

Universidad Nacional de San Martín

Maestría en Microbiología Molecular - 8va Cohorte

Tesis de Maestría

**Identificación molecular de nematodes Anisákidos de impacto en la
salud pública**

Tesista: Bioq. María Fernanda Degese

Director: Lic. MSc. Silvio Krivokapich

Lugar: Departamento Parasitología, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

Mes y año: Marzo 2015

A mi marido “pescador” y a nuestra/o hija/o en camino

A mis padres

A mis amigos de cuatro patas: Isabel, Malbec y Camilo

Agradecimientos

A mis compañeros de laboratorio: Graciana Gatti, Cinthia González y Silvio Krivokapich por hacerme un lugar junto a ellos.

Al Dr. Juan T. Timi y a su equipo de trabajo del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Mar del Plata, por capacitarme en la identificación de nematodos parásitos de la familia Anisakidae.

A mi amiga Gisela Cornalea.

A Katherina Vizcaychipi y a todos los compañeros del departamento de parasitología.

Índice

Resumen

1. Introducción	1
1.1. Características morfológicas generales de nemátodes anisákidos	1
1.2. Taxonomía	1
1.2.1. Género <i>Anisakis</i>	2
1.2.2. Género <i>Pseudoterranova</i>	2
1.2.3. Género <i>Contracaecum</i>	2
1.2.4. Género <i>Hysterothylacium</i>	2
1.3. Ciclo biológico de los anisákidos	2
1.4. Hospedadores	3
1.4.1. Género <i>Anisakis</i>	3
1.4.2. Género <i>Pseudoterranova</i>	3
1.4.3. Género <i>Contracaecum</i>	3
1.4.4. Género <i>Hysterothylacium</i>	3
1.5. Distribución geográfica	4
1.6. Anisakidosis humana	4
1.6.1. Epidemiología	4
1.6.2. Patogénesis y manifestaciones clínicas	5
1.6.2.1. <i>Anisakis</i>	5
1.6.2.1.1. Anisakiasis gástrica	5
1.6.2.1.2. Anisakiasis intestinal	5

1.6.2.1.3. Anisakiasis alérgica	6
1.6.2.1.4. Anisakiasis gastroalérgica	6
1.6.2.2. <i>Pseudoterranova</i>	7
1.6.2.3. <i>Contracaecum</i>	8
1.6.2.4. <i>Hysterothylacium</i>	8
1.6.3. Diagnóstico	8
1.6.3.1. Criterios morfológicos de las larvas (L3)	9
1.6.3.1.1. Género <i>Anisakis</i>	9
1.6.3.1.2. Género <i>Pseudoterranova</i>	9
1.6.3.1.3. Género <i>Contracaecum</i>	9
1.6.3.1.4. Género <i>Hysterothylacium</i>	9
1.6.3.2. Limitaciones de la identificación convencional de nematodos anisákidos	10
1.6.3.3. Diagnóstico molecular	10
1.6.3.3.1. Aloenzimas	10
1.6.3.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	10
1.6.3.3.3. PCR múltiple	12
1.6.3.4. Diagnóstico serológico	12
1.6.4. Tratamiento	12
1.6.5. Profilaxis	13
1.6.6. Anisakidosis en Argentina	14
1.7. Justificación y alcances	14
1.8. Objetivos	14
1.8.1. Objetivo general	14
1.8.2. Objetivos específicos	15

2. Materiales y Métodos	16
2.1. Población y muestra	16
2.2. Diseño experimental	16
2.2.1. Análisis morfológico	16
2.2.2. Extracción de ADN	16
2.2.3. Identificación molecular	16
2.2.3.1. Diseño de cebadores	16
2.2.3.2. Construcción de un control interno de amplificación (CIA)	16
2.2.3.3. PCR y secuenciación	17
2.2.3.4. Optimización de las condiciones de la reacción de amplificación por PCR	18
2.2.3.4.1. Determinación de la concentración óptima de CIA	18
2.2.3.4.2. Ensayo de sensibilidad y determinación de la concentración óptima de templado	18
2.3. Aplicación del método	18
3. Resultados	20
3.1. Detección de anisákidos en pescados infectados	20
3.2. Optimización de las condiciones de la reacción de amplificación por PCR	20
3.2.1. Concentración óptima del CIA	20
3.2.2. Sensibilidad de la PCR y concentración óptima de templado	20
3.3. Detección de anisákidos en muestras enviadas para su identificación	20
4. Discusión	21

5. Conclusiones	23
6. Tablas	24
7. Figuras	34
8. Referencias bibliográficas	47

Resumen

Los anisákidos son parásitos nematodos de la familia Anisakidae cuyo ciclo biológico se desarrolla en hospedadores acuáticos.

La anisakidosis humana es causada por la ingesta de pescado crudo o insuficientemente cocido infectado con larvas de tercer estadio (L3) de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium*.

A pesar de que las larvas no se desarrollan en humanos, pueden vivir y causar síntomas severos, pudiendo penetrar en la pared del estómago causando dolor abdominal agudo, náuseas y vómitos a las pocas horas pos ingestión; cuando invaden la mucosa gástrica o intestinal, a menudo producen úlcera o granuloma eosinófilo; y suelen ocasionar reacciones alérgicas que van desde urticaria hasta shock anafiláctico.

La globalización de hábitos alimentarios que incluyen pescado crudo o poco cocido provocó un aumento de la enfermedad en todo el mundo.

Aunque los géneros de los anisákidos mencionados pueden diferenciarse mediante su morfología, las larvas recuperadas de los pacientes afectados frecuentemente presentan estructuras deterioradas, que no permiten identificar al parásito. Asimismo, la existencia de especies morfológicamente similares en anisákidos, dificulta la identificación a nivel de especie. Por lo tanto, el diagnóstico molecular constituye una herramienta muy útil para la identificación definitiva de estos parásitos.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema de diagnóstico molecular de anisákidos con impacto en la salud pública: diseñar y efectuar la puesta a punto de un sistema de identificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación nucleotídica de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium*; identificar a nivel de especies, los géneros estudiados y aplicar la nueva metodología para la identificación molecular de muestras procedentes de infección humana y halladas en el alimento previo a su consumo.

Se obtuvieron larvas de nematodos de merluza (*Merluccius hubbsi*), pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*) y pez palo (*Percophis brasiliensis*) de la ciudad de Mar del Plata, y de Mero (*Acanthistius patachonicus*) y merluza adquiridos en pescaderías de la ciudad de Buenos Aires. Las larvas de anisákidos se identificaron a nivel de género de acuerdo a características morfológicas.

Se diseñaron un par de cebadores a partir de una región conservada del espaciador transcrita interno 1 (ITS1) del ADN ribosomal nuclear de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* y *Hysterothylacium* con el fin de amplificar mediante la técnica de PCR fragmentos de ADN de una longitud de 544pb, 505pb, 601pb y 583pb, respectivamente. Se elaboró un sistema de control interno de amplificación (CIA) con el objetivo de validar la precisión de la prueba. El CIA consistió en un producto de amplificación por PCR, purificado, formado por ADN quimérico del gen de

la enzima Maturasa K de *Arabidopsis thaliana* rodeado por secuencias específicas de ADN blanco parasitario. Posteriormente, se efectuó la reacción de PCR a partir de larvas L3 obtenidas y los productos amplificados fueron analizados mediante la secuenciación nucleotídica. Las secuencias obtenidas se cotejaron con la base de datos de nucleótidos del GenBank.

El método desarrollado se aplicó para la identificación molecular de tres muestras remitidas al laboratorio, una procedente de infección humana y dos halladas en un alimento.

En los pescados procedentes de comercios se evidenciaron larvas de anisákidos que se identificaron como pertenecientes a *Anisakis pegreffii*, *Contracaecum osculatum*, *Contracaecum* sp, *Hysterothylacium aduncum*, *Hysterothylacium deardorffoverstreetorum*, *Terranova* sp y *Pseudoterranova cattani*. Esto indica que el método de identificación molecular de anisákidos desarrollado en el presente trabajo, permitió diferenciar los géneros de parásitos inicialmente contemplados (i.e *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* y *Hysterothylacium*) y además identificar a otro como correspondiente al género *Terranova*.

Las muestras remitidas para análisis a nuestro laboratorio correspondieron a *P. cattani*. Este hecho constituye la primera identificación de esta especie, proveniente de infección humana.

Este método se propone como una herramienta útil para la identificación de anisákidos en humanos, que podrá auxiliar al diagnóstico diferencial con otras patologías gastrointestinales, favoreciendo un tratamiento eficaz del paciente. Asimismo, esta técnica de identificación, podrá contribuir a los estudios de prevalencia y comportamiento de la anisakidosis en nuestro país.

1. Introducción

Los anisákidos son parásitos nematodos cuyo ciclo de vida ocurre en hospedadores acuáticos. Los hospedadores definitivos son peces, reptiles, aves y mamíferos. Los hospedadores paraténicos son peces y cefalópodos.

La anisakidosis humana es causada por la ingestión de larvas de tercer estadio (L3) a través del consumo de productos de mar, pescados y mariscos crudos o poco cocidos.

Se destacan por su interés sanitario los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium* (Umehara et al, 2008).

1.1. Características morfológicas generales de nemátodos anisákidos.

El cuerpo de los nematodos anisákidos es cilíndrico, alargado, sin segmentación y puntiagudo en los extremos y posee una cutícula marcada por estriaciones finas transversales. El sistema digestivo es completo, compuesto por boca, esófago, intestino y ano (Möller & Anders, 1986). La boca posee labios bien desarrollados y según el género, puede presentar un diente perforante. El esófago comprende dos porciones bien diferenciadas: una anterior muscular llamada proventrículo y otra posterior glandular denominada ventrículo, que puede exhibir un apéndice, con presencia de intestino con o sin ciego intestinal, dependiendo del género. Estos nematodos poseen un sistema nervioso rudimentario, destacándose un anillo nervioso situado en el tercio anterior del parásito. El sistema excretor, compuesto por una glándula y un conducto que finaliza en el llamado poro excretor, está situado por debajo de la apertura bucal, o bien a nivel del anillo nervioso, según el género (Cheng, 1982).

La taxonomía de los anisákidos está basada principalmente en la morfología de los machos adultos. Las características estructurales relevantes para la identificación de especies son la distribución y el patrón de la papila caudal, la espícula y la morfología del extremo cefálico (Fagerholm, 1991).

La diferencia principal entre los estadios larvarios y los adultos está determinada por el desarrollo del sistema reproductor, claramente visible en estos últimos. Las larvas pueden ser identificadas al nivel de género por microscopía óptica, basándose principalmente, en la morfología del tracto digestivo y del sistema excretor (D' Amelio et al, 2013).

1.2. Taxonomía

Los anisákidos pertenecen al Phylum Nematelminthes, Clase Nematoda, Subclase Secernentea, Orden Ascaridida, Superfamilia Ascaridoidea, Familia Anisakidae, dentro de la cual se hallan 24 géneros (Cheng, 1982; Olson et al, 1983; Myers, 1975), entre

ellos cabe descartar a *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, e *Hysterothylacium*, por estar asociados a infecciones humanas.

1.2.1. Género *Anisakis*.

En la actualidad el género *Anisakis* posee nueve especies descritas, agrupadas en dos clados principales (Tabla 1). En el Clado 1, que se corresponde con el morfotipo larval I, el ventrículo es más largo que ancho y a menudo sigmoide y las espículas del macho son delgadas, largas y desiguales. En el Clado 2, mostrando el morfotipo larval II, el ventrículo es corto, no sigmoide y más ancho que largo, mientras que las espículas del macho son cortas, anchas y de largo similar (Berland, 1961; Valentini, 2006; D' Amelio et al, 2013).

1.2.2 Género *Pseudoterranova*

El género *Pseudoterranova* de mamíferos marinos incluye las especies: *P. kogiae*, *P. ceticola* y *P. decipiens*. Dentro del complejo *P. decipiens sensu lato* se encuentran al menos 6 especies: *P. decipiens sensu stricto*, *P. azarasi*, *P. cattani*, *P. krabbei*, *P. bulbosa* y *P. decipiens* E (Timi et al, 2014).

1.2.3. Género *Contracaecum*

Al presente, el género *Contracaecum* comprende unas 50 especies, la mayoría de las cuales se presentan en estadio adulto en pinnípedos y aves piscívoras. Han sido reconocidos cinco miembros del Complejo *Contracaecum osculatum*: tres especies del Ártico (*C. osculatum* A, *C. osculatum* B y *C. osculatum sensu stricto*) (Nascetti et al, 1993) y dos especies antárticas (*C. osculatum* D y *C. osculatum* E) (Orecchia et al, 1994). Estas especies sólo maduran en pinnípedos. Dentro de las especies que maduran en aves piscívoras se encuentran *C. pelagicum*, *C. australe*, *C. rudolphii*, *C. septentrionale*, *C. chubutensis*, *C. microcephalum*, *C. micropapillatum*, *C. bioccai*, *C. gibsoni* y *C. overstreeti* (Garbin, 2009).

1.2.4. Género *Hysterothylacium*

El género *Hysterothylacium* incluye actualmente 65 especies descritas en peces en todo el mundo y una única especie de anfibios, descrito en los EE.UU (Rossin et al, 2011).

1.3. Ciclo biológico de los anisákidos

El ciclo comienza cuando los huevos son eliminados con las heces de los hospedadores definitivos, generalmente mamíferos marinos y aves piscívoras (Figura 1). Los huevos, libres en el mar, eclosionan dando lugar al segundo estadio larvario (L2) que debe ser consumido por un hospedador intermediario, un crustáceo, para madurar hasta el tercer estadio larvario (L3). Peces y calamares se infectan al comer un crustáceo infectado.

Como los anisákidos no sufren algún tipo de desarrollo o muda dentro de peces y calamares, éstos son considerados hospedadores paraténicos del nematode, conteniendo la L3 infectiva para los seres humanos. El ciclo de vida se completa después que el hospedador paraténico es ingerido por un hospedador definitivo, en este último, la larva muda dos veces hasta convertirse en el parásito adulto. Es posible que pequeños peces o calamares sean ingeridos por grandes peces, determinando el pasaje adicional en un nuevo hospedador paraténico. Mientras el ciclo de vida descrito es aceptado por la mayoría de los científicos, existe evidencia de que pueden ocurrir dos mudas durante el desarrollo en el huevo y entonces el tercer estadio larval emerge de éste. El hombre se comporta como hospedador accidental a través del consumo de pescado o cefalópodos (moluscos marinos, como calamar y pulpo) crudos o insuficientemente cocinados (EFSA, 2011; D'Amelio et al, 2013).

1.4. Hospedadores

1.4.1. Género *Anisakis*

Los cachalotes son los hospedadores definitivos del segundo clado. Delfines y marsopas son los hospedadores finales del complejo *A. simplex* y de *A. typica*, en tanto que las ballenas son hospedadoras definitivas de *A. ziphidarum* y *A. nascettii* (Tabla2)

1.4.2. Género *Pseudoterranova*

Los gusanos adultos viven en los intestinos de focas y leones marinos y las larvas infectivas viven en los tejidos de varios peces marinos, como el bacalao, abadejo y eperlano (Tabla 3).

1.4.3. Género *Contracaecum*

Los hospedadores definitivos de estos parásitos son aves ictiófagas (Tabla 4 a) y mamíferos pinnípedos asociados a sistemas de agua dulce, salobres y/o marinos. Los nematodos del complejo de especies *C. osculatum* se encuentran en los peces de aleta marinos como larvas y en pinnípedos como adultos (Tabla 4 b). Otras especies que parasitan pinnípedos son *C. ogmorhini* y *C. radiatum* entre otras (Garbin, 2009).

1.4.4. Género *Hysterothylacium*

Las formas adultas de este género son parásitos comunes del tracto digestivo de peces en ambientes marinos, salobres y de agua dulce, mientras que los estadios larvales viven en diferentes tejidos de numerosas especies de peces e invertebrados (Tabla 5).

1.5. Distribución geográfica

Los miembros de la familia Anisakidae presentan una distribución mundial donde cada especie tiene un área de distribución específica (Tabla 6).

1.6. Anisakidosis humana

La anisakidosis humana es una enfermedad producida por larvas de nematodos de la familia Anisakidae, debida principalmente al consumo de pescado parasitado crudo o poco cocido. En 1960, van Thiel et al. reportaron el primer caso de Anisakidosis ocurrido en Holanda, a través del consumo de arenques crudos o mal cocidos, que estaban contaminados con larvas vivas de *Anisakis simplex* (van Thiel et al, 1960). A pesar de que las larvas no se desarrollan en humanos, éstas pueden vivir y causar síntomas severos, pudiendo penetrar en la pared del estómago causando dolor abdominal agudo, náuseas y vómitos a las pocas horas pos ingestión; cuando invaden la mucosa gástrica o intestinal, a menudo producen úlcera o granuloma eosinófilo; y suelen ocasionar reacciones alérgicas que van desde urticaria hasta shock anafiláctico.

La mayoría de los casos de esta parasitosis han sido diagnosticados en Corea, Japón, España y otros países, debido a sus hábitos alimentarios que incluyen pescado crudo o poco cocido (Kim et al, 2011). Sin embargo, la globalización de dichos hábitos provocó un aumento de la enfermedad en todo el mundo.

1.6.1 Epidemiología

Los productos de la pesca procedentes del mar son la principal fuente de las infecciones humanas con larvas de anisákidos, que llegan al hombre, por el consumo de pescados crudos o ligeramente salados o ahumados.

La presencia de estos nematodos en los peces es un problema universal y ha sido descrita en todos los océanos y en una gran diversidad de especies de peces y cefalópodos. Las especies donde más comúnmente se encuentran son bacalao, sardina, boquerón, merluza, arenque, salmón, bonito, caballa, brótola, pescadilla, abadejo, atún, calamar, entre otras.

Los tratamientos de salazón ligera, ahumado en frío (<60°C) y escabeche, a los cuales se someten a algunos pescados no matan las larvas de estos nematodos (AESAN, 2007).

Algunos de los productos que han sido implicados en infecciones humanas son (fuente: Gobierno de Cantabria <http://www.saludcantabria.es/index.php?page=anisakis>):

- Ceviche: pescado con especias marinado con jugo de limón
- Lomi lomi: salmón marinado con jugo de limón, cebolla y tomate

- Huevos de salmón
- Sashimi: trozos de pescado crudo
- Sushi: piezas de pescado crudo con arroz y otros ingredientes
- Arenque crudo en salmuera ligera
- Boquerón en vinagre
- Pescado ahumado en frío
- Pescado insuficientemente cocinado

1.6.2 Patogénesis y manifestaciones clínicas

La anisakidosis del tracto digestivo es clasificada desde el punto de vista clínico, como aguda o moderada. Según su localización, la enfermedad es subdividida en anisakidosis gástrica e intestinal, aunque se han documentado localizaciones extragastrointestinales en cavidad abdominal, mesenterio y epiplón (D'Amelio et al, 2013).

1.6.2.1. *Anisakis*

Las especies asociadas a anisakiasis (anisakidosis causada por parásitos del género *Anisakis*) son *A. physeteris* y el Complejo *A. simplex* (Koinari et al, 2013).

1.6.2.1.1. Anisakiasis gástrica

La forma gástrica aguda está caracterizada por náuseas, vómito y dolor epigástrico, de 4 a 6 horas después de la ingesta de pescado infectado. El dolor abdominal ha sido observado en casi el 100% de los casos en un estudio realizado en Japón (Ohtaki et al, 1989), con náuseas (68.3%), vómitos (39%), sensación de saciedad o distensión abdominal (29.3%), diarrea (19.5%), anorexia (9.8%) y dolor de pecho (4.9%). La fiebre no es un signo clásico pero la temperatura suele estar ligeramente por encima del valor normal. Otros hallazgos son leucocitosis de ligera a severa y algunas veces, eosinofilia. La mayoría de las larvas son encontradas en la curvatura mayor, seguido por la pared posterior. Se han descrito hallazgos endoscópicos tales como pliegues gástricos hipertróficos edematosos, aumento en la secreción gástrica y peristalsis, y lesiones de la mucosa, incluyendo edema, enrojecimiento, coagulación, hemorragia y ulceración (Shibata et al, 1989). La forma crónica se caracteriza por pérdida de apetito, epigastralgia, y la ocurrencia de pseudotumor gástrico (D'Amelio et al, 2013).

1.6.2.1.2. Anisakiasis intestinal

Los signos aparecen después de los siete días pos infección con dolor abdominal, náuseas, vómito, fiebre, diarrea, sangre oculta en materia fecal, leucocitosis y

raramente, eosinofilia. La evolución de la anisakiasis intestinal crónica es más maliciosa. En un estudio realizado, el 27% de las anisakiasis se encontraron a nivel intestinal (Ishikura et al, 1967). La mayoría de los casos llevaron a cólico intestinal y algunas veces peritonitis. Puede haber síntomas como náuseas, vómitos, abdomen hinchado e indurado, a pesar de que muchos casos fueron asintomáticos. La forma crónica se caracteriza por granulomas eosinofílicos formando tumores en las paredes intestinales mientras que la forma aguda tiene los síntomas de íleo agudo. Distintos casos reportados de España (Rosales et al, 1999) y de Italia (Moschella et al, 2005) fueron caracterizados por un cuadro clínico de dolor abdominal agudo, diarrea, meteorismo, y dolor selectivo a la palpación en íleo derecho con síntomas como náusea, fiebre y vómitos. Aunque es difícil de evaluar, algunas pruebas bioquímicas como recuento de leucocitos, porcentaje de eosinófilos, enzimas glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato piruvato transaminasa (GPT) pueden ayudar en el diagnóstico. Esta condición también puede ser evaluada por radiografía o ultrasonografía. Sobre la base del cuadro histológico, ha sido clasificada en cuatro estadios: 1- flemón, 2- absceso, 3- granuloma-absceso y 4- granuloma. A pesar de que una de las principales características de las lesiones de inflamación local producidas por larvas de *Anisakis* es la presencia de infiltrado eosinofílico en tejidos que rodean al parásito, la eosinofilia sistémica está asociada a anisakidosis en menos del 30 % de los casos (D'Amelio et al, 2013).

1.6.2.1.3. Anisakiasis alérgica

Las larvas de anisákidos presentes en el pescado, viables o no, pueden llevar a la aparición de reacciones alérgicas, frecuentemente asociadas a altos niveles de inmunoglobulina IgE. Se describieron casos de alergia a *A. simplex* ocupacional en pescaderías, o relacionados con la exposición (por contacto o inhalación) a harinas de pescado en la alimentación de pollos. Los síntomas clínicos de anisakiasis alérgica van desde urticaria hasta shock anafiláctico. El diagnóstico suele ser complicado ya que las infecciones por helmintos, en general, producen un aumento de IgE y de otras inmunoglobulinas. Además puede ocurrir reacción cruzada con otros antígenos parasitarios. Este problema demandó el desarrollo de técnicas inmunológicas más sensibles. En España, más del 50 % de los pacientes con este tipo de alergia, requirió tratamiento de emergencia, con 5 de 64 hospitalizados por falla respiratoria (Fernández de Corres et al, 1996). Desde 1995, más de 150 casos de alergia debidos a *Anisakis* fueron reportados en España. Los signos usuales son urticaria, shock anafiláctico y falla respiratoria debida a edema (D'Amelio et al, 2013).

1.6.2.1.4. Anisakiasis gastroalérgica

La anisakiasis gastroalérgica es un tipo de anisakiasis caracterizada por urticaria, angioedema, y anafilaxis, la cual consiste de reacción generalizada aguda mediada por IgE después de ingerir pescado ya sea crudo, poco cocido, cocido o freezeado, infectado

con *A. simplex*. Es una condición frecuente en Japón. La reacción alérgica ocurre a las 24 horas pos ingesta del pescado. En España los síntomas son moderados, probablemente debido a una isoforma diferente del alérgeno (*Ani s1*) (D'Amelio et al, 2013). Otras inmunoglobulinas, como IgA, IgG1, IgG2b y IgG2c pueden detectarse también. Investigadores encontraron que los alérgenos de *Anisakis*, *Ani s1*, y *Ani s4* son resistentes al calor, por lo tanto estarán en las preparaciones cocidas (Shikamura et al, 2004; Moneo et al, 2005).

Recientemente se han descrito 28 antígenos y potenciales nuevos alérgenos pertenecientes a diferentes familias de proteínas, con funciones biológicas diversas caracterizadas por primera vez en *Anisakis simplex s. l.* Hasta la fecha tan solo estaban descritas 12 proteínas alérgicas (Proteomics, 2014).

1.6.2.2. *Pseudoterranova*

Los miembros del complejo *P. decipiens* son los segundos anisákidos más comunes que se encuentran en los seres humanos (los más comunes son los integrantes del complejo *A. simplex*)

Se han descrito casos humanos en varios países. En Japón, 335 casos de Anisakidosis gástrica por *Pseudoterranova* fueron reportados entre 12000 casos de anisakidosis clínica. Fue encontrado con más frecuencia en la región norte, y principalmente relacionado a peces planos del área norte infectados con larvas de *P. decipiens s.l.* Recientemente fue identificado, en dicho país, un caso de infección humana por *P. azarasi* (Arizono et al, 2011). En Korea, después del primer caso descrito siguieron otros, y más recientemente, se reportaron 12 casos humanos. En casos notificados de Norteamérica, la infección fue transiente, probablemente luminal, sin evidencias de penetración tisular significativa. En Chile, después de un primer caso documentado, siete nuevos casos fueron reportados recientemente (Mercado et al, 1997, 2001). En Perú hay tres casos notificados por larvas de *P. decipiens s.l.* (Tantaleán et al, 1993; Cabrera et al, 2003). En Europa, la enfermedad ha sido hallada principalmente desde el norte aunque actualmente está siendo encontrada en el sur, en Italia y Francia. La larva L3 de *Pseudoterranova* mostró en pocos casos ser capaz de invadir tejido gastrointestinal de animales infectados experimentalmente. Sin embargo, de acuerdo a la literatura, los síntomas de infección causados en humanos son más débiles que los observados con *Anisakis spp* y puede ser asintomático. No obstante, los síntomas clínicos pueden aparecer de 2 a 3 horas hasta 7 días después de la ingestión de pescado infectado. Podría manifestarse en forma aguda o crónica. La forma aguda está descrita hasta ahora, por ejemplo, para las anisakidosis por *P. decipiens s.l.* reportadas en Europa, Chile, Perú y Norteamérica, donde las larvas de este parásito han sido encontradas a menudo unidas a la mucosa oral, faríngea y digestiva, o libres en el lumen del estómago. La mayoría de los pacientes chilenos, mostraron náusea, irritación de la faringe, y en algunos casos la larva fue expectorada entre 36 horas y 7 días después de comer pescado. En varios casos

descritos, los estadios larvales fueron expulsados por vía oral, a través de vómito o tos, o fueron encontrados muertos en las heces como una “infección transiente luminal”. En estos casos puede haber sensación de hormigueo en la garganta y moderado malestar abdominal. En algunos pacientes se ha observado irritación de la faringe y/o síntomas alérgicos. Los reportes de una forma crónica relacionada a los casos descritos de esas áreas geográficas, son muy pocos y no están plenamente documentados. En Japón, los casos notificados involucran solamente el estómago y las larvas han sido detectadas por endoscopía. En la mayoría de los casos la infección es luminal. Cuando hubo penetración gástrica fue a nivel de la curvatura mayor del cardias. Las imágenes endoscópicas revelan que la mucosa es edematosa y la biopsia del sitio de penetración mostró que no hay formación de granuloma eosinofílico como en *Anisakis*. En Europa, ha sido informada la forma gástrica, donde los parásitos están libres en el lumen. Una serie de estudios revelaron que las larvas de *A. simplex* s.l. y *P. decipiens* s.l. comparten antígenos comunes, estos autores sugieren que los síntomas gástricos agudos severos debido a *P. decipiens* s.l. podrían haber surgido como una reacción cruzada a una infección secundaria después de una exposición previa a larvas de *A. simplex* s.l. La hipersensibilidad alérgica vista en *Anisakis*, no aparece aquí. Este hallazgo probablemente esté asociado con la ausencia de granuloma eosinofílico formado alrededor de la larva (Mattiucci et al, 2013).

1.6.2.3. *Contracaecum*

Si bien el rol zoonótico de estos helmintos es discutido y su presencia en humanos sumamente casual, recientemente confirmaron el primer caso de anisakidosis luminal por larva de *Contracaecum* sp. en Australia (Shamsi & Butcher, 2011). Una mujer de 41 años de edad, experimentó dolor gastrointestinal, vómitos y diarrea de intensidad creciente durante 3 semanas. Todos los síntomas se resolvieron espontáneamente después de que un gusano fue eliminado en sus heces. El examen microscópico mostró que se trataba de una larva de una especie de *Contracaecum* de la familia Anisakidae (Biolé et al, 2012).

1.6.2.4. *Hysterothylacium*

En 1996, Yagi et al describieron un caso de infección humana en Japón debido a la ingestión de un pescado parasitado con *H. aduncum*. Overstreet y Meyer describieron, en 1981, lesiones hemorrágicas y eosinofilia causadas por la larva de *Hysterothylacium* tipo MB en monos rhesus (modelo animal experimental) (Knoff et al, 2012). También se han observado alteraciones patológicas causadas por *Hysterothylacium* en *Paralichthys isósceles* en la costa sudeste de Brasil. (Felizardo et al, 2009).

1.6.3. Diagnóstico

El diagnóstico clínico es difícil, dada la inespecificidad de los síntomas. La asociación de éstos con los antecedentes epidemiológicos basados en la ingesta de pescado crudo,

son datos que ayudan a orientar la etiología. La exploración ecográfica, radiográfica o gastroscópica permite visualizar las lesiones o las larvas del parásito. Las larvas se pueden extraer por endoscopia, aunque en ocasiones se requiere cirugía. El diagnóstico se confirma por la observación de las larvas así extraídas, o halladas en el vómito o las heces, o durante el examen anatomopatológico de la pieza quirúrgica resecada (Zuloaga et al, 2004).

1.6.3.1. Criterios morfológicos de las larvas (L3)

1.6.3.1.1. Género *Anisakis*: las larvas de *Anisakis* son de aproximadamente 2 cm de longitud. Se diferencian morfológicamente del resto de los anisákidos por la ausencia de apéndice ventricular y de ciego intestinal y por la ubicación del poro excretor en la base de los labios. La larva tipo I posee un ventrículo largo con la unión ventrículo-intestinal oblicua y una cola redondeada, corta y con una espina terminal, y la larva tipo II: tiene el ventrículo corto con una unión horizontal al intestino y posee una cola larga, puntiaguda y sin apéndice terminal (Berland, 1961).

1.6.3.1.2. Género *Pseudoterranova*: si se obtiene la larva intacta de una infección humana, puede ser posible distinguir, macroscópicamente, la larva de *P. decipiens* de la larva de *Anisakis* tipo I, porque la primera es más larga, más gruesa, color blanco amarillento cremoso, rojiza o marrón. Sin embargo, la larva de *Anisakis* tipo II, puede confundirse porque éstas son de color rojo blanquecino y del mismo largo que *P. decipiens*. Por este motivo es necesario un diagnóstico microscópico. La principal característica morfológica sobre la cual el diagnóstico diferencial es posible es, en la larva de *P. decipiens*, la presencia del intestino el cual, inmediatamente detrás del ventrículo, se extiende hacia delante como un ciego intestinal. El ciego intestinal no se encuentra en la larva de *Anisakis* spp (Mattiucci et al, 2013).

No posee apéndice ventricular. Presenta una cola pos anal corta y cónica con una espina terminal fina. La cutícula, a lo largo de todo el cuerpo, está finamente estriada por lo que muestra una apariencia lisa. El extremo anterior tiene un diente pequeño y triangular dirigido hacia afuera. El poro excretor aparece situado justo en posición ventral al diente (Berland, 1989).

1.6.3.1.3. Género *Contracaecum*: Por lo general la larva mide entre 4 y 16 mm. Ventrículo pequeño y esférico, apéndice ventricular expandiéndose inmediatamente después del ventrículo hacia el intestino, que expone un ciego anterior. El extremo posterior es cónico y no presenta espina terminal. La cutícula de esta larva es gruesa con las estriaciones transversales muy marcadas (Berland, 1989).

1.6.3.1.4. Género *Hysterothylacium*: El apéndice ventricular es fino y el ciego intestinal es más largo que el apéndice ventricular. El poro excretor está situado inmediatamente por debajo del nivel del anillo nervioso. Las gónadas están presentes

como filamentos, que se extienden desde la extremidad distal del apéndice ventricular hasta el ano (Navone et al, 1998).

1.6.3.2. Límites de la identificación convencional de nematodes anisákidos

Especies diferentes de anisákidos pueden estar asociados con distintas formas clínicas de anisakidosis en humanos. Debido a esto, la identificación a nivel de especies de larvas de anisákidos es un prerrequisito fundamental para que cualquier estudio epidemiológico se lleve a cabo en un área particular (Mattiucci et al, 2013).

Bajo condiciones diagnósticas, muy a menudo sólo se recupera una porción de la larva, o bien luego de la cirugía intestinal, se obtiene una muestra de nematode muy difícil de reconocer.

Las larvas que pertenecen al género *Anisakis* y pueden ser subdivididas sobre la base de la presencia/ausencia del mucrón o espina terminal, en dos tipos larvales distintos, no pueden identificarse a nivel de especie, dado que cada tipo larval es representado por más de una especie indistinguible morfológicamente. Más aun, el fenómeno generalizado de la existencia de especies morfológicamente similares en anisákidos, dificulta la identificación a nivel de especie, incluso en adultos, donde el número de caracteres morfológicos útiles para propósitos taxonómicos es mucho mayor. Estos factores hacen el uso de métodos moleculares absolutamente necesarios para identificar las larvas de nematodes anisákidos a nivel de especie (D'Amelio et al, 2013).

1.6.3.3. Diagnóstico molecular

1.6.3.3.1. Aloenzimas

La electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) ha sido usada extensivamente en nematodes anisákidos desde los comienzos de 1980 para abordar cuestiones concernientes a la genética de poblaciones, evolución, coevolución hospedador-parásito, y la relación entre variabilidad genética y alteraciones del hábitat. Los logros más importantes de esta metodología son a niveles de población y especies, mientras que por encima de estos niveles taxonómicos, muestra limitaciones significantes (D'Amelio et al, 2013). A pesar de que sigue siendo utilizada para detectar y describir especies de anisákidos, una de las limitaciones de esta metodología es el hecho de que si bien fue estandarizada sobre los distintos anisákidos, pueden encontrarse diferencias entre laboratorios (Mattiucci et al, 2013).

1.6.3.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*-PCR) descrita por Mullis en 1987, simula *in vitro* la replicación del ADN que tiene lugar de forma natural en las células. Esta metodología permite obtener gran número de copias a

partir de un segmento determinado de ADN. Por esta razón, utiliza pequeñas cantidades de muestra del parásito, fresco o fijado en etanol, para el análisis y es independiente del estadio de desarrollo del mismo. Esto representa una ventaja respecto del método anterior. La técnica de PCR se basa en realizar una mezcla de reactivos donde se agrega el templado de ADN previamente extraído de las células en estudio. Luego, esta mezcla de reacción es sometida a varios ciclos de amplificación en un termociclador, que proporciona la temperatura necesaria para la apertura de la doble cadena de ADN (desnaturalización), la unión de los cebadores o primers (hibridación o *annealing*) y la generación de los fragmentos amplificados (extensión). Posteriormente, los productos de amplificación (amplicones), se detectan mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Estos geles se colorean y se procede a la interpretación de los patrones de bandas obtenidos, relacionando el tamaño de las mismas con las bandas de los controles positivos, con marcadores de peso molecular, o secuenciándolas (Merino & Giusiano, 2011).

Recientemente, herramientas basadas en la reacción de PCR han sido utilizadas para la caracterización de especies de anisákidos en múltiples loci, incluyendo la región del espaciador transcrita interno ribosomal (ITS) y los genes de las subunidades I y II de la citocromo oxidasa C mitocondrial (Mattiucci et al, 2002; Valentini et al, 2006; La Rosa et al, 2006; Umehara et al, 2006; Umehara et al, 2008; Borges et al, 2012; Smrzlić et al, 2012; Koinari et al, 2013; Jabbar et al, 2013; D'Amelio et al 2013; Mattiucci et al, 2013).

En los organismos eucariotas, los genes de ADN ribosomal nuclear (ADNr) que codifican las subunidades ribosomales 18S, 5.8S y 28S, se agrupan en regiones repetidas en tándem, se trata de una estructura compleja formada por genes altamente conservados. Las subunidades 18S y 5.8S están separadas por el espaciador transcrita interno 1 (ITS1), mientras que las subunidades 5.8S y 28S están intercaladas por el espaciador transcrita interno 2 (ITS2), donde los espaciadores presentan altas tasas de sustitución. No obstante, las repeticiones en tándem del ADNr se encuentran conservadas a lo largo de todo un genoma por un mecanismo de evolución concertada (Hartl & Ruvolo 2000).

Los ITS pertenecen al ADNr, que constituye una fracción abundante del ADN total, además se encuentran entre regiones de ADN altamente conservadas (18S, 5.8S y 28S); estas características permiten una fácil amplificación por PCR utilizando cebadores y fragmentos de amplificación que pueden ser secuenciados.

Por otra parte, las secuencias mitocondriales también representan sitios blanco que permiten una detección sensible y específica de patógenos mediante análisis moleculares. El genoma mitocondrial se caracteriza por constituir una molécula circular cerrada, transmitirse por herencia materna, tener ausencia de recombinación, presencia de un patrón de evolución rápida y por hallarse en múltiples copias (Moraes, 2001).

Además, la forma circular de la molécula la protegería de la acción de las exonucleasas en los tejidos en descomposición (Foran, 2006).

1.6.3.3.3. PCR múltiple

En esta prueba se utiliza más de un par de cebadores y su ventaja es que permite amplificar diferentes segmentos de ADN en una misma reacción de PCR (Merino & Giusiano, 2011).

Umehara et al. desarrollaron un método basado en PCR múltiple para la identificación rápida de *A. simplex* s.s, *A. pegreffii*, *A. physeteris*, *P. decipiens*, *C. osculatum* e *H. aduncum*, donde se emplearon seis cebadores específicos y un cebador universal de la región ribosomal ITS (Umehara et al, 2008).

1.6.3.4. Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico puede resultar complicado en las infecciones por helmintos, en general, donde se produce un aumento de IgE y de otras inmunoglobulinas. Además puede ocurrir reacción cruzada con otros antígenos parasitarios. Estos problemas demandaron el desarrollo de técnicas inmunológicas más sensibles. Es de notar que pacientes sanos pueden tener altos niveles de IgE anti *Anisakis* en suero, sin el desarrollo de síntomas alérgicos. Por otro lado, individuos con niveles bajos de Ac IgE específicos pueden mostrar manifestaciones clínicas. Del Pozo et al recomendaron cuatro criterios para el diagnóstico de alergia a *Anisakis*: 1- urticaria/angioedema o anafilaxis dentro de las 6 horas después de la ingesta de pescado, 2- Ac IgE específicos para *A. simplex*, 3- prueba cutánea “prick test” (inoculación intradérmica de extractos de *A. simplex*), positiva (un diámetro >3 mm se considera una reacción positiva), 4- exclusión de alergia al pescado u otras causas sospechadas. En el ámbito experimental y mediante inmunoblot se han detectado anticuerpos frente a 5 antígenos de *A. simplex* de 45 y 66-95 kDa, al igual que ha sido posible determinar antígenos de este parásito en suero mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (D’Amelio et al, 2013).

1.6.4. Tratamiento

El tratamiento de elección es la extracción de la larva por endoscopia o cirugía. Las lesiones gastrointestinales se resuelven a las 2-3 semanas después de haber extraído el parásito. El diagnóstico de anisakiasis intestinal es más difícil, sin embargo, por lo general, se puede controlar sin la extracción del gusano dado que finalmente muere dentro de aproximadamente tres semanas. La cirugía puede ser necesaria para las infecciones intestinales o extraintestinales cuando ocurre obstrucción intestinal, apendicitis o peritonitis. No existe un tratamiento antihelmíntico de eficacia probada. El tratamiento exitoso de anisakiasis con albendazol, 400 mg por vía oral dos veces al día durante 6 a 21 días, se ha informado en casos con diagnósticos presuntivos (historia

altamente sugerente y/o serología). No obstante, no está aprobado por la FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos de EEUU) para esta indicación (Hochberg et al, 2010).

1.6.5. Profilaxis

El mayor número de reportes de anisakidosis invasora a nivel mundial se debe a dos especies, *A. simplex s.l.* y *P. decipiens s.l.*, siendo el fenómeno disparador del principal efecto patogénico, su capacidad de invadir los tejidos del hospedador. Ni el tamaño, ni la especie del pez, ni su carga larval en la cavidad corporal, son predictores confiables de la carga de anisákidos en el músculo. La región hipaxial (flancos que rodean la masa visceral) es más intensamente parasitada que la epiaxial (filet propiamente dicho), y la migración hacia el filet respondería a la capacidad individual para decodificar señales presentes en la musculatura de los peces (Tanzola, 2011).

Por otra parte, los nematodos poseen un conjunto de adaptaciones que le permiten sobrevivir en los entornos en los que vive. Estos organismos tienen adaptaciones de resistencia que les permiten sobrevivir en medios adversos hasta que las condiciones sean favorables nuevamente, como los mecanismos de tolerancia al frío.

Las medidas de prevención según la regulación vigente (Real Decreto, 2006; AESAN, 2007; EFSA, 2010; FDA, 2012) incluyen:

- Extremar las medidas de control bromatológico en el análisis de la calidad de productos pesqueros destinados al consumo humano.
- Evisceración inmediata de los peces.
- Para la preparación de platos crudos (orientales), someter la carne de pescado a congelación por freezer (-20°C) durante 72 horas.
- Cocinar muy bien el pescado, esto es lograr que toda la masa a consumir adquiera por más de 5 minutos una temperatura mínima de 60°C.

Lanfranchi y Sardella (2010) analizaron los efectos de diferentes tratamientos sobre anisákidos de peces en Argentina. No hallaron parásitos sobrevivientes por freezado de filetes a -20°C por 24 hs ni por exposición a sal seca de pescados infectados durante 24 horas. En el mismo estudio, las larvas de *Anisakis* sp en filetes sobrevivieron a la cocción en microondas a una temperatura interna de 64.05°C durante un minuto, mientras que a 75.56°C ninguna de las larvas de *Anisakis* sobrevivió. En un estudio previo, Adams y De Vlieger (2000) encontraron que la cocción en microondas requiere mayor temperatura para matar a los anisákidos debido a un calentamiento desigual (Lanfranchi & Sardella, 2010).

1.6.6. Anisakidosis en Argentina

En Argentina, prácticamente todas las especies de peces marinos y varias de agua dulce albergan, con diferente prevalencia e intensidad, larvas infectivas de estos nematodos. Sin embargo existen pocos casos de anisakidosis humana. Un caso identificado como *Anisakis* sp que por provenir de un tripulante de barco extranjero, no se lo considera como caso autóctono (en Tanzola, 2011); y otro caso reportado en una niña, que eliminó a través de sus heces una larva de anisákido de tercer estadio (Menghi et al, 2011).

Adultos de *A. pegreffii* han sido identificados a nivel molecular en delfines del Mar Argentino. En un estudio realizado en merluzas de Buenos Aires y de Mar el Plata, de 91 larvas pertenecientes a *Anisakis* spp, el 100% fue identificado como *A. pegreffii* (Hutler Wolkowicz, 2008).

Se ha demostrado que *A. pegreffii* tendría menor tendencia invasora del filet que *A. simplex* s.s, este dato puede explicar la baja casuística de larvas musculares en la ictiofauna marina sud atlántica y la consecuente exigua prevalencia de anisakidosis humana en nuestro país. Además, el consumo relativamente bajo de carne de pescado y los hábitos de su cocción completa, hasta el momento, explican en parte la escasez de casos clínicos descritos en la Argentina (Tanzola, 2011).

Por otra parte, adultos de *P. cattani* han sido identificados en lobos marinos de aguas del Sudeste del Pacífico y del Sudoeste Atlántico (Hernández-Orts, 2013; Timi et al, 2014), y larvas de este parásito fueron identificadas en la musculatura de peces de consumo en aguas argentinas y chilenas (Hernández-Orts, 2013; Timi et al, 2014). Por este motivo, es de esperar que el riesgo de infección humana sea similar al reportado en Chile, con la tendencia al consumo de pescado crudo.

1.7. Justificación y alcances

El desarrollo e implementación de un método de identificación molecular de anisákidos que afectan al hombre permitirá realizar el diagnóstico diferencial con otras patologías gastrointestinales, permitiendo un tratamiento eficaz del paciente. Asimismo posibilitará estimar la prevelencia y el comportamiento de esta parasitosis en nuestro país.

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo general

Desarrollar un sistema de diagnóstico molecular de anisákidos con impacto en la salud pública.

1.8.2. Objetivos específicos:

Diseñar y efectuar la puesta a punto de un sistema de identificación mediante PCR y secuenciación nucleotídica de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium*

Identificar a nivel de especies, los géneros estudiados.

Aplicar la nueva metodología para la identificación molecular de muestras procedentes de infección humana y halladas en el alimento previo a su consumo.

2. Materiales y Métodos

2.1. Población y muestra

Las larvas de nematodos analizados se obtuvieron de merluza (*Merluccius hubbsi*), pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*) y pez palo (*Percophis brasiliensis*) de la ciudad de Mar del Plata, y Mero (*Acanthistius patachonicus*) y merluza adquiridos en pescaderías de la ciudad de Buenos Aires.

2.2. Diseño experimental

Los pescados se diseccionaron y las larvas fueron recolectadas de las vísceras (estómago, intestino, hígado, cavidad celomática y mesenterios) por observación a ojo desnudo y/o con lupa binocular, y lavadas con solución salina fisiológica. De cada individuo, se escindió un fragmento de la región media de 3 mm de largo que se conservó en etanol 70° a -20°C para el posterior estudio molecular, y el resto del parásito se aclaró en lactofenol (Berland, 1984) para el examen morfológico.

2.2.1. Análisis morfológico

Las larvas de anisákidos se identificaron a nivel de género de acuerdo a características morfológicas (Ver secciones 1.1. y 1.6.3.1.)

2.2.2. Extracción de ADN

El ADN de cada nematode se aisló mediante el método Rapid isolation of Mammalian DNA (Sambrook & Russell, 2001).

2.2.3. Identificación molecular

2.2.3.1. Diseño de cebadores

Se realizó el alineamiento de secuencias, obtenidas del banco de datos de secuencias nucleotídicas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), de la región ITS1 del ADN ribosomal nuclear de *A. simplex*, *P. decipiens*, *C. osculatum* y *H. aduncum* (Figura 2).

Se diseñaron un par de cebadores, Ani-9F y Ani-552R, a partir de las regiones conservadas de las subunidades ribosomales 18S y 5.8S, que rodean al ITS1 (Tabla 7a), con el fin de obtener fragmentos de amplificación específicos y de tamaño diferencial para cada uno de los cuatro géneros de anisákidos (Tabla 7b).

2.2.3.2. Construcción de un control interno de amplificación (CIA)

Se elaboró un sistema CIA con el objetivo de validar la precisión de la prueba, distinguir resultados negativos verdaderos de resultados falsos negativos causados por

fallas de la amplificación por PCR, debido a degradación de ADN, mal funcionamiento del ciclado térmico, mezcla de PCR incorrecta, deterioro de los reactivos, pobre actividad de la ADN polimerasa y sustancias inhibitorias en la matriz de la muestra y en el ambiente de trabajo.

Se diseñaron un par de cebadores (CIA-Ani-9F y CIA-Ani-552R) que consistieron en la adición de una secuencia de 21 bases, correspondiente al gen de la enzima Maturasa K de la hierba *Arabidopsis thaliana*, en el extremo 3' de los cebadores mencionados en el apartado anterior (Ani-9F y Ani-552R) (Tabla 7a), con el fin de generar un producto de amplificación de 400 pares de bases, que incluya las regiones linderas de los cebadores Ani-9F y Ani-552R.

La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 μ l, que contenía 1.25 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen); 1X de buffer de *Taq*; 4 mM de $MgCl_2$, 2 mM de cada dNTP, 0.25 μ M de cebadores (CIA-Ani-9F y CIA-Ani-552R) y 1 μ l de ADN de *Arabidopsis thaliana*. Las condiciones de ciclado (Px2 Thermal Cycler/ Electron Corporation) incluyeron una primera desnaturalización a 94 °C durante 3 min, seguida por 40 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a 60°C (hibridación) y 1 min a 72 °C (extensión), con una extensión final de 10 min a 72 °C. Como control negativo se utilizó agua ultrapura. El fragmento de ADN amplificado por PCR fue determinado por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y comparado con un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen), tras teñir con bromuro de etidio.

El producto de amplificación fue purificado para ser utilizado como CIA, a partir del gel de agarosa, usando AccuPrep Gel Purification Kit (BIONEER) y titulado en un espectrofotómetro Ultrospec 2100 pro (Amersham/ Biosciences). El número de copias del control interno fue calculado como la cantidad de ADN en ng x NA / largo de templado en pb x 1.10^9 x el peso medio de un par de bases, donde NA es el número de Avogadro (6.022×10^{23}) y el peso medio de un par de bases es 650 daltons. Posteriormente, fue almacenado a -20 °C hasta su utilización en la amplificación por PCR junto al ADN blanco, por medio de los cebadores Ani-9F y Ani-552R.

2.2.3.3. PCR y Secuenciación

La mezcla de reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l, que contenía 0,5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen), 1X de buffer; 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,8 μ M de cada dNTP, y 0.25 μ M de cebadores (Ani-9F y Ani-552R). Las concentraciones de ADN del parásito y del CIA fueron determinadas de acuerdo al análisis de optimización detallado en sección 2.2.3.4. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 3 minutos a 94°C, 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60°C y 1 min a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C, en un equipo Px2 Thermal Cycler/ Electron Corporation. Se utilizó agua ultrapura como control negativo. Los fragmentos amplificados se chequearon mediante

el análisis electroforético en un gel de agarosa 1.5 % con bromuro de etidio, comparados con un marcador de tamaño molecular de 100 pb (Invitrogen).

Los fragmentos de amplificación por PCR que arrojaron el tamaño de banda esperado fueron purificados a partir de geles de agarosa usando AccuPrep Gel Purification Kit (BIONEER). La secuencia de nucleótidos de los productos de amplificación fue determinada por la secuenciación automática del ADN mediante un equipo ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Los datos de secuenciación fueron analizados por el programa Chromas LITE 2.01 y las secuencias se alinearon y compararon con la base de datos del GenBank mediante la herramienta Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.3.4. Optimización de las condiciones de la reacción de amplificación por PCR

2.2.3.4. 1 Determinación de la concentración óptima de CIA

La concentración de ADN del CIA fue optimizada antes de incluirlo en la mezcla de reacción. Se realizaron diluciones del CIA (de 1×10^4 a 0.1 copias) para determinar la menor cantidad de ADN del mismo suficiente para generar un producto de PCR visible por electroforesis en gel.

2.2.3.4.2 Ensayo de sensibilidad y determinación de la concentración óptima de templado

Para determinar el límite de detección y la cantidad óptima de ADN a utilizar, la PCR se llevó a cabo con diluciones seriadas con agua ultrapura, de ADN de los parásitos identificados como *A. pegreffii*, *C. osculatum*, *H. aduncum* y *P. cattani*, de 5 ng a 5 fg, tanto en presencia como en ausencia de CIA en la mezcla de reacción. El análisis se realizó por duplicado para cada dilución.

2.3. Aplicación del método

De enero a abril del año 2012, se recibieron en nuestro laboratorio, 3 muestras de nematodos para su identificación. Una muestra correspondiente a una paciente colombiana, asintomática, que acude a la consulta tras haber eliminado un parásito por la boca junto con la expectoración, manifestando haber comido ceviche en Perú, 15 días antes. Las otras dos muestras corresponden a parásitos que han sido hallados en el pescado previo a su consumo. Una se trata de un gusano encontrado dentro de la bolsa junto a filetes de mero adquiridos en una pescadería de la ciudad de Buenos Aires. La otra muestra, se trata de un parásito observado en una brótola poco cocida a punto de ser consumida, también proveniente de dicha ciudad.

En todos los casos eran gusanos cilíndricos de aproximadamente 2 cm de longitud, de color blanco amarillento. Estas muestras no eran aptas para su estudio morfológico por encontrarse mal conservadas, y fueron analizadas mediante el método de identificación molecular desarrollado en el presente estudio.

3. Resultados

3.1 Detección de anisákidos en pescados infectados

En los pescados procedentes de comercios se evidenciaron larvas de anisákidos que mediante la secuenciación nucleotídica de ITS1 se identificaron como pertenecientes a *A. pegreffii*, *C. osculatum*, *Contracaecum* sp, *H. aduncum*, *H. deardorffoverstreetorum*, *Terranova* sp y *P. cattani*. Todos los géneros coincidieron con el análisis morfológico y dieron un fragmento de amplificación diferencial por PCR (Figura 8).

3.2. Optimización de las condiciones de la reacción de amplificación por PCR

3.2.1. Concentración óptima del CIA

Se estimó que 1 copia del CIA es suficiente para generar una amplificación visible por electroforesis en gel de agarosa. No obstante, en la amplificación conjunta del control interno con el ADN de los cuatro anisákidos, se estableció una cantidad de CIA de 100 copias por tubo de reacción para asegurar la presencia de un número adecuado de copias del mismo en cada tubo (Figura 7).

3.2.2. Sensibilidad de la PCR y concentración óptima de templado

La cantidad mínima de ADN necesaria para detectar los amplicones fue de 5 pg para *C. osculatum* (Figura 3 a) y de 500 fg para *P. cattani* (Figura 4 a), *H. aduncum* (Figura 5 a) y *A. pegreffii* (Figura 6 a), cuando el CIA no fue añadido a la mezcla de PCR.

Luego de la adición de 100 copias de CIA a la reacción de PCR, los límites de detección no variaron para *C. osculatum* (Figura 3 b) y *P. cattani* (Figura 4 b), mientras que para *H. aduncum* (Figura 5 b) y *A. pegreffii* (Figura 6 b) pasó de 500 fg a 5 pg.

Se estableció una concentración óptima de ADN parasitario, en la mezcla de reacción de PCR, de 5 ng, con el fin de evitar posibles fallas en la amplificación debido a la degradación del ADN en muestras no conservadas apropiadamente.

3.3. Detección de anisákidos en muestras enviadas para su identificación

Todas las muestras remitidas para análisis a nuestro laboratorio, una procedente de infección humana y dos halladas en el alimento, correspondieron a *Pseudoterranova cattani* por análisis molecular (Figura 9).

4. Discusión

El método de identificación molecular desarrollado en el presente trabajo permitió diferenciar los géneros de parásitos inicialmente contemplados (i.e *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* y *Hysterothylacium*) y además identificar a otro como correspondiente al género *Terranova*, en pescados adquiridos en comercios de las ciudades de Buenos Aires y Mar del Plata. Las longitudes de los productos de PCR generados en la reacción de amplificación fueron diferenciales para cada género de anisákidos, y estos resultados fueron concordantes con el análisis de indentificación morfológico de los parásitos. La secuenciación nucleotídica y el subsiguiente análisis comparativo, mediante la herramienta Blastn, de los fragmentos amplificados, permitió la identificación a nivel de especie de los ejemplares estudiados.

Además, la identificación a nivel de especie evidenció una correlación con los hospedadores y su distribución geográfica previamente reportadas para estos parásitos (tablas 2 a 6).

Diferentes especies de anisákidos suelen ser morfológicamente similares y en ocasiones sus estructuras son difíciles de reconocer, ya sea por no ser correctamente obtenidas en procedimientos quirúrgicos, o por no encontrarse conservadas en condiciones idóneas. Estas pueden estar asociadas con distintas formas clínicas de la enfermedad en humanos. Debido a esto, un método de identificación a nivel de especies de larvas de anisákidos, como el empleado en el presente trabajo de tesis, es necesaria para la identificación del agente etiológico y para efectuar estudios epidemiológicos de esta parasitosis en un área determinada.

La sensibilidad de detección del método, determinada con los géneros implicados en infecciones humanas fue similar para *A. pegreffii*, *P. decipiens*, y *H. aduncum*(0,5pg) aunque en *C. osculatum* los productos de amplificación se evidenciaron hasta una dilución decimal inferior. No obstante, el límite de detección de 5 pg registrado en *C. osculatum* es consistente con otros métodos de PCR descriptos para el diagnóstico de nematodes (Dangoudoubiyam et al, 2009).

Para evitar resultados falsos negativos de la PCR, se diseñó e incluyó en el ensayo un control interno de amplificación competitivo con la región del ITS1 del ADN de los géneros de anisákidos estudiados. En esta estrategia, siempre se evidencia una competencia entre el ADN blanco y el CIA, donde la concentración del control interno es crítica para el límite de detección (Hoofar et al, 2004). En este estudio se estableció que 100 copias fue la menor concentración de CIA capaz de producir una amplificación visible por electroferesis en gel. Este control interno exhibió una leve competencia con el ADN de *H. aduncum* y *A. pegreffii*, aunque no afectó la detección de los restantes anisákidos. De todos modos, la adición del CIA al sistema permitió un límite mínimo de detección de 5 pg. Es de notar que el ADN extraído en las condiciones mencionadas en

el apartado 2.2.2 arroja en promedio una concentración de 100 ng/ul, y siendo la concentración ajustada en la reacción de PCR de 5 ng, un límite de detección de 5 pg sería más que aceptable.

Finalmente se utilizó este método para el análisis de muestras de parásitos recibidas en el laboratorio para su análisis. Estos parásitos fueron identificados como *P. cattani*.

La presentación del caso clínico fue similar a los casos de pseudoterranovosis luminal notificados de Chile, Perú, Norteamérica y Europa. En Japón, donde las formas clínicas de pseudoterranovosis suelen presentarse de forma severa con penetración del tracto gastrointestinal, el agente causal de pseudoterranovosis ha sido recientemente identificado como *P. azarasi* (Arizono et al., 2011). *P. cattani* se encuentra como adulto en el lobo marino *Otaria flavescens* en aguas del Sudeste del Pacífico y del Sudoeste Atlántico. Larvas de este parásito fueron identificadas en la musculatura de peces de consumo en aguas argentinas y chilenas (Hernández-Orts, 2013; Timi et al, 2014). El riesgo de infección humana en nuestro país se espera que sea similar al de Chile, donde se han informado casos de esta parasitosis por *P. decipiens* s.l. Sin embargo, hasta el momento, no se han reportado casos humanos en Argentina, probablemente debido a la tradición de consumir pescado bien cocido, o a la falta de sospecha clínica del sistema de salud frente a una patología poco conocida en nuestro medio. Es de notar, que aquí, se describe el primer caso de diagnóstico de anisakidosis por *P. cattani* en nuestro país de una paciente que consumió ceviche en Perú. Este hecho constituye la primera identificación de esta especie, proveniente de infección humana.

Por último, y considerando las otras dos muestras analizadas que se hallaban en el pescado a punto de ser consumido, podemos inferir que la presencia de larvas de *Pseudoterranova* en la musculatura de los peces, que aparecen, por ende, en el alimento a consumir, constituye un riesgo para la salud humana si no se toman las medidas de prevención sanitarias adecuadas.

5. Conclusiones

La anisakidosis constituye un problema de salud pública dado el aumento que ha experimentado la prevalencia en los últimos años en todo el mundo, debido principalmente, a la adquisición de nuevos hábitos gastronómicos basados en el consumo de pescado crudo o insuficientemente cocinado.

En nuestro país, en particular, ha aumentado la ingesta de pescado a través de la popularización de platos exóticos, como el sushi, y de movimientos naturistas que promueven el hábito de consumir pescado crudo o poco cocido. Por este motivo, es importante el diagnóstico diferencial por parte del laboratorio para evaluar la emergencia de los anisákidos como agentes etiológicos de parasitosis.

El método diseñado permite identificar al mismo tiempo varios anisákidos en una reacción de PCR convencional, seguida de la secuenciación de nucleótidos. Se propone como una herramienta útil para el estudio de estos parásitos en humanos, cuando las estructuras morfológicas no se encuentran conservadas. Asimismo, este método podrá auxiliar al diagnóstico diferencial con otras patologías gastrointestinales, favoreciendo un tratamiento eficaz del paciente, como así también, contribuir a los estudios de prevalencia y comportamiento de la anisakidosis en nuestro país.

Perspectivas futuras:

Conforme el número de casos humanos de anisakidosis en nuestro país aumente, de acuerdo a lo esperado, otras estrategias diagnósticas disponibles hoy a un costo accesible, como la PCR en tiempo real a través del uso de sondas de ADN específicas, podrán emplearse para la identificación de especies de estos nematodos, sin la necesidad de recurrir a un servicio de secuenciación nucleotídica, que puede ser poco accesible, de mayor costo y demandar más tiempo.

6. Tablas

Tabla 1: Clasificación taxonómica del género *Anisakis*

<u>Clado 1</u>		
<i>A. pegreffii</i>	}	Complejo <i>A. simplex</i>
<i>A. simplex sensu stricto</i>		
<i>A. Simplex C</i>	}	Larva morfotipo I
<i>A. typica</i>		
<i>A. ziphidarum</i>		
<i>A. nascettii</i>		
 <u>Clado 2</u>		
<i>A. physeteris</i>	}	Larva morfotipo II
<i>A. brevispiculata</i>		
<i>A. paggiae</i>		

Tabla 2: Hospedadores del género *Anisakis* ^{(a) (b)}

Especie	Hospedador definitivo	Hospedador paraténico
<i>A. simplex</i> s.s.	<i>Balaenoptera acutorostrata</i> <i>Delphinapterus leucas</i> <i>Delphinus delphis</i> <i>Globicephala melaena</i> <i>Lagenorhynchus albirostris</i> <i>Orcinus orca</i> <i>Pseudorca crassidens</i> <i>Phocoena phocoena</i> <i>Stenella coeruleoalba</i>	<i>T. trachurus</i> <i>Brosme brosme</i> <i>Salmo salar</i> <i>Clupea harengus</i> <i>Gadus morhua</i> <i>Theragra chalcogramma</i> <i>Reinhardtius hippoglossoides</i>
<i>A. pegreffii</i>	<i>D. delphis</i> <i>Ziphius cavirostris</i> <i>Tursiops truncatus</i> <i>Caperea marginata</i>	<i>Merluccius merluccius</i> <i>Trachurus trachurus</i> <i>Merluccius capensis</i> <i>Lepidopus caudatus</i> <i>Thyrsites atun</i> <i>Merluccius hubbsi</i> <i>Parapercis colias</i> <i>Pseudophycis bachus</i>
<i>A. simplex</i> C	<i>L. albirostris</i> <i>Lissodelphis borealis</i> <i>P. crassidens</i>	<i>P. colias</i> <i>P. bachus</i>
<i>A. ziphidarum</i>	<i>Z. cavirostris</i> <i>Mesoplodon layardii</i> <i>Mesoplodon europaeus</i> <i>Mesoplodon densirostris</i>	Jurel, merluza
<i>A. nascettii</i>	<i>M. layardii</i> <i>M. densirostris</i> <i>Mesoplodon mirus</i> <i>Mesoplodon grayi</i>	<i>Moroteuthis ingens</i> <i>M. merluccius</i>
<i>A. typica</i>	<i>Globicephala macrorhynchus</i> <i>Sotalia fluviatilis</i> <i>Steno bredanensis</i> <i>Stenella attenuata</i> <i>Stenella longirostris</i> <i>S. coeruleoalba</i> <i>T. truncatus</i> <i>Lagenodelphis hosei</i> <i>Mesoplodon bidens</i>	<i>Thunnus thynnus</i> <i>M. merluccius</i>
<i>A. physeteris</i>	<i>Physeter macrocephalus</i> <i>Kogia breviceps</i>	Varias especies de peces (merluza, pez espada, bacaladilla). Predilección particular por cefalópodos
<i>A. brevispiculata</i> y <i>A. paggiae</i>	<i>K. breviceps</i> <i>Kogia sima</i>	Predilección particular por cefalópodos

^(a) La lista de hospedadores definitivos y secundarios es sólo indicativa y es incompleta debido a la amplia variedad de hospedadores para este grupo de parásitos.

^(b) D'Amelio et al, 2013; Mattiucci y Nascetti, 2007; Mattiucci et al, 2009; La Rosa et al, 2006.

Tabla 3: Hospedadores del género *Pseudoterranova* ^{(a) (b)}

Especie	Hospedador definitivo	Hospedador paraténico
<i>P. decipiens sensu stricto</i>	<i>Phoca vitulina</i> <i>Halichoerus grypus</i> <i>P. vitulina richardsii</i> <i>Zalophus californianus</i>	Peces gádidos del Océano Atlántico Norte.
<i>P. krabbei</i>	<i>Phoca vitulina</i> <i>Halichoerus grypus</i>	<i>Gadus morhua</i> <i>Melanogrammus aeglefinus</i> <i>Pollachius virens</i>
<i>P. bulbosa</i>	<i>Erignathus barbatus</i>	<i>Hippoglossoides platessoides</i> <i>Reinhardtius hippoglossoides</i>
<i>P. azarasi</i>	<i>Erignathus barbatus</i> <i>Eumetopias jubatus</i>	ND
<i>P. decipiens</i> E	<i>Leptonychotes weddellii</i>	<i>Notothenia coriiceps</i> .
<i>P. cattani</i>	<i>Otaria flavescens</i>	<i>Prionotus nudigula</i> <i>Percophis brasiliensis</i> <i>Acanthistius patachonicus</i> <i>Paralichthys isósceles</i> <i>Paralichthys patagonicus</i> <i>Pseudopercis semifasciata</i> <i>Conger orbignianus</i> <i>Paralichthys isósceles</i>

ND: Dato no disponible

^(a) La lista de hospedadores definitivos y secundarios es sólo indicativa y es incompleta debido a la amplia variedad de hospedadores para este grupo de parásitos.

^(b) Mattiucci et al, 2013; Hernández-Orts et al, 2013; Timi et al, 2014

Tabla 4: Hospedadores del género *Contracaecum* ⁽ⁱ⁾

a- Especies que parasitan aves: ⁽ⁱⁱ⁾

Especie	Hospedador definitivo	Hospedador paraténico
<i>C. pelagicum</i>	<i>Spheniscus magallanicus</i> <i>Phalacrocorax atriceps</i> <i>Thalassarche melanophris</i> <i>Phalacrocorax atriceps</i> <i>albiventer</i>	<i>Engraulis anchoita</i>
<i>C. rudolphii</i> y <i>C. septentrionale</i>	<i>Phalacrocoracidae boreales</i>	ND
<i>C. chubutensis</i>	<i>Phalacrocorax atriceps</i>	ND
<i>C. bioccai</i>	<i>Pelecanus occidentalis</i>	ND
<i>C. australe</i>	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	ND
<i>C. microcephalum</i>	<i>Phalacrocorax pigmaeus</i>	ND
<i>C. micropapillatum</i>	<i>Pelecanus onocrotalus</i>	ND
<i>C. gibsoni</i> y <i>C. overstreeti</i>	<i>Pelecanus crispus</i>	ND

ND: Dato no disponible

⁽ⁱ⁾ La lista de hospedadores definitivos y secundarios es sólo indicativa y es incompleta debido a la amplia variedad de hospedadores para este grupo de parásitos.

⁽ⁱⁱ⁾ Garbin, 2009; Garbin et al, 2013.

Tabla 4: Hospedadores del género *Contracaecum* ⁽ⁱ⁾

b- Especies del Complejo *C. osculatum*: ⁽ⁱⁱⁱ⁾

Especie	Hospedador definitivo ^c	Hospedador secundario ^c
<i>C. osculatum</i> sp. A	<i>E. barbatus</i> <i>H. grypus</i> <i>E. Acinonyx</i>	<i>Theragra chalcogramma</i>
<i>C. osculatum</i> sp. B	<i>Pagophilus groenlandicus</i> <i>P. vitulina</i> <i>H. grypus</i> <i>Z. californianus</i>	ND
<i>C. osculatum sensu stricto</i>	<i>H. grypus</i>	ND
<i>C. osculatum</i> sp. D	<i>L. weddellii</i>	Peces pelágicos y meso-pelágicos pertenecientes a las familias <i>Channicthydae</i> y <i>Bathydraconidae</i> .
<i>C. osculatum</i> sp. E	<i>L. weddellii</i>	Peces bentónicos antárticos pertenecientes a la familia <i>Nothotenidae</i> .

ND: Dato no disponible

⁽ⁱ⁾ La lista de hospedadores definitivos y secundarios es sólo indicativa y es incompleta debido a la amplia variedad de hospedadores para este grupo de parásitos.

⁽ⁱⁱⁱ⁾ Mattiucci et al, 2013

Tabla 5: Hospedadores del género *Hysterothylacium* ^{(a) (b)}

Especie	Hospedador definitivo	Hospedador paraténico
<i>Hysterothylacium</i> de anfibios de norteamérica	<i>Notophthalmus viridescens</i>	ND
<i>H. corrugatum</i>	<i>Xiphias gladius</i>	ND
<i>H. rhamdiae</i>	<i>Rhamdia sapo</i>	ND
<i>H. patagonense</i>	<i>Percichthys trucha</i>	ND
<i>H. aduncum</i>	<i>M. hubbsi</i> <i>S. japonicus</i> <i>Genypterus blacodes</i> <i>G. brasiliensis.</i>	<i>Themisto gaudichaudii</i> <i>E. anchoita</i> <i>Merluccius hubbsi</i>
<i>Hysterothylacium spirale</i> sp. Nov.	<i>Zenopsis conchifer</i>	ND
<i>H. geschei</i> n. sp	<i>Cauque mauleanum</i>	ND
<i>H. winteri</i>	<i>Eleginops maclovinus</i>	ND
<i>H. fortalezae</i>	<i>Scomberomorus cavalla</i> <i>Scomberomorus maculatus</i> <i>Harengula clupleola</i>	ND
<i>H. reliquens</i>	<i>Archosargus probatocephalus</i> <i>Opsanus beta</i> <i>Chilomycterus schoepfi</i> <i>Halichoeres bivittatus</i> <i>Micropogon undulatus</i>	ND
<i>H. deardorffoverstreetorum</i> sp. Nov.	<i>Paralichthys isosceles</i>	ND

ND: Dato no disponible

^(a) La lista de hospedadores definitivos y secundarios es sólo indicativa y es incompleta debido a la amplia variedad de hospedadores para este grupo de parásitos.

^(b) Torres et al, 1998; Rossin et al, 2011; Navone et al, 1998; Knoff et al, 2012

Tabla 6: Distribución geográfica de anisákidos ^(a)

Género	Especie	Distribución
<i>Anisakis</i>	<i>A. simplex</i> s.s.	Océanos Atlántico Norte Pacífico Norte Mar Mediterráneo (raramente)
	<i>A. pegreffii</i>	Mar Mediterráneo Océano Atlántico Sur Aguas japonesas y neozelandesas.
	<i>A. simplex</i> C	Distribución de “piel de leopardo”: Aguas del Pacífico de Canadá y California Chile Nueva Zelanda Océano Atlántico suroriental.
	<i>A. typica</i>	Aguas cálidas y tropicales: Golfo de México Costas brasileras Costas de Somalia, Mauritania, y Morocco Mar Mediterráneo (parte central este, incluyendo Cyprus, Tunisia, y Lybia)
	<i>A. ziphidarum</i>	Costas de Sudáfrica Mar Mediterráneo Aguas del Atlántico Central hasta el Mar Caribe
	<i>A. nascettii</i>	Océano Atlántico Central Costas de Madeira España noroccidental Aguas de Sudáfrica y Nueva Zelanda.
	<i>A. physeteris</i>	Mar Mediterráneo (incluyendo las costas del Norte de África) Costas atlánticas de España Océano Atlántico Central Golfo de México.
	<i>A. brevispiculata</i> y <i>A. paggiae</i>	Aguas cálidas del Océano Atlántico (desde el Golfo de México hasta las costas de la Península Ibérica)

Continúa Tabla 6 en la página siguiente

Continuación Tabla 6

Género	Especie	Distribución
<i>Pseudoterranova</i>	<i>P. decipiens</i> s.s.	Regiones del Ártico y Subártico: Noreste Atlántico (aguas escocesas, Isla Feroe, aguas del Sur de Islandia y noruegas) Atlántico canadiense (aguas de Isla de Terranova y del Golfo de St Lawrence) Aguas del Pacífico canadiense
	<i>P. krabbei</i>	Noreste Atlántico
	<i>P. bulbosa</i>	Mar de Barents Mar de Noruega Atlántico canadiense Mar de Japón.
	<i>P. azarasi</i>	Océano Pacífico Norte (aguas japonesas y sajalesas)
	<i>P. decipiens</i> E	Aguas antárticas y subantárticas.
	<i>P. cattani</i>	Sudeste de aguas del Pacífico (Chile) Sudoeste Atlántico (costa patagónica argentina).
<i>Contracaecum</i>	<i>C. osculatum</i> A	Mares noruego y de Barents Atlántico canadiense, islandés Aguas del Pacífico canadiense Mar de Japón.
	<i>C. osculatum</i> B	Noreste y Noroeste del Océano Atlántico Aguas del Pacífico norte
	<i>C. osculatum</i> s.s.	Mar Báltico (única especie del complejo <i>C. osculatum</i> en este lugar)
	<i>C. osculatum</i> D	Antártida: Mar de Weddell y Mar de Ross
	<i>C. osculatum</i> E	Antártida: Mar de Weddell.
	<i>C. pelagicum</i>	Península Valdés y Bahía Engaño (Chubut. Argentina)
	<i>C. rudolphii</i> A	Laguna de Venecia (Norte de Italia)

Continúa Tabla 6 en la página siguiente

Continuación Tabla 6

Género	Especie	Distribución
<i>Contracaecum</i>	<i>C. rudolphii</i> B	Laguna Oristano, Isla de Cerdeña y Salinas de Tarquinia (Italia) Lago Mazury (Polonia)
	<i>C. rudolphii</i> C	Bahía de Sarasota (Florida, EEUU)
	<i>C. septentrionale</i>	Islandia, Noruega
	<i>C. chubutensis</i>	Bahía Bustamante (Chubut, Argentina)
	<i>C. bioccai</i>	Pantano del Totumo (Colombia)
	<i>C. australe</i>	Laguna Santa Elena (Chile)
	<i>C. microcephalum</i>	Lago Scutari (Región de Montenegro)
	<i>C. micropapillatum</i>	Asuán (Egipto)
	<i>C. gibsoni</i> y <i>C. overstreeti</i>	Grecia
<i>Hysterothylacium</i>	<i>H. corrugatum</i>	Ecuador
	<i>H. rhamdiae</i> , <i>H. patagonense</i> , <i>H. aduncum</i> , <i>Hysterothylacium spirale</i>	Argentina
	<i>H. geschei</i> , <i>H. winteri</i> , <i>H. aduncum</i>	Chile
	<i>H. fortalezae</i> , <i>H. reliquens</i> , <i>H. deardorffoverstreetorum</i>	Brasil <i>H. reliquens</i> : también en norte del golfo de México y sur de Florida
	<i>H. aduncum</i>	Atlántico Norte Ampliamente distribuido en el hemisferio sur hasta las aguas antárticas

^(a) D'Amelio et al, 2013; Mattiucci y Nascetti, 2007; Mattiucci et al, 2009; Mattiucci et al, 2013; Hernández-Orts et al, 2013; Timi et al, 2014; Garbin, 2009; Garbin et al, 2013; Torres et al, 1998; Rossin et al, 2011; Navone et al, 1998; Knoff et al, 2012.

Tabla 7

a) Cebadores utilizados en la PCR para detección de anisákidos.

Cebador	Secuencia nucleotídica
Ani-9F	5' CCGCCTTAATCGCAGTGG '3
Ani-552R	5' CAATTCGCACTATTTATCGCAGC '3
CIA-Ani-9F *	5' <u>CCGCCTTAATCGCAGTGG</u> TTCAAACCCTACGTTACCGGG '3
CIA-Ani-552R *	5' <u>CAATTCGCACTATTTATCGCAGC</u> CCAGAATGCATCTTCCGTGAT '3

* Las secuencias subrayadas son idénticas a los cebadores Ani.

b) Longitud de los amplicones obtenidos en la reacción de PCR según especie de anisákido.

Especie	Longitud del amplicón
<i>A. simplex</i>	544pb
<i>P. decipiens</i>	505 pb
<i>C. osculatum</i>	601pb
<i>H. aduncum</i>	583 pb

7. Figuras

Figura 1: Ciclo biológico de parásitos anisákidos (Traducido de Levsen, 2010, modificado de S. Mattiucci) (European Food Safety Authority (EFSA), 2011)

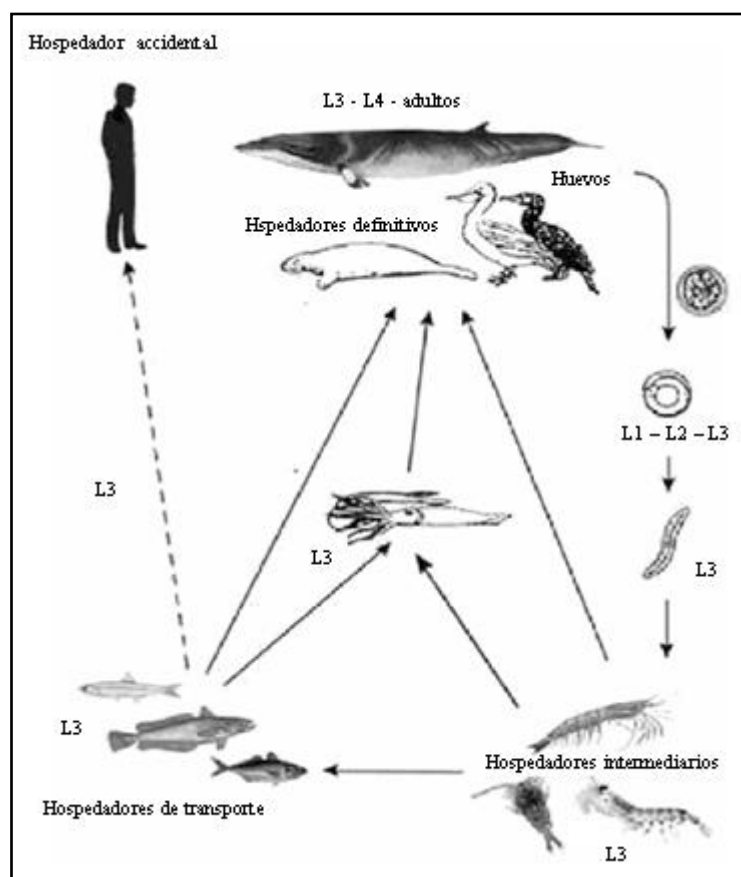
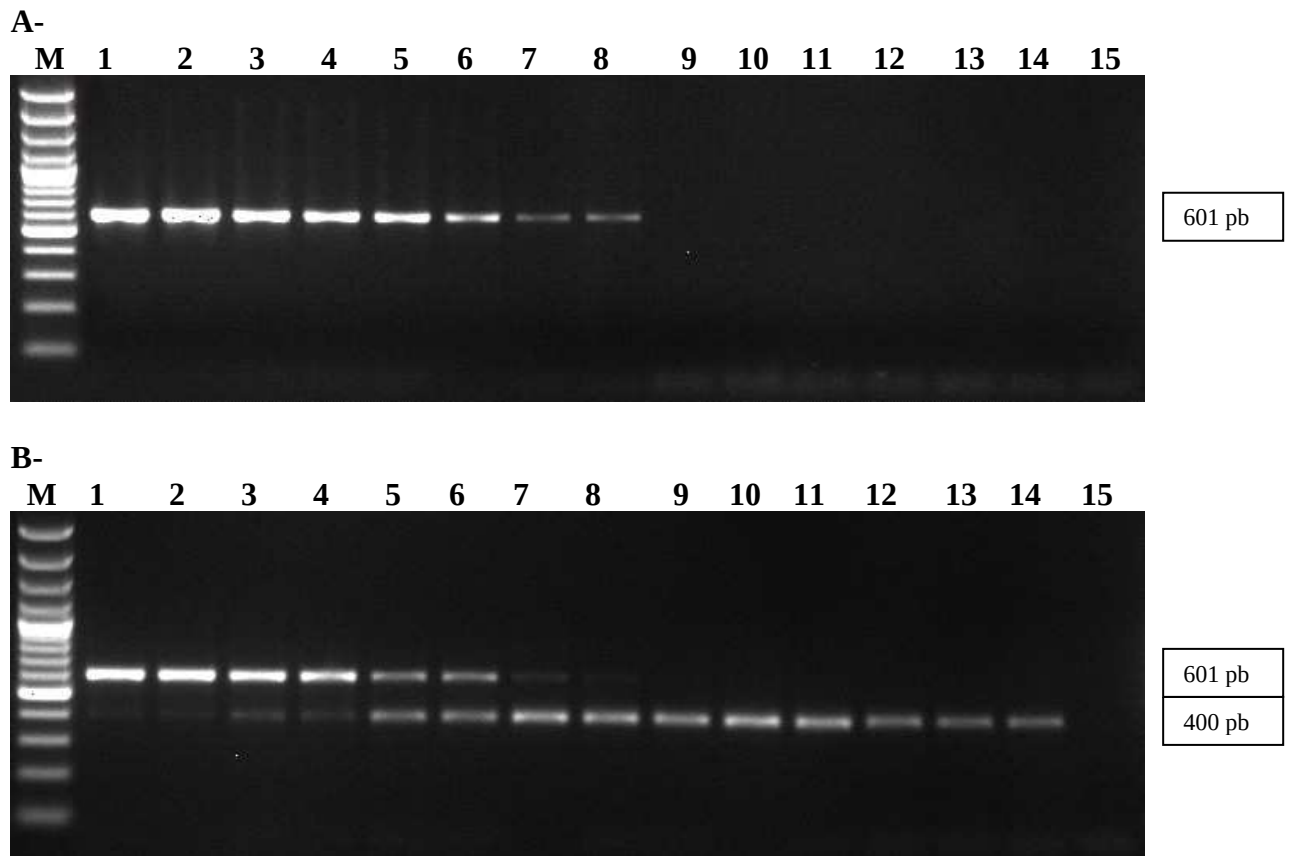


Figura 2: Alineamiento de secuencias de anisákidos obtenidas de GenBank, en la región 18S - ITS1 - 5.8S del ADN ribosomal nuclear. En amarillo se resaltan las secuencias de cebadores diseñados.

AF411202.1_A simplex	CCGCCTTAATCGCAGTGGCTTGAACCGGGCAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA
AB277824.1_P.deciapiens	CCGCCTTAATCGCAGTGGCTTGAACCGGGCAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA
AB277825.1_C.osculatum	CCGCCTTAATCGCAGTGGCTTGAACCGGGCAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA
AB277826.1_H.aduncum	CCGCCTTAATCGCAGTGGCTTGAACCGGGCAAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA
AF411202.1_A simplex	CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAAACGAAAGTCTCCCAACGTGCA
AB277824.1_P.deciapiens	CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCGAATCCAAAAACGAA--AAAGTCTCCCAACGTGCA
AB277825.1_C.osculatum	CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTAAACCAAAA--AGTCTCTTACGTGCA
AB277826.1_H.aduncum	CCTGCGGAAGGATCATTATCGAGCTAAGACTAAA--AGTCTCCGAACGTGCA
AF411202.1_A simplex	TACCTTCCATTGTCATGTTGTTGTGAGCCACATGGAAACTCGTACACACG--TGGTGGC
AB277824.1_P.deciapiens	TACCATCCATTGTCATGTTGTTGTGAGCCACATAGAACTCATACACGTG--TGGTGGC
AB277825.1_C.osculatum	TAAATTCCATTGTCGTAATCGTGAGCCATGCATCAAGCCATACACATG--TGGTGGC
AB277826.1_H.aduncum	TGCCCTTCATATGCGCGTATACGTGAGCCGACAGTGAGCTGCACACATGCGGTGCGTGT
AF411202.1_A simplex	AGCCGTCTGCTGTGCTTTTITAGGCAGACAATGGCTTACGAGTGGCCGTGTGCTTGTG
AB277824.1_P.deciapiens	AGCCGTCTGATGTGCTTTATC--GTGCAGACAATGGCTTATGAGTGGCTGTGTGATTGTTG
AB277825.1_C.osculatum	AGCCGTCCGCTGT--TTTGT--GGCAGACAATGGCTT--TGGCTTGATGTGTGATGAGGG
AB277826.1_H.aduncum	GGCGCTCAGCGTGTGTTTTT--GGCAGACAATGGTCTGTAGCTTGTGTGTTGAGGG
AF411202.1_A simplex	AACAACGGTGACCAATTTGGCGTC--TACGCCGTATCTAGCTTCTGCGCTGGAC
AB277824.1_P.deciapiens	AACAACGGTGACCAATTTGGCGTC--TACGCCGTATCTAGCTTCTGCGCTGGAC
AB277825.1_C.osculatum	GAAGTGAGTGACCTGATATGCTTG--AAAGGCAGGTGATTGC--GCTCGTTTCTCTGT
AB277826.1_H.aduncum	GGGATAGGTGACGTATTGGGCTAGTTAGAAAGGTACGCCGCGAGC--GCCTATCCTCTCTGT
AF411202.1_A simplex	CGTCAGTTGCGATGAAA--GATGCGGAGAAAAGTTCCT--TTGTTTTGGCTGC
AB277824.1_P.deciapiens	CGTCGGTAGCGATGAAA--GATGCGGAGGAAAGTTCCT--CTGTTTTGG--
AB277825.1_C.osculatum	TATTGCTAACAAACGGTATGCTATTGGCGTCTACGCCGTAGCTATTGGCTGGACCGT
AB277826.1_H.aduncum	TATTGGCAAAAACGGTATCCATTGCTGTCTACACCCTACCTAGCTACTGCTGGAACCGT
AF411202.1_A simplex	TAATCATCATTGATGA--GCAGTAGCTTAAGGCAGA--GTTGAGCAGACTTA
AB277824.1_P.deciapiens	---TACGCTAAAGCAGA--GTTGAGCAGACTTA
AB277825.1_C.osculatum	CGATAGCAATGAAAGGTGCGGAGAAAGTTCCTCATTAT--GAGTTGAGCAGACTTA
AB277826.1_H.aduncum	CGGTAGCTATCAAAGGTGGGATAAAGCTCCTCGTCTTTACGGCGAGTCGAGTAGACTTA
AF411202.1_A simplex	ATGAGCCAC-GCTAGGTGGCGCCAAAACCCAAAACACAACCGGTC--TATTTGACATT
AB277824.1_P.deciapiens	ATGAGCCAC-GCTTGGTGGCGCCAAAACCCAAAACACAACCGATC--TATTT--TAAC
AB277825.1_C.osculatum	ATGAGCCCT-GCAAGAGGGCGCCAAAACCCAAAACACAACCATTTCTTTATTTTATA
AB277826.1_H.aduncum	ATGAGTCTCAGCGAGGAGGCCACCAAAAACCCAAAACACAACCGATCTTTTGTGTTGAAAT
AF411202.1_A simplex	GTTA--T--TTCATTGT--ATGTGTTGA--
AB277824.1_P.deciapiens	GTT--TGTG--ATATGTT--
AB277825.1_C.osculatum	GTTGATCGGTAAATCGAGGTGTTCTGTTATCTGACAACATGTGGTTGTGCGATGCGGATGTC
AB277826.1_H.aduncum	GTTG--TGAAGGTACTTCT--CGTGTGT--GCC
AF411202.1_A simplex	---A--AATG--TACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTCTGTTGGATCGATGAAG
AB277824.1_P.deciapiens	---AATG--TACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTCTGTTGGATCGATGAAG
AB277825.1_C.osculatum	TTGTTGAATCGTTAACTACAAATCTTGGCGGTGGATCACTCGGTTCTGTTGGATCGATGAAG
AB277826.1_H.aduncum	TT--TGA AAC--TGAGTATAAATCTTAGCGGTGGATCACTCGGTTCTGTTGGATCGATGAAG
AF411202.1_A simplex	AACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTG
AB277824.1_P.deciapiens	AACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTG
AB277825.1_C.osculatum	AACGCAGCCAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTG
AB277826.1_H.aduncum	AACGCAGCTAGCTGCGATAAATAGTGCGAATTG

Figura 3: Sensibilidad de la PCR para la detección de ADN de *Contracaecum osculatum*

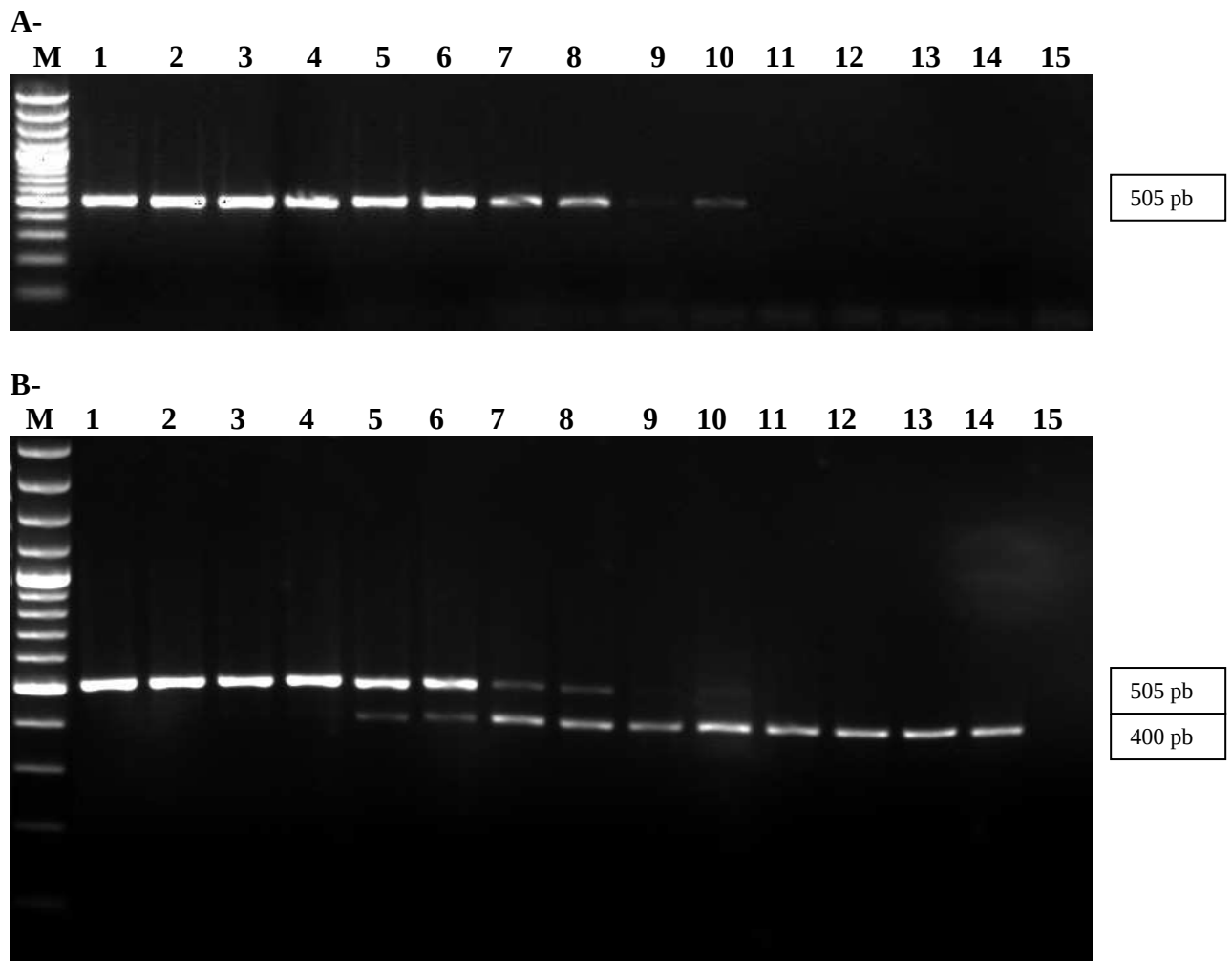


C. osculatum y el control interno de amplificación (CIA) producen amplicones de 601 pb y 400 pb respectivamente.

A: PCR sin 100 copias de CIA. **Calle M:** marcador de tamaño molecular de 100 pb. **Calles 1 a 14:** la concentración de ADN por ensayo duplicado, respectivamente: 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 5 fg. **Calle 15:** control negativo.

B: PCR con 100 copias de CIA. **Calle M:** marcador de tamaño molecular de 100 pb. **Calles 1 a 14:** la concentración de ADN por ensayo duplicado, respectivamente: 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 5 fg. **Calle 15:** control negativo.

Figura 4: Sensibilidad de la PCR para la detección de ADN de *Pseudoterranova cattani*

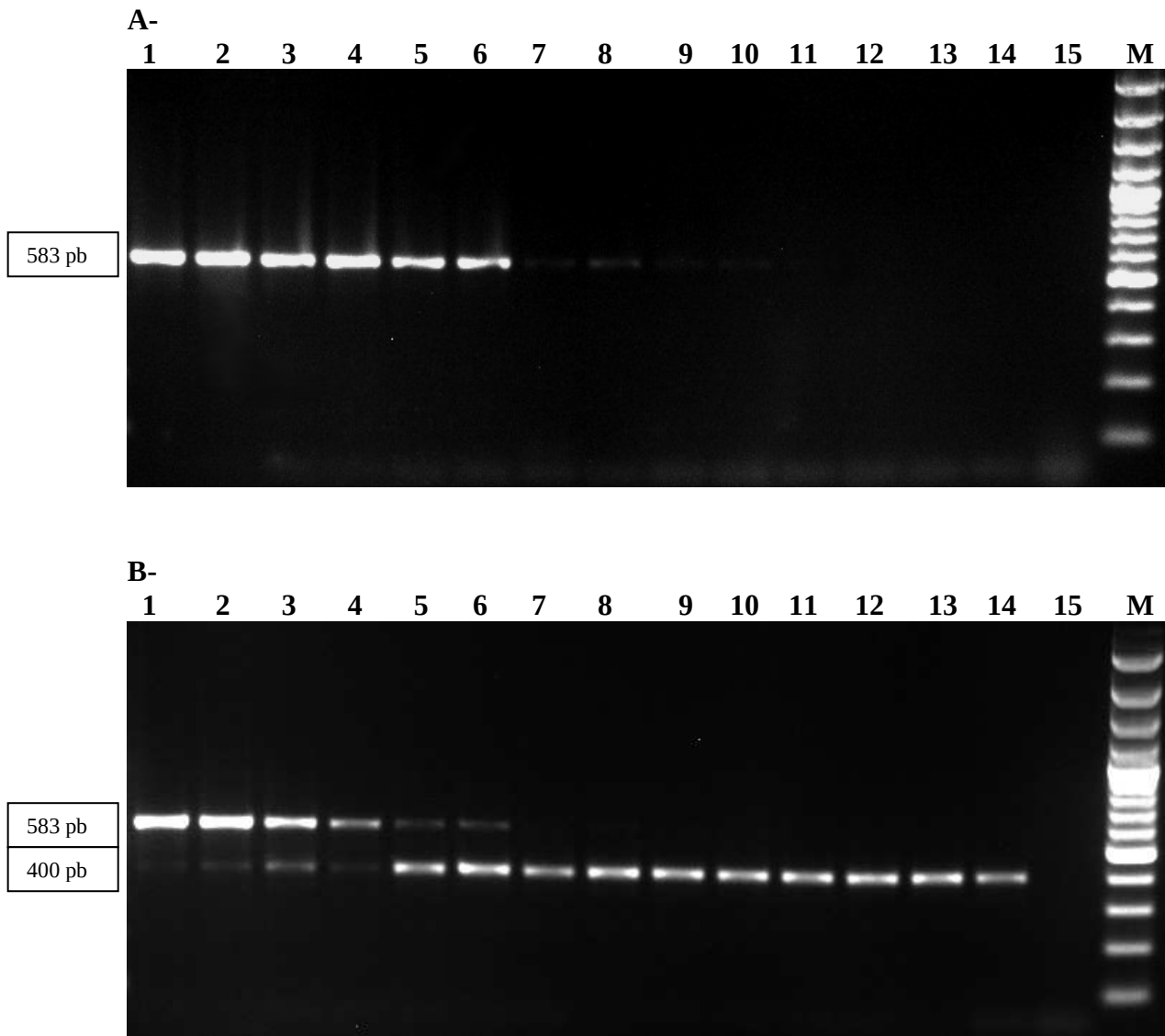


P. cattani y el control interno de amplificación (CIA) producen amplicones de 505 pb y 400 pb respectivamente.

A: PCR sin 100 copias de CIA. **Calle M:** marcador de tamaño molecular de 100 pb. **Calles 1 a 14:** la concentración de ADN por ensayo duplicado, respectivamente: 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 5 fg. **Calle 15:** control negativo.

B: PCR con 100 copias de CIA. **Calle M:** marcador de tamaño molecular de 100 pb. **Calles 1 a 14:** la concentración de ADN por ensayo duplicado, respectivamente: 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 5 fg. **Calle 15:** control negativo.

Figura 5: Sensibilidad de la PCR para la detección de ADN de *Hysterothylacium aduncum*

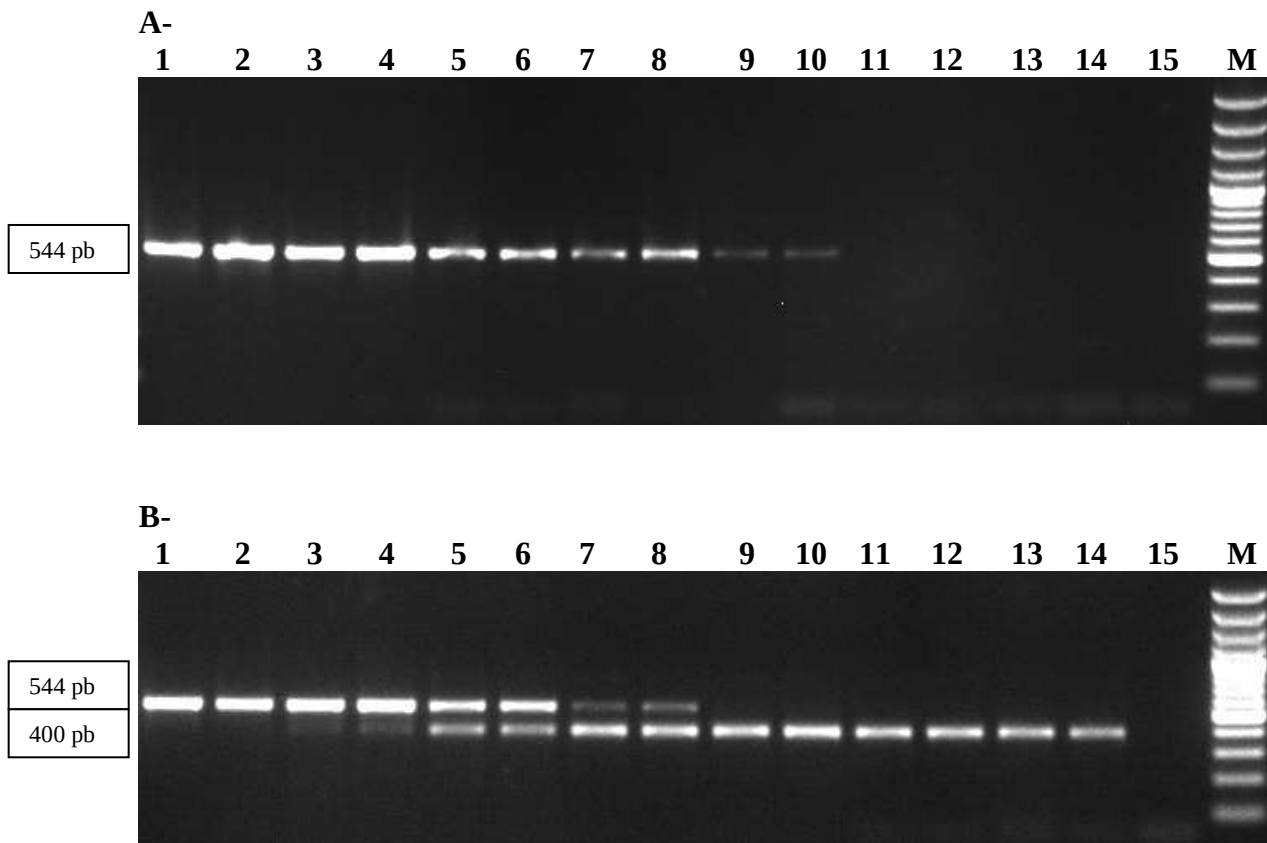


H. aduncum y el control interno de amplificación (CIA) producen amplicones de 583 pb y 400 pb respectivamente.

A: PCR sin 100 copias de CIA. **Calle M:** marcador de tamaño molecular de 100 pb. **Calles 1 a 14:** la concentración de ADN por ensayo duplicado, respectivamente: 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 5 fg. **Calle 15:** control negativo.

B: PCR con 100 copias de CIA. **Calle M:** marcador de tamaño molecular de 100 pb. **Calles 1 a 14:** la concentración de ADN por ensayo duplicado, respectivamente: 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 5 fg. **Calle 15:** control negativo.

Figura 6: Sensibilidad de la PCR para la detección de ADN de *Anisakis pegreffii*

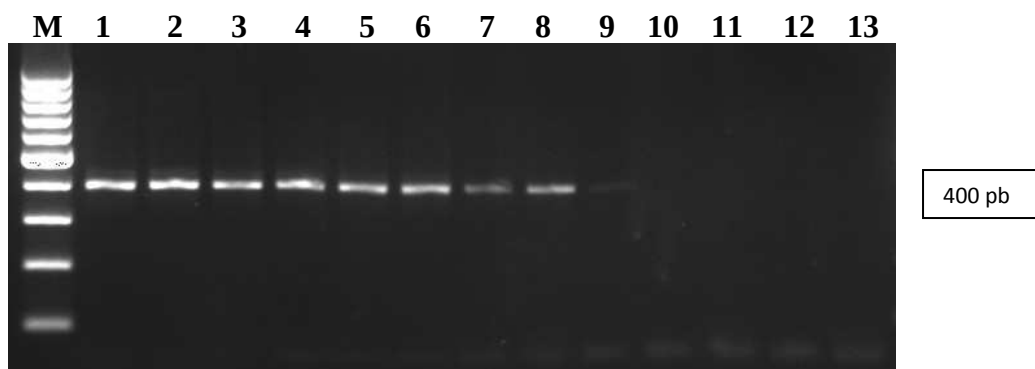


A. pegreffii y el control interno de amplificación (CIA) producen amplicones de 544 pb y 400 pb respectivamente.

A: PCR sin 100 copias de CIA. **Calle M:** marcador de tamaño molecular de 100 pb.
Calles 1 a 14: la concentración de ADN por ensayo duplicado, respectivamente: 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 5 fg. **Calle 15:** control negativo.

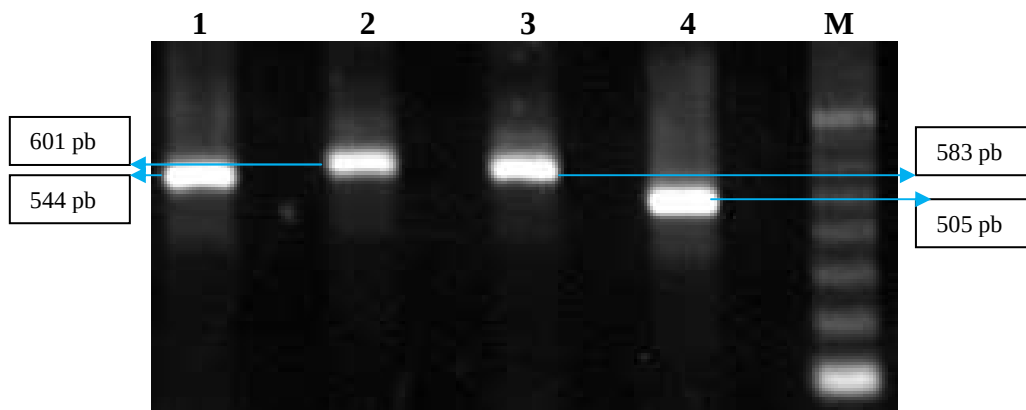
B: PCR con 100 copias de CIA. **Calle M:** marcador de tamaño molecular de 100 pb.
Calles 1 a 14: la concentración de ADN por ensayo duplicado, respectivamente: 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 500 fg, 50 fg, 5 fg. **Calle 15:** control negativo.

Figura 7: Sensibilidad de la PCR para la detección de ADN del Control interno de amplificación (CIA).



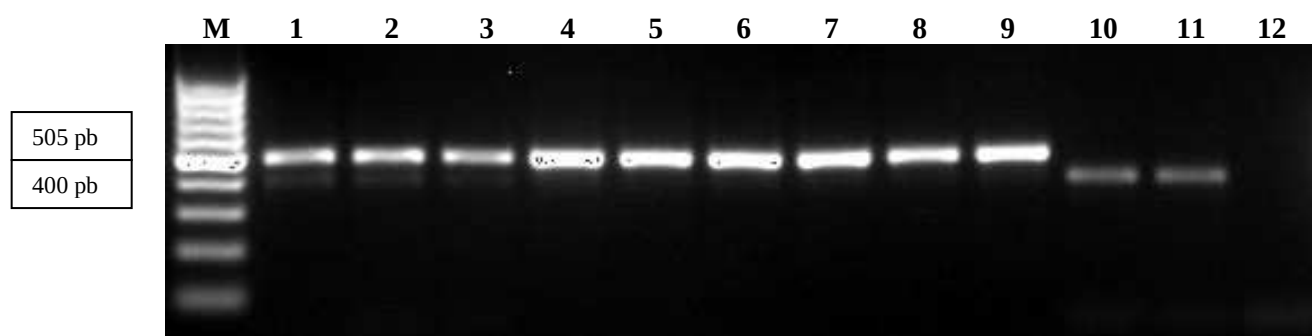
Calle M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. **Calles 1 a 12:** el número de copias de ADN de CIA por ensayo duplicado, respectivamente: 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1, 0,1. **Calle 13:** control negativo.

Figura 8: PCR para la detección de Anisákidos de interés sanitario.



Fragmentos de distinto tamaño obtenidos por amplificación de la región ITS1 de *Anisakis* sp., *Contracaecum* sp., *Hysterothylacium* sp. y *Pseudoterranova* sp. (calles 1 a 4 respectivamente) Calle M: marcador de tamaño molecular de 100 pb.

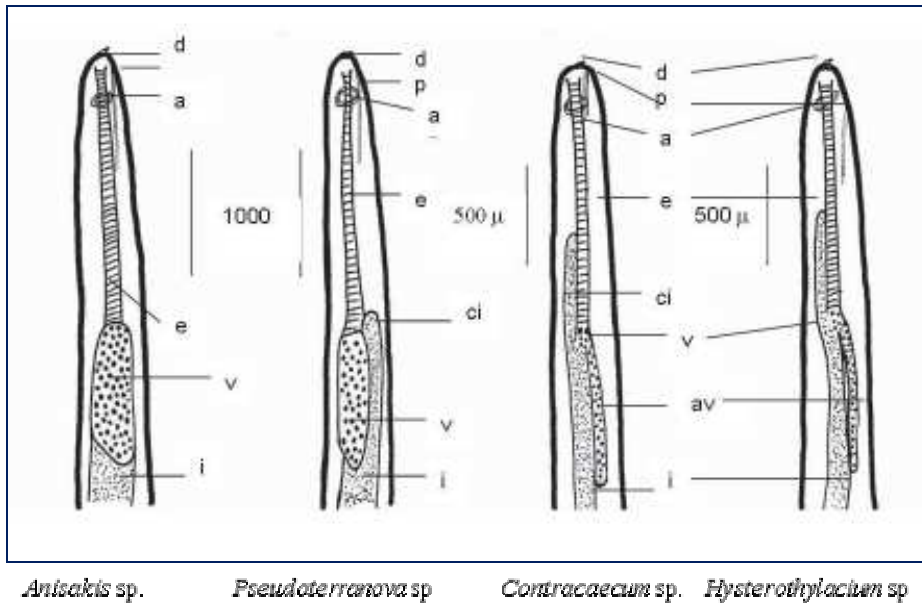
Figura 9: PCR para la identificación de anisákidos en muestras enviadas para su identificación



Las bandas de 505 pb y 400 pb corresponden a *Pseudoterranova cattani* y el control interno de amplificación (CIA), respectivamente.

Calle M: marcador de tamaño molecular de 100 pb. Calles 1 a 3: ADN de larva procedente de infección humana, calles 4 a 6: ADN de larva en filetes de mero crudos recién comprados, calles 7 a 9: ADN de larva en brótola poco cocida, calles 10 y 11: ADN de CIA sin ADN de parásito en la mezcla de reacción, calle 12: control negativo.

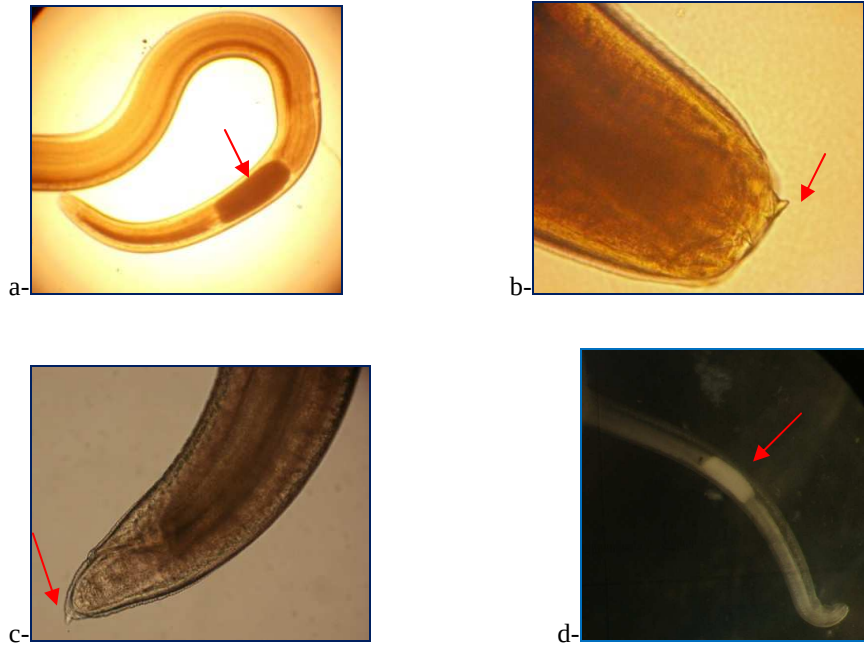
Figura 10: Características diferenciales del extremo anterior de anisákidos.



a: anillo nervioso; d: diente; p: poro excretor; e: esófago; ci: ciego intestinal; v: ventrículo; av: apéndice ventricular; i: intestino

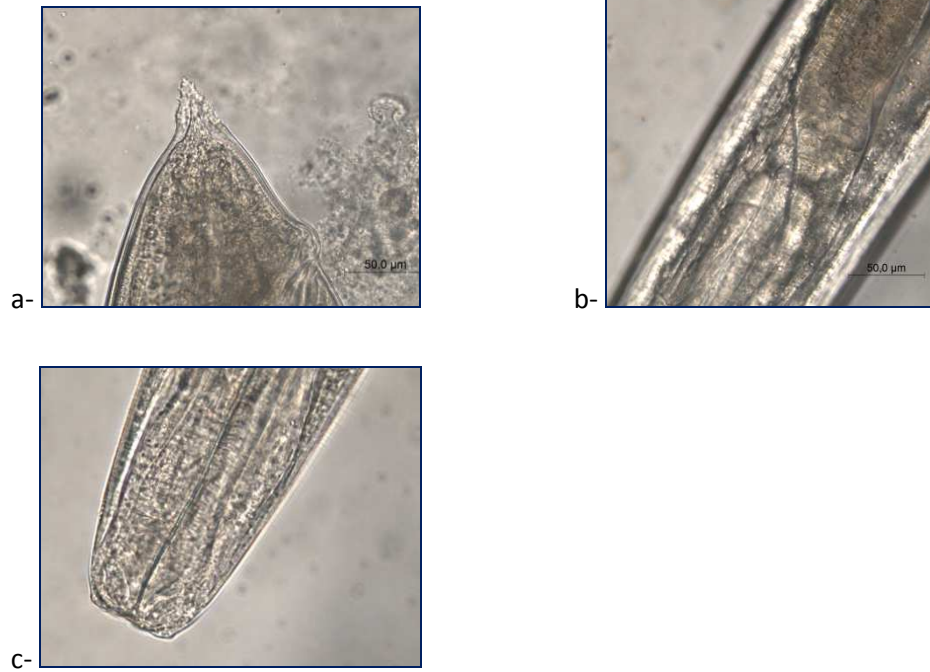
Fuente: Yubero et al, 2004

Figura 11: Larva de *Anisakis* sp



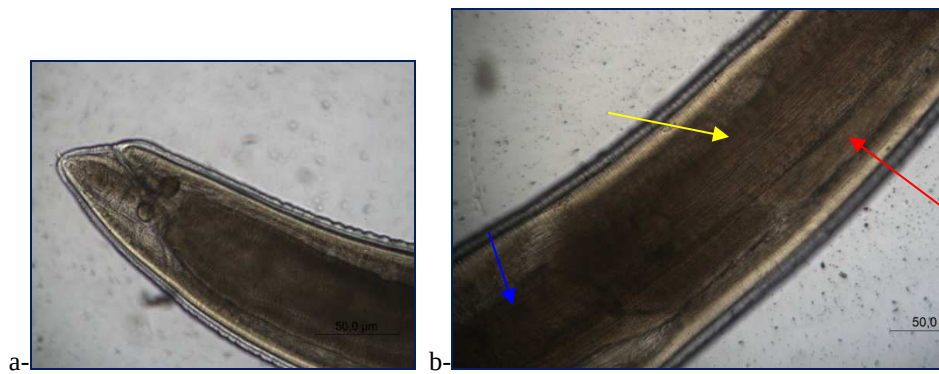
a: Extremo anterior (la flecha indica un ventrículo voluminoso), b: extremo anterior (la flecha indica el diente perforante), c: cola (la flecha indica el mucrón), d: extremo anterior visto con lupa binocular (la flecha indica un ventrículo voluminoso).

Figura 12: Larva de *Hysterothylacium* sp



a-: Cola, b: ventrículo-ciego intestinal-apéndice ventricular, c: extremo anterior.

Figura 13: Larva de *Pseudoterranova* sp



a: Cola; b: Intestino (flecha azul), ventrículo (flecha amarilla), ciego intestinal (flecha roja).

Figura 14: Larva de *Contracaecum* sp (cola)



8. Referencias bibliográficas

Abollo, E., Pascual, S., 2001. Element concentration variability in the whaleworm *Anisakis simplex* s.l. *Parasitology international* 50, 115–119.

AESAN, 2007. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de *Anisakis*. *Revista del Comité Científico de la AESAN* 6, 59–65.

Berland, B., 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2, 1-50.

Berland, 1984. Basic techniques involved in helminth preservation. *Systematic Parasitology* 6, 242-245

Berland, B., 1989. Identification of larval nematodes from fish, p.16-22. In: *Nematode problems in north Atlantic fish*, Moller, H. (ed.). Report from a workshop in Kiel, 3-4 April 1989. International Council for the Exploration of the Sea, C. M./F: 6, p. 16-22.

Berón- Vera, B., Pedraza, S.N., Raga, J.A., Gil de Pertierra, A., Crespo, E.A., Koen Alonso, M., Goodall, R.N.P., 2001. Gastrointestinal helminths of Commerson's dolphins *Cephalorhynchus commersonii* from central Patagonia and Tierra del Fuego. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 201–208.

Biolé, F.G., Guagliardo, S.E., Mancini, M.A., Tanzola, R.D., Salinas, V., Morra, G., 2012. Primer registro de *Contracaecum australe* (nematoda: anisakidae) en *Phalacrocorax brasilianus* (aves: phalacrocoracidae) de la región central de Argentina. *Bioscriba* 5, 1–11.

Borges, J.N., Cunha, L.F.G., Santos, H.L.C., Monteiro-Neto, C., Santos, C.P., 2012. Morphological and Molecular Diagnosis of Anisakid Nematode Larvae from Cutlassfish (*Trichiurus lepturus*) off the Coast of Rio de Janeiro, Brazil. *Plos ONE* 7, e40447. Doi:10.1371/journal.pone.0040447.

Butt, A.A., Aldridge, K.E., Sander, C.V., 2004. Infections related to the ingestion of seafood. Part II: parasitic infections and food safety. *The Lancet infectious diseases* 4, 294–300.

Cabrera, R., Trillo-Altamirano, M., 2004. Anisakidosis: ¿Una zoonosis parasitaria marina desconocida o emergente en el Perú? *Rev. Gastroenterol. Perú*, 24, 335-342.

Cheng, T.C. 1982. Anisakiasis. In: Steele JH, editor. *CRC handbook series in zoonoses*. Section C: parasitic zoonoses. Boca Raton: CRC Press. 2 pp. 37-54.

D'Amelio, S., Cavallero, S., Busi, M., Ingrosso, S., Giuffra, E., Farjallah, S., Costa, G., 2013. *Anisakis*, in: *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*. CRC Press

Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742, pp. 485–496.

Dangoudoubiyam, S., Vemulapalli R, Kazacos KR., 2009. PCR assays for detection of *Baylisascaris procyonis* eggs and larvae. *J Parasitol* 95, 571-7. Doi: 10.1645/GE-1905.1.

Diario El Mundo de España, 2014. España, Euskadi: La Osakidetza detecta 70 casos de anisakiosis en los dos últimos meses. *Reporte Epidemiológico de Córdoba*. Número 1.380 11–12.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2010. Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal* 8, 1543. [91 pp.]. Doi:10.2903.

Fagerholm, H.P 1991. Systematic implications of male caudal morphology in ascaridoid nematode parasites. *Syst. Parasitol.* 19,215.

FDA Food and Drug Administration, 2012. *Anisakis simplex* and related worms, in: *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Pp. 149–151.

Felizardo, NN, Knoff, M, Pinto, RM & Gomes, DC. 2009. Larval anisakid nematodes of the flounder, *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) from Brazil. *Neotropical Helminthology* 3, 57- 64.

Fernández de Corres, L. et al., 1996. *Anisakis simplex* induces not only anisakiasis: Report n 28 cases of allergy caused by this nematode. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 6, 315.

Foran D.R., 2006. Relative Degradation of Nuclear and Mitochondrial DNA: An Experimental Approach. *J Forensic Sci*, 51, 766-770.

Garbin, L.E., 2009. Taxonomía y evaluación de la especificidad hospedatoria de nematodos Anisakidae parásitos de aves marinas en el área de Península Valdés, Chubut, Argentina. (Resumen de tesis doctoral). Universidad Nacional de La Plata., Facultad de Ciencias Naturales y Museo.

Garbin, L.E., Mattiucci, S., Paoletti, M., Diaz, J.I., Nascetti, G., Navone, G.T., 2013. Molecular identification and larval morphological description of *Contracaecum pelagicum* (Nematoda: Anisakidae) from the anchovy *Engraulis anchoita* (Engraulidae) and fish-eating birds from the Argentine North Patagonian Sea. *Parasitology International* 62, 309–319. Doi:10.1016/j.parint.2013.03.001.

Gregory, J.B., Litaker, R.W., Noble, R.T., 2006. Rapid One-Step Quantitative Reverse Transcriptase PCR Assay with Competitive Internal Positive Control for Detection of

Enteroviruses in Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3960–3967. Doi:10.1128/AEM.02291-05.

Guagliardo, S.E., De Salvo, M.N., Schwerdt, C.B., Galeano, N.A., Tanzola, R.D., San Juan, U.B.B.A., 2009. Anisákidos del savorín, *Seriolla porosa* (Pisces: Centrolophidae). Análisis de la interacción parasito-hospedador. *Bioscriba* 2, 106–114.

Hartl D & Ruvolo. M., *Molecular Organization and Genomes*, in *Genetics Analysis of genes and genomes*, Jones & Bartlett Learning; 8° edición, 2012. 226-255.

Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M., Visvanathan, C., Nol, C., Furumai, H., 2011. Validation of Internal Controls for Extraction and Amplification of Nucleic Acids from Enteric Viruses in Water Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4336–4343. Doi:10.1128/AEM.00077-11.

Hernández-Orts, J.S., Aznar, F.J., Blasco-Costa, I., García, N.A., Vállora-Montero, M., Crespo, E.A., Raga, J.A., Montero, F.E., 2013. Description, microhabitat selection and infection patterns of sealworm larvae (*Pseudoterranova decipiens* species complex, nematoda: ascaridoidea) in fishes from Patagonia, Argentina. *Parasites & vectors* 6, 252.

Hernández-Orts, J.S., Montero, F.E., Juan-García, A., García, N.A., Crespo, E.A., Raga, J.A., Aznar, F.J., 2013. Intestinal helminth fauna of the South American sea lion *Otaria flavescens* and fur seal *Arctocephalus australis* from northern Patagonia, Argentina. *J. Helminthol.* 87, 336–347. Doi:10.1017/S0022149X12000454.

Herranz-Bachiller, M.T., Atienza-Sánchez, R., Barrio-Andrés, J., Alcaide-Suárez, N., Ruiz-Zorrilla, R., Sancho-del-Val, L., de-la-Serna-Higuera, C., Pérez-Miranda, M., 2012. Pólipo de colon secundario a *Anisakis simplex*. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 104, 554–555.

Hochberg, N.S., Hamer, D.H., 2010. Anisakidosis: Perils of the Deep. *Clinical Infectious Diseases* 51, 806–812. Doi:10.1086/656238.

Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., Fach, P., 2004. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 1863–1868. Doi:10.1128/JCM.42.5.1863-1868.2004.

Hutler Wolkowicz, I.R., 2008. Identificación molecular de aislamientos de *Anisakis* sp en peces destinados a consumo humano en Argentina (Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas). CAECE, INEI ANLIS Malbrán.

Hwang, D., Park, S.I., Pack, S.C., Lee, K.S., Choi, S.K., Kang, H., Park, C.W., Lee, S., 2012. A Case of Duodenal Anisakiasis with Duodenal Ulcer. *Chonnam Medical Journal* 48, 73–75. Doi:10.4068/cmj.2012.48.1.73.

Ishikura, H., Kikuchi, Y., and Hayasaka, 1967H. Pathological and clinical observation on intestinal anisakiasis. *Arch. Jpn. Chir.* 36, 663-679.

Jabbar, A., Fong, R.W.J., Kok, K.X., Lopata, A.L., Gasser, R.B., Beveridge, I., 2013. Molecular characterization of anisakid nematode larvae from 13 species of fish from Western Australia. *International Journal of Food Microbiology* 161, 247–253. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.012.

Kim, J., Jo, J.O., Choi, S.H., Cho, M.K., Yu, H.S., Cha, H.J., Ock, M., 2011. Seroprevalence of Antibodies against *Anisakis simplex* Larvae among Health-Examined Residents in Three Hospitals of Southern Parts of Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 49, 139–144. Doi:10.3347/kjp.2011.49.2.139.

Knoff, M., Felizardo, N.N., Iñiguez, A.M., Maldonado Jr, A., Torres, E.J.L., Pinto, R.M., Gomes, D.C., 2012. Genetic and morphological characterisation of a new species of the genus *Hysterothylacium* (Nematoda) from *Paralichthys isosceles* Jordan, 1890 (Pisces: Teleostei) of the Neotropical Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 107, 186–193.

Knoff, M., São Clemente, S.C. de, Pinto, R.M., Gomes, D.C., 2001. Nematodes of elasmobranch fishes from the southern coast of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 81–87.

Koinari, M., Karl, S., Elliot, A., Ryan, U., Lymbery, A.J., 2013. Identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) in marine fish hosts from Papua New Guinea. *Veterinary Parasitology* 193, 126–133. Doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.008.

La Rosa, G., Stefano, D.A., Pozio, E., 2006. Molecular Identification of Nematode Worms From Seafood (*Anisakis* spp. And *Pseudoterranova* spp.) And Meat (*Trichinella* spp.), in: *Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols*. Springer Science & Business Media, p. 267.

Labreuche, Y., Pallandre, L., Ansquer, D., Herlin, J., Wapotre, B., Le Roux, F., 2012. Pathotyping of *Vibrio* Isolates by Multiplex PCR Reveals a Risk of Virulent Strain Spreading in New Caledonian Shrimp Farms. *Microbial Ecology* 63, 127–138. Doi:10.1007/s00248-011-9951-3.

Lanfranchi, A.L., Sardella, N.H., 2010. Anisakids Survival after Microwaving, Freezing and Salting Fish from Argentina. *Food Sci. Technol. Res.* 16, 499–504.

Liu, B., Zhou, X., Zhang, L., Liu, W., Dan, X., Shi, C., Shi, X., 2012. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis. *Food Control* 27, 87–93. Doi:10.1016/j.foodcont.2012.01.062.

Malagón Martínez, D., 2007. Evolución de la actividad proteasa y de la fijación de CO₂ durante el desarrollo in vitro de *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae), parásito de peces (Tesis doctoral). Universidad de Granada, Facultad de farmacia. Departamento de parasitología.

Manfredi, M.T., Crosa, G., Galli, P., Ganduglia, S., 2000. Distribution of *Anisakis simplex* in fish caught in the Ligurian Sea. *Parasitology research* 86, 551–553.

Mattiucci S1, Nascetti G., 2007. Genetic diversity and infection levels of anisakid nematodes parasitic in fish and marine mammals from Boreal and Austral hemispheres. *Vet Parasitol* 148, 43–57.

Mattiucci S1, Paggi L, Nascetti G, Portes Santos C, Costa G, Di Benedetto AP, Ramos R, Argyrou M, Cianchi R, Bullini L., 2002. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Syst Parasitol* 51, 159–70.

Mattiucci, S., Paoletti, M., Borrini, F., Palumbo, M., Palmieri, R.M., Gomes, V., Casati, A., Nascetti, G., 2011. First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC infectious diseases* 11, 82.

Mattiucci, S., Paoletti, M., Webb, S.C., 2009. *Anisakis nascettii* n. Sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology* 74, 199–217. Doi:10.1007/s11230-009-9212-8.

Mattiucci, S., Paoletti, M., Webb, S.C., Nascetti, G., 2013. *Pseudoterranova* and *Contracaecum*, in: *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*. CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742, pp. 645–654.

Menghi, C.I., Comunale, E., Gatta, C.L., 2011. Anisakiosis: primer diagnóstico en Buenos Aires, Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 31, 71–73.

Mercado, R., Torres, P. Maira, J., 1997. Human case of gastric infection by a fourth larval stage of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae). *Rev. Saude Publica* 31, 178-81

- Mercado, R. Torres, P., Muñoz V., Apt W., 2001 Human infection by *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) in Chile: Report of seven cases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 653-655.
- Merino L.A., Giusiano,G., 2011. Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos, 1st ed. Asoc. Argentina de Microbiología, Buenos Aires.
- Moller, H., Anders, K. 1986. Diseases and parasites of marine fishes. Edit. Verlag Moller, Kiel, 365 pp.
- Moneo, I., Caballero, M. L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A. I., Rodríguez-Perez, R., and Silva, A. 2005. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res.* 96, 285-289.
- Moraes, C.T. 2001. What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *Trends Genet.* 17, 199–205.
- Moschella, C.M., Mattiucci, S., Mingazzini, P., Mongardini, M., Chein, A., Miccolis, D., Modini, C. 2005. Intestinal anisakiasis in Italy: A case treated by emergency surgery. *G. Chir.* 26, 201- 205.
- Myers, B.J. 1975. The nematodes that cause anisakiasis. *Journal of Milk and Food Technology.* 38, 774-782.
- Nadler, S.A., Hudspeth, D.S.S., 2000. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) Based on Three Genes and Morphology: Hypotheses of Structural and Sequence Evolution. *The Journal of Parasitology* 86, 380. Doi:10.2307/3284785.
- Naoki Arizono, Toshiyuki Miura, Minoru Yamada, Tatsuya Tegoshi, and Kotaro Onishi, 2011. Human Infection with *Pseudoterranova azarasi* Roundworm. *Emerging Infectious Diseases* 17, 555–556. Doi:10.3201/eid1703.101350.
- Nascetti, G., Cianchi, R., Mattiucci, S., et al. 1993. Three sibling species within *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic-Boreal region: Reproductive isolation and host preferences. *Int. J. Parasitol.* 23, 105-120.
- Navone, G., Sardella, N.H., Timi, J.T., 1998. Larvae and adults of *Hysterothylacium aduncum* (rudolphi, 1802) (nematoda: anisakidae) in fishes And crustaceans in the south west atlantic. *Parasite* 5, 127–136.
- Ohtaki, H., and Ohtaki, R. Clinical manifestation of gastric anisakiasis. In: Ishikura, H., and Namiki, M. (eds), *Gastric Anisakiasis in Japan*, Springer-Verlag, Tokyo, p. 37, 1989.

Olivero Verbel, J., Baldiris Avila, R., 2008. Parásitos en peces colombianos: Están enfermando nuestros ecosistemas? 1st ed. Universidad de Cartagena, Cartagena. Colombia.

Olson, A.C., Lewis, M.D., Hauser, M.L. 1983. Proper identification of anisakine Worms. The American Journal of Medical Technology. 49, 111-114.

Orecchia, P., Mattiucci, S., D'Amelio, S., Paggi, L., Plötz J., Cianchi, R., Nascetti, G., Arduino, P. and Bullini, L. 1994. Two new members in the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda, Ascaridoidea) from the Antarctic. Int. J. Parasitol. 24, 367-377.

Osanz Mur, A.C., 2001. Presencia de larvas de anisákidos (Nematoda: Ascaridoidea) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria, Bellaterra.

Paggi, L., Nascetti, G., Webb, S. C., Mattiucci, S., Cianchi, R., Bullini, L. 1998. A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales (Ziphiidae): Allozyme and morphological evidence. Syst. Parasitol. 40, 161-174.

Pérez Harguindeguy, G., Ballesteros, F., n.d. Pautas y recomendaciones del SENASA. Consumo responsable de productos de la pesca y la acuicultura.

Proteomics, 2014. España: Identifican 28 nuevos alérgenos potenciales en *Anisakis*. Reporte Epidemiológico de Córdoba. Número 1.375 6–7.

Quijada, J., Lima, C., Avdalov, N., n.d. Enfermedades parasitarias por consumo de pescado. Incidencia en América Latina. Infopesca internacional 24, 16–23.

Real Decreto 1420/2006 Ministerio de sanidad y consumo, 2006., de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por anisakis en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades. BOE (Boletín oficial del Estado Español) 44547–44549.

Rodriguez-Lazaro, D., Pla, M., Scotti, M., Monzo, H.J., Vazquez-Boland, J.A., 2005. A Novel Real-Time PCR for *Listeria monocytogenes* That Monitors Analytical Performance via an Internal Amplification Control. Applied and Environmental Microbiology 71, 9008–9012. Doi:10.1128/AEM.71.12.9008-9012.2005.

Rosales, M., Mascaró C, Fernández C, Luque F, Sánchez-Moreno M, Parras L, et al. 1999. Acute intestinal anisakiasis in Spain: A fourth stage *Anisakis simplex* larva. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94, 823-826.

Rossin, M.A., Datri, L.L., Incorvaia, I.S., Timi, J.T., 2011. A new species of *Hysterothylacium* (Ascaridoidea, Anisakidae) parasitic in *Zenopsis conchifer*

(Zeiformes, Zeidae) from Argentinean waters. *Acta Parasitologica* 56, 310–314. Doi:10.2478/s11686-011-0062-6.

Sakanari, J.A., mckerrow, J.H., 1989. Anisakiasis. *Clinical microbiology reviews* 2, 278–284.

Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Rapid isolation of Mammalian DNA, in: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. P. 6.28.

Sardella, N.H., Timi, J.T., 2004. Parasites of Argentine hake in the Argentine Sea: population and infracommunity structure as evidence for host stock discrimination. *Journal of Fish Biology* 65, 1472–1488.

Shamsi S. Y Butcher A.R. 2011. First records of human anisakidosis in Australia. *Medical Journal of Australia* 194, 199-200.

Shibata, O., Uchida, Y., and Furusawa, T. Acute gastric anisakiasis with special analysis of the location of the worms penetrating the gastric mucosa. In: Ishikura, H., and Namiki, M. (eds) *Gastric Anisakiasis in Japan* Springer-Verlag, Tokyo, p. 53, 1989.

Shimakura K, Miura H, Ikeda K, Ishizaki S, Nagashima Y, Shirai T, Kasuya S, Shiomi K. 2004. Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135, 69-75.

Smrzlić, I., Valić, D., Kapetanović, D., Kurtović, B., Teskeredžić, E., 2012. Molecular characterisation of Anisakidae larvae from fish in Adriatic Sea. *Parasitology Research* 111, 2385–2391. Doi:10.1007/s00436-012-3094-4.

Tantaleán V.M., 1972. La presencia de larvas de *Anisakis* sp. En algunos peces comerciales del mar peruano. *Rev Per Med Trop UNMSM*; 1, 38-43.

Tanzola, D.R., Guagliardo, S.E., 2008. Anisakidosis, in: *Parasitosis regionales: un estudio referido a las principales parasitosis de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, Argentina*. Editorial de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, pp. 273–278.

Tanzola, R.D., 2011. La migración larval: clave para el desarrollo de anisakidosis humana., in: *Temas de Zoonosis*. Asociación Argentina de Zoonosis, pp. 415–419.

Timi, J.T., 2007. Parasites as biological tags for stock discrimination in marine fish from South American Atlantic waters. *J. Helminthol.* 81, 107–111. Doi:10.1017/S0022149X07726561.

Timi, J.T., Paoletti, M., Cimmaruta, R., Lanfranchi, A.L., Alarcos, A.J., Garbin, L., George-Nascimento, M., Rodríguez, D.H., Giardino, G.V., Mattiucci, S., 2014.

Molecular identification, morphological characterization and new insights into the ecology of larval *Pseudoterranova cattani* in fishes from the Argentine coast with its differentiation from the Antarctic species, *P. Decipiens* sp. E (Nematoda: Anisakidae). *Veterinary Parasitology* 199, 59–72. Doi:10.1016/j.vetpar.2013.09.033.

Toro, C., Caballero, M.L., Baquero, M., Garcia-Samaniego, J., Casado, I., Rubio, M., Moneo, I., 2004. High Prevalence of Seropositivity to a Major Allergen of *Anisakis simplex*, *Anisakis* 1, in Dyspeptic Patients. *Clinical and Vaccine Immunology* 11, 115–118. Doi:10.1128/CDLI.11.1.115-118.2004.

Torres, P., Andrade, P., Silva, R., 1998. On a new species of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) from *Cauque mauleanum* (Pisces: Atherinidae) by brightfield and scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 745–752.

Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A., 2008. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International* 57, 49–53. Doi:10.1016/j.parint.2007.08.003.

Umehara, A., Kawakami, Y., Matsui, T., Araki, J., Uchida, A., 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitology International* 55, 267–271. Doi:10.1016/j.parint.2006.07.001.

Valentini A1, Mattiucci S, Bondanelli P, Webb SC, Mignucci-Giannone AA, Colom-Llavina MM, Nascetti G., 2006. Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox2* sequences, and comparison with allozyme data. *J Parasitol* 92, 156–66.

Valero, A., Paniagua, M.I., Hierro, I., Díaz, V., Valderrama, M.J., Benítez, R., Adroher, F.J., 2006. Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the Mediterranean coasts of Andalucía (Southern Spain). *Parasitology International* 55, 1–5. Doi:10.1016/j.parint.2005.07.001.

Valle, J., Lopera, E., Sánchez, M.E., Lerma, R., Ruiz, J.L., 2012. Spontaneous splenic rupture and *Anisakis* appendicitis presenting as abdominal pain: a case report. *Journal of medical case reports* 6, 114.

Van Thiel, P., Kuipers, F., Roskam, R., n.d., 1960. A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop Geogr Med.* 12, 97-113.

Wharton, D.A., Hassall, M.-L., Aalders, O., 1999. *Anisakis* (Nematoda) in some New Zealand inshore fish. *New Zealand journal of marine and freshwater Research* 33, 643–648.

Yorimitsu, N., Hiraoka, A., Utsunomiya, H., Imai, Y., Tatsukawa, H., Tazuya, N., Yamago, H., Shimizu, Y., Hidaka, S., Tanihira, T., Hasebe, A., Miyamoto, Y., Ninomiya, T., Abe, M., Hiasa, Y., Matsuura, B., Onji, M., Michitaka, K., 2013. Colonic Intussusception Caused by Anisakiasis: A Case Report and Review of the Literature. *Internal Medicine* 52, 223–226. Doi:10.2169/internalmedicine.52.8629.

Yubero F., Auroux F., Lopez A. 2004 Anisakidos parásitos de peces comerciales. Riesgos asociados a la salud pública. *Anales de la real academia de ciencias veterinarias de Andalucía Oriental*, 17.

Zuloaga, J., Arias, J., Balibrea, J.L., 2004. Anisakiasis digestiva. Aspectos de interés para el cirujano. *Cir Esp* 75, 9–13.

Zuloaga, J., Rodríguez-Bobada, C., Corcuera, M.T., Gómez-Aguado, F., González, P., Rodríguez-Perez, R., Arias-Díaz, J., Caballero, M.L., 2013. A rat model of intragastric infection with *Anisakis* spp. Live larvae: histopathological study. *Parasitology Research* 112, 2409–2411. Doi:10.1007/s00436-013-3359-6.