

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“INCIDENCIA DE ANISAKIS EN PESCADOS
COMERCIALIZADOS EN ASTURIAS”**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

CRISTINA DUARTE OLIVENZA

JULIO, 2016





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo, España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dña. EVA GARCÍA VÁZQUEZ (Universidad de Oviedo)

Dra. LAURA MIRALLES LÓPEZ

CERTIFICA:

Que Dña. **Cristina Duarte Olivenza** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 10ª promoción curso 2015-2016.

Oviedo, a 11 de Julio 2016

Dña. EVA GARCÍA VÁZQUEZ

Dra. LAURA MIRALLES LÓPEZ

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

ÍNDICE

	Pags.
AGRADECIMIENTOS _____	6
RESUMEN _____	7
ABSTRACT _____	8
LISTA DE FIGURAS _____	9
LISTA DE TABLAS _____	11
INTRODUCCIÓN _____	13
CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES _____	17
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES MORFOLÓGICAS DE ANISAKIS _____	18
2. CONTEXTO HISTÓRICO _____	20
2.1. Antecedentes de anisakidosis humana en España _____	21
3. DIFERENTES TIPOS DE ESPECIE PARÁSITO Y DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE ANISAKIS _____	22
4. CICLO DE VIDA Y HOSPEDADORES DE ANISAKIS _____	26
5. FORMAS DE LLEGADA DEL PARASITO AL INTESTINO HUMANO _____	28
6. DETECCIÓN DE LAS LARVAS DE ANISAKIS EN EL PESCADO _____	30
6.1. Examen visual simple _____	30
6.2. Examen por translumiación _____	30
6.3. Examen por digestión de jugo gástrico artificial _____	31
7. CUADRO CLÍNICO CAUSADO POR ANISAKIS _____	31

	Pags.
7.1. Anisakidosis o Anisakiasis_____	32
7.1.1. Sintomatología_____	32
7.1.2. Pruebas diagnosticas_____	33
7.2. Reacción alérgica a Anisakis_____	35
7.2.1. Sintomatología_____	35
7.2.2. Causa de la reacción alérgica a <i>Anisakis</i> _____	36
7.2.3. Pruebas diagnósticas_____	37
8. MEDIDAS DE PREVENCIÓN CONTRA ANISAKIS SP. _____	38
9. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ANISAKIS SIMPLEX _____	40
9.1. Técnicas inmunológicas_____	41
9.1.1. Método de identificación ELISA (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay)_	41
9.1.2. Método de identificación Western Blot_____	42
9.2. Técnicas basadas en identificación de ácidos nucleicos_____	43
9.2.1. Extracción del DNA_____	43
9.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)_____	43
9.2.3. Electroforesis_____	46
9.2.4. Secuenciación del DNA_____	48
MATERIAL Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIS _____	51

	Pags.
1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS _____	52
2. ANÁLISIS VISUAL Y EXTRACCIÓN MANUAL DE <i>ANISAKIS</i> _____	55
3. EXTRACCIÓN DEL DNA _____	56
4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMESARA: PCR _____	57
5. VISUALIZACIÓN EN GEL DE AGAROSA _____	58
6. SECUENCIACIÓN DEL DNA _____	59
RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	61
1. CARGA PARASITARIA DE LOS HOSPEDADORES _____	62
2. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTERSPECÍFICA _____	65
3. DIVERSIDAD <i>ANISAKIS SP</i> EN CADA PESCADO _____	71
4. DIVERSIDAD POR ESPECIES DE <i>ANISAKIS</i> Y HAPLOTIPOS DE LOS HOSPEDADORES _____	72
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES _____	80
ABREVIATURAS _____	83
BIBLIOGRAFÍA _____	84

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer sinceramente a las siguientes personas por haber contribuido en la realización de mi Trabajo Fin de Máster:

- Agradecerle a mi tutora, Dr. Eva García Vázquez, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto tan interesante.
- A mis compañeros del laboratorio de genética de recursos naturales, especialmente a la Dr. Laura Miralles, Laura Clusa y Sara Fernández por su paciencia y buen humor a la hora de enseñarme. Sin vosotras no podría haber realizado este trabajo.
- A todo el equipo de la pescadería del Hiperacor por su ayuda desinteresada y por su buen trato. Especialmente a mi tío, Juan Carlos, por preocuparse e interesarse continuamente por este trabajo.
- Por último, dar las gracias a mi familia y amigos, especialmente a mis padres y Jonathan, por sus ánimos y su paciencia. También a mi compañeros del Máster, por hacer de este año un año muy especial.

RESUMEN

Las investigaciones recientes han comprobado que la parasitación de los pescados por gusanos nematodos como *Anisakis spp* ha aumentado. Las nuevas formas de consumo de pescado promueven la aparición de más casos de enfermedades producidas por estos parásitos, ya sean por parasitación del intestino o por reacciones alérgicas asociadas a productos que contienen *Anisakis spp*.

El presente estudio trata de determinar la carga parasitaria de siete especies de pescado: *Merluccius merluccius* (merluza), *Micromesistius poutassou* (bacalada), *Sardina pilchardus* (sardina), *Engraulis encrasicolus* (anchoa), *Lepidorhombus boscii* (gallo), *Scomber scombrus* (caballa) y *Trachurus trachurus* (chicharro). Las muestras son pescados frescos comercializados en Asturias. En ellas se identificó la especie de parásito y su diversidad haplotípica.

El estudio genético se realizó mediante el análisis del gen que codifica el enzima mitocondrial Citocromo oxidasa 2. Los resultados obtenidos mostraron la existencia de tres especies diferentes de parásitos, dos pertenecientes al género *Anisakis* (*Anisakis simplex* y *Anisakis pegreffii*) y una perteneciente al género *Hysterothylacium* (*Hysterothylacium aduncum*). En el estudio se observa que es *Anisakis simplex* la especie predominante en la parasitación.

ABSTRACT

Recent research of parasitism have verified that the presence of nematodes worms in fish such as *Anisakis spp* have increased. The new ways of fish consumption promote the emergence of more diaseases caused by these parasites. The *Anisakis* can parasitize the intestine or produce allergic reactions.

The present study tries to determine the parasitic load of seven species of fish: *Merluccius merluccius*, *Micromesistius poutassou*, *Sardina pilchardus*, *Engraulis encrasicolus*, *Lepidorhombus boscii*, *Scomber scombrus* and *Trachurus trachurus*. The samples of fish are fresh and they are sold in Asturias. The parasite species and its haplotype diversity were identified in these samples.

The genetic study has been realized by analysing the gene which encodes the mitochondrial enzyme cytochrome oxidase 2. The results obtained showed the existence of three different types of parasites: two parasites that belong to the *Anisakis* category (*Anisakis simplex* and *Anisakis pegreffii*) and the other pasasite that belongs to the *Hysterothylacium* one (*Hysterothylacium aduncum*). The study shows that *Anisakis simplex* is the predominant species in the parasitation.

LISTA DE FIGURAS

	Pags.
FIGURA 1: Pescado con larvas de <i>Anisakis spp</i> _____	15
FIGURA 2: Esquema de la anatomía de <i>Anisakis spp</i> _____	18
FIGURA 4: Árbol filogenético de las especies de <i>Anisakis spp</i> (Malttiucci y Nascetti, 2008)____	22
FIGURA 5: Distribución geográfica a nivel mundial de <i>Anisakis spp</i> (Malttiucci y Nascetti, 2008)_____	24
FIGURA 6: Distribución en la Costa Atlántica y Mediterránea Europea de <i>Anisakis spp</i> en muestras de <i>M. merluccius</i> _____	25
FIGURA 7: Ciclo de vida del parásitos <i>Anisakis spp</i> ._____	26
FIGURA 8: Endoscopia donde se observa la presencia de <i>Anisakis sp.</i> en el estómago humano_____	33
FIGURA 9: Técnica inmunológica ELISA_____	41
FIGURA 10: Pasos básicos de la PCR (Vierstracte, 1999)_____	44
FIGURA 11: Amplificación exponencial de PCR (Vierstracte, 1999)_____	45
FIGURA 12: Separación DNA en gel de agarosa horizontal_____	46
FIGURA 13: Fragmentos de DNA separados en una electroforesis de agarosa, visualizado con luz UV_____	47
FIGURA 14: Esquema secuenciación método de Sanger_____	49

	Pags.
FIGURA 15: Esquema del programa seguido por la PCR_____	57
FIGURA 16: Cromatograma de una secuencia en BioEdit_____	58
FIGURA 17: Información proporcionada por BLAST y alineamiento y de comparación de la secuenciación_____	59
FIGURA 18: Esquema de radiación de los diferentes haplotipos de <i>Anisakis pegreffii</i> _____	72
FIGURA 19: Esquema de radiación de los diferentes haplotipos de <i>Anisakis simplex</i> _____	77

LISTA DE TABLAS

	Pags.
TABLA 1: Platos de pescado con riesgos de parasitación_____	28
TABLA 2: Datos sobre <i>Merluccius merluccius</i> para el estudio_____	51
TABLA 3: Datos sobre <i>Sardina pilchardus</i> para el estudio_____	52
TABLA 4: Datos sobre <i>Engraulis encrasilocus</i> para el estudio_____	52
TABLA 5: Datos sobre <i>Micromesistius poutassou</i> para el estudio_____	53
TABLA 6: Datos sobre <i>Lepisorhombus bossii</i> para el estudio_____	53
TABLA 7: Datos sobre <i>Scomber scombrus</i> para el estudio_____	53
TABLA 8: Datos sobre <i>Trachurus trachurus</i> para el estudio_____	54
TABLA 9: Reactivos y DNA necesario para llevar a cabo la amplificación por PCR_____	56
TABLA 10: Carga parasitaria de <i>Merluccius merluccius</i> _____	61
TABLA 11: Carga parasitaria de <i>Engraulis encrasilocus</i> _____	62
TABLA 12: Carga parasitaria <i>Micromesistius poutassou</i> _____	62
TABLA 13: Resultado de los análisis genéticos de los parásitos extraídos de <i>Merluccius merluccius</i> _____	64
TABLA 14: Resultado de los análisis genéticos de los parásitos extraídos de <i>Micromesistius poutassou</i> _____	69

TABLA 15: Resultado de los análisis genéticos de los parásitos extraídos de <i>Engraulis encrasilocus</i> _____	69
TABLA 12: Resultados del programa DnpSP donde se recoge el número de secuencias, de haplotipos, la diversidad nucleotídica(ρ , π) y la diversidad haplotídica (Hd) _____	70
TABLA 13: Resultados obtenidos del análisis de los diferentes haplotipos de <i>Anisakis pegreffii</i> encontrados en las muestras de pescado _____	72
TABLA 14: Resultados obtenidos del análisis de los diferentes haplotipos de <i>Anisakis simplex</i> encontrados en las muestras de pescado _____	73
TABLA 15: Resumen de los resultados obtenidos del análisis de los diferentes haplotipos de <i>Anisakis simplex</i> encontrados en las muestras de pescado _____	77

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El pescado constituye la base de la dieta en numerosos países siendo incluso el único aporte de proteínas de origen animal. Cada vez, el consumo de pescado es más elevado ya que es recomendado por numerosos especialistas debido su elevado valor nutricional y a la cantidad de ácidos grasos esenciales que posee. Como en la mayoría de los alimentos, sobre todo de origen animal, se debe prestar especial atención a los parásitos o enfermedades asociadas a su consumo, que pueden ser perjudiciales para el hombre. Es frecuente que estos alimentos puedan contener algunas sustancias o parásitos que pongan en peligro la salud del consumidor.

De todas las enfermedades que pueden ocasionar los alimentos procedentes del mar, las principales parasitosis que afectan al hombre occidental son las de la familia Anisakis, o anisákidos (= Anisakidosis), con una distribución global en los cinco continentes (Berasategui, 2012).

Según los datos de Bean y Griffin (HUSS, 1997), en EE.UU. entre los años 1973 y 1987 de todas las enfermedades transmitidas por alimentos, sólo en el 49,6% se identificó un alimento como agente específico, y entre estos, el pescado fue el que con más frecuencia se identificó como responsable de la enfermedad, (10%).

La distribución de anisákidos se limita solamente a agua marina según la mayoría de los expertos. Algunos autores mencionan que ocasionalmente se han hallado larvas de *Anisakis sp* en peces de agua dulce, sin embargo esto ha sido atribuido a que los peces de agua dulce pueden haber sido alimentados por restos marinos infestados y no tratados o también se menciona que peces como el salmón, al tener parte de su ciclo en agua marina, en sus migraciones pueden llegar a ser parasitados (Gómez *et al.*, 1999). Por otra parte Dzido *et al* (2009) afirma que la mayoría de parásitos adultos pueden estar presentes tanto en ambientes marinos como en agua dulce, citando a Maestre *et al.* (2004).

El ciclo vital del parásito comprende uno o más hospedadores intermediarios, siendo el definitivo mamíferos marinos y grandes peces, donde la larva se desarrolla hasta alcanzar el estado adulto. El hombre es un huésped accidental del helminto el cual adquiere las larvas al consumir pescado crudo o poco cocinado (Gómez *et al.*, 2003).

Dentro de la superfamilia *Anisakidae* se incluye el género *Anisakis*, del que se reconocen especies como: *Anisakis simplex*, *Anisakis physeris*, *Anisakis brevispiculata*, *Anisakis ziphidarmu*, *Anisakis typica* y *Anisakis schupakovi*. Dentro del complejo *Anisakis simplex* encontramos tres especies hermanas: *Anisakis simplex sensu stricto*, *A. pegreffii* y *A. simplex C.* (Mattiucci *et al.*, 2005)

La larva *Anisakis* produce, al ingerir alimentos contaminados por él, dos cuadros clínicos: la parasitación del tracto digestivo, y las reacciones alérgicas cuya sintomatología puede variar desde la urticaria hasta el choque anafiláctico. Cuando ambas situaciones coinciden en el tiempo, hablamos de *anisakiasis gastroalérgica* (Berasategui, 2012).

Debido al creciente consumo de pescado crudo en la península Ibérica, se han producido numerosos casos de enfermedades o alergias producidos por la presencia en el alimento de las larvas o de proteínas pertenecientes a *Anisakis*, las cuales pueden seguir presentes una vez cocinado el alimento.

Por todo esto, con el fin de tratar sus dolencias asociadas es de vital importancia conocer la especie concreta de *Anisakis* a la cual nos enfrentamos, ya que muchas veces las diferencias solo pueden apreciarse a nivel genético sin ser evidentes a simple vista.



Figura 1 Pescado con larvas de *anisakis spp*

CONSIDERACIONES TEÓRICAS Y EXPERIMENTALES

CONSIDERACIONES TEORICAS Y EXPERIMENTALES

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES MORFOLÓGICAS DE *ANISAKIS*

La identificación de las larvas se basa en que se caracterizan por tener un color blanquecino, casi transparentes, de apariencia redonda, con cuerpo cilíndrico, alargado y no segmentado, que pueden medir entre 4 y 30 mm de longitud y menos de 1 mm de diámetro (Alejo et al., 2003). Sin embargo, cuando lo observamos en la musculatura o las vísceras de los peces parasitados se encuentra enrollado en espiral, plano y de un color pardusco (Sánchez et al., 2009).

Los anisákidos son vermes redondos, con el cuerpo alargado y ligeramente afilado en ambos extremos. En el extremo anterior hay 3 labios (uno dorsal y 2 subventrales) bien desarrollados. El extremo posterior es recto en las hembras y curvado ventralmente en los machos. El tubo digestivo presenta un ventrículo, posterior al esófago, además de un ciego intestinal y un apéndice ventricular en algunos géneros (Gómez et al., 1999). Estas características morfológicas le permiten a la población de *Anisakis simplex* ser ágiles, dotados evolutivamente para penetrar las paredes de tejido de su vector u hospedero. Pertenecen a los denominados nematelmintos (gusanos cilíndricos).

El sistema digestivo es completo, dispone de boca, esófago, intestino y ano (Möller y Anders, 1986). Posee un sistema nervioso rudimentario y se destaca la presencia de un anillo nervioso situado en el tercio del parásito. También existe un sistema excretos compuesto por una glándula y un conducto que finaliza en el llamado poro excretos que se sitúa inmediatamente por debajo de la apertura bucal, o bien a nivel del anillo nervioso según los géneros (Cheng, 1982).

La principal diferencia entre las larvas y los adultos es el desarrollo del sistema reproductor, el cual es visible en los adultos.

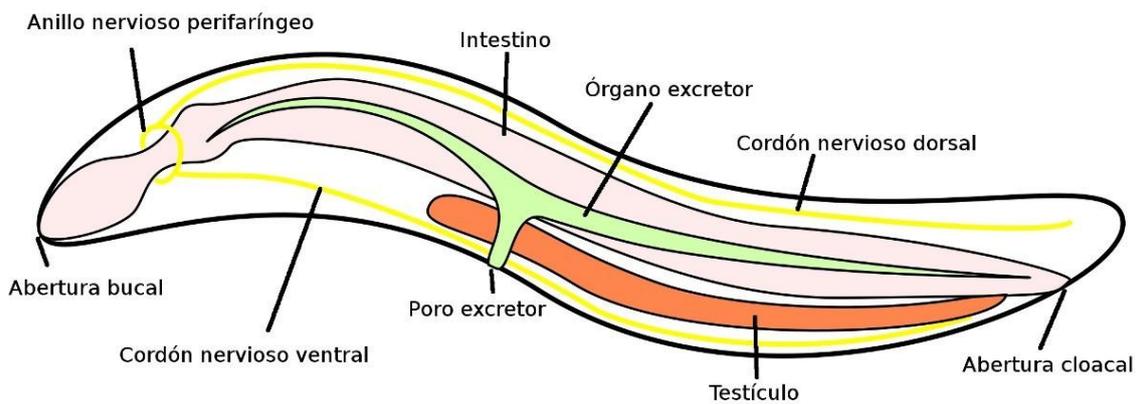


Figura 2 Esquema de la anatomía de *Anisaki spp*

Los anisákidos pertenecen al *Phylum Nematelminthes*, Clase *Nematoda*, Subclase *Secernentea*, orden *Ascarida*, Suborden *Ascaridina*, Superfamilia *Ascaridoidea*, Familia *Anisakidae*, Subfamilia *Anisakinae*, Género *Anisakis* (Anderson et al., 1074).

Las especies son diversas, siendo las de más importancia, desde el punto de vista clínico en la alimentación *A. simplex s.s.*, *A. pegreffii* y *A. simplex C.*, ya que parasitan principalmente peces pelágicos, demersales y mesopelágicos como hospedadores intermedios con más facilidad de llegar al hombre al estar incluidos en su dieta (www.mncn.csic.es/).



Figura 3 Larvas de *Anisakis spp* extraídas de una muestra de Merluza.

2. CONTEXTO HISTÓRICO

Recientemente los estudios demuestran que existe un aumento en la prevalencia a nivel mundial, en las últimas décadas, de las enfermedades transmitidas por la ingesta de *Anisakis*. La mayoría de los casos se registran en Japón, con más de 20.000 casos anuales (Chai, Darwin Murrell, y Lymbery, 2005; Hochberg y Hamer, 2010; Mattiucci et al., 2013). España es el segundo en la clasificación por su frecuente consumo de pescado, ya que forma parte de la dieta Mediterránea.

La primera descripción del parásito tuvo lugar a finales del siglo XIX, y a mitad del siglo XX es cuando se da importancia al problema sanitario que representa la presencia de estas larvas en el pescado (Rodrick y Cheng, 1989).

La anisakidosis humana fue reconocida por primera vez por M. Straub (1955) en los Países Bajos y descrita por Van Thiel (1960) como un caso de anisakidosis intestinal debido al consumo de arenques (*Clupea harengus*) crudos o ligeramente salados. Esta enfermedad también se denominó “Enfermedad del gusano del arenque” (Shikura, 1993). Desde la descripción del primer caso, se describieron 149 casos más de anisakidosis humana en Holanda entre 1955 y 1967 (Bellaterra, 2001).

En Japón se revisaron los casos de granuloma eosinofílico gástrico o intestinal que se habían considerado causados por Áscaris. Por este motivo, en 1965 se inició una investigación, durante tres años, sobre los casos de úlcera gástrica o duodenal, de apendicitis aguda y de tumor de estómago. Este estudio reveló que cientos de casos habían sido erróneamente diagnosticados. Desde entonces, los casos donde se describe anisakidosis humana son muy numerosos en países como China, Corea y EE.UU. (Cheng, 1982).

En Europa se han diagnosticado numerosos casos de anisakidosis en Noruega, Reino Unido, Francia, Alemania, Dinamarca y España, todos ellos relacionados con la ingesta de pescado crudo o poco cocinado. (Barros *et al.*, 1992; Chord Auger *et al.*, 1995).

2.1. Antecedentes de la anisakidosis humana en España

En España existe la costumbre de consumir pescado crudo de dos especies diferentes: el boquerón (*E. encrasicholus*) y la sardina (*S. pilchardus*), generalmente aliñados con vinagre, aceite y limón (López Vélez 1992; Madrid *et al.*, 1994; Cruchaga *et al.*, 1995 y Acebes Rey *et al.*, 1006).

El primer caso de anisakidosis en la literatura médica fue publicado por Arenal *et al.* (1991) como causa de una apendicitis aguda y cuadro reumatológico. Posteriormente Barros *et al.* (1992) publicaron dos casos de anisakidosis por consumo de sardinas. Uno de ellos se presentó como una patología aguda con cuadros de íleo paralítico obstructivo donde se identificaron larvas de *Anisakis simplex* tras el tratamiento quirúrgico.

En 1993 Clavel *et al.* publican un nuevo caso donde se describe la aparición de una larva de *Anisakis physeteris* en la cavidad abdominal de una mujer en Zaragoza la cual había consumido pescadilla poco cocinada.

Tres años después, Cruchaga *et al.* (1995) informan de un caso de úlcus duodenal e identifican una larva de *Anisakis simplex* tras su extracción. La ingesta de boquerones crudos fue la causante de los síntomas.

Acebes Rey *et al.* (1996) describen dos casos más de anisakidosis digestiva aguda en los que se extraen dos y una larvas, respectivamente, pertenecientes al género *Anisakis*.

Como antecedentes epidemiológicos nuevamente consta la ingesta de sardinas o anchoas aliñadas con aceite, vinagre y limón.

En 1996 Duran *et al.* describen una reacción urticariforme generalizada y un cuadro digestivo agudo tras la ingesta de pescado. Se extraen del estómago del paciente cuatro larvas de *Anisakis*. También está señalado un caso de anisakidosis aguda por consumo de lomos de merluza cocidos insuficientemente en un horno microondas (menos de un minuto de cocción). En este caso se aisló una larva de *Anisakis sp.* (Canut Blasco, 1996).

Finalmente, Oliveira *et al.* (1999) diagnosticaron siete casos de anisakidosis gastrointestinal en Madrid durante el otoño de 1996. Cinco de los siete pacientes habían adquirido los parásitos después de comer anchoas en vinagre.

Al igual que ocurrió en Japón, algunos de los casos de anisakidosis humana en España, antes de 1991, pudieron haber pasado desapercibidos (López-Vélez *et al.*, 1992).

La incidencia de anisakidos en España podría ser mayor si se utilizaran análisis complementarios en pacientes sospechosos de padecerla, ya que el número de casos referidos actualmente es menor que el esperado en un país que se halla en el segundo lugar de mayor consumo de pescado por habitante en el mundo (Dominguez *et al.*, 2000).

3. DIFERENTES TIPOS DE ESPECIE DE PARÁSITO Y DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE ANISAKIS

Podemos distinguir a las diferentes especies del género *Anisakis* gracias al avance en las técnicas moleculares. Recientes estudios llevados a cabo con marcadores

moleculares han mostrado que *A. simplex* (Davey, 1971) es un complejo formado por especies hermanas: *A. simplex sensu stricto*, *A. pegreffii* y *A. simplex C* (Nascetti *et al.*, 1986; Mattiucci *et al.*, 1997). Además, se ha demostrado que *A. brevispiculata*, sinónimo con *A. physeteris*, es una especie distinta (Davey, 1971), y se ha podido describir una nueva especie que es *A. ziphidarum* (Paggi *et al.*, 1998).

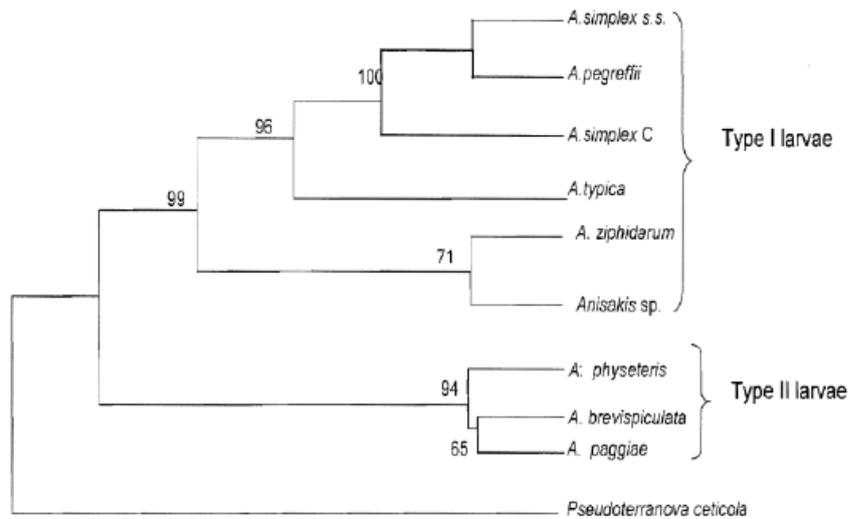


Figura 4 Árbol filogenético de las especies de *Anisakis spp* (Mattiucci y Nascetti, 2008)

Las diferentes especies del género *Anisakis* tienen una amplia distribución geográfica. Además suelen presentar diferentes ciclos de vida y hospedadores definitivos diferentes (Mattiucci y Nascetti, 2008).

Los Nematodos anisákidos son comunes en la Antártida, sub-Antártida y las zonas árticas, ya que las larvas de *Anisakis* pueden permanecer viables bajo condiciones adversas. Es allí, en las zonas polares, donde habita la mayoría de mamíferos marinos que son los huéspedes definitivos donde las larvas pueden reproducirse al completar su ciclo biológico.

Sin embargo la distribución actual en las zonas polares se sigue revisando, teniendo en cuenta que el cambio climático interviene en el ciclo biológico de todas las especies,

donde un calentamiento continuo puede llegar a modificar la composición de la fauna de *Anisakis*, cambiando así el comportamiento, los hábitos de alimentación, tanto de estos, como de todas las especies de animales terrestres y marinas. Se puede encontrar, por tanto, que la distribución de los anisákidos es prácticamente cosmopolita, haciendo énfasis en zonas como la Antártida, las subantárticas, las zonas árticas, y países como Japón, España, México, Escandinava, Chile, Holanda, Nueva Zelanda, Brasil, Indonesia, China, donde el consumo de pescado, y/o cefalópodos es abundante.

El grupo formado por *A. simplex*, en sentido estricto (Rudolphi, 1809), *A. pegreffi* (Campana-Rouget & Biocca, 1955) y *A. simplex C* (Nascetti et al., 1986, Mattiucci et al., 1997, 2001, 2002) podemos encontrarlo a lo largo del Hemisferio Norte y Sur colonizando diferentes tipos de peces grandes y mamíferos, es el que tiene mayor distribución (Mattiucci et al., 2005). Si se concretan las posiciones de los mismo, encontramos *Anisakis simplex*, en sentido estricto, distribuido por el Atlántico Norte y el Océano Pacífico, *Anisakis pefreffi* se localiza principalmente a lo largo del Mar Mediterráneo y por todo el Hemisferio Sur, y *Anisakis simplex C* podemos encontrarlo en las aguas de la Costa del Océano Pacífico en Canadá y en el Hemisferio Sur (Marques et al., 2005).

Anisakis typica (Diesing, 1860) parasita, principalmente, delfines que habitan las aguas de la Costa Atlántica de Brasil. Pero también podemos localizarla en el Mar mediterráneo, en la zona central del Océano Atlántico y en las costas de Somalia y la India. (Mattiucci et al., 2005).

Por otro lado, *Anisakis physeteris* (Baylis, 1923) habita el cachalote de las aguas del Atlántico y Mediterráneo. *A. brevispiculata* (Dollfus, 1968) se encuentra en el esperma del cachalote pigmeo en las aguas del Centro y Sureste del Atlántico. Se puede considerar a estas dos especies sinónimas. (Mattiucci et al., 2005).

Por último, *A. ziphidarum* (Paggi et al. 1998) es localizado en las aguas del Mediterráneo y el Sureste del Atlántico. (Mattiucci et al., 2005).

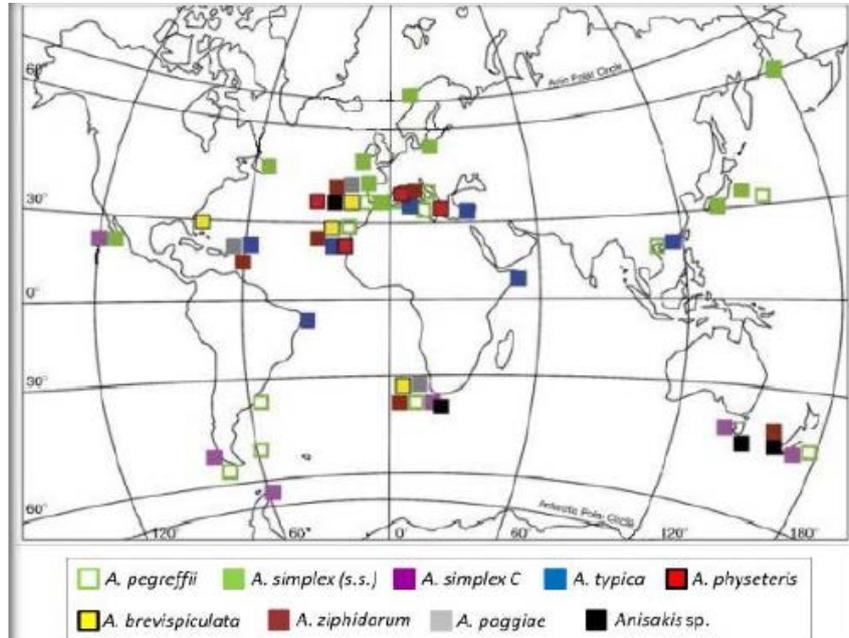


Figura 5 Distribución geográfica a nivel mundial de *Anisakis* spp (Mattiucci y Nascetti, 2008)

De los países mencionados el de mayor presencia de anisákidos es España puesto que, aparte de ser el país de mayor consumo de pescado en el mundo, también habita en sus aguas una multitud de especies de pescado que pueden estar altamente infectadas. La especie de pescado predominante que causa la infección varía de un país a otro y depende de las costumbres de cada uno, sin embargo, en España pueden encontrarse varias especies con alta prevalencia de *Anisakis*.

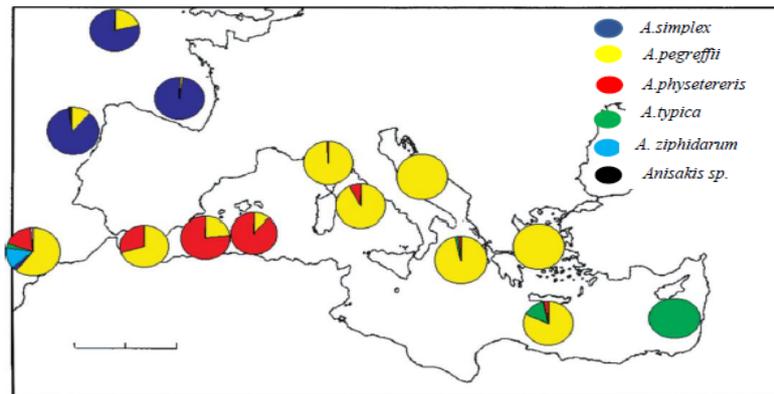


Figura 6 Distribución en la Costa Atlántica y Mediterránea Europea de *Anisakis spp* en muestras de *M. merluccius*

Los registros que se encuentran acerca de la distribución de anisákidos dependen de varios factores:

- La dieta de pescado y otros animales marinos de consumo humano
- La distribución de los vectores u hospederos relacionados con el nematodo en cuestión.
- La temperatura de las aguas
- Las variaciones producidas por el cambio climático

4. CICLO DE VIDA Y HOSPEDADORES DE ANISAKIS

El *Anisakis* tiene un ciclo biológico complejo dividido en varias fases donde el hombre es un hospedador accidental. El primer estadio larvario consiste en huevos que proceden de las heces de los hospedadores definitivos, como mamíferos marinos (ballenas, delfines, marsopas, orcas, narvales) y peces grandes. Es aquí donde el parásito desarrolla su forma adulta. Los huevos liberados al mar por las hembras eclosionan dando lugar al segundo estadio larvario. Estas pequeñas larvas son

ingeridas por los crustáceos que encontramos en el plancton, los cuales constituyen el primer hospedador. A su vez, estos pequeños crustáceos del plancton son ingeridos por peces y cefalópodos, los cuales representan el segundo hospedador. En estos peces y cefalópodos es donde se desarrolla el tercer estadio larvario, pudiendo tener varios pasos de un pez o cefalópodo a otro, o ser ingeridos, a su vez, por peces más grandes y grandes mamíferos marinos. Una vez que la larva llega a los grandes mamíferos marinos o peces grandes se instala en el intestino, muda dos veces más y llega a su estadio adulto. Una vez alcanza la madurez, se reproduce y libera los huevos nuevamente al exterior a través de las heces del hospedador definitivo, cerrándose nuevamente el ciclo.



Figura 7- Ciclo de vida del parásitos *Anisakis spp.*

Normalmente encontramos al parásito en el tubo digestivo de los individuos a los que parasita, pero cuando éste muere, el parásito emigra hacia la cavidad abdominal, las vísceras o los músculos, donde pueden permanecer durante un amplio periodo de tiempo. Es aquí cuando se da la infección el humano, al ingerir el tejido infectado con el parásito. La cantidad de larvas y su distribución dentro del pez dependen de sus hábitats marinos y de sus hábitos alimentarios (Berasategui, 2012).

El *Anisakis* llega al hombre por error ya que en el intestino humano la larva no es capaz de alcanzar la madurez sexual. El hombre adquiere las larvas al ingerir pescado crudo o poco cocinado. Las especies de pescado donde podemos encontrar al parásito son numerosas: *Gadus morhua* (bacalao), *Sardina pilchardus* (sardina), *Engraulis encrasicolus* (anchoa), *Merluccius merluccius* (merluza), *Salmon salar* (salmón), *Thunnus alalunga* (bonito), *Scomber scombrus* (caballa), *Pollachius pollachius* (abadejo), etc. y entre los cefalópodos el más parasitado es *Loligo vulgaris* (calamar) (Gómez *et al.*, 2003).

5. FORMAS DE LLEGADA DEL PARÁSITO AL INTESTINO HUMANO

Se pueden encontrar casos de parasitación humana por *Anisakis* en todos los continentes. Si bien es cierto que no solamente existe el *Anisakis* como parásito del pescado, en los países occidentales las especies de anisákidos son las únicas, prácticamente, a tener en cuenta.

Las infestaciones humanas por parásitos del pescado se asocian a hábitos alimenticios que incluyen el consumo de pescados crudos o insuficientemente cocinados, los cuales pueden llevar a cabo la ingestión de parásitos vivos presentes en pescado crudo o de sustancias producidas por el propio parásito presentes en el pez (alergias). Por tanto, se trata de una contaminación biológica de los pescados y no existe riesgo de contagio persona a persona.

Los hábitos de consumo de pescado pueden variar mucho en función de las tradiciones y de la cultura culinaria. Así, se consideran platos de riesgo en la transmisión de anisákidos el sushi y sashimi japoneses, los arenques salados o ahumados típicos de Holanda, el gravlax nórdico, el lomi-lomi hawaiano, el cebiche sudamericano y los

boquerones en vinagre españoles, entre otros platos. No obstante, estos platos se consideran seguros si se elaboran con pescado previamente congelado.

PAIS	ALIMENTO (especialidad de pescado)
Todos	<i>Sushi, sashimi</i> , pescado ahumado, <i>sprat</i> (arenque, salmón, caballa, bonito, atún)
Todos	Cebiche sudamericano (lenguado, pejerrey, caballa, bonito, mero, pulpo, calamar, corvina, tiburón)
Dinamarca	Arenque ahumado y/o en salazón
Italia	Anchoas marinadas
Escandinavia	<i>Gravlax</i> (salmón)
España	Anchoas en vinagre (boquerones)
Alemania	<i>Rollmops</i> (arenque)
Holanda	<i>Nieuwe</i> (arenque)

Tabla 1- Platos de pescado con riesgos de parasitación

Dónde se encuentre la larva dentro del pescado puede verse influenciado por distintos factores (Chía *et al.*, 2010, Tejada, 2009, Valero *et al.*, 2006):

- El hábitat del hospedador.
- El tipo de alimentación que siga el hospedador. Los hospedadores que se alimentan de crustáceos eufásicos poseen las larvas en la cavidad abdominal y vísceras. Los pescados piscívoros tienen larvas en la musculatura hipoaxial que rodea al abdomen.
- Cuando se encuentra un número elevado de parásitos en la musculatura, es indicador de que existe una infección previa en las vísceras.

6. DETECCIÓN DE LAS LARVAS DE ANISAKI EN EL PESCADO

Existen diferentes métodos para la búsqueda de las larvas en la carne y/o vísceras del pescado. La mayoría de las técnicas empleadas para su detección implican fragmentar o destruir el pescado en su totalidad. Normalmente las técnicas seguidas para la detección de las larvas son:

- Examen visual simple
- Transluminación
- Digestión por jugo gástrico artificial

6.1. Examen visual simple

Consiste en la búsqueda directa de las larvas en la superficie del tejido y/o vísceras, y en cortes de pescado de espesor menor de 5mm mediante la utilización de unas tijeras y pinzas (Huang, 1990).

La Decisión de la Comisión de 19 de Enero de 1993 (DOCE núm, L 56/42 de 9 de Marzo de 1993) define este método como un examen no destructivo del pescado o productos pesqueros.

Según Huang (1990) este método de examen visual resulta suficiente para descubrir el 90% de las larvas en peces pequeños, pero tiene escasa eficacia para especies de pescado grandes, donde solamente se podrían ver las larvas con una fragmentación mayor de los tejidos.

6.2. Examen por transluminación

Se basa en la observación visual de las larvas de *Anisakis* en filetes sobre los cuales se proyecta una fuente luminosa desde la parte inferior. Para este examen es típico utilizar mesas iluminadas. Bratas (1988) citado por Díaz Estruch (1992), describe las

mesas como un tablero transparente sobre el que se coloca el filete de pescado el cual recibe una iluminación mediante lámparas de luz blanca. Las larvas se distinguen como nódulos más oscuros.

Este método resulta poco eficaz para detectar larvas de *Anisakis simplex* en un grosor de filete del pescado mayor de 0,5 cm (Huang, 1990).

6.3. Examen por digestión de jugo gástrico artificial

Este método permite encontrar casi todas las larvas. Consiste en someter a la muestra de pescado, ya sean carne, vísceras o ambas, a la acción de una solución digestiva (Huang, 1990).

Este tipo de examen obtiene muy buenos resultados, aunque se recomienda un número pequeño de especímenes para el examen ya que es complicado cuando se tratan de especies de pescado grandes.

7. CUADRO CLÍNICO CAUSADO POR ANISAKIS

Como ya se ha dicho anteriormente, los *Anisakis* producen dos tipos de patologías asociadas al tubo digestivo. Por un lado producen Anisakidosis o Anisakiasis que conllevan la parasitación del tracto digestivo, y por otro lado reacciones alérgicas cuya sintomatología puede variar desde la urticaria hasta el choque anafiláctico. Existe ocasiones donde las dos patologías coinciden denominándose *anisakiasis gastroalérgica*.

7.1. Anisakidosis o Anisakiasis

Se considera una zoonosis ya que es una enfermedad humana transmitida por los animales, y se adquiere por el consumo de pescado o cefalópodos crudos o insuficientemente cocinados que alojen larvas vivas, ocasionando una infestación que puede afectar a cualquier individuo expuesto de la población general. Una vez ingeridas por el hombre, las larvas penetran a través de la mucosa del tracto digestivo gracias a la acción de diversas enzimas. La forma clínica de presentación dependerá de la parte del tubo digestivo a la que afecte el parásito, y así se distinguen tres formas clínicas: gástrica, intestinal y ectópica.

7.1.1. Sintomatología

Los síntomas en general comienzan por episodios de dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarreas y pueden simular cuadros de úlcus gástrico, ileítis, apendicitis, abdomen agudo o incluso tumores abdominales y también se han descrito casos de poliartritis y algunos casos de invasión de otros órganos como pulmón, hígado, bazo y páncreas.

Si las larvas se mantienen en el estómago o el intestino sin penetrar en los tejidos, se da una infección asintomática, la cual suele descubrirse al eliminar larvas vivas con la tos, vómitos o defecaciones (Petithory y Marty, 1988).

Dependiendo de la zona parasitada tendremos:

- **Forma gástrica:** los síntomas aparecen unas pocas horas (< 12) después de comer pescado poco cocinado, coincidiendo con el momento en que la larva penetra en el tracto digestivo. La localización gastroduodenal es la más frecuente (70% de los casos). La persona afectada se ve aquejada de dolor muy intenso en la zona alta del abdomen, náuseas y vómitos.

- **Forma intestinal:** los síntomas aparecen en las 48-72 horas siguientes a la ingestión del pescado contaminado con larvas. Suelen consistir en dolor abdominal agudo, náuseas, vómitos y alteración del ritmo intestinal con estreñimiento o diarrea; incluso son posibles cuadros de obstrucción intestinal. Las lesiones suelen aparecer en la zona final del intestino delgado llamada íleon terminal (zona cercana al apéndice) y los síntomas pueden parecerse a una apendicitis aguda.

Además, en casos excepcionales pueden combinarse ambas patologías y provocar Extragastrointestinal o ectópica. Las larvas perforan completamente la pared gástrica o intestinal, alcanzan la cavidad abdominal y migran a diferentes localizaciones: peritoneo, pulmón, páncreas, hígado... Cuando esto ocurre, en los casos más graves puede ser necesaria la cirugía. En otras ocasiones aún más raras, las larvas son capaces de remontar desde el estómago hasta la orofaringe, y se produce la expulsión de la larva con la tos.

7.1.2. Pruebas diagnósticas

La parasitación por larvas de *Anisakis* es peculiar en varios aspectos con respecto a otras parasitaciones. En primer lugar, entre el 90-95% de los casos está ocasionada por una sola larva; en segundo lugar, es posible que la larva se expulse por el tracto digestivo o incluso migre a localizaciones ectópicas; y finalmente, el ser humano no es un hospedador adecuado para el parásito. Estas peculiaridades hacen que los diagnósticos coprológicos no sean útiles, a diferencia de otras parasitaciones digestivas.

Los hallazgos en las radiografías simples no son específicos pudiéndose encontrar en las formas intestinales la presencia de asas de intestino dilatadas con niveles hidroaéreos, siendo en las formas de afectación gástrica habitualmente normal. Con el

uso de contraste se han descrito estrechamientos de la luz intestinal con imagen de pseudotumor o defectos de repleción de aspecto lineal correspondientes a la larva. En la ecografía también se puede apreciar imágenes de engrosamiento de la pared intestinal, líquido libre y estrechamiento de la luz. Dentro de las principales pruebas diagnósticas encontramos:

- **Gastro-endoscopia o colonoscopia:** Es la prueba principal para la visualización y diagnóstico de la larva. Dicho estudio debe ser realizado minuciosamente ya que algunos pacientes diagnosticados de gastroenteritis eosinofílica primaria no se evidenció, en un primer examen, la presencia del parásito, pero en un segundo examen, más minucioso, se halló la presencia de la larva.

El examen endoscópico se realiza en el estómago, duodeno o colon. Es aquí donde se suele permitir la visualización de la larva confirmando el diagnóstico y realizando al mismo tiempo, a través del propio endoscopio, la extracción de las larvas por medio de unas pinzas. Las larvas y las lesiones asociadas suelen encontrarse distribuidas predominantemente en el estómago. Si la endoscopia se lleva a cabo en las primeras horas del inicio de los síntomas, se puede observar incluso la larva viva penetrando en la mucosa. Las endoscopias de los casos crónicos revelan imágenes parecidas a un tumor gastrointestinal o a una úlcera gástrica.



Figura 8 Endoscopia donde se observa la presencia de *Anisakis spp.* en el intestino humano

- **Serología:** El sistema inmunitario humano, una vez que entra en contacto con los antígenos del parásito, da lugar a la aparición de una respuesta en forma de anticuerpos de varios tipos (IgG, IgM e IgE). La IgE total (o policlonal) se eleva en las parasitaciones agudas y va descendiendo de forma paulatina. La IgE específica frente al parásito se eleva durante los primeros días que siguen a una reinfestación, y estos niveles se pueden mantener altos durante meses. Existe alta reactividad cruzada con antígenos procedentes de otros parásitos, sobre todo para anticuerpos IgG o IgM.
- **Biopsia.** En los casos agudos, las biopsias del tubo digestivo muestran las erosiones del parásito en la mucosa; en los crónicos, permiten ver al microscopio granulomas con restos de cutículas de la larva.

7.2. Reacción alérgica a Anisakis

Lo más común es un cuadro alérgico agudo que se desencadena habitualmente entre 15-30 minutos y 2 horas tras comer pescado. Es más frecuente que tenga lugar en sujetos adultos, entre los 40 y 70 años, y que la reacción se atribuya a medicamentos o a otros alimentos, dado que los sujetos habían tolerado estas mismas variedades de pescado a lo largo de toda su vida.

7.2.1. Sintomatología

Los signos y síntomas detectables son los siguientes:

- En la piel: urticaria con habones generalizados pruriginosos, y en ocasiones angioedema (hinchazón deformante de la piel de los párpados y/o labios).

- En el aparato digestivo: dolor abdominal, sensación de plenitud, náuseas, vómitos y/o diarrea.
- Cuadro generalizado o anafilaxia, con sus síntomas típicos: urticaria, picor palmoplantar y en genitales, acompañados de síntomas respiratorios y digestivos, mareo, pérdida de conciencia.

A diferencia de los síncope más banales (de tipo vagal), los sujetos afectados por un choque anafiláctico no están pálidos ni sudorosos, sino con lesiones de urticaria, hinchazón facial y generalmente dificultad respiratoria.

7.2.2. Causa de la reacción alérgica a *Anisakis*

Se ha podido demostrar que dichas reacciones son mediadas por anticuerpos de clase IgE específicos inducidos por determinados antígenos del parásito (Gómez *et al.*, 2003). Según algunos autores la base de dicha alergia está en la termoestabilidad de diversos antígenos del parásito, capaces de unirse a la IgE de los pacientes y provocar síntomas de hipersensibilidad con la ingesta de pescado cocinado (Gómez *et al.*, 2003).

Sin embargo, en otros estudios en los que se han realizado provocaciones orales con larvas liofilizadas en pacientes, con una historia sugestiva y sensibilizados a *Anisakis simplex*, éstas han resultado negativas. Dichos resultados, similares a los obtenidos en otros, sugieren que sólo el parásito vivo que parasita la mucosa gástrica induce síntomas clínicos en pacientes sensibilizados. Probablemente las larvas de *Anisakis simplex* muertas por la cocción del pescado, discurren por el tracto intestinal sin producir ni sintomatología digestiva, ni reacción alérgica puesto que por un lado: las larvas no pueden engancharse a la mucosa con la consiguiente reacción inflamatoria y síntomas acompañantes y por otro lado; los antígenos liberados no llegan en cantidades significativas al torrente circulatorio como para provocar una reacción

alérgica. Parece ser entonces que la verdadera alergia está en las proteínas termoestables del *Anisakis simplex* (Gómez *et al.*, 2003).

Por tanto, dentro de las reacciones alérgicas IgE mediadas por *Anisakis simplex* podemos diferenciar dos tipos (Gómez *et al.*, 2003):

- Una reacción anafiláctica inducida por antígenos termoestables y que se desarrolla pese a que el pescado se consuma cocinado o congelado (sin larvas viables en su interior).
- Una parasitación digestiva aguda acompañada de síntomas alérgicos denominada *anisakiasis gastro-alérgica* desencadenada por la ingesta de pescado crudo o insuficientemente cocinado.

7.2.3. Pruebas diagnósticas

Como todo estudio de alergia, se debe comenzar por una historia clínica compatible. En este caso supone una reacción de tipo alérgico (urticaria acompañada o no de otros síntomas de anafilaxia) en el contexto de haber comido pescado en las 4 horas previas a la reacción. A raíz de esto las pruebas para detectar la alergia son las siguientes (Berasategui, 2012):

- **Pruebas cutáneas (*prick-test*, prueba intraepidérmica):** consisten en la aplicación de un extracto del parásito y de los pescados en forma de gota en el antebrazo que a continuación se punciona con una lanceta y se mide la reacción en un período de 10 a 15 minutos. Como control positivo se utiliza clorhidrato de histamina que ocasiona un característico habón, y como control negativo solución salina. Las pruebas deben efectuarse por personal experto. Para confirmar el diagnóstico, las pruebas deberían resultar positivas para el extracto de *Anisakis* y negativas para los pescados u otros alimentos ingeridos de forma concomitante.

- **Determinación de IgE específica:** se suelen llevar a cabo ensayos de cuantificación de anticuerpos específicos del tipo IgE mediante la técnica denominada FEIA (fluoro-enzimo-inmunoensayo CAP-System, Phadia, Uppsala, Suecia). Esto da lugar a una serie de valores, con un rango entre 0,35 y 100 kU/l. Para la mayoría de alérgenos, los valores superiores a 0,35 kU/l se consideran positivos, pero en el diagnóstico de alergia a *Anisakis* es habitual encontrar valores positivos bajos sin relevancia clínica. Teniendo en cuenta que un extracto de *Anisakis* es una mezcla compleja de sustancias, ciertos pacientes alérgicos a mariscos o ácaros pueden responder de manera inespecífica a algunas de esas sustancias (reactividad cruzada), con resultado de falsos positivos, con valores bajos de IgE específica. Así, sólo se consideran de valor diagnóstico niveles altos de IgE específica (más de 3,5 kU/l).
- **Otras pruebas *in vitro*.** Además de la determinación de IgE específica, se pueden realizar otros análisis más precisos de reconocimiento de antígenos, que no están disponibles en todos los servicios de Alergología y se suelen utilizar con fines de investigación. Algunas de estas técnicas son *immunoblotting*, test de activación de basófilos (TAB) y estudio de componentes alérgicos (*microarrays*), entre otros.

8. MEDIDAS DE PREVENCIÓN CONTRA *ANISAKIS SPP*

Es muy importante concienciar a la población sobre los riesgos que conlleva el consumo de pescado crudo o insuficientemente cocinado. Los nematodos contenidos en la musculatura del pescado son capaces de sobrevivir largos periodos de tiempo y resistir diferentes tipos de cocinado. Así, *Anisakis sp.* se mantiene viable hasta 25 días

en mezclas de sal y vinagre. Si la concentración de sal disminuye y la del vinagre se mantiene constante, la supervivencia se puede prolongar hasta 119 días.

A parte de concienciar a la población, la principal medida de prevención es evitar el consumo de pescado crudo o poco cocinado, pescados marinados o en salazón y peces marinos o calamar (Pravettoni et al. 2012). Pero si se decide consumir pescado, deben de tenerse en cuenta las siguientes medidas (Gómez et al. 2003):

- El pescado debe ser congelado a -20°C durante al menos 72 horas. Se recomienda el pescado congelado en alta mar o ultracongelado, ya que en este caso la evisceración del pescado se da en una fase temprana y no se corre un riesgo tan elevado de parasitación de la musculatura.
- El momento de la evisceración del pez es un punto clave para evitar el contagio por *Anisakis sp.* Esto es así porque, que se encuentran en las vísceras y el intestino, migran desde la pared intestinal hasta el músculo para alojarse en él una vez que el pescado está muerto. Es por eso, que es mucho más segura la evisceración del pez en el propio barco tras la captura, que una vez en la costa, donde s el número de parásitos en el músculo puede ser mucho más elevado.
- El tratamiento térmico también es un punto importante ya que las larvas de los *Anisakis* son sensibles al calor. La FDA recomienda un tratamiento de 60°C durante un minuto para matar a las larvas de *Anisakis*, mientras que la Comisión Internacional de Especificación Microbiológicas en alimentos (ICMSF) recomienda que debe alcanzarse una temperatura de 70°C . Los pescados fritos, hervidos, ahumados (más de 60°C), pasteurizados y cocinados al vacío, son seguros y pueden consumirse sin conllevar problemas.

- Una adecuada legislación en cuanto a la producción primaria y la puesta en el mercado de los productos de pesca, así como un exhaustivo control sanitario para evitar riesgos.

Desafortunadamente, estas medidas de prevención no son del todo útiles para proteger a los consumidores de las alergias que produce la ingesta de moléculas pertenecientes al parásito. Según Arlian *et al.* (2003), algunos de los alérgenos de *A. simplex* son resistentes al calor manteniéndose en el pescado cocinado y proporcionando síntomas de alergia.

El pescado es muy importante en nuestra dieta y no debe ser reemplazado. El conocimiento de los riesgos que existen en su consumo, no debe hacer que nuestros hábitos alimenticios cambien. Siempre que el pescado esté comprado bajo las garantías sanitarias vigentes en nuestro país (congelación del pescado en que se vaya a consumir en crudo), y estén cocinados bajo unas medidas de higiene, no tiene porque presentar problemas. Pero por otro lado, se deben evitar los platos que generen riesgo y consumir pescados crudos sin ser previamente congelados.

9. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE *ANISAKIS SIMPLEX*

Para la detección de *Anisakis simplex* se emplean diferentes técnicas de detección ya sean basadas en el análisis inmunológico o bien basadas en el análisis de ácidos nucleicos:

9.1. TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Actualmente una de las técnicas más empleadas para la detección de *Anisakis* es mediante pruebas inmuno-enzimática. Entre ellas, destaca principalmente el método ELISA de captura con el Ac monoclonal UA3 y el método Western Blot (Gárate *et al.*, 2008).

Los alérgenos concretos de *A. simplex* no se han caracterizado todavía. Estudios realizados con Western Blot han identificado la unión de IgE a péptidos procedentes de la larva L3, o bien la unión de IgE a productos de excreción/secreción recogidos de la larva L3 (Arlan *et al.*, 2003).

Según Lorenzo *et al.*, (1999), el antígeno que induce específicamente la alergenicidad de *Anisakis simplex* es el de peso molecular de 139/154 kDa debido a su immunoabundancia y naturaleza alergénica. Este Ag es reconocido por el Ac monoclonal UA3. Se presta atención al Ag Ani s4 por ser el más problemático debido a su termorresistencia. (Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental). Por otro lado, existen estudios donde se habla de que es la IgA la que interactúa con antígenos como Ani s 1 y Ani s 7 pudiendo estar implicada en mecanismos protectores ante episodios alérgicos como las reacciones urticantes (Serna, 2014).

Los Ac policlonales pueden detectar proteínas antigénicas de *Anisakis simplex*, y Ag Ani s4. Como ya se ha dicho anteriormente, los antígenos extraídos se detectan mediante pruebas con Western Blot y ELISA (Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental).

9.1.1. Método de identificación ELISA (Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay)

ELISA depende de la reacción del Ag con el Ac. Va a determinar la concentración de Ag o de Ac mediante el uso de un de ellos inmovilizado en una fase sólida y el otro en

disolución. Es un método cualitativo y cuantificativo. El producto de la reacción puede ser detectado y cuantificado mediante un marcador enzimático con un sustrato apropiado.

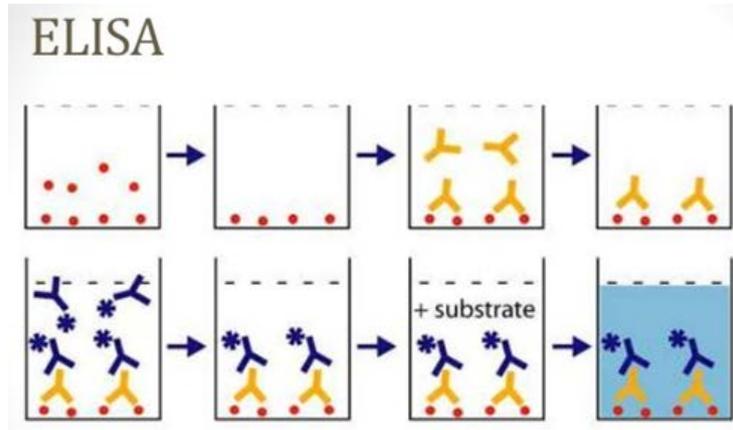


Figura 9 Técnica inmunológica ELISA.

La técnica de captura de ELISA parece ser una técnica adecuada para discernir entre la presencia de anticuerpos específicos a *Anisakis simplex* de otros anticuerpos de otros parásitos.

9.1.2. Método de identificación Western Blot

Es una técnica muy importante utilizada en biología celular y molecular. Los investigadores son capaces de identificar proteínas específicas a partir de una mezcla compleja de proteínas extraídas de las células que se comportan como antígenos.

La técnica sigue tres pasos: separación de las proteínas por tamaño celular, transferencia a un soporte sólido y marcado de la proteína diana utilizando Ac primarios y secundarios que se puedan visualizar posteriormente (Mahmood & Yang, 2012).

9.2. TÉCNICAS BASADAS EN IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

El análisis de ácidos nucleicos es un método avanzado y muy eficaz para el diagnóstico e identificación de especies a nivel molecular. Para llevar a cabo estos análisis, es fundamental seguir unos pasos previos tales como: extracción del DNA, amplificación por PCR y electroforesis. Una vez finalizados los pasos previos, se produce la secuenciación del fragmento de DNA a estudiar.

Cuando son obtenidos los resultados de la secuenciación, donde se muestra cómo está formada la secuencia de interés, los datos son analizados en bases de datos como BLAST o BOLD, donde nos indicará la especie concreta.

9.2.1. Extracción del DNA

La inmensa mayoría de las técnicas empleadas para analizar genes requieren, en primer lugar, la extracción del mismo. Muchas veces además de la extracción también requieren técnicas de purificación. Con la extracción del DNA se obtienen los nucleótidos procedentes de las células del tejido. Existen varios métodos de extracción del DNA de parásito. Uno de los más empleados es utilizando CHELEX.

El Chelex es una resina quelante de iones metálicos polivalentes que se utiliza para la extracción del DNA, con o sin digestión previo con proteinasa K, a altas temperaturas. Los métodos de extracción de DNA basados en esta resina no presentan ninguna dificultad técnica (Sánchez Lazo *et al.*, 2003).

9.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, comúnmente conocida como PCR, fue desarrollada por Kary Mullis en 1983. Consiste en una técnica, simple y muy rápida, de multiplicar "in vitro" secuencias específicas de DNA. En muy poco tiempo esta técnica

es capaz de lograr miles de copias del DNA presente en la muestra biológica. La PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

- Desnaturalización del ADN doble cadena. En esta etapa la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.
- Se trata de una etapa crítica ya que es muy importante que el DNA molde se desnaturalice al completo. Para lograrlo se recomienda alcanzar temperaturas de 94°C durante 1 minuto. Si la muestra tiene alto contenido en G y C , el tiempo o la temperatura se puede aumentar debido a que estas bases están unidas por tres puentes de hidrógeno. Sin embargo debemos tener en cuenta que la actividad de la DNA polimerasa decrece muy rápido a partir de los 95°C, por lo que debemos controlar el tiempo en estas temperaturas, siendo aconsejable disminuir el tiempo de incubación.
- Hibridación o anillamiento de los cebadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65°C). En este caso, la temperatura y el tiempo depende de tres factores relacionados con los dNTPs: la composición de las bases, el tamaño y la concentración. La temperatura de anillamiento puede oscilar entre los 45 y 65°C, durante un tiempo comprendido entre 30 y 1 minuto.
- Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa. En esta etapa es donde se produce la síntesis de una cadena sencilla en la dirección 5' → 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los dNTPs presentes en el medio siguiendo la cadena molde. En la mayoría de las reacciones la etapa

de extensión se realiza entre 70 y 72°C y el tiempo de extensión dependerá del tamaño de la amplificación. Se estima aproximadamente un minuto para elongar 1Kb. Es normal que al final de todos los ciclos, se realice una última elongación de 5 minutos a 72°C.

Los ciclos también tienen gran relevancia a la hora de optimizar una PCR. El número de ciclos depende de la cantidad de DNA que existe en la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados. Es importante no realizar un número alto de ciclos ya que puede dar lugar a la amplificación de productos no deseados.

El tiempo, la temperatura y el número de ciclos de cada etapa pueden ser modificados, lo que ayuda a optimizar los resultados de la reacción.

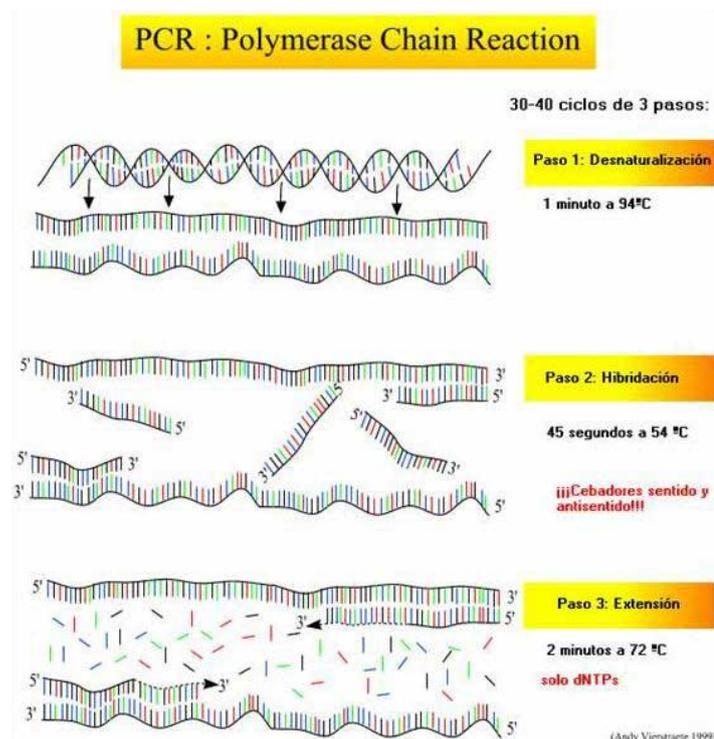


Figura 10 Pasos básicos de la PCR (Vierstrae, 1999)

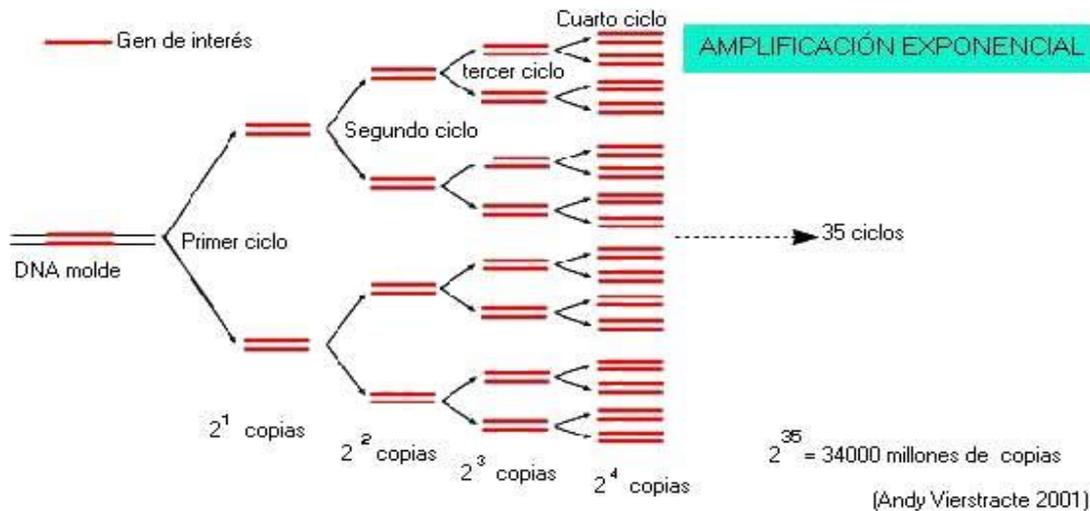


Figura 11 Amplificación exponencial de PCR (Vierstracte, 1999)

9.2.3. Electroforesis

Se denomina electroforesis a la técnica mediante la cual se separan las biomoléculas en disolución cuando se ven sometidas a un campo eléctrico. Se trata de una técnica fundamentalmente analítica, aunque también se puede realizar con fines preparativos.

La muestra debe situarse en/sobre un medio soporte que puede ser de diferentes tipos, principalmente para evitar perturbaciones mecánicas y corrientes de convección durante la separación. Los soportes puede ser de papel (o similares) donde la muestra queda sobre la superficie y avanza a lo largo de ella, con escasa fricción, por lo que el mecanismo principal de separación es la magnitud de la carga de cada componente de la muestra. Por otro lado, los soportes constituidos por geles están formados por polímeros que forman una malla, matriz o red tridimensional a través de la cual deben avanzar las moléculas de la muestra, que queda embebida en el medio de soporte electroforético. Como consecuencia, la fricción es notable y los factores de forma y tamaño adquieren una alta relevancia en la separación. Además, el porte puede encontrarse en forma horizontal o vertical.

Normalmente, para la separación de DNA se utiliza un soporte en vertical formado por un gel. Como ejemplo, se explicará la electroforesis en gel de agarosa en horizontal ya que es un método muy utilizado en la separación de ácidos nucleicos debido a la alta porosidad de la agarosa pudiendo dar resultados muy satisfactorios.

Se suelen emplear geles de agarosa (concentración entre 0,3% y 2%), más porosos que los de poliacrilamida. Las características mecánicas de estos geles hacen aconsejable la realización de la electroforesis en horizontal. Las muestras se aplican en pocillos practicados dentro del gel mediante la ayuda de una micropipeta.

Una vez depositado el material genético se pone en marcha la corriente eléctrica en ambos polos. La forma de todas las moléculas de DNA es esencialmente la misma. En consecuencia, resulta que la movilidad en electroforesis depende exclusivamente de la longitud de la molécula. El DNA, cargado negativamente, migrará hacia el polo positivo dejando a su paso los fragmentos genéticos separados en función de su tamaño. El avance del frente de electroforesis se observa gracias a colorantes, como por ejemplo azul de bromofenol, añadidos a la muestra.

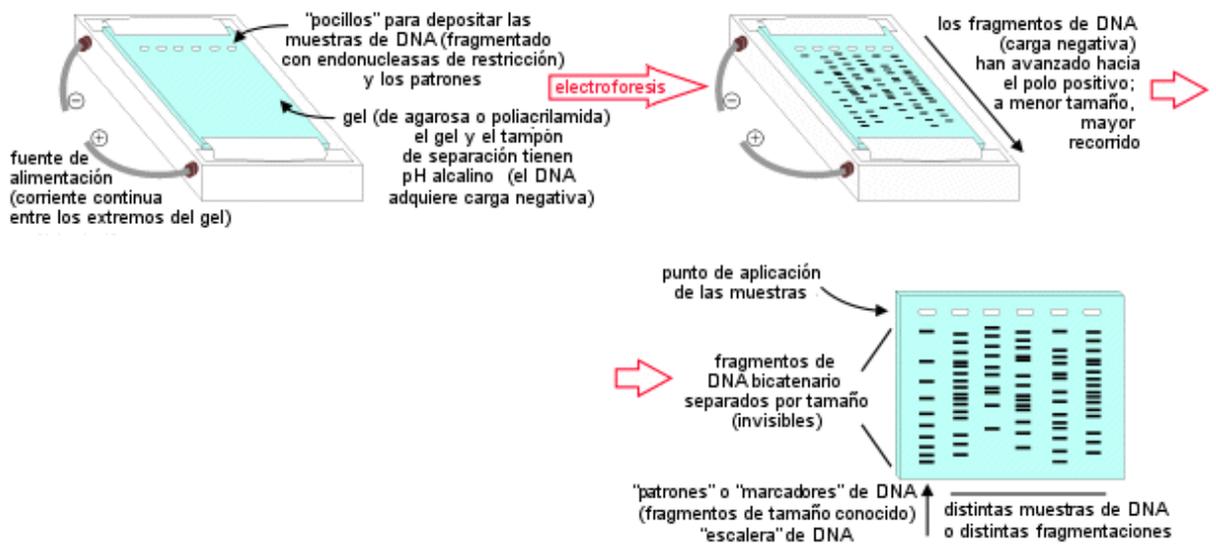


Figura 12 Separación DNA en gel de agarosa horizontal

Además, en uno de los pocillos del gel se añade un marcador, del cual conocemos su longitud, para hacernos una idea aproximada del tamaño de nuestras bandas de DNA del gel de electroforesis.

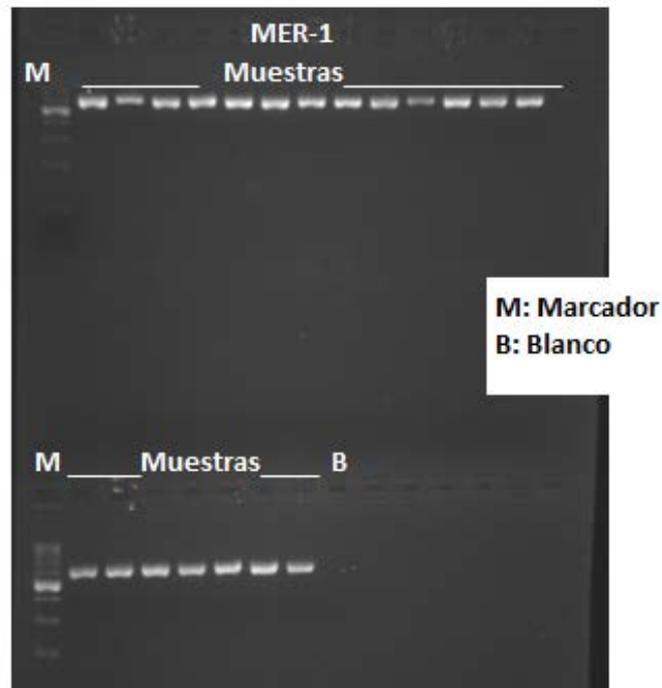


Figura 13 Fragmentos de DNA separados en una electroforesis de agarosa, visualizado con luz UV

9.2.4 Secuenciación del DNA

A finales de los años 70 se desarrollaron los métodos que permitieron de manera simple y rápida, determinar la secuencia nucleotídica de cualquier fragmento de ADN. La estrategia básica de la secuenciación de ácidos nucleicos es idéntica a la que se utiliza en la secuenciación de proteínas que siguen los siguientes pasos:

- Degradación específica y el fraccionamiento de los polinucleótidos de interés a fragmentos suficientemente pequeños para ser secuenciados.
- Secuenciación de los fragmentos pequeños.

- Ordenamiento de los fragmentos a través de la repetición de los pasos anteriores, usando un procedimiento de degradación que produce una serie de fragmentos de polinucleótidos que traslapan el punto de corte en la primera serie.

Hoy en día, el método más usado para la secuenciación de ácidos nucleicos es el método de Sanger. Sin embargo, es justo decir que el método de Maxam-Gilbert es el más adecuado para determinar la secuencia de fragmentos cortos de ADN, debido a que puede determinar la secuencia desde la primera base. En cambio, el método de Sanger sólo permite la lectura a partir de la base 10-20 (Tahara *et al.*, 1990).

El método de Sanger se basa en el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. Con este método se generan fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles que se puedan distinguir entre sí, por el tipo de marcaje que llevan o por la incorporación de un terminador específico. Entre los componentes de la reacción se incluyen nucleótidos que no tienen un grupo hidroxilo en su extremo 3' (ddNTP), para poder obtener una terminación específica en las cadenas. Una vez que el ddNTP se incorpora como el residuo terminal, evita que la cadena de ADN sintetizada continúe extendiéndose. La incorporación de los ddNTPs es al azar, de tal forma que se obtienen fragmentos de todos los tamaños posibles que terminan en un residuo específico.

En el método de Sanger (1977), la estrategia es hacer cuatro reacciones diferentes de síntesis de ADN, utilizando un ddNTP distinto en cada tubo. Con la mezcla del nucleótido normal (dNTP) y su terminador (ddNTP), se pueden generar fragmentos complementarios de diferentes tamaños que terminan en el mismo nucleótido. Después, estos fragmentos se pueden separar en un gel de electroforesis con cuatro carriles distintos, para determinar la secuencia del templado. (Necochea & Canul, 2004).

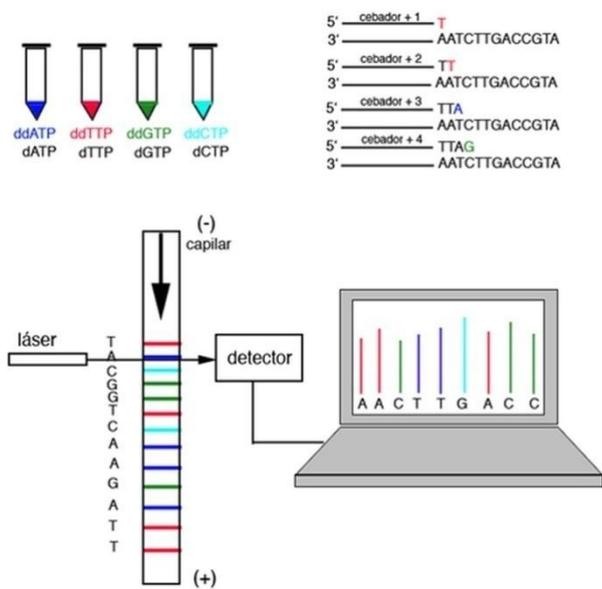


Figura 14 Esquema secuenciación método de Sanger

MATERIAL Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *ANISAKIS*

MATERIAL Y MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *ANISAKIS*

1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para realizar la investigación se ha procedido al estudio de diez individuos de seis especies de peces: *Merluccius merluccius* (merluza), *Micromesistius poutassou* (bacalada), *Sardina pilchardus* (sardina), *Engraulis encrasilocus* (anchoa), *Lepidorhombus boschii* (gallo), *Scomber scombrus* (caballa) y *trachurus trachurus* (chicharro).

Todos los pescados han sido adquiridos en dos pescaderías distintas de Oviedo. El estudio se ha realizado entre Marzo y Mayo del 2016. Ningún pez ha sido sometido a ningún tratamiento térmico ni por congelación, si no que están completamente frescos. Todos han sido pescados en diferentes zonas de las costas de la península Ibérica, tal y como se indica en los siguientes cuadros:

Tabla 2-Datos sobre *Merluccius merluccius* para el estudio

MERLUZA (<i>Merluccius merluccius</i>)	Zona de pesca	Gramos analizados	Lugar de venta
MER-1	Golfo de Vizcaya	13	Hipercor
MER-2	Golfo de Vizcaya	16	Hipercor
MER-3	Golfo de Vizcaya	19	Hipercor
MER-4	Golfo de Vizcaya	15	Hipercor
MER-5	Golfo de Vizcaya	18	Hipercor
MER-6	Golfo de Vizcaya	16	Hipercor
MER-7	Golfo de Vizcaya	15	Hipercor
MER-8	Golfo de Vizcaya	15	Hipercor
MER-9	Golfo de Vizcaya	15	Hipercor
MER-10	Golfo de Vizcaya	16	Hipercor
MER-11	Golfo de Vizcaya	15	Hipercor
MER-12	Atlántico NE	3,22	El Árbol
MER-13	Atlántico NE	54	El Árbol
MER-14	Atlántico NE	13,8	El Árbol
MER-15	Atlántico NE	7	El Árbol
MER-16	Atlántico NE	6,2	El Árbol

MER-17	Atlántico NE	14,4	El Árbol
MER-18	Atlántico NE	9	El Árbol

Tabla 3- Datos sobre *Sardina pilchardus* para el estudio

SARDINA (<i>Sardina pilchardus</i>)	Zona pesca	Gramos analizados	Lugar venta
SAR-1	Aguas Portugal	15	Hipercon
SAR-2	Aguas Portugal	14	Hipercon
SAR-3	Aguas Portugal	14	Hipercon
SAR-4	Aguas Portugal	15	Hipercon
SAR-5	Aguas Portugal	14	Hipercon
SAR-6	Aguas Portugal	18	Hipercon
SAR-7	Aguas Portugal	8	Hipercon
SAR-8	Aguas Portugal	14	Hipercon
SAR-9	Aguas Portugal	18	Hipercon
SAR-10	Aguas Portugal	18	Hipercon

Tabla 4- Datos sobre *Engraulis encrasicolus* para el estudio

BOCARTE (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	Zona pesca	Gramos analizados	Lugar venta
BOC-1	Golfo Vizcaya	12	Hipercon
BOC-2	Golfo Vizcaya	10	Hipercon
BOC-3	Golfo Vizcaya	15	Hipercon
BOC-4	Golfo Vizcaya	15	Hipercon
BOC-5	Golfo Vizcaya	11	Hipercon
BOC-6	Golfo Vizcaya	16	Hipercon
BOC-7	Golfo Vizcaya	10	Hipercon
BOC-8	Golfo Vizcaya	9	Hipercon

BOC-9	Golfo Vizcaya	11	Hipercor
BOC-10	Golfo Vizcaya	10	Hipercor

Tabla 5- Datos sobre *Micromesistius poutassou* para el estudio

BACALADA (<i>Micromesistius poutassou</i>)	Zona pesca	Gramos analizados	Lugar venta
BAC-1	Golfo Vizcaya	17	Hipercor
BAC-2	Golfo Vizcaya	18	Hipercor
BAC-3	Golfo Vizcaya	14	Hipercor
BAC-4	Golfo Vizcaya	15	Hipercor
BAC-5	Golfo Vizcaya	14	Hipercor
BAC-6	Golfo Vizcaya	15	Hipercor
BAC-7	Golfo Vizcaya	18	Hipercor
BAC-8	Golfo Vizcaya	15	Hipercor
BAC-9	Golfo Vizcaya	15	Hipercor
BAC-10	Golfo Vizcaya	18	Hipercor

Tabla 6- Datos sobre *Lepidorhombus bosscii* para el estudio

GALLO (<i>Lepidorhombus bosscii</i>)	Zona pesca	Gramos analizados	Lugar venta
GAL-1	Golfo Vizcaya	19	Hipercor
GAL-2	Golfo Vizcaya	17	Hipercor
GAL-3	Golfo Vizcaya	16	Hipercor
GAL-4	Golfo Vizcaya	19	Hipercor
GAL-5	Golfo Vizcaya	17	Hipercor
GAL-6	Golfo Vizcaya	18	Hipercor
GAL-7	Golfo Vizcaya	17	Hipercor
GAL-8	Golfo Vizcaya	16	Hipercor
GAL-9	Golfo Vizcaya	17	Hipercor
GAL-10	Golfo Vizcaya	18	Hipercor

Tabla 7- Datos sobre *Scomber scombrus* para el estudio

CABALLA (<i>Scomber scombrus</i>)	Zona pesca	Gramos analizados	Lugar venta
XAR-1	Golfo Vizcaya	18	Hipercor
XAR-2	Golfo Vizcaya	20	Hipercor
XAR-3	Golfo Vizcaya	20	Hipercor

XAR-4	Golfo Vizcaya	20	Hipercor
XAR-5	Golfo Vizcaya	16	Hipercor
XAR-6	Golfo Vizcaya	19	Hipercor
XAR-7	Golfo Vizcaya	20	Hipercor
XAR-8	Golfo Vizcaya	19	Hipercor
XAR-9	Golfo Vizcaya	19	Hipercor
XAR-10	Golfo Vizcaya	20	Hipercor

Tabla 8- Datos sobre *Trachurus trachurus* para el estudio

CHICHARRO (<i>Trachurus trachurus</i>)	Zona pesca	Gramos analizados	Lugar venta
CHI-1	Costa Cádiz	10	Hipercor
CHI-2	Costa Cádiz	9	Hipercor
CHI-3	Costa Cádiz	14	Hipercor
CHI-4	Costa Cádiz	8	Hipercor
CHI-5	Costa Cádiz	10	Hipercor
CHI-6	Costa Cádiz	8	Hipercor
CHI-7	Costa Cádiz	9	Hipercor
CHI-8	Costa Cádiz	11	Hipercor
CHI-9	Costa Cádiz	8	Hipercor
CHI-10	Costa Cádiz	10	Hipercor

2. ANÁLISIS VISUAL Y EXTRACCIÓN MANUAL DE *ANISAKIS*

El primer paso fue seleccionar con ayuda de una báscula entre 15 y 20 gramos del músculo del pez aproximadamente. A continuación se diseccionó el pescado, se dejó secar un poco al aire, se observó visualmente la presencia de larvas de *Anisakis sp* y se extrajo manualmente las larvas con la ayuda de unas pinzas. Una vez que la larva de *Anisakis sp* es capturada, se mete en un bote de plástico con Etanol 70% para conservar el DNA. Dentro del bote se añade una porción pequeña del tejido estudiado con el fin de poder diferenciar los diferentes tipos de pescado. Además, se rotula bien el bote con el número de parásitos, lugar de pesca y gramos del músculo estudiado.

3. EXTRACCIÓN DEL DNA

Una vez finalizada la extracción manual del parásito del tejido muscular, se procede a realizar el estudio de su DNA para identificar la especie de *Anisaki*. Para la extracción de ADN se sigue el protocolo escrito por de Estoup *et al.* (1996) con variaciones en cuanto a la cantidad de Chelex y proteinasa utilizados.

El material empleado para la extracción del ADN son: tijeras, pinzas, gradillas, tubos Eppendorf y un vaso pequeño de precipitados con agua destilada. La extracción del ADN se va a hacer por medio de CHELEX (Bio-Rad). El primer paso a realizar es calentar el CHELEX con agitación a unos 60°C. A continuación, se rotula bien el tubo Eppendorf para que no haya problemas de identificación. Con las pinzas se coge de la muestra con etanol uno de los gusanos y se corta y tritura dentro del tubo Eppendorf. Si el gusano es lo suficientemente largo se utiliza aproximadamente la mitad en la extracción, conservándose la otra mitad por si hubiera algún tipo de problema y se necesitara repetir el ensayo. Mientras se cambia de muestra se dejan las tijeras y las pinzas dentro del vaso de precipitados con agua destilada.

Una vez que se cortan bien todas las muestras y se ponen en el tubo Eppendorf correspondiente, se procede a añadir 400 µL CHELEX, el cual es una resina que se emplea como agente quelante que produce una rotura mecánica del tejido para facilitar la extracción de ADN. Una vez añadido el CHELEX se deben añadir 6 µl de proteinasa K (EUR_x), la cual se encarga de la digestión de la proteínas asegurándonos, de esta forma, que se inactivan las proteínas encargadas de degradar el DNA.

Se colocan las gradillas con las muestras dentro de un horno a 55°C durante una hora y media agitando las gradillas cada 10 minutos para facilitar la mezcla y la rotura mecánica. Finalizada la hora y media, se meten nuevamente en el horno a 100°C durante 20 minutos para desactivar la proteinasa K una vez que ya ha realizado su función. Pasados los 20 minutos se observan claramente dos fases diferentes en los Eppenderof. La fase superior contiene el DNA que se va a estudiar y la parte inferior

corresponde a la resina que se ha utilizado en el proceso de extracción. Por último, se dejan enfriar los tubos Eppendorf almacenándose en la nevera.

4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA: PCR

El gen del DNA elegido para la amplificación ha sido el gen mitocondrial de la citocromo oxidasa (Cox-2) que corresponde a 629 pb (Valentini *et al.*, 2006). El análisis de este fragmento del gen mitocondrial ayudará a conocer la relación filogenética entre las especies de *Anisakis*. Todas las reacciones de amplificación se llevan a cabo con un termociclador Applied Biosystems® Verity Thermal Cyclers.

Para la amplificación se utilizan dos *primers*, A210 y A 211 (cebadores) cuya secuencia, descrita por Nadler y Husdpeth (2000), es: 5' CACCAACTCTTAAAATTATC (A210) y 5' TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT (A211).

La amplificación fue realizada para un volumen de PCR de 35 μ L. Además, se necesitan 3,5 μ L del ADN molde y 31,5 μ L del Mix compuesto por: polimerasa (Promega, WI USA), primers, dNTPs, buffer, Mg²⁺ y agua destilada. La polimerasa irá añadiendo los dNTPs que le indique el DNA molde (tabla2):

Tabla 9- Reactivos y DNA necesario para llevar a cabo la amplificación por PCR

PCR	STOCK	[Final]	V= 35 μ L
Primer F	20 μ l	11 μ l	1,75
Primer R	20 μ l	11 μ l	1,75
ADN	50 ng	50 ng	3,5
Mg ²⁺	25mM	2,5mM	3,5
dNTPs	2,5mM	250mM	3,5
Taq	5 U/ μ l	0,03U/ μ L	0,22
Buffer	5x	1x	7
H ₂ O			13,78

El programa seguido por la PCR tendrá un total de 35 ciclos seguidos. La primera parte que corresponde a la desnaturalización del ADN se efectuará inicialmente a un temperatura de

95°C durante 5 minutos seguida de 30 segundos a 94°C. Una vez que el ADN está desnaturalizado deben unirse los primers a las regiones específicas, dicha etapa se conoce como anillamiento y tiene una duración de 45 segundos a una temperatura de 47°C. Finalmente se procede a la extensión de la cadena de ADN la cual se realizará a 72 °C durante 10 minutos, y un enfriamiento a 20°C durante 1 minuto (Figura 15):

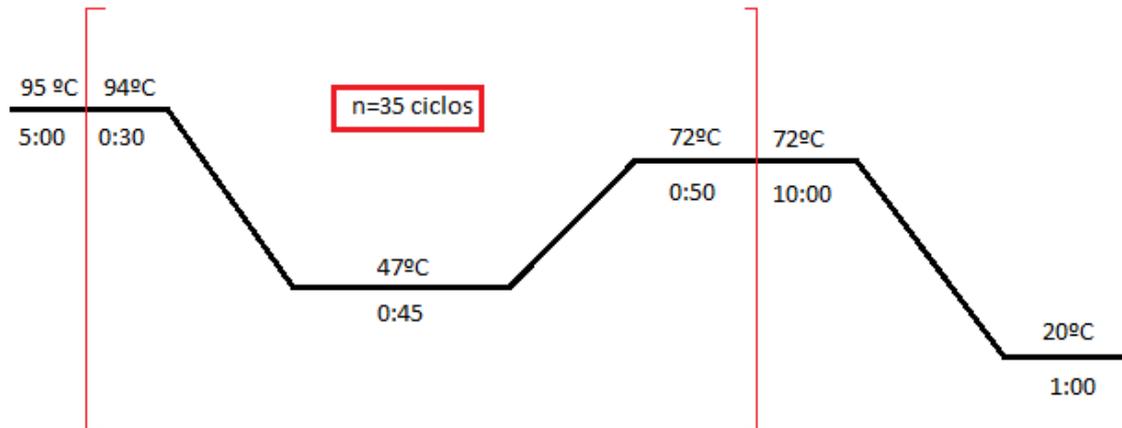


Figura 15- Esquema del programa seguido por la PCR.

5. VISUALIZACIÓN EN GEL DE AGAROSA

Para comprobar la presencia del ADN de la larva y observar el tamaño del fragmento que tiene el DNA se realiza una electroforesis en gel de agarosa.

Para ello se elabora el gel de agarosa de 2% con ayuda de una placa molde. Se preparan en un vaso 100 mL de TBE 1X y 2 gramos de agarosa en polvo, se calientan en el microondas vigilando que no hierba demasiado perdiéndose parte del volumen, y se observa que quede todo bien diluido.

A continuación añadimos 5 µL de SimplySafe como agente revelador y vertemos el contenido del vaso en la placa molde dejándola secar durante una hora para que se forme el gel. Una vez solidificado el gel, se añaden 5 µL del ADN y del marcador, que

nos permite ver el tamaño del fragmento de DNA, al pocillo correspondiente. Después se realiza la electroforesis a 120 V durante aproximadamente media hora donde los fragmentos de DNA migrarán desde el polo negativo al positivo.

Una vez finalizada la media hora, se observan cómo han migrado las bandas de DNA y con ayuda de los marcadores identificamos el tamaño de esas bandas. Para ello se visualiza el gel por transiluminación con luz UV utilizando el fotodocumentador Gene Flash®(Syngene).

6. SECUENCIACIÓN DEL DNA

Las muestras amplificadas y los primers fueron enviados a secuenciar a la empresa Macrogen. La cantidad enviada fue de 30 µL por muestra en una placa de 96 pocillos.

Las secuencias fueron leídas con el software BioEdit. Este programa ayuda a alinear mecánicamente las secuencias para poder editarlas en el caso de que fuese necesario bien porque haya que eliminar gaps, o bien porque haya que corregir posibles transiciones o transversiones.

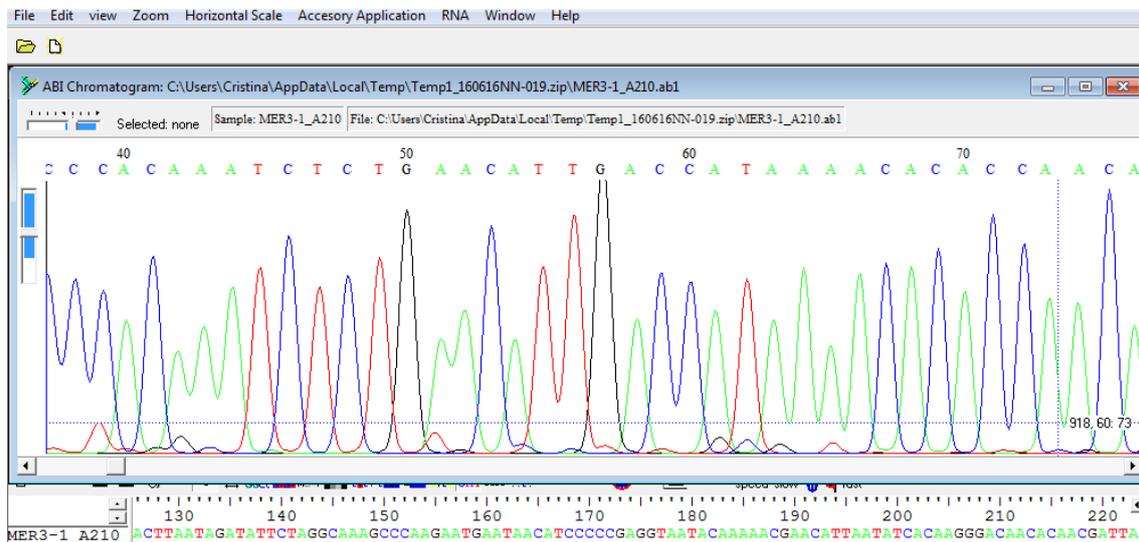


Figura 16 Cromatograma de una secuencia en BioEdit

Con la ayuda del programa informático BLAST (Basis Local Alignment Search Tool) se comparan las muestras de DNA alineándolas con las secuencias de la base de datos GenBank.

Alignments							Download	GenBank	Graphics	Distance tree of results
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession				
<input type="checkbox"/> Anisakis simplex isolate F2 DNA17 C cytochrome c oxidase subunit II-like (COX2) gene, partial sequence	1042	1042	90%	0.0	99%	GQ338429.1				
<input type="checkbox"/> Anisakis simplex isolate F1 DNA16 C cytochrome c oxidase subunit II-like (COX2) gene, partial sequence	1040	1040	90%	0.0	99%	GQ338428.1				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand						
1042 bits(564)	0.0	573/577(99%)	1/577(0%)	Plus/Plt						
Query 10	AAGC-ATGGGCATAAAACTATGGTTAGCCCCACAAATCTCTGAACATTGACCATAAAAACA	68								
Sbjct 39	AAGCAATGGGCATAAAACTATGGTTAGCCCCACAAATCTCTGAACATTGACCATAAAAACA	98								
Query 69	CACCAACAGTAGGAAAACTATAAGAAACAGTAGACAAAATACCCCTTATAGCATCCAAC	128								
Sbjct 99	CACCAACAGTAGGAAAACTATAAGAAACAGTAGACAAAATACCCCTTATAGCATCCAAC	158								
Query 129	TAATAGATATTCTAGGCAAAGCCCCAAGAATGAATAACATCCCCGAGGTAATACAAAAAC	188								
Sbjct 159	TAATAGATATTCTAGGCAAAGCCCCAAGAATGAATAACATCCCCGAGGTAATACAAAAAC	218								
Query 189	GAACATTAATATCACAAGGGACAACACAACGATTATCAACCTCCAAAAGACGAGGCTCAC	248								
Sbjct 219	GGACATTAATATCACAAGGAACAACAACGATTATCAACCTCCAAAAGACGAGGCTCAC	278								
Query 249	CTAGCTCCAACGTATCCACAGACTTCATATAAGAATCAAATCTAAGCCCGGGATATCAC	308								
Sbjct 279	CTAGCTCCAACGTATCCACAGACTTCATATAAGAATCAAATCTAAGCCCGGGATATCAC	338								

Figura 17 Información proporcionada por BLAST y alineamiento y de comparación de la secuenciación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de dicho estudio es determinar la presencia/ ausencia de *anisakis* y su identificación en pescados comercializados en la zona del Cantábrico. Para ello se han analizado 78 pescados que no han sido procesados ni sometidos a ningún tratamiento térmico.

Los resultados obtenidos muestran la existencia de tres especies distintas de parásitos presentes en estos pescados. Como parásito mayoritario se ha encontrado *Anisakis simplex* seguido de *Anisakis pegreffii* en una medida mucho más inferior. Además, se ha encontrado un individuo de la especie *Hysterothylacium aduncum*, muy similar a simple vista a *Anisakis* pero genéticamente diferente.

1. CARGA PARASITARIA DE LOS HOSPEDADORES

La carga parasitaria de los hospedadores hace referencia al número de *Anisakis* presentes en los 20 gramos aproximadamente de pescado analizado. De las diferentes especies de pescado analizadas, solamente se han encontrado parásitos en *Merluccius merluccius* (merluza), *Micromesistius poutassou* (bacalada), y *Engraulis encrasicolus* (anchoa). El resto de los pescados no presentan carga parasitaria alguna en los 20 gramos analizados. En las siguientes tablas podemos observar los resultados obtenidos:

Tabla 10- Carga parasitaria de *Merluccius merluccius*

MERLUZA (<i>Merluccius merluccius</i>)	Zona de pesca	Gramos analizados	Nº de parásitos
MER-1	Golfo de Vizcaya	13	20
MER-2	Golfo de Vizcaya	16	8
MER-3	Golfo de Vizcaya	19	27
MER-4	Golfo de Vizcaya	15	16
MER-5	Golfo de Vizcaya	18	26
MER-6	Golfo de Vizcaya	16	45
MER-7	Golfo de Vizcaya	15	2

MER-8	Golfo de Vizcaya	15	49
MER-9	Golfo de Vizcaya	15	19
MER-10	Golfo de Vizcaya	16	20
MER-11	Golfo de Vizcaya	15	19
MER-12	Atlántico NE	3,22	1
MER-13	Atlántico NE	54	5
MER-14	Atlántico NE	13,8	3
MER-15	Atlántico NE	7	13
MER-16	Atlántico NE	6,2	7
MER-17	Atlántico NE	14,4	4
MER-18	Atlántico NE	9	18
TOTAL Anisakis			302

Tabla 11 - Carga parasitaria de *Engraulis encrasilocus*

BOCARTE (<i>Engraulis encrasilocus</i>)	Zona pesca	Gramos analizados	Nº de parásitos
BOC-1	Golfo Vizcaya	12	0
BOC-2	Golfo Vizcaya	10	1
BOC-3	Golfo Vizcaya	15	0
BOC-4	Golfo Vizcaya	15	2
BOC-5	Golfo Vizcaya	11	0
BOC-6	Golfo Vizcaya	16	0
BOC-7	Golfo Vizcaya	10	0
BOC-8	Golfo Vizcaya	9	0
BOC-9	Golfo Vizcaya	11	0
BOC-10	Golfo Vizcaya	10	0
TOTAL Anisakis			3

Tabla 12- Carga parasitaria *Micromesistius poutassou*

BACALADA (<i>Micromesistius poutassou</i>)	Zona pesca	Gramos analizados	Nº de parásitos
BAC-1	Golfo Vizcaya	17	0
BAC-2	Golfo Vizcaya	18	0
BAC-3	Golfo Vizcaya	14	1
BAC-4	Golfo Vizcaya	15	0
BAC-5	Golfo Vizcaya	14	1
BAC-6	Golfo Vizcaya	15	0
BAC-7	Golfo Vizcaya	18	1
BAC-8	Golfo Vizcaya	15	0

BAC-9	Golfo Vizcaya	15	0
BAC-10	Golfo Vizcaya	18	0
TOTAL <i>Anisakis</i>			3

Como ya se ha mencionado anteriormente, cualquier pescado es susceptible de presentar carga parasitaria. La presencia o ausencia de las larvas depende principalmente del tipo de alimentación y el hábitat del pescado.

Del músculo de los 78 pescados estudiados solamente se encontraron parásitos en Merluza, Bacalada y Anchoa. La cantidad de parásitos en la Merluza es muy elevada en comparación a las otras dos especies, ya que todos los individuos analizados de merluza contienen larvas en cantidades elevadas. La presencia de la larvas en Anchoa y Bacalada es prácticamente similar y mucho más inferior que en la Merluza. Es muy posible que si el estudio se centrara en las vísceras, y no solamente en el músculo, el número de *Anisakis* en cada especie sería más elevado.

Ferrer-Maza *et al.* (2013), en un estudio realizado para la Universidad de Girona, destacan una prevalencia del 100% de larvas de *Anisakis spp* en merluzas de más de 44 cm. Además, también se menciona en dicho estudio que los pescados más jóvenes tienen menor carga parasitaria que aquellos son más edad.

Una de las razones por las que se podría explicar la parasitación de estos pescados se encuentra en la práctica pesquera. Es común que en los barcos que faenan en alta mar se evisceren los pescados cuando son capturados y se viertan nuevamente las vísceras de los mismos al agua. Esto fomenta aún más la presencia del parásito en las aguas aumentando el riesgo de ser consumidas por los pescados como la merluza o la bacalada, ya que son bentopelágicos.

Una medida que está en la mano humana para reducir la elevada presencia de *Anisakis* en las aguas es controlar los métodos de evisceración llevados a cabo en alta mar. Una vez eviscerados los pescados dentro de los buques, se puede almacenar las

vísceras, sin ser devueltas nuevamente al agua, con el fin de incinerarlas o destruirlas una vez que llegan a tierra.

Otro factor a tener es el calentamiento global del planeta que actualmente se sufre. La temperatura de los mares y océanos cada vez es más elevada, pudiendo modificar los ritmos de los ciclos de vida de los parásitos haciendo que la eclosión de los huevos sea más temprana y favoreciendo su crecimiento. Además, el aumento de temperatura de las aguas también favorece la migración de los peces, aumentando así la presencia del parásito en zonas concretas y dando lugar a mayor cantidad de huevos que eclosionarán en las aguas.

2. ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTERSPECÍFICA

Para identificar la especie de *Anisakis* se ha secuenciado el gen del enzima mitocondrial Cox-2 (Valentini *et al.*, 2006; Mattiucci *et al.*, 2007, 2010; Nascetti *et al.*, 2008). A continuación se observan en las tablas los resultados obtenidos de la secuenciación de las larvas que reflejan la identidad de cada una de ellas.

Tabla 13- Resultado de los análisis genéticos de los parásitos extraídos de *Merluccius merluccius*

MERLUZA	Parásito	Identity (%)
MER1-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-2	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-4	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-5	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-6	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-7	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER1-8	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-9	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-10	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-11	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-13	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-14	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-15	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-16	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-17	<i>Anisakis simplex</i>	99

MER1-18	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER1-19	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER1-20	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER2-1	<u>Anisakis pegreffii</u>	99
MER2-2	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER2-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER2-4	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER2-5	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER2-6	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER2-7	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER4-2	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER4-4	<u>Anisakis pegreffii</u>	99
MER4-5	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER4-6	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER4-8	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER4-9	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER4-11	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER4-12	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER4-13	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER4-14	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER4-15	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER4-16	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-2	<u>Hysterothylacium aduncum</u>	99
MER5-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-4	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER5-5	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-6	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-8	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-10	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-11	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-13	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-14	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-16	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-18	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-20	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-21	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER5-22	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER5-26	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-2	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-4	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-6	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-7	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-10	<i>Anisakis simplex</i>	95
MER6-11	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-12	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-13	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-14	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-15	<i>Anisakis pegreffii</i>	99

MER6-16	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-18	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-19	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-20	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-21	<i>Anisakis simplex</i>	95
MER6-22	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-23	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-24	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-25	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-26	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-27	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-28	<u>Anisakis pegreffii</u>	98
MER6-29	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-30	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-31	<i>Anisakis simplex</i>	93
MER6-32	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-33	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-36	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-37	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-38	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-39	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-40	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER6-41	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-42	<i>Anisakis simplex</i>	97
MER6-43	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-44	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER6-45	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER7-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER2-8	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-2	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-4	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-5	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-6	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-7	<u>Anisakis pegreffii</u>	99
MER3-8	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-9	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-10	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER3-11	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-12	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-14	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER3-15	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER3-16	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER3-17	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-18	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-19	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER3-20	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER3-21	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-22	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-23	<i>Anisakis simplex</i>	99

MER3-24	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER3-25	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER3-26	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER3-27	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER8-11	<u>Anisakis pegreffii</u>	99
MER8-12	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER8-14	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-15	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER8-16	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-18	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-20	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-21	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-22	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER8-23	<u>Anisakis pegreffii</u>	99
MER8-24	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-25	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-26	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-27	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-28	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-29	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-30	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-31	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-32	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-33	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-34	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-35	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-36	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-37	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-38	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER8-39	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-40	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-41	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-42	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-43	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-44	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-45	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER8-46	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-47	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-48	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-49	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-4	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-7	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER9-8	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-10	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-12	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-13	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-15	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-16	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-17	<i>Anisakis simplex</i>	99

MER9-20	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER9-18	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-2_	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-4	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER10-5	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-6	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-7	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-8	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-9	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER10-10	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-11	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-13	<u>Anisakis pegreffii</u>	99
MER10-14	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-15	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-16	<u>Anisakis pegreffii</u>	99
MER10-17	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-18	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-19	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER10-20	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-2	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-6	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-7	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-8	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-9	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-10	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-11	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-12	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER8-13	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-13_	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-14	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-15	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER11-17	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER11-18	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER14-1	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER14-2	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER15-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER15-2	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER15-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER15-4	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER15-7	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER15-8	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER15-10	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER15-12	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER15-13	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER16-2	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER16-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER16-4	<i>Anisakis simplex</i>	99

MER16-5	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER16-6	<i>Anisakis simplex</i>	100
MER16-7	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER17-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER17-2	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER17-3	<i>Anisakis simplex</i>	98
MER17-4	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-2	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-3	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-4	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-5	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-6	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-7	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-8	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-9	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-10	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-11	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-13	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-14	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-15	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-16	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-17	<i>Anisakis simplex</i>	99
MER18-18	<i>Anisakis simplex</i>	99

Tabla 14- Resultado de los análisis genéticos de los parásitos extraídos de *Micromesistius poutassou*

BACALADA	Especie Anisakis	Identity
BAC3-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
BAC5-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
BAC7-1	<i>Anisakis pegreffii</i>	99

Tabla 15- Resultado de los análisis genéticos de los parásitos extraídos de *Engraulis encrasilocus*

BOCARTE	Especie Anisakis	Identity
BOC2-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
BOC4-1	<i>Anisakis simplex</i>	99
BOC4-2	<i>Anisakis simplex</i>	99

Según Nascetti (1986) es común la coexistencia de distintas especies de parásitos dentro de la misma zona geográfico o incluso dentro del mismo hospedador.

3. DIVERSIDAD ANISAKIS SP EN CADA PESCADO

Con la ayuda del software BioEdit se ha realizado el alineamiento de las secuencias con ClustalW. Una vez identificados los GAP y corregidos, se han cortado los extremos de las secuencias para que todas tuvieran el mismo tamaño, aproximadamente entre 300 y 400 pb. A continuación, se ha utilizado el software informático DnaSP para mostrar los datos referentes a la variabilidad nucleotídica (π , π_i) y haplotídica (Hd). En la siguiente tabla se recogen los datos obtenidos del análisis con DnaSP.

Tabla 16 Resultados del programa DnaSP donde se recoge el número de secuencias, de haplotipos, la diversidad nucleotídica (π , π_i) y la diversidad haplotídica (Hd)

MUESTRA		Nº secuencias	Nº haplotipos	π	Hd
MERLUZA	<i>Anisakis simplex</i>	220	91	0,00934	0,91
	<i>Anisakis pegreffii</i>	9	5	0,01499	0,857
	<i>Hysterothylacium aduncum</i>	1	-	-	-
BACALADA	<i>Anisakis simplex</i>	2	2	0,00270	0,25000
	<i>Anisakis pegreffii</i>	1	-	-	-
	<i>Hysterothylacium aduncum</i>	0	-	-	-
BOCARTE	<i>Anisakis simplex</i>	3	3	0,00531	0,07407
	<i>Anisakis pegreffii</i>	0	-	-	-
	<i>Hysterothylacium aduncum</i>	0	-	-	-

En las muestras de merluza se observa que predominan las secuencias de *Anisakis simplex* (220) frente a las de *Anisakis pegreffii* (9) e *Hysterothylacium aduncum* (1). El número de haplotipos o números de secuencias diferentes en la muestra en los que se agrupan las secuencias de *Anisakis simplex* es de 91, en comparación a *A. pegreffii* que es 5. La diversidad haplotídica, Hd, expresada como la probabilidad de que la coger dos muestras al azar sean diferentes, corresponde con un valor 91% para *A. simplex* y de un 85% para *A. pegreffii*. Además, la diversidad nucleotídica, π , hace referencia a la probabilidad de que al coger dos secuencias al azar de la muestra difieran en una posición determinada, en este caso el valor para *A. simplex* es de 0,00934 y para *A.*

pegreffii de 0,01499. En *Anisakis simplex*, por tanto, se encuentra más variabilidad que en *Anisakis pegreffii*.

En la muestras de bacalada se observa un total de 3 secuencias, 2 pertenecientes a *A. simplex* y una a *A. pegreffii*. Dentro de *A. simplex* las 2 secuencias se agrupan en 2 haplotipos diferentes. La diversidad haplotídica, H_d , corresponde con un valor 25%. La diversidad nucleotídica, π , es de 0,00270.

Finalmente en la muestra de anchoa se observa un total de 3 secuencias pertenecientes *A. simplex*. Agrupadas en 3 haplotipos diferentes. La diversidad haplotídica es igual al 74% y la diversidad nucleotídica es igual a 0,00531.

4. DIVERSIDAD POR ESPECIES DE ANISAKIS Y HAPLOTIPOS DE LOS HOSPEDADORES

A continuación se presentan los resultados obtenidos del análisis de la diversidad de las especies de *Anisakis* y de los diferentes tipos de haplotipos que encontramos en los hospedadores. Para ayudarnos a ver más claro este punto utilizamos el software informático Network para representar los diagramas, y nuevamente el software DnaSP para calcular la diversidad haplotípica y la nucleotídica del conjunto general de *Anisakis*.

En primer lugar se representan los resultados obtenidos referentes al análisis de *Anisakis pegreffii*:

Tabla 17 Resultados obtenidos del análisis de los diferentes haplotipos de *Anisakis pegreffii* encontrados en las muestras de pescado

Número de haplotipos: 6	
Diversidad Haplotídica, Hd: 0,8889	
Haplotipo1	BAC7-1 MER4-4
Haplotipo2	MER2-1 MER10-16
Haplotipo3	MER3-7 MER8-11 MER10-13
Haplotipo4	MER8-23
Haplotipo5	MER6-27
Haplotipo6	MER6-15

Los resultados de la tabla nos muestran que el haplotipo 1 es compartido por una secuencia de ADN obtenido de merluza y por otra secuencia obtenida de bacalada. Todos los demás haplotipos corresponden a secuencias de ADN de merluza. Todos los haplotipos únicos corresponden a merluza.

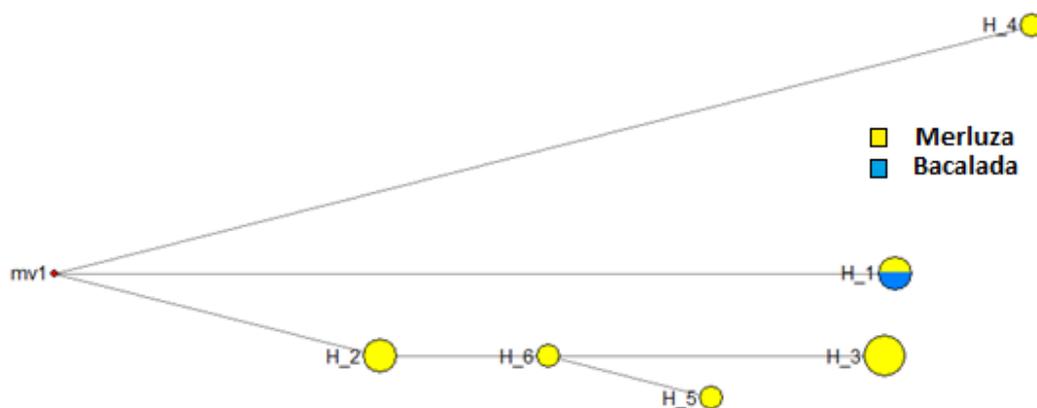


Figura 18 Esquema de radiación de los diferentes haplotipos de *Anisakis pegreffii*

El esquema de radiación de *Anisakis pegreffii* nos muestra que todos los haplotipos obtenidos tienen un ancestro común el cual no ha aparecido en este estudio. Se

observan diferencias muy significativas en el haplotipo 1 (compartido por bacalada y merluza) y el haplotipo 4. Por otro lado, se observan relaciones entre el haplotipo 2,6,5 y 3, pudiendo encontrar similitudes entre ellos.

En primer lugar se representan los resultados obtenidos referentes al análisis de *Anisakis simplex*:

Tablas 18 Resultados obtenidos del análisis de los diferentes haplotipos de *Anisakis simplex* encontrados en las muestras de pescado

Número de haplotipos: 6	
Diversidad Haplotídica, Hd: 0,8889	
Haplotipo1	MER1-1 MER1-16 MER4-11 MER4-2 MER4-9 MER4-11 MER5-4 MER5-10 MER8- MER8-43 MER8-44 MER9-18 MER10-4 MER10-10 MER15-12 MER16-6 MER16-7 MER18-5 MER18-9 MER18-17
Haplotipo2	MER1-2 MER11-11
Haplotipo3	MER1-3
Haplotipo4	MER1-4 BOC4-2_
Haplotipo5	MER1-5 MER1-9 MER1-13 MER1-15 MER1-17 MER1-19 MER1-20 MER2-3 MER2-7 MER3-8 MER3-10 MER3-17 MER3-23 MER4-8 MER4-13 MER4-15 MER5-22 MER5-1 MER5-5 MER5-8 MER5-14 MER5-20 MER6-1 MER6-6 MER6-22 MER8-25 MER8-27 MER8-30 MER8-33 MER8-34 MER8-36 MER8- 37 MER8-41_ MER8-46 MER9-1 MER9-10 MER9-12 MER9-13_ MER10-3 MER10-20MER11-6 MER11-8 MER11-10 MER11-13 MER11-17 MER14- 2MER15-8 MER15-10MER16-2 MER16-3 MER16-4 MER16-5 MER17-1 MER17-4 MER18-7 MER18-13MER18-16MER18-18 BOC4-1 BAC5-1
Haplotipo6	MER1-6 MER8-28 MER8-32 MER10-15 MER15-4
Haplotipo7	MER1-7
Haplotipo8	MER1-8 MER2-8 MER5-3 MER5-6 MER8-12 MER8-18 MER10-6 MER10-14 MER11-3 MER15-7 MER18-3
Haplotipo9	MER1-10_A210 MER3-2_A210 MER6-2_A210 MER6-32 MER15-13 MER18-11
Haplotipo10	MER1-11 MER5-21_A210 MER9-15_A210 MER18-15
Haplotipo11	MER1-14
Haplotipo12	MER1-18 MER11-9

Haplotipo13	MER2-2
Haplotipo14	MER2-4
Haplotipo15	MER2-5
Haplotipo16	MER2-6
Haplotipo17	MER3-1
Haplotipo18	MER3-3
Haplotipo19	MER3-4
Haplotipo20	MER5-3 MER8-24
Haplotipo21	MER3-6
Haplotipo22	MER3-9
Haplotipo23	MER3-11
Haplotipo24	MER3-12
Haplotipo25	MER3-25
Haplotipo26	MER3-26
Haplotipo27	MER4-12 MER8-22 MER9-20
Haplotipo28	MER4-5 MER8-48 MER18-2
Haplotipo29	MER4-6
Haplotipo30	MER4-14 BOC2-1
Haplotipo31	MER4-16
Haplotipo32	MER5-11 MER8-42 MER9-7 MER18-4
Haplotipo33	MER5-13
Haplotipo34	MER5-16
Haplotipo35	MER5-18
Haplotipo36	MER5-26
Haplotipo37	MER6-3
Haplotipo38	MER6-4

Haplotipo39	MER6-7
Haplotipo40	MER6-10
Haplotipo41	MER6-18
Haplotipo42	MER6-10
Haplotipo43	MER6-12
Haplotipo44	MER6-13 MER10-17
Haplotipo45	MER6-14
Haplotipo46	MER6-16
Haplotipo47	MER6-26
Haplotipo48	MER6-28
Haplotipo49	MER6-29
Haplotipo50	MER6-30
Haplotipo51	MER6-33
Haplotipo52	MER6-36
Haplotipo53	MER6-37 MER6-39 MER7-1
Haplotipo54	MER6-41
Haplotipo55	MER6-45
Haplotipo56	MER8-15
Haplotipo57	MER8-20 MER9-17 MER18-6 MER18-10
Haplotipo58	MER8-24
Haplotipo59	MER8-26
Haplotipo60	MER8-29
Haplotipo61	MER8-31
Haplotipo62	MER8-35
Haplotipo63	MER8-39
Haplotipo64	MER8-40
Haplotipo 65	MER8-45 MER10-18 MER10-19 MER15-2 MER18-8

Haplotipo66	MER8-47
Haplotipo67	MER8-49
Haplotipo68	MER9-3
Haplotipo69	MER9-4
Haplotipo70	MER9-8
Haplotipo71	MER9-16
Haplotipo72	MER10-1
Haplotipo73	MER10-2
Haplotipo74	MER10-5
Haplotipo75	MER10-7
Haplotipo76	MER10-8
Haplotipo77	MER10-9
Haplotipo78	MER10-11 MER11-7 BAC3-1
Haplotipo79	MER11-1
Haplotipo80	MER11-2
Haplotipo81	MER11-12
Haplotipo82	MER11-14
Haplotipo83	MER11-15
Haplotipo84	MER11-18
Haplotipo85	MER14-1
Haplotipo86	MER15-1
Haplotipo87	MER15-3
Haplotipo88	MER17-2
Haplotipo89	MER17-3
Haplotipo90	MER18-1
Haplotipo91	MER18-14

Tabla 19 Resumen de los resultados obtenidos del análisis de los diferentes haplotipos de *Anisakis simplex* encontrados en las muestras de pescado

RESUMEN	
Nº haplotipos	91
Diversidad haplotípica, Hd	0,9093
Haplotipos únicos	72
Haplotipos de más de dos secuencias	19

Los resultados obtenidos nos indican que de los 91 haplotipos encontrados 19 de ellos corresponden a más de una secuencia y 72 son haplotipos únicos. Todos los haplotipos únicos de *Anisakis simplex* tienen como hospedador merluza.

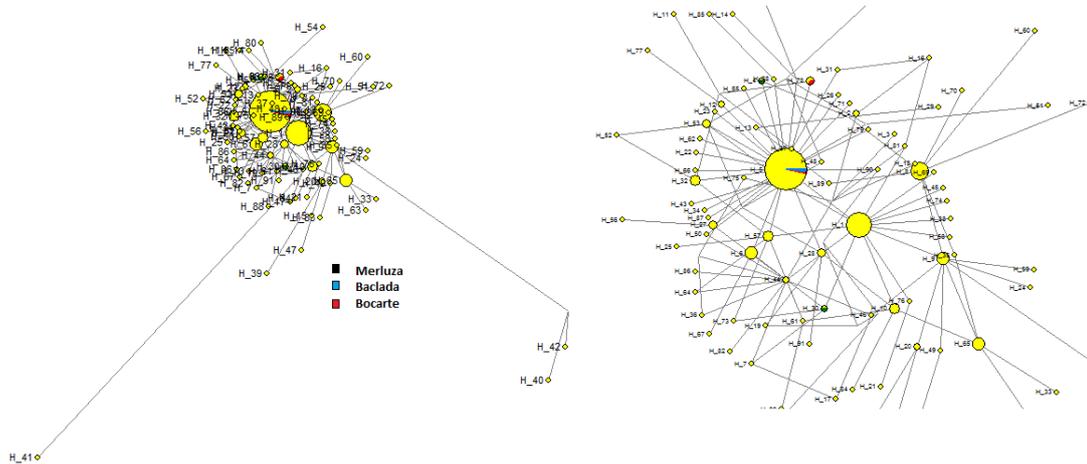


Figura 19 Esquema de radiación de los diferentes haplotipos de *Anisakis simplex*

El esquema de radiación de *Anisakis simplex* es demasiado complejo y no puede verse con claridad, aún así al igual que en la tabla anterior, se observa que existe un haplotipo común, el haplotipo 5. Dentro del haplotipo 5 encontramos secuencias pertenecientes a parásitos encontrados en merluza, bacalada y anchoa.

Finalmente, tanto en los resultados obtenidos de *Anisakis pegreffii* como de *Anisakis simplex*, se observa que solo las secuencias correspondientes a merluza tienen

haplotipos únicos. Los haplotipos con secuencias de bacalada y anchoa son compartidos con secuencias de merluza, por tanto ni anchoa ni bacalada tienen haplotipos únicos. Esto sugiere que se trata de poblaciones grandes de parásitos que pueden parasitar a varias especies de pescado diferentes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En función de los resultados obtenidos en el presente estudio, se exponen las principales conclusiones a las que se ha llegado:

- PRIMERA

Los parásitos estudiados presentes en pescados que se comercializan en la zona Cantábrica pertenecen a los géneros *Anisakis* e *Hysterothylacium*.

- SEGUNDA

Las especies predominantes de *Anisakis* han sido en su mayoría *Anisakis simplex*, seguido en menor cantidad *Anisakis pegreffii*.

- TERCERA

Las larvas de *Anisakis* han aparecido en todas las muestras de merluza analizadas.

- CUARTA

El gen Cox-2 analizado en todas las muestras ha sido útil para la identificación específica de las larvas.

- QUINTA

Solamente se han encontrado haplotipos únicos en muestras de merluza. Todos los haplotipos encontrados en bacalada y bocarte también están presentes en la merluza.

- SEXTA

Hysterothylacium guarda cierto parecido con *Anisakis* pudiendo pasar desapercibida, aunque genéticamente son especies totalmente diferentes. Esta especie merece ser estudiada desde el punto de vista de las alergias que pueda causar al ser ingerida.

Las especies de pescado que tienen mayor riesgo de producir anisakiasis o algún tipo de alergia debido a la presencia de estos parásitos son la merluza, la bacalada y el bocarte. Se debe prestar atención a los hábitos de preparación de estos pescados ya que es un factor muy importante a tener en cuenta. Concretamente de estos pescados debemos prestar atención a la anchoa, ya que muchas veces se presenta crudo sometido a procesos de escabechado o tratamientos con vinagre.

Otras medidas de prevención de problemas derivados de estos parásitos a nivel de consumidor son:

- Evitar el consumo de zonas concretas donde se acumula un mayor número de larvas.
- Evitar el consumo de pescado fresco. Es riesgo disminuye si el pescado están congelado al menos 48 horas antes de su consumo.
- Cocinar el pescado para su consumo.

Si es cierto que el problema derivado de las alergias que producen productos de las larvas es más difícil de controlar ya que estos productos no se destruyen, en ocasiones, con tratamientos térmicos o de congelación. Según la literatura científica al cocinado del pescado y del marisco a 60°C durante 10 minutos, o su congelación durante 24 horas puede matar al parásito y prevenir la infestación en el hombre. Sin embargo, los alérgenos son ligeramente termoestables y ninguno de los procesados antes descritos por calor o por frío puede prevenir de la reacción de sensibilización (Audicana *et al.*, 1997).

Finalmente, hay que recordar que no se debe suprimir el pescado de la dieta ya que tiene un valor nutricional muy elevado, simplemente se deben seguir las recomendaciones sanitarias para su consumo.

ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo

IgE: Inmunoglobulina E

Ag: Antígeno

L3: Tercer estadio Larvar

dNTPs: nucleótidos

pb: pares de bases

UV: luz ultravioleta

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

V: voltios

kDa: KiloDalton

BIBLIOGRAFÍA

A.C. BELLATERRA. "Presencia de larvas de Anisákidos (Nematoda: Ascaridoidea) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona". Trabajo Fin de Grado. Universidad Autónoma de Barcelona, 2001.

A. DEL REY-MORENO, A. VALERO-LÓPEZ, B. GÓMEZ-POZO, C. MAYORGA-MAYORGA, J. HERNÁNDEZ-QUERO, M. L. GARRIDO-TORRES-PUCHOL, M. J. TORRES-JAÉN, J. LOZANO-MALDONADO. "Usefulness of anamnesis and immunological techniques in the diagnosis of anisakidosis in patients with acute abdomen". Revista Española de Enfermedades Digestivas 2008; 100 (3).

Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/diges/v100n3/original3.pdf>

A. LÓPEZ ESPINOSA. "Distribution and abundance of anisakis simplex and its conquest of different hosts throughout its biologic cycle".

A. VALENTINI, S. MATTIUCCI, P. BONDANELLI, S. C. WEBB. A.A MIGNUCCI-GIANNONE, M.M. COLOM-LLAVINA, G. NASCETTI. "Genetic relationships among Anisakis species inferred from mitochondrial COX2 sequences, and comparison with allozyme data". J. Parasitol 2006; 156-166.

B. GÓMEZ, E. LASA, E. ARROABARREN, S. GARRIDO, M. ANDA, A.I. TABAR. "Allergy to Anisakis simplex". An. sis. sanit. Navar 2003; 26 (2): 25-30.

Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v26s2/original3.pdf>

C. GÓMEZ, U. GÉREZ, O. ZANGRÓNIZ, J. MURO, J. GONZÁLEZ, P. GARCÍA. "Reacciones de hipersensibilidad y manifestaciones digestivas producidas por la ingestión de pescado parasitado por anisakis simplex". Semergen, 1999; 25 (9): 792-797.

E. MADRID, F. GIL, M. GARCÍA, A. L. DEBENEDETTI, M. TRELIS, M. V. FUENTES. "Potential risk analysis of human anisakiasis through the consumption of mackerel, *Scomber scombrus*, sold at Spanish supermarkets". Elsevier 2016, 66: 300-305.

E. MAS, J. POZA, J. CIRIZA, P. ZARAGOZA, R. OSTA, C. RODELLAR. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)". En: Revista AquaTic 2001 (15).

Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespqr.htm>

G. ROS BERRUEZO. "Anisakidos en pescado y su relación con la seguridad alimentaria". En: Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, 2000; 13 (1): 14-32.

Disponible en: <http://www.insacan.org/racvao/anales/2000/13-2000.pdf#page=14>

J. M. CORONAS SERNA. "Modelado bioinformático tridimensional de los alérgenos Ani s 1 y Ani s 7 y respuesta IgA específica en pacientes sensibilizados a Anisakis simplex". Universidad Complutense de Madrid, 2014; 6 (4): 170-175.

Disponible en: <http://revistareduca.es/index.php/reduca/article/viewFile/1809/1825>

J.F. MARQUES, H.N. CABRAL, M. BUSI, S. D'AMELIO. "Molecular identification of *Anisakis* species from *Pleuronectiformes* off the Portuguese coast" Journal of Helminthology 2006; 80: 47-51.

J. SUZUKI, R. MURATA, M. HOSAKA, J. ARAKI. "Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and *anisakis* nematodes". International Journal of Food Microbiology 2010; 137: 88-93.

L. A. GARCÍA GONZÁLEZ, J. P. RODRIGO TAPIA, P. SÁNCHEZ LAZO, S. RAMOS, C. SUÁREZ NIETO. "Extracción de ADN con resina chelex en el análisis de la amplificación oncogénica en carcinomas de cabeza y cuello". Elsevier 2004; 55: 139-144.

Disponible

en:

http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet? f=10&pident_articulo=13097135&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=102&ty=74&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=102v55n3a13097135pdf001.pdf

L.G. ARLIAN, M.S. MORGAN, S. QUIRCE, F. MARAÑÓN, E. FERNÁNDEZ-CALDAS. "Characterization of allergens of *Anisakis simplex*". European journal of allergy and clinical immunology, 2003.

M.ªT. AUDICANA BERASATEGUI. "Alergia al *Anisakis simplex*". En: *Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA*. 1º ed. Bilbao: Nerea S.A.; 2012. 345-355.

Disponible en: <http://www.alergiafbbva.es/alergia.pdf>

R. DE NECOCHEA CAMPION, J. C. CANUL TEC. "Métodos Físicoquímicos en Biotecnología: Secuenciación de Ácidos Nucleicos". Proyecto de Investigación. Instituto de Biotecnología-Unam; 2004.

Disponible

en:

http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf

S. MATTIUCCI, G. NASCETTI, M. DAILEY, STEPHEN C. WEBB, N. B. BARROS, R. CIANCHI, L. BULLINI. "Evidence for a new species of *Anisakis Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationship between congeners*" Systematic Parasitology 2005, 61: 157-171.

S. MATTIUCCI, P. ABAUNZA. L. RAMADORI, G. NASCETTI. "Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition". Journal of Fish Biology 2004; 65: 495- 510.

S. MATTIUCCI, V. FARINA, N. CAMPBELL, K. MACKENZIE, P. RAMOS, A.L. PINTO, P. ABAUNZA, G. NASCETTI. "Anisakis spp. Larvae from Atlantic horse mackerel: their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization". El Servier 2008; 146- 151.

T. GÁRATE, C. CAÑAVATE, I. DE FUENTES, E. FERRER, L. M. GONZÁLEZ, E. RODRÍGUEZ, M^a J. PERTEGUER, M^a. FLORES-CHAVEZ, M^a. J. GUTIÉRREZ. "Herramientas moleculares para el control de enfermedades parasitarias". 2008.

Disponible en :
https://www.researchgate.net/profile/Elizabeth_Ferrer2/publication/265244791_Herramientas_moleculares_para_el_control_de_enfermedades_parasitarias/links/560995ab08ae840a08d3b861.pdf

V. MAESTRE, J. TORAL. "Parasitosis intestinal por nematodos asociada al consumo de pescado contaminado". Revista Clinica España, 2004; 204(5):264-5.

V. PRAVETTONI, L. PRIMAVESI, M. PIANTANIDA. "Anisakis simplex: current knowledge". Clinical Allergy and Immunology Unit, 2012; 44 (4): 150-156.

SITIOS WEB

<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>

<http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.htm>

www.mncn.csic.es/

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3456489/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3456489/>