no presentan reacciones cruzadas. Los antígenos extraídos se detectan por Inmuno Blot, ELISA o Western- Blot. Este método

para el cual el CSIC solicitó una patente en 2008 ([http://digital.csic.es/bitstream/10261/28597/1/2340978\\_A1.pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/28597/1/2340978_A1.pdf)) tiene como objetivo detectar la alergenicidad residual en aquellos pescados portadores de *Anisakis spp.* que han sido ya sometidos a tratamientos culinarios y procesados industrialmente.

### **Western Blot**

La inmunodetección por Western Blot es una técnica electroforética que permite la detección específica de las proteínas previamente separadas en el gel de acrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Una vez fijadas, las proteínas antigénicas pueden manipularse sin perderlas y someterlas a reacciones, por ejemplo, con anticuerpos como la Ig E (Kurien y Scofield 2009).

### **Dot Blot**

El Dot-blot representa una simplificación de las técnicas Northern- Blot, Southern- Blot y Western Blot. Las proteínas antigénicas se inmovilizan directamente en la membrana de nitrocelulosa y se hacen reaccionar con un anticuerpo marcado, de forma que al reaccionar emite una señal. Esta técnica es rápida y altamente sensible y no necesita fenómenos de transferencia para el gel, sin embargo no ofrecen información sobre el tamaño de la molécula estudiada (Besler, 2001). Por otro lado, si se detectan dos moléculas de tamaños distintos, aparecerán como un solo punto. Por lo tanto, esta técnica solo permite averiguar la presencia o ausencia de una molécula al ser detectada por una sonda de ADN o por un anticuerpo (Kurien y Scofield, 2009).

### **2.10.2 Técnicas básicas para el análisis de ácidos nucleicos**

El análisis de ácidos nucleicos es una herramienta potente para el diagnóstico e identificación de especies a nivel molecular.

### **Extracción del ADN**

Como en la mayoría de técnicas empleadas para el análisis de genes, es necesario realizar en primer lugar la extracción y purificación del ADN, de esta forma se obtienen los ácidos nucleicos liberados de cualquier resto de tejido presente en las células.

Para la extracción del ADN del núcleo en organismos parásitos existen varios protocolos diferentes, a continuación se explica brevemente y como ejemplo uno de los más utilizados. En primer lugar se homogeneizan las células y posteriormente se

rompen en un tampón de lisis, que suele contener el detergente SDS (dodecil sulfato de sodio) y EDTA. Este tratamiento además de romper la membrana favorece la desnaturalización de las proteínas. El SDS actúa rompiendo los enlaces no covalentes en las proteínas desnaturalizándolas y además solubiliza las membranas lipídicas. El EDTA es un agente quelante que desestabiliza la membrana al eliminar cationes divalentes, principalmente el magnesio (cofactor de la desoxirribonucleasa) y a su vez se degradan las DNAsas que destruyen el ADN (Brown, 2006).

### **Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena polimerasa (a partir de ahora PCR) fue desarrollada en 1986 por Kary Mullis, esta técnica supuso una revolución en la biología molecular lo que le llevo a recibir el Premio Nobel de Química en 1993. Hoy en día es una de las técnicas más utilizadas y permite la amplificación in vitro de fragmentos de ADN millones de veces en unas pocas horas, además permite utilizar cantidades extremadamente pequeñas del ADN muestra. Es una técnica muy útil para obtener cantidades utilizables de una secuencia de ADN específica que se desea analizar (Dale y Von Schantz, 2002).

El proceso es automatizado mediante un aparato llamado termociclador (*Figura 14*), que es programable y permite calentar y enfriar los tubos donde ocurre la reacción.



*Figura 14. Termociclador del laboratorio de genética de recursos naturales del departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo donde tiene lugar la reacción en cadena de la polimerasa.*

Su fundamento está basado en la propiedad de las enzimas ADN polimerasas para replicar las hebras de ADN en sentido 5' → 3' utilizando como molde una hebra sencilla. La ADN polimerasa requiere el uso de cebadores para la polimerización. Estos son oligonucleótidos de ADN que se han sintetizado de forma que sean complementarios a los extremos 3' del fragmento que se desea amplificar (Brown, 2006).

El proceso necesita una mezcla de reacción, que se compone del propio ADN diana, los cebadores, los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), la ADN polimerasa, y el tampón adecuado que suele contener cloruro de magnesio ya que la enzima lo necesita como cofactor.

El procedimiento (*Figura 15*) consiste en la sucesión consecutiva de una serie de ciclos de altas y bajas temperaturas en los cuales ocurren distintos acontecimientos en el ADN. La PCR convencional comprende entre 25 y 50 ciclos repetitivos y cada uno de los cuales incluye tres reacciones secuenciales: en primer lugar se desnaturaliza el ácido nucleico de la secuencia diana, a continuación el cebador hibrida (se ancla) con la secuencia diana de cadena simple, y, finalmente ocurre la extensión del dúplex cebador-diana. La última etapa corresponde a la elongación del cebador, donde la polimerasa incorpora sucesivamente nucleótidos trifosfato al extremo 3' a una temperatura de 72°C.

Antiguamente la técnica era lenta, y las polimerasas como proteínas que son, se desnaturalizaban por las altas temperaturas, por lo que había que añadir nuevas polimerasas al inicio de cada ciclo. Hoy en día se utilizan polimerasas termoestables, procedentes de microorganismos capaces de crecer a altas temperaturas como es el caso de la bacteria *Thermus aquaticus* del cual procede la Taq polimerasa que fue aislada en el año 1968 por Thomas D. Brock y cuya temperatura óptima es de 80°C aunque puede llegar a resistir temperaturas de 96°C durante 40-50 minutos.

Los cebadores suelen ser secuencias cortas de ADN de aproximadamente entre 20 -30 nucleótidos de longitud, que se seleccionan para que hibriden específicamente con la secuencia que se va a estudiar. En la fase de apareamiento o hibridación cuando el par de cebadores se mezcla con el ADN diana, un cebador se une al sitio específico de un extremo del ADN diana mientras que, el otro cebador se aparea con el extremo opuesto de la secuencia diana complementaria. En la práctica la temperatura y tiempo de hibridación varía según la composición de bases, el tamaño y la concentración.

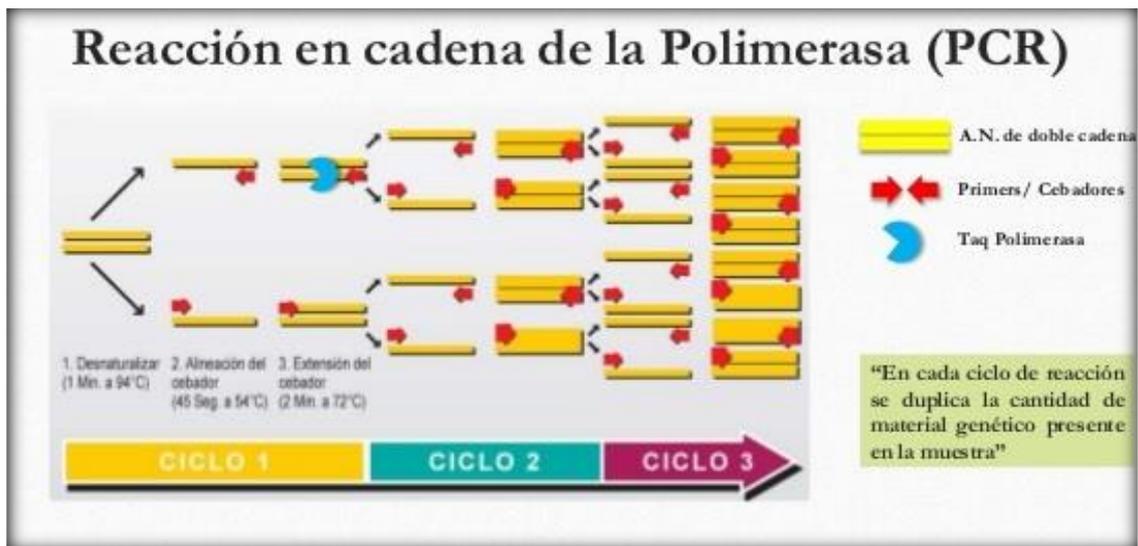


Figura 15. Esquema donde se muestran las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa en ciclos sucesivos, y la amplificación exponencial de las secuencias diana.

### Electroforesis

El uso de la electroforesis para la separación de proteínas se ha llevado a cabo de acuerdo a la idea desarrollada por el sueco Tiselius (1937).

La electroforesis es una técnica de separación molecular en una mezcla. Cuando se aplica un campo eléctrico, las moléculas se desplazan por el campo a una velocidad determinada según su relación masa-carga. La fuerza motriz de la electroforesis es la tensión eléctrica aplicada a los electrodos que se sitúan a ambos extremos del gel. Si dos moléculas tuviesen la misma masa, la de mayor carga neta se desplazará antes al electrodo.

Muchas macromoléculas importantes como aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos pueden contener grupos ionizables en su estructura, ionizables a un pH determinado, esto hace que la molécula tenga cierta carga, y por lo tanto las moléculas cargadas migran hacia los electrodos con carga opuesta.

Actualmente, los soportes que se utilizan son geles de agarosa o de poliacrilamida, en función del tipo de moléculas a separar (Nelson y Cox, 2006). Los geles de agarosa tienen una resolución menor que los de poliacrilamida, no permiten separar moléculas de ADN inferiores a 50 pb, sin embargo el rango de tamaño es mayor (entre 50 pb y 40 Kb) y varía en función de la concentración, a menor concentración de agarosa, mayor es el tamaño de las moléculas que se pueden separar. Los geles de poliacrilamida corren en

vertical y tienen mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos (5-600pb) que queremos separar pero poseen un poder de resolución mucho mayor.

La electroforesis horizontal en geles de agarosa es un método normalizado con poca resolución ya que las bandas tienden a ser difusas y se utiliza para separar fragmentos de ADN. El gel se realiza disolviendo la agarosa en polvo en un tampón de disolución y se calienta hasta llegar a ebullición, posteriormente se enfría hasta llegar a 55°C aproximadamente y se vierte en la cubeta donde se colocan los peines que darán lugar a los huecos (calles) en los que se carga el ADN. Una vez sólido el gel es cubierto con el tampón correspondiente.

Para visualizar los fragmentos el gel puede teñirse mediante colorantes fluorescentes. Antiguamente se utilizaba bromuro de etidio, aprovechando su propiedad intercalante en la secuencia de ADN, pero debido a su perjudicial efecto mutagénico, ha sido sustituido por otros considerados inocuos.

Cuando una muestra biológica, como el ADN, se mezcla en una solución tampón y se aplica a un gel, la carga y la masa de la molécula actúan de forma conjunta. La corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas y al mismo tiempo el otro electrodo las atrae. Mientras esto ocurre, el gel ejerce una fuerza de fricción actuando como un “tamiz molecular” que va separando las moléculas al atravesar forzosamente los poros en función de su tamaño (Nelson y Cox, 2006).

El tampón de alta fuerza iónica, hace que la conductancia eléctrica sea muy elevada y se genera una importante cantidad de calor. Existen diferentes tipos de tampones para la electroforesis de ADN bicatenario. Contienen EDTA (pH 8) y tris- acetato (TAE), tris-borato (TBE) o trisfosfato (TPE) a una concentración de aproximadamente 50mM (pH 7 – pH 8). Los tampones suelen fabricarse de forma concentrada, y se diluyen cuando se van a utilizar.

### **Secuenciación**

Constituye el conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G, T) en una secuencia de ADN. El desarrollo de la secuenciación ha acelerado significativamente la investigación y los descubrimientos biológicos.

Los métodos de secuenciación se desarrollaron a finales de los años setenta. Originalmente se descubrieron dos métodos: el método Maxam y Gilbert (1977) y el método de Sanger y col. (1977). Aunque ambos métodos producen grupos de fragmentos marcados de distinta longitud, los cuales son separados por electroforesis, estos métodos son conceptualmente muy distintos. El método de Maxam y Gilbert se basa en la degradación química parcial de la cadena original de ADN, mientras que el método Sanger está basado en la síntesis de una nueva cadena de ADN cuya elongación se detiene mediante la incorporación de una base modificada o terminador. Este es el método más utilizado de forma rutinaria en el laboratorio.

El método enzimático de Sanger consiste en la incorporación de terminadores dideoxinucleótidos (ddNTPs sin grupo 3'OH) a una nueva cadena de ADN mediante la actividad de una ADN polimerasa. Cuando se incorpora un terminador, la ausencia del grupo hidroxilo evita la formación del puente fosfodiéster en el siguiente nucleótido y la elongación de la cadena termina en ese punto. En el método original, cada uno de los cuatro terminadores se empleaban en reacciones distintas en presencia de un nucleótido marcado radiactivamente, de forma que se obtenían poblaciones de ADN de distinta longitud. Los fragmentos radiactivos obtenidos se separaban en un gel de poliacrilamida y la secuencia de ADN completa se determinaba mediante autorradiografía.

La sustitución de la radiactividad por fluorocromos ha permitido la automatización de su detección y análisis, y la aparición de secuenciadores automáticos. En el método actual cada terminador se asocia a un fluorocromo distinto los cuales se incorporan a la nueva cadena de ADN mediante PCR. Los nuevos fragmentos de ADN se separan por electroforesis capilar y la señal emitida por cada uno de los fluorocromos al ser excitados por un láser es captada por unos detectores y analizada mediante soporte informático.

### **2.10.3 Análisis de secuencias biológicas mediante herramientas bioinformáticas**

La bioinformática constituye una herramienta fundamental para la investigación biológica ya que nos ofrece la posibilidad de comparar y relacionar la información filogenética con fines deductivos.

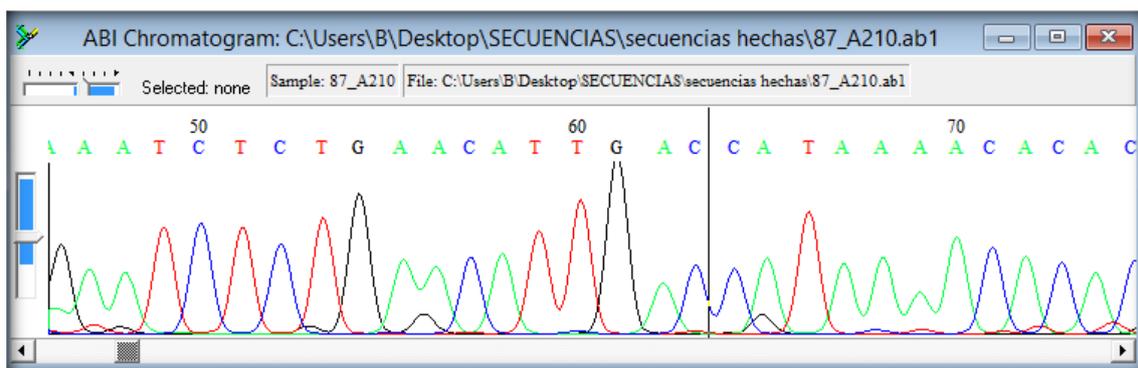
Durante la última década del siglo XX, la bioinformática surgió al converger los avances en ingeniería genética paralelamente a la explosión de las tecnologías de la información. Esto se puede observar en la base de datos GenBank, cuya información se duplica cada dos años aproximadamente desde hace tiempo.

Algunas de las razones por las que se considera adecuada los softwares informáticos en la investigación biológica son:

- la transparencia, ya que la información publicada por los científicos siempre está disponible.
- Potencia, estabilidad y flexibilidad,
- Economía

### BioEdit

BioEdit es un programa gratuito para editar alineamientos y analizar secuencias. La edición de las secuencias en los cromatogramas (*Figura 16*) es muy importante para paliar posibles errores en la lectura de las bases nitrogenadas de la secuencia analizada. La edición se realiza de forma manual, y consiste en corroborar visualmente la correspondencia de picos de diferentes colores (a cada base se le ha asignado un color diferente) con la secuencias de bases que aparece en la parte superior, y la corrección de la misma en el caso en que esto sea necesario. La edición resulta especialmente difícil al principio y al final de la secuencia ya que los picos no están bien definidos. Una vez editadas las secuencias y para poder realizar comparaciones es necesario alinearlas (*Figura 17*).



*Figura 16. Ejemplo: Cromatograma en el software Bioedit de una secuencia.*

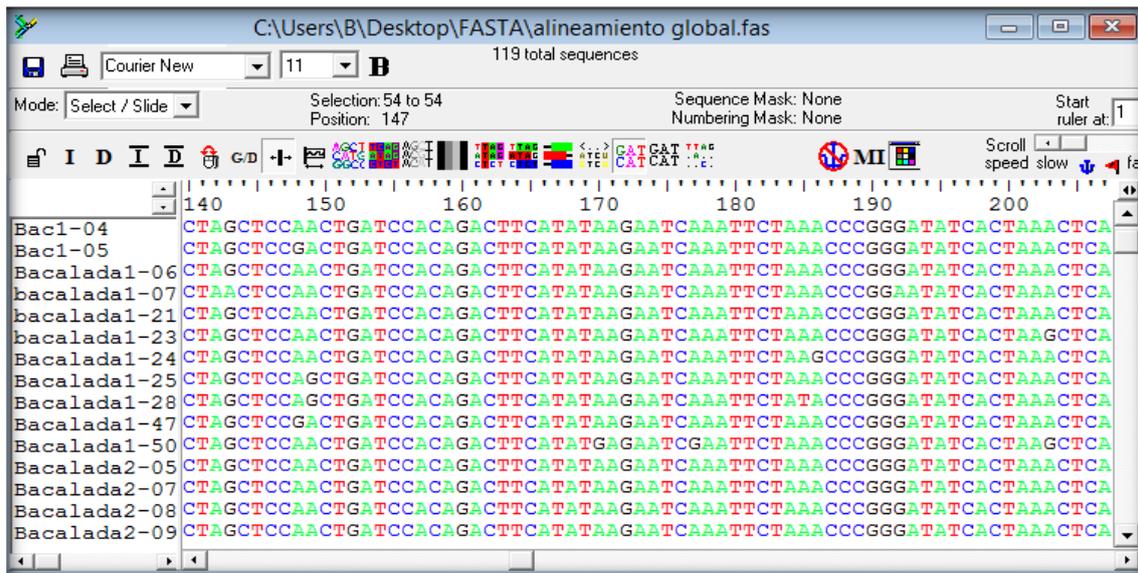


Figura 17. Ejemplo: Archivo del programa BioEdit con secuencias alineadas, en las que se muestran las bases nitrogenadas en colores distintos.

Una vez obtenida la secuencia limpia, y como paso previo al análisis de datos, se realizan búsquedas en la base de datos GenBank, utilizando el algoritmo BLAST que se encargará de comprobar si las secuencias revisadas con BioEdit son similares o iguales a otras identificadas anteriormente para la misma especie y/o región analizada.

Finalmente, todas las secuencias que se obtienen en el desarrollo del estudio, se depositan en la web del GenBank para que, tras su homologación, otros usuarios puedan utilizar esa información.

## BLAST

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local. Este software es capaz de comparar una secuencia problema con una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos (Figura 18). Este programa se utiliza para encontrar posibles genes homólogos. Cuando se obtiene una nueva secuencia, se usa el BLAST para compararla con otras que ya han sido anteriormente caracterizadas, para así poder inferir en su identidad (Camacho, 2009). El algoritmo del programa encuentra las secuencias de la base de datos que más se parecen a la secuencia problema (Figura 19), siendo capaz de calcular la significación estadística de sus resultados, para que puedan ser juzgados a través de ese parámetro (Altschul, S.F. 1997, Jhonson, 2008, Camacho, 2009). Se considera la herramienta más usada para la anotación y predicción funcional de genes.

BLAST utiliza el algoritmo heurístico de Smith- Waterman para realizar sus alineamientos y los califica usando una matriz de sustitución de nucleótidos. Dicha matriz contiene la puntuación (llamada score) que se le da al alinear un nucleótido de una secuencia con otro de otra secuencia (Altschul, 1997).

BLAST fue desarrollado por el Instituto Nacional de Salud del gobierno de E.E.U.U. es de dominio público y puede usarse de forma gratuita desde el servidor del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI). Entre las ventajas del uso del servidor NCBI se encuentran que el usuario no tiene que mantener ni actualizar las bases de datos y que la búsqueda se hace en Cluster de ordenadores, lo que otorga rapidez. Entre los inconvenientes se encuentran no se pueden hacer búsquedas masivas al ser un recurso compartido, no se pueden personalizar las bases de datos contra la que busca el programa y las secuencias son enviadas al servidor del NCBI sin ningún tipo de cifrado, lo que puede suponer un problema para quienes quieran mantener sus secuencias privadas. La aplicación local del BLAST tiene la ventaja de que permite manejar varios parámetros que en las búsquedas del NCBI están estandarizados, por lo que provee una mayor seguridad para los usuarios (Camacho, 2009).  
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Anisakis simplex voucher ASS3 cytochrome oxidase subunit II (COI) gene, partial cds, mitochondrial</a>	950	950	99%	0.0	98%	<a href="#">KC810003.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Anisakis simplex mitochondrion, complete genome</a>	939	939	98%	0.0	98%	<a href="#">KC965056.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Anisakis simplex isolate F4_DNA11_C cytochrome c oxidase subunit II-like (COX2) gene, partial sequence, mitochondrial</a>	933	933	99%	0.0	98%	<a href="#">GQ338430.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Anisakis simplex isolate F1_DNA16_C cytochrome c oxidase subunit II-like (COX2) gene, partial sequence, mitochondrial</a>	933	933	98%	0.0	98%	<a href="#">GQ338428.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Anisakis simplex isolate SMOLT4_DNA cytochrome c oxidase subunit II-like (COX2) gene, partial sequence, mitochondrial</a>	928	928	99%	0.0	97%	<a href="#">GQ338435.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Anisakis simplex isolate F2_DNA17_C cytochrome c oxidase subunit II-like (COX2) gene, partial sequence, mitochondrial</a>	928	928	99%	0.0	97%	<a href="#">GQ338429.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Anisakis simplex isolate 5_4 mitochondrion, complete genome</a>	922	922	98%	0.0	97%	<a href="#">JN786322.1</a>

Figura 18. Información proporcionada por el BLAST para identificar la especie.



Figura 19. Alineamiento y comparación de la secuencia problema con la secuencia de referencia de Genbank.

## DNAsp

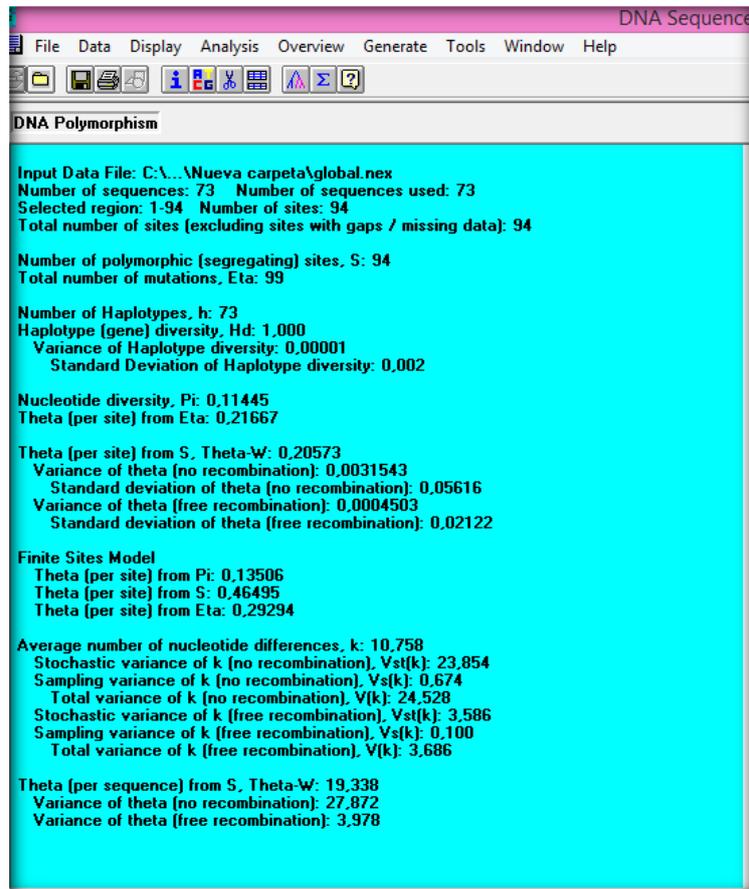
Es un paquete informático cuya función principal es permitir el análisis de los polimorfismos de la secuencia de ADN y SNPs (Polimorfismos de un solo nucleótido) que proporcionan información acerca de las fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones y especies. Los métodos genéticos, en particular los que se basan en la teoría coalescente, que defiende que las diferentes secuencias genéticas presentes en una población deben provenir de una única secuencia original, se han convertido en el marco principal para analizar polimorfismos.

Entre las características principales de este software se encuentran: la capacidad de almacenar conjuntos de datos de gran tamaño, cálculo estadístico de la genética poblacional y proporcionar resultados en forma tabular o gráfica.

Este software es capaz de analizar miles de secuencias con miles de nucleótidos para estimar las medidas de variación de la secuencia de ADN inter- e intrapoblacional, como desequilibrio de ligamiento, recombinación, flujo y conversión genético.

La magnitud del polimorfismo se estima mediante varias medidas calculadas como pueden ser el número de posiciones nucleotídicas diferentes entre dos secuencias, la diversidad de nucleótidos ( $P_i$ ), su varianza de muestro y el error estándar entre otras.

También permite calcular la divergencia genética entre poblaciones y cambios en el tamaño poblacional (*Figura 20*).



*Figura 20. Análisis de polimorfismos de secuencias de ADN en el programa DNAsp.*

### **MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis)**

La filogenia persigue trazar la relación entre los ancestros y los descendientes, representando las relaciones evolutivas en forma de árbol filogenético o de diagrama arborescente. Las afinidades entre los individuos se calculan utilizando distintos coeficientes en función del estudio. Existen varios métodos de construcción de árboles (métodos que se basan en matrices de distancias como UPGMA y Neighbor-joining, análisis de parsimonia, análisis de máxima verosimilitud) a través de programas informáticos específicos que permiten su realización automática.

- ✓ Neighbor-Joining (NJ): Este método consiste en agrupar secuencialmente los individuos con menos distancia genética, considerándolos una sola entidad, y a continuación se busca el siguiente taxón a menor distancia con ese grupo y se forma un nuevo agrupamiento. El proceso continúa hasta agrupar todos los

taxones en un mismo árbol. Es el método más preciso para construir árboles filogenéticos.

- ✓ UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean): Construye un árbol por un método de agrupamiento secuencial. Este asume que los taxones son grupos por sí mismos, y agrupa los dos taxones más cercanos entre sí basándose en la matriz de distancias, para posteriormente crear una matriz reducida considerando el agrupamiento como un único taxón. El mismo proceso de agrupamiento se repite y se crea otra nueva matriz reducida, y así sucesivamente hasta que todos los taxones se sitúan en el árbol.
- ✓ Parsimonia: Se basa en la relación de agrupación entre parejas de OTUs en función del mínimo número de diferencias estimadas a partir de los sitios informativos, la probabilidad del árbol más simple explica los cambios en las secuencias.
- ✓ Máxima verosimilitud: Este método busca el árbol que es más probable que haya generado los datos que hemos observado. Se parte de los datos y de un modelo de evolución y se calcula la probabilidad de que nuestros datos hayan sido generados por los distintos árboles posibles. Tiene la ventaja frente a los anteriores de utilizar con mayor eficiencia la información filogenética contenida en el alineamiento múltiple, es decir, dado un mismo alineamiento tiende a generar un resultado más cercano a la realidad.

#### **2.10.4 Marcadores genéticos y moleculares para la identificación de *Anisakis* spp.**

Para identificar la especie y realizar estudios filogenéticos del género *Anisakis* se ha recurrido al estudio de genes mitocondriales (cox II), RFLP, RAPD y electroforesis de isoenzimas principalmente.

##### **ADN mitocondrial**

El ADN mitocondrial (ADNmt) (*Figura 21*) es una estructura circular, que suele tener 37 genes, con una alta tasa evolutiva, lo que le convierte en un marcador ideal para el estudio de la genética de poblaciones y la filogenia.

Además al presentar herencia materna, sus loci son genéticamente independientes de los genes del núcleo, cuya herencia parental implica recombinación genética. La secuencia de nucleótidos del genoma mitocondrial completo de la especie de nematodo *A. simplex*

ha sido determinada, su tamaño es de 1396 pb y se ajusta a las características generales del ADN mitocondrial de nematodos (Kim y col., 2006). La secuencia mitocondrial es rica en A+T (71,2%) y se compone de 36 genes de los cuales 12 codifican proteínas y 22 son genes de ARNt, además presenta 15 regiones intergénicas no codificantes y 2 genes ARN ribosomal.

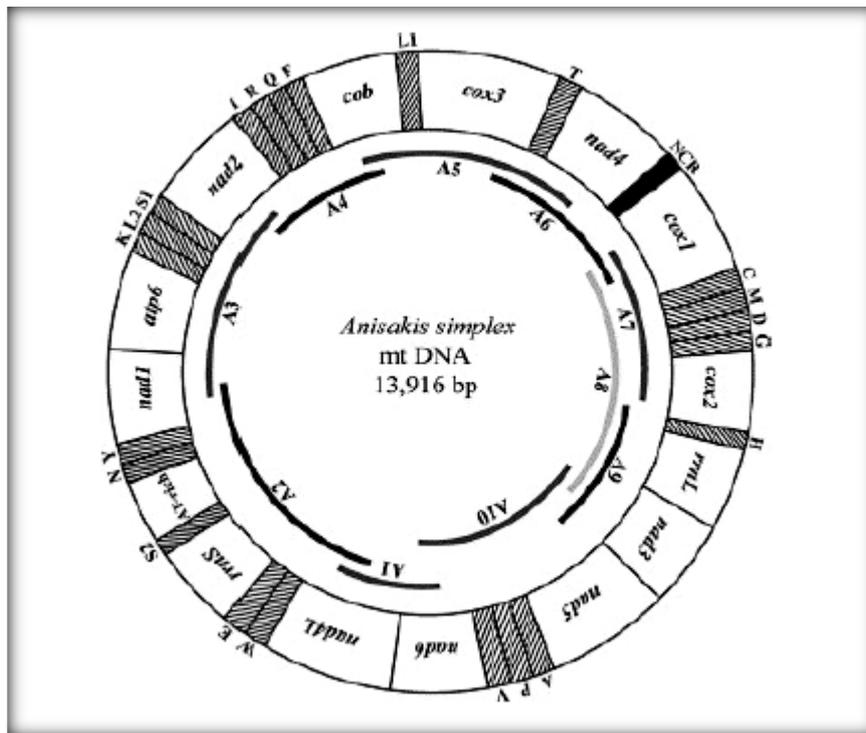


Figura 21. ADN mitocondrial de *Anisakis simplex* (Kim y col., 2006).

La subunidad II de la citocromo oxidasa es un componente clave de la cadena de transporte de electrones en el proceso de la respiración aeróbica. Su secuencia codificante puede ser amplificada mediante los cebadores 211 y 210 descritos por Nadler y Husdspeth (2000). El contenido de bases A+T de esta secuencia es muy alto, como ocurre en otras secuencias mitocondriales de nemátodos, a pesar de esto la secuencia de aminoácidos de la citocromo oxidasa II se muestra conservada y su ADN se ha utilizado para el estudio de la estructura genética de poblaciones de *Anisakis simplex* y la reconstrucción filogenética de anisákidos (Valentini y col., 2006).

### **Electroforesis de Isoenzimas para identificar *Anisakis***

En 1957 R.L. Hunter y Clement Markert describieron por primera vez a las isoenzimas como “*diferentes variantes de la misma enzima que tienen idénticas funciones y están*

*presentes en el mismo individuo*” por lo tanto catalizan la misma reacción química pero difieren en la secuencia de aminoácidos y por tanto en el peso molecular y /o carga eléctrica, lo que se traduce en diferente movilidad electroforética. El hecho de encontrarse en diferentes tejidos del mismo o distinto individuo ha permitido su comparación y su uso como marcadores genéticos. En el pasado, han sido los marcadores moleculares más utilizados junto con las aloenzimas, para el estudio de la genética de poblaciones.

En función de la carga eléctrica que presenta la enzima en solución, se desplazaran hacia el ánodo o el cátodo cuando se aplica un campo eléctrico. Como ocurre al ser sometidas a electroforesis, la distancia recorrida dependerá de la carga eléctrica, peso molecular de la proteína, de las condiciones en las que se realice (tiempo, voltaje..) de la capacidad de asociación de la propia enzima con otros compuestos susceptibles de ionizarse ente otros factores.

Una vez realizada la migración de las enzimas, aprovechando la capacidad catalítica que tienen, se procede al revelado, que se mostrara en un zimograma, constituido por un conjunto de bandas. De esta forma se pueden identificar los genotipos de los individuos estudiados, serán homocigotos aquellos representados por una sola banda, mientras que los heterocigotos aparecerán representados con tantas bandas como subunidades proteicas compone la enzima.

Los primeros estudios genéticos poblacionales del género *Anisakis* fueron realizados mediante el análisis electroforético de isoenzimas.

En el año 1986, Nascetti y col. realizaron un estudio electroforético de 22 loci enzimáticos en el que se puso de manifiesto la variación genética entre especies del complejo *Anisakis simplex* procedentes del Mar Mediterráneo y Noreste Atlántico. El estudio concluyó que se trataba de especies aisladas reproductivamente y que no existía flujo genético. El análisis de 3 loci SOD, ADK1 y Lap-1 mostraron alelos distintos según la especie lo que permitió diferenciar de forma fiable *A. simplex* y *A. pegreffii* tanto en estado larvario como en estado adulto. Fue también a partir de este estudio donde se distribuyó geográficamente estas dos especies, principalmente Mediterránea para *A. pegreffii* y sobretodo del Atlántico Norte para *A. simplex*.

Posteriormente, Mattiucci y col (1997, 1998, 2001, 2002, 2004), Mattiucci y Nascetti (2008) realizaron diversos de estudios basados en isoenzimas que constituyeron la base de para la realización de estudios con otros marcadores genéticos.

## RFLP-PCR

Los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción se refieren a secuencias específicas de nucleótidos de ADN que son cortadas por las enzimas de restricción y que varían entre individuos. Estas secuencias presentan patrones de distancia, longitud y disposición diferente en el ADN de individuos en una población. Los RFLP son marcadores génicos de ADN, y se utilizan junto a la PCR para identificar grupos de individuos, ya que puede mostrar la relación filogenética entre ellos.

La técnica RFLP es altamente sensible y se utiliza frecuentemente en estudios moleculares, en primer lugar se amplifica el gen o fragmento que queremos estudiar y que hayan mostrado variabilidad entre especies y a continuación se realiza la digestión del producto amplificado con enzimas de restricción, finalmente el patrón de bandas característico de cada especie podrá ser observado mediante electroforesis, lo que nos permitirá distinguirlas.

Esta técnica fue utilizada por Perteguer y col. (2004) para la identificación específica de especie de anisákidos parásitos humanos, se pretendía poder identificar cualquier anisákido marino que pudiera causar enfermedad en el ser humano. Para ello se utilizaron larvas de nematodos, previamente identificadas morfológicamente, presentes en pescados para el consumo humano, en este caso se utilizó *Micromesistius poutassou*. Se amplificó el ADN de anisákidos que correspondía a las regiones ribosómicas ITS-1 5,8 S ITS-2 28S (Figura 22) y los productos se digirieron con la endonucleasa Taq I. Como resultado se obtuvieron patrones de amplificación diferentes según la especie de anisákidos, *Anisakis simplex* y *Hysterothylacium aduncum* (helmintho no parásito humano, aunque se ha descrito que porta alérgenos compartidos con *A. simplex*), que coincidieron con los ya descritos para los mismos parásitos de otras procedencias geográficas y se confirmó así la divergencia genómica.

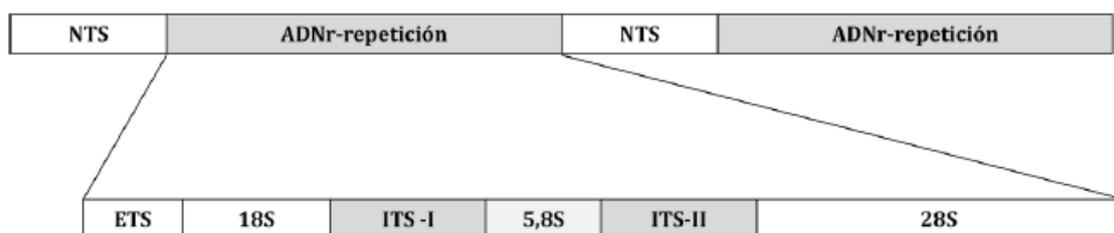


Figura 22. Disposición del ARNr eucariótico 18S, 5,8S, 28S, en tándem.

Además de la enzima de restricción Taq I, las enzimas Hinf y Cfo I también han sido muy utilizadas para la diferenciación de estos nematodos mediante la técnica RFLP-PCR.

En concreto, en el estudio epidemiológico del complejo *Anisakis simplex* realizado por Abattouy y col. (2010) a partir de larvas encontradas en ejemplares de caballa y chicharro en el Norte de Marruecos se concluyó la presencia de nematodos *A. pegreffii* que presentaron idéntico patrón de bandas, dos individuos presentaba genotipo híbrido *A. pegreffii/A. simplex s.s.* y no se encontró ningún ejemplar perteneciente *A. simplex s.s.* Estos resultados se compararon con otros estudios realizados con ejemplares en la costa de Granada, una zona geográficamente próxima, en los que se obtenía un resultado muy similar. Sin embargo, en la costa Cantábrica el 90% de las larvas pertenecían a esta última especie.

Con esta misma técnica, se llegó a la conclusión que, de los 3 integrantes del complejo *A. simplex*, es *A. simplex s.s.* el principal causante de la anisakiosis humana en Japón, ya que es capaz de penetrar en el músculo más rápidamente que *A. pegreffii* del cual se describieron sólo unos pocos casos de enfermedad (Suzuki y col., 2010).

Otros estudios mediante el análisis electroforético de enzimas de restricción llevados a cabo sobre el genoma de estas larvas confirmaron también la identidad entre larvas de *Anisakis* tipos I y II y *A. simplex* y *A. physeteris* respectivamente (Sugane, 1990; Matsuura y col., 1992).

Utilizando el marcador genético RFLP y dos enzimas de restricción (Hha I y Hinf I) se identificaron genotipos recombinantes correspondientes a las especies larvarias híbridas de *A. simplex s.s.* y *Anisakis pegreffii* en peces pleuronectiformes de la costa portuguesa. La presencia de individuos en peces relativamente sedentarias como los pleuronectiformes sugirió que la costa portuguesa puede constituir un área de hibridación y por tanto de interés para el estudio del proceso de hibridación y la especiación de estos anisákidos. (Marqués y col., 2006).

### **RAPD-PCR**

Es una de las técnicas más versátiles desde que se desarrolló en 1990 y no requiere un conocimiento previo del genoma.

La amplificación aleatoria de ADN polimórfico, es un tipo de marcador molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa. Los fragmentos de ADN que se han obtenido mediante esta técnica son amplificados en regiones aleatorias del genoma, ya

que los cebadores de la reacción son secuencias arbitrarias de ADN sintético de aproximadamente 8-10 pb. Su pequeño tamaño y baja temperatura de hibridación en torno a 36 °C (mucho más baja que la que se utiliza en la PCR convencional) aseguran que se une a multitud de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos.

Los productos amplificados son visualizados en geles de agarosa y se visualizan a la luz UV. De este modo, los perfiles que se obtienen mediante RAPDs pueden permitir la diferenciación de especies e incluso a nivel de individuo, ya que es capaz de detectar polimorfismos (sustitución, pérdida o inserción de bases en los sitios de unión de los cebadores) entre individuos altamente relacionados. La sensibilidad y especificidad de esta técnica radica en el hecho de que se toma todo el genoma como base para generar perfiles genéticos (Vicent y col., 1998).

El principal inconveniente de esta técnica es la baja reproductibilidad de los fragmentos amplificados, especialmente los de alto peso molecular. Se ha demostrado que pequeños cambios en las condiciones de la reacción tales como el tipo de polimerasa, la concentración de cloruro de magnesio, la concentración de ADN molde o la temperatura en el termociclador, pueden hacer cambiar el patrón de fragmentos RAPDs obtenidos (Williams y col., 1990, Ellsworth y col., 1993, Schweder y col., 1995, Pérez y col., 1998). A pesar de esto, algunos autores, han comprobado que manteniendo unas condiciones de reacción estrictamente controladas se pueden obtener unos porcentajes elevados de reproductibilidad.

A pesar de todo, la técnica RAPD-PCR ha sido utilizada para diferenciar individuos de *A. simplex* obtenidos de *Merluccius merluccius*, *Phycis blennoides*, *Conger conger* y *Lepidorhombus boscii* del Océano Atlántico. Los patrones de amplificación de *A. simplex* revelaron las diferencias entre las larvas, lo que sugirió la posible existencia de dos poblaciones con una alta variabilidad genética y una adaptación diferente a diferentes especies de huésped (Helminthol y col., 1997)

**MATERIALES Y  
METODOLOGÍA EMPLEADA  
PARA LA DETECCIÓN E  
IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIS**

### **3. MATERIALES Y METODOLOGÍA EMPLEADA PARA LA DETECCIÓN IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIS**

#### **3.1 RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE TRABAJO**

Las especies de pescado estudiadas fueron adquiridas en diferentes pescaderías de Gijón y Oviedo a la largo del mes de Marzo y Abril de 2015. Se tomaron los datos de la procedencia y el peso.

En el presente estudio se han tenido en cuenta 7 especies de pescado fresco, sin procesar ni tratar, entre los que se ha elegido tanto pescado azul o graso que principalmente habita aguas superficiales (boquerón, caballa, chicharro) como pescado blanco o magro que se encuentran en zonas profundas (merluza, gallo, bacaladilla) y semigrasos como la lubina, además, el gallo representa a las especies pleuronectiformes (pescados planos) dónde también puede habitar *Anisakis spp.* (J.M. Marqués y col., 2006).

Las lubinas de este estudio proceden de acuicultura, estas especies se han cultivado en cautividad en un régimen de cría intensiva y en condiciones estrictamente controladas por lo que la alimentación presenta un excelente perfil nutricional. Además se garantiza la bioseguridad del producto a la hora de consumirlo ya que los piensos que consumen están deshidratados y esterilizados por lo que no deberían contener *Anisakis spp.*, también hay programas sanitarios que se han implantado en las granjas de acuicultura donde se hacen controles periódicos que supervisan la calidad del producto a lo largo de toda su vida.

Tabla 1. En esta tabla se muestran las especies del estudio, su zona de captura, la lonja de la que proceden y el lugar en el que han sido compradas.

<b>Ejemplar</b>	<b>Zona de captura</b>	<b>Lonja</b>	<b>Lugar de venta</b>
<b>Bacalada 1</b> ( <i>Micromesistius poutassous</i> )	Atlántico Noreste	Vigo	Alimerka
<b>Bacalada 2</b> ( <i>Micromesistius poutassous</i> )	Atlántico Noreste	Avilés	El árbol
<b>Bacalada 3</b> ( <i>Micromesistius poutassous</i> )	Atlántico Noreste	Avilés	Pescadería Pablo Prieto García (Oviedo)
<b>Bacalada 4</b> ( <i>Micromesistius poutassous</i> )	Atlántico Noreste	Avilés	Pescadería Pablo García Prieto( Oviedo)
<b>Bacalada 5</b> ( <i>Micromesistius poutassous</i> )	Atlántico Noreste	Avilés	Pescadería Pablo García Prieto ( Oviedo)
<b>Chicharro 1</b> ( <i>Trachurus capensis</i> )	Atlántico Noreste	Avilés	Pescadería Segis (Gijón)
<b>Chicharro 2</b> ( <i>Trachurus capensis</i> )	Atlántico Noreste	Avilés	Pescadería Segis (Gijón)
<b>Chicharro 3</b> ( <i>Trachurus trachurus</i> )	Atlántico Noreste		Carrefour
<b>Boquerón 1</b> ( <i>Engraulis encrasicolus</i> )	Golfo de Cádiz	Punta umbría (Huelva)	Pescados J. Delgado – Carrefour
<b>Boquerón 2</b> ( <i>Engraulis encrasicolus</i> )	Atlántico Noreste	Avilés	Pescadería Segis (Gijón)
<b>Boquerón 3</b> ( <i>Engraulis encrasicolus</i> )	Golfo de Vizcaya		El árbol
<b>Boquerón 4</b> ( <i>Engraulis encrasicolus</i> )	Golfo de Vizcaya		El árbol
<b>Caballa 1</b> ( <i>Scomber scombrus</i> )	Golfo de Vizcaya	Vigo	Alimerka
<b>Caballa 2</b> ( <i>Scomber scombrus</i> )	Golfo de Vizcaya	Avilés	Pescadería Segis (Gijón)
<b>Caballa 3</b> ( <i>Scomber scombrus</i> )	Mediterráneo		El árbol
<b>Merluza 1</b> ( <i>Merluccius merluccius</i> )			Pescadería Pablo García Prieto (Oviedo)
<b>Lubina 1</b> ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Piscifactoría (acuicultura)		Pescadería Segis
<b>Lubina 2</b> ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Piscifactoría		Carrefour
<b>Lubina 3</b> ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	Piscifactoría		Carrefour
<b>Gallo 1</b> ( <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> )	Atlántico Noreste	Gijón	Pescados y mariscos EL TARA S.L.
<b>Gallo 2</b> ( <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> )	Atlántico Noreste	Ribeira (Coruña)	Carrefour
<b>Gallo 3</b> ( <i>Lepidorhombus whiffiagonis</i> )	Atlántico Noreste	Ribeira (Coruña)	Carrefour

### 3.1.1 Inspección visual de los ejemplares:

El primer paso de este estudio consiste en abrir el pescado y hacer un exhaustivo examen visual para detectar la presencia de larvas de *Anisakis spp.*, tanto en las vísceras como en el músculo, extrayendo manualmente el mayor número posible de estos para conocer el grado de infección. En aquellos casos en los que el pescado es de gran tamaño y presenten una cantidad muy grande de larvas (como la merluza), se hace una estimación aproximada del número total pesando y midiendo una parte del cuerpo (Figura 23) y teniendo en cuenta sólo las que se encuentren en esta sección (Tabla 1).

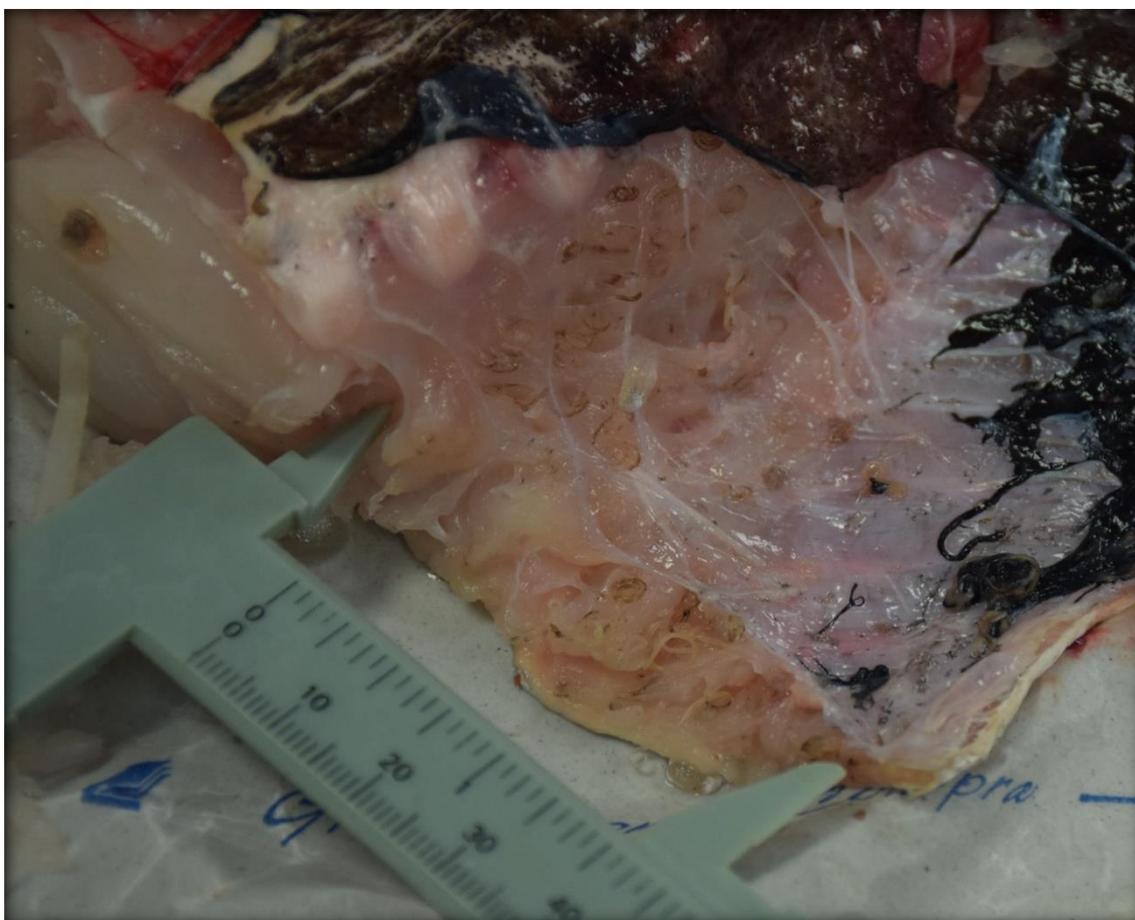


Figura 23. Sección de merluza donde se muestran las larvas de *Anisakis sp.* espiraladas entre el tejido muscular que aparecen al levantar la piel

Se realiza el recuento de larvas según se van extrayendo y se almacenan en tubos Eppendorf que contienen etanol lo que favorece la conservación del ADN del parásito. Los parásitos una vez liberados del pescado deben estar lo más limpios posible de restos

de tejido del pez, de esta forma se evitan interferencias entre ácidos nucleicos en el momento de secuenciar.

Una vez realizado el recuento, se realiza la extracción del ADN del tejido. En aquellos pescados que contienen gran cantidad de larvas, se analizan en torno a veinte y su resultado será estadísticamente representativo de toda la población larvaria de ese individuo.

Para conocer si hay relación entre cada especie de parásito y su hospedador se ha hecho el test estadístico Chi-cuadrado (*Figura 24*), a partir del cálculo de las frecuencias esperadas, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(\text{observada}_i - \text{teórica}_i)^2}{\text{teórica}_i}$$

*Figura 24. Fórmula para calcular el estadístico  $\chi^2$*

$$gl = (r - 1)(k - 1)$$

*Figura 25. Fórmula para calcular los grados de libertad*

### **3.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN**

Las muestras larvarias obtenidas se procesan individualmente y se someten a una extracción sencilla de ADN. Para ello, se introduce un fragmento del cuerpo del nematodo en tubos Eppendorf y para facilitar la digestión se tritura con unas tijeras en trozos muy pequeños, a continuación se añaden 400  $\mu\text{L}$  de CHELEX®, previamente templado a 55° C. El CHELEX® es una resina empleada como agente quelante para la extracción del ADN de las larvas y se suele utilizar cuando el ADN va a ser amplificado en PCR; la solución obtenida tendrá ADN, ARN, proteínas, lípidos y carbohidratos.

El siguiente paso consiste en añadir 6  $\mu\text{L}$  de proteinasa K cuya función es la digestión de las proteínas, de esta forma nos aseguramos que se inactivan las proteínas encargadas de degradar el ADN. Finalmente se introducen las muestras en el horno a 55 °C durante una hora y media y se agitan cada 10 minutos para mezclar vigorosamente, facilitar la ruptura mecánica y así homogeneizar los productos añadidos.

En el último paso, las muestras se mantienen en otro horno durante 20 minutos a 100°C, temperatura necesaria para inactivar la proteinasa K, una vez que ya ha realizado su función.

Después de este tiempo de horneado, en cada Eppendorf se pueden observar dos fases claramente diferenciadas (*Figura 26*). La fase superior es acuosa y contiene en solución el ADN objeto de estudio, y una fase inferior, en la que permanece la resina utilizada con los restos de tejido celular. Los tubos Eppendorf se almacenan en frío hasta ser utilizados.



*Figura 26. Tubo Eppendorf después de la extracción en el que se observa un sobrenadante acuoso con ADN y un precipitado con CHELEX y tejido celular.*

### **3.3 AMPLIFICACIÓN DEL ADN: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

Las reacciones de amplificación mediante PCR se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems® Verity Thermal Cycler.

El gen mitocondrial (629 pb) de la citocromo oxidasa (Cox II) ha sido elegido para conocer la relación filogenética entre especies del género *Anisakis*. La secuencia nucleotídica de los cebadores, descrita por Nadler y Husdpeth (2000) es la siguiente 210 5' CAC CAA CTC TTA AAA TTA TC 3' y 211 5' TTT TCT AGT TAT ATA GAT TGR TTY AT 3'.

La amplificación fue realizada para un volumen de 40  $\mu$ L, para lo cual 4  $\mu$ L del ADN extraído de cada individuo de *Anisakis*, se adicionaron en 36  $\mu$ L de Mix PCR, que

contenía 15,74  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada, 8  $\mu\text{L}$  de buffer PCR 5x Green Go- Taq® Flexy buffer, 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 4  $\mu\text{L}$  de dNPs 2,5 mM, 2  $\mu\text{L}$  de cada primer 20 mM y 0,26  $\mu\text{L}$  de Go Taq® ADN polimerasa. El paso inicial consiste en desnaturalizar la doble hebra durante 5 minutos a  $95^\circ\text{C}$ , seguido de 35 ciclos de amplificación con una desnaturalización de 30 segundos a  $94^\circ\text{C}$ , una hibridación a  $47^\circ\text{C}$  durante 45 segundos, y un paso de extensión de la polimerización a  $72^\circ\text{C}$  durante 50 segundos, con una extensión final da  $72^\circ\text{C}$  de 10 minutos y un enfriamiento a  $20^\circ\text{C}$  durante 1 minuto.

### **3.4 VISUALIZACIÓN EN GEL DE AGAROSA**

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis utilizando un gel de agarosa de 50 ml al 2 % que contenía 2,5  $\mu\text{L}$  de simplySafe™ como agente revelador y se preparó en un tampón TBE 1X.

La separación electroforética se realizó en una cámara de electroforesis horizontal, donde se hizo correr el ADN aplicando una tensión de 120 V durante 20-25 minutos.

Las bandas de ADN fueron visualizadas por transiluminación con luz UV utilizando el fotodocumentador Gene Flash®(Syngene).

Este método es útil, es un procedimiento básico analítico para caracterizar macromoléculas, muy fácil de realizar y el coste es relativamente accesible.

### **3.5 SECUENCIACIÓN Y LECTURA DE SECUENCIAS**

Las muestras de ADN amplificadas junto con los cebadores 211 y 210 descritos por Nadler y Husdpeth (2000) fueron enviadas a la empresa MacroGen, donde se secuenciaron con el secuenciador ABI 3730 xl. La cantidad enviada fueron 30  $\mu\text{L}$  por muestra en una placa de 96 pocillos.

Las secuencias recibidas fueron leídas con el software BioEdit. Este programa se emplea también para alinear mecánicamente las secuencias para posteriormente editarlas manualmente, eliminando gaps y corrigiendo posibles transiciones o transversiones erróneas.

Para identificar las secuencias ya definidas se utilizó el programa BLAST (Basis Local Alignment Search Tool) que comparó el ADN de las muestras alineándolas con secuencias de la base de datos GenBank. Esta herramienta es muy rápida y arroja buenos resultados.

### **3.7 ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS**

El análisis de polimorfismos de las secuencias nucleotídicas alineadas y definidas anteriormente se llevó a cabo utilizando el software DNAsp (DNA sequence polymorphism), que además de aportar información cuantitativa básica como el número de nucleótidos de la secuencia o el número de posiciones polimórficas, se ha encargado de calcular varias medidas de la diversidad nucleotídica existente entre las poblaciones de *Anisakis* de cada especie, también se utilizó para dar a conocer el haplotipo que posee cada individuo. Debido a la gran cantidad de secuencias analizadas, no es posible poner la información obtenida en forma gráfica.

El proyecto concluyó con la realización de un árbol filogenético Neighbor – Joining en el que se representó la estructura genético-poblacional de todos los individuos estudiados, donde se muestra la relación evolutiva y la distancia genética, para ello se utilizó el programa MEGA (Kumar y col., 2008)

También se realizó un análisis genético de los pescados con el objetivo de identificar la especie, a partir de una porción muscular se amplificó el ADN y se secuenció.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este proyecto se propuso como objetivo el estudio de la presencia/ausencia, abundancia, identificación y diversidad genética específica del parásito *Anisakis spp.*, en 22 pescados frescos capturados en las costas del Mar Cantábrico y que no han sido procesados ni sometidas a ningún tratamiento. Las especies de hospedador estudiadas son las siguientes: bacaladas, merluza, gallos, chicharros, boquerones y caballas, obtenidos mediante pesca extractiva; y lubina en representación de los pescados de acuicultura.

Los resultados obtenidos han puesto en evidencia la existencia de tres especies distintas de nematodos en estos pescados. A nivel global, cabe destacar la prevalencia de *Anisakis simplex* en todas las especies que presentan la larva y en una proporción inferior se ha encontrado *Anisakis pegreffii*. Además, se han extraído dos individuos de la especie *Hysterothylacium aduncum*, cuya morfología es muy similar al género *Anisakis*.

### 4.1 CARGA PARASITARIA

La carga parasitaria nos indica el número de larvas que posee cada hospedador. Debido a la enorme cantidad de parásitos encontrados en algunos ejemplares, se ha realizado el análisis sólo en un trozo del pescado que ha sido medido o pesado. En la siguiente tabla se muestran los datos recopilados durante el recuento (*Tabla 2*).

*Tabla 2. Ejemplares de pescado muestreado y número de parásitos encontrados según la porción analizada.*

EJEMPLAR PESCADO	Nº Parásitos encontrados	Sección analizada	Nº Anisakis/gr de pescado
Bacalada 1 ( <i>Micromesistius poutassou</i> )	229	100 gr (pez entero)	2-3
Bacalada 2 ( <i>Micromesistius poutassou</i> )	16	90 gr (pez entero)	0-1
Bacalada 3 ( <i>Micromesistius poutassou</i> )	48	9 gr (porción muscular)	5-6
Bacalada 4 ( <i>Micromesistius poutassou</i> )	11	50 gr (pez entero)	0-1
Bacalada 5 ( <i>Micromesistius poutassou</i> )	506	150 gr (pez	3-4

		entero)	
<b>Chicharro 1 (<i>Trachurus trachurus</i>)</b>	0	250 gr (pez entero)	0
<b>Chicharro 2 (<i>Trachurus trachurus</i>)</b>	0	220 gr (pez entero)	0
<b>Chicharro 3 (<i>Trachurus trachurus</i>)</b>	3	250 gr (pez entero)	0-1
<b>Boquerón 1 (<i>Engraulis encrasicolus</i>)</b>	1	24 gr (pez entero)	0-1
<b>Boquerón 2 (<i>Engraulis encrasicolus</i>)</b>	0	20 gr (pez entero)	0
<b>Boquerón 3 (<i>Engraulis encrasicolus</i>)</b>	0	14 gr (pez entero)	0
<b>Boquerón 4 (<i>Engraulis encrasicolus</i>)</b>	0	25 gr (pez entero)	0
<b>Caballa 1 (<i>Scomber scombrus</i>)</b>	0	230 gr (pez entero)	0
<b>Caballa 2 (<i>Scomber scombrus</i>)</b>	8	250 gr (pez entero)	0-1
<b>Caballa 3 (<i>Scomber scombrus</i>)</b>	0	210 gr (pez entero)	0
<b>Merluza 1 (<i>Merluccius merluccius</i>)</b>	300	30 gr (músculatura hipoaxial)	10
<b>Lubina 1 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)</b>	0	300 gr (pez entero)	0
<b>Lubina 2 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)</b>	0	260 gr (pez entero)	0
<b>Lubina 3 (<i>Dicentrarchus labrax</i>)</b>	0	250 gr (pez entero)	0
<b>Gallo 1 (<i>Lepidorhombus spp.</i>)</b>	2	145 gr (pez entero)	0-1
<b>Gallo 2 (<i>Lepidorhombus spp.</i>)</b>	4	125 gr (pez entero)	0-1
<b>Gallo 3 (<i>Lepidorhombus spp.</i>)</b>	4	114 gr (pez entero)	0-1

Cualquier pescado marino es susceptible de presentar larvas de anisákidos, sin embargo la presencia o ausencia de éstas y la cantidad depende tanto de su hábitat marino como el tipo de alimentación.

Debido a la gran cantidad de muestras de ADN analizadas solo se pondrá la visualización del gel de electroforesis de la primera extracción realizada.



Figura 27: Bandas de ADN correspondiente a 7 individuos de *Anisakis sp.* de *Bacalada 1*.

De los 22 individuos de pescado estudiados más de la mitad, concretamente 12 ejemplares, presentaron el parásito, de los cuales 4 (gallo, chicharro, caballa, boquerón) contenían una cantidad inferior a 5 parásitos por ejemplar estudiado. En la *Tabla 3* se muestra que tanto la bacalada como la merluza son las especies de pescado que aseguran la presencia de anisákidos al 100% y además con una carga parasitaria extremadamente alta en proporción a las otras especies, siendo la merluza el hospedador que mayor número de parásitos contiene por gramo, en concreto 10 *Anisakis*/gr, seguido de las bacaladas, que presentan un número medio de parásitos de 2 o 3 por gramo.

Tabla 3. Porcentajes de parasitación y número medio de parásitos/gr según la especie de pescado.

Especie	Presencia intraespecífica	Nº medio parásitos/gr
<b>Bacalada</b>	100%	2-3
<b>Merluza</b>	100%	10
<b>Gallo</b>	100%	0-1
<b>Chicharro</b>	33%	0-1
<b>Caballa</b>	33%	0-1
<b>Boquerón</b>	25%	0-1
<b>Lubina</b>	0%	0

El alto índice de parasitación en las bacaladas se ha encontrado principalmente en las vísceras, ya que esto es propio de aquellas especies que ingieren la larva L3 al consumir crustáceos eufáusidos como ocurre también en las caballas. Sin embargo, en las especies piscívoras como la merluza las larvas también se localizan en la musculatura hipoaxial que rodea la cavidad abdominal donde se albergan las vísceras (*Figura 28*).



*Figura 28. Musculatura hipoaxial de merluza en la que se observan larvas de Anisákidos en forma de espiral.*

En general, la mayor parte de las larvas en este estudio fueron extraídas de los órganos internos del pez (*Figura 29*), como el hígado y el estómago (motivo por el cual algunos supermercados no venden el pescado sin haber sido eviscerado previamente), y en los casos de alta parasitación también estaban presentes en el músculo (*Figura 30*) e incluso en la cabeza cuando la infección era masiva (*Figura 31*).



Figura 29. Vísceras de bacalada infestada altamente parasitada.



Figura 30. En esta imagen se observan los parásitos que han migrado de las vísceras al músculo donde se han incrustado.

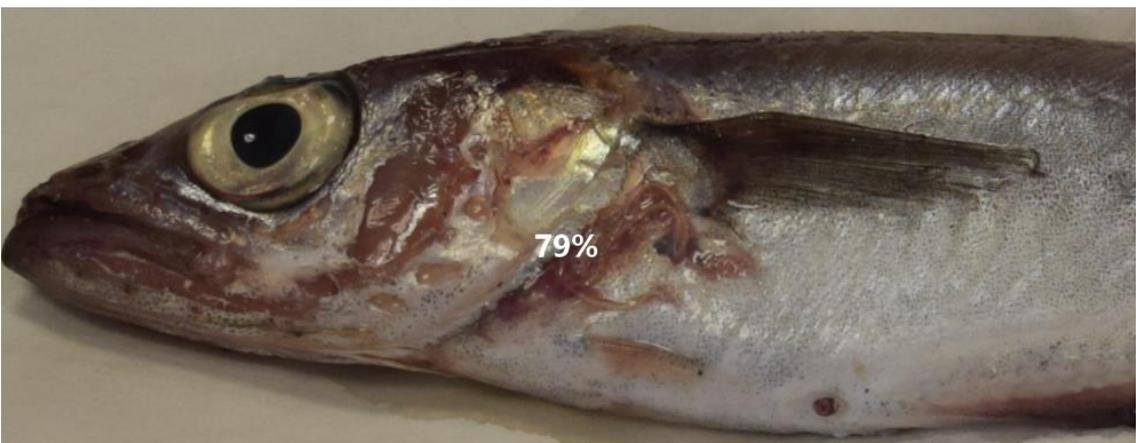


Figura 31. Bacalada antes de comenzar la extracción de las larvas. Se puede observar sin necesidad de abrirla la presencia de parásitos en la zona de la cabeza lo que a simple vista sugiere una infección masiva.

Tal y como se esperaba, el gallo y el chicharro presentan una parasitación insignificante, y la lubina está libre de parásitos, algo que también se esperaba al proceder del cultivo controlado en acuicultura con una dieta controlada.

Un resultado inesperado ha sido la baja carga parasitaria del boquerón (*Tabla 3*). En este estudio se ha encontrado que la incidencia de parásitos corresponde a tan sólo el 25 % de los ejemplares analizadas de esta especie y además con escasa carga (0-1 parásitos/gr). Este hecho sorprende, ya que se ha visto que los boquerones en vinagre son una de las fuentes principales de anisakis en el hombre (<http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/>), (Audicana Berasategui M.T.) (<http://www.elmundo.es/pais-vasco/2014/05/08/536bb2c6e2704e0f278b4576.html>).

La infección de los pescados por este parásito podría ser explicada por la práctica pesquera, realizada en el interior de los buques, de eviscerar los pescados en alta mar (sobretudo las merluzas) cuándo son capturados y la consiguiente devolución de las vísceras al agua. Este proceso realimenta el mar con larvas de Anisákidos, que serán consumidas por crustáceos o por estas mismas especies de pescado. En el interior del hospedador las larvas copulan y salen al exterior para depositar sus huevos en el fondo marino donde sedimentan y sirven de alimento a otros crustáceos, cerrando así el círculo. Esto podría explicar el porqué de la alta parasitación de bacalada y merluza, al ser especies bentopelágicas. Además, se ha visto que la bacaladilla es uno de los pescados principales en la alimentación de la merluza, lo que contribuye aún más a la propagación del parásito. Por lo que una reducción de esta práctica pesquera de evisceración y devolución de las vísceras al mar podría reducir también la incidencia de las infecciones. Un método de control simple, sencillo y eficaz sería el almacenaje en barriles de las vísceras una vez capturado el pescado y su destrucción en tierra a la misma vez que se desembarca el pescado.

Otro factor influyente puede haber sido el aumento de la temperatura del agua, que podría haber reducido el tiempo de eclosión de los huevos de *Anisakis spp.* y la sobreexplotación de aquellos caladeros cuyas condiciones favorecen el desarrollo del parásito como son la temperatura o la presencia de hospedadores idóneos. Además, el aumento de la edad, del tamaño (no su frescura) y la zona de captura del pescado influyen en la alta parasitación.

Investigadores de la Universidad de Girona (Ferrer-Maza y col., 2013) publicaron un estudio en el que se destacaba la prevalencia de las larvas de *Anisakis spp.* en las merluzas de mayor tamaño, llegando a una prevalencia del 100% en aquellos individuos que sobrepasaban los 55cm. Por otra parte, la diversidad de carga parasitaria encontrada entre los individuos de bacaladas, sugiere que aquellas con más edad son las que presentan la infección masiva, mientras que las menos parasitadas son más jóvenes.

Por lo tanto, podemos concluir que el hombre ha contribuido enormemente a la expansión de este parásito, por los motivos comentados. A comienzos de los años 50 los primeros casos en Europa fueron detectados en unos jureles del Mar del Norte, y hoy en día se encuentra presente en muchas otras especies, incluso, en algunos caladeros el 80% de las capturas tienen *Anisakis spp.*

#### **4.2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTERSPECÍFICA**

La **variabilidad genética interespecífica** del género *Anisakis* también ha sido objeto de este estudio, al igual que su relación con la especie de pescado que parasita. Para identificar la especie se ha secuenciado el gen de la enzima mitocondrial Cox II (Valentini y col., 2006; Mattiucci y col., 2006, 2007, 2010; Mattiuci y Nascetti, 2008). En las siguientes tablas queda reflejado la identidad de cada especie extraída, el porcentaje de homología con una especie de referencia, el porcentaje de cobertura del segmento alineado que se ha utilizado para consultar la especie en la base de datos (Query cover), y finalmente, el número de acceso en la base de datos del GenBank, que es un código que representa, en esta base de datos, el individuo con mayor homología a la especie que estamos buscando.

Los anisákidos obtenidos de las 6 especies de pescado analizadas se clasifican genéticamente como:

- ❖ Larvas L3 que pertenecen al morfotipo I de Berland (1961) presentes en todas las especies hospedadoras y cosmopolita (*Anisakis simplex*).
- ❖ Lavas L3 que pertenecen al morfotipo I de Berland (1961) presentes solo en dos especies hospedadoras con distribución predominantemente mediterránea. (*Anisakis pegreffii*).

- ❖ Larvas L3 de *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) de distribución cosmopolita presente en dos especies hospedadoras.

Tabla 4. Resultados del análisis genético de los parásitos extraídos de Bacalada 1. Par: Parásito

BACALADA 1	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
Par1	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810003.1
Par2	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par3	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
Par4	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338430.1
Par5	<i>Anisakis simplex</i>	98	99	0.0	KC810003.1
Par6	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par7	<i>Anisakis simplex</i>	98	99	0.0	KC810004.1
Par21	<i>Anisakis simplex</i>	98	100	0.0	GQ338430.1
Par22	<i>Hysterothylacium aduncum</i>	98	96	0.0	JQ934893.1
Par23	<i>Anisakis simplex</i>	97	99	0.0	KC810003.1
Par24	<i>Anisakis simplex</i>	98	100	0.0	GQ338429.1
Par25	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	KC810003.1
Par28	<i>Anisakis simplex</i>	98	99	0.0	KC810003.1
Par 29	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par47	<i>Anisakis simplex</i>	98	100	0.0	GQ338435.1
Par50	<i>Anisakis simplex</i>	98	100	0.0	GQ338430.1

Tabla 5. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Bacalada 2.

BACALADA 2	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
Par1	<i>Anisakis pegreffii</i>	99	100	0.0	AB517563.1
Par2	<i>Anisakis pegreffii</i>	100	97	0.0	KC480007.1
Par3	<i>Anisakis pegreffii</i>	100	97	0.0	KC480007.1
Par4	<i>Anisakis pegreffii</i>	99	97	0.0	KC809998.1
Par5	<i>Anisakis simplex</i>	100	99	0.0	GQ338430.1
Par6	<i>Anisakis pegreffii</i>	100	97	0.0	KC480007.1
Par7	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par8	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1
Par9	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
Par10	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par11	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	KC810004.1
Par12	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par13	<i>Anisakis simplex</i>	100	99	0.0	GQ338428.1
Par14	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1
Par 15	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338435.1
Par16	<i>Anisakis simplex</i>	98	100	0.0	GQ338430.1

Tabla 6. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Bacalada 3.

BACALADA 3	especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
par1	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810004.1
par2	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par3	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par4	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par5	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1
par6	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810003.1
par7	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338429.1
par8	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par9	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par10	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338429.1
par11	<i>Anisakis simplex</i>	100	99	0.0	GQ338428.1
par12	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338429.1
par13	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1
par14	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par15	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1
par16	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par17	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par18	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338435.1
par19	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1

Tabla 7. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Bacalada 4.

BACALADA 4	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
Par1	<i>Anisakis pegreffii</i>	100	96	0.0	KC480007.1
Par2	<i>Anisakis pegreffii</i>	99	99	0.0	AB517563.1
Par3	<i>Anisakis pegreffii</i>	99	99	0.0	KC479830.1
Par4	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338429.1
Par5	<i>Anisakis pegreffii</i>	99	99	0.0	JQ900760.1
Par6	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par7	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par8	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par9	<i>Anisakis pegreffii</i>	99	100	0.0	JQ900762.1
Par10	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810003.1
Par11	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1

Tabla 8. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Bacalada 5.

BACALADA 5	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
par1	<i>Anisakis pegreffii</i>	99	100	0.0	DQ116428.1

par2	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810002.1
par3	<i>Hysterothylacium aduncum</i>	98	96	0.0	JQ934893.1
par4	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par5	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338429.1
par6	<i>Anisakis simplex</i>	98	99	0.0	GQ338428.1
par7	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par8	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810003.1
par9	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810003.1
par10	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338435.1
par11	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par12	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par13	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par14	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par15	<i>Anisakis simplex</i>	99	98	0.0	GQ338430.1
par16	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par17	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1
par19	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par20	<i>Anisakis simplex</i>	99	98	0.0	GQ338430.2

Tabla 9. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Merluza.

MERLUZA	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
par1	<i>Anisakis simplex</i>	100	99	0.0	GQ338430.1
par2	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par3	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par4	<i>Anisakis simplex</i>	100	99	0.0	GQ338430.1
par5	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par6	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	KC810004.1
par7	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	JN786322.1
par8	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338429.1
par9	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338430.1
par10	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par11	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1
par12	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
par13	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810003.1
par14	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338429.1
par15	<i>Anisakis pegreffii</i>	99	100	0.0	DQ116428.1
par16	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338430.1
par17	<i>Aniskis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
par18	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338430.1
par19	<i>Anisakis pegreffii</i>	99	96	0.0	KC480007.1
par20	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810004.1

Tabla 10. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Boquerón 1.

BOQUERÓN	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
Boquerón 1	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1

Tabla 11. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de la caballa 2.

CABALLA 2	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
Par1	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338430.1
Par2	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par3	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par4	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810003.1
Par5	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par6	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1
Par7	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338435.1
Par8	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338433.1

Tabla 12. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de chicharro 3.

CHICHARRO 3	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
Par1	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1
Par2	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par3	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810003.1

Tabla 13. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Gallo 1.

GALLO 1	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
Par1	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par2	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1

Tabla 14. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Gallo 2.

GALLO 2	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
Par1	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338428.1
Par2	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338430.1
Par3	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par4	<i>Anisakis simplex</i>	99	99	0.0	GQ338430.1

Tabla 15. Resultados del Análisis genético de los parásitos extraídos de Gallo 3.

GALLO 3	Especie	Identity	Query cover	e-value	Accession number
Par 1	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1
Par 2	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	KC810003.1
Par 3	<i>Anisakis simplex</i>	100	100	0.0	GQ338430.1
Par 4	<i>Anisakis simplex</i>	99	100	0.0	GQ338430.1

La coexistencia de distintas especies e incluso géneros de parásitos dentro de la misma zona e incluso dentro del mismo hospedador es algo usual como se ha reflejado en estudios anteriores (Nascetti y col., 1981, 1986).

Tabla 16. Número de parásitos de cada especie por hospedador

ESPECIES	<i>Anisakis simplex</i>	<i>Anisakis pegreffii</i>	otros	TOTAL
Bacalada	68	11	2	81
Merluza	18	2	0	20
Gallo	10	0	0	10
Caballa	8	0	0	8
Chicharro	3	0	0	3
Boquerón	1	0	0	1
Lubina	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>108</b>	<b>13</b>	<b>2</b>	<b>123</b>
	<b>87,8%</b>	<b>10,5%</b>	<b>1,7%</b>	

En la Tabla 16 se pone en evidencia que del total de parásitos analizados genéticamente el 87,8 % corresponde a la especie *Anisakis simplex*, mientras que *Anisakis pegreffii* se encuentra en una proporción de 10,5 % lo que concuerda con las investigaciones realizadas hasta ahora (Mattiucci y Nascetti, 2008). Las cuales confirman la predominancia de *A. simplex* en el Noreste Atlántico, lugar en el que han sido capturados estos pescados, mientras que *A. pegreffii* habita fundamentalmente en latitudes más bajas, como la costa Mediterránea. La aparición de esta última especie en una proporción que, aunque menor, no es desdeñable, supone un posible riesgo para el consumidor y especialmente para el consumidor alérgico, y debe ponerse en conocimiento de las autoridades sanitarias.

### 4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA RELACIÓN DE ANISAKIS SPP. CON SU HOSPEDADOR

Se realizó un análisis de Chi-cuadrado de contingencia para frecuencias absolutas (Tabla 17), con el objetivo de evaluar la posible relación de asociación entre especies de *Anisakis sp.*, y su hospedador. A pesar de que hubiera sido necesario aumentar el tamaño de algunas muestras como en el caso de la merluza, para corroborar que son generalizables los hallazgos de este estudio, el resultado de la prueba de asociación parásito-hospedador ha sido el siguiente:

Considerando las siguientes hipótesis:

Ho: No existe asociación entre la especie de *Anisakis* y su hospedador.

H1: Si existe asociación entre la especie de *Anisakis* y su hospedador.

Tabla 17. Tablas de Frecuencias absolutas observadas y esperadas.

DATOS OBSERVADOS			DATOS ESPERADOS		
ESPECIES	<i>A. simplex</i>	<i>A. pegreffii</i>	ESPECIES	<i>A. simplex</i>	<i>A. pegreffii</i>
Bacalada	68	11	Bacalada	70,51	8,49
Merluza	18	2	Merluza	17,85	2,16
Gallo	10	0	Gallo	8,92	1,08
Caballa	8	0	Caballa	7,14	0,86
Chicharro	3	0	Chicharro	2,67	0,33
Boquerón	1	0	Boquerón	0,89	0,11

Teniendo en cuenta un nivel de significación  $\alpha=0,05$  y 5 grados de libertad, el valor crítico de la distribución  $\chi^2$  corresponde a 11,07.

El valor calculado es  $3,14 < 11,07$  luego, no se rechaza la hipótesis nula, es decir, con una seguridad del 95% se concluye que no existe relación entre la especie de *Anisakis* y su hospedador, por lo que no se trataría de un género especie-específico sino oportunista.

#### 4.4 ANÁLISIS GENÉTICO DE *ANISAKIS SPP.*

Con el Software utilizado se ha llevado a cabo el análisis de polimorfismos en las secuencias de ADN que codifican la enzima mitocondrial Cox II para las especies *A. simplex* y *A. pegreffii*. Después de haber definido las mutaciones que identifican los haplotipos, el análisis de secuencias incluye el número de haplotipos compartidos y únicos entre poblaciones de cada especie, la diversidad nucleotídica y haplotípica. En la *Tabla 18*, se recogen los parámetros obtenidos sobre las medidas descriptivas de la variabilidad de las secuencias obtenidas para este gen.

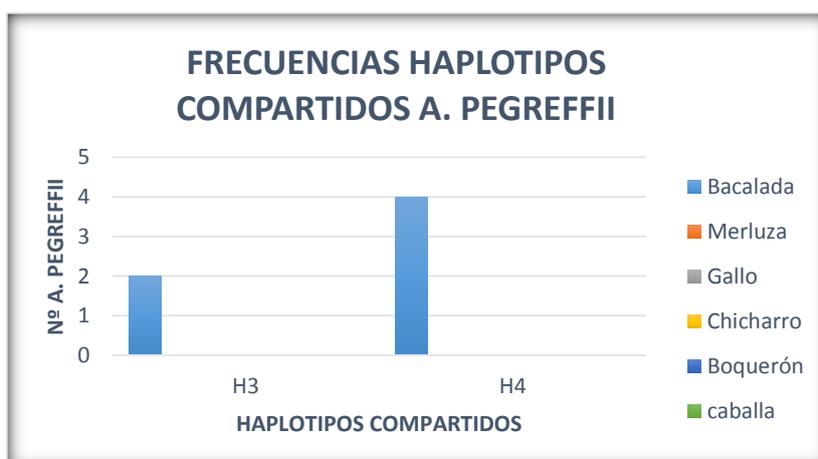
*Tabla 18. Resultados del programa DnaSP. N es el número de secuencias, NH es el número de haplotipos, Hd es la diversidad haplotípica, Pi es la diversidad nucleotídica.*

ESPECIES	N	NH	H. Único	Nº posiciones polimórficas	Hd	Jl
<i>A. simplex</i>	106	64	52	72	0,952 ± 0,015	0,01019
<i>A. pegreffii</i>	13	9	7	31	0,910 ± 0,068	0,01511

#### *A. pegreffii*

En el alineamiento múltiple de las 13 líneas de *A. pegreffii*, una vez revisadas y corregidas las posiciones que presentaron huecos, se detectaron 31 polimorfismos que fueron debidos a un cambio nucleotídico.

Las 13 secuencias analizadas de *A. pegreffii* tras ser alineadas presentan una longitud de 543 nucleótidos y se agruparon en 9 haplotipos, dos de los cuales, son compartidos por diferentes bacaladas, mientras que, los otros 7 son exclusivos de individuos de bacalada y merluza (*Gráfica 1*).



*Gráfica 1. Frecuencias haplotípicas de A. pegreffii., se observa que solo hay 2 haplotipos compartidos entre individuos de bacalada.*

La diversidad haplotípica,  $H_d$ , expresada como la probabilidad de encontrar haplotipos diferentes en la muestra corresponde a un valor alto, 91%, esto es lógico ya que la mayoría de los haplotipos son exclusivos.

La diversidad nucleotídica  $\pi$  (pi) se refiere al número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar, en este caso corresponde a 1,02%.

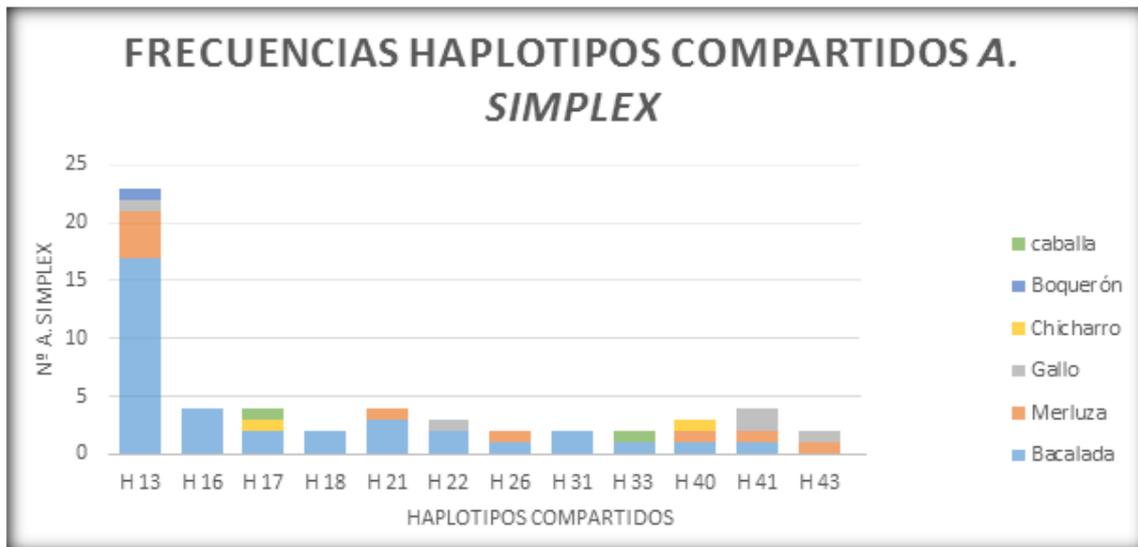
El examen de la diversidad poblacional de *A. pegreffii* a nivel de ADN mt ha revelado un haplotipo predominante en el Mar Cantábrico, encontrado en ejemplares de bacaladas.

Por otra parte parece que, esta especie de Anisákidos, no está sujeta a ninguna especie concreta de pescado, sino que se ha encontrado en aquellos que presentaban mayor parasitación, la merluza y las bacaladas. Por lo tanto, es probable que, si el resto de pescado analizados hubieran presentado mayor carga parasitaria, se habrían encontrado más individuos de *A. pegreffii*.

#### *A. simplex*

En cuanto a *A. simplex*, de las 106 secuencias que fueron analizadas, se detectaron 72 posiciones polimórficas debidas a un cambio nucleotídico. La diversidad haplotípica es mayor que en el caso de *A. pegreffii*, un 95 %, es decir, proporcionalmente presenta mayor cantidad de haplotipos exclusivos del total de individuos *A. simplex*, en concreto 52 de 64 haplotipos.

En la *Gráfica 2*, aparece reflejada la distribución de las frecuencias de los haplotipos que son compartidos por más de un hospedador. Como se aprecia en la imagen, el haplotipo 13 es el más abundante, y está presente en 4 especies de hospedador diferentes (Bacalada, Merluza, Gallo y Boquerón) mientras que otros haplotipos como el H18 se han encontrado exclusivamente en la misma especie de hospedador.



Gráfica 2. Frecuencias de haplotipos compartidos de *A. simplex*.

Para finalizar este proyecto, se ha elaborado un árbol filogenético clásico basado en los haplotipos. Este árbol muestra las relaciones evolutivas entre los individuos del género *Anisakis*. El árbol (*Figura 32*) muestra que, en general, existe una asociación de secuencias basadas en el origen mitocondrial del gen Cox II. Globalmente se puede ver a simple vista que existen dos grupos principales en el árbol que corresponden a la agrupación de los individuos de las dos especies estudiadas (*A. simplex* y *A. pegreffii*). Dentro de cada grupo, en el caso de la especie *A. simplex* hay múltiples subgrupos de diversos tamaños, mientras que el agrupamiento de la especie *A. pegreffii* solo tiene dos subgrupos, uno con una sola secuencia de bacalada y el otro se ramifica dando lugar a todos los individuos de esa especie menos uno y de merluza.

En cuanto a la distribución genética de *Anisakis* respecto a los hospedadores, se puede observar que, en el mismo hospedador existen individuos de *A. simplex* que presentan haplotipos genéticamente distantes, lo que sugiere que, no hay subpoblaciones de haplotipos específicas para un determinado hospedador.

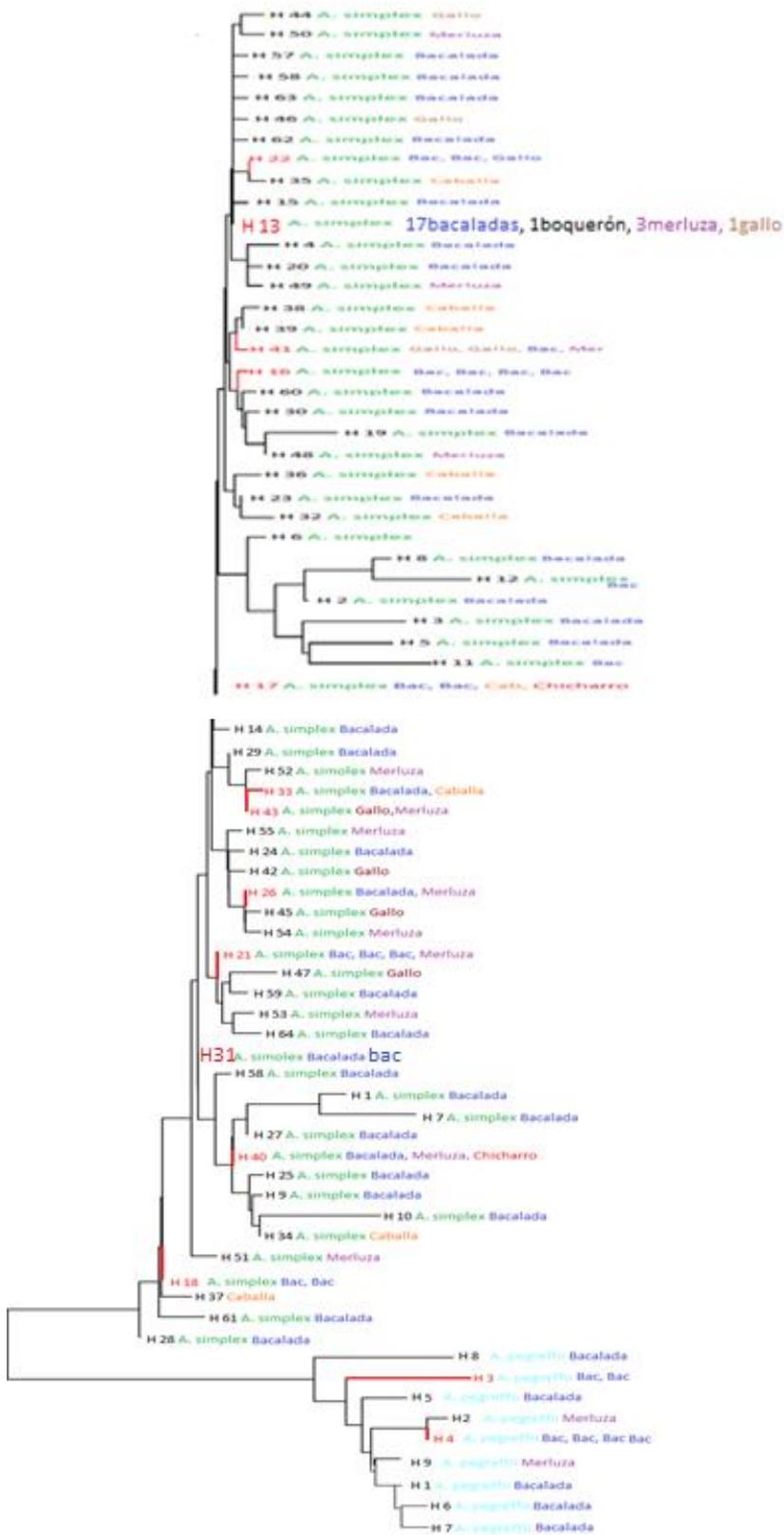


Figura 32. Árbol filogenético Neighbor-Joining de los haplotipos mitocondriales Cox II de *A. simplex* y *A. pegreffii*. Las líneas rojas reflejan los haplotipos compartidos. Para facilitar la visualización de la distribución de los haplotipos, cada especie de hospedador se ha representado con un color diferente.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conforme a los resultados que se han obtenido en este proyecto y teniendo en cuenta los argumentos presentados en los resultados y la discusión, a continuación se exponen las principales conclusiones a las que se ha llegado:

### PRIMERA

Los anisákidos presentes en las especies de pescado del litoral Cantábrico analizados pertenecen a los géneros *Anisakis* e *Hysterothylacium*.

### SEGUNDA

Las especies de *Anisakis* identificadas han sido *A. simplex* y *A. pegreffii*, con una proporción 9:1 respectivamente.

### TERCERA

Las larvas de *Anisakis spp.* han estado presentes en un 54% del total de pescados analizados y en 85 % de las especies hospedadoras.

### CUARTA

No existe relación significativa de especificidad entre la especie de nematodo y su especie hospedadora.

### QUINTA

Los parásitos presentes en el mismo hospedador presentan gran variabilidad genética, indicando que proceden de infestaciones múltiples.

### SEXTA

Las secuencias del gen COX II han sido útiles para la identificación específica de larvas de Anisákidos, mediante el análisis comparativo de las secuencias obtenidas con las secuencias de referencia depositadas en la base de datos de GenBank.

A partir de los resultados de este trabajo se podrían hacer las siguientes recomendaciones para el consumidor de la región:

Las especies de pescado que conllevan mayor riesgo de contraer anisakiasis para los consumidores en el ámbito doméstico son la merluza, seguido de la bacalada, por las elevadas prevalencias de parásitos obtenidas.

En cuanto al boquerón, las prevalencias han resultado ser bajas, pero los hábitos de preparación (escabechado, anchoado) son un factor de riesgo importante a tener en cuenta.

Como medida de prevención a nivel de consumidor, excepto en algunos casos de alergias, no es necesario suprimir el pescado de la dieta, sólo hay que tener en cuenta algunas medidas de control:

- Se debe consumir preferentemente la musculatura epiaxial que presenta menos parasitación, sobretodo en merluza.
- Seleccionar los pescados de menor tamaño.
- Congelar el pescado en el ámbito doméstico al menos 48 horas antes de su consumo.

## **ABREVIATURAS**

Ig E: Inmunoglobulina E

Ig M: Inmunoglobulina M

Ig A: Inmunoglobulina A

Th 1: Linfocitos T colaboradores subgrupo 1

Th 2: Linfocitos T colaboradores subgrupo 2

KGy: Kilogray: Unidad de medida de la radiación absorbida.

ICMSF: International Commission on Microbiological Specification for Foods

MPa: MegaPascal

OTU: Operational Taxonomic unit

## 6. BIBLIOGRAFÍA

ABATTOUY, N. MARTÍN SANCHEZ, J. BENAJIBA, M.H. VALERO LOPEZ, A. 2007, “*Epidemiología de Anisakis simplex S.L.en caballa y jurel capturados en la costa Mediterránea de Marruecos*”.

ABOLLO, E., GESTAL, C., PASCUAL, S. “*Anisakis infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective*”. Parasitol Res 2001

ALFONSO ANDRADE, “*Anisakis, baja incidencia en Galicia*”, Art. La voz de Galicia 30 de Marzo de 2014.

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. 1997 “*Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*”.

APROMAR (Asociación empresarial de productores y cultivos marinos de España) 2012 “*Estudio que demuestra la ausencia de anisakis en los pescados de acuicultura españoles*”.

ARCOS S. C, CIORDIA S, ROBERSTON L, ZAPICO I, JIMÉNEZ-RUIZ Y, GONZALEZ-MUÑOZ M, MONEO I, CARBALLEDA-SANGIAO N, RODRIGUEZ-MAHILLO A, ALBAR JP, NAVAS A. 2014 “*Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes Anisakis simplex sensu stricto and A. pegreffii*”

BARTLETT & STIRLING (2003) “*A Short History of the Polymerase Chain Reaction*”. In: Methods Mol Biol. 226:3-6

BETTY A. FORBES, 2007 “*Diagnóstico microbiológico*”.

CALVO G. J.F1, GARCÍA M.J.L.A. Y ROJAS M.N.J1 “*Alineamiento de secuencias genéticas mediante el uso de BioEdit*”.

CHIEN A, EDGAR DB, TRELA JM (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*".

CSIC, 2010 "Método para detectar el riesgo de infección y de alergia por *Anisakis* de forma rápida y segura".

D. LLORIS, J. MATALLANAS, P. OLIVER FAO, 2003. "Catálogo comentado e ilustrado de las merluzas del mundo".

DAVID MALAGÓN MARTÍNEZ, Tesis Doctoral, 2007 "Evolución de la actividad proteasa y de la fijación de CO<sub>2</sub> durante el desarrollo in vitro de *Hysterothylacium aduncum* (NEMATODO: ANISAKIDAE, PARASITO DE PECES)

DANIEL PACHECO LEAL, 2004 "Bioquímica médica".

DOLORS FERRERZ-MAZA, JOSEPH LLORET et al. 2013 "Parasitism, condition and reproduction of the European hake (*Merluccius merluccius*) in the northwestern Mediterranean Sea".

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health "Allergic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens and evaluation of the possible risk to human health". 27 April 1998

FOODS STÁNDARDS AGENCY 2005, "A survey of *Anisakis* and *Pseudoterranova* in Scottish fisheries and the efficacy of current detection methods".

FRANCO T.L. E HIDALGO R. 2003. "Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos"

JOSÉ GONZÁLEZ, 2014 "Avances multidisciplinares en el cultivo de la merluza europea, *Merluccius merluccius*"

JOSEPH BELLANTI, MÉNDEZ DE INOCENCIO, HUERTA LÓPEZ, BELLANTI, OVILLA MARTÍNEZ, ESCOBAR GUTIÉRREZ, 2008. “*Alergia, enfermedad multisistémica*”.

JOSEPH LLORET 2014, Web: “Salud y pescado, beneficios y riesgos”. Universidad de Girona.

JOSE MAURICIO M. H. “*El software libre en bioinformática*”.

JOSÉ PEÑALVER, EMILIO MARÍA DOLORES Y PILAR MUÑOZ, 2011 “*Un estudio prueba la ausencia de anisakis en doradas y lubinas*”. Revista: Journal of Food Protection.

JULI CAUJAPÉ CASTELLS Y RUTH JAÉN MOLINA “*Asistencia técnica para la realización de la tipificación de especies amenazadas mediante técnicas genéticas de identificación específica*”, integrada en el proyecto interreg iii-b azores madeira canarias (bionatura)”.

KYU-HEON KIM, KEESEON S. EOM, JOONG-KI PARK 2006 “The complete mitochondrial genome of *Anisakis simplex* (Ascaridida: Nematoda) and phylogenetic implications”.

M<sup>a</sup> TERESA AUDICANA BERASATEGUI “*Alergia al Anisakis simplex*” Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA.

MALTTIUCCI, et al. (2008) *Anisakis spp. larvae (Nematoda: Anisakidae from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stocks characterization)*.

MATTIUCCI S, NASCETTI G. 2006 “*Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus Anisakis Dujardin, 1845*”

MATTIUCCI S, NASCETTI G, CLANCHI R, PAGGI L, ARDUINO P, MARGOLIS L, BRATTEY J, WEBB S, D'AMELIO S, ORECCHIA P, BULLINI L. 1997 “*Genetic and ecological data on the Anisakis simplex complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae)*”.

MARQUÉS J.F., CABRAL H.N., BUSI M. AND S. D'AMELIO 2006. “*Molecular identification of Anisakis species from pleuronectiformes off the Portuguese coast*”.

NASCETTI G., PAGGI L., ORECCHIA P, SMITH J.W., MATTIUCCI S., BULLINI L., 1986 “*Electrophoretic studies on the Anisakis simplex complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic*”. International Journal for Parasitology (Volume 16, Issue 6, December 1986, Pages 633–640

OLIVA VIRGILI R., VIDAL TABOADA J.M. 2006 “GENOMA HUMANO, Nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento.”

PABLO BALDI, LAURA P. B., SILVIA FERNÁNDEZ C. et al. 2004 BIOCHEMISTRY.

PERTEGUER M.J., GUADALUPE ORTIZ, ELENA GARCÍA, MARÍA FLORES, ESPERANZA RODRÍGUEZ, FLORENCIO M UBEIRA, TERESA GÁRATE “*Application of the PCR-RFLP technique for the species-specific identification of nematodes involved in human anisakiasis*” Medicina clínica Vol. 122. Núm. 18. 15 Mayo 2004.

RAUL IGLESIAS B., FLORENCIO M.U. 1998 “*La anisaquiosis y su diagnóstico*”.

RODRIGUEZ MAHILLO A. I., MARGARITA T.Y. et al 2012 “*Método de extracción y detección de antígenos de Anisakis en alimentos destinados al consumo humano o animal*”.

ROZAS J. 2009 “*DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP*”.

Siles M, Cuéllar C, Perteguer MJ. 1997 “*Genomic identification of Anisakis simplex isolates*”.

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*”.

TORRES LAMAS M.E., MORENO VÁZQUEZ S. “*Caracterización mediante marcadores moleculares basados en el ADN*”.

VALENTINI A, MATTIUCCI S, BONDANELLI P, WEBB SC, MIGNUCCI-GIANNONE AA, COLOM-LLAVINA MM, NASCETTI G. “*Genetic relationships among Anisakis species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial cox2 sequences, and comparison with allozyme data*”.

WHO 1989. Report of WHO “*Consultation on Public Health Aspects of Seafood-Borne Diseases*”. WHO/CDS/VPH/90.86

W.H. FREEMAN AND COMPANY. 2004. “*Molecular cell biology*”.

### **SITIOS WEB**

<http://www.ecured.cu/index>.

<http://www.pescaderiascorunesas.es/>

[http://www.madrimasd.org/blogs/salud\\_publica/2008/08/18/98910](http://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/2008/08/18/98910)

<http://www.elmundo.es/elmundo/2011/06/28/natura/1309254532.html>

<http://www.elmundo.es/elmundosalud/2007/03/20/medicina/1174394589.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://personales.upv.es/jcanizar/bioinformatica/filogenias>

