

**UNIVERSITAT
DE
VALÈNCIA**



**FACULTAT
DE
FARMÀCIA**

TESIS DOCTORAL

REALIZADA EN EL DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I
PARASITOLOGIA DE LA FACULTAT DE FARMÀCIA DE LA
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Parasitología Humana y Animal

**ESTUDIO DE ANISÁKIDOS EN PESCADO
FRESCO EXPEDIDO EN SUPERMERCADOS
DE VALÈNCIA Y ANÁLISIS DEL RIESGO DE
ADQUIRIR ANISAKIDOSIS ASOCIADO A SU
CONSUMO**

por

ELENA MADRID MÁÑEZ

Directores

Dr. MÀRIUS V. FUENTES i FERRER

Profesor Titular de Parasitología

Departament de Biologia Cel·lar i Parasitologia

Facultat de Farmàcia, Universitat de València

y

Dra. MARÍA TRELIS VILLANUEVA

Profesora Contratada Doctora de Parasitología

Departament de Biologia Cel·lar i Parasitologia

Facultat de Farmàcia, Universitat de València

Valencia, 2015

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I PARASITOLOGIA

Los abajo firmantes Dr. MÀRIUS V. FUENTES i FERRER y Dra. MARÍA TRELIS VILLANUEVA, Profesor Titular y Profesora Contratada Doctora, respectivamente, del Área de Parasitología del Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, por la presente:

CERTIFICAN: que Doña ELENA MADRID MÁÑEZ ha realizado íntegramente la Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO DE ANISÁKIDOS EN PESCADO FRESCO EXPEDIDO EN SUPERMERCADOS DE VALÈNCIA Y ANÁLISIS DEL RIESGO DE ADQUIRIR ANISAKIDOSIS ASOCIADO A SU CONSUMO ” en el Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València, con el fin de optar al grado de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman la presente en Valencia a – de ----- de 2014.

Fdo.:

Dr. Màrius V. Fuentes i Ferrer

Fdo.:

Dra. María Trelis Villanueva

*A mis dos gusanitos,
Bosco y Jimena*

MADRID MÁÑEZ, ELENA, 2015.- ESTUDIO DE ANISÁKIDOS EN PESCADO FRESCO EXPEDIDO EN SUPERMERCADOS DE VALÈNCIA Y ANÁLISIS DEL RIESGO DE ADQUIRIR ANISAKIDOSIS ASOCIADO A SU CONSUMO. TESIS (DIRECTORES: M. V. FUENTES Y M. TRELIS), FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, ESPAÑA, 367 pp.

En este trabajo se investiga la presencia de anisákidos en pescado de consumo frecuente en España con el fin de evaluar el riesgo asociado; identificando morfológicamente los nematodos aislados, comparando prevalencias y abundancias de parasitación entre vísceras y musculatura, y en función de dos procedencias y dos estaciones de captura. Para ello se analizaron 1442 ejemplares de ocho especies expedidas frescas en nuestros supermercados (bacaladilla, pescadilla europea y americana, salmonete, boquerón, sardina, caballa y estornino). Se realizó un análisis estadístico para valorar que factores influyeron en las prevalencias y abundancias obtenidas. Así mismo, se analizó molecularmente una muestra representativa de larvas del género *Anisakis* mediante PCR-RFLP, para identificación de las especies.

Todas las especies hospedadoras presentaron L₃ de *Anisakis*, la mayoría de ellas también de *Hysterothylacium*. *Contracaecum* únicamente apareció en pescadilla americana. La presencia de *Anisakis* fue superior en el Atlántico, con mayores prevalencias en bacaladilla, pescadilla y caballa. La sardina y el salmonete fueron las especies menos parasitadas, siendo el salmonete el único que no presentó larvas en musculatura. Molecularmente se identificaron las especies *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* y un genotipo híbrido entre ambas, siendo estos dos últimos más frecuentes en el Mediterráneo y el primero en el Atlántico. La mayor presencia en musculatura se dio en pescadilla europea del Atlántico. La estación primavera influyó en la presencia de *Hysterothylacium*. El mayor riesgo lo presentan los ejemplares de procedencia atlántica y los de mayor tamaño, siendo el factor días pescado importante en la migración de larvas a musculatura. Por tanto, debe recomendarse consumir los ejemplares más frescos, de procedencia mediterránea y de menor tamaño.

PALABRAS CLAVE: *Anisakis pegreffii*, *Anisakis simplex* (s.s), genotipo híbrido, *Hysterothylacium*, Atlántico, Mediterráneo, riesgo de transmisión, Valencia, España.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	15
1.- INTRODUCCIÓN.....	21
1.1.- INTRODUCCIÓN GENERAL Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS .	23
1.2.- GENERALIDADES DE NEMATODOS ANISÁKIDOS	28
1.2.1.- TAXONOMÍA	28
1.2.2.- CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR	29
1.2.3.- CICLO BIOLÓGICO.....	39
1.2.4.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	44
1.3.- EPIDEMIOLOGÍA	47
1.3.1.- FACTORES DE RIESGO	48
1.4.- ANISAKIDOSIS HUMANA.....	53
1.4.1.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS	53
1.4.2.- SINTOMATOLOGÍA Y PATOLOGÍA.....	54
1.4.3.- DIAGNÓSTICO	64
1.4.4.- TRATAMIENTO	68
1.5.- MEDIDAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL	70
1.5.1.- TRATAMIENTOS FÍSICOS.....	72
1.5.2.- TRATAMIENTOS QUÍMICOS.....	74
1.6.- LEGISLACIÓN	75
1.7.- OBJETIVOS	77
2.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
2.1.- MATERIAL	81
2.1.1.- CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA DE LAS ESPECIES DE PESCADO ANALIZADAS.....	81
2.1.2.- OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE HOSPEDADORES.....	82
2.1.3.- DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES HOSPEDADORAS ANALIZADAS	86
2.1.3.1.- Bacaladilla (<i>Micromesistius poutassou</i>)	86

Índice

2.1.3.2.- Pescadilla europea (<i>Merluccius merluccius</i>)	89
2.1.3.3.- Pescadilla americana (<i>Merluccius bilinearis</i>).....	91
2.1.3.4.- Salmonete de fango (<i>Mullus barbatus</i>).....	93
2.1.3.5.- Boquerón (<i>Engraulis encrasicolus</i>).....	95
2.1.3.6.- Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>)	98
2.1.3.7.- Caballa (<i>Scomber scombrus</i>).....	101
2.1.3.8.- Estornino (<i>Scomber japonicus</i>)	104
2.2.- MÉTODOS	106
2.2.1.- OBTENCIÓN DEL MATERIAL HELMINTOLÓGICO	106
2.2.1.1.- Toma de datos de las muestras	106
2.2.1.2.- Observación de las vísceras y aislado de L ₃	107
2.2.1.3.- Digestión péptica de la musculatura y aislado de L ₃	108
2.2.2.- MONTAJE E IDENTIFICACIÓN DE LOS HELMINTOS HALLADOS	110
2.2.2.1.- Montaje extemporáneo	110
2.2.2.2.- Identificación morfológica	110
2.2.2.3.- Identificación molecular	111
2.2.2.3.1.- Extracción de DNA.....	111
2.2.2.3.2.- PCR-RFLP	113
2.2.3.- CONFECCIÓN DE LA BASE DE DATOS	120
2.2.4.- TÉCNICAS ESTADÍSTICAS UTILIZADAS	122
2.2.4.1.- Estadística descriptiva	122
2.2.4.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2	124
2.2.4.3.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria	125
2.2.4.4.- Comparación de abundancias	127
2.2.4.4.1.- Test de Mann-Whitney (muestras no relacionadas).....	127
2.2.4.4.2.- Test de Wilcoxon (muestras relacionadas)	127

2.2.4.5.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias.....	128
2.2.4.5.1.- Rho de Spearman.....	128
2.2.4.5.2.- Análisis de Varianza (ANOVA)	128
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	129
3.1.- BACALADILLA.....	133
3.1.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS	133
3.1.1.1.- Aislado e identificación morfológica	133
3.1.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP.....	135
3.1.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	137
3.1.2.1.- Estadística descriptiva	137
3.1.2.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2	142
3.1.2.3.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria	143
3.1.2.4.- Comparación de abundancias	145
3.1.2.5.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias.....	148
3.1.3.- DISCUSIÓN.....	151
3.2.- PESCADILLA EUROPEA	161
3.2.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS	161
3.2.1.1.- Aislado e identificación morfológica	161
3.2.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP.....	164
3.2.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	166
3.2.2.1.- Estadística descriptiva	166
3.2.2.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2	171
3.2.2.3.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria	172
3.2.2.4.- Comparación de abundancias	175
3.2.2.5.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias.....	177

Índice

3.2.3.- DISCUSIÓN.....	179
3.3.- PESCADILLA AMERICANA.....	187
3.3.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS	187
3.3.1.1.- Aislado e identificación morfológica	187
3.3.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP.....	189
3.3.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	190
3.3.2.1.- Estadística descriptiva	190
3.3.2.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2	193
3.3.2.3.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria	194
3.3.2.4.- Comparación de abundancias	195
3.3.2.5.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias.....	197
3.3.3.- DISCUSIÓN.....	198
3.4.- SALMONETE DE FANGO	202
3.4.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS	202
3.4.1.1.- Aislado e identificación morfológica	202
3.4.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP.....	203
3.4.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	203
3.4.2.1.- Estadística descriptiva	203
3.4.2.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2	207
3.4.2.3.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria	208
3.4.2.4.- Comparación de abundancias	209
3.4.2.5.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias.....	211
3.4.3.- DISCUSIÓN.....	212
3.5.- BOQUERÓN.....	217
3.5.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS	217

3.5.1.1.- Aislado e identificación morfológica	217
3.5.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP.....	218
3.5.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	220
3.5.2.1.- Estadística descriptiva	220
3.5.2.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2	225
3.5.2.3.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria	227
3.5.2.4.- Comparación de abundancias	231
3.5.2.5.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias.....	234
3.5.3.- DISCUSIÓN.....	237
3.6.- SARDINA	244
3.6.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS	244
3.6.1.1.- Aislado e identificación morfológica	244
3.6.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP.....	244
3.6.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	245
3.6.2.1.- Estadística descriptiva	245
3.6.2.2.- Comparación de Prevalencias: Test de χ^2	250
3.6.2.3.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria	251
3.6.2.4.- Comparación de abundancias	252
3.6.2.5.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias.....	254
3.6.3.- DISCUSIÓN.....	255
3.7.- CABALLA	260
3.7.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS	260
3.7.1.1.- Aislado e identificación morfológica	260
3.7.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP.....	261
3.7.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	262

Índice

3.7.2.1.- Estadística descriptiva	262
3.7.2.2.- Comparación de Prevalencias: Test de χ^2	266
3.7.2.3.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria	267
3.7.2.4.- Comparación de abundancias	269
3.7.2.5.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias.....	271
3.7.3.- DISCUSIÓN.....	272
3.8.- ESTORNINO	279
3.8.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS	279
3.8.1.1.- Aislado e identificación morfológica	279
3.8.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP.....	279
3.8.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	281
3.8.2.1.- Estadística descriptiva	281
3.8.2.2.- Comparación de Prevalencias: Test de χ^2	284
3.8.2.3.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria	285
3.8.2.4.- Comparación de abundancias	286
3.8.2.5.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias.....	288
3.8.3.- DISCUSIÓN.....	289
4.- SÍNTESIS DE RESULTADOS.....	293
5.- DISCUSIÓN GENERAL.....	299
6.- CONCLUSIONES.....	309
BIBLIOGRAFÍA	315

AGRADECIMIENTOS

El camino recorrido durante la realización de esta Tesis ha sido para mí largo y duro, parecía no tener fin, pero todo llega. En este tiempo he tenido la suerte de compartir buenos momentos con mejores personas a las que aprecio y tengo mucho que agradecer, no solamente por los conocimientos adquiridos en el área de la Parasitología sino también por los momentos compartidos, buenos y en ocasiones no tan buenos.

En primer lugar, agradezco a mis directores, Màrius V. Fuentes y María Trelis, no solo el haber aceptado la dirección de esta tesis y todo lo que ello conllevaba, también su disponibilidad, sus conocimientos y su tiempo. A Màrius doblemente, ya que fue el tutor de mi Tesis de Maestría, por querer seguir dirigiéndome también en este trabajo y por su paciencia infinita conmigo. Gràcies una altra vegada.

En segundo lugar, a todos aquellos que me precedieron en la línea de investigación de anisákidos en este departamento, Sandra Mejally, Florimar Gil, Manuel Santana y Sandra Sáez, por todas sus aportaciones; especialmente a Manuel Santana (al cual no he tenido la suerte de conocer en persona), ya que su trabajo fue mi guía. A todos los venezolanos que coincidieron conmigo en el laboratorio, Willy, Ammar, Glorielys, Yolanda, Mariana, Adriana Carolina, Dily, especialmente a Marian Menéndez, por tantas risas y buenos momentos compartidos. También a Frank, aunque no coincidiéramos en el laboratorio, por sus aportaciones y por sufrir mis rápidas explicaciones en biología molecular. Por último, y no por ello menos importante, quiero expresarle mi enorme agradecimiento a Ángela Debenedetti, doctoranda de este departamento y autora de los mejores dibujos de anisákidos que había visto hasta ahora, por su incondicional ayuda, disponibilidad en todo momento, la gran cantidad de horas

Agradecimientos

dedicadas y aportaciones realizadas en esta línea. Su nombre lo dice todo.

Al resto de compañeros de laboratorio con los que coincidí en alguna ocasión, perdonadme si me olvido de alguien, Amparo, Lucía, Raquel, Carla, Jesmil, Lis, Vivi, Patricio, Kouhbane, Nacho, Sandra, Maria José, Melissa, ..., por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio; a Alba que fue con quien más tiempo coincidí y compartimos un par de aventuras y desventuras (también a su madre, que me consiguió caballas del mediterráneo, tan difíciles de encontrar).

A mis primeros compañeros, los del Máster, por tantos buenos momentos compartidos; Pau, Rodrigo, Helmuth, Nalfer (Paco para los amigos), Marta, Rita, y a las que compartieron equipo conmigo porque nuestros trabajos dieron muy buenos resultados, Eva, Lorena, Andrea y especialmente a Caro Lenis. A Alicia, con la que empecé el Máster y continuamos juntas también en la Tesis Doctoral, gracias por tu amistad y los buenos ratos compartidos, que han sido muchos.

A todos los profesores del Departamento de Parasitología, Carla Muñoz, M^a Teresa Galán, Santiago Mas Coma, M^a Dolores Barges, Adela Valero, Guillermo Esteban, Rafael Toledo, Antonio Marcilla, especialmente a María Trelis y Màrius Fuentes.

A Araceli y al resto de personal del laboratorio, por tener siempre el material preparado, y a Clemente, Administrativo del Departamento por su disponibilidad.

No puedo olvidarme de mis amig@s fuera, los de toda la vida, mis compañeras de carrera y mis amigos del Capaso, que me conocen y me aceptan tal como soy. Por ayudarme a desconectar cuando más lo necesitaba haciendo que cada

momento fuera único.

Y por último, lo más importante, a mi gran familia, mis padres, herman@s y sobrin@s, porque cada momento vivido con vosotros ha sido y es especial. Mi agradecimiento extremo a quienes más lo merecen, a Ernesto, que siempre ha estado a mi lado, ayudándome, apoyándome y confiando plenamente en mí, también por haberme dado el mejor regalo, a mis hijos, los que más me han sufrido, aguantando mis ausencias y mal humor en algunas ocasiones y a los que quiero pedir perdón por tantas horas robadas.

Para la realización de esta tesis no he tenido la ocasión de disfrutar de una beca pre doctoral ni de ninguna clase de ayuda económica, únicamente la ilusión de investigar y las ganas de trabajar han hecho que llegara a buen fin. Este trabajo también ha dado como fruto la publicación de dos artículos, así como algunas presentaciones y comunicaciones orales en diferentes congresos.

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- INTRODUCCIÓN GENERAL Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El pescado constituye uno de los pilares básicos en nuestra dieta ocupando un lugar destacado en la alimentación humana. En algunos países es el principal aporte de proteínas de origen animal y desde hace décadas figura entre los integrantes más importantes de la dieta mediterránea, siendo su consumo muy recomendado por especialistas, ya que, en general, presenta un contenido calórico bajo, siendo una buena fuente de proteínas de alto valor biológico, aportando a su vez vitaminas, minerales y ácidos grasos ω -3, muy beneficiosos en la prevención de algunas enfermedades crónicas ([INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE MADRID, 2005](#)). Por estos motivos constituye un alimento insustituible en nuestra alimentación, pero también figura entre los productos con mayor riesgo de transmisión de parásitos al ser humano ([CHAPPUIS & LOUTAN, 2006](#)).

La presencia de parásitos en el pescado es un fenómeno generalizado e imposible de eliminar de las poblaciones de peces, ya que los factores ecológicos que determinan las infecciones parasitarias escapan habitualmente a nuestro control. Aunque son muchas las especies de helmintos que parasitan a peces, solo algunas son zoonóticas y causan problemas de Salud Pública por sus formas infestantes para el ser humano: larvas de nematodos, metacercarias de trematodos y plerocercoides de cestodos.

Los parásitos no siempre generan alteraciones fisiológicas importantes en sus hospedadores, sin embargo, evidencias científicas demuestran que existen muchos problemas asociados a sus efectos en tejidos y órganos (VUONG et al., 1999). Además, se han relacionado con un gran número de enfermedades emergentes asociadas al consumo de alimentos (KEISER & UTZINGER, 2005; TORRES et al., 2007), debido al impacto de estos sobre la producción mundial y también sobre la salud del consumidor (GAJADHAR et al., 2006).

La presencia de nematodos en peces aparece documentada desde el siglo XIII (MYERS, 1976), pero adquiere importancia en los años sesenta del siglo XX, cuando se aprecian cambios significativos en su prevalencia, con la consecuente disminución de ingresos para la industria pesquera (SMITH & WOOTTEN, 1978; McCLELLAND et al., 1985).

Entre los nematodos, los más importantes son las larvas vivas de anisákidos (BOUREE et al., 1995; CHAI et al., 2005), no solo por su alta prevalencia y ubicuidad en los ecosistemas, sino también por su potencial para generar enfermedades. Los nematodos de la familia Anisakidae están ampliamente distribuidos y su transmisión se produce en el agua, incluyendo invertebrados acuáticos y peces como hospedadores intermediarios (necesarios para el desarrollo del ciclo) y paraténicos (de transporte, dentro de los cuales el parásito no evoluciona) (ANDERSON, 2000; ZHANG et al., 2007).

En la anisakidosis, la especie humana se convierte en hospedador accidental por el consumo de pescado marino o cefalópodos crudos o poco cocinados; por tanto, se producirán más casos en aquellas zonas donde existan estas costumbres

culinarias, como Japón, regiones costeras de Europa y Estados Unidos (HOCHBERG & HAMER, 2010).

Las anisakidosis se clasifican en función del agente causal involucrado en cada caso (IGLESIAS et al., 2002): anisakiosis o anisakiasis, causada por especies del género *Anisakis* (alrededor del 95% de los casos diagnosticados), pseudoterranovosis, producida por *Pseudoterranova* (3% de los casos, más leve y no invasiva) y contraeacosis, cuyos responsables son especies del género *Contraeacum* (muy poco frecuente). Del género *Hysterothylacium*, perteneciente a la familia Rhabdascaridae, se conocen pocas referencias en la literatura médica: una larva en un humano adulto (NORRIS & OVERSTREET, 1976) y un caso de anisakidosis no invasiva con la presencia de un adulto hembra en las heces del paciente (YAGI et al., 1996), aunque no hay que descartar la posibilidad de que la presencia de sus alérgenos en pescado pueda producir alergias alimentarias.

Las especies pertenecientes al género *Anisakis* son las de mayor importancia debido a su extensa distribución geográfica y amplia frecuencia de aparición en el pescado de consumo habitual, dado que pueden encapsularse en vísceras y en tejido muscular, conservando su capacidad de infección. En la actualidad se han reportado más de 33.000 casos de anisakidosis en más de 26 países, incluyendo Asia, Europa occidental (FELDMEIER et al., 1993; BOUREE et al., 1995; AUDÍCAN et al., 2002), Estados Unidos (AMIN et al., 2000), Canadá (COUTURE et al., 2003), Chile (MERCADO et al., 2001), Nueva Zelanda (PALTRIDGE et al., 1984) y Egipto (COCHETON et al., 1991). Cabe destacar que aproximadamente el 95 % de casos han sido diagnosticados en Japón, donde se producen alrededor de dos mil casos nuevos al año (CHAI et al., 2005;

UMEHARA et al., 2007; YORIMITSU et al., 2013), siendo las especies de *A. simplex complex* los principales agentes causales de anisakiasis (ARIZONO et al., 2012; PRAVETTONI et al., 2012).

Aunque el primer caso de parasitación fue descrito en 1876 por Leucckrat en un niño groenlandés, la enfermedad fue más ampliamente descrita entre los años 1950 y 1960 al producirse más casos en Holanda (154 entre 1955 y 1968) por ingestión de arenques escabechados. En 1960 se identificó como larva del tercer estadio de *A. simplex* (VAN THIEL, 1960). Desde mediados de los años cincuenta, en que se publicaron los primeros casos en Holanda y Japón, se han ido comunicando nuevos casos en diferentes países, como España, Francia, Reino Unido, EEUU y Alemania principalmente, dependiendo de los hábitos de consumo de pescado crudo o poco cocinado (PRAVETTONI et al., 2012). En España el primer caso se describió en 1991 (ARENAL VERA et al., 1991). Desde esa fecha hasta 1996 se habían publicado alrededor de 6 casos, siendo la anisakiasis una patología anecdótica (LÓPEZ PEÑAS et al., 2000).

Los anisákidos plantean un riesgo para la salud en dos sentidos: a través de la infección por helmintos al comer pescado no elaborado y/o reacciones alérgicas a los antígenos que quedan en él, ya que en 1995 los alergólogos españoles encontraron casos de reacciones alérgicas tras consumo de pescado presumiblemente bien cocinado, con hallazgo de pruebas cutáneas positivas e IgE específica a *A. simplex* (AUDICANA et al., 1995).

Desde el primer caso descrito en España se ha observado un aumento progresivo en las investigaciones sobre esta parasitosis, teniendo además un impacto importante a nivel social. El aumento de la incidencia, incluso en países donde el consumo de pescado es poco habitual, ha motivado un aumento de la preocupación y ha llevado a cuestionar la eficacia de las medidas preventivas aplicadas en algunos países.

España es el segundo país con mayor consumo per cápita de pescado y marisco de la Unión Europea después de Portugal. Según la Food and Agriculture Organization ([FAO](#)), el consumo por habitante en nuestro país fue de 28,2 Kg en 2012. El pescado representa más del 60% de las ventas de productos pesqueros (dentro de los cuales, la merluza representa más del 25% del total de la demanda), llegando al consumidor final principalmente a través de supermercados (43,3% de cuota de mercado) o hipermercados (entre ambos, el 78,3% del total en 2012). Los principales grupos minoristas de alimentos que operan en España son: Mercadona, Carrefour, Alcampo, Eroski Grupo (Eroski, Caprabo) y Distribuidora Internacional de Alimentos (Día). El mayor porcentaje del consumo se concentró en los hogares (79,8%), mientras que la restauración comercial y social supuso el % restante ([MARTÍN, 2008](#); [MERCASA, 2009](#); [MARM, 2010](#)). A pesar de todo, la incidencia de la anisakidosis es baja, aunque hoy todavía se considera una enfermedad infradiagnosticada ([NAVARRO CANTARERO et al., 2005](#)). En los hospitales se diagnostican entre 200-300 casos al año, pero solo se declaran unos pocos al Departamento de Salud ([REPISO ORTEGA et al., 2003](#)).

1.2. GENERALIDADES DE NEMATODOS ANISÁKIDOS

1.2.1.- TAXONOMÍA

La familia Anisakidae incluye hasta la fecha ocho géneros según la base de datos de la [NCBI TAXONOMY BROWSER \(www.ncbi.nlm.nih.gov\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Muchas de sus especies son de importancia médica o veterinaria y algunas con gran importancia económica, siendo *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum* parásitos de hospedadores de sangre caliente, ballenas, focas y aves piscívoras (BERLAND, 2006), y los agentes causales de zoonosis en humanos por consumo de pescado crudo o insuficientemente cocinado. *Hysterothylacium*, el otro género que aparece frecuentemente en pescados de consumo, pertenece a la familia Raphidascarididae.

Phylum Nematoda

Clase Chromadorea

Orden Ascaridida

Superfamilia Ascaridoidea

Familia Anisakidae

Género *Anisakis* (Dujardin, 1845)

Género *Contracaecum* (Railliet et Henry, 1913)

Género *Ophidascaris*

Género *Phocascaris*

Género *Pseudanisakis*

Género *Pseudoterranova* (Krabbe, 1878)

Género *Sulcascaris*

Género *Terranova*

Familia Ascarididae

Familia Heterocheilidae

Familia Quimperiidae

Familia Raphidascarididae

Género *Goezia*

Género *Hysterothylacium* (Ward et Magath, 1917)

Género *Iheringascaris*

Género *Raphidascaris*

Familia Toxocaridae

1.2.2.- CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR

La morfología de estos nematodos se ha estudiado ampliamente (BERLAND, 1961, 1964; OSCHÉ, 1963; DAVEY, 1971; HARTWICH, 1974; SPRENT, 1977, 1978, 1979, 1983; DEARDOFF & OVERSTREET, 1979; GIBSON, 1983; FAGERHOLM & GIBSON, 1987; FAGERHOLM, 1989, 1991; BRUCE & CANNON, 1990; entre otros) existiendo mucha controversia en su sistemática, debido a que las claves utilizadas para su clasificación se basaban en características morfológicas (principalmente del tracto digestivo y del sistema excretor) de

escasa significancia taxonómica y solo válidas para adultos (principalmente machos), resultando muy difícil la clasificación a nivel de especie, sobre todo para los estadios larvarios (MATTIUCCI & NASCETTI, 2008).

A lo largo de las dos últimas décadas ha aumentado la diversidad de especies debido a la introducción de técnicas moleculares que han permitido detectar especies gemelas muy similares a nivel morfológico pero aisladas reproductivamente. Esto conduce a la necesidad de clasificar estos nematodos utilizando métodos moleculares con marcadores genéticos. La primera herramienta utilizada fue la electroforesis aloenzimática (19-24 locus) que reveló la existencia de una elevada heterogeneidad genética entre morfoespecies de *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum* (BULLINI et al., 1986; MATTIUCCI et al., 1986; NASCETTI et al., 1986; PAGGI et al., 1991), aumentando rápidamente la detección de especies gemelas pertenecientes a estos tres géneros, así como la detección de nuevas especies. Mediante esta técnica se demostró el aislamiento reproductivo y la ausencia de flujo genético entre especies gemelas simpátricas y alopátricas (PAGGI et al., 1991; NASCETTI et al., 1993; MATTIUCCI et al., 1997, 2001, 2003, 2005), lo cual además permitió establecer relaciones genéticas e identificar estadios larvarios carentes de características morfológicas diferenciables (BULLINI et al., 1986, 1997; MATTIUCCI et al., 1986, 1997, 1998, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008a,b,c; NASCETTI et al., 1986, 1993; ORECCHIA et al., 1986a,b, 1994; PAGGI et al., 1991, 1998, 2000, 2001; PAGGI & BULLINI, 1994; ARDUINO et al., 1995; MATTIUCCI & NASCETTI, 2006, 2008).

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) confirmó los datos obtenidos por marcadores aloenzimáticos. Así, las referencias individuales caracterizadas por aloenzimas se utilizaron para identificación de especies basadas en el DNA, quedando demostradas algunas hipótesis evolutivas, análisis comparativos de caracteres morfológicos y ciclos de vida (NADLER, 1992, 1995, 2005; NADLER & HUDSPETH, 1998; ZHU et al., 2000).

Los anisákidos comparten los rasgos comunes de todos los nematodos: cuerpo vermiforme, sección redondeada y falta de segmentación. La cavidad corporal es estrecha, la boca se encuentra en el lado anterior, rodeada de proyecciones que se utilizan para sentir y alimentarse, con el ano ligeramente fuera del lado posterior. La epidermis segrega una cutícula en capas que protege al cuerpo de los jugos digestivos.

Aparte de las características propias de los ascaroideos, los anisákidos poseen caracteres morfológicos propios, como son el ventrículo, en ocasiones apéndice ventricular, ciego intestinal o ambos, sistema excretor asimétrico y anillos cuticulares sin espinas (HARTWICH, 1974).

Anisakis

Su clasificación se había basado tradicionalmente en la morfología de los adultos. Según DAVEY (1971), las únicas características de valor sistemático serían la longitud y el diámetro del ventrículo esofágico, así como el tamaño de las espículas y la distribución de las papilas caudales en el macho, y la posición de la vulva en la hembra.

Los especímenes de este género presentan: tres labios sin interlabios y un diente simple, con glándula excretora que se abre entre los labios ventrolaterales; esófago con porción anterior muscular y ventrículo posterior oblongo, a veces sigmoideo o tan ancho como largo. Carecen de apéndice ventricular y de ciego intestinal. La vulva está situada en el medio o primer tercio del cuerpo en las hembras. Las espículas del macho son desiguales y presenta numerosas papilas preanales y postanales, que incluyen un grupo de tres o cuatro pares cerca del extremo posterior. Las características propuestas por otros autores para el reconocimiento de los estadios larvarios (BERLAND, 1961; SHIRAKI, 1974) no resultan útiles para identificar hasta el nivel específico.

Según BERLAND (1961), las larvas de *Anisakis* pueden diferenciarse en tipo I y tipo II en base a la longitud del ventrículo esofágico y la presencia o no de mucrón terminal. Actualmente, la existencia de estos dos tipos se deduce claramente del análisis filogenético basado en los datos aloenzimáticos y el análisis de la secuencia del DNA mitocondrial de todas las especies caracterizadas genéticamente (MATTIUCCI et al., 2001; MATTIUCCI & NASCETTI, 2006; VALENTINI et al., 2006). Un morfotipo comprende las larvas clasificadas como *Anisakis* tipo I (*sensu* Berland, 1961) y el otro morfotipo las clasificadas como *Anisakis* tipo II (*sensu* Berland, 1961) (MATTIUCCI et al., 2005; VALENTINI et al., 2006). Las especies comprendidas en cada uno de los grupos, así como sus características morfológicas diferenciales se detallan en la tabla 1.1.

Tabla 1.1.- Clasificación de los morfotipos de L₃ de *Anisakis* (*sensu* Berland, 1961).

<u><i>Anisakis</i> Tipo I</u>	<i>A. simplex</i> (s.s.)
<i>A. simplex</i> (s.l.)	<i>A. pegreffii</i>
	<i>A. simplex</i> C
ventrículo largo y mucrón terminal	<i>A. ziphidarum</i>
	<i>A. typica</i>
	<i>A. nascettii</i>
<u><i>Anisakis</i> Tipo II</u>	<i>A. physeteris</i>
ventrículo corto y sin mucrón	<i>A. paggie</i>
	<i>A. brevispiculata</i>

En la actualidad el género *Anisakis* comprende nueve especies identificadas (MATTIUCCI et al., 2009; MATTIUCCI et al., 2014):

- *A. pegreffii* Campana-Rouget et Biocca, 1955; *A. simplex* (*sensu stricto*) (Rudolphi, 1809) y *A. simplex* C* Nascetti et al., 1986 son tres especies gemelas, morfológicamente indiferenciables. Al conjunto de estas tres especies se le denomina *A. simplex* (*sensu lato*) o *A. simplex* complex, en el cual también se incluye el genotipo híbrido *A. simplex* x *A. pegreffii*.
- *A. typica* (Diesing, 1860), *A. nascettii* Mattiucci et al., 2009 y *A. ziphidarum* (Paggi et al., 1988) forman, junto al complejo anterior, el grupo llamado *Anisakis* tipo I.
- *A. physeteris* (Baylis, 1923), *A. brevispiculata* Dollfus, 1966 y *A. paggiae* Mattiucci et. al, 2005 forman el grupo llamado *Anisakis* tipo II.

* MATTIUCCI et al. (2014) proponen *A. berlandi* n. sp. como nuevo nombre para *A. simplex* C.

Pseudoterranova

Anteriormente conocido como *Terranova* y *Phocanema*, su morfología es similar a la de *Anisakis* pero presenta además un ciego intestinal corto (BERLAND, 1989). Su hospedador definitivo comprende diversas especies de focas, presentando una distribución cosmopolita (NADLER et al., 2005). Al igual que ocurre con *Anisakis*, la clasificación morfológica resulta difícil, sobre todo a nivel de los estadios larvarios, y las herramientas moleculares han favorecido enormemente su clasificación específica y el hallazgo de especies gemelas indiferenciables a nivel morfológico (MATTIUCCI & NASCETTI, 2008).

Contracaecum

Se caracteriza por la presencia tanto de ciego intestinal anterior como de apéndice ventricular proyectado hacia la parte posterior (de ahí su nombre); también poseen tres labios pero, a diferencia de los anteriores, los interlabios están bien desarrollados. Sus hospedadores definitivos son aves acuáticas y focas; los adultos presentes en ellos pueden identificarse a nivel de especie pero las larvas presentes en pescados son indiferenciables si no se recurre a técnicas moleculares para ello, habiéndose identificado también especies gemelas. Las relaciones filogenéticas entre las especies de los géneros *Contracaecum* y *Phocascaris*, basándose en DNA ribosomal, fueron estudiados por NADLER et al. (2000, 2005).

Hysterothylacium

Se han descrito en todo el mundo un elevado número de especies del género *Hysterothylacium* parásitas de pescado (GOPAR-MERINO et al., 2005). Sin embargo, sus larvas se han confundido en muchas ocasiones con las del género *Contracaecum* basándose en identificaciones morfológicas únicamente (LOPES et al., 2011). Hasta la fecha hay once especies identificadas y un elevado número de taxones por identificar según la base de datos de la NCBI TAXONOMY BROWSER (www.ncbi.nlm.nih.gov).

En el Atlántico norte, Mar del Norte, Mar Báltico, Mediterráneo y aguas adyacentes templadas y frías, la especie *H. aduncum* es un parásito muy común en peces (PALM et al., 1999), pero su taxonomía presenta una gran ambigüedad y no sería sorprendente que en un futuro estudios moleculares revelaran a *H. aduncum* como un todavía desconocido complejo de especies gemelas (BALBUENA et al., 1998), debido a que este parásito presenta muy baja especificidad de hospedador y a que ya han sido detectadas especies gemelas en sus congéneres, como *H. fabri* (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2003).

Morfológicamente las L₃ de este género se caracterizan según BERLAND (1989, 2006) y GRABDA (1991) por ser alargadas, de color amarillento, delicadas, con una longitud de 6-20 mm; poseen tres labios bucales grandes y un ventrículo esofágico apenas presente y muchas veces de difícil visualización; con ciego intestinal y apéndice ventricular proyectados en sentidos opuestos; el extremo final es puntiagudo y con mucrón y, a diferencia de *Contracaecum*, el poro excretor está situado a la altura del anillo nervioso. Su extremo final en forma de cactus le permite nadar en el contenido intestinal, así, cuando el pez

Introducción

muere, es común ver salir las larvas desde el estómago a través de las branquias o por la boca, incluso moverse por el intestino y salir por el orificio anal del pez. *H. aduncum* puede vivir prácticamente en todas las especies teleósteas como larva y adulto (BERLAND, 2006).

En la figura 1.1 y en la tabla 1.2 se muestran las principales características morfológicas diferenciales de los cuatro géneros.

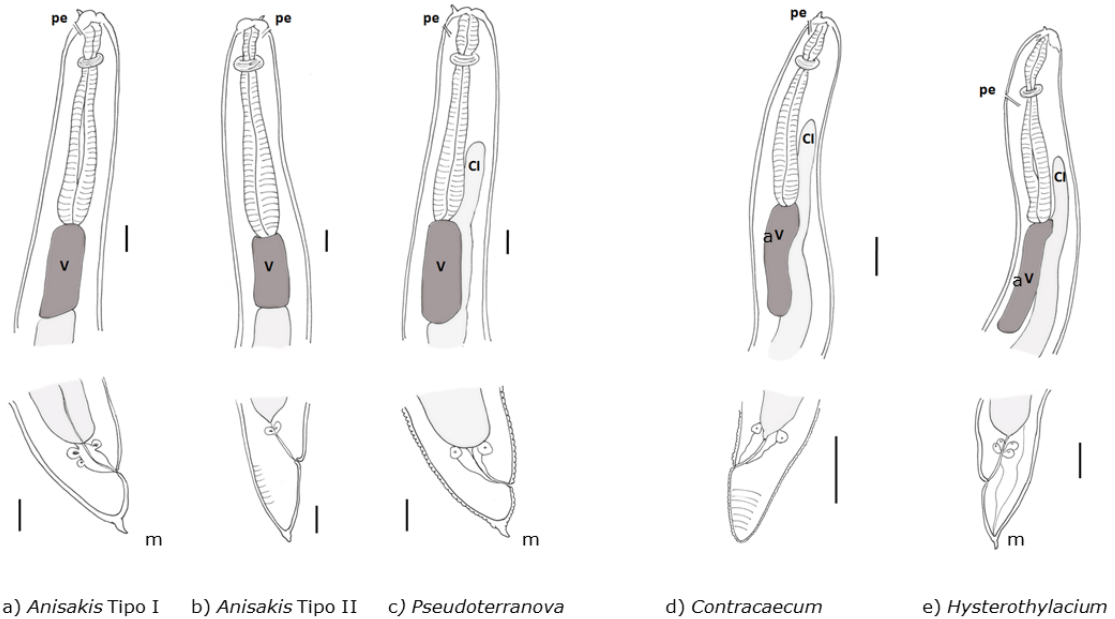


Figura 1.1.- Extremo anterior, esófago y extremo posterior de L₃ de nematodos anisákidos. a) *Anisakis* Tipo I; b) *Anisakis* Tipo II; c) *Pseudoterranova*; d) *Contraeaecum* y e) *Hysterothylacium*. pe: poro excretor, v: ventrículo, ci: ciego intestinal, av: apéndice ventricular, m: mucrón. Escala=0,2 mm (Dibujos: A. Debenedetti, 2014).

Introducción

Tabla 1.2.- Características morfológicas de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contraecum* e *Hysterothylacium*.

CARACTERÍSTICAS	<i>Anisakis</i> (Tipo I)	<i>Pseudoterranova</i>	<i>Contraecum</i>	<i>Hysterothylacium</i>
COLOR	Blanco	Amarillo-rojizo	Blanquecino	Amarillento
TAMAÑO	7-40 mm	25-45 mm	4-30 mm	6-20 mm
EXTREMO ANTERIOR	3 labios pequeños, con dentículo	3 labios pequeños, con dentículo	3 labios prominentes con dentículo	3 labios grandes, con diente cuticular
VENTRÍCULO	Alargado, glandular	Alargado	Pequeño y esférico	Inapreciable
APÉNDICE VENTRICULAR	No	No	Hacia el polo posterior	Hacia el polo posterior
CIEGO INTESTINAL	No	Hacia el polo anterior	Hacia el polo anterior	Hacia el polo anterior
EXTREMO POSTERIOR	Romo, con mucrón	Romo, mucrón más largo	Cola cónica, sin mucrón	Puntiagudo, con mucrón
PORO EXCRETOR	En la base de los labios	En la base de los labios	En la base de los labios	A la altura del anillo nervioso

1.2.3.- CICLO BIOLÓGICO

Los ciclos de vida de los nematodos anisákidos son complejos e implican a un elevado número de especies hospedadoras muy diferentes; los factores que regulan su abundancia geográfica todavía no son del todo conocidos, complicándose más aún su distribución por las migraciones de los peces infestados (PETRIE & WOOTTEN, 2009). Los pinnípedos, hospedador final de *Pseudoterranova*, viven en zonas costeras mientras que los cetáceos, principales hospedadores definitivos de *Anisakis* son más abundantes en alta mar (WOOTTEN & WADDELL, 1977).

El trabajo de diversos autores (OSHIMA, 1972; SLUITERS, 1974; PIPPY & VAN BANNING, 1975; SMITH & WOOTTEN, 1978) y los resultados más recientes obtenidos de datos basados en la aplicación de técnicas moleculares (NASCETTI et al., 1986; MATTIUCCI et al., 1986, 1997, 2001; MATTIUCCI & NASCETTI, 2008), han aportado nuevas contribuciones al esclarecimiento de muchos aspectos del ciclo biológico de *Anisakis* y de sus preferencias por diversas especies de cetáceos como hospedadores definitivos.

En la figura 1.2 se muestra un ciclo de vida generalizado para los nematodos anisákidos.

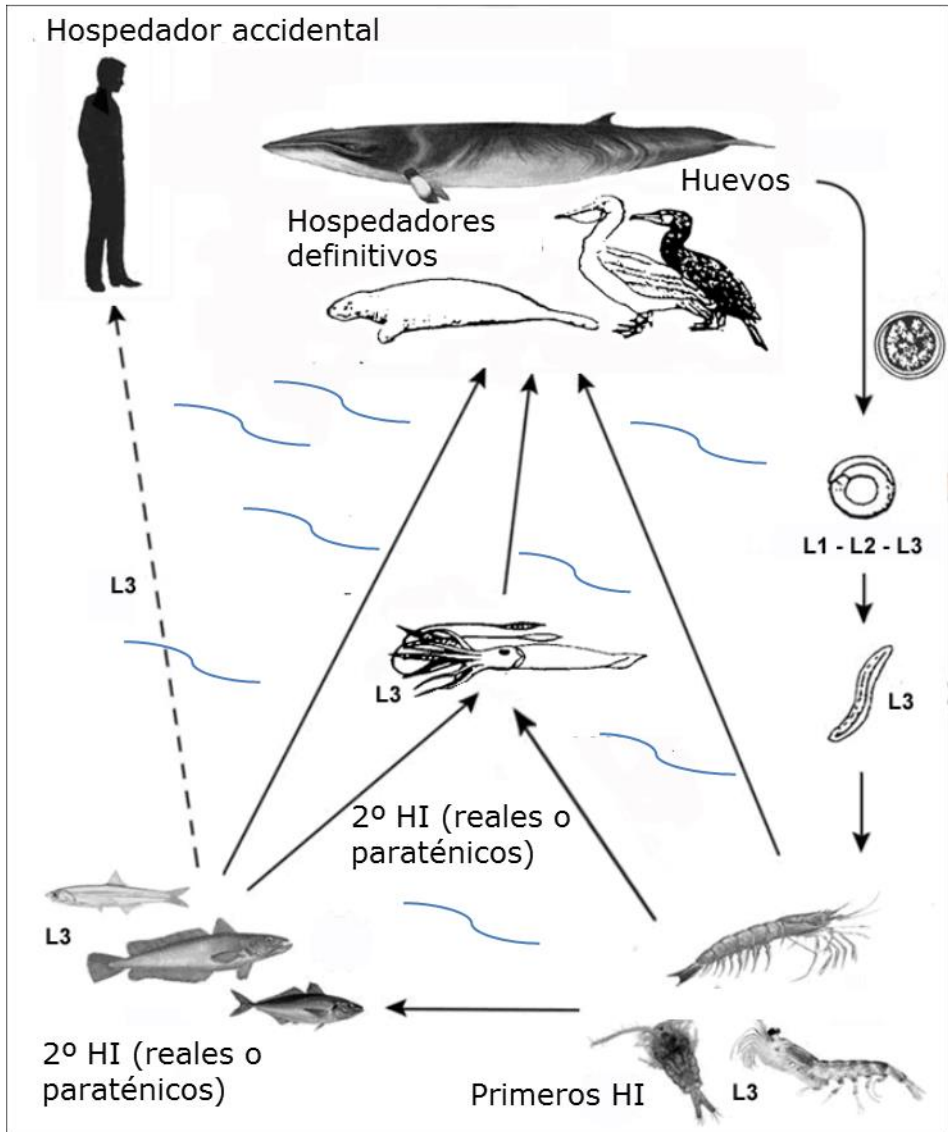


Figura 1.2.- Ciclo de vida de los nematodos anisákidos (modificado de LEVSEN & LUNESTAND, 2010).

Las especies del género *Anisakis* presentan un ciclo poliheteroxeno, complicado por la presencia de hospedadores paraténicos que contribuyen a la dispersión temporal y espacial del parásito. El último estadio larvario y los adultos parasitan el intestino de sus hospedadores definitivos, mamíferos marinos (principalmente cetáceos: ballenas, delfines, cachalotes; pero también pinnípedos: focas, marsopas) en los cuales tienden a agruparse entre ellos formando úlceras crateriformes que facilitan su penetración en la mucosa. Las hembras ponen huevos no embrionados que salen con las heces del hospedador. Dentro del huevo tienen lugar las dos primeras mudas emergiendo la L₃, capaz de nadar y que utiliza crustáceos pelágicos (eufásidos, decápodos y anfípodos) como primer hospedador intermediario (KØIE et al., 1995). La prevalencia en estas especies es muy baja, pero su densidad es elevada, así, los peces (segundo hospedador intermediario), al ingerir grandes cantidades, tienen la posibilidad de adquirir un gran número de larvas, aunque la intensidad de parasitación del primer hospedador sea baja. Además, se van acumulando con la edad por sucesivas reinfestaciones debidas a sus hábitos predadores, los peces pequeños, con las larvas enquistadas, son devorados por los de mayor tamaño, volviéndose a enquistar estas larvas en los nuevos hospedadores; este proceso se va repitiendo pudiendo los peces más grandes acumular un elevado número de larvas (BERLAND, 2006).

Una gran variedad de peces y cefalópodos pueden comportarse como segundos hospedadores intermediarios reales o paraténicos (CHENG, 1982). Finalmente, los hospedadores definitivos ingieren a los hospedadores intermediarios o paraténicos con las larvas que evolucionan hasta adultos. El ser humano entra a formar parte como hospedador accidental al ingerir al segundo hospedador intermediario (con la L₃

infestante) crudo, insuficientemente cocinado o sometido a un proceso tecnológico que no provoque la muerte del parásito, como ahumado, salazón o marinado (PANEBIANCO & LO SCHIAVO, 1985), pero en este caso, el parásito ni evoluciona ni se reproduce y el ciclo se rompe (SMITH & WOOTTEN, 1978).

El ciclo de *Pseudoterranova*, según McCLELLAND (1990, 2002), es bentónico, siendo las focas los hospedadores definitivos. Los huevos emitidos junto con las heces caen al fondo del mar donde tiene lugar su desarrollo hasta L₃. Crustáceos bentónicos (copépodos principalmente, aunque también anfípodos, gammáridos e isópodos) al alimentarse, adquieren las L₃ que se desarrolla en su hemocele, siendo éstos sus primeros hospedadores intermediarios. Otros macro invertebrados y peces que tienen como fuente de alimento a los crustáceos bentónicos actúan como segundos hospedadores intermediarios, en los cuales las larvas seguirán creciendo y se harán infectivas para sus hospedadores definitivos.

Las especies del género *Contraeaecum* siguen un ciclo muy complejo con una eurixenia muy marcada que implica a invertebrados y peces bentónicos, demersales o pelágicos. Sus hospedadores definitivos pueden ser mamíferos marinos y aves piscívoras (KLIMPEL & PALM, 2011).

El ciclo de vida de *Hysterothylacium* todavía presenta muchos aspectos que aún se desconocen (KLIMPEL & RÜCKERT, 2005). Sus especies son de las más ubicuas en peces del Atlántico Norte (KØIE, 1993; BALBUENA et al., 1998, 2000; NAVONE et al., 1998; KLIMPEL et al., 2006a). Puede asumirse que los ciclos son similares para todas las especies pertenecientes a este género. Los adultos maduros sexualmente se encuentran

principalmente en el tracto digestivo de grandes peces predadores, teleósteos y raramente en elasmobranquios (KØIE, 1993; KLIMPEL et al., 2003), mientras que las L₃ y L₄ parasitan preferentemente órganos de la cavidad corporal de sus hospedadores intermediarios. Más de cien especies de invertebrados bentónicos y pelágicos actúan como hospedadores intermediarios y/o paraténicos (KØIE, 1993; BALBUENA et al., 1998, 2000; NAVONE et al., 1998; KLIMPEL et al., 2007). Los huevos salen con las heces de sus hospedadores definitivos y se desarrollan hasta L₂ que son ingeridas por invertebrados pelágicos o bentónicos (copépodos, isópodos y anfípodos), eclosionan en su intestino llegando al hemocele (KØIE, 1993; KLIMPEL et al., 2006b), el desarrollo hasta L₃ se produce en invertebrados y de ahí puede infectar a sus hospedadores definitivos. Como segundos hospedadores intermediarios se han encontrado medusas, crustáceos y quetognatos. El tamaño de la larva parece ser importante, ya que solo las L₃ mayores de 0,3 cm mudan a L₄ y a adulto en el lumen del tracto digestivo de su hospedador final (KØIE, 1993). Los peces pueden acumular un elevado número de larvas de diferentes estadios por la ingestión de crustáceos y pequeños peces infestados que actúan como hospedadores paraténicos o de transporte (KLIMPEL, 2005; KLIMPEL & RÜCKERT, 2005).

1.2.4.- DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Sería muy extenso mostrar la distribución geográfica de las diferentes especies comprendidas en estos cuatro géneros, así, en la figura 1.3 y en la tabla 1.3 se sintetizan los aspectos más importantes en cuanto a distribución de las especies del género *Anisakis* así como sus principales hospedadores definitivos, mientras que la figura 1.4 muestra las distribuciones geográficas de las especies comprendidas en los tres géneros más importantes de la familia Anisakidae.

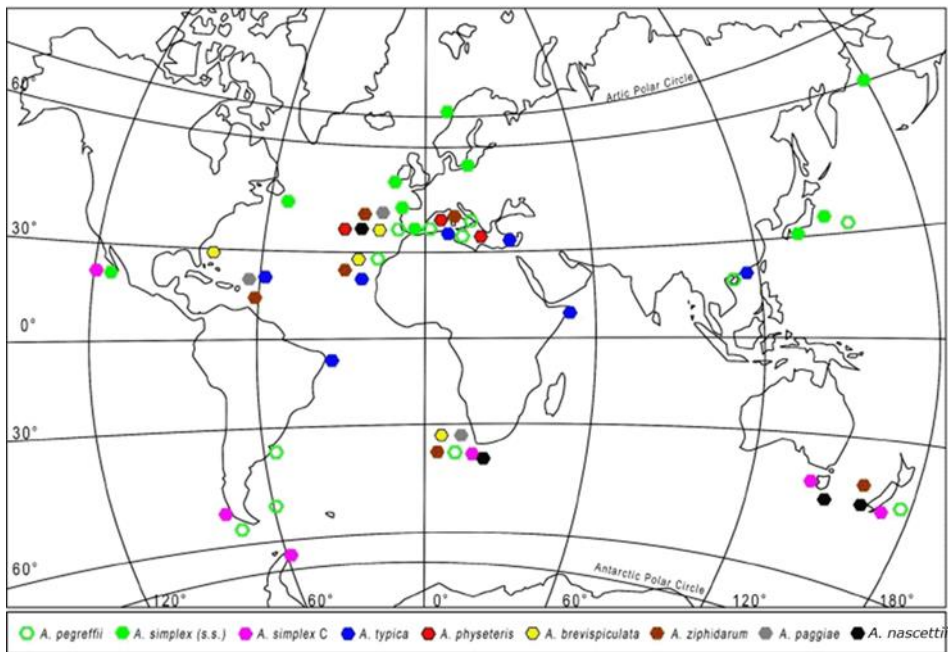


Figura 1.3.- Distribución geográfica de *Anisakis* spp. identificadas genéticamente (Modificado de [MATTIUCCI & NASCETTI, 2008](#)).

Tabla 1.3.- Distribución geográfica y hospedadores definitivos más importantes de las especies incluidas en el género *Anisakis* (MATTIUCCI & NASCETTI, 2008).

Especies	Distribución geográfica	Hospedadores definitivos
<i>A. simplex (s.s.)</i>	Entre 35°N y Círculo Polar Ártico, región austral y Pacífico boreal. NO y NE Atlántico; Gibraltar y ocasionalmente oeste del Mediterráneo (Mar de Alborán)	Ballenas y delfines (Delphinidae, Monodontidae y Phocoenidae)
<i>A. pegreffii</i>	Mediterráneo, región Austral (30°N-55°S); límite norte del Atlántico: costa Ibérica. China y Japón	Delfines (Delphinidae)
<i>A. simplex C</i>	Este del Pacífico, costas de Canadá y Chile, Nueva Zelanda y costa atlántica de Sudáfrica	Cetáceos
<i>A. typica</i>	Entre 30°S y 35°N, en aguas cálidas y tropicales; este del Mediterráneo, noreste del Atlántico, costa norte de África y Mar de China	Delfines (Delphinidae)
<i>A. ziphidarum</i>	Sur del Atlántico, Mediterráneo y Caribe	Ballena picuda (Ziphiidae)
<i>A. nascettii</i>	Costas de Nueva Zelanda y Sudáfrica	Ballena picuda (Ziphiidae)
<i>A. physeteris</i>	Mediterráneo y Atlántico	Cachalotes
<i>A. brevispiculata</i>	Noreste Atlántico (costa Ibérica) y Sudáfrica	Cachalote pigmeo
<i>A. paggiae</i>	Florida y Sudáfrica	Cachalotes

Introducción

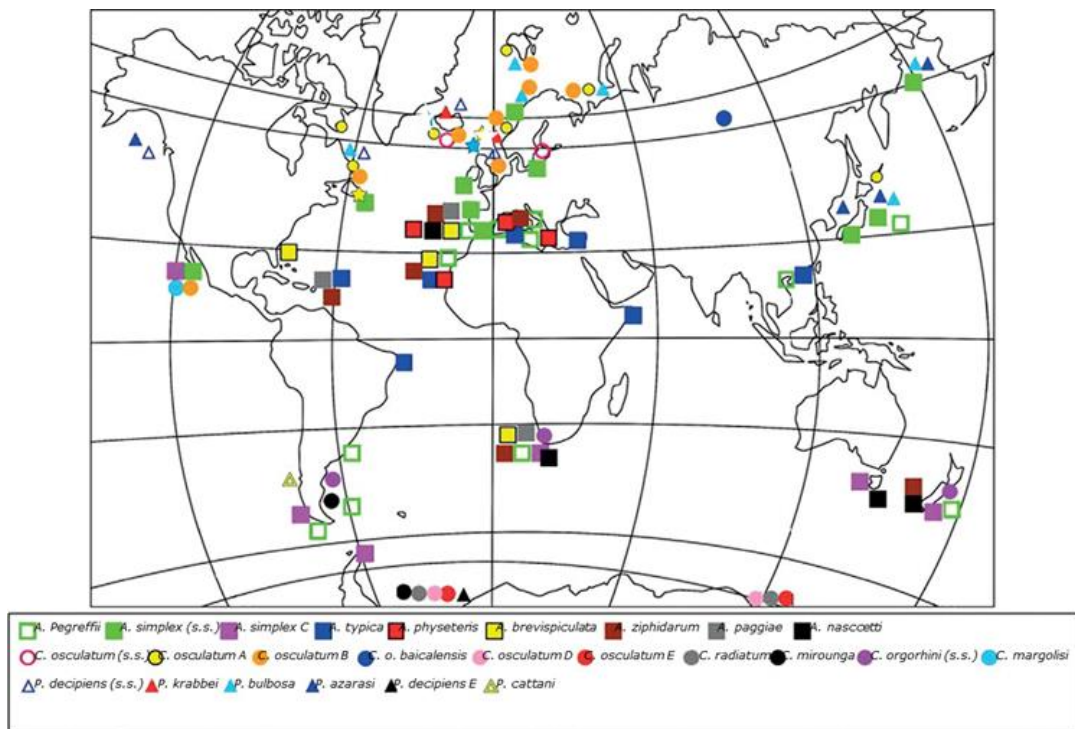


Figura 1.4.- Mapa con las áreas de distribución conocidas de las especies anisákidas pertenecientes a los géneros *Anisakis*, *Contracaecum* y *Pseudoterranova* (Modificado de [MATTIUCCI & NASCETTI, 2008](#)).

1.3.- EPIDEMIOLOGÍA

En los últimos años se ha observado un aumento de la prevalencia de la anisakidosis humana en todo el mundo, y no solo en países donde tradicionalmente se consume pescado crudo. Aunque la mayoría de casos se producen en Japón, también se han detectado en otros países, principalmente Holanda, Francia y España (BOUREE et al., 1995; AUDÍCANA et al., 2002), pero también en Reino Unido (LEWIS & SHORE, 1985), Corea (IM et al., 1995), Filipinas (PETERSEN et al., 1993), Bélgica (VERCAMMEN et al., 1997), Estados Unidos (AMIN et al., 2000) y México (LAFFON-LEAL et al., 2000), entre otros.

Este aumento de la prevalencia no es debido sólo a la variación de los gustos gastronómicos (OSHIMA, 1987; SAKANARI & McKERROW, 1989), sino también a:

- los movimientos migratorios y la globalización, con el consecuente aumento en el consumo de comidas exóticas;
- al uso de métodos rápidos de preparación de los alimentos (microondas);
- a los movimientos naturistas, que recomiendan no cocinar demasiado los alimentos;
- al conocimiento de los beneficios de la dieta mediterránea que incluye un elevado consumo de pescado para prevenir enfermedades del corazón y la obesidad;

- al mejor conocimiento de la enfermedad por parte de los médicos, así como la disponibilidad de mejores instrumentos de diagnóstico; y,
- al aumento de las poblaciones de mamíferos marinos como consecuencia de las medidas de protección y conservación de estas especies.

1.3.1.- FACTORES DE RIESGO

Existen diferentes factores que incrementan el riesgo de adquirir anisakidosis.

Prácticas pesqueras

En la comercialización de productos del mar, la evisceración de pescado se debe considerar después de su captura con el fin de evitar la migración de las larvas a la musculatura. Sin embargo, a pesar de esas medidas, las infecciones en humanos se siguen produciendo (ARRIAZA et al., 2010), ya que la proliferación de la pesca extractiva en todos los caladeros y las prácticas de manipulación (evisceración y vertido al mar de las vísceras) contribuyen a incrementar la demografía de anisákidos en los ecosistemas explotados para este fin. Dado el alto porcentaje de peces afectados, los subproductos de la pesca contaminados por estos parásitos representan cientos de toneladas y son descartados y eliminados sin tratamiento preventivo alguno. De esta manera, los parásitos se reintroducen en la cadena trófica sirviendo de alimento a

muchas especies que inmediatamente resultan afectadas. La probabilidad de que un mamífero marino (hospedador definitivo) ingiera un pez o invertebrado portador de larvas aumenta y, por tanto, se acelera la dispersión y expansión (geográfica y poblacional) del parásito. Si la pesca maneja adecuadamente estos subproductos, disminuye potencialmente la infección de los hospedadores definitivos y consecuentemente de todo el ciclo (AESAN, 2009).

La sobreexplotación de los caladeros hace que los peces capturados sean paulatinamente de menor tamaño y con mayor carga parasitaria. De este modo la prevalencia de los anisákidos no disminuye con la pesca, sino que se mantiene y se hace más evidente, puesto que al final la soportan un número menor de peces, que son además de menor tamaño.

Prácticas alimenticias

Se han descrito parasitaciones por anisákidos en numerosas especies de importancia comercial tales como arenque, sardina, boquerón, bacalao, merluza, abadejo, rape, bonito, caballa, bacaladilla, besugo, calamar y muchas más. Es decir, presenta una distribución mundial y los pescados implicados en cada caso dependen fundamentalmente de los hábitos alimentarios de cada zona de consumo.

La infestación se asocia al consumo de pescado crudo o insuficientemente cocinado y a sus distintas preparaciones culinarias: sushi, sashimi (figura 1.5) y sumomono en Japón; arenques salados o escabechados en Holanda; gravlax en Noruega; boquerones en vinagre en España (figura 1.6) o marinados en Italia; lomi-lomi en Hawai o ceviche en América.

Introducción

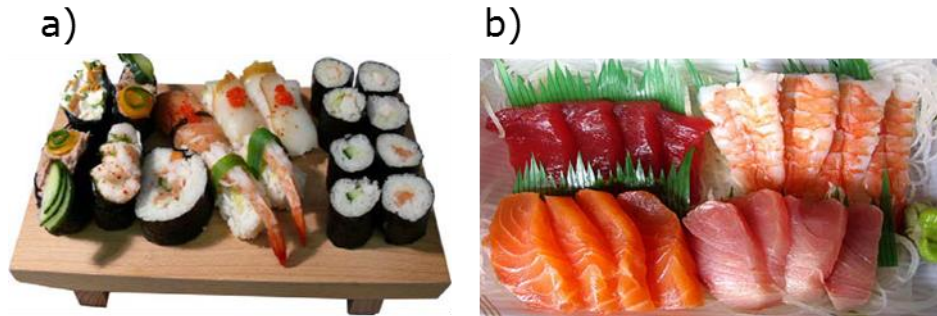


Figura 1.5.- a) sushi (preparación a base de arroz, verduras, pescado crudo y algas); b) sashimi (pescado crudo en filetes muy delgados).

Los casos diagnosticados en España fueron debidos principalmente al consumo de boquerones en vinagre aunque también se han diagnosticado casos por consumo de sardinas crudas con limón y por pescado a la plancha o al microondas insuficiente cocinados (sardinas y merluza principalmente) (AUDICANA & KENEDY, 2008). El mayor consumo de pescado en verano, podría justificar el mayor número de casos descritos durante estos meses (REPISO ORTEGA et al., 2003).

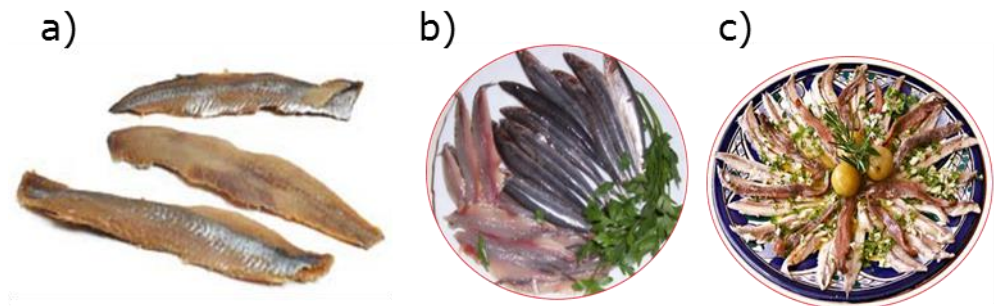


Figura 1.6.- a) arenques ahumados; b) boquerones crudos; c) boquerones en vinagre.

La incidencia de las reacciones alérgicas frente a *Anisakis* es muy desigual en el conjunto de la geografía española: es alta en el centro y norte de la península y poco frecuente en el sur y sureste de España. Además de la distinta procedencia del pescado consumido (caladeros con una mayor o menor infestación del pescado), también pueden influir las costumbres locales en hábitos alimentarios. La forma de cocinar el pescado puede variar desde una "plancha de calor moderado" en el norte y el centro del país, a una "fritura a alta temperatura y más prolongada" en el sur. Así mismo, a pesar de que en Galicia el consumo de pescado es mayor que en Madrid, los hábitos asociados al riesgo de infección son más prevalentes en la capital, donde el número de casos diagnosticados es mayor.

Aspectos ecológicos

Otros posibles factores serían aquellos que afectan a la distribución de los peces hospedadores. Comparados con los ecosistemas terrestres, los marinos son más sensibles y reaccionan más rápidamente a cambios climáticos, con consecuencias impredecibles en la composición de especies, cambios espaciales de poblaciones, o reestructuraciones en las cadenas alimenticias (STEELE, 2004). Los parásitos pueden utilizarse como indicadores biológicos de impacto ambiental, siendo los helmintos los más útiles, ya que son un reflejo de las cadenas tróficas y del medio marino (PALM, 2011). Se sabe que la frecuencia de *Anisakis* cambia de acuerdo a variaciones de la temperatura del agua (ARRIAZA et al., 2010), estos cambios podrían estar implicados en la transmisión de la anisakidosis, ya que muchos estudios reflejan que la prevalencia de *Anisakis* en los peces capturados en el

Mediterráneo es significativamente menor que los capturados en el Atlántico.

Además, los parásitos marinos pueden resultar útiles como indicadores biológicos de la cadena alimentaria (THOMSON et al., 2005), contaminación (SURES, 2004), cambios climáticos (POULIN, 2006; BROOKS & HOBERG, 2007), impactos antropogénicos (MARCOGLIESE, 2005), evaluación de poblaciones de peces (MACKENZIE, 2002a, b) y de la salud del ecosistema en general (MARCOGLIESE, 2005). Los anisákidos son uno de los mejores marcadores, ya que, al ser integrantes de los ecosistemas acuáticos, no solo juegan un papel importante en la dinámica poblacional y estructura de la comunidad, sino que también pueden proporcionar información sobre la diversidad del ecosistema marino (MATTIUCCI & NASCETTI, 2008), pudiendo utilizarse como marcadores genéticos en estructura de poblaciones de sus hospedadores. También determinarán la presencia de anisákidos los cambios poblacionales del zooplacton así como la mayor presencia de hospedadores definitivos en primavera.

En truchas cultivadas las infecciones se atribuyen a haber sido alimentadas con vísceras contaminadas y no tratadas. También se han encontrado anisákidos en salmón, adquiridos seguramente durante su permanencia en el mar (DÍAZ ESTRUCH, 1992).

1.4.- ANISAKIDOSIS HUMANA

1.4.1.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Desde 1960 se venía usando el término anisakiosis para la patología causada por larvas L₃ de la familia Anisakidae, sin embargo, a partir de 1988 se estableció una nomenclatura estandarizada (KASSAI et al., 1988) por la cual se recomienda usar el término anisakidosis para patologías causadas por nematodos de esta familia y anisakiasis, pseudoterranovosis, contraecosis para las causadas por especies de los género *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contraecum* respectivamente.

Debido a que los síntomas son inespecíficos, esta enfermedad continua estando infradiagnosticada (EFSA, 2010).

ARIZONO et al. (2012) reportan a *A. simplex* (s.s) como responsable de la mayoría de las infecciones humanas. Sin embargo, en los casos recientemente reportados en Italia se identificó a *A. pegreffii* como agente causal (FUMAROLA et al., 2009; MATTIUCCI et al, 2011). También se ha reportado algún caso por *A. physeteris* (CLAVEL et al., 1993) y por L₄ de *A. simplex* (ROSALES et al., 1999).

Los casos producidos por *Pseudoterranova* son más escasos. En una revisión realizada en un hospital de Corea por CHOI et al. (2014), entre 2004 y 2011 se diagnosticaron 62 casos de anisakidosis, de los cuales 52 fueron producidos por *A. simplex*

mientras que solamente en 10 pacientes se identificó a *P. decipiens* como agente causal.

La anisakidosis por *Contracaemun* son más frecuentes en Sudamérica, sin embargo, [SHAMSI & BUTCHER \(2011\)](#) describen el primer caso de contraecaecosis en Australia en una mujer, previo consumo de caballas capturadas en sus costas, con síntomas de anisakidosis y reacciones alérgicas en la paciente.

Únicamente se ha reportado un caso de anisakidosis no invasiva por *Hysterothylacium* con la presencia de un adulto hembra en las heces del paciente ([YAGI et al., 1996](#)).

1.4.2.- SINTOMATOLOGÍA Y PATOLOGÍA

Para que se produzca la parasitosis es necesario que la larva esté viva, de forma que se engancha y perfora la mucosa del estómago o intestino. Por tanto, ante la baja probabilidad de producirse este hecho, el cuadro en la mayoría de los casos revierte sin haber llegado a un diagnóstico y sin necesidad de tratamiento.

Las manifestaciones clínicas de la anisakidosis en general, y de la anisakiasis en particular, son variadas y no patognomónicas, fundamentalmente de tipo alérgico y/o digestivo, siendo debidas a dos mecanismos:

- **Acción local del parásito.** La sintomatología depende del tamaño del inóculo y del lugar de penetración de la larva en la

mucosa del tracto gastrointestinal. En este caso los síntomas tardan de 12 a 48 horas en aparecer (NAVARRO CANTARERO et al., 2005).

- **Reacciones de hipersensibilidad inmediata mediada por IgE.** Los pacientes desarrollan cuadros alérgicos como urticaria y angioedema pocas horas después de la ingesta de pescado.

El mecanismo patogénico de las infecciones por helmintos se caracteriza por el desarrollo de respuestas de tipo alérgico (IgE) e inmunomodulador (producción de citoquinas Th2, degranulación de mastocitos y eosinofilia) (AUDÍCANA & KENNEDY, 2008).

La anisakidosis humana es peculiar porque este parásito no está adaptado a vivir en humanos y la infección es transitoria. Además, más del 90% de los casos descritos están causados por una única larva, aunque KAGEI & ISOGAKI (1992) reportan la presencia de hasta 56 larvas en un único paciente. Por tanto, pueden esperarse diferencias en la patogénesis de *A. simplex* (u otros anisákidos) con otros helmintos parásitos humanos.

En los últimos años, los estudios han indicado que, como en otras infecciones helmínticas, los cambios patológicos se producen en el tracto gastrointestinal. Durante la infección por *A. simplex*, la patología es el resultado de la acción directa de la larva durante la invasión tisular y de la interacción compleja entre el sistema inmunitario del hospedador y las sustancias producidas por, o que contienen, los parásitos.

Los síndromes que pueden aparecer en humanos que experimentan anisakidosis sintomática pueden ser de diferentes tipos.

- **Gástrico.** Inicio brusco (1-12 horas tras la ingestión de pescado crudo) de dolor epigástrico, náuseas, vómitos y febrícula. Los síntomas agudos se resuelven en unos días, pero las personas infectadas pueden presentar dolor abdominal inespecífico, náuseas y vómitos durante semanas e incluso meses. La enfermedad gástrica puede llegar a ser crónica, y los síntomas tipo úlcera pueden durar meses y ser difíciles de diagnosticar (HOCHBERG & HAMER, 2010). El cáncer de estómago es mucho más frecuente en Japón que en cualquier otro país y se ha sugerido la presencia de larvas de *Anisakis* como uno de los factores implicados (PETITHORY et al., 1990).

- **Intestinal.** Dolor abdominal que empieza 5-7 días después de la ingestión de las larvas. Los individuos infectados pueden desarrollar ascitis y/o signos peritoneales. Las complicaciones son raras pero incluyen la obstrucción del intestino delgado, estenosis ileal, invaginación intestinal, perforación intestinal y neumoperitoneo (HOCHBERG & HAMER, 2010).

La afectación gástrica representa del 60 al 70% de las parasitaciones. Sin embargo, en España se ha observado una mayor afectación intestinal, siendo el íleon terminal el segmento que se ha involucrado con mayor frecuencia, donde probablemente el pH alcalino dificulte la estancia del parásito durante un largo periodo de tiempo (REPISO ORTEGA et al., 2003).

- **Ectópico.** Por penetración de las larvas desde el estómago o el intestino, pudiendo llegar a la cavidad peritoneal y menos frecuentemente a la cavidad pleural, mesenterio, hígado, páncreas, ovario y tejido subcutáneo, con neumoperitoneo por la perforación del tracto gastrointestinal. En la infección crónica

pueden observarse masas mesentéricas (HOCHBERG & HAMER, 2010).

- **Alérgico.** La anisakidosis está también asociada a una fuerte respuesta alérgica, este patógeno es una de las principales causas de alergias alimentarias en España (principalmente asociado al consumo de boquerones en vinagre). Los síntomas alérgicos aparecen generalmente en menos de cinco horas desde la ingestión del pescado infectado, y las manifestaciones pueden variar desde urticaria y angioedema hasta anafilaxis, algunas veces acompañada de síntomas gastrointestinales (HOCHBERG & HAMER, 2010).

Antígenos de *Anisakis*

Se conocen tres grupos de moléculas antigénicas.

- **Antígenos somáticos.** Son los más abundantes y algunos presentan reactividad cruzada con antígenos de otros ascáridos. Se obtienen por homogenización de las larvas enteras y contienen todas las proteínas solubles del parásito.

- **Antígenos de excreción/secreción (E/S).** Se sintetizan en la glándula esofágica dorsal y células secretoras del tracto digestivo que son la mayor fuente de enzimas histolíticas. Estas moléculas ayudan al parásito a penetrar en la mucosa gástrica. Los anticuerpos frente a estos antígenos son los primeros en aparecer. Este complejo antigénico puede obtenerse mediante incubación de las larvas vivas en un medio de cultivo apropiado durante largos periodos de tiempo. Se ha demostrado que las proteínas de bajo peso molecular (14, 17 y 18 kDa) sólo son reconocidas por los sueros de los ratones infectados con la larva viva. Una posible explicación es que los

antígenos con bajo peso molecular son producidos únicamente cuando la larva está viva.

- **Antígenos de superficie.** Corresponden a moléculas expresadas en la cutícula del parásito, que también se encuentran en otros nematodos. Se expresan cuando la larva evoluciona de L₃ a L₄. Aunque se ha sugerido que son menos antigénicas y específicas que los antígenos de tipo E/S y somáticos, se ha demostrado en recientes estudios que son fuente de muchas proteínas reconocidas por los anticuerpos del ratón infestado. Posiblemente estas moléculas juegan un papel importante en el desarrollo de un estímulo crónico, como en el caso de los granulomas (VALLS et al., 2003).

Las Agencias Internacionales de Seguridad Alimentaria han fijado su atención en *Anisakis* en relación a su posible potencial alergénico y riesgo para el consumidor de productos de la pesca, y se ha incluido como un factor etiológico en las recientes guías de evaluación de anafilaxis (EFSA, 2010; SIMONS et al., 2011).

En general no se desencadena una reacción alérgica en el primer contacto con las proteínas del parásito, pero se puede dar si ha habido un contacto previo con proteínas de otros parásitos que presenten características similares (reactividad cruzada). Diferentes estudios han mostrado reacciones cruzadas con carbohidratos, fosforilcolina, otros anisákidos, ascáridos, ácaros, cucarachas o crustáceos (DASCHNER et al., 2012).

Los datos epidemiológicos son escasos, incluso en España, donde la alergia a *A. simplex* está más reconocida y más estudiada que en otros países europeos. Respecto al estudio

inicial que dio lugar al concepto de GAA (anisakiasis gastroalérgica), en 1997 se diagnosticaron 96 casos de GAA en pacientes que acudieron a centros de urgencia adscritos a una zona de aproximadamente 500.000 habitantes en Madrid (ALONSO-GÓMEZ et al., 2004). Extrapolando estos datos, hay una incidencia mínima anual de 20 pacientes por 100.000 habitantes, aunque estos datos podrían estar subestimados ya que en esta zona muchos pacientes con síntomas leves no acudían a los centros sanitarios. En este estudio, la ingestión de boquerones en vinagre fue el factor de riesgo más común (79 de 96 pacientes) pero también estuvieron implicados otros pescados: 9 casos por consumo de merluza insuficientemente cocinada, 2 por bacalao crudo y 6 por otros pescados insuficientemente cocinados (ALONSO-GÓMEZ et al., 2004).

Las manifestaciones clínicas de la anisakidosis varían dependiendo de dónde se infectó el paciente y qué tipo de anisákido la causó. En Japón la infección gástrica es predominante, mientras que en Europa es más frecuente la enfermedad intestinal. Estas diferencias pueden reflejar un sesgo de información o diferencias en los métodos diagnósticos. La infección con *P. decipiens* es menos frecuente, normalmente solo afecta al estómago y tiende a ser más leve que la enfermedad causada por especies del género *Anisakis*. Las personas infectadas presentan el "síndrome de hormigueo en la garganta" por una larva que se arrastra en el esófago superior o la orofaringe. Uno de los primeros síntomas es la tos (HOCHBERG & HAMER, 2010).

Hasta la fecha se han caracterizado 13 alérgenos de *Anisakis* cuyas características se muestran en la tabla 1.4.

Tabla 1.4.- Alérgenos de *A. simplex*. E/S: excreción-secreción (Modificado de [DASCHNER et al., 2012](#)).

Alérgeno	PM (kDa)	Tipo de antígeno	Proteína	Reactividad en pacientes	Autores
Ani s 1	24	E/S	Inhibidor tripsina tipo Kunitz	85%	MONEO et al., 2000
Ani s 2	97	Somático	Paramiosina	88%	PÉREZ-PÉREZ et al., 2000
Ani s 3	41	Somático	Tropomiosina	¿4%?	ASTURIAS et al., 2000
Ani s 4	9	E/S	Cistatina	27%	RODRÍGUEZ-MAHILLO et al., 2007
Ani s 5	15	E/S	Proteína SXP/RAL	25-49%	KOBAYASHI et al., 2007
Ani s 6	7	E/S	Serpina	18%	KOBAYASHI et al., 2007
Ani s 7	139	E/S	Glicoproteína	83-100%	ANADÓN et al., 2009
Ani s 8	15	E/S	Proteína SXP/RAL	25%	KOBAYASHI et al., 2007
Ani s 9	14	E/S	Proteína SXP/RAL	13%	RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2008
Ani s 10	22	¿Somático?	Desconocido	39%	CABALLERO et al., 2011
Ani s 11	55	¿Somático?	Desconocido	47%	KOBAYASHI et al., 2011
Ani s 11-li	Desconocido	¿Somático?	Desconocido	Desconocido	KOBAYASHI et al., 2011
Ani s 12	Desconocido	Desconocido	Desconocido	57%	KOBAYASHI et al., 2011

En España, de manera similar a lo que ocurre también en Italia, hay mayores prevalencias de anisakiasis en regiones costeras, resultando en reportes frecuentes de reacciones de hipersensibilidad (AUDICANA et al., 2002; MONEO et al., 2007; DASCHNER et al., 2008). En algunas partes de España el suero de los pacientes alérgicos que reaccionaban con antígenos específicos (incluidos rAni s1, nAni s4, rAni s5, rAni s9 y rAni s10), también tenían mayores episodios de urticaria y síntomas gastrointestinales en comparación con los pacientes italianos afectados de forma similar. Sin embargo, estos últimos mostraron reactividad IgE a los doce alérgenos caracterizados y a otros todavía no caracterizados (CABALLERO et al., 2013).

En la tabla 1.5 se sintetizan los casos reportados de alergia a *A. simplex* en España entre 1997 y 2007, y en la tabla 1.6 se reportan algunos casos de parasitación sin sintomatología alérgica.

Tabla 1.5.- Casos reportados de alergia a *A. simplex* en España entre 1997 y 2007 (modificado de [EFSA, 2010](#)).

Año	Nº pacientes		Autores
	Total	Con anafilaxia	
1995	10	1	AUDÍCANA et al., 1995
1996	28	17	FERNÁNDEZ DE CORRES et al., 1996
1997	1 (ocupacional)		AÑÍBARRO, 1997
1997	1 (ocupacional)		CARRETERO AÑÍBARRO et al, 1997
1997	23		MONTORO et al., 1997
1997	23	5	MORENO-ANCILLO et al., 1997
1998	1 (ocupacional)		AÑÍBARRO & SEOANE, 1998
1998	2 (ocupacional)		ARMENTIA et al., 1998
1998	3		CUENDE et al., 1998
1998	11		DASCHNER et al., 1998
1998	8		GÓMEZ et al., 1998
1998	2		ROSEL RIOJA et al., 1998
1999	36		MENDIZÁBAL-BASAGOITI, 1999
2000	67	18	AUDÍCANA et al., 2000
2001	3	3	DOMÍNGUEZ ORTEGA et al., 2001
2001	75	12	GARCÍA et al., 2001
2001	17	6	GRACIA-BARA et al., 2001
2002	150	39	AUDÍCANA, 2002
2004	96		ALONSO-GÓMEZ et al., 2004
2006	8 (ocupacional)		ARMENTIA et al., 2006
2007	54	22	AÑÍBARRO et al., 2007

Tabla 1.6.- Episodios de parasitación por *Anisakis* sin sintomatología alérgica (modificado de EFSA, 2010).

Año	Región	Nº pacientes con anisakiasis	Autores
1999	Madrid	5 gástrica 2 intestinal	OLIVEIRA et al., 1999
2000	Córdoba	13 intestinal	LÓPEZ PEÑAS et al., 2000
2002	Pamplona	8 gástrica 13 intestinal	CASTÁN et al., 2002
2003	Toledo	10 gástrica 15 intestinal	REPISO ORTEGA et al., 2003

Las diferentes prevalencias de sensibilización en distintas regiones podrían explicarse por los hábitos alimenticios y también por las distintas prevalencias de parásitos en la especie de pescado que se consume. Un estudio reciente en boquerón reveló mayores prevalencias de *A. simplex* en el Atlántico respecto del Mediterráneo mientras que en el Mediterráneo se dieron mayores prevalencias en el este (Liguria) que en las costas españolas de Cataluña (RELLO et al., 2009).

1.4.3.- DIAGNÓSTICO

La anamnesis es muy importante para llegar al diagnóstico. Es muy orientativa la ingesta de pescado crudo o poco cocinado desde unas horas hasta 3 días previos (GÓMEZ et al., 2003). Los síntomas suelen aparecer tras 48-72 h postingesta.

Diagnóstico diferencial

La anisakidosis gástrica puede confundirse con úlcera péptica o gastritis, mientras que en la infección intestinal el diagnóstico diferencial es amplio y puede incluir apendicitis, ileitis, diverticulitis, gastroenteritis eosinofílica, colecistitis, tumor colónico o enfermedad inflamatoria intestinal. La obstrucción intestinal por anisakidosis puede confundirse con otras lesiones obstructivas, mientras que la infección extraintestinal puede confundirse con peritoneo agudo, peritonitis tuberculosa y cáncer pancreático (HOCHBERG & HAMER, 2010).

Diagnóstico de la parasitación

En el diagnóstico por imagen (en casos de clínica sugestiva) se ha utilizado la radiografía y la ecografía, pero el diagnóstico de certeza lo ofrece la visualización de la larva por gastroscopia (o colendoscopia), la cual permite, además, su extracción y la resolución del cuadro (KAKIZOE et al., 1995).

La serología no debe utilizarse ya que, por un lado, para confirmar una infección pasada o reciente se necesitarían marcadores de aparición precoz, y los Ac no se detectan hasta después de varias semanas desde la primoinfección, dando lugar a falsos negativos en individuos con larvas en su tubo digestivo (antes de la seroconversión, éstas habrán muerto y se habrán eliminado, o el paciente habrá requerido procedimientos activos, como la endoscopia o la cirugía, que confirmarían directamente el diagnóstico). La seroprevalencia solo tendrá interés retrospectivo, con utilidad en estudios epidemiológicos. Por otra parte, la detección de Ac no permite conocer el momento en que se han producido y un resultado positivo solo informará que el paciente ha tenido en algún momento de su vida contacto con el parásito. Estas limitaciones podrían conducir a errores en la interpretación de los resultados. Un método con utilidad diagnóstica debería poder detectar la presencia de antígenos de anisákidos en las heces de los pacientes. Su detección indicaría la presencia actual del anisákido en el tracto digestivo y su negativización permitiría asegurar su desaparición.

Diagnóstico de alergias

Se inicia generalmente comprobando la existencia de una historia clínica compatible con urticaria, angioedema o anafilaxia tras la ingestión de pescado.

- **Pruebas cutáneas (prick test).** Se trata de una intradermorreacción para comprobar el estado de sensibilización de los pacientes. Se realiza con un extracto

comercial de *A. simplex*, practicándose una lectura precoz a los 15 minutos y otra tardía a las 24 horas. Existen varios casos de anafilaxia durante la ejecución de esta prueba (CARRETERO et al., 1998; DOMÍNGUEZ ORTEGA et al., 2000; AUDICANA, 2002; PÉREZ CACHAFEIRO et al., 2004).

- **IgE sérica total y específica para *A. simplex*.** Los laboratorios españoles disponen de procedimientos comerciales, automatizables y asequibles para medir los niveles sanguíneos de IgE específica a *A. simplex*, mediante los que se confirman muchos de los casos con sospecha clínica de sensibilización alérgica a este parásito.

Es muy importante tener en cuenta que la detección de niveles elevados de IgE específica no permite confirmar, ni su ausencia descartar, la presencia actual o reciente de larvas, solo indican que el paciente, después de haber tenido contacto previo con el parásito o sus productos (que pudo darse en cualquier momento de su vida) está sensibilizado a estos alérgenos, y que una nueva ingestión de alimentos con larvas vivas (posiblemente también si están muertas, enteras o partidas, bien cocinadas o no, debido a sus Ag termoestables) podría provocar un nuevo cuadro alérgico, local o general y más o menos grave.

Mediante CAP-radioinmunoensayo se pueden encontrar valores altos de ambas inmunoglobulinas y comprobar, además, que su evolución mantiene una asociación, disminuyendo conjuntamente sus valores en el tiempo si se insta una dieta carente de pescado y cefalópodos. Esto puede utilizarse para el seguimiento de pacientes positivos y estudiar su evolución con la clínica, así como valorar el

resultado de instaurar una dieta sin pescado (DASCHNER et al., 1999).

En la actualidad, las muestras en las que se detectan niveles elevados son mucho más frecuentes que las positivas para cualquier otro alérgeno alimentario, incluida la clara de huevo. En muchos de estos pacientes existía una sospecha previa de alergia a pescado.

También puede darse la sensibilización a otros helmintos, como *Áscaris* o *Equinococcus*, antes consideradas más frecuentes, con las que el procedimiento no presenta reacciones cruzadas. Los métodos de ELISA y *Western-Blot* son los más utilizados dado que pueden distinguir casos de reactividad cruzada con antígenos de otros parásitos. Este problema se podría solucionar con la utilización de anticuerpos monoclonales.

- Pruebas de provocación. Ingesta por parte de los pacientes de larvas inactivas (previo consentimiento escrito normalizado), para comprobar la correlación entre esta ingestión y el desencadenamiento de fenómenos alérgicos. Para ello, se obtienen larvas de más de 2 cm de longitud de algunos pescados de consumo habitual que se congelan en cápsulas a -20°C durante más de 48 h o se liofilizan (SASTRE et al., 2000).

Según diferentes protocolos, los pacientes toman estas cápsulas, cuya envoltura se disuelve en el estómago liberando las larvas muertas o el producto del liofilizado. Se comparan las respuestas de los pacientes a la toma de un número variable de larvas (hasta 20 en el mismo día) a la de un placebo, con distintas pautas horarias. Según algunos resultados publicados,

estas pruebas no se siguen de reacciones alérgicas por parte de los pacientes, aunque muchos de ellos tuvieran historia previa de anafilaxia atribuible a *A. simplex*, lo cual indicaría que las reacciones alérgicas serían causadas por los Ag de E/S y no por los Ag termoestables.

1.4.4.- TRATAMIENTO

El tratamiento es principalmente profiláctico, con el objetivo de evitar la ingesta del parásito vivo (GÓMEZ et al., 2003). En los casos de alergia sería necesaria una dieta de exclusión de pescado, mientras que en los cuadros de alergia con parasitación bastaría con evitar el pescado crudo o no congelado.

El tratamiento ideal es la extracción de la larva por gastroscopia, sin embargo, esta no es siempre posible.

Algunos estudios sugieren que el tratamiento con nematocidas como el albendazol puede ser efectivo, pero el desarrollo de resistencias a fármacos antihelmínticos y la demanda social por productos terapéuticos naturales ha motivado la investigación de sustancias basadas en la medicina tradicional y obtenidas de plantas (GÓMEZ-RINCÓN et al., 2014). Así, algunos investigadores españoles estudian diferentes aceites esenciales obtenidos de manzanilla y árbol del té (entre otros) cuyos compuestos terpénicos (geraniol, citronelol, farnesol, etc.) muestran actividad contra L₃ de *A. simplex* (s.l.) provocando alteraciones en la cutícula, ruptura de la pared intestinal y/o actividad anticolinesterásica, principalmente *in vitro* aunque

algunos de ellos también han dado buenos resultados *in vivo* (HIERRO et al., 2004a, 2004b, 2006; NAVARRO et al., 2008; NAVARRO-MOLL et al., 2011; ROMERO et al., 2012; GÓMEZ-RINCÓN et al., 2014).

En la mayoría de casos el tratamiento es sintomático ya que las larvas no sobreviven y finalmente mueren y son eliminadas. Pero en caso de obstrucción intestinal puede ser necesaria la cirugía de urgencia.

Los antiácidos podrían ser útiles, administrados tras la ingesta del pescado crudo, ya que, según algunos autores, parece existir una relación entre el pH gástrico y la actividad de las larvas, de forma que la acidez facilitaría el desarrollo del parásito (MURAOKA et al., 1996).

El tratamiento de las manifestaciones cutáneas y/o anafilácticas por alergia a anisákidos se basa en la actuación médica inmediata y la administración de antihistamínicos, corticoides y, en ocasiones, adrenalina subcutánea, de igual modo que si se tratara de una reacción anafiláctica secundaria a cualquier otra causa.

1.5.- MEDIDAS DE PREVENCIÓN Y CONTROL

Resulta difícil evitar que los peces parasitados lleguen al consumidor ya que los factores ecológicos que determinan la infección escapan al control humano. Para conseguir una buena prevención hay que tener en cuenta cada uno de los eslabones de la cadena producción-consumo. Lo ideal para un buen control es la educación de la población acerca de los peligros que conllevan el consumo de pescado crudo o poco cocinado.

Producción primaria

Seguramente es la parte más difícil de controlar pero el número de larvas de *Anisakis* en pescado podría reducirse teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- evaluar y controlar el impacto de la actividad humana en el parásito, es decir, acciones humanas que favorezcan la reproducción del parásito;
- evitar capturar las especies que normalmente están parasitadas por *Anisakis* y evitar también trabajar en zonas de mayor prevalencia ([WHO, 1989](#)).

Criterios ante la captura y la manipulación del pescado

Procurar que pase el menor tiempo posible entre la captura y la evisceración del pescado, para evitar así la migración *post mortem* de larvas hacia la musculatura. Determinadas partes del pescado (musculatura hipoaxial) se encuentran

hiperparasitadas por lo que si se eliminan se reducirá el riesgo de infección.

Manipulación en tierra e inspección del pescado fresco

La International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1996) indica que la evisceración y lavado de la cavidad abdominal debería realizarse en el barco. El riesgo de infección puede reducirse con un examen visual del pescado eviscerado, extrayendo los parásitos visibles o bien eliminando los peces muy parasitados (AUDICANA et al., 2002).

Procesado de los productos de la pesca

Hay más información de resistencia a tratamientos físicos o químicos para *Anisakis* que para cualquier otro parásito presente en el pescado. Los alérgenos de *A. simplex* son muy resistentes al calor y a la congelación (FERNÁNDEZ DE CORRES et al., 1996; FALCAO et al., 2008). Así, los tratamientos que inactivan las larvas en pescado podrían no proteger al consumidor frente a alergias tras su ingestión (EFSA, 2010).

Existen varios procesos que inactivan las larvas de *Anisakis* del pescado crudo, evitando así la ingestión de las larvas vivas por parte del consumidor.

1.5.1.- TRATAMIENTOS FÍSICOS

- **Congelación.** Es una de las técnicas con mayor eficacia ante las larvas de *Anisakis* pero hay que tener en cuenta factores tales como la temperatura y el tiempo de exposición. La UE señala que para consumir pescado crudo o poco cocinado debe congelarse al menos durante 24 horas a -20°C , especialmente en restauración colectiva y en los hogares, donde no se usan sistemas rápidos de congelación.

La Food and Drug Administration ([FDA](#)) especifica “congelación y almacenamiento a -20°C durante 7 días” (tiempo total en un congelador convencional) o congelación a -35°C hasta que solidifique, y mantenimiento a la misma temperatura durante 15 horas, o congelación a -35°C hasta que solidifique y mantenimiento a -20°C durante 24 horas (se entiende que a -35°C en un congelador comercial). Hay que tener en cuenta, sobre todo en el ámbito doméstico, la capacidad de congelación de los frigoríficos.

También deben congelarse los restos de pescado utilizados como alimento de peces cultivados y de mamíferos marinos en cautividad para prevenir la transmisión. La congelación rápida con aire “blast freezing” en el buque es un método eficaz para inactivar las larvas, aunque es probable que no destruya la capacidad de sensibilización de sus antígenos.

- **Altas temperaturas.** Es un método también eficaz, ya que las larvas de *Anisakis* son sensibles al calor. La [FDA](#) considera que un tratamiento de 60°C durante 1 minuto es suficiente

para eliminarlas, sin embargo, la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) recomienda que se alcancen, al menos, 70°C en el centro de la pieza. Esto significa que los productos cocinados completamente (hervidos o fritos), los ahumados en caliente (temperatura central de la pieza >60°C), los pasteurizados y los cocinados al vacío son seguros desde el punto de vista de la inactivación del parásito, pero no los productos ahumados en frío o los cocinados de forma inadecuada a la plancha o en microondas. Las microondas llegan hasta un determinado espesor y, a partir de ahí la transmisión de calor se hace por conducción, por lo que en las zonas donde no actúan las ondas, la eficacia dependerá únicamente del tiempo y de la temperatura que se alcance (TRUJILLO et al, 2002). Hay un acuerdo generalizado entre la comunidad científica aceptándose que es necesaria una infección activa, es decir, que la larva este viva, para que provoque una reacción alérgica. Sin embargo, no hay que excluir la posibilidad de que se den sensibilizaciones por la exposición a alérgenos térmicamente resistentes (PRAVETTONI, 2012).

- **Altas presiones.** Son eficaces para inactivar las larvas de *Anisakis* aunque afectan al color y al aspecto del producto. En la mayoría de los estudios realizados, la aplicación de 200 MPa inactivaba el 100% de las larvas en 3 a 10 minutos.

- **Otros.** Succión por vacío, radiaciones ionizantes y electrocución.

1.5.2.- TRATAMIENTOS QUÍMICOS

- **Salazón.** Aunque *Anisakis* es sensible a la sal, se necesitan elevadas concentraciones durante periodos prolongados para inactivar las larvas. La salazón en seco inactiva las larvas de la superficie pero, si no es prolongada, no inactiva las del interior.

- **Acidificación.** Se puede concluir que la sal y el vinagre pueden reducir el riesgo asociado a *Anisakis*, pero no lo eliminan ni lo reducen hasta un nivel aceptable. Por ello, es necesario congelar previamente los productos que se van a escabechar o marinar (MEHLHORN et al., 1992). Están en estudio diferentes tipos de salmueras que son rápidas y efectivas, que no necesitan congelación previa, y que además conservan las propiedades organolépticas.

- **Otros.** Sustancias vegetales como shogaol o gingerol, así como compuestos de *Perilla* que producen la muerte de las larvas en unas determinadas condiciones (GOTO et al., 1990; HIERRO et al., 2004a, 2006). Estudios con compuestos monoterpénicos obtenidos de diversos aceites esenciales también han mostrado actividad (NAVARRO et al., 2008).

1.6.- LEGISLACIÓN

Como consecuencia de los casos crecientes de anisakiasis, la Unión Europea publicó en 1991 la [DIRECTIVA 91/493/CEE](#) en la que se especificaban algunas medidas para disminuir la incidencia de esta enfermedad.

Por su parte, en el [REAL DECRETO 1437/1992](#), de 27 de noviembre (BOE, 1993), se fijan las directrices relativas a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura. Referente a los parásitos, determina que, tanto los pescados como los productos derivados de ellos, habrán de pasar un control visual para detectar los posibles parásitos y desecharlos. Por otra parte, se prohíbe la venta de los pescados o las partes de éstos que estén altamente parasitados. Finalmente, son los barcos factoría y las industrias dedicadas a la elaboración y preparación de los productos de la pesca, los responsables de realizar el control para garantizar el cumplimiento de dicha ley.

En 2004 fue derogada la [DIRECTIVA 91/493/CEE](#) por el reglamento [CE núm. 853/2004](#) en el que se establecieron normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.

En el [REAL DECRETO 1420/2006](#), de 1 de diciembre (BOE, 2006), se fija la obligatoriedad, para los establecimientos que sirven comida, de someter todos los pescados que se vayan a servir en crudo o casi crudos a un ciclo de congelación de 24 horas a una $T^a \leq -20^{\circ}\text{C}$. Esto incluye productos de la pesca que han sido sometidos a un proceso de ahumado en frío en el que la temperatura central del producto no ha sobrepasado los

60°C (arenque, caballa, espadín y salmón salvaje del Atlántico o Pacífico). Igualmente estarán obligados a garantizar la congelación en las mismas condiciones si se trata de productos de la pesca en escabeche o salados, cuando este proceso no baste para destruir las larvas.

Estas medidas pueden ser llevadas a cabo en estos establecimientos, pero muchas veces escapan a los hogares de familias consumidoras, en este caso, las autoridades sanitarias no pueden controlar al 100% dichas medidas, recayendo la responsabilidad profiláctica sobre las campañas publicitarias de prevención de la anisakidosis llevadas a cabo por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición ([AESAN](#)).

Haciendo referencia a este hecho, el conocimiento del estado de parasitación de los pescados de consumo por nematodos en cada zona de captura puede orientar las acciones de vigilancia de los productos de la pesca y a la valoración del riesgo sanitario.

1.7.- OBJETIVOS

Según la [EFSA \(2010\)](#), para productos de la pesca capturados en el medio marino de consumo crudo o casi crudo, es importante la información sobre prevalencias y abundancias así como la identificación de especies, su distribución geográfica y hospedadores.

Objetivo general:

- Verificar la presencia de larvas de anisákidos en pescados de consumo frecuente en España, obtenidas en supermercados de Valencia; identificar especie y/o genotipo de las larvas encontradas para saber si suponen riesgo en Salud Pública; valorar el grado de infección tanto en vísceras como en músculo de los distintos hospedadores; y analizar los posibles factores que pueden influir en las prevalencias y abundancias de anisákidos en estas especies de pescado de consumo habitual.

Objetivos específicos:

- ✓ Verificar e identificar la presencia de anisákidos, tanto en vísceras como en músculo y diferenciar entre las especies que presentan riesgo para la Salud Pública.
- ✓ Analizar la variación en el grado de parasitación entre las procedencias atlántica y mediterránea. Especificar los factores que pueden influir en las diferencias encontradas, tanto en las abundancias como en las prevalencias.
- ✓ Evaluar las posibles variaciones estacionales (otoño y primavera) en la presentación de las infecciones en las especies de pescado seleccionadas.
- ✓ Valorar si los factores intrínsecos, peso y longitud, influyen en el número de larvas encontradas.
- ✓ Comprobar si existe relación entre el tiempo transcurrido desde la fecha de captura hasta la fecha de análisis y la presencia de parásitos en musculatura, ya que es el microhábitat que presenta mayor riesgo para el consumidor; con el fin de poder comparar la migración *post mortem* en los hospedadores analizados y evaluar si está relacionada con el contenido en grasa del músculo.
- ✓ Valorar si las medidas de control son suficientes y adecuadas para prevenir la anisakidosis por consumo de estas especies de pescado.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.- MATERIAL

2.1.1.- CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA DE LAS ESPECIES DE PESCADO ANALIZADAS

Phylum Chordata

Clase Actinopteri

Subclase Neopterygii

Infraclase Teleostei

Orden Gadiformes

Familia Gadidae

Género *Micromesistius*

Micromesistius poutassou (Risso, 1827)

Familia Merlucciidae

Género *Merluccius*

Merluccius merluccius (Linnaeus, 1758)

Merluccius bilinearis (Mitchill, 1814)

Orden Syngnathiformes

Familia Mullidae

Género *Mullus*

Mullus barbatus Linnaeus, 1758

Orden Scombriformes

Familia Scombridae

Género *Scomber*

Scomber scombrus Linnaeus, 1758

Scomber japunicus Houttuyn, 1782

Orden Clupeiformes

Familia Engraulidae

Género *Engraulis*

Engraulis encrasicolus (Linnaeus, 1758)

Familia Clupeidae

Género *Sardina*

Sardina pilchardus (Walbaum, 1792)

2.1.2.- OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE HOSPEDADORES

Las especies de pescado fueron seleccionadas, unas por pertenecer a los grupos más comunes de comercialización, que el consumidor puede encontrar frescas y no evisceradas, y otras porque aparecen como las más frecuentes entre los casos de anisakidosis reportados en España o por hallarse entre las especies en las que se obtuvieron mayores prevalencias de parasitación en estudios previos. Todo el pescado analizado procedía del mar Mediterráneo (Zona FAO 37.1) o del océano Atlántico Noreste (Zona FAO 27), excepto la pescadilla americana, procedente del Noroeste Atlántico (Zona FAO 21) pero también de consumo frecuente en España (figura 2.1).

El pescado fue capturado durante las estaciones de otoño y primavera y obtenido en las principales cadenas de supermercados establecidas en Valencia (extrapolables al resto de España).

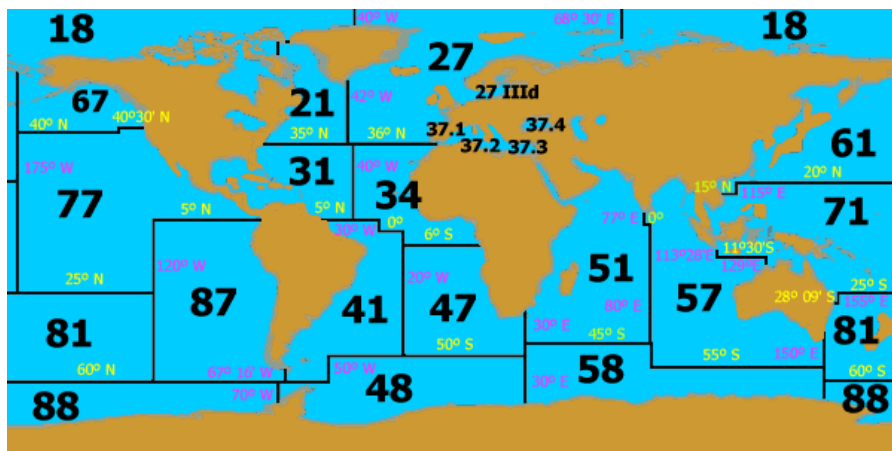


Figura 2.1.- Zonas de pesca establecidas por la FAO (Food and Agriculture Organization).

En el presente estudio se analizaron un total de 1442 ejemplares de pescado capturado entre otoño de 2007 y primavera de 2012 (tabla 2.1).

Los ejemplares fueron elegidos al azar, pero seleccionando distintos pesos y tamaños, así como distintos días transcurridos entre la fecha de captura y la de análisis (que correspondería a la fecha de consumo). En el momento de la compra se ofrecían frescos y no eviscerados y en el mismo punto de venta se obtuvieron los datos necesarios para el estudio: especie, fecha de captura y origen, principalmente (figura 2.2).



Figura 2.2.- Datos que figuran en las etiquetas identificativas.

Tabla 2.1.- Número de individuos de pescado analizado por especie, procedencia y estación de captura.

Nombre común	Nombre científico	<u>ATLÁNTICO</u>			<u>MEDITERRÁNEO</u>			<u>TOTAL</u>		
		Otoño	Primavera	TOTAL	Otoño	Primavera	TOTAL	Otoño	Primavera	TOTAL
Bacaladilla	<i>Micromesistius poutassou</i>	94	75	169	40	75	115	134	150	284
Merluza europea	<i>Merluccius merluccius</i>	-	100	100	40	60	100	40	160	200
Merluza americana	<i>Merluccius bilinearis</i>	56	60	116	-	-	-	56	60	116
Salmonete de fango	<i>Mullus barbatus</i>	-	-	-	75	80	155	75	80	155
Boquerón	<i>Engraulis encrasicolus</i>	59	50	109	50	50	100	109	100	209
Sardina	<i>Sardina pilchardus</i>	50	51	101	50	50	100	100	101	201
Caballa	<i>Scomber scombrus</i>	55	25	80	40	49	89	95	74	169
Estornino	<i>Scomber japonicus</i>	58	15	73	-	35	35	58	50	108
TOTAL		372	376	748	295	399	694	667	775	1442

Los rangos (mínimo-máximo) de peso, longitud y días transcurridos entre la pesca y el análisis figuran en la tabla 2.2.

Tabla 2.2.- Número (n) y rangos de peso, longitud y días pescado de cada una de las especies analizadas.

Especie	n	Rango de Peso	Rango de Longitud	Rango de días pescado
Bacaladilla	284	17,58-145,20 g	14,50-28,60 cm	1-8 días
Merluza europea	200	43,63-549,60 g	19,40-41,50 cm	1-6 días
M. americana	116	51,44-215,92 g	19,00-32,50 cm	1-8 días
Salmonete	155	11,24-85,60 g	10,60-21,00 cm	1-5 días
Boquerón	209	7,10-39,10 g	10,50-18,20 cm	1-5 días
Sardina	201	8,80-120,61 g	10,60-25,70 cm	1-4 días
Caballa	169	29,96-466,80 g	15,00-39,20 cm	1-5 días
Estornino	108	62,72-511,80 g	20,00-40,00 cm	1-6 días

2.1.3.- DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES HOSPEDADORAS ANALIZADAS

2.1.3.1.- Bacaladilla (*Micromesistius poutassou*)

La bacaladilla es una especie de pequeño tamaño, cuerpo delgado y fusiforme, color característico gris azulado en la parte dorsal y más blanquecino en la ventral; cabeza puntiaguda, grandes ojos y provista de tres aletas dorsales y dos anales. Su tamaño varía entre 15 y 30 cm de longitud, con un máximo de 50 cm (figura 2.3).

En España también se le denomina lirio, maire y perlita, y aunque se le considera próxima al bacalao, *Gadus morhua*, se trata de especies distintas. Si bien la bacaladilla no tiene sustitutivo en el mercado interior, la bacaladilla austral de América del Sur, *Micromesistius australis*, es similar. También puede confundirse con el pez rey o liba e incluso ser tomada por pescadilla pequeña, *Merluccius bilinearis* o *Merluccius merluccius*, aunque sus colores característicos las diferencian.

Especie oceánica y batipelágica, es un pez gregario, errático y que habita entre los 300 y 400 m de profundidad, pudiendo llegar a los 2000 m. Por la noche asciende para alimentarse, principalmente de pequeñas quisquillas (krill) y raramente (los ejemplares de mayor tamaño) de otros peces o cefalópodos. Habita en aguas templadas, distribuidas entre 26°N-79°N y 51°E-82°E.

Realiza migraciones norte-sur, favorecidas por las corrientes marinas, asociadas a su reproducción. Alcanza su madurez sexual a los tres años, desovando en febrero en las zonas de localización situadas en el sur y en mayo en las del norte.



Figura 2.3.- Bacaladilla.

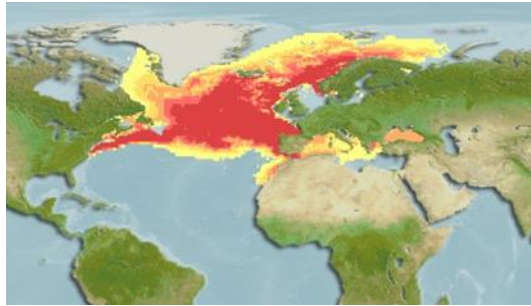


Figura 2.4.- Distribución de *M. poutassou*.

(<http://www.fishbase.org>)

Sus principales áreas de distribución van desde el mar de Barents hasta Gibraltar y Mauritania, Groenlandia, Islandia, Terranova y puntualmente en la costa este de Estados Unidos, en el Atlántico Norte; y el mar Mediterráneo (figura 2.4).

La flota del Norte (Portugal y costas del Cantábrico) emplea como método de captura el arrastre pelágico principalmente, mientras que en el Mediterráneo es susceptible de captura con cerco, palangres de fondo, redes de enmalle e incluso con sedal (anzuelo a mano).

La bacaladilla es un pescado blanco, ya que su contenido en grasa es muy bajo (0,7%), contiene proteínas de alto valor biológico, minerales (yodo, magnesio, zinc) y vitaminas del complejo B. Muy consumida en los hogares españoles, principalmente fresca pues su carne es fina y sabrosa pero delicada, blanda y de difícil conservación, lo cual desaconseja, para evitar que pierda su textura, la congelación. La permanencia del producto en Merca es de 1-2 días, en cámara entre 0°-4°C, conservado en hielo y agua para su comercialización en fresco (figura 2.5).



Figura 2.5.- a y b) Bacaladillas expuestas en el punto de venta del supermercado.

Normalmente se consume rebozada y empanada, aunque también puede cocinarse al microondas, como croquetas, flanes y pudín. Dada la fragilidad de su carne, el excedente es destinado a la elaboración de harinas de pescado, empleándose también en acuicultura como alimento del rodaballo, especialmente.

2.1.3.2.- Pescadilla europea (*Merluccius merluccius*)

Especie denominada comúnmente pescadilla europea o merluza europea (los ejemplares de mayor tamaño). Color gris acero en el dorso, más claro en los costados y blanco plateado en el vientre. La longitud máxima registrada en el Atlántico es de 140 cm y el peso máximo de 15 kg, aunque raramente excede los 100 cm y los 10 kg; en el Mediterráneo no sobrepasa los 89 cm de longitud y los 6 kg de peso (figura 2.6).

Su entorno es demersal, habita en áreas marinas con una escala de profundidad de 30-1075 m, por lo general entre 70 y 370 m. Se desarrolla en aguas templadas. Los adultos viven cerca del fondo durante el día, pero ascienden durante la noche y se alimentan principalmente de calamares y peces (pequeñas merluzas, anchoas, sardinas, arenques, bacalao y otras especies de gadoideos). Los jóvenes, objeto del presente estudio, se alimentan de crustáceos (especialmente eufásidos y anfípodos).

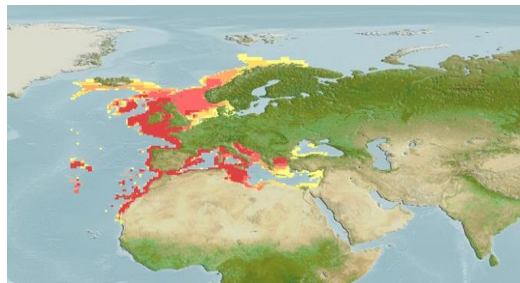


Figura 2.6.- Pescadilla europea. **Figura 2.7.-** Distribución de *M. merluccius*.

(<http://www.fishbase.org>)

Su distribución está limitada al Atlántico oriental, desde Noruega e Islandia hasta el sur de Mauritania; en el Mediterráneo se extiende desde el estrecho de Gibraltar hasta la costa sur del mar Negro, con rangos entre 76°N-18°N y 30°O-42°E (figura 2.7).

El método de captura más común es el arrastre de fondo, siendo las principales zonas pesqueras Escocia, Irlanda, golfo de Vizcaya, costa portuguesa y costa oeste del norte de África.

La pescadilla es un pescado blanco ya que su contenido en grasa está alrededor del 2%, por tanto es muy adecuada en sobrepeso y obesidad; sus proteínas son de elevado valor biológico, también es rica en minerales (potasio, fósforo, magnesio) y vitaminas del complejo B. Los ejemplares más grandes se comercializan sin vísceras pero los más pequeños se pueden adquirir enteros y sin eviscerar (figura 2.8); también es frecuente su comercialización congelada.

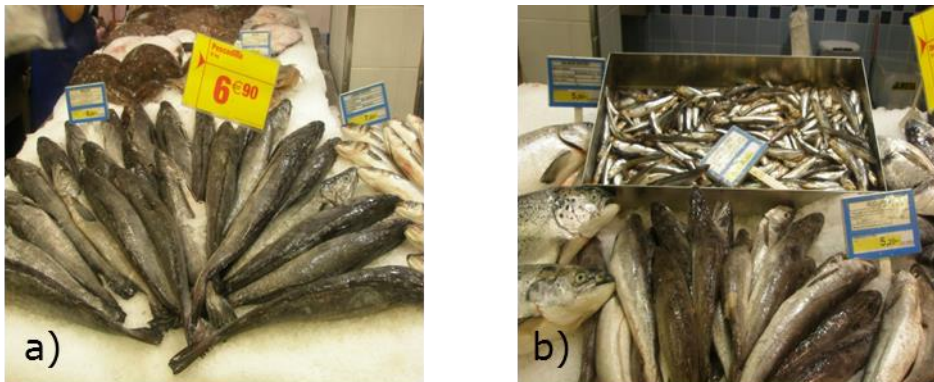


Figura 2.8.- a y b) Pescadilla europea en el punto de venta del supermercado.

Admite las mismas preparaciones que la bacaladilla; fresca se puede cocinar al horno, plancha, frita o al microondas.

2.1.3.3.- Pescadilla americana (*Merluccius bilinearis*)

Especie conocida como pescadilla americana o merluza plateada. Características similares a la pescadilla europea aunque se diferencia en su color, más rojizo. La longitud máxima registrada es de 76 cm, comúnmente de 37 cm para machos y de 65 cm para hembras. El peso máximo registrado es de 2,3 Kg (figura 2.9).

El hábitat natural de esta especie es demersal, más abundante en arenales y en desvíos hacia aguas someras; oceanódromos, se desplazan en el mar en un rango de profundidad de 55-914 m. Se desarrollan en un clima de aguas templadas, distribuidas entre 55°N-24°N y 80°O-42°O; se mueven cerca de la costa en primavera mientras que en invierno migran hacia aguas más cálidas. Es un voraz depredador con hábitos caníbales, los adultos se alimentan de otros peces como gadoideos y arenques, mientras que los más pequeños, jóvenes, objeto del presente estudio, se alimentan de crustáceos como los eufásidos y pequeñas gambas.



Figura 2.9.- Pescadilla americana. **Figura 2.10.-** Distribución de *M.*

bilinearis. (<http://www.fishbase.org>)

Material y Métodos

Su distribución geográfica está limitada al Atlántico noroeste, las costas de Canadá y Estados Unidos, desde los canales de la isla Bell hasta las Bahamas, siendo más común desde el sur de Terranova hasta Carolina del Sur (figura 2.10).

El método de captura principal es por arrastre demersal.

Su composición es similar a la pescadilla europea y su carne es de textura firme y muy sabrosa; se comercializa en filetes, congelada y ahumada. Los ejemplares más pequeños se comercializan enteros (figura 2.11).

Admite las mismas preparaciones culinarias que la pescadilla europea y la bacaladilla.



Figura 2.11.- a) y b) Pescadilla americana en el punto de venta del supermercado.

2.1.3.4.- Salmonete de fango (*Mullus barbatus*)

Dentro del género *Mullus* se encuentran diversas especies entre las cuales se encuentran el salmonete de roca (*Mullus surmuletus*), de colores vivos, tonos rojizos y bandas amarillas longitudinales; y el salmonete de fango (*Mullus barbatus*), de color ligeramente más apagado, rosáceo, sin bandas amarillentas, más plateado en la zona ventral y con la primera aleta dorsal casi transparente.

De cuerpo alargado y comprimido lateralmente, longitud entre 10 y 20 cm (pudiendo alcanzar los 30 cm), cabeza pequeña; debajo de la mandíbula inferior presenta dos largos barbillones, más cortos que las aletas pectorales, la mandíbula superior no tiene dientes, y la inferior tiene molariformes. Opérculo liso, con dos aletas dorsales bien separadas y cola ahorquillada (figura 2.12). Los barbillones son órganos sensoriales para el gusto y tacto con los que remueven la arena para buscar alimentos, come la arena que luego filtra y expulsa a través de las hendiduras branquiales quedándose con gusanos, pequeños moluscos y crustáceos.

Suelen vivir en pequeños grupos aunque es posible ver individuos separados.

Son especies bentónicas, el salmonete de fango habita zonas muy cercanas a la costa y en fondos arenosos, limosos o fangosos entre 5 y 300 m, mientras que el de roca vive en fondos rocosos de bastante profundidad.



Figura 2.12.- Salmonete de fango.

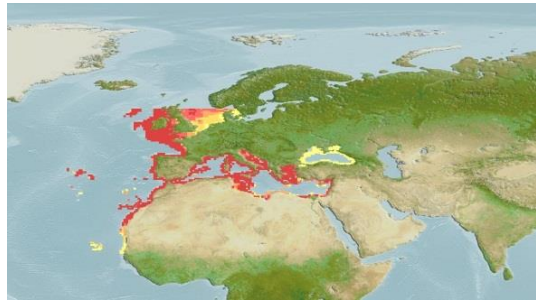


Figura 2.13.- Distribución de *M. barbatus*. (<http://www.fishbase.org>)

Su distribución geográfica va desde el Norte de las islas Británicas hasta el Mediterráneo y Senegal, en un rango de temperaturas subtropicales, entre 58°N-14°N y 32°O-42°E (figura 2.13).

Método de captura principalmente con redes de enmalle y de arrastre de fondo.

Se le considera una especie semi-grasa (contenido en lípidos inferior al 4%). Es rico en ácidos grasos ω -3, vitaminas (B1, B2, B3, B9, E) y minerales (fósforo, hierro, potasio, magnesio, yodo y molibdeno), aunque su contenido proteico es bajo, las proteínas son de alto valor biológico ya que contienen todos los aminoácidos esenciales.

La carne del salmonete se parece mucho a la de la pescadilla y tiene las mismas propiedades, es firme, blanca y de excelente sabor, pero delicada. Esta especie es abundante en el Mediterráneo y, por tanto, frecuente en nuestra dieta. Se encuentra en el mercado fresco (figura 2.14), aunque en ocasiones también se puede adquirir congelado.



Figura 2.14.- Salmonete de fango.



Figura 2.15.- Preparado en tartar.

La manera más frecuente de cocinarlo es frito, al horno, en papillote o emparrillado, también puede prepararse en tartar (figura 2.15); además, el hígado es la parte más apreciada por los gastrónomos que recomiendan no desecharlo al extraer las vísceras.

2.1.3.5.- Boquerón (*Engraulis encrasicolus*)

Cuerpo alargado, delgado y algo comprimido lateralmente; hocico cónico y puntiagudo sobrepasando la mandíbula inferior, boca muy grande y en posición inferior; posee una única aleta dorsal corta, situada en el centro del dorso; cola en V, escamas caedizas, dorso azul-verdoso, con una banda longitudinal plateada bordeada por encima por una línea oscura que va desapareciendo con la edad, vientre pálido. Longitud de 4 a 14 cm con un máximo de 20 cm (figura 2.16).

Dado que presentan morfología, tamaño y color similar, se puede confundir fácilmente con el gualde, *Atherina presbyter*, pero este último tiene la boca mucho más pequeña y oblicua y dos aletas dorsales.

Especie oceanódroma, principalmente costera, vive en aguas superficiales litorales y oceánicas próximas, entre 0 y 400 m de profundidad. En ciertas épocas tiene crecimientos demográficos notables, forma grandes bancos y efectúa migraciones considerables, moviéndose hacia el norte en aguas superficiales en verano y descendiendo en invierno. Tolera la salinidad y en algunas zonas entra en lagunas, esteros y lagos, sobre todo durante el desove. Es una especie carnívora que se alimenta de animales planctónicos (crustáceos y moluscos).



Figura 2.16.- Boquerón.



Figura 2.17.- Distribución de *E. encrasicolus*.

(<http://www.fishbase.org>)

Se distribuye en el Atlántico oriental e Índico occidental, desde Noruega y mar Báltico hasta Sudáfrica, islas Azores, Canarias, Cabo Verde y Santa Helena, frecuente en todo el Mediterráneo

y en el mar Negro (figura 2.17). Habita en climas subtropicales, entre 62°N-37°S y 18°O-42°E.

Se captura con artes de cerco y su nivel de explotación es elevado.

Tiene un interés comercial alto y es muy apreciado por los consumidores. Se comercializa fresco (figura 2.18), seco, ahumado, en conserva y raramente congelado, también se utiliza para hacer harina de pescado y como carnada en las pesquerías de atunes.



Figura 2.18.- Boquerones en la lonja.



Figura 2.19.- Boquerones en vinagre.

Con cabeza se cocinan fritos o rebozados, en España se consumen frecuentemente en vinagre (figura 2.19) y en Italia marinados. Su carne es blanca y firme, clasificado como pescado azul ya que su contenido en grasas oscila entre 5% y 6%; su contenido en proteínas varía entre 17% y 21%, y es muy rico en ácidos grasos ω -3; consumidos con espinas son una buena fuente de calcio y otros minerales.

2.1.3.6.- *Sardina (Sardina pilchardus)*

Cuerpo alargado, casi cilíndrico, vientre bastante redondeado, con escudetes formando una pequeña cresta; mandíbula superior redondeada, aletas dorsal y anal con numerosos radios blandos, cola en V, dorso azul verdoso y lados dorados, vientre plateado con manchas oscuras en los flancos superiores. Pequeño tamaño, de 15-20 cm (máximo 25 cm) y peso entre 25 y 63 g (máximo de 130 g) (figura 2.20).

Debido a la gran semejanza morfológica que presenta con otros pescados, en los mercados puede confundirse con la alacha, *Sardinella aurita*, y el machuelo, *Sardinella maderensis*, pero ninguna de estas dos especies tienen estriaciones óseas radiales en la parte inferior del opérculo. La alacha se distribuye por el Mediterráneo, en especial por la zona meridional, donde es bastante común, tiene los flancos plateados con una línea dorada pálida a media altura y una mancha negra patente en el borde posterior del opérculo mientras que el machuelo presenta los costados plateados con una línea dorada pálida a media altura precedida por una mancha dorada o negro pálido detrás del opérculo.

Habita en aguas costeras y oceánicas próximas, desde la superficie hasta 250 m de profundidad. Realiza migraciones de acercamiento y alejamiento de la costa. Durante la noche se sitúan a menos profundidad que durante el día. Se localiza sobre todo en aguas cálidas y saladas, agrupadas en extensos cardúmenes en las superficies marinas, distinguibles a grandes distancias porque forman unas manchas características producidas por su movimiento. De hábitos omnívoros, se

alimenta de plancton, pequeños peces, crustáceos y huevos de otras especies.



Figura 2.20.- Sardina.

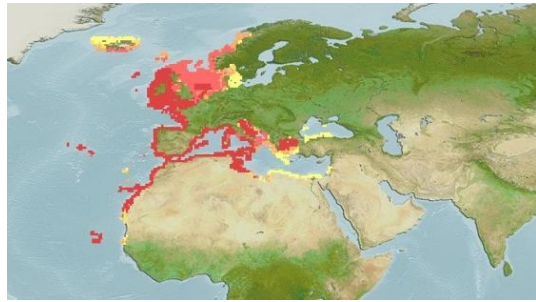


Figura 2.21.- Distribución de *S. pilchardus*.

(<http://www.fishbase.org>)

Esta especie es subtropical, habita entre 66°N-15°S, se distribuye por el Atlántico (desde las costas de Senegal hasta Noruega), Mediterráneo, Cantábrico, canal de La Mancha y mar del Norte; es muy común a lo largo de todo el litoral español y la zona occidental africana, y menos abundante en las costas septentrionales (figura 2.21).

Se captura con artes de cerco y playa durante todo el año, aunque varían por zonas y su nivel de explotación es elevado.

Interés comercial alto, se comercializan enteras (figura 2.22), en fresco y en conserva, los ejemplares pequeños se utilizan salados y secos (jareados); también se utilizan como carnada, vivos o muertos.

Su carne es blanca-rojiza; clasificado como pescado azul, aunque con cierta variación estacional en su contenido graso, que oscila entre un 7% y un 10%; es una buena fuente de

ácidos grasos ω -3. Su contenido proteico también es elevado (18-21%), contiene vitaminas del complejo B (B1, B12) y liposolubles (A, D y E), también es rica en minerales (fósforo, magnesio, potasio, hierro, zinc y yodo). Las sardinillas, sobre todo cuando están saladas y secas (jareadas), al consumirse en general con espinas, son una buena fuente de calcio. Hay que tener en cuenta que el contenido en purinas es elevado, por tanto, no son adecuadas en personas que padecen gota.

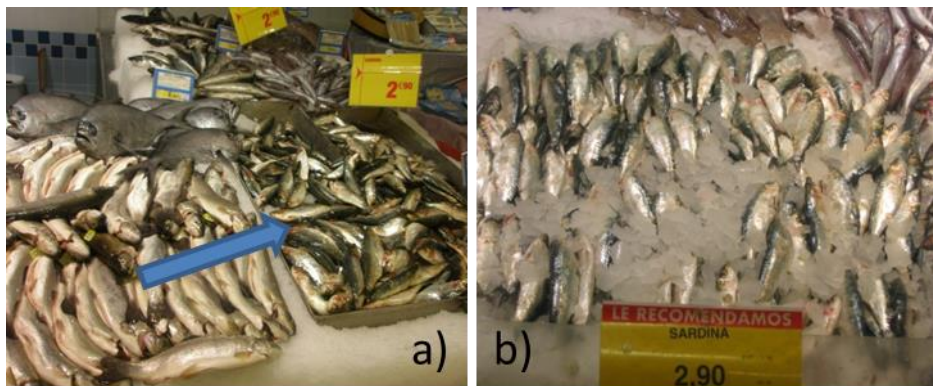


Figura 2.22.- a) y b) Sardinias en el punto de venta del supermercado.

La sardina es uno de los pescados azules de mayor consumo y fresca admite múltiples preparaciones culinarias. Las de mayor tamaño se preparan principalmente a la plancha o parrilla, habitualmente enteras, con cabeza e incluso en ocasiones junto con las vísceras. Las de menor tamaño poseen una carne más fina y delicada y se suelen cocinar fritas, rebozadas, al microondas o asadas en papillote. Limpias y sin cabeza, se puede degustar en escabeche y como base de guisos marinos, junto a los gueldes y boquerones, las sardinillas jareadas constituyen los denominados "pejines" que se preparan quemados con alcohol.

2.1.3.7.- Caballa (*Scomber scombrus*)

A esta especie también se le conoce con el nombre de sarda, verdel o verta. Tiene el cuerpo alargado, fusiforme y de sección casi redondeada al estar poco comprimido lateralmente, cubierto de pequeñas escamas, boca grande, con mandíbulas del mismo tamaño y dientes dispuestos en una única fila. Primera aleta dorsal formada por radios espinosos, bastante separada de la segunda, con radios blandos; pedúnculo caudal estrecho, provisto de una pequeña quilla y aleta caudal bastante hendida. Color del dorso verde azulado, con numerosas bandas transversales bien marcadas, sinuosas y más oscuras que las laterales, vientre gris plateado, sin manchas. Longitud alrededor de 30 cm (máximo 50 cm), y peso entre 250-300 g aunque puede llegar hasta los 3 Kg (figura 2.23).

Especie epipelágica y mesodemersal, forma grandes bancos que nadan a gran velocidad. Vive entre la superficie y los 300 m de profundidad, acercándose a la costa para la reproducción cuando la temperatura del agua está entre 11-14°C. Durante el invierno permanece en el fondo del mar sin alimentarse y cuando llegan los meses de primavera vuelve a aproximarse a la superficie. La alimentación de la caballa es bastante amplia e incluye desde crustáceos (copépodos y eufásidos) hasta larvas de sardina y anchoa, que quedan retenidas en sus branquiespinas.



Figura 2.23.- Caballa.



Figura 2.24.- Distribución de *S. scombrus*.

<http://www.fishbase.org>

Es muy abundante en el Atlántico oriental, desde las islas Británicas hasta las costas del norte de África, así como en el Atlántico occidental, en concreto en las costas de Estados Unidos y Canadá, también es abundante en el Mediterráneo y mar Negro (figura 2.24). Rango de distribución entre 70°N-25°N y 77°O-42°E.

Se captura con artes de cerco (a veces junto con las sardinas), arrastre pelágico y redes de enmalle.

La caballa se encuadra dentro del grupo de los pescados azules debido a su contenido graso y es muy apreciado por su sabor y por la consistencia de su carne. Es rica en ácidos grasos ω -3 y sus proteínas son de elevado valor biológico; contiene vitaminas del grupo B y al ser un pescado graso, también posee vitaminas liposolubles (A, D y E), que se acumulan en vísceras (hígado, principalmente) y músculo. En cuanto al contenido en minerales, destaca la presencia de potasio, fósforo, magnesio, yodo y hierro, aunque éste último en cantidad inferior comparado con las carnes. No se aconseja en enfermos de gota ya que su contenido en purinas es alto y

tampoco en casos de hipertensión ya que posee un alto contenido en sodio que aumenta si se trata de caballa en conserva.

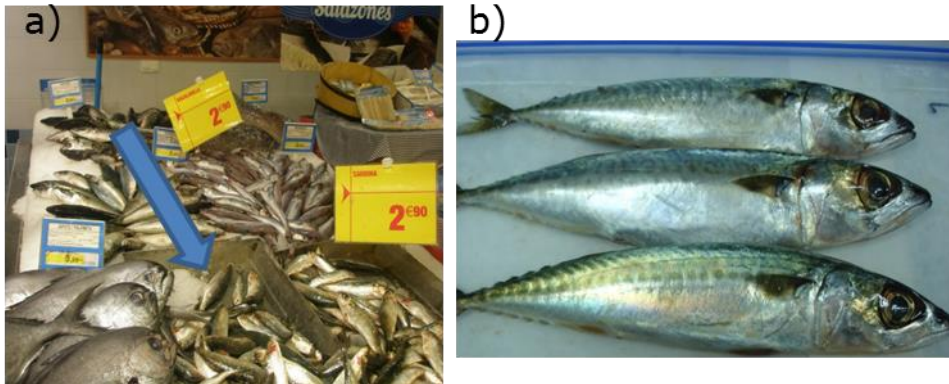


Figura 2.25.- a) Caballas en el punto de venta y, b) recién adquiridas.

A la hora de adquirir un ejemplar de caballa, conviene decantarse por los de menor tamaño porque se consideran los de mejor calidad. La caballa es un pescado que comienza a mostrar signos de falta de frescura a las pocas horas de haber sido capturado y se aconseja elegir aquellos ejemplares que tengan la carne consistente y la piel brillante. Admite diversas formas de preparación y está presente en numerosas recetas, además, es un pescado económico. La mayor parte de las caballas capturadas se destinan a la elaboración de conservas pero, si se consume fresca (figura 2.25), admite prácticamente las mismas preparaciones que las sardinas o las anchoas. Las más grandes se pueden cocinar asadas al horno, en papillote, fritas, a la parrilla o a la plancha, marinadas o en escabeche; además, cada vez es más frecuente encontrar en el mercado caballa ahumada.

2.1.3.8.- Estornino (*Scomber japonicus*)

El estornino es de aspecto muy similar a la caballa pero que posee como característica diferenciadora unas manchas en su parte inferior. Longitud aproximada de 30 cm (máximo 50 cm) y peso similar al de la caballa (figura 2.26).

Es una especie pelágica y costera, desde la superficie hasta 250-300 m de profundidad; realiza migraciones hacia el norte con el aumento de temperaturas en verano y hacia el sur en invierno y para el desove. Su alimentación es oportunista y no selectiva; los adultos se alimentan desde copépodos y otros crustáceos hasta peces y calamares.



Figura 2.26.- Estornino.



Figura 2.27.- Distribución de *S. japonicus*.

<http://www.fishbase.org>

Cosmopolita, habita en aguas cálidas y templadas de los océanos Pacífico, Índico, Atlántico y mares adyacentes; en un rango de temperatura subtropical (10°C-27°C); entre 60°N-55°S y 180°O-180°E (figura 2.27).

Se captura mediante artes de cerco, arrastre y enmalle.

Se comercializan frescos (figura 2.28), congelados, ahumados y en conserva; su importancia comercial es notable, aunque en muchos casos se comercializa como caballa (figura 2.29).



Figura 2.28.- Punto de venta de un supermercado.



Figura 2.29.- Diferencias entre caballa (arriba) y estornino (abajo).

Este pescado admite las mismas preparaciones culinarias que la caballa.

2.2.- MÉTODOS

2.2.1.- OBTENCIÓN DEL MATERIAL HELMINTOLÓGICO

2.2.1.1.- *Toma de datos de las muestras*

Cada uno de los ejemplares analizados se registró mediante un código, clasificándolos por fecha (año/mes/día) y orden en que eran procesados, además se anotaron los datos del peso y longitud corporal (figura 2.30).



Figura 2.30.- Toma de datos de peso y longitud corporal de los hospedadores.

Todos los datos se recogieron en una ficha individual para cada ejemplar y fueron incluidos en la base de datos (véase el apartado 2.2.3).

2.2.1.2.- Observación de las vísceras y aislado de L_3

Cada ejemplar se diseccionó realizándole un corte longitudinal desde el opérculo hasta la parte posterior (después de desechar cabeza y cola), y se separaron las paredes laterales para analizar los órganos internos. Las vísceras se colocaron en placa Petri con agua destilada para favorecer la salida de las larvas y, posteriormente, se observó el interior de los órganos (estómago, intestino, hígado, gónadas, etc.) bajo lupa binocular a 1x y a 3x (figura 2.31).



Figura 2.31.- Disección de vísceras y observación bajo lupa binocular.

Las larvas de anisákidos, así como otros posibles helmintos y parásitos extraídos, se colocaron en frascos de cristal, individuales para cada individuo hospedador y separados también por microhábitat (vísceras y musculatura), con alcohol de 70% como líquido de fijación y su correspondiente etiqueta

identificativa (especie de pescado, código, procedencia y microhábitat). Las larvas que posteriormente se utilizaron en el análisis molecular se lavaron en PBS (tampón fosfato salino) y se congelaron inmediatamente en seco a -20°C dentro de tubos ependorff®, también con su correspondiente etiqueta identificativa.

2.2.1.3.- Digestión péptica de la musculatura y aislado de L_3

La digestión en jugo gástrico artificial consiste en someter la muestra a la acción de una solución digestiva permitiendo la liberación y consiguiente visualización de las larvas de anisákidos.

A cada individuo hospedador analizado se le practicó una división axial en dos mitades, eliminando la espina central; la musculatura se colocó en un vaso de precipitados de un litro de capacidad, numerado, al cual se le añadió el líquido de digestión, que se preparó siguiendo el método clásico propuesto por [HUANG \(1990\)](#):

- 5 g de pepsina comercial (1:2500)
- 10 mL de ácido clorhídrico al 37%
- agua destilada csp 1000 mL

A continuación, se incubó al baño María a 37°C durante 45 min, agitando cada 10-15 min, simulando así las condiciones de una digestión natural.

Una vez finalizada la digestión, la musculatura digerida se recuperó haciendo pasar el producto de la digestión por un tamiz de pequeño diámetro para desechar el líquido de digestión y retener las posibles larvas presentes. La musculatura digerida se transfirió a una placa petri de tamaño suficiente para su observación bajo lupa binocular (figura 2.32).



Figura 2.32.- Digestión artificial de musculatura y observación con lupa del producto de la digestión.

Con las larvas obtenidas de la musculatura se procedió de igual modo que con las aisladas de vísceras.

2.2.2.- MONTAJE E IDENTIFICACIÓN DE LOS HELMINTOS HALLADOS

2.2.2.1.- Montaje extemporáneo

Debido a que las características morfológicas una vez fijado el parásito se observan con mayor dificultad, es necesario un aclaramiento previo de la cutícula. Para ello se utilizó lactofenol de Amman antes de la observación al microscopio.

Las larvas examinadas se colocaron entre porta y cubre con unas gotas del líquido aclarante; cada preparación se dejó reposar el tiempo necesario para conseguir un aclarado adecuado que permitiera la visualización de la organografía interna (BERLAND, 1989).

2.2.2.2.- Identificación morfológica

Una vez aclarado el helminto, se procedió a la visualización bajo microscopio óptico con los objetivos de 4x, 10x y 40x.

La identificación morfológica se basó en las claves de ANDERSON et al. (2009) y GIBBONS (2010) y en las características morfológicas descritas por GRABDA (1991), teniendo en cuenta fundamentalmente, el tamaño, las características del ventrículo esofágico, presencia o no de ciego intestinal y/o apéndice ventricular, características del extremo

anterior (labios y dentículo), del extremo posterior (presencia o no de mucrón) y posición del poro excretor.

2.2.2.3.- Identificación molecular

En muchos casos aparecen obstáculos considerables en el diagnóstico como consecuencia de las limitaciones en la identificación de las larvas utilizando sus características morfológicas (OLSON et al., 1983), por ello, una vez acabada la identificación morfológica, se realizó un análisis molecular por PCR-RFLP de una representación de las larvas aisladas para realizar una caracterización diferencial dentro del género *Anisakis* con el fin de conocer con más detalle las especies presentes en los ejemplares de pescados analizados.

2.2.2.3.1.- Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizaron larvas preferentemente conservadas a -20°C y también algunas conservadas en alcohol, pero estas últimas no dieron buenos resultados. Como material de partida para la extracción se utilizó la parte central, conservando los tercios anterior y posterior (siempre que el tamaño total de la larva permitiera la obtención de DNA en cantidad suficiente), por ser las porciones claves utilizadas en la identificación morfológica. Se intentó seleccionar larvas de ambas procedencias y de ambos microhábitats para valorar las posibles diferencias específicas en cada caso.

La extracción del DNA total se llevó a cabo según el método clásico fenol-cloroformo descrito por [SAMBROOK et al. \(1989\)](#), tal y como se explica a continuación:

Preparación. Cada larva seleccionada se lavó con PBS y se cortó en pequeños trozos, con ayuda de unas pinzas y tijeras para facilitar la posterior rotura de células.

Lisis. Se introdujeron en un tubo eppendorff® con 350 µL de tampón de lisis (100 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1% dodecil sulfato sódico), 40 µL de detergente SDS (dodecilsulfato sódico) al 10% y 10 µL de Proteinasa-K de concentración inicial 500 µg/mL (QUIAGEN®). La preparación se incubó durante 2-3 h a 55°C con agitación continua y suave (350 rpm).

Extracción. En este paso son necesarias tres etapas en las cuales se combinan distintas cantidades de fenol y cloroformo/alcohol isoamílico (49/1) para desnaturalizar y precipitar las proteínas, y para eliminar lípidos e impurezas.

En la primera etapa se añaden 400 µL de fenol; en la segunda, 200 µL de fenol y 200 µL de cloroformo/alcohol isoamílico; y en la tercera, 400 µL de cloroformo/alcohol isoamílico. Tras cada una de estas etapas la mezcla se separa en dos fases mediante centrifugación (Eppendorff Centrifuge 5415R) a 13200 rpm durante 5 min, quedando el DNA en la fase acuosa (sobrenadante), la cual se recupera cuidadosamente y se coloca en un nuevo eppendorff®.

Precipitado y conservación. Finalmente se mide el volumen de la última fase acuosa recuperada y se precipita con 0,1 volúmenes de acetato amónico (NH₄Ac 4M, pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío; proceso que favorece la

concentración del DNA, ya que el etanol en presencia de cationes de NH₄Ac induce cambios estructurales que causan su agregación y precipitación; además, también se eliminan los residuos de fenol y cloroformo del paso anterior. Después se congela a -20°C durante al menos dos horas (o toda la noche); transcurrido este tiempo se centrifuga durante 15 min a 13200 rpm a una temperatura de 4°C, para que el DNA quede concentrado en el fondo del tubo; a continuación se decanta todo el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet de ácidos nucleicos (a veces no visible); seguidamente se lava el precipitado añadiendo 400 µL de etanol frío al 70%, se vuelve a centrifugar 5 o 10 min y se decanta de nuevo el sobrenadante. El sedimento se deja secar a temperatura ambiente manteniendo el ependorff® hacia abajo hasta que se evaporen totalmente los restos de alcohol y el pellet quede completamente seco (2-3 horas). Este DNA precipitado y seco se resuspende en 20-50 µL de tampón TE (Tris-HCl 10mM, pH 7,6, EDTA 1mM) y se conserva a -20°C en congelador o a 4°C en nevera si se va a utilizar a continuación.

2.2.2.3.2.- PCR-RFLP

La PCR (Polimerase Chain Reaction) es una técnica molecular descrita por [MULLIS et al. \(1986\)](#) que permite la amplificación de fragmentos específicos de ácidos nucleicos de los cuales se conocen las secuencias inicial y final. Si una especie o genotipo tiene este fragmento de DNA, se puede utilizar una pareja de oligonucleótidos para amplificarlo. Como método diagnóstico, la amplificación por PCR tiene una elevada sensibilidad y especificidad.

La secuenciación de genes conservados y espaciadores internos transcritos del DNA ha demostrado ser una herramienta eficaz para superar dificultades a nivel del diagnóstico de especies y estudios filogenéticos.

Como marcadores moleculares para la caracterización genética se emplearon los espaciadores internos transcritos (Internal Transcribed Spacers-ITS) 1 y 2 junto con el gen 5,8S del DNA ribosomal. Estos genes se presentan en múltiples copias en el genoma y las diferentes regiones poseen variaciones intra e interespecíficas con distintos niveles de variabilidad en las secuencias, así pues, constituyen una buena herramienta en la resolución de problemas de clasificación entre individuos a diversos niveles taxonómicos. La región 5,8S es más conservada, con muy poca variabilidad entre especies del mismo género e incluso entre individuos de una misma especie. Sin embargo, los espaciadores ITS presentan una tasa de divergencia evolutiva más rápida, siendo muy útiles en la clasificación de especies gemelas con divergencias evolutivas recientes.

Como cebadores de la Taq Polimerasa se utilizaron los oligonucleótidos NC5 (forward) 5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3' y NC2 (reverse) 5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3'. El producto esperado de la amplificación es un amplicón de 960 pb para el género *Anisakis* y de 1050 pb para *Hysterothylacium* (D'AMELIO et al., 2000; ZHU et al., 2000) tal como se muestra en la figura 2.33.

Las reacciones se diseñaron para un volumen final de 25 µL y una mezcla que incluía la enzima "Dream" Taq Polimerasa (Thermo Scientific®), nucleótidos (dNTPs, Takara®), los primers NC5 y NC2 y el tampón necesario para la enzima (tabla

2.3). En todos los ensayos se incluyó un control con DNA positivo para comprobar el éxito de la amplificación y un control negativo, sin DNA, para descartar la existencia de contaminación o actividad inespecífica.

La cantidad de DNA molde que se añade a la mezcla varía en función de la concentración del extracto de partida, la cual puede determinarse espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm (Nanodrop®). Así mismo, se comprueba la calidad del DNA midiendo la relación A_{260}/A_{280} , que se encuentra en torno a 1,8 cuando el DNA es puro, mientras que valores inferiores a 1,6 indican contaminación proteica y no se obtienen buenos resultados.

Tabla 2.3.- Composición de la mezcla de reacción para la PCR.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
Tampón	Tris-HCl 20 mM, pH=8,0; KCl 100 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 1mM; Glicerol 50%; Triton X-100%
dNTPs	2,5 mM de cada uno (TaKaRa®)
Primers	10 μ M de cada uno
Dream Taq Polimerasa	5 U/ μ L
Agua purificada csp 25 μL	
2 μL DNA molde total	

La reacción se llevó a cabo en un termociclador MiniCycler™PT-150 (MJ Research, USA) con el programa siguiente:

5 min a 94°C

30-40 ciclos repitiendo 3 pasos: 30 s a 94°C

30 s a 60°C

30 s a 72°C

5 min a 72°C

descenso de la temperatura y mantenimiento a 4°C.

Electroforesis en gel de agarosa. Para la visualización del producto amplificado, este se sometió a electroforesis en agarosa, técnica que permite separar las moléculas de DNA cuando son sometidas a un campo eléctrico y atraídas hacia el polo opuesto a su carga neta. Las muestras se hacen migrar a través del gel durante un tiempo y se obtiene una separación en que la distancia migrada por una molécula es inversamente proporcional a su longitud en pares de bases. El tamaño de los productos de la PCR vienen determinados por un marcador de peso molecular que contiene oligonucleótidos de tamaño conocido, que se separa en el gel junto con los productos de PCR.

Se preparó un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1%, a partir de una solución madre de TAE 10% (Tris base 48,1 g/L; ácido acético glacial 1,14%; EDTA 0,5 M, pH 8,0), al cual se le añadieron 2,0 µL de Safeview® (NBS Biologicals LTD) de concentración 10 mg/mL para poder visualizar por fluorescencia las bandas obtenidas (Bio-Rad Model 200/2.0). En cada pocillo se cargaron 6,5 µL de una solución que contenía 1,5 µL de tampón de carga (LD 6x, Thermo Scientific®) mezclado con 5,0 µL de producto de PCR, cargando también en uno de los pocillos un marcador de 100

pb (Gene Ruler 100 bp plus DNA Ladder, 0,1 µg/µL, Thermo Scientific®). La electroforesis se realizó a 60-90 voltios constantes durante 30-40 min. El resultado se observó en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio-Rad Chemidoc XRS sistema PC), visualizando los fragmentos amplificados en forma de bandas (figura 2.33).

La finalidad de la electroforesis es comprobar el éxito de la reacción comparando la movilidad de los fragmentos de DNA amplificados con la de un control positivo, aunque también permite estimar la cantidad aproximada del producto de PCR obtenido en función de la intensidad de las bandas.

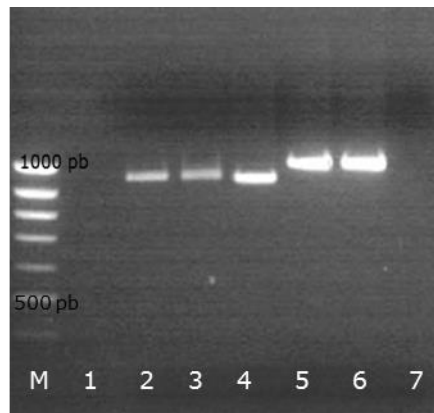


Figura 2.33.- Electroforesis de los productos de amplificación de las regiones ITS1-5,8S-ITS2: M) Marcador de peso molecular de 100 pb Ladder (Thermo Scientific®); 1 y 7) Control negativo; 2 y 3) L₃ de *Anisakis*; 4) Control positivo para *Anisakis* (fragmento de 960 pb); 5) Control positivo para *Hysterothylacium* (fragmento de 1050 pb); 6) L₃ de *Hysterothylacium* (Modificado de [PERTEGUER et al., 2004](#)).

Digestión con la enzima de restricción HinfI. Para poder identificar las diferentes especies de L₃ de *Anisakis* aisladas de las especies hospedadoras analizadas, el fragmento de DNA amplificado se digiere con endonucleasas de restricción que reconocen una determinada secuencia nucleotídica (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) cortando el DNA en bandas de diferentes tamaños según el genotipo. Así pues, es posible amplificar el mismo fragmento de DNA de especies cercanas e identificarlas en base a los distintos tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos. Los perfiles (peso y bandas) esperados tras la digestión se muestran en la figura 2.34.

Existen diferentes enzimas de restricción que ayudan a la identificación genotípica (CfoI, HhaI, RsaI, TaqI, HaeIII). En este trabajo, y teniendo en cuenta las dos zonas de estudio analizadas, se eligió la enzima HinfI, que, según estudios anteriores (ABOLLO et al., 2003; FARJALLAH et al., 2008), es la más apropiada y la más empleada para este tipo de identificación molecular permitiendo diferenciar entre *A. simplex* (*sensu stricto*) (bandas a 620, 250 y 100 pb), *A. pegreffii* (370, 300 y 250 pb) y el genotipo híbrido obtenido de la recombinación genética de ambas especies (620, 370, 300 y 250 pb).

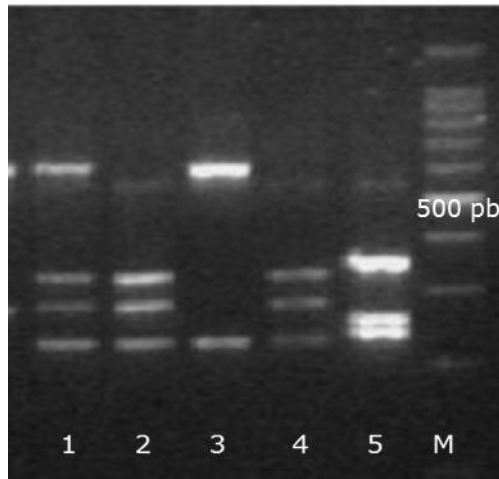


Figura 2.34.- Perfiles RFLP obtenidos por digestión de la región ITS1-5,8S-ITS2 con la enzima de restricción HinfI: 1) Genotipo recombinante (620, 370, 300 y 250 pb); 2 y 4) *A. pegreffii* (370, 300 y 250 pb); 3) *A. simplex (s.s)* (620 y 250 pb); 5) *A. physteris* (380, 290 y 270 pb); M) Marcador de 100 bp (Modificado de FARJALLAH et al., 2008).

La mezcla de digestión (tabla 2.4) se mantiene en estufa a 37°C durante 15-20 min (siguiendo las instrucciones del fabricante) para que actúe la enzima. El producto obtenido se corre en un gel de agarosa al 2% para obtener las bandas bien separadas; los pocillos se cargan de igual modo que en el apartado anterior, con 5 µL del DNA digerido mezclados con 1,5 µL de tampón de carga, cargando además en uno de los pocillos el marcador de 100 pb. La electroforesis se realizó a 60-90 voltios durante 40-60 min. El resultado final se observó en un transiluminador de luz ultravioleta que permite visualizar los fragmentos de DNA amplificados y digeridos en forma de bandas de distintos tamaños en función del genotipo.

Tabla 2.4.- Composición de la mezcla de digestión con HinfI.

COMPONENTE	VOLUMEN
Buffer 10x Fast Digest	2,0 µL
HinfI Fast Digest (1 µg/mL)	1,0 µL
Agua purificada csp 20 µL	
Producto de PCR	10,0 µL

2.2.3.- CONFECCIÓN DE LA BASE DE DATOS

Los datos correspondientes a cada uno de los ejemplares analizados, tanto los recogidos en la toma de datos inicial (subapartado 2.2.1.1), como los parasitológicos (número de parásitos por microhábitat e identificación), se recogieron en una ficha individual para cada hospedador (tabla 2.5), en la cual se registraron los datos siguientes: código asignado, pescado, procedencia, fechas de captura y de análisis, total de anisákidos encontrados, especie y si habían sido extraídos de vísceras o de musculatura.

Este fichero constituyó la base de datos definitiva para los análisis posteriores, la cual se confeccionó utilizando el software FileMaker Pro 6.

Tabla 2.5.- Ficha individual de la base de datos elaborada para cada individuo hospedador analizado.

Código	Pescado	Especie
Supermercado	Procedencia	Subprocedencia
Fecha de captura	Fecha de análisis	Puerto
Días pescado	Longitud	Peso
Anisákidos en vísceras		Anisákidos en musculatura
L ₁ <i>A. simplex</i> tipo I en vísceras		L ₁ <i>A. simplex</i> tipo I en musculatura
L ₁ <i>A. simplex</i> tipo II en vísceras		L ₁ <i>A. simplex</i> tipo II en musculatura
L ₁ <i>Hysterothylacium</i> sp. en vísceras		L ₁ <i>Hysterothylacium</i> sp. en musculatura
L ₁ <i>Contracaecum</i> sp. en vísceras		L ₁ <i>Contracaecum</i> sp. en musculatura
Total Anisákidos		
Total L ₁ <i>A. simplex</i> tipo I		Total L ₁ <i>Hysterothylacium</i> sp.
Total L ₁ <i>A. simplex</i> tipo II		Total L ₁ <i>Contracaecum</i> sp.

2.2.4.- TÉCNICAS ESTADÍSTICAS UTILIZADAS

Los datos recogidos se analizaron estadísticamente mediante pruebas paramétricas y no paramétricas, para el cálculo de las cuales se utilizaron los paquetes estadísticos: Microsoft Excel 2010, StatView 5.0.1 y SPSS 19.0 en sus versiones para Windows.

En todas las pruebas realizadas se estableció la significancia estadística para un valor de $P < 0,05$.

2.2.4.1.- Estadística descriptiva

Para el conjunto de anisákidos totales encontrados, así como para cada uno de los géneros identificados a nivel morfológico, fueron analizados los siguientes parámetros, siguiendo la nomenclatura establecida por [BUSH et al. \(1997\)](#).

- Nº hospedadores parasitados
- Prevalencias de parasitación en %

$$P = \frac{n^{\circ} \text{ total de hospedadores parasitados}}{n^{\circ} \text{ total de hospedadores analizados}} \times 100$$

- Abundancia media,

$$Am = \frac{n^{\circ} \text{ total de parásitos encontrados}}{n^{\circ} \text{ total de hospedadores analizados}}$$

- Rango de parasitación (mínimo-máximo)

Cada uno de estos parámetros fue analizado para:

- el total de muestra de cada especie de pescado examinada;
- el total por procedencia, para cada una de las especies, Atlántico y Mediterráneo;
- el total por estación, para cada una de las especies, otoño y primavera.

Así como para:

- el total de parásitos hallados en cada hospedador examinado, para cada especie hospedadora;
- el total de parásitos en vísceras (de anisákidos totales y por géneros), para cada especie hospedadora;
- el total de parásitos en musculatura (de anisákidos totales y por géneros), para cada especie hospedadora.

Los datos obtenidos para el género *Anisakis* fueron utilizados posteriormente en la comparación de prevalencias y abundancias y en el análisis de la posible influencia, sobre estas dos variables dependientes, de factores intrínsecos y extrínsecos para cada especie hospedadora.

En las muestras de sardina y salmonete el estudio se realizó para el total de anisákidos, con el fin de tener tamaño de muestra suficiente para realizar el análisis estadístico. Mientras que en la muestra de boquerón, el estudio se realizó para ambos géneros de anisákidos por separado (*Anisakis* e *Hysterothylacium*), ya que mostraron prevalencias similares.

2.2.4.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2

A partir de los datos del número de hospedadores parasitados y las prevalencias de parasitación obtenidas en la estadística descriptiva se realizó la comparación de variables dependientes (en este caso la prevalencia) solamente para las larvas del género *Anisakis* teniendo en cuenta que, de los anisákidos hallados, fue el que presentó mayores prevalencias de parasitación en general, y también el de mayor riesgo, ya que es muy resistente y, al contrario de lo que ocurre con las larvas de *Hysterothylacium*, continua viable tras la digestión péptica. Sin embargo, en la muestra de sardinas y en la de salmonete, al ser este último mayoritario en estas dos especies hospedadoras en concreto, se agrupó junto a *Anisakis* con el fin de tener tamaño de muestra suficiente, y se realizó el estudio estadístico al total de anisákidos. Para la muestra de boquerones en particular, el estudio se realizó para ambos géneros por separado, ya que las prevalencias obtenidas fueron bajas en ambos casos pero algo mayores para *Hysterothylacium*, por tanto, y teniendo en cuenta el posible riesgo que presentan ambos géneros en la producción de alergias alimentarias, se realizó el análisis estadístico de los dos, pero solo en esta especie hospedadora. Del género *Contracaecum* se obtuvieron únicamente cuatro individuos y solo en pescadilla americana, por tanto no se le realizó ningún estudio estadístico.

Se utilizó el programa estadístico StatView, confeccionándose las tablas de contingencia 2x2 y calculándose los valores de χ^2 y P, teniendo en cuenta la parasitación y no parasitación entre vísceras y musculatura para cada grupo de especies

hospedadoras analizadas, así como por procedencia y estación de captura.

El Test de χ^2 contrasta la hipótesis nula, H_0 , que postula que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las proporciones observadas de las variables X e Y (ZAR, 2010).

Las variables comparadas fueron:

- microhábitat de parasitación: vísceras y musculatura;
- procedencia: Atlántico y Mediterráneo;
- estación de captura: otoño y primavera.

2.2.4.3.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria

Con el objetivo de analizar la posible influencia de los factores intrínsecos (peso y longitud) y extrínsecos (procedencia, estación de captura y días pescado) sobre la prevalencia, se llevaron a cabo regresiones logísticas binarias (RLB) dando el valor 1 a la presencia de parásitos y el valor 0 a su ausencia.

Las variables independientes (factores intrínsecos y extrínsecos) son en este caso de tipo categórico, agrupadas en dos categorías como muestra la tabla 2.6.

Tabla 2.6.- Valores de las diferentes variables independientes agrupadas cada una de ellas en dos categorías.

Especie	Procedencia	Estación	Peso	Longitud
Bacaladilla	1=Atlántico	1=otoño	1 ≤50 g	1 ≤20 cm
	2=Mediterráneo	2=primavera	2 >50 g	2 >20 cm
Merluza europea	1=Atlántico	1=otoño	1 ≤120 g	1 ≤26 cm
	2=Mediterráneo	2=primavera	2 >120 g	2 >26 cm
Merluza americana	Atlántico	1=otoño	1 ≤100 g	1 ≤25 cm
		2=primavera	2 >100 g	2 >25 cm
Salmonete de fango	Mediterráneo	1=otoño	1 ≤45 g	1 ≤15 cm
		2=primavera	2 >45 g	2 >15 cm
Boquerón	1=Atlántico	1=otoño	1 ≤20 g	1 ≤15 cm
	2=Mediterráneo	2=primavera	2 >20 g	2 >15 cm
Sardina	1=Atlántico	1=otoño	1 ≤40 g	1 ≤18 cm
	2=Mediterráneo	2=primavera	2 >40 g	2 >18 cm
Caballa	1=Atlántico	1=otoño	1 ≤200 g	1 <27 cm
	2=Mediterráneo	2=primavera	2 >200 g	2 ≥27 cm
Estornino	1=Atlántico	1=otoño	1 ≤200 g	1 <30 cm
	2=Mediterráneo	2=primavera	2 >200 g	2 ≥30 cm

El factor días pescado se tuvo en cuenta solamente para los individuos parasitados, en este caso, como variable dependiente se utilizó únicamente la presencia o ausencia de parásitos en la muestra de hospedadores parasitados, pudiendo así relacionar los días transcurridos desde la pesca (muerte del hospedador) hasta la fecha del análisis (teórica fecha de consumo) con la migración *post mortem* de helmintos (potencialmente presentes en vísceras en el momento de la muerte del hospedador) a musculatura; con el propósito de valorar el riesgo.

El objetivo de esta prueba es estimar, mediante una función lineal de las variables independientes, la probabilidad de que cada individuo pertenezca a cada uno de los dos grupos

establecidos por los valores de la variable dependiente (ZAR, 2010).

2.2.4.4.- Comparación de abundancias

Para la comparación de abundancias se utilizaron dos pruebas no paramétricas, el Test de Mann-Whitney y el Test de Wilcoxon. En ambos casos las variables independientes son de tipo categórico, agrupándose, como se muestra en la tabla 2.6, en dos clases (1, 2) cada una de ellas (longitud, peso, procedencia y estación).

2.2.4.4.1.- Test de Mann-Whitney (muestras no relacionadas)

Prueba no paramétrica para muestras independientes distribuidas en dos grupos, y con variables dependientes cuantitativas. El objetivo es determinar si la diferencia, entre el número de veces en que el valor de la variable en un grupo es mayor que en el otro y el número de veces en que es menor, es estadísticamente significativa (ZAR, 2010).

2.2.4.4.2.- Test de Wilcoxon (muestras relacionadas)

Prueba no paramétrica para muestras relacionadas distribuidas en dos grupos, según su microhábitat, y con variables dependientes cuantitativas. El objetivo es determinar si la diferencia entre la magnitud de las diferencias positivas entre los valores de las dos variables y la magnitud de las diferencias negativas es estadísticamente significativa (ZAR, 2010).

2.2.4.5.- Influencia de factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias

En el análisis de la influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias se utilizaron dos pruebas, una no paramétrica, Rho de Spearman, y otra paramétrica, Análisis de Varianza (ANOVA).

2.2.4.5.1.- Rho de Spearman

Esta prueba utiliza el peso y la longitud del hospedador como variables independientes cuantitativas.

La Correlación o Rho de Spearman es una medida del grado de asociación lineal entre la variable dependiente y cada una de las variables independientes (ZAR, 2010).

2.2.4.5.2.- Análisis de Varianza (ANOVA)

Este Modelo Lineal General, ANOVA, utiliza variables independientes de tipo categórico, y como variable dependiente, la transformación logarítmica $\ln(x + 1)$ de la abundancia.

Esta prueba permite realizar un análisis de la varianza de una variable dependiente en los grupos establecidos por las combinaciones de los valores de dos o más variables independientes (ZAR, 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los anisákidos obtenidos de las ocho especies de pescado analizadas se clasificaron morfológicamente como:

- larvas L₃ del género *Anisakis* pertenecientes al morfotipo I de Berland (1961) y presentes en todas las especies hospedadoras;
- larvas L₃ de *Anisakis* tipo II, presentes solamente en pescadilla europea de procedencia mediterránea;
- larvas L₃ del género *Hysterothylacium*, presentes en todas las especies hospedadoras excepto en dos, estornino y pescadilla americana, con mayores prevalencias en salmonete (25,20%) y boquerón (22,00%), siendo las abundancias también mayores en este último (2,17);
- cuatro larvas L₃ del género *Contracaecum*, aisladas solamente de pescadilla americana, única especie analizada procedente del Atlántico occidental (costa de Canadá, zona FAO 21).

En la tabla 1.2 y figura 1.1 del capítulo de introducción se describen las características morfológicas diferenciales entre estos tres géneros, así como las de *Pseudoterranova*, el otro género causante de anisakidosis humana, aunque de este último no se identificó ningún individuo en ninguna de las especies hospedadoras analizadas.

En cuanto al análisis molecular, se realizó únicamente para ejemplares del género *Anisakis*, al ser el más frecuente y el que más casos de anisakidosis ha reportado, además de ser el único anisákido que permaneció viable tras la digestión artificial de la musculatura, por tanto, potencialmente patógeno para el ser humano. Las especies identificadas a partir de 182 muestras analizadas fueron *Anisakis simplex (sensu stricto)*, *Anisakis pegreffii* y el genotipo híbrido entre ambas.

Nota: en este capítulo, al hablar de *Anisakis* e *Hysterothylacium* en general, nos estamos refiriendo en todo momento a los géneros *Anisakis* e *Hysterothylacium*.

3.1.- BACALADILLA

3.1.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS

3.1.1.1.- *Aislado e identificación morfológica*

En total se hallaron 1281 L₃ de anisákidos (982 en vísceras y 299 en musculatura) en las 284 bacaladillas analizadas, que se clasificaron como pertenecientes a los géneros *Anisakis* (1098) e *Hysterothylacium* (183). Las figuras 3.1 y 3.2 muestran la presencia de anisákidos en vísceras y tras su posterior aislamiento, respectivamente.

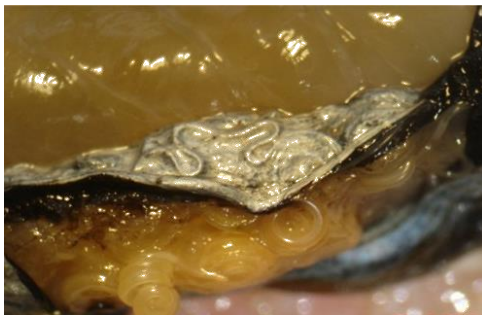


Figura 3.1.- Anisákidos en vísceras de bacaladilla.



Figura 3.2.- Anisákidos aislados de vísceras.

Al observar las larvas bajo la lupa binocular, antes de transferirlas al líquido de fijación, se pudo distinguir claramente el ventrículo esofágico en el caso de *Anisakis* y el esófago y el ciego intestinal en *Hysterothylacium*, estructuras situadas en la porción anterior, de color más oscuro que el resto del cuerpo, como puede apreciarse en la figura 3.3.

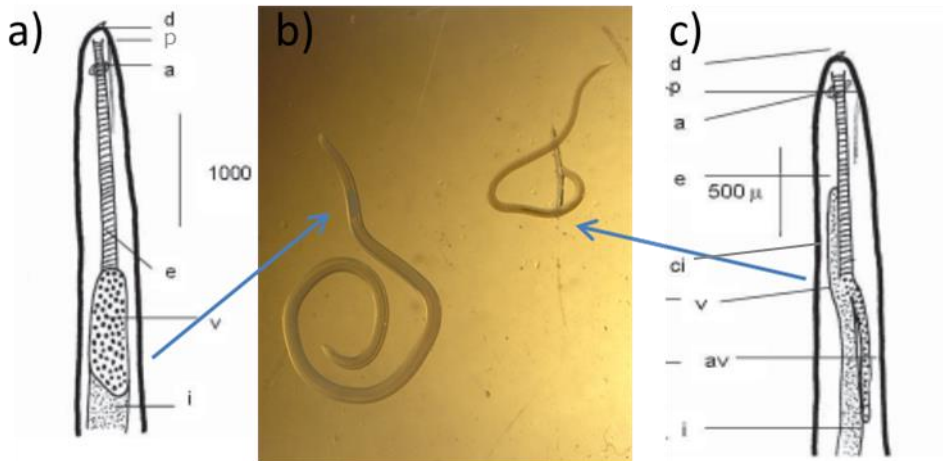


Figura 3.3.- a) Características morfológicas del extremo anterior de las L₃ de *Anisakis*. b) Diferencia de tamaños entre L₃ de *Anisakis* e *Hysterothylacium* aisladas de **bacaladilla**. c) Características morfológicas del extremo anterior de las L₃ de *Hysterothylacium*: d) diente; p) poro excretor; a) anillo nervioso; e) esófago; ci) ciego intestinal; v) ventrículo; av) apéndice ventricular; i) intestino (Dibujos modificados de [RELO-YUBERO et al., 2004](#)).

3.1.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP

Para el análisis se seleccionó la región ITS1-5,8S-ITS2 del DNA ribosomal utilizando los oligonucleótidos cebadores NC5 (forward) y NC2 (reverse).

HinfI es la endonucleasa más conocida y apropiada para este tipo de identificación molecular, produciendo bandeados diferentes para cada una de las especies así como para el genotipo híbrido. Los patrones obtenidos en cada caso aparecen detallados en el pie de la figura 3.4.

Se analizaron 25 L₃ de *Anisakis* tipo I, únicamente de procedencia atlántica ya que no se consiguió amplificar DNA de ninguna de las larvas de procedencia mediterránea. Las especies identificadas mediante PCR-RFLP fueron: *A. simplex* (*sensu stricto*) y un genotipo híbrido *A. simplex* (*s.s.*) x *A. pegreffii*, en base a los patrones de bandas obtenidas tras la digestión con HinfI, como se muestra en la tabla 3.1 y la figura 3.4.

A. simplex (*s.s.*) fue la especie más frecuente en las bacaladillas del Atlántico analizadas. También se identificó el genotipo híbrido *A. simplex* (*s.s.*) x *A. pegreffii* pero en menor proporción (80/20), tanto en vísceras como en musculatura. Mientras que de *A. pegreffii* no se identificó ningún ejemplar.

Tabla 3.1.- N° de L₃ de *Anisakis* aisladas de **bacaladilla**, n° de L₃ de procedencia atlántica analizadas, especie y/o genotipo identificado a nivel molecular. *A.s. (s.s.)=A. simplex (sensu stricto)*.

	N° L ₃ Halladas	N° L ₃ Analizadas	Especie/ Genotipo
Vísceras	894	20	16 <i>A.s. (s.s.)</i> 4 híbridos
Músculo	204	5	4 <i>A.s. (s.s.)</i> 1 híbrido
Total	1098	25	20 <i>A.s. (s.s.)</i> 5 híbridos

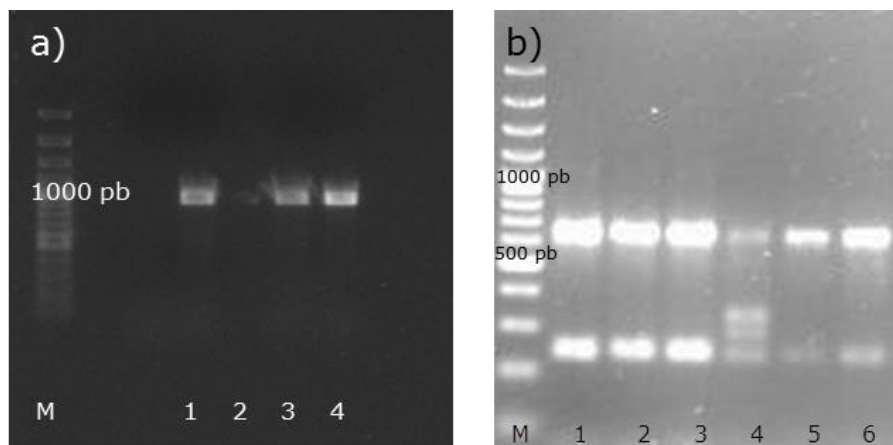


Figura 3.4.- a) Productos de PCR de L₃ analizadas de **bacaladilla** procedente del Atlántico: M) marcador de peso molecular; 1) Control positivo; 2) Control negativo; 3 y 4) Fragmentos de 960 pb. b) Patrones obtenidos tras la digestión con HinfI: M) marcador de peso molecular; 1-3, 5-6) *A. simplex (s.s.)* (620 y 250 pb); 4) genotipo híbrido *A. simplex (s.s.)* x *A. pegreffii* (250, 300, 370 y 620 pb).

3.1.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

3.1.2.1.- Estadística descriptiva

Los parámetros que caracterizan a cada una de las dos poblaciones de anisákidos encontradas en bacaladilla se muestran en las tablas 3.2 a 3.4, en las cuales se describe el número de hospedadores parasitados, las prevalencias de parasitación en %, el rango (mínimo-máximo), las abundancias medias y el número de larvas halladas. Todos los parámetros se expresan para el total de la población hospedadora y por microhábitat de parasitación (vísceras y músculo), tanto para el total de anisákidos, como para cada población helmintiana. Todos estos parámetros se calcularon para el total de la muestra y para cada procedencia y estación de captura. A continuación se comentan los resultados más relevantes obtenidos en el total de la muestra de bacaladilla.

Análisis de las prevalencias

El 55,60% de las bacaladillas analizadas estaban parasitadas por anisákidos (53,90% por *Anisakis* y 12,00% por *Hysterothylacium*). Para el total de anisákidos, las prevalencias fueron superiores en vísceras (51,10%) que en musculatura (28,50%), en el Atlántico (78,10%) mayores que en el Mediterráneo (22,60%) y mayores en primavera (62,00%) que en otoño (48,50%).

Análisis de los rangos

La población de *Anisakis* presentó rangos máximos de parasitación superiores a la de *Hysterothylacium*, con infrapoblaciones máximas de 219 (184 en vísceras, 35 en musculatura) y 76 (51 en vísceras, 30 en musculatura) helmintos respectivamente. El mayor número de anisákidos hallado en un hospedador se obtuvo en el Mediterráneo y durante la primavera (295 larvas; 235 en vísceras y 60 en musculatura). Cabe destacar que durante el otoño se aisló únicamente un ejemplar de *Hysterothylacium* y éste se encontraba en musculatura.

Análisis de las abundancias

Las abundancias medias fueron de 4,51 para el total de anisákidos. Superiores para *Anisakis* (3,87) que para *Hysterothylacium* (0,64), superiores en vísceras (3,46) que en musculatura (1,05) y mayores en el Atlántico (5,17) que en el Mediterráneo (3,54) pero muy similares entre otoño (4,36) y primavera (4,65). Sin embargo, para *Hysterothylacium* la carga parasitaria media fue prácticamente igual en músculo (0,33) que en vísceras (0,31) y mayor en el Mediterráneo (1,09) y durante la primavera (1,21).

Tabla 3.2.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am) con su error (ϵA), rangos mínimo-máximo (Rango) y n° L₃ halladas en la muestra total de **bacaladilla** y para cada microhábitat de parasitación.

TOTAL (N=284)	N	%	Am (ϵA)	Rango	N° L₃ Halladas
<u>Anisakis</u>					
Vísceras	141	49,60	3,15 (0,82)	1-184	894
Músculo	74	26,10	0,72 (0,16)	1-35	204
Total	153	53,90	3,87 (0,94)	1-219	1098
<u>Hysterothylacium</u>					
Vísceras	24	8,50	0,31 (0,18)	1-51	88
Músculo	17	6,00	0,33 (0,15)	1-30	95
Total	34	12,00	0,64 (0,30)	1-76	183
<u>Anisákidos</u>					
Vísceras	145	51,10	3,46 (0,96)	1-235	982
Músculo	81	28,50	1,05 (0,29)	1-60	299
Total	158	55,60	4,51 (1,18)	1-295	1281

Resultados y Discusión

Tabla 3.3.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **bacaladilla** y por microhábitat de parasitación; para cada procedencia.

	ATLÁNTICO (N=169)	%	Am	Rango	Nº L₃ Halladas	MEDITERRÁNEO (N=115)	%	Am	Rango	Nº L₃ Halladas
<i>Anisakis</i>										
Vísceras	124	73,40	4,02	1-90	679	17	14,40	1,87	1-184	215
Músculo	65	38,50	0,81	1-12	137	9	7,80	0,58	1-35	67
Total	131	77,50	4,83	1-95	816	22	19,10	2,45	1-219	282
<i>Hysterothylacium</i>										
Vísceras	16	9,50	0,17	1-8	29	8	7,00	0,51	1-51	59
Músculo	8	4,70	0,17	1-17	29	9	7,80	0,57	1-30	66
Total	21	12,40	0,34	1-25	58	13	11,30	1,09	1-76	125
<i>Anisákidos</i>										
Vísceras	126	74,60	4,19	1-90	708	19	16,50	2,38	1-235	274
Músculo	66	39,10	0,98	1-19	166	15	13,00	1,16	1-60	133
Total	132	78,10	5,17	1-95	874	26	22,60	3,54	1-295	407

Tabla 3.4.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **bacaladilla** y por microhábitat de parasitación; para cada estación de captura.

	OTOÑO (N=134)					PRIMAVERA (N=150)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<i>Anisakis</i>										
Vísceras	60	44,80	3,75	1-90	502	81	54,00	2,61	1-184	392
Músculo	31	23,10	0,60	1-12	81	43	28,70	0,82	1-35	123
Total	64	47,80	4,35	1-95	583	89	59,30	3,43	1-219	515
<i>Hysterothylacium</i>										
Vísceras	0	0,00	0,00	0	0	24	16,00	0,59	1-51	88
Músculo	1	0,70	0,10	1-1	1	16	10,70	0,63	1-30	94
Total	1	0,70	0,10	1-1	1	33	22,00	1,21	1-76	182
<i>Anisákidos</i>										
Vísceras	60	44,80	3,75	1-90	502	85	56,70	3,20	1-235	480
Músculo	32	23,90	0,61	1-12	82	49	32,70	1,45	1-60	217
Total	65	48,50	4,36	1-95	584	93	62,00	4,65	1-295	697

3.1.2.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2

A continuación se muestran las tablas de contingencia (agrupadas en la tabla 3.5), con los valores del test de χ^2 y su significancia estadística (P), derivadas de la comparación de las prevalencias de *Anisakis* en función de su procedencia y estación de captura, así como para cada microhábitat de parasitación.

La presencia de *Anisakis* se codifica como 1, mientras que la ausencia se codifica como 0. Los resultados estadísticamente significativos de χ^2 ($P < 0,05$) se muestran en negrita.

Tabla 3.5.- Comparación de prevalencias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, por procedencia y por estación de captura para el total de muestra analizada de **bacaladilla**.

Microhábitat parasitación	VÍSCERAS			MUSCULATURA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	143	141	284	210	74	284	32,600	<0,0001

Procedencia	ATLÁNTICO			MEDITERRÁNEO			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	38	131	169	93	22	115	91,537	<0,0001

Estación	OTOÑO			PRIMAVERA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	70	64	134	61	89	150	3,363	0,0569

Por microhábitat de parasitación, se dieron diferencias significativas a favor de las vísceras, y por procedencia a favor de la muestra atlántica, mientras que por estación de captura las diferencias no resultaron ser significativas.

3.1.2.3.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria

Para conocer la influencia de los factores intrínsecos (peso y longitud) y extrínsecos (procedencia, estación y días pescado) sobre la prevalencia de *Anisakis*, se llevaron a cabo regresiones logísticas binarias (RLB).

El factor días pescados solo se tuvo en cuenta en los individuos parasitados, con el fin de averiguar la posible relación entre los días transcurridos desde la pesca hasta el consumo, y la presencia del parásito en la musculatura.

En las tablas 3.6 y 3.7 se muestran los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos mediante esta prueba.

Tabla 3.6.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **bacaladilla** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i>	Variables independientes	χ^2	P<0,05	Variables incluidas
TOTAL BACALADILLA (N=153)	procedencia estación, peso, longitud	135,490	0,0001	PROCEDENCIA, ESTACIÓN,PESO
ATLÁNTICO (N=131)	estación, longitud, peso	18,899	0,0001	ESTACIÓN, LONGITUD
MEDITERRÁNEO (N=22)		21,499	0,0001	ESTACIÓN
OTOÑO (N=64)		83,237	0,0001	LONGITUD, PESO, PROCEDENCIA
PRIMAVERA (N=89)	procedencia, longitud, peso	60,997	0,0001	PROCEDENCIA

En la muestra total de bacaladilla todas las variables (excepto la longitud) influyeron en las prevalencias. La procedencia también mostró influencia en ambas estaciones y viceversa; sin embargo la longitud solo influyó en las muestras del Atlántico y de otoño mientras que el peso influyó en la muestra total y en la de otoño.

Teniendo en cuenta solo a los hospedadores parasitados y añadiendo el factor días pescado, solamente este último influyó sobre la prevalencia de *Anisakis* en musculatura para el total de la muestra de bacaladilla (tabla 3.7).

Tabla 3.7.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de *Anisakis* en músculo, solo en **individuos parasitados**, para el total de la muestra de **bacaladilla** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i> en músculo	Variables independientes	χ^2	P <0,05	Variables incluidas
TOTAL BACALADILLA (N=74)	procedencia, estación, longitud, peso, días pescado	5,119	0,024	DIAS PESCADO
ATLÁNTICO (N=65)	estación, longitud, peso,	4,100	0,043	DIAS PESCADO
MEDITERRÁNEO (N=9)	días pescado	-	-	-
OTOÑO (N=31)	procedencia, longitud, peso,	-	-	-
PRIMAVERA (N=43)	días pescado	4,829	0,028	DIAS PESCADO

3.1.2.4.- Comparación de abundancias

Las abundancias se compararon mediante dos pruebas no paramétricas; una para muestras no relacionadas (Test de Mann-Whitney), con variables independientes categóricas; y otra para muestras relacionadas (Test de Wilcoxon), en la cual se comparan las abundancias entre los microhábitats de parasitación de un mismo individuo. Los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) se muestran en negrita.

Test de Mann-Whitney

El análisis se llevó a cabo utilizando como variable dependiente la abundancia de *Anisakis*, para el total de la muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.8.

Tabla 3.8.- Comparación de abundancias de *Anisakis* para muestras no relacionadas, según clases longitud, peso, estación y procedencia, para el total de la muestra de **bacaladilla**.

TOTAL BACALADILLA Abundancia media=3,87	U	Z	P
ATLÁNTICO	3375,0	-9,859	<0,0001
MEDITERRÁNEO			
OTOÑO	9468,0	-0,890	0,375
PRIMAVERA			
CLASE LONGITUD <20 cm	6524,0	-5,420	<0,0001
CLASE LONGITUD ≥20 cm			
CLASE PESO <50 g	7622,0	-3,658	<0,0001
CLASE PESO ≥50 g			

Se obtuvieron diferencias significativas en todos los casos (mayores abundancias en procedencia atlántica y clase longitud y peso mayor) excepto en la estación, donde las abundancias fueron mayores en otoño pero las diferencias con primavera no resultaron ser significativas.

Test de Wilcoxon

En la tabla 3.9 se resumen los resultados obtenidos mediante esta prueba.

Se realizó el análisis para el total de muestra de bacaladilla, así como para cada procedencia y estación de captura, comparando entre microhábitats vísceras y musculatura para cada individuo hospedador.

Tabla 3.9.- Comparación de abundancias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, para el total de la muestra de **bacaladilla** así como para cada procedencia y estación de captura.

MUESTRA	Z	P
TOTAL BACALADILLA	-7,646	<0,0001
ATLÁNTICO	-7,448	<0,0001
MEDITERRÁNEO	-1,602	0,109
OTOÑO	-5,097	<0,0001
PRIMAVERA	-5,720	<0,0001

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas a favor del microhábitat de parasitación vísceras en todos los casos excepto en la muestra del Mediterráneo, donde las abundancias también fueron mayores en vísceras pero sin diferencias significativas respecto a musculatura.

3.1.2.5.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias

Para analizar los factores que influyeron sobre las abundancias se utilizaron dos pruebas, una no paramétrica, Rho de Spearman, cuyas variables independientes son de tipo cuantitativo y otra paramétrica, Análisis de Varianza (ANOVA) con variables independientes categóricas.

Rho de Spearman

Los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos en el análisis de la influencia de los factores intrínsecos (longitud y peso) sobre la abundancia de *Anisakis*, para datos cuantitativos de los factores, se muestran en la tabla 3.10.

Tabla 3.10.- Influencia de los factores intrínsecos sobre las abundancias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **bacaladilla** así como para cada procedencia y estación de captura.

	LONGITUD		PESO	
	Rho	P<0,05	Rho	P<0,05
TOTAL BACALADILLA	0,382	<0,0001	0,251	<0,0001
ATLÁNTICO	0,114	-	0,052	-
MEDITERRÁNEO	0,238	0,010	0,246	0,008
OTOÑO	0,576	<0,0001	0,578	<0,0001
PRIMAVERA	0,084	-	0,199	0,015

En general, el peso y la longitud mostraron influencia sobre las abundancias (siendo estas mayores en los individuos de mayor longitud y peso), excepto en la muestra del Atlántico, debido a que las abundancias fueron elevadas tanto en los ejemplares de mayor tamaño como en los más pequeños.

ANOVA

Los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos en el análisis de la influencia de los factores extrínsecos (procedencia y estación) sobre las abundancias de *Anisakis*, para datos cualitativos de los factores, se muestran en la tabla 3.11.

Tabla 3.11.- Influencia de los factores extrínsecos sobre las abundancias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **bacaladilla** así como para cada procedencia y estación de captura.

VARIABLE DEPENDIENTE Ln (N° L₃ <i>Anisakis</i>+1)	VARIABLES INDEPENDIENTES	F	P<0,05
TOTAL	PROCEDENCIA	6,012	0,015
BACALADILLA	ESTACIÓN	21,207	<0,0001
ATLÁNTICO	ESTACIÓN	5,712	0,018
MEDITERRÁNEO		-	-
OTOÑO	PROCEDENCIA	4,784	0,031
PRIMAVERA		39,130	<0,0001

Los resultados obtenidos mediante esta prueba mostraron que los factores intrínsecos analizados como variables categóricas y agrupadas en dos clases de peso y de longitud, no influyeron en ninguno de los casos, por tanto, al haber mostrado influencia en el análisis cuantitativo, y por tanto más exacto, ya que analiza a cada hospedador individualmente y no agrupados en categorías como en este caso, no fueron incluidos en la tabla. Sin embargo, los factores extrínsecos (procedencia y estación) influyeron en todos los casos, excepto para la muestra del Mediterráneo que no resultó estar influenciada por la estación de captura.

3.1.3.- DISCUSIÓN

La bacaladilla es una especie altamente parasitada por anisákidos y su consumo en España es frecuente, por tanto, el riesgo de adquirir anisakidosis es elevado. Además, se expende sin eviscerar y no es aconsejable su congelación debido a la fragilidad de su carne, por tanto, la medida preventiva más importante en este caso sería cocinarla a una temperatura que garantizara la inactivación de las larvas. Sin embargo, algunos de los antígenos presentes son resistentes al calor conservando su capacidad antigénica después del cocinado. Los resultados obtenidos para esta especie hospedadora están recogidos en el artículo de [MADRID et al. \(2012\)](#).

Especies halladas y prevalencias

Los dos únicos géneros de anisákidos presentes en la bacaladilla analizada fueron *Anisakis* e *Hysterothylacium*. La prevalencia de parasitación total por anisákidos fue elevada (55,60%) y mayor para las especies del género *Anisakis* (53,90%) que para las de *Hysterothylacium* (12,00%), superioridad que se mantiene al separar la muestra según procedencia y estación de captura del hospedador y también para cada microhábitat de parasitación. Otros autores coinciden con la presencia de especies de ambos géneros en bacaladilla: [SANMARTIN et al. \(1994\)](#), [SILVA & EIRAS \(2003\)](#), [FERNÁNDEZ et al. \(2005\)](#), [CRUZ et al. \(2007\)](#); sin embargo, en el estudio realizado por [OSANZ MUR \(2001\)](#) se identificaron

larvas de *Contracaecum* y no de *Hysterothylacium* junto a las de *Anisakis*. Hay que tener en cuenta que las diferencias morfológicas entre ambos géneros son escasas, principalmente el tamaño y la posición del poro excretor, y que este último es difícilmente visible incluso al microscopio después del aclarado.

La comparación de la prevalencia total de *Anisakis* mostró la existencia de diferencias significativas en cuanto a la procedencia atlántica y el microhábitat de parasitación vísceras, no resultando estadísticamente significativa en cuanto a la estación. Sin embargo, al analizar mediante RLB los factores que influyeron en las prevalencias, tanto la procedencia como la estación, y también el peso, mostraron influencia con significancia estadística.

Diversos estudios muestran que las prevalencias de *Anisakis* reportadas en bacaladilla han sido de las más elevadas entre las especies de pescado analizadas: 88,10% en Bilbao (PEREIRA BUENO et al., 1989), 69,90% en Granada (RUÍZ VALERO et al., 1992), 85,50% en Zaragoza (VIU et al., 1996), 63,60% en Castilla-León (PEREIRA BUENO & FERRÉ PÉREZ, 1997), 42,00% en Córdoba (DE LA TORRE MOLINA et al., 2000), y 54,00% en Cádiz (OJEDA-TORREJÓN et al., 2001). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro estudio (MADRID et al., 2012).

Las L₃ de *Anisakis* analizadas a nivel molecular eran únicamente de procedencia atlántica y dieron como resultado la presencia de *A. simplex* (s.s.) y el genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii*, en una proporción de 80/20. Otros estudios realizados en el Atlántico como el de MARTIN-SANCHEZ et al. (2005) muestran la presencia de *A. simplex* (s.s.) y del genotipo híbrido en porcentajes similares a los del

presente estudio (66,67% y 16,67%; respectivamente), pero también se reporta la presencia de *A. pegreffii* en el 20,00% de las larvas analizadas genéticamente. Sin embargo, [ABOLLO et al. \(2001\)](#) identificaron *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii* pero ningún híbrido en bacaladillas capturadas en aguas de Galicia.

En cuanto a la procedencia mediterránea, no se pudo identificar ninguna larva en este trabajo, pero otros autores muestran a *A. pegreffii* como la especie mayoritaria en bacaladillas de esta procedencia ([MARTIN-SANCHEZ et al., 2005](#); [MELONI et al., 2011](#); [TEDDE et al., 2011](#)).

Muchas especies de peces actúan como hospedadores paraténicos de distintas especies de anisákidos. Por ejemplo, *A. simplex* y *Pseudoterranova* spp. suelen aparecer con mayor frecuencia en peces bentónicos o demersales, como la bacaladilla o la pescadilla, mientras que *A. pegreffii* se encuentra con mayor frecuencia en especies pelágicas, como la sardina o el boquerón ([PAGGI et al., 1991](#); [ANDERSON, 1992](#); [MATTIUCCI et al., 1997](#); [ABOLLO et al., 2001](#)).

Influencia de la procedencia

Las prevalencias de *Anisakis* fueron superiores en el Atlántico (77,50%) que en el Mediterráneo (19,10%), tanto a nivel global como en las dos estaciones de captura analizadas. Esta mayor prevalencia en la procedencia atlántica ya fue reportada por otros autores y puede ser debida a distintos factores, por ejemplo, la mayor abundancia de hospedadores definitivos e intermediarios en esta zona ([ARTHUR et al., 1982](#); [BOILY &](#)

MARCOGLIESE, 1995), la menor temperatura del agua en el Atlántico respecto al Mediterráneo (HOJGAARD, 1998) o la dieta de los hospedadores intermediarios y definitivos (RELLO-YUBERO et al., 2004).

Son muy numerosos los estudios que muestran mayores prevalencias de parasitación en bacaladillas de procedencia atlántica respecto de la mediterránea. En el llevado a cabo por ADROHER et al. (1996) también se reportaron mayores prevalencias en el Cantábrico respecto al Mediterráneo. Otras prevalencias obtenidas para bacaladilla del Atlántico fueron: 62,69% (QUINTEIRO et al., 1987), 63,00-70,00% (SANMARTIN et al., 1994), 91,16% (ABOLLO et al., 2001), 99,30% (FERNÁNDEZ et al., 2005), todos ellos en aguas gallegas; 81,70% (MARTIN-SANCHEZ et al., 2005); 77,70 % (CRUZ et al., 2007) en Oporto y 76,30% (FUENTES et al., 2008); mientras que las prevalencias obtenidas para la procedencia mediterránea fueron, al igual que en el presente estudio (MADRID et al., 2012), bastante menores: 30,30% (CUÉLLAR et al., 1991), 28,00% (RENON & MALANDRA, 1991) en Adriático y Tirreno (al este del Mediterráneo), 10,63% (VALERO et al., 2000) en Motril (suroeste Mediterráneo), 18,70-28,40% (OSANZ MUR, 2001), en Tarragona (oeste Mediterráneo), 9,10% (MARTIN-SANCHEZ et al., 2005), mientras que ANGELUCCI et al., (2011) hallaron unas prevalencias del 87,50% (de las cuales el 81,20% se correspondían con larvas tipo I) y MELONI et al. (2011) obtuvieron un 82,35%, ambos en aguas de Cerdeña. Estas prevalencias son bastante superiores a las reportadas por otros autores en el Mediterráneo, pero hay que tener en cuenta que provenían de la zona este, un área protegida para los hospedadores definitivos.

La prevalencia de *A. simplex* varía considerablemente entre diferentes áreas geográficas y especies hospedadoras, siendo en el Mediterráneo mayores en el este (sur de Sicilia, Adriático y Tirreno) que en la zona oeste (islas Baleares, sur de Francia y costas españolas) (MACKENZIE et al., 2008).

Influencia de la estación de captura

La estación influyó sobre las prevalencias, siendo mayores en primavera para *Anisakis*. Sin embargo, las abundancias fueron algo superiores en otoño aunque sin diferencias significativas respecto a primavera. VALERO et al. (1992) también obtuvieron variaciones estacionales de las prevalencias en bacaladilla, pero no otros autores como LÓPEZ GIMÉNEZ & MOSALVE (1994) y OSANZ MUR (2001).

Los estudios llevados a cabo por DE LA TORRE MOLINA et al. (2000) en Córdoba, y por STRØMNES & ANDERSEN (2000) en aguas noruegas sobre la presencia de anisákidos en pescado, concluyen que las prevalencias son mayores en primavera. Este hecho podría deberse a la mayor migración de ballenas en esta época del año (por tanto, presencia de mayor cantidad de huevos de anisákidos) y a la mayor proliferación de zooplancton que permitiría la continuidad del ciclo (KØIE & FAGERHOLM, 1995; KØIE et al., 1995; MARCOGLIESE, 1995a).

Cabe destacar que prácticamente todas las larvas de *Hysterothylacium* se encontraron en la muestra de primavera ya que en otoño solo se aisló un ejemplar (presente en musculatura).

Influencia de la longitud y el peso del hospedador

Los factores peso y longitud del hospedador influyeron tanto en las prevalencias como las abundancias de *Anisakis*. Al igual que en la estación, VALERO et al. (1992) también obtuvieron variaciones en las prevalencias con el peso de las bacaladillas, pero otros autores como LÓPEZ GIMÉNEZ & MONSALVE (1994) y OSANZ MUR (2001) no encontraron relación entre el tamaño del hospedador y las prevalencias.

La infrapoblación con un mayor número de helmintos presentó 219 L₃ de *Anisakis* (y 86 de *Hysterothylacium*) en un ejemplar procedente del Mediterráneo y capturado en primavera, resultando además ser el hospedador de mayor longitud de toda la muestra y uno de los de mayor peso analizado en esta estación y procedencia.

Las causas de esta elevada abundancia podrían ser la acumulación de helmintos debida a una mayor cantidad de primeros hospedadores intermediarios ingeridos. STRØMNES & ANDERSEN (2000) postulan que a mayor tamaño del pez más alto está en la cadena trófica, y por tanto la probabilidad de ingerir hospedadores intermediarios infectados es mayor; si bien, también podría deberse a que en el Mediterráneo el número de segundos hospedadores intermediarios es menor y por tanto los que hay soportarían mayor carga parasitaria.

Microhábitat de parasitación y migración "post mortem"

Los resultados obtenidos mostraron mayores prevalencias y abundancias en vísceras respecto a musculatura, tanto en general como en función de los factores intrínsecos y extrínsecos analizados, aun así, cabe destacar que las prevalencias en musculatura fueron elevadas (26,10%). Otros autores también reportaron prevalencias elevadas en musculatura de bacaladilla aunque menores a las del presente estudio: 20,00% (SANMARTIN et al., 1994), 3,00-10,20% OSANZ MUR (2001), 6,40% (ABOLLO et al., 2001), alrededor de 1,00% (OJEDA-TORREJÓN et al., 2001) y 12,40% (CRUZ et al., 2007).

La RLB mostró influencia de los días pescados sobre la presencia de larvas en musculatura, en el total de bacaladillas y también en las de procedencia atlántica y estación primavera. Algunos autores postulan que las especies grasas y el pescado azul en general, muestran menores prevalencias de parasitación pero una mayor migración al músculo, mientras que en bacaladilla y en el pescado blanco (no graso) las prevalencias son mayores pero la migración es menor y preferentemente al hígado (SMITH, 1984; CORDERO DEL CAMPILLO et al., 1999). Sin embargo, y teniendo en cuenta que una única larva es suficiente para causar anisakidosis, el riesgo de parasitación es importante.

Hysterothylacium

En este estudio no se realizó la identificación molecular de larvas pertenecientes a este género debido a los escasos casos publicados. En el análisis morfológico se pudo observar que la mayoría de las larvas tenían el apéndice ventricular y el ciego intestinal aproximadamente del mismo tamaño, característico de la especie *H. aduncum*, pero también se observaron algunas larvas con el ciego intestinal de menor longitud; por tanto, la identificación se llevó a cabo hasta el nivel genérico.

En este género, la estación juega un papel importante en las prevalencias y abundancias, ya que en otoño solo se halló un individuo parasitado (en musculatura). *H. aduncum* parece ser una especie estacional, los adultos son comunes en los meses templados, durante el invierno cesa la actividad reproductora debido a las bajas temperaturas y a la escasez de alimentos y se detiene la producción de huevos que se reanuda en primavera (BERLAND, 1998).

En cuanto a la procedencia, se observaron mayores abundancias en el Mediterráneo (1,09) y no en el Atlántico (0,34) como ocurría en el caso de *Anisakis*; mientras que las prevalencias fueron muy similares en ambas procedencias (12,40% Atlántico; 11,30% Mediterráneo). El estudio de RELLO et al. (2009), realizado en boquerón, mostró mayores prevalencias de parasitación por *Anisakis* en el Atlántico mientras que en el Mediterráneo predominaba *Hysterothylacium*. Este hecho sugiere que el número de hospedadores definitivos de *Hysterothylacium* (gádidos principalmente) es elevado en esta zona, aunque la abundancia del primer hospedador intermediario y las condiciones

hidrográficas también jugarían un papel importante (KLIMPEL & RÜCKET, 2005).

Además, y al contrario de lo que sucedía para *Anisakis*, *Hysterothylacium* mostró abundancias ligeramente mayores en musculatura que en vísceras en todos los grupos analizados, lo cual hace pensar que este género presenta mayor migración a músculo que *Anisakis*, probablemente debido a su pequeño tamaño. La confirmación de esta hipótesis supondría la existencia de un mayor riesgo para el consumidor, si bien, la posibilidad de que esta especie cause anisakidosis es prácticamente nula, a pesar de la existencia de publicaciones que describen algún caso (YAGI et al., 1996), pero en este estudio lo que se aisló en las heces del paciente no fue un estadio larvario sino un adulto hembra. Además, teniendo en cuenta que en la muestra analizada *Hysterothylacium* apareció asociado a *Anisakis* y que los ejemplares obtenidos de la musculatura no resistieron la digestión péptica artificial, probablemente sería este último el causante de los síntomas de los pacientes infectados con *Hysterothylacium* y que a la vez estuvieran parasitados por *Anisakis*, aunque serían necesarios más estudios que aclararan este tema.

En general, se puede postular que:

- Las especies de *Anisakis* fueron las más prevalentes y abundantes en bacaladilla. Además, este anisákido se mostró resistente a la digestión péptica siendo, por tanto, el que mayor riesgo presenta para los consumidores.
- Las mayores prevalencias y abundancias se observaron en la procedencia atlántica, siendo significativamente menores en el Mediterráneo.
- La estación también influyó, tanto en las prevalencias, que fueron mayores en primavera, como en relación a los géneros identificados, ya que prácticamente todos los ejemplares de *Hysterothylacium* se obtuvieron en la muestra de primavera.
- Las vísceras fueron el microhábitat más parasitado, sin embargo, el factor días pescado es importante en cuanto a la presencia de parásitos en musculatura, ya que a medida que transcurren los días entre la pesca y el consumo también aumenta la migración *post mortem* del parásito, aumentando de esta manera el riesgo.

3.2.- PESCADILLA EUROPEA

3.2.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS

3.2.1.1.- *Aislado e identificación morfológica*

2044 L₃ de anisákidos (744 en vísceras y 1300 en musculatura) se aislaron de las 200 pescadillas europeas analizadas, pertenecientes al género *Anisakis* (2042); tres de las cuales (2 en vísceras y 1 en musculatura) comprendidas dentro del morfotipo II de Berland (1961), presentes solamente en la procedencia mediterránea. Del género *Hysterothylacium* únicamente se obtuvieron 2 larvas. Tanto las L₃ de *Anisakis* tipo II como las de *Hysterothylacium* solo se encontraron en la muestra de primavera. La figura 3.5 muestra la presencia de anisákidos enquistados en musculatura.



Figura 3.5.- Larvas presentes en musculatura de pescadilla europea fresca.

A nivel de las L₃ de *Anisakis* solo puede diferenciarse morfológicamente entre tipo I y tipo II, Berland (1961), ya que las especies comprendidas en cada uno de estos dos grupos son gemelas y carecen de características morfológicas diferenciables. En la tabla 3.12 se describen de forma general las características morfológicas utilizadas en la identificación de cada uno de los dos morfotipos de larvas L₃ de *Anisakis* identificadas en esta especie hospedadora. Las características morfológicas generales de *Hysterothylacium*, en especial aquellas que las diferencian de las otras especies de anisákidos más patógenas para el ser humano, como ya se explicó en el apartado de bacaladilla, son, su menor tamaño, la presencia tanto de apéndice ventricular como de ciego intestinal, poro excretor a la altura del anillo nervioso y mucrón terminal.

Tabla 3.12.- Especies de *Anisakis* comprendidas en los tipos I y II. Principales diferencias morfológicas entre ambos (MATTIUCCI & NASCETTI, 2008).

	<i>Anisakis</i> tipo I	<i>Anisakis</i> tipo II
Especies incluidas	<i>A. pegreffii</i> <i>A. simplex</i> (s.s.) <i>A. simplex</i> C* <i>A. typica</i> <i>A. ziphidarum</i> <i>A. nascettii</i>	<i>A. physeteris</i> <i>A. brevispiculata</i> <i>A. paggiae</i>
Tamaño	15-25 mm	Algo mayor, hasta 30 mm
Extremo posterior	Romo, con mucrón	Cónico, sin mucrón
Ventrículo esofágico	Largo, unión oblicua con el intestino	Corto, conectado al intestino perpendicularmente

El tercer estadio larvario de *Anisakis* tipo I se caracteriza morfológicamente por un ventrículo largo con unión al intestino oblicua y extremo final redondeado, corto y con una espina terminal llamada mucrón. Las larvas tipo II son de mayor tamaño, presentan un ventrículo corto con unión horizontal al intestino y extremo final cónico y sin mucrón (ANDERSON, 2000).

En la figura 3.6 se pueden apreciar las diferencias entre el ventrículo esofágico y extremo terminal de las L₃ de ambos morfotipos.

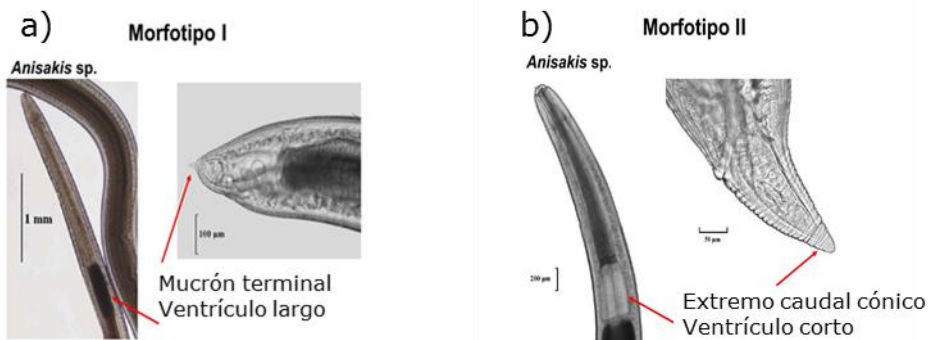


Figura 3.6.- Extremos anterior y posterior de L₃ de *Anisakis*: a) Tipo I; b) Tipo II.

3.2.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP

Para poder llevar a cabo la diferenciación específica es necesaria la utilización de medios de cultivo para obtener, a partir de la L₃, L₄ y adultos, estos últimos más fácilmente diferenciables a nivel morfológico; o emplear técnicas moleculares.

Por ello, se analizaron a nivel molecular 58 L₃ presentes en pescadilla europea del Atlántico y únicamente una L₃ de procedencia mediterránea. No fue posible amplificar el DNA de ninguna de las tres larvas pertenecientes al morfotipo II aisladas de esta muestra, aunque, teniendo en cuenta la procedencia del hospedador, podría tratarse de *A. physeteris*.

El patrón de bandas obtenido para estas L₃, permitió identificarlas como: *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* y genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii*, como se muestra en la tabla 3.13 y la figura 3.7. La única larva analizada de procedencia mediterránea se obtuvo de musculatura y se identificó como *A. pegreffii*.

En ambos microhábitats, la especie mayoritaria fue *A. simplex* (s.s.) seguida del genotipo híbrido, mientras que la única larva identificada de la procedencia mediterránea fue *A. pegreffii*, siendo esta última especie minoritaria en la muestra del Atlántico. Estos resultados muestran una marcada relación de estas dos especies con la procedencia.

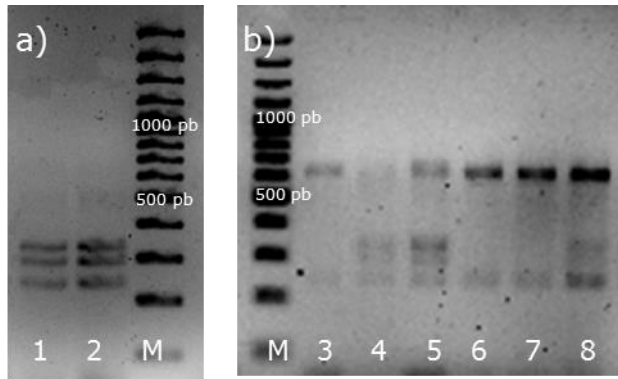


Figura 3.7.- Patrones moleculares obtenidos por PCR-RFLP (HinfI) de las L₃ de **pescadilla europea** analizadas; a) *A. pegreffii* de procedencia mediterránea (1) y atlántica (2); y, b) L₃ de procedencia atlántica: M) marcador de peso molecular; 3 y 6-7) *A. simplex* (s.s.); 4-5 y 8) genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii*.

Tabla 3.13.- Nº de L₃ de *Anisakis* aisladas de **pescadilla europea**, nº de L₃ analizadas, especie y/o genotipo identificado a nivel molecular. A.s. (s.s.)=*A. simplex* (*sensu stricto*).

	Nº L ₃ Halladas	Nº L ₃ Analizadas	Especie/ Genotipo
Vísceras	742	31	16 A.s. (s.s.)
			13 híbridos
			2 <i>A. pegreffii</i>
Músculo	1300	28	19 A.s. (s.s.)
			7 híbridos
			2 <i>A. pegreffii</i>
Total	2042	59	35 A.s. (s.s.) 20 híbridos 4 <i>A. pegreffii</i>

3.2.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

3.2.2.1.- Estadística descriptiva

Los parámetros que caracterizan a cada una de las dos poblaciones de anisákidos obtenidas de en pescadilla europea se muestran en las tablas 3.14 a 3.16.

Análisis de las prevalencias

El 45,50% de las pescadillas europeas analizadas estaban parasitadas por anisákidos (45,00% por *Anisakis* y 1,00% por *Hysterothylacium*). Para el total de anisákidos, las prevalencias fueron superiores en vísceras (36,00%) que en musculatura (29,50%), en el Atlántico (84,00%) que en el Mediterráneo (7,00%) y mayores en primavera (55,00%) que en otoño (7,50%). También se encontraron diferencias entre ambas estaciones en el número de géneros y especies identificadas, ya que en primavera se aislaron L₃ de *Anisakis* tipo II y de *Hysterothylacium* que no aparecieron en la muestra de otoño.

Análisis de los rangos

La población de *Anisakis* presentó los mayores rangos de parasitación. El mayor número de anisákidos hallados en un hospedador se obtuvo en el Atlántico y durante la primavera, (cabe destacar que de las 574 larvas extraídas, 138 se encontraron en vísceras mientras que de la musculatura se

recogieron un total de 436); cabe destacar también que cuando se analizó este individuo hospedador solo había transcurrido un día desde su captura y su peso fue de 314,5 g. Únicamente se aislaron dos ejemplares parasitados con L₃ de *Hysterothylacium*, en vísceras y con una sola larva cada uno de ellos.

Análisis de las abundancias

Las abundancias medias fueron de 10,22 para el total de anisákidos. Los resultados obtenidos fueron muy superiores en el caso de *Anisakis* (10,21) en relación a *Hysterothylacium* (0,01), superiores en musculatura (6,50) que en vísceras (3,72) y mayores en el Atlántico (20,35) que en el Mediterráneo (0,09) siendo superiores también en primavera (12,75) que en otoño (0,10) para el total de anisákidos.

Tabla 3.14.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am) con su error (ϵA), rangos mínimo-máximo (Rango) y n° L₃ halladas en la muestra total de **pescadilla europea** y para cada microhábitat de parasitación.

TOTAL (N=200)	N	%	Am (ϵA)	Rango	N° L₃ Halladas
<u>Anisakis</u>					
Vísceras	70	35,00	3,71 (1,16)	1-138	742
Músculo	59	29,50	6,50 (2,71)	1-436	1300
Total	90	45,00	10,21(3,82)	1-574	2042
<u>Hysterothylacium</u>					
Vísceras	2	1,00	0,01 (0,01)	1-1	2
Músculo	0	0,00	0,00 (0,00)	0	0
Total	2	1,00	0,01 (0,01)	1-1	2
<u>Anisákidos</u>					
Vísceras	72	36,00	3,72 (1,16)	1-138	744
Músculo	59	29,50	6,50 (2,71)	1-436	1300
Total	91	45,50	10,22(3,82)	1-574	2044

Tabla 3.15.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **pescadilla europea** y por microhábitat de parasitación; para cada procedencia.

	ATLÁNTICO (N=100)	%	Am	Rango	Nº L₃ Halladas	MEDITERRÁNEO (N=100)	%	Am	Rango	Nº L₃ Halladas
<u>Anisakis</u>										
Vísceras	65	65,00	7,36	1-138	736	5	5,00	0,06	1-2	6
Músculo	57	57,00	12,98	1-436	1298	2	2,00	0,02	1-1	2
Total	84	84,00	20,34	1-574	2034	6	6,00	0,08	1-2	8
<u>Hysterothylacium</u>										
Vísceras	1	1,00	0,01	1-1	1	1	1,00	0,01	1-1	1
Músculo	0	0,00	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0	0
Total	1	1,00	0,01	1-1	1	1	1,00	0,01	1-1	1
<u>Anisákidos</u>										
Vísceras	66	66,00	7,37	1-138	737	6	6,00	0,07	1-2	7
Músculo	57	57,00	12,98	1-436	1298	2	2,00	0,02	1-1	2
Total	84	84,00	20,35	1-574	2035	7	7,00	0,09	1-2	9

Resultados y Discusión

Tabla 3.16.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **pescadilla europea** y por microhábitat de parasitación; para cada estación de captura.

	OTOÑO (N=40)					PRIMAVERA (N=160)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<i>Anisakis</i>										
Vísceras	3	7,50	0,08	1-1	3	67	41,90	4,62	1-138	739
Músculo	1	2,50	0,03	1-1	1	58	36,30	8,12	1-436	1299
Total	3	7,50	0,10	1-2	4	87	54,40	12,74	1-574	2038
<i>Hysterothylacium</i>										
Vísceras						2	0,20	0,01	1-1	2
Músculo						0	0,00	0,00	0	0
Total						2	0,20	0,01	1-1	2
<i>Anisákidos</i>										
Vísceras	3	7,50	0,08	1-1	3	69	43,10	4,63	1-138	741
Músculo	1	2,50	0,03	1-1	1	58	36,30	8,12	1-436	1299
Total	3	7,50	0,10	1-2	4	88	55,00	12,75	1-574	2040

Nota: Para la muestra de otoño, el total de anisákidos se corresponde con el total de *Anisakis*, ya que no se hallaron ejemplares de otros géneros en dicha muestra.

3.2.2.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2

A continuación se muestran las tablas de contingencia (sintetizadas en la tabla 3.17), con los valores del test de χ^2 y su significancia estadística (P), derivadas de la comparación de las prevalencias de *Anisakis* en función de su procedencia, estación de captura y microhábitat de parasitación.

Tabla 3.17.- Comparación de prevalencias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, por procedencia y por estación de captura para el total de muestra analizada de **pescadilla europea**.

Microhábitat parasitación	VÍSCERAS			MUSCULATURA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	130	70	200	141	59	200	1,114	0,285

Procedencia	ATLÁNTICO			MEDITERRÁNEO			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	16	4	100	94	6	100	119,78	<0,0001

Estación	OTOÑO			PRIMAVERA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	37	3	40	73	87	160	26,547	0,0001

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para el total de muestra en procedencia (mayor en Atlántico) y en estación de captura (mayor en primavera), mientras que las diferencias por microhábitat de parasitación, aunque fueron mayores en vísceras, no resultaron ser significativas en la muestra total, debido a que en pescadilla europea también se halló un elevado número de hospedadores parasitados en musculatura.

3.2.2.3.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre la prevalencia: Regresión Logística Binaria

En la tabla 3.18 se muestran los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos mediante esta prueba.

En todos los casos, la procedencia y la longitud influyeron sobre las prevalencias de *Anisakis*, excepto en las muestras del Mediterráneo y de otoño, debido al escaso número de hospedadores parasitados en estas dos muestras (6 y 3, respectivamente).

Tabla 3.18.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **pescadilla europea** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i>	Variables independientes	χ^2	P<0,05	Variables incluidas
TOTAL PESCADILLA EUROPEA (N=90)	procedencia estación, peso, longitud	151,414	0,0001	PROCEDENCIA, LONGITUD
ATLÁNTICO (N=84)	estación, longitud, peso	9,110	0,003	LONGITUD
MEDITERRÁNEO (N=6)		-	-	-
OTOÑO (N=3)		-	-	-
PRIMAVERA (N=87)	procedencia, longitud, peso	118,375	0,0001	PROCEDENCIA, LONGITUD

Teniendo en cuenta solo a los hospedadores parasitados y añadiendo el factor días pescado, solamente este último influyó sobre la prevalencia de *Anisakis* en el total de pescadilla europea, y también en las muestras del Atlántico y de primavera. Ni en la del Mediterráneo ni en la de otoño influyeron los días pescado ni ningún otro factor debido al escaso número de hospedadores parasitados en musculatura en ambos casos (2 y 1 respectivamente) (tabla 3.19).

Tabla 3.19.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de *Anisakis* en músculo, solo en **individuos parasitados**, para el total de la muestra de **pescadilla europea** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i> en músculo	Variables independientes	χ^2	P <0,05	Variables incluidas
TOTAL PESCADILLA EUROPEA (N=59)	procedencia, estación, longitud, peso, días pescado	16,381	<0,0001	DÍAS PESCADO
ATLÁNTICO (N=57)	estación, longitud, peso, días pescado	12,333	<0,0001	DÍAS PESCADO
MEDITERRÁNEO (N=2)		-	-	-
OTOÑO (N=1)	procedencia, longitud, peso, días pescado	-	-	-
PRIMAVERA (N=58)		14,492	<0,0001	DÍAS PESCADO

3.2.2.4- Comparación de abundancias

Test de Mann-Whitney

En la tabla 3.20 se muestran los resultados obtenidos mediante esta prueba.

Tabla 3.20.- Comparación de abundancias de *Anisakis* para muestras no relacionadas, según clases longitud, peso, estación y procedencia, para el total de la muestra de **pescadilla europea**.

TOTAL PESCADILLA EUROPEA Abundancia media=10,21	U	Z	P
ATLÁNTICO	940,0	-10,881	<0,0001
MEDITERRÁNEO			
OTOÑO	1620,0	-5,293	<0,0001
PRIMAVERA			
CLASE LONGITUD <26 cm	3594,0	-3,727	<0,0001
CLASE LONGITUD ≥26 cm			
CLASE PESO <120 g	3696,0	-3,420	0,001
CLASE PESO ≥120 g			

Se observaron diferencias significativas en todos los casos, siendo las abundancias mayores en el Atlántico, en primavera y en individuos de mayor longitud y peso.

Test de Wilcoxon

En la tabla 3.21 se resumen los resultados obtenidos mediante esta prueba.

Se realizó el análisis para el total de muestra, así como para cada procedencia y estación de captura, comparando entre microhábitats vísceras y musculatura para cada individuo hospedador parasitado.

Tabla 3.21.- Comparación de abundancias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, para el total de la muestra de **pescadilla europea** así como para cada procedencia y estación de captura.

MUESTRA	Z	P
TOTAL PESCADILLA EUROPEA	-0,786	0,432
ATLÁNTICO	-0,595	0,552
MEDITERRÁNEO	-1,414	0,157
OTOÑO	-1,414	0,157
PRIMAVERA	-0,699	0,484

Los resultados mostraron que en ningún caso se dieron diferencias estadísticamente significativas a favor de ninguno de los dos microhábitat de parasitación dentro del mismo hospedador, siendo las abundancias incluso mayores en músculo que en vísceras, tanto en la muestra total como en la del Atlántico y en la de primavera; por tanto, cabe destacar la importancia de la migración a músculo en esta especie en particular.

3.2.2.5.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias

Rho de Spearman

Los resultados estadísticamente significativos se muestran en la tabla 3.22.

Tabla 3.22.- Influencia de los factores intrínsecos sobre las abundancias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **pescadilla europea** así como para cada procedencia y estación de captura.

	LONGITUD		PESO	
	Rho	P<0,05	Rho	P<0,05
PESCADILLA EUROPEA TOTAL	0,319	<0,0001	0,280	<0,0001
ATLÁNTICO	0,456	<0,0001	0,452	<0,0001
MEDITERRÁNEO	0,056	-	0,058	-
OTOÑO	0,019	-	0,034	-
PRIMAVERA	0,327	<0,0001	0,384	<0,0001

En todos los casos (excepto en las muestras del Mediterráneo y de otoño y debido a que las abundancias resultaron ser muy bajas), el peso y la longitud mostraron influencia sobre las abundancias, siendo éstas mayores en los individuos de mayor longitud y peso.

ANOVA

Los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos en el análisis de la influencia de los factores extrínsecos (procedencia y estación) sobre las abundancias de *Anisakis*, para datos cualitativos de los factores, se muestran en la tabla 3.23.

Tabla 3.23.- Influencia de los factores extrínsecos sobre las abundancias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **pescadilla europea** así como para cada procedencia y estación de captura.

VARIABLE DEPENDIENTE Ln (Nº L₃ <i>Anisakis</i>+1)	VARIABLES INDEPENDIENTES	F	P<0,05
TOTAL PESCADILLA	PROCEDENCIA	25,661	<0,0001
EUROPEA	ESTACIÓN	-	-
MEDITERRÁNEO	ESTACIÓN	-	-
PRIMAVERA	PROCEDENCIA	21,222	<0,0001

Solo la procedencia influyó en las abundancias (tanto en la muestra total como en la de primavera) ya que fueron elevadas en el Atlántico y muy bajas en el Mediterráneo, debido a la escasa parasitación de este grupo. No se obtuvieron resultados en la muestra de procedencia atlántica ni en la de otoño debido a que no habían hospedadores del Atlántico analizados en dicha estación; pero en la muestra del Mediterráneo, al igual que en la total, la estación tampoco influyó en las abundancias.

3.2.3.- DISCUSIÓN

Algunos de los casos de anisakiosis reportados en España fueron debidos al consumo de merluza insuficientemente cocinada. Así, [CLAVEL et al. \(1993\)](#) narran un caso de anisakiosis por consumo de merluza o bacaladilla insuficientemente cocinada y, en este caso en particular, se aisló una larva de *Anisakis* tipo II en las heces de la paciente; morfotipo que también ha aparecido en nuestra muestra.

Especies halladas y prevalencias

Son muy numerosos los estudios llevados a cabo sobre pescadilla europea que reportan a especies del género *Anisakis* como principal componente de sus comunidades helmintianas ([PEREIRA BUENO et al., 1989](#); [OLMEDO MEDICOUAGUE & SOLER, 1991](#); [LÓPEZ GIMÉNEZ & MONSALVE, 1994](#); [VIU et al., 1996](#); [DE LA TORRE MOLINA et al., 2000](#); [VALERO et al., 2006](#)); coincidiendo con las reportadas en el presente estudio, ya que, en esta especie hospedadora, prácticamente todas las L₃ encontradas pertenecían a este género. En la identificación morfológica se hallaron principalmente larvas del tipo I. También se aislaron tres larvas de tipo II, pero únicamente en la procedencia mediterránea y en primavera. En cuanto a *Hysterothylacium*, se obtuvieron 2 L₃ pero solamente en primavera.

El análisis molecular de las L₃ analizadas mostró a *A. simplex* (s.s.) como la especie mayoritaria y con mayor presencia en musculatura que en vísceras. También se identificó el genotipo híbrido en la procedencia atlántica, mientras que la única larva de procedencia mediterránea analizada se identificó como *A. pegreffii* y se aisló de musculatura.

En pescadilla europea, las prevalencias de *Anisakis* (45,00%) fueron mucho mayores que las de *Hysterothylacium* (1,00%). El análisis estadístico realizado para *Anisakis*, mostró mayores prevalencias en la procedencia atlántica y en primavera, en ambos casos con diferencias estadísticamente significativas en los valores de χ^2 ; siendo también mayores en vísceras pero sin diferencias significativas respecto a musculatura debido a que también fueron elevadas en este microhábitat.

Influencia de la procedencia

Las altas prevalencias de parasitación por *Anisakis* en la muestra total (45,00%) y las grandes diferencias observadas entre las dos procedencias analizadas; Atlántico (84,00%) y Mediterráneo (6,00%) concuerdan con las reportadas por otros estudios llevados a cabo sobre este hospedador en la península Ibérica, como el 71,50% para *A. simplex* (s.l.) obtenido por [VIU et al. \(1996\)](#) en pescadilla de diferentes orígenes.

La mayor parasitación por especies del género *Anisakis* en pescadilla procedente del Atlántico frente a la del Mediterráneo, ya fue reportada previamente por otros autores: 96,30-96,80% ([PEREIRA BUENO & FERRÉ PÉREZ, 1997](#)); 100,00%

para *A. simplex* (s.s.) en aguas gallegas (ABOLLO et al., 2001); 87,97% para *Anisakis* spp. en pescadilla procedente del Atlántico, costa noroeste de África (VALERO et al., 2006) y 100,00% en Atlántico noreste (CEBALLOS-MENDIOLA et al., 2010). Sin embargo, las prevalencias obtenidas para la procedencia mediterránea fueron bastante menores, pero superiores a las del presente estudio: 14,20-19,00% (OSANZ MUR, 2001); 41,27% para *Anisakis* spp. (VALERO et al., 2006); 30,00% (MELONI et al., 2011) y 37,50% *Anisakis* tipo I (TEDDE et al., 2011) en pescadilla de origen mediterráneo; mientras que CUÉLLAR et al. (1991) observaron prevalencias muy superiores en esta procedencia (88,60% de *Anisakis* spp).

En la procedencia mediterránea se aislaron además dos larvas de *Anisakis* tipo II. Otros autores también obtuvieron estos resultados en pescadilla y otras especies de pescado. Así, MATTIUCCI et al. (2004) identificaron ambos morfotipos en merluza de procedencia mediterránea, siendo mayoritarias las larvas tipo I (68,60% de *A. pegreffii* y 14,70% de *A. Physeteris*), PIRAS et al. (2014) también observaron minoritariamente larvas tipo II (37,50% tipo I y 1,00% tipo II) en Cerdeña, y FARJALLAH et al. (2008) en diferentes zonas de Marruecos y Mauritania; sin embargo, VALERO et al. (2006) observaron larvas tipo II en ambas procedencias.

En general, las prevalencias y abundancias de *A. simplex* parecen ser considerablemente menores en pescado de la zona oeste del Mediterráneo comparado con las mismas especies hospedadoras del Atlántico. Sin embargo, en el mar Negro, las especies anisákidas (excepto *H. aduncum*) parecen estar ausentes en pescadilla, esto podría ser debido a las características físico-químicas y ecológicas de esta zona, pobre

en krill, hospedador intermediario principal de *Anisakis* (HERRERAS et al., 1997).

Cabe destacar la mayor prevalencia, abundancia y presencia de *Anisakis* en musculatura en la especie *M. merluccius* de procedencia atlántica. Este hecho puede ser debido a las diferencias existentes entre ambas áreas geográficas de factores como el nivel de parasitación de los mamíferos marinos hospedadores definitivos, la abundancia de hospedadores intermediarios invertebrados o la importancia de cada especie de pescado en el conjunto de la cadena trófica en la cual se enclava el ciclo del parásito.

Influencia de la estación de captura

Tanto las prevalencias como las abundancias de *Anisakis* fueron mayores en primavera, en ambos casos con diferencias significativas. Además, en esta estación se obtuvieron ejemplares de *Hysterothylacium* y de *Anisakis* tipo II que no aparecieron en otoño; siendo esta especie hospedadora en concreto la única analizada que presentó este morfotipo.

Otros estudios hablan de mayores parasitaciones en primavera (RENON & MALDRANA, 1993; DE LA TORRE MOLINA et al., 2000) pero muchos otros no obtienen relación entre las parasitaciones y la estación (LÓPEZ GIMÉNEZ & MONSALVE, 1994; OSANZ MUR, 2001) en esta especie hospedadora en concreto; por tanto, al igual que ocurre en el resto de las especies analizadas, no puede afirmarse que la estación sea un factor importante a la hora de valorar el riesgo de adquirir

anisakiosis, aunque hay que tener en cuenta que este estudio no analiza todas las épocas del año.

Influencia de la longitud y el peso del hospedador

En la mayoría de los estudios llevados a cabo en la península se analizaban individuos de talla grande, más conocidos como merluza (>40 cm de longitud y >500 g de peso), mientras que en el presente estudio se analizaron individuos de talla pequeña, más conocidos como pescadilla. La diferencia de prevalencias a favor de ejemplares de mayor tamaño permite confirmar que, como postularon para esta misma especie [VALERO et al. \(2006\)](#), la parasitación aumenta con la edad del hospedador, fácilmente visible a través de su longitud y peso.

En nuestro estudio, tanto la longitud como el peso mostraron influencia en las abundancias (Rho de Spearman) y el peso también influyó en las prevalencias (RLB).

Microhábitat de parasitación y migración "post mortem"

La pescadilla europea fue la que mayor parasitación presentó en musculatura de todas las especies analizadas, y los días transcurridos entre la pesca y el análisis influyeron en su presencia en este microhábitat.

La migración de las larvas a musculatura reduce considerablemente la calidad del pescado con una devaluación

importante en los mercados, además, su presencia puede reducir la calidad estética del producto, especialmente con respecto a la posible naturaleza alergénica de las larvas o incluso trazas moleculares de ellas ([LEVSEN & LUNESTAND, 2010](#)).

Los resultados helmintológicos obtenidos permiten postular que el riesgo de adquirir anisakiosis por consumo de pescadilla mediterránea es muy bajo, sobre todo teniendo en cuenta, además de la baja parasitación total, el escaso número de nematodos encontrados en la musculatura (únicamente un individuo en cada una de las dos pescadillas parasitadas en este microhábitat). Sin embargo, en los ejemplares de origen Atlántico, la presencia en musculatura fue importante, tanto en prevalencias (más de la mitad de los hospedadores presentaron larvas en musculatura) como en abundancias (la abundancia media en este microhábitat fue de 12,98) y en rangos, ya que 436 de las 574 larvas obtenidas de un único individuo hospedador se hallaban en musculatura.

Otros autores también hablan de elevadas parasitaciones en musculatura en esta especie de pescado: 33,33% ([PEREIRA BUENO, 1992](#)); 82,90% ([VIU et al., 1996](#)); 41,10% ([ABOLLO et al., 2001](#)) así como el 6,35% en procedencia mediterránea y 19,55% en la atlántica obtenidos por [VALERO et al. \(2006\)](#) observando en este último estudio la presencia de larvas mayoritariamente en la musculatura hipoaxial. Este dato llevaría a recomendar el consumo preferentemente de la parte epiaxial, ya que al estar más alejada de las vísceras, la migración se produce en menor grado.

Una posible causa de la diferencia de parasitación entre vísceras y musculatura podrían ser los hábitos alimenticios del

segundo hospedador intermediario en el ciclo biológico de *Anisakis*. La bacaladilla, y otros peces que se alimentan principalmente de eufásidos, tienden a acumular las larvas en vísceras; sin embargo, en peces piscívoros, como el bacalao o la merluza, la presencia de larvas es mayor en la musculatura hipoaxial.

Además, se debe considerar que en el proceso de migración, los nematodos pueden arrastrar hacia el músculo bacterias de la flora intestinal del hospedador produciendo su contaminación (principalmente por Gram +) y deterioro, afectando a la calidad de la carne. La congelación produce la inactivación de las larvas pero no de las bacterias que pueden quedar adheridas a su cutícula, pudiendo ser viables estas aunque la carne del pescado se haya congelado previamente, ya que su supervivencia durante el proceso de congelación dependerá del tipo de bacteria, de la composición y contenido en agua del pescado y del tiempo de congelación (SVANEVIK et al., 2013).

En general, puede postularse que:

- la presencia de larvas de *Anisakis* en musculatura de los ejemplares procedentes del Atlántico ha resultado ser muy elevada en esta especie hospedadora en particular;
- la pescadilla procedente del Mediterráneo estaba mucho menos parasitada y presentaba menores abundancias que la de procedencia atlántica;
- el número de días transcurridos desde la pesca hasta el consumo puede aumentar, en el caso de parasitación del

pescado, el número de larvas presentes en la musculatura;

- Así pues, el riesgo de transmisión alimentaria de anisakiosis humana por consumo de pescadilla insuficientemente cocinada o no congelada convenientemente, aumenta con el tamaño, su origen Atlántico y el número de días transcurridos.

3.3.- PESCADILLA AMERICANA

3.3.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS

3.3.1.1.- *Aislado e identificación morfológica*

Del total de ejemplares de pescadilla americana analizados (116), se extrajeron 169 L₃ de anisákidos, todas pertenecientes al género *Anisakis*, excepto 4, que pertenecían al género *Contraecum*, solamente en primavera. Las figuras 3.8 y 3.9 muestran la presencia de anisákidos en vísceras y tras su extracción.

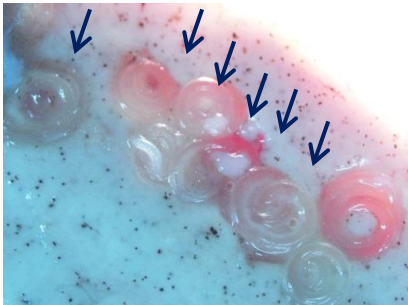


Figura 3.8.- Anisákidos en vísceras de pescadilla americana.



Figura 3.9- Anisákidos extraídos de vísceras.

Estos dos géneros son diferenciables entre ellos, a nivel morfológico, principalmente en base a su tamaño, la longitud del ventrículo esofágico y la presencia o no de ciego intestinal y

apéndice ventricular, tal como se muestra en la tabla 1.2 y figura 1.1 de la introducción.

En el caso de *Anisakis* se puede distinguir claramente el ventrículo esofágico y en *Contracaecum* se observan tanto el apéndice ventricular (proyectado hacia el extremo posterior) como el ciego intestinal (hacia el extremo anterior).

Morfológicamente las L₃ del género *Contracaecum* se caracterizan, según BERLAND (1989) y GRABDA (1991), por ser cortas y gruesas, de color blanquecino, y tamaño entre 4 y 16 mm; presenta tres labios bucales pequeños con un diente cuticular cónico y ligeramente romo, ventrículo esofágico corto, con apéndice ventricular y ciego intestinal, extremo posterior puntiagudo y sin mucrón, pero con una cutícula gruesa con las estriaciones transversales muy marcadas. El polo excretor desemboca a la altura de la base de los labios y se abre inmediatamente posterior al diente (figura 3.10).

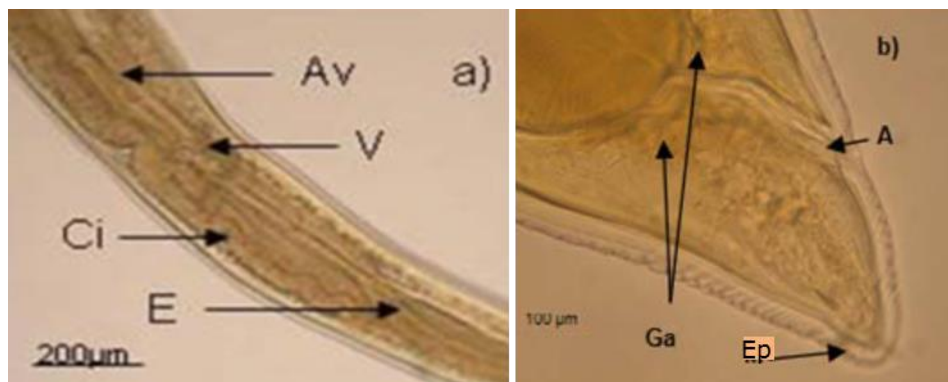


Figura 3.10.- L₃ de *Contracaecum* sp. a) Extremo anterior: V) ventrículo esofágico; Ci) ciego intestinal; Av) apéndice ventricular; E) esófago; b) Extremo posterior: Ep) extremo posterior; Ga) glándulas anexas; A) ano (Microfotografías: Centro de Investigación Piscícola de la Universidad de Córdoba, Chile).

3.3.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP

Se seleccionaron 22 L₃ del género *Anisakis* para analizarlas molecularmente, identificándose únicamente la especie *A. simplex* (s.s.) y el genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* en base a la longitud de las bandas obtenidas tras la digestión con HinfI, como se muestra en la tabla 3.24.

Tabla 3.24.- Nº de L₃ de *Anisakis* aisladas de **pescadilla americana**, nº de L₃ analizadas, especie y/o genotipo identificado a nivel molecular. A.s. (s.s.)=*A. simplex* (sensu stricto).

	Nº L ₃ Halladas	Nº L ₃ Analizadas	Especie/ Genotipo
Vísceras	118	15	14 A.s. (s.s.) 1 híbrido
Músculo	47	7	6 A.s. (s.s.) 1 híbrido
Total	165	22	20 A.s. (s.s.) 2 híbridos

En este hospedador (único analizado procedente del oeste del Atlántico), al igual que los resultados obtenidos en pescadilla europea de procedencia atlántica (zona este), la especie mayoritaria fue *A. simplex* (s.s.), no identificándose en este caso ninguna larva de *A. pegreffii*. En cuando al genotipo híbrido, la proporción obtenida fue muy baja.

3.3.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

3.3.2.1.- Estadística descriptiva

Los parámetros que caracterizan a cada una de las dos poblaciones de anisákidos encontradas en pescadilla americana se muestran en las tablas 3.25 y 3.26.

Análisis de las prevalencias

El 59,50% de las pescadillas americanas analizadas estaban parasitadas por anisákidos (59,50% por *Anisakis* y 3,40% por *Contracaecum*). Para el total de anisákidos, las prevalencias fueron superiores en vísceras (47,40%) que en musculatura (28,40%) y mayores en otoño (64,30%) que en primavera (55,00%).

Análisis de los rangos

Los rangos de parasitación fueron bajos (1-10) y muy similares entre ambas estaciones pero algo mayores en vísceras que en musculatura, tanto en la muestra total como en ambas estaciones por separado. La población de *Anisakis* presentó rangos máximos de parasitación superiores a la de *Contracaecum*, que se aisló solamente de cuatro individuos (3 parasitados en vísceras y 1 en musculatura), capturados en primavera, y con un solo parásito cada uno de ellos. Además,

todas las pescadillas americanas parasitadas por *Contracaecum* también lo estaban por *Anisakis*.

Análisis de las abundancias

Las abundancias medias fueron de 1,46 para el total de anisákidos. Superiores para *Anisakis* (1,42) que para *Contracaecum* (0,03) y mayores en vísceras (1,04) que en musculatura (0,41) pero similares entre otoño (1,75) y primavera (1,18) para el total de anisákidos.

Tabla 3.25.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am) con su error (ϵA), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en la muestra total de **pescadilla americana** y para cada microhábitat de parasitación.

TOTAL (N=116)	N	%	Am (ϵA)	Rango	Nº L₃ Halladas
<u>Anisakis</u>					
Vísceras	54	46,60	1,02 (0,16)	1-9	118
Músculo	33	28,40	0,41 (0,08)	1-6	47
Total	69	59,50	1,42(0,18)	1-10	165
<u>Contracaecum</u>					
Vísceras	3	2,60	0,03 (0,02)	1-1	3
Músculo	1	0,90	0,01 (0,01)	1-1	1
Total	4	3,40	0,03 (0,02)	1-1	4
<u>Anisákidos</u>					
Vísceras	55	47,40	1,04 (0,16)	1-9	121
Músculo	33	28,40	0,41 (0,08)	1-6	48
Total	69	59,50	1,46(0,18)	1-10	169

Resultados y Discusión

Tabla 3.26.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **pescadilla americana** y por microhábitat de parasitación; para cada estación de captura.

	OTOÑO (N=56)					PRIMAVERA (N=60)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<u>Anisakis</u>										
Vísceras	30	53,60	1,30	1-9	73	24	40,00	0,75	1-8	45
Músculo	14	25,00	0,45	1-6	25	19	31,70	0,37	1-2	22
Total	36	64,30	1,75	1-10	98	33	55,00	1,12	1-9	67
<u>Contracaecum</u>										
Vísceras						3	5,00	0,05	1-1	3
Músculo						1	1,70	0,02	1-1	1
Total						4	6,70	0,07	1-1	4
<u>Anisákidos</u>										
Vísceras	30	53,60	1,30	1-9	73	25	41,70	0,80	1-8	48
Músculo	14	25,00	0,45	1-6	25	19	31,70	0,38	1-2	23
Total	36	64,30	1,75	1-10	98	33	55,00	1,18	1-9	71

Nota: Para la muestra de otoño, el total de anisákidos se corresponde con el total de *Anisakis*, ya que no se hallaron ejemplares de otros géneros en dicha muestra.

3.3.2.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2

A continuación se muestran las tablas de contingencia (sintetizadas en la tabla 3.27), con los valores del test de χ^2 y su significancia estadística (P), derivadas de la comparación de las prevalencias de *Anisakis* en función de su estación de captura, así como para cada microhábitat de parasitación.

Tabla 3.27.- Comparación de prevalencias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación y por estación de captura para el total de muestra analizada de **pescadilla americana**.

Microhábitat parasitación	VÍSCERAS			MUSCULATURA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	62	54	116	83	33	116	7,356	0,007

Estación	OTOÑO			PRIMAVERA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	20	36	56	27	33	60	0,687	0,347

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en microhábitat de parasitación (mayor en vísceras). Por estación de captura, las diferencias no fueron significativas.

3.3.2.3.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre la prevalencia: Regresión Logística Binaria

En la muestra de pescadilla americana ningún factor influyó sobre las prevalencias de *Anisakis*, ya que el número de hospedadores parasitados en primavera fue muy similar al de los parasitados en otoño.

Teniendo en cuenta solo a los hospedadores parasitados y añadiendo el factor días pescado (tabla 3.28), solamente este último influyó sobre las prevalencias de *Anisakis* únicamente en la muestra de primavera, mientras que en la de otoño solo influyó la longitud. Para la muestra total ningún factor mostró influencia en dichas prevalencias.

Tabla 3.28.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de *Anisakis* en músculo, solo en **individuos parasitados**, para el total de la muestra de **pescadilla americana** así como para cada estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i> en músculo	Variables independientes	χ^2	P <0,05	Variables incluidas
TOTAL PESCADILLA EUROPEA (N=33)	procedencia, estación, longitud, peso, días pescado	-	-	-
OTOÑO (N=14)	procedencia,	6,259	0,012	LONGITUD
PRIMAVERA (N=19)	longitud, peso, días pecado	14,492	<0,0001	DÍAS PESCADO

3.3.2.4.- Comparación de abundancias

Test de Mann-Whitney

El análisis se llevó a cabo utilizando como variable dependiente la abundancia de *Anisakis* para el total de la muestra de pescadilla americana (tabla 3.29).

Tabla 3.29.- Comparación de abundancias de *Anisakis* para muestras no relacionadas, según clases longitud, peso y estación para el total de la muestra de **pescadilla americana**.

TOTAL PESCADILLA AMERICANA Abundancia media=1,42	U	Z	P
OTOÑO PRIMAVERA	1427,0	-1,465	0,143
CLASE LONGITUD <25 cm CLASE LONGITUD ≥25 cm	1491,5	-1,059	0,290
CLASE PESO <100 g CLASE PESO ≥100 g	1437,5	-1,282	0,200

No se observaron diferencias estadísticamente significativas, ya que las abundancias entre las variables comparadas (tanto estación como clases longitud y peso) fueron muy similares en ambos grupos.

Test de Wilcoxon

En la tabla 3.30 se resumen los resultados obtenidos mediante esta prueba.

Se realizó el análisis para el total de muestra, así como para cada estación de captura, comparando entre microhábitats vísceras y musculatura para cada individuo hospedador parasitado.

Tabla 3.30.- Comparación de abundancias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, para el total de la muestra de **pescadilla americana** así como para cada estación de captura.

MUESTRA	Z	P
TOTAL PESCADILLA AMERICANA	-3,772	<0,0001
OTOÑO	-3,136	0,002
PRIMAVERA	-2,007	0,045

Los resultados muestran, en todos los casos (tanto en la muestra total como en cada estación de captura por separado), diferencias estadísticamente significativas a favor de las vísceras.

3.3.2.5.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias

Rho de Spearman

Los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos en el análisis de la influencia de los factores intrínsecos (longitud y peso) sobre las abundancias de *Anisakis*, para datos cuantitativos de los factores, se muestran en la tabla 3.31.

Tabla 3.31.- Influencia de los factores intrínsecos sobre las abundancias, para el total de la muestra de **pescadilla americana** así como para cada estación de captura.

	LONGITUD		PESO	
	Rho	P<0,05	Rho	P<0,05
TOTAL PESCADILLA AMERICANA	0,259	0,005	0,258	0,005
OTOÑO	0,297	0,026	0,274	0,041
PRIMAVERA	0,205	-	0,226	-

En todos los casos, excepto en la muestra de primavera, el peso y la longitud influyeron sobre las abundancias.

ANOVA

Ninguno de los factores (en este caso, la estación) mostró influencia en las abundancias mediante esta prueba.

3.3.3.- DISCUSIÓN

Aunque esta especie de pescado se consume también en gran medida en España, son pocos los estudios realizados en pescadilla americana. En el llevado a cabo por [MARCOGLIESE \(1995a\)](#) se encontraron solamente larvas de *A. simplex*, pero hay que tener en cuenta el bajo número de individuos analizados en él (menos de 10). Sin embargo, en el presente estudio, se hallaron además L₃ de *Contracaecum* en 4 hospedadores capturados en primavera, no habiéndose encontrado en ninguno de los ejemplares analizados en otoño, pese a la revisión de la identificación del material.

Especies halladas y prevalencias

A nivel global, destaca la elevada prevalencia de parasitación por *Anisakis* (59,50%) y en particular su elevada presencia en musculatura (28,40%).

Los resultados moleculares obtenidos en este hospedador, procedente del noroeste Atlántico, difieren de los obtenidos en pescadilla europea (del Atlántico noreste), ya que, aunque la especie mayoritaria en las L₃ analizadas fue *A. simplex* (s.s.) (20 de las 22 larvas analizadas), también se aisló el genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii*, aunque en menor proporción. Cabe destacar que, a diferencia de pescadilla americana, en la europea también apareció *A. pegreffii*. Este resultado es lógico ya que la zona suroeste de España y el

estrecho de Gibraltar se describen en otros estudios (ABOLLO et al., 2003; MARTIN-SÁNCHEZ et al., 2005) como zonas de hibridación entre ambas especies.

MATTIUCCI et al. (2007) encontraron diferencias significativas en las proporciones relativas de diferentes especies gemelas de *Anisakis* en peces capturados en el noreste Atlántico y mar Mediterráneo: *A. simplex* (s.s) predomina en el golfo de Vizcaya, sur y oeste de las costa de Irlanda, mar del Norte y mar de Noruega. Sin embargo, las prevalencias de *A. pegreffii* aumentan a medida que disminuye la latitud siendo la principal especie del este y oeste del Mediterráneo, mientras que ambas especies muestran infecciones mixtas aproximadamente en la misma proporción en pescado capturado en la zona de Gibraltar.

Influencia de la estación de captura

Aunque fueron mayores en otoño, la falta de diferencias significativas a nivel de prevalencias y de cargas parasitarias entre los individuos hospedadores capturados en otoño y en primavera, permiten postular que la estación de captura no supone un cambio importante en el riesgo de transmisión humana por esta especie hospedadora en particular. Cabe destacar la presencia de larvas del género *Contracaecum* únicamente en primavera (al igual que lo observado con *Hysterothylacium* en otras especies hospedadoras analizadas), aunque con prevalencias y abundancias de parasitación muy inferiores a las de *Anisakis*.

Influencia de la longitud y el peso del hospedador

Al igual que en el caso de la pescadilla europea, los factores intrínsecos del hospedador (longitud y peso) presentaron un rango de variación demasiado pequeño como para que se diera una correlación entre ellos y las prevalencias y/o abundancias de parasitación. Sin embargo, el test Rho de Spearman reveló una correlación positiva, y significativa estadísticamente, entre estos dos factores con las abundancias, poniendo de nuevo de manifiesto la probabilidad de aumento de la parasitación con la edad (tamaño) del pescado, como ya se ha comentado anteriormente.

Microhábitat de parasitación y migración "post mortem"

La presencia de parásitos en musculatura aumenta con el número de días transcurridos, si bien esta relación resultó ser estadísticamente significativa solo en la muestra de primavera. Esta correlación no ha sido reportada en ninguno de los estudios hasta ahora llevados a cabo en esta especie del género *Merluccius*. Este hecho permite relacionar de forma directa la mayor presencia de parásitos en musculatura a medida que el pescado pasa más días sin ser consumido y siendo mantenido refrigerado o congelado a la temperatura recomendada, bien en el lugar de dispensación o en el frigorífico del consumidor.

La importancia real de la parasitación por anisákidos es la presencia de parásitos en musculatura. Así, en esta especie hospedadora, al igual que los resultados obtenidos en la muestra de pescadilla europea de procedencia atlántica, el porcentaje de hospedadores parasitados en músculo supone un importante factor de riesgo a tener en cuenta, aunque cabe destacar que, a diferencia de la pescadilla europea, las abundancias halladas en *M. bilinearis* fueron muy inferiores.

Para este hospedador en concreto puede postularse que:

- Fue la única especie de todas las analizadas que presentó larvas del género *Contracaecum*. Coincide este hecho con que fue el único hospedador analizado procedente del Atlántico noroeste (zona FAO 21).
- Estas larvas de *Contracaecum* solo se observaron en primavera. Sin embargo, *Anisakis* presentó mayores prevalencias y abundancias en otoño.
- Como en el resto de especies estudiadas, las vísceras fueron el microhábitat más parasitado aunque la presencia en musculatura también fue elevada y los días transcurridos no influyeron en su presencia en este microhábitat.
- Las abundancias aumentan con el tamaño del hospedador.

3.4.- SALMONETE DE FANGO

3.4.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS

3.4.1.1.- *Aislado e identificación morfológica*

En los 155 ejemplares de salmonete de fango analizados, todos ellos de procedencia mediterránea, se obtuvieron un total de 97 L₃ de anisákidos (85 en vísceras y 12 en musculatura), que se clasificaron como pertenecientes a los géneros *Anisakis* (7 larvas) e *Hysterothylacium* (90 larvas). La diferenciación morfológica entre estos dos géneros aparece detallada anteriormente en la tabla 1.2 de la introducción. En la figura 3.11 se muestran las características del extremo anterior de distintas larvas de *Hysterothylacium*.

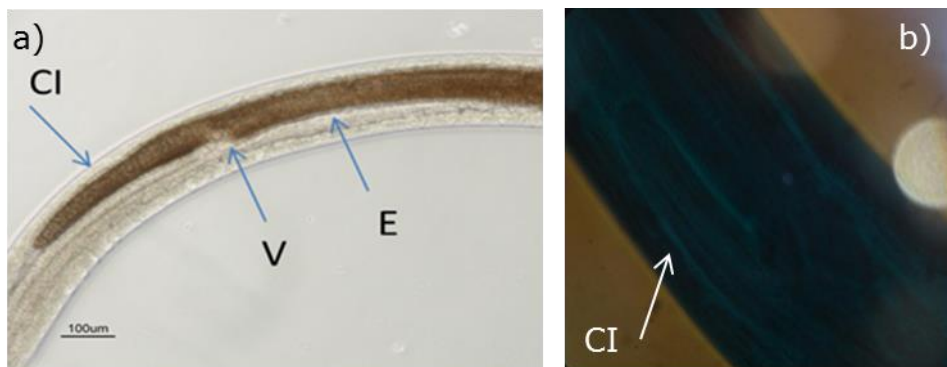


Figura 3.11.- Características morfológicas de larvas L₃ de *Hysterothylacium*. a) Extremo anterior con ciego intestinal largo característico de la especie *H. aduncum*; b) Ciego intestinal corto característico de *H. fabri*. E) esófago, V) ventrículo, CI) ciego intestinal.

3.4.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP

No fue posible realizar el análisis molecular de ninguna de las únicas 7 larvas de *Anisakis* obtenidas de esta especie hospedadora.

3.4.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

3.4.2.1.- Estadística descriptiva

Las tablas 3.32 y 3.33 muestran los parámetros que caracterizan a cada una de las dos poblaciones de anisákidos presentes en el salmonete.

Análisis de las prevalencias

Las prevalencias de anisákidos en los salmonetes analizados fueron del 27,70% (3,20% por *Anisakis* y 25,20% por *Hysterothylacium*).

Para el total de anisákidos, las prevalencias fueron mayores en vísceras (24,50%) que en musculatura (6,50%) y mayores en primavera (37,50%) que en otoño (17,30%). *Anisakis* mostró mayor prevalencia en otoño (5,30%) que en primavera (1,20%) mientras que para *Hysterothylacium* las prevalencias

fueron mayores en primavera (36,30%) que en otoño (13,30%).

Análisis de los rangos

La población de *Anisakis* presentó rangos máximos de parasitación bastante inferiores a la de *Hysterothylacium*, con infrapoblaciones máximas de 3 (únicamente en vísceras) y 27 helmintos respectivamente. El mayor número de anisákidos hallados en un hospedador se obtuvo en otoño (28 larvas; 27 de ellas pertenecientes al género *Hysterothylacium* y solo 1 de *Anisakis*) y todas se extrajeron de vísceras. Cabe destacar que *Anisakis* se visualizó solamente en cinco individuos, cuatro de ellos capturados en otoño y solo uno en primavera, y todos se encontraron en vísceras.

Análisis de las abundancias

Las abundancias medias fueron de 0,63 para el total de anisákidos. Mayores para *Hysterothylacium* (0,58) que para *Anisakis* (0,05), superiores en vísceras (0,55) que en musculatura (0,08) y muy similares entre otoño (0,65) y primavera (0,60) para el total de anisákidos.

Teniendo en cuenta la escasa parasitación por *Anisakis* en esta especie en particular, en esta muestra se realizó el análisis estadístico completo para el total de anisákidos, con el fin de tener tamaño de muestra suficiente para realizar los cálculos estadísticos.

Tabla 3.32.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am) con su error (ϵA), rangos mínimo-máximo (Rango) y n° L₃ halladas en la muestra total de **salmonete** y para cada microhábitat de parasitación.

TOTAL (N=155)	N	%	Am (ϵA)	Rango	N° L₃ Halladas
<u>Anisakis</u>					
Vísceras	5	3,20	0,05 (0,02)	1-3	7
Músculo	0	0,00	0,00 (0,00)	0	0
Total	5	3,20	0,05 (0,02)	1-3	7
<u>Hysterothylacium</u>					
Vísceras	34	21,90	0,50 (0,18)	1-27	78
Músculo	10	6,50	0,08 (0,03)	1-2	12
Total	39	25,20	0,58 (0,18)	1-27	90
<u>Anisákidos</u>					
Vísceras	38	24,50	0,55 (0,19)	1-28	85
Músculo	10	6,50	0,08 (0,03)	1-2	12
Total	43	27,70	0,63 (0,19)	1-28	97

Resultados y Discusión

Tabla 3.33.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **salmonete** y por microhábitat de parasitación; para cada estación de captura.

	OTOÑO (N=75)					PRIMAVERA (N=80)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<u>Anisakis</u>										
Vísceras	4	5,30	0,08	1-3	6	1	1,20	0,01	1-1	1
Músculo	0	0,00	0,00	0	0	0	0,00	0,00	0	0
Total	4	5,30	0,08	1-3	6	1	1,20	0,01	1-1	1
<u>Hysterothylacium</u>										
Vísceras	9	12,00	0,53	1-27	40	25	31,20	0,48	1-3	38
Músculo	2	2,70	0,04	1-2	3	8	10,00	0,11	1-2	9
Total	10	13,30	0,57	1-27	43	29	36,30	0,59	1-3	47
<u>Anisákidos</u>										
Vísceras	12	16,00	0,61	1-28	46	26	32,50	0,49	1-3	39
Músculo	20	2,70	0,04	1-2	3	8	10,00	0,11	1-2	9
Total	13	17,30	0,65	1-28	49	30	37,50	0,60	1-3	48

3.4.2.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2

A continuación se muestran las tablas de contingencia (agrupadas en la tabla 3.34), con los valores del test de χ^2 y su significancia estadística (P), derivadas de la comparación de las prevalencias de anisákidos halladas en función de su estación de captura, así como para cada microhábitat de parasitación.

Tabla 3.34.- Comparación de prevalencias de **anisákidos** por microhábitat de parasitación y por estación de captura para el total de muestra analizada de **salmonete**.

Microhábitat parasitación	VÍSCERAS			MUSCULATURA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	117	38	155	145	10	155	17,970	<0,0001

Estación	OTOÑO			PRIMAVERA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	62	13	75	50	30	80	6,880	0,007

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en microhábitat de parasitación (mayor en vísceras). Por estación de captura, las diferencias también fueron significativas (prevalencias mayores en primavera).

3.4.2.3.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria

En la tabla 3.35 se muestran los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos mediante esta prueba.

Tabla 3.35.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de **anisákidos** para el total de la muestra de **salmonete** así como para cada estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por anisákidos	Variables independientes	χ^2	P<0,05	Variables incluidas
TOTAL SALMONETE (N=43)	estación, longitud, peso	8,035	0,005	ESTACIÓN
OTOÑO (N=13)	longitud,	-	-	-
PRIMAVERA (N=30)	peso	-	-	-

En la muestra total de salmonete solo la estación de captura mostró influencia sobre las prevalencias de anisákidos encontradas. El peso y la longitud de los hospedadores no influyeron en ninguna de las muestras, probablemente debido

a que no había grandes variaciones de peso y longitud entre los ejemplares analizados.

Teniendo en cuenta solo a los hospedadores parasitados y añadiendo el factor días pescado, ningún factor mostró influencia en las prevalencias obtenidas en músculo, probablemente debido a los pocos hospedadores parasitados en este microhábitat. Cabe destacar que el número de hospedadores parasitados por anisákidos en músculo coincidía con el número de hospedadores parasitados por *Hysterothylacium* ya que no se obtuvo ninguna larva de *Anisakis* en musculatura en esta especie hospedadora en concreto.

3.4.2.4.- Comparación de abundancias

Test de Mann-Whitney

En la tabla 3.36 se resumen los resultados obtenidos mediante esta prueba.

El análisis se llevó a cabo utilizando como variable dependiente la abundancia total de anisákidos, para la muestra total de salmonete.

Se observaron diferencias significativas estadísticamente en la estación y clase longitud.

Tabla 3.36.- Comparación de abundancias de **anisákidos** para muestras no relacionadas, según clases longitud, peso y estación para el total de la muestra de **salmonete**.

TOTAL SALMONETE Abundancia media=0,63	U	Z	P
OTOÑO PRIMAVERA	2416,5	-2,656	0,008
CLASE LONGITUD <15 cm CLASE LONGITUD ≥15 cm	2464,5	-2,363	0,018
CLASE PESO <45 g CLASE PESO ≥45 g	2568,0	-1,826	0,068

Test de Wilcoxon

En la tabla 3.37 se resumen los resultados obtenidos mediante esta prueba.

Se realizó el análisis para el total de muestra, así como para cada estación de captura, comparando entre microhábitats vísceras y musculatura para cada individuo hospedador parasitado.

Tabla 3.37.- Comparación de abundancias de **anisákidos** por microhábitat de parasitación, para el total de la muestra de **salmonete** así como para cada estación de captura.

MUESTRA	Z	P
TOTAL SALMONETE	-4,542	<0,0001
OTOÑO	-2,600	0,009
PRIMAVERA	-3,468	0,001

Los resultados mostraron, en todos los casos (tanto en la muestra total como analizando cada estación de captura por separado), diferencias estadísticamente significativas a favor de las vísceras.

3.4.2.5.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias

Rho de Spearman

Los resultados obtenidos en el análisis de la influencia de los factores intrínsecos (longitud y peso) sobre la abundancia de anisákidos para datos cuantitativos de los factores, se muestran en la tabla 3.38 Los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) se muestran en negrita.

Tabla 3.38.- Influencia de los factores intrínsecos sobre las abundancias de **anisákidos**, para el total de la muestra de **salmonete** así como para cada estación de captura.

	LONGITUD		PESO	
	Rho	P<0,05	Rho	P<0,05
TOTAL SALMONETE	-0,164	0,041	-0,165	0,040
OTOÑO	-0,220	-	-0,209	-
PRIMAVERA	0,054	-	0,070	-

En la muestra total, el peso y la longitud mostraron influencia sobre las abundancias de anisákidos pero estos factores no influyeron cuando se analizó cada estación de captura por separado.

ANOVA

Ninguno de los factores (en este caso, la estación) mostró influencia en las abundancias mediante esta prueba, ya que estas fueron prácticamente iguales en ambas estaciones.

3.4.3.- DISCUSIÓN

Son pocos los estudios realizados en esta especie hospedadora; en un reciente trabajo llevado a cabo por [SERRACA et al. \(2013\)](#) en el cual se analizaba la presencia de anisákidos en 195 ejemplares de 22 especies de pescado, se encontró también la presencia de estos dos géneros en salmonete de fango procedente del mar de Liguria, siendo esta especie la que presentó mayores intensidades de parasitación por *Hysterothylacium* de las 22 analizadas. En nuestro caso, no son las intensidades sino las prevalencias de *Hysterothylacium* las mayores obtenidas entre las 8 especies de pescado analizadas. Las prevalencias y otros datos obtenidos sobre las especies parásitas aisladas de los salmonetes analizados en este trabajo se recogen en el artículo de [DEBENEDETTI et al. \(2013\)](#).

Especies halladas y prevalencias

Las larvas presentes en el salmonete analizado también pertenecían a los géneros *Anisakis* e *Hysterothylacium*. La prevalencia de parasitación total por anisákidos fue de 27,70%, pero en este caso, mayor para *Hysterothylacium* (25,20%) que para *Anisakis* (3,20%). Otros autores también reportaron bajas prevalencias en salmonetes del Mediterráneo: 5,56% en el mar Egeo ([CHALIGIANNIS et al., 2012](#)) y 6,06% en salmonete de roca capturado en aguas de Cerdeña ([MELONI et al., 2011](#)). Sin embargo, otros estudios, como los realizados por [DE LA](#)

TORRE MOLINA et al. (2000) y por ABOLLO et al. (2001) (este último en salmonete de roca de procedencia atlántica), obtuvieron prevalencias nulas de anisákidos.

La comparación de la prevalencia total mostró la existencia de diferencias significativas en cuanto a la estación primavera y al microhábitat de parasitación vísceras, sin embargo, al analizar mediante RLB los factores que influyeron en las prevalencias, únicamente la estación mostró influencia con significancia estadística.

Cabe destacar que ninguno de los 4 hospedadores parasitados por *Anisakis* presentó larvas en musculatura, este hecho, sumado a la baja prevalencia de parasitación por este anisákido en concreto, hace que el salmonete sea la especie que presentó menor riesgo de anisakiosis humana en el conjunto de las especies analizadas en este estudio, aunque no hay que olvidar que los ejemplares eran únicamente de procedencia mediterránea. Aunque hay que tener en cuenta que los alérgenos de *Hysterothylacium* también podrían estar implicados en los casos de alergias (FERNÁNDEZ-CALDAS et al., 1998; VALERO et al., 2003) y que, además, las larvas pueden producir contaminación bacteriana en su migración hacia el músculo (SVANEVIK et al., 2013).

A. simplex es mucho más común en aguas de alta mar que en aguas costeras. Los cetáceos, principales hospedadores definitivos de *Anisakis*; así como sus hospedadores intermediarios (especialmente los eufásidos) son abundantes en zonas alejadas de la costa (WOOTTEN & WADDELL, 1977; SMITH & WOOTTEN, 1978).

Influencia de la estación de captura

Anisakis mostró mayores prevalencias en otoño (5,30%) que en primavera (1,20%) mientras que para *Hysterothylacium* las prevalencias fueron mayores en primavera. Esto muestra, al igual que ocurría con la bacaladilla y la pescadilla europea, que las prevalencias de *Hysterothylacium* son mayores en esta época del año. Para otras especies hospedadoras también se reportan mayores prevalencias de *Hysterothylacium* en primavera pero no se han hallado otros estudios en salmonete de fango.

Influencia de la longitud y el peso del hospedador

Los factores intrínsecos del hospedador presentaron un rango de variación demasiado pequeño como para que obtuviera una correlación entre ellos y la prevalencia y/o la abundancia de parasitación, sin embargo, el test de Spearman reveló una correlación significativa estadísticamente, entre estos dos factores y las abundancias, aunque en este caso en particular, la correlación fue negativa, siendo los hospedadores de menor tamaño los más parasitados por anisákidos, principalmente por *Hysterothylacium*, al ser éste el que presentó mayores abundancias, por tanto no se puede concluir que la edad sea un factor influyente en esta especie hospedadora.

Microhábitat de parasitación y migración "post mortem"

Tanto las prevalencias como las abundancias de anisákidos presentes en salmonete fueron mayores en vísceras y las diferencias resultaron estadísticamente significativas. Este hecho se debe tener en cuenta en su preparación culinaria, ya que el hígado del salmonete es muy apreciado y la presencia de larvas (concretamente de *Anisakis*) en este microhábitat, también conllevaría en este caso riesgo para el consumidor.

Los días transcurridos entre la pesca y el análisis no influyeron ni en las prevalencias ni en las abundancias, por tanto, la presencia de anisákidos en musculatura en esta especie fue independiente de los días pescado, apareciendo también en musculatura en los ejemplares más frescos. Aunque hay que tener en cuenta que en este microhábitat únicamente se aislaron larvas del género *Hysterothylacium*.

En el salmonete cabe destacar que la presencia de larvas del género *Anisakis* fue escasa, 4 hospedadores parasitados en otoño y solamente uno en primavera, siendo además su presencia en musculatura nula, es decir, esta especie hospedadora fue la única que no presentó larvas de *Anisakis* en músculo. Tampoco se ha hallado ningún otro estudio en el que se mencione la presencia de *Anisakis* en musculatura de salmonete ni ningún caso reportado de anisakidosis por consumo de esta especie de pescado.

Para este hospedador se puede postular que:

- Ha sido la especie analizada que menor riesgo conlleva para el consumidor, no solo debido a las bajas prevalencias y abundancias obtenidas, sino también porque fue la única que no presentó larvas de *Anisakis* en musculatura.
- Al igual que ocurría en otras especies analizadas, la mayor presencia de *Hysterothylacium* se observó en primavera.

3.5.- BOQUERÓN

3.5.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS

3.5.1.1.- *Aislado e identificación morfológica*

De los 209 boquerones analizados se aislaron 525 L₃ de anisákidos (474 en vísceras y 51 en musculatura), que se clasificaron a nivel morfológico como pertenecientes a los géneros *Anisakis* (71) e *Hysterothylacium* (454), diferenciables entre ellas, como se ha comentado anteriormente, por una serie de características que se detallan en la tabla 1.2 del capítulo de introducción. En la figura 3.12 se muestra un anisákido presente en boquerón así como el extremo anterior de una L₃ de *Hysterothylacium* observada bajo lupa.

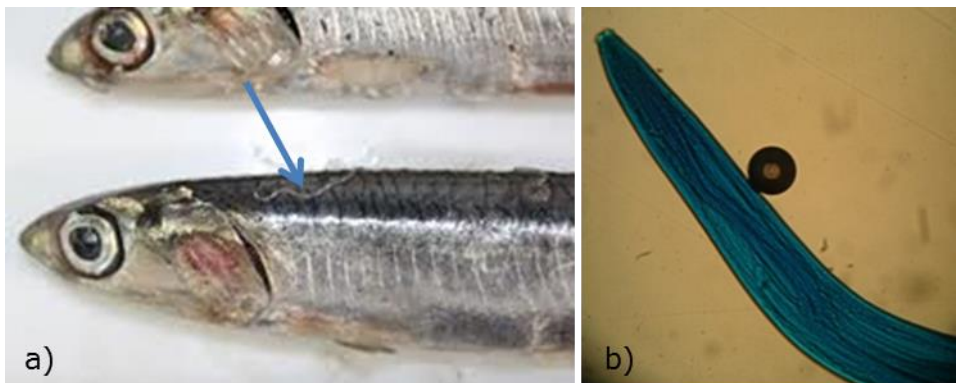


Figura 3.12.- a) Anisákido en boquerón; b) Extremo anterior de una L₃ de *Hysterothylacium*.

3.5.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP

En el análisis molecular realizado a 35 L₃ se identificó la especie *A. simplex* (s.s.) y el genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* en los ejemplares de procedencia atlántica, mientras que en la procedencia mediterránea también se identificó *A. pegreffii*, como se muestra en la tabla 3.39 y figura 3.13.

Tabla 3.39.- N° de L₃ de *Anisakis* aisladas de **boquerón**, n° de L₃ analizadas, especie y/o genotipo identificado a nivel molecular para cada procedencia. *A.s. (s.s.)=A. simplex (sensu stricto)*.

Atlántico	N° L₃	N° L₃	Especie/ Genotipo
	Halladas	Analizadas	
Vísceras	50	20	16 <i>A.s. (s.s.)</i> 4 híbridos
Músculo	7	6	5 <i>A.s. (s.s.)</i> 1 híbrido
Total	57	26	21 <i>A.s. (s.s.)</i> 5 híbridos

Mediterráneo	N° L₃	N° L₃	Especie/ Genotipo
	Halladas	Analizadas	
Vísceras	7	4	2 <i>A. pegreffii</i> 2 híbridos
Músculo	7	5	1 <i>A. pegreffii</i> 3 híbridos 1 <i>A.s. (s.s.)</i>
Total	14	9	3 <i>A. pegreffii</i> 5 híbridos 1 <i>A.s. (s.s.)</i>

A la vista de estos resultados se puede observar que la especie mayoritaria en el Atlántico fue *A. simplex* (s.s.) mientras que en el Mediterráneo fue el genotipo híbrido. La especie *A. pegreffii* solo apareció en ejemplares de procedencia mediterránea. Cabe destacar que el único ejemplar de *A. simplex* (s.s.) identificado en el Mediterráneo se aisló de musculatura.

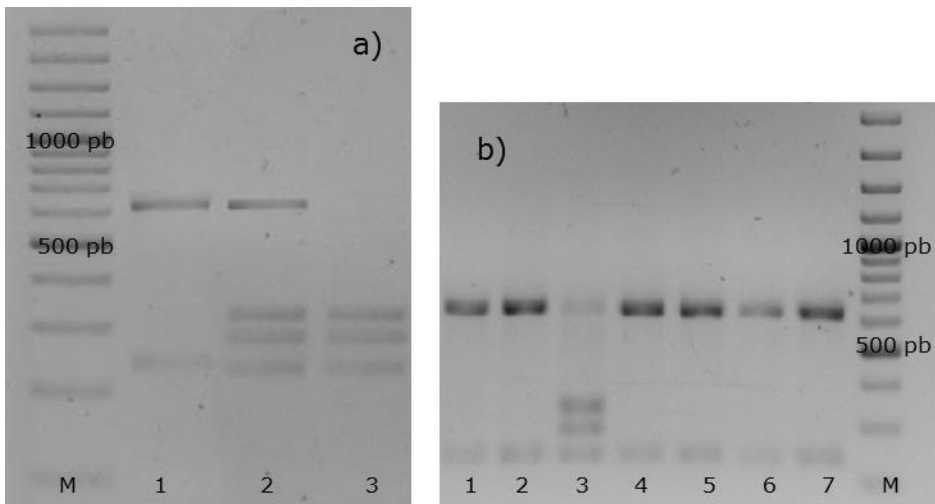


Figura 3.13.- Patrones moleculares obtenidos por PCR-RFLP (HinfI) de L_3 aisladas de **boquerón**; a) de procedencia mediterránea: M) marcador de peso molecular; 1) *A. simplex* (s.s.) (620 y 250 pb); 2) genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* (250, 300, 370 y 620 pb); 3) *A. pegreffii* (250, 300 y 370 pb); b) de procedencia atlántica: M) marcador de peso molecular; 1-2 y 4-7) *A. simplex* (s.s.) (620 y 250 pb); 3) genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* (250, 300, 370 y 620 pb).

3.5.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

3.5.2.1.- Estadística descriptiva

Los parámetros que caracterizan a cada una de las dos poblaciones de anisákidos encontradas en boquerón se muestran en las tablas 3.40 a 3.42.

Análisis de las prevalencias

Las prevalencias de anisákidos en la muestra de boquerones fueron del 32,10% (17,20% para *Anisakis* y 22,00 % para *Hysterothylacium*). Para el total de anisákidos, las prevalencias fueron superiores en vísceras (27,80%) que en musculatura (14,80%), en el Atlántico (34,90%) mayores que en el Mediterráneo (29,00%) y mayores en primavera (43,00%) que en otoño (22,00%).

Análisis de los rangos

La población de *Hysterothylacium* presentó rangos máximos de parasitación superiores a las de *Anisakis*, con infrapoblaciones máximas de 46 (45 en vísceras, 6 en musculatura) y 13 (13 en vísceras, 2 en musculatura) helmintos respectivamente. El mayor número de anisákidos hallados en un hospedador se obtuvo en el Atlántico y durante la primavera (47 larvas; 46 en vísceras y 1 en musculatura).

Análisis de las abundancias

Las abundancias medias fueron de 2,51 para el total de anisákidos. Superiores para *Hysterothylacium* (2,17) que para *Anisakis* (0,34), superiores en vísceras (2,27) que en musculatura (0,24), mayores en el Atlántico (3,95) respecto al Mediterráneo (0,94) y mayores en primavera (4,08) que en otoño (1,07).

En la muestra de boquerón, tanto la comparación de prevalencias y abundancias como los factores que influyen en cada una de ellas, se realizó también para *Hysterothylacium*, debido a que, tanto las prevalencias como las abundancias, resultaron ser mayores en este último, y, a pesar de que se han descrito pocos casos de anisakidosis por esta especie, se debe tener en cuenta que, al poseer antígenos comunes con *Anisakis*, podría estar también implicado en los casos de alergias.

Tabla 3.40.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am) con su error (ϵA), rangos mínimo-máximo (Rango) y n° L₃ halladas en la muestra total de **boquerón** y para cada microhábitat de parasitación.

TOTAL (N=209)	N	%	Am (ϵA)	Rango	N° L₃ Halladas
<u>Anisakis</u>					
Vísceras	28	13,40	0,27 (0,08)	1-13	57
Músculo	12	5,70	0,07 (0,02)	1-2	14
Total	36	17,20	0,34 (0,08)	1-13	71
<u>Hysterothylacium</u>					
Vísceras	42	20,10	2,00 (0,41)	1-45	417
Músculo	21	10,00	0,18 (0,05)	1-6	37
Total	46	22,00	2,17 (0,43)	1-46	454
<u>Anisákidos</u>					
Vísceras	58	27,80	2,27 (0,43)	1-46	474
Músculo	31	14,80	0,24 (0,05)	1-6	51
Total	67	32,10	2,51 (0,45)	1-47	525

Tabla 3.41.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **boquerón** y por microhábitat de parasitación; para cada procedencia.

	ATLÁNTICO (N=109)					MEDITERRÁNEO (N=100)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<u>Anisakis</u>										
Vísceras	21	19,30	0,46	1-13	50	7	7,00	0,07	1-1	7
Músculo	5	4,60	0,06	1-2	7	7	7,00	0,07	1-1	7
Total	23	21,10	0,52	1-13	57	13	13,00	0,14	1-2	14
<u>Hysterothylacium</u>										
Vísceras	27	24,80	3,21	1-45	350	15	15,00	0,67	1-21	67
Músculo	11	10,01	0,22	1-6	24	10	10,00	0,13	1-3	13
Total	28	25,70	3,43	1-46	374	18	18,00	0,80	1-22	80
<u>Anisákidos</u>										
Vísceras	36	33,00	3,67	1-46	400	22	22,00	0,74	1-21	74
Músculo	15	13,80	0,28	1-6	31	16	16,00	0,20	1-3	20
Total	38	34,90	3,95	1-47	431	29	29,00	0,94	1-22	94

Resultados y Discusión

Tabla 3.42.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **boquerón** y por microhábitat de parasitación; para cada estación de captura.

	OTOÑO (N=109)					PRIMAVERA (N=100)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<u>Anisakis</u>										
Vísceras	6	5,50	0,17	1-13	18	22	22,0	0,39	1-6	39
Músculo	4	3,70	0,04	1-1	4	8	8,00	0,10	1-2	10
Total	9	8,30	0,20	1-13	22	27	27,00	0,49	1-6	49
<u>Hysterothylacium</u>										
Vísceras	13	11,90	0,72	1-21	79	29	29,00	3,38	1-45	338
Músculo	8	7,30	0,15	1-4	16	13	13,00	0,21	1-6	21
Total	15	13,80	0,87	1-22	95	31	31,00	3,59	1-46	359
<u>Anisákidos</u>										
Vísceras	19	17,40	0,89	1-21	97	39	39,00	3,77	1-46	377
Músculo	12	11,00	0,18	1-4	20	19	19,00	0,31	1-6	31
Total	24	22,00	1,07	1-22	117	43	43,00	4,08	1-47	408

3.5.2.2.- Comparación de prevalencias: Test de χ^2

A continuación se muestran las tablas de contingencia derivadas de la comparación de las prevalencias, tanto para *Anisakis* (tabla 3.43) como para *Hysterothylacium* (tabla 3.44).

Tabla 3.43.- Comparación de prevalencias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, por procedencia y por estación de captura para el total de muestra analizada de **boquerón**.

Microhábitat parasitación	VÍSCERAS			MUSCULATURA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	181	28	209	197	12	209	6,220	0,0118

Procedencia	ATLÁNTICO			MEDITERRÁNEO			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	86	23	109	87	13	100	1,866	0,144

Estación	OTOÑO			PRIMAVERA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	100	9	109	73	27	100	11,569	<0,0001

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en microhábitat de parasitación (mayor en vísceras) y en estación de captura (mayor en primavera) mientras que las diferencias por procedencia, aunque fueron mayores en el Atlántico, no resultaron ser significativas.

Tabla 3.44.- Comparación de prevalencias de *Hysterothylacium* por microhábitat de parasitación, por procedencia y por estación de captura para el total de muestra analizada de **boquerón**.

Microhábitat parasitación	VÍSCERAS			MUSCULATURA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	167	42	209	188	21	209	7,476	0,0059

Procedencia	ATLÁNTICO			MEDITERRÁNEO			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	81	28	109	82	18	100	1,376	0,187

Estación	OTOÑO			PRIMAVERA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	94	15	109	69	31	100	8,052	0,004

Al igual que para *Anisakis*, las diferencias fueron estadísticamente significativas en microhábitat de parasitación (mayor en vísceras) y en estación de captura (mayor en primavera) mientras que las diferencias por procedencia, aunque fueron mayores en el Atlántico, no fueron significativas.

3.5.2.3.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria

En las tablas 3.45 y 3.46 se muestran los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos mediante esta prueba para *Anisakis* y en las tablas 3.47 y 3.48 para *Hysterothylacium*.

Tabla 3.45.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **boquerón** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i>	Variables independientes	χ^2	P<0,05	Variables incluidas
TOTAL BOQUERÓN (N=36)	procedencia estación, peso, longitud	21,756	<0,0001	LONGITUD, ESTACIÓN
ATLÁNTICO (N=23)	estación,	41,240	<0,0001	LONGITUD, ESTACIÓN
MEDITERRÁNEO (N=13)	longitud, peso	-	-	-
OTOÑO (N=9)	procedencia,	8,025	0,005	PROCEDENCIA
PRIMAVERA (N=27)	longitud, peso	22,656	<0,0001	LONGITUD

La longitud como factor intrínseco, y la estación como extrínseco, mostraron influencia sobre las prevalencias.

Teniendo en cuenta solo a los hospedadores parasitados y añadiendo el factor días pescado, para la muestra total, ningún factor mostró influencia sobre las prevalencias de *Anisakis*. Únicamente en la muestra del Atlántico, la variable estación influyó en las prevalencias obtenidas siendo estas mayores en primavera (tabla 3.46).

Tabla 3.46.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre la prevalencia de *Anisakis* en músculo, solo en **individuos parasitados**, para el total de la muestra de **boquerón** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i> en músculo	Variables independientes	χ^2	P <0,05	Variables incluidas
TOTAL BOQUERÓN (N=12)	procedencia, estación, longitud, peso, días pescado	-	-	-
ATLÁNTICO (N=5)	estación,	8,078	0,004	ESTACIÓN
MEDITERRÁNEO (N=7)	longitud, peso, días pescado	-	-	-
OTOÑO (N=4)	procedencia,	-	-	-
PRIMAVERA (N=8)	longitud, peso, días pescado	-	-	-

El factor días pescado no influyó sobre las prevalencias de *Anisakis*, lo que se traduce en que la migración del parásito a musculatura se produjo incluso en los ejemplares más frescos.

Tabla 3.47.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de *Hysterothylacium*, para el total de la muestra de boquerón así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Hysterothylacium</i>	Variables independientes	χ^2	P<0,05	Variables incluidas
TOTAL BOQUERÓN (N=46)	procedencia estación, peso, longitud	9,145	0,002	ESTACIÓN
ATLÁNTICO (N=28)	estación,	12,364	0,002	ESTACIÓN, PESO
MEDITERRÁNEO (N=18)	longitud, peso	9,419	0,002	PESO
OTOÑO (N=15)	procedencia,	6,009	0,014	LONGITUD
PRIMAVERA (N=31)	longitud, peso	12,416	<0,0001	LONGITUD

Únicamente la estación influyó en las prevalencias de *Hysterothylacium* en la muestra total de boquerón, siendo estas mayores en primavera.

Solamente el factor días pescado influyó sobre las prevalencias de *Hysterothylacium* en el total de la muestra de boquerón, analizando solo a los hospedadores parasitados y añadiendo el factor días pescado (tabla 3.48).

Tabla 3.48.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de *Hysterothylacium* en músculo, solo en **individuos parasitados**, para el total de la muestra de **boquerón** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Hysterothylacium</i> en músculo	Variables independientes	χ^2	P <0,05	Variables incluidas
TOTAL BOQUERÓN (N=21)	procedencia, estación, longitud, peso, días pescado	4,776	0,029	DÍAS PESCADO
ATLÁNTICO (N=11)	estación, longitud, peso, días pescado	10,394	0,001	DÍAS PESCADO
MEDITERRÁNEO (N=10)		-	-	-
OTOÑO (N=8)	procedencia, longitud, peso, días pescado	-	-	-
PRIMAVERA (N=13)		10,531	0,005	LONGITUD Y DÍAS PESCADO

3.5.2.4.- Comparación de abundancias

Test de Mann-Whitney

En la tabla 3.49 se muestran los resultados obtenidos para *Anisakis* y en la tabla 3.50 los obtenidos para *Hysterothylacium*.

Tabla 3.49.- Comparación de abundancias de *Anisakis* para muestras no relacionadas, según clases longitud, peso, estación y procedencia, para el total de la muestra de **boquerón**.

TOTAL BOQUERÓN Abundancia media=0,34	U	Z	P
ATLÁNTICO MEDITERRÁNEO	4958,0	-1,716	0,086
OTOÑO PRIMAVERA	4420,5	-3,591	<0,0001
CLASE LONGITUD ≤15 cm CLASE LONGITUD >15 cm	4320,5	-2,751	0,006
CLASE PESO ≤20 g CLASE PESO >20 g	4738,0	-2,506	0,012

Se observaron diferencias con significancia estadística en la estación (mayores abundancias en primavera) y en individuos de mayor longitud y peso.

Tabla 3.50.- Comparación de abundancias de *Hysterothylacium* para muestras no relacionadas, según clases longitud, peso, estación y procedencia, para el total de la muestra de **boquerón**.

TOTAL BOQUERÓN Abundancia media=2,17	U	Z	P
ATLÁNTICO	4876,0	-1,813	0,070
MEDITERRÁNEO			
OTOÑO	4439,5	-3,192	0,001
PRIMAVERA			
CLASE LONGITUD ≤15 cm	4576,0	-1,655	0,098
CLASE LONGITUD >15 cm			
CLASE PESO ≤20 g	5181,0	-0,871	0,384
CLASE PESO >20 g			

Solamente se obtuvieron diferencias significativas en la estación (mayores abundancias de *Hysterothylacium* en primavera).

Test de Wilcoxon

En la tabla 3.51 se resumen los resultados obtenidos mediante esta prueba para *Anisakis* y en la tabla 3.52 para *Hysterothylacium*.

Tabla 3.51.- Comparación de abundancias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, para el total de la muestra de **boquerón** así como para cada procedencia y estación de captura.

MUESTRA	Z	P
TOTAL BOQUERÓN	-3,125	0,002
ATLÁNTICO	-3,458	0,001
MEDITERRÁNEO	0	1
OTOÑO	-0,905	0,366
PRIMAVERA	-3,024	0,002

Los resultados mostraron (excepto para las muestras del Mediterráneo y de otoño), la existencia de diferencias estadísticamente significativas a favor del microhábitat de parasitación vísceras.

Tabla 3.52.- Comparación de abundancias de *Hysterothylacium* por microhábitat de parasitación, para el total de la muestra de **boquerón** y para cada procedencia y estación de captura.

MUESTRA	Z	P
TOTAL BOQUERÓN	-5,427	<0,0001
ATLÁNTICO	-4,496	<0,0001
MEDITERRÁNEO	-2,911	0,004
OTOÑO	-2,934	0,003
PRIMAVERA	-4,535	<0,0001

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas a favor de las vísceras en todos los casos.

3.5.2.5.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias

Rho de Spearman

Los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) para datos cuantitativos de los factores para *Anisakis* se muestran en la tabla 3.53 y en la tabla 3.54 se muestran los resultados obtenidos para *Hysterothylacium*.

Tabla 3.53.- Influencia de los factores intrínsecos sobre las abundancias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **boquerón** así como para cada procedencia y estación de captura.

	LONGITUD		PESO	
	Rho	P<0,05	Rho	P<0,05
BOQUERÓN TOTAL	0,217	0,002	0,294	<0,0001
ATLÁNTICO	0,249	0,009	0,472	<0,0001
MEDITERRÁNEO	0,094	-	0,048	-
OTOÑO	-0,152	-	0,148	-
PRIMAVERA	0,523	<0,0001	0,521	<0,0001

Tanto el peso como la longitud mostraron influencia sobre las abundancias de *Anisakis* para la muestra total de boquerón.

Tabla 3.54.- Influencia de los factores intrínsecos sobre las abundancias de *Hysterothylacium*, para el total de la muestra de **boquerón** así como para cada procedencia y estación de captura.

	LONGITUD		PESO	
	Rho	P<0,05	Rho	P<0,05
TOTAL BOQUERÓN	0,034	-	0,131	-
ATLÁNTICO	0,168	<0,0001	0,460	<0,0001
MEDITERRÁNEO	-0,368	<0,0001	-0,415	<0,0001
OTOÑO	-0,208	0,030	0,081	-
PRIMAVERA	0,290	0,003	0,277	0,005

En la muestra total, ni el peso ni la longitud influyeron sobre las abundancias de *Hysterothylacium*. Sin embargo, ambos factores influyeron al separar la muestra por estaciones de captura y procedencias.

ANOVA

Los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) sobre la abundancia de *Anisakis*, para datos cualitativos de los factores, se muestran en la tabla 3.55 y para *Hysterothylacium* en la 3.56.

Tabla 3.55.- Influencia de los factores extrínsecos sobre las abundancias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **boquerón** así como para cada procedencia y estación de captura.

VARIABLE DEPENDIENTE Ln (N° L ₃ <i>Anisakis</i> +1)	VARIABLES INDEPENDIENTES	F	P<0,05
TOTAL BOQUERÓN	PROCEDENCIA ESTACIÓN	-	-
ATLÁNTICO		5,573	0,020
MEDITERRÁNEO	ESTACIÓN	-	-
OTOÑO		-	-
PRIMAVERA	PROCEDENCIA	4,193	0,043

Ninguno de los factores mostró influencia en las abundancias de *Anisakis* mediante esta prueba en la muestra total. Sin embargo, la estación sí que influyó en la muestra del Atlántico así como la procedencia en la de primavera.

Tabla 3.56.- Influencia de los factores extrínsecos sobre las abundancias de *Hysterothylacium*, para el total de la muestra de **boquerón**.

VARIABLE DEPENDIENTE Ln (N°L ₃ <i>Hysterothylacium</i> +1)	VARIABLES INDEPENDIENTES	F	P<0,05
TOTAL BOQUERÓN	PROCEDENCIA ESTACIÓN	6,591	0,001
		-	-

Únicamente la procedencia mostró influencia sobre las abundancias en la muestra total, siendo estas mayores en la atlántica. Analizando cada procedencia y estación de captura por separado, en ningún caso ningún factor influyó en las abundancias obtenidas.

3.5.3.- DISCUSIÓN

El boquerón es un hospedador paraténico común de nematodos anisákidos y una importante fuente de infección para el ser humano, ya que se consume en muchos países. En España, la preparación de éstos crudos en vinagre se considera el principal factor de riesgo de contraer anisakidosis (DE LIBERATO et al., 2013). Por este motivo es una especie muy estudiada, fundamentalmente en la búsqueda de larvas de *Anisakis*.

Especies halladas y prevalencias

En el presente trabajo se aislaron L₃ de los géneros *Anisakis* e *Hysterothylacium*, siendo las prevalencias de este último mayores a las de *Anisakis*. Estudios recientes (FIORAVANTI et al., 2004; RELLO et al., 2009; MARTÍNEZ & CASADEVALL, 2010; ANGELUCCI et al., 2011; DE LIBERATO et al., 2013) muestran que especies de estos dos géneros son las más frecuentemente aisladas de boquerón.

Las prevalencias de parasitación por anisákidos obtenidas a nivel global (32,10%) se corresponden con los resultados reportados por otros investigadores: 31,95% (RELLO et al., 2009) en pescado de distintas procedencias y 34,62% (MELONI et al., 2011) en boquerones capturados en aguas de Cerdeña. Sin embargo, otros estudios reportan prevalencias inferiores: 2,10% (PEREIRA BUENO et al., 1989); 2,20% (RENON & MALDRANA, 1993); 5,60% (DE LA TORRE MOLINA et al., 2000); 3,90% (CHALIGIANNIS et al., 2012); 2,30% (DE

LIBERATO et al., 2013); e incluso nulas (OLMEDO MEDICOUAGUE & SOLER, 1991; LÓPEZ GIMÉNEZ & MONSALVE, 1994; VIU et al., 1996; OSANZ MUR, 2001; GUTIÉRREZ-GALINDO et al., 2010); aunque en algunos de ellos no se indica la procedencia de captura del pescado.

Como se puede observar en estos datos, los estudios más recientes son los que obtienen mayores prevalencias. Por tanto, el tratamiento de las vísceras antes de arrojarlas al mar es un paso previo muy importante si se quieren disminuir dichas prevalencias.

Las prevalencias sobre la muestra total de *Anisakis* reportadas en este estudio (17,20%) fueron superiores a las obtenidas en el trabajo reciente realizado por RELLO et al. (2009), en el cual se reportan unas prevalencias del 9,35%, así como a las del resto de autores mencionados anteriormente.

Las L₃ de *Anisakis* identificadas nivel específico de procedencia atlántica fueron *A. simplex* (s.s.) y el genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii*. Sin embargo, en las 9 larvas analizadas de procedencia mediterránea se identificó la especie *A. pegreffii* y el genotipo híbrido mayoritariamente, mientras que solo se identificó una L₃ de *A. simplex* (s.s.), encontrándose esta en musculatura. Otros estudios realizados en el Mediterráneo muestran la presencia de *A. pegreffii* en boquerón (MATTIUCCI & NASCETTI, 2008; CAVALLERO et al., 2012 (en el Tirreno); CHALIGIANNIS et al., 2012 (en el mar Egeo); MLADINEO et al., 2012); mientras que otros autores (MELONI et al., 2011; DE LIBERATO et al., 2013) identificaron también el genotipo híbrido, en ambos casos en menor proporción que *A. pegreffii*.

Influencia de la procedencia

Comparando los resultados por procedencias, las prevalencias de *Anisakis* del presente estudio (21,10% en el Atlántico y 13,00% en el Mediterráneo) duplican a las obtenidas por [RELO et al. \(2009\)](#): 13,13% en el Atlántico y 5,56% en el Mediterráneo. Por otro lado, numerosos trabajos reportan que los boquerones de procedencia atlántica tienen mayores prevalencias y abundancias de *Anisakis* que los originarios del Mediterráneo ([ADROHER et al., 1996](#)) al igual que los resultados obtenidos en este estudio, probablemente relacionado con la mayor presencia de algunas especies de delfines en el Atlántico ([MATTIUCCI & NASCETTI, 2008](#)), mientras que en el oeste Mediterráneo la presencia de cetáceos varía en función de las condiciones hidrográficas, topográficas y tróficas ([GANNIER, 2005](#)).

Como se ha comentado en la identificación molecular y también de acuerdo con otros autores, tanto en boquerón como en otras numerosas especies de pescado, *A. simplex* (s.s.) es la especie predominante en el Atlántico mientras que en el Mediterráneo es mayoritaria *A. pegreffii*.

Influencia de la estación de captura

Las mayores tasas de infección se detectaron en primavera, tanto de anisákidos totales como de ambos géneros por separado. Estos resultados también fueron obtenidos en estudios anteriores ([DE LA TORRE MOLINA et al., 2000](#); [RELO et al., 2009](#)) y se podría relacionar con la migración de las

ballenas (hospedador definitivo) en esta época del año, las cuales diseminarían los huevos de anisákidos; aunque también podría estar relacionado con el aumento poblacional de metazoos planctónicos, que permitirían la continuidad del ciclo (BOILY & MARCOGLIESE, 1995). De hecho, en un estudio reciente elaborado por COSTALAGO et al. (2012) se constata que los cambios estacionales varían los hábitos alimenticios del boquerón, pudiendo suponer este hecho un mayor riesgo de parasitación en ciertas épocas del año.

Influencia de la longitud y el peso del hospedador

En el análisis de la influencia de factores intrínsecos del pescado en el presente estudio, se obtuvo como resultado que tanto el peso como la longitud influyeron en las prevalencias y abundancias de *Anisakis*, siendo los ejemplares de mayor longitud y peso (que se corresponderían a su vez con los de mayor edad) los más parasitados, permitiendo este hecho un mayor contacto con hospedadores intermediarios y acumulando nematodos a lo largo de su vida. Además, los peces de mayor tamaño están más cerca de la cima de la cadena trófica, teniendo por tanto mayor probabilidad de ingerir a otros hospedadores infectados.

Los resultados obtenidos por otros autores (RELLO et al., 2009; DE LIBERATO et al., 2013) también concuerdan en que los boquerones de mayor tamaño son los que presentan mayores prevalencias, aumentando así el riesgo, ya que los ejemplares más grandes son los que se suelen utilizar en la preparación de los boquerones en vinagre.

Esta relación entre prevalencias y tamaño también fue observada por algunos autores en otras especies hospedadoras (ADROHER et al., 1996; VALERO et al., 2006).

Microhábitat de parasitación y migración "post mortem"

En una visión general, tanto del total de anisákidos como de los dos géneros por separado, las abundancias y las prevalencias fueron mayores en vísceras que en musculatura, excepto en la muestra del Mediterráneo, en la cual el número de hospedadores parasitados por *Anisakis* en musculatura coincidió con el número de hospedadores parasitados en vísceras, siendo también las abundancias iguales en ambos microhábitats y únicamente de una larva en cada uno de ellos. Estas bajas prevalencias en musculatura también fueron observadas por otros autores (MLADINEO et al., 2012). Sin embargo, otros estudios muestran prevalencias en músculo mucho mayores: 25,60% (DE LIBERATO et al., 2013) y 57,20% de *Anisakis*, 24,30% de *Hysterothylacium* (RELLO et al., 2009), en este último, los autores confirman la migración *post mortem* a músculo mediante examen visual.

En este trabajo, los días transcurridos entre la pesca y el análisis solo influyeron en el caso de *Hysterothylacium*. Por tanto, el hecho de no mostrar influencia en el análisis realizado para *Anisakis* indica que la presencia en musculatura no parece depender en este caso de los días transcurridos, pudiéndose visualizar enquistado en músculo también en los ejemplares más frescos. Este hecho es importante a la hora de

valorar el riesgo de parasitación humana y de tomar las medidas preventivas adecuadas.

También puede observarse que la presencia en músculo resultó ser muy baja (2 en la muestra atlántica y 1 en la mediterránea). Es importante tener en cuenta este dato a la hora de valorar el riesgo, ya que, aunque la presencia en musculatura fue muy baja, el riesgo de adquirir anisakiosis por consumo de boquerones es elevado. Ya se comentó que el factor de riesgo más importante en este pescado es el método de preparación; debido a que las larvas enquistadas en la musculatura del boquerón son especialmente resistentes comparadas con las del resto de especies analizadas en este estudio, probablemente debido a la elevada consistencia de su carne, de difícil digestión. De hecho, la mayoría de los casos publicados en España fueron debidos al consumo de boquerones en vinagre (LOUREDO et al., 1997; DEL OLMO ESCRIBANO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1999; DEL OLMO MARTÍNEZ et al., 2000; LÓPEZ PEÑAS et al., 2000; LÓPEZ-SERRANO et al., 2000; REPISO ORTEGA et al., 2003; GONZÁLEZ QUIJADA et al., 2005).

Hysterothylacium

En el caso de *Hysterothylacium*, en estudios anteriores se mostraron prevalencias del 20,43% (CUÉLLAR et al., 1991), 24,45% (RELLO et al., 2009), y 21,90% (KULIKOWSKI et al., 2012), todas ellas muy similares a las obtenidas en el presente estudio (22,00%). Es bien conocido que *Hysterothylacium* es más prevalente en boquerón que *Anisakis*, principalmente en el Mediterráneo. Posiblemente la presencia de peces

hospedadores definitivos de este nematodo y la dieta del boquerón influyan en estas prevalencias diferenciales, ya que se alimentan de copépodos, cirrípedos, larvas de moluscos y huevos de peces (KULIKOWSKI et al., 2012), y los hospedadores intermediarios más comunes de las especies del género *Anisakis* son eufásidos. Esta mayor presencia de *Hysterothylacium* respecto a *Anisakis* en boquerón también podría ser debida al número de hospedadores intermediarios y a unas condiciones hidrográficas favorables (KLIMPEL & RÜCKETT, 2005).

A la vista de los resultados obtenidos se puede postular que:

- El mayor riesgo en esta especie hospedadora sería el método de preparación, que resulta insuficiente para destruir las larvas enquistadas en la musculatura, siendo así la principal medida de prevención la correcta congelación previa a su preparación en vinagre para el consumo.
- Los ejemplares que mayor riesgo conllevan son los de mayor tamaño y capturados en primavera.
- En el caso particular del boquerón, aunque las prevalencias y abundancias fueron mayores en el Atlántico, las diferencias respecto al Mediterráneo no fueron significativas, por tanto, la procedencia en este caso no fue tan relevante como en las otras especies de pescado analizadas.

3.6.- SARDINA

3.6.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS

3.6.1.1.- Aislado e identificación morfológica

En total se aislaron 199 L₃ de anisákidos (186 en vísceras y 13 en musculatura) en las 201 sardinas analizadas, pertenecientes al género *Hysterothylacium* principalmente (190 larvas). Del género *Anisakis* solo se aislaron 9 larvas en cinco hospedadores parasitados (5 en vísceras y 4 en musculatura), diferenciables entre ellas, a nivel morfológico, por una serie de características ya detalladas en la tabla 1.2.

3.6.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP

Solamente se pudo identificar por PCR-RFLP una de las 9 larvas extraídas (de procedencia mediterránea y presente en musculatura), dando como resultado tras la digestión con HinfI 3 bandas de 250, 300 y 370 pb, características de *A. pegreffii*.

3.6.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

3.6.2.1.- Estadística descriptiva

A continuación se comentan los resultados más relevantes obtenidos en el total de muestra de sardina que se resumen en las tablas 3.57 a 3.59.

Análisis de las prevalencias

Un 15,90% de las sardinias analizadas estaban parasitadas por anisákidos (2,50% por *Anisakis* y 13,40% por *Hysterothylacium*). Para el total de anisákidos, las prevalencias fueron superiores en vísceras (13,90%) que en musculatura (5,00%), en el Mediterráneo (23,20%) que en el Atlántico (8,00%) y mayores en primavera (19,80%) que en otoño (12,00%).

Análisis de los rangos

La población de *Hysterothylacium* presentó rangos máximos de parasitación superiores a la de *Anisakis*, con infrapoblaciones máximas de 37 (35 en vísceras, 2 en musculatura) y 5 (4 en vísceras, 1 en musculatura) helmintos respectivamente. Los mayores rangos se obtuvieron en el Atlántico y durante la primavera (1-37) pero fueron muy similares a los hallados en el Mediterráneo y durante el otoño (1-32).

Análisis de las abundancias

Las abundancias medias fueron de 0,99 para el total de anisákidos. Superiores para *Hysterothylacium* (0,95) que para *Anisakis* (0,04), superiores en vísceras (0,93) que en musculatura (0,06) y mayores en el Mediterráneo (1,46) que en el Atlántico (0,52) siendo iguales en otoño que en primavera (0,99). La carga parasitaria fue superior en vísceras que en musculatura para *Hysterothylacium* (0,90 y 0,04; respectivamente), mientras que para *Anisakis* fue igual en músculo que en vísceras (0,02).

Dado que, tanto las prevalencias como las abundancias resultaron ser bajas (sobre todo para *Anisakis*), y con el objetivo de poder obtener resultados con significancia estadística para las comparaciones de prevalencias y abundancias, así como para analizar los factores que influyeron en cada una de ellas, en el caso de la muestra de sardina se tomaron los datos del total de anisákidos para realizar el resto de los análisis estadísticos.

Tabla 3.57.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am) con su error (ϵA), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en la muestra total de **sardina** y para cada microhábitat de parasitación.

TOTAL (N=201)	N	%	Am (ϵA)	Rango	Nº L₃ Halladas
<u>Anisakis</u>					
Vísceras	2	1,00	0,02 (0,02)	1-4	5
Músculo	4	2,00	0,02 (0,01)	1-1	4
Total	5	2,50	0,04 (0,03)	1-5	9
<u>Hysterothylacium</u>					
Vísceras	26	12,90	0,90 (0,29)	1-35	181
Músculo	6	3,00	0,04 (0,02)	1-2	9
Total	27	13,40	0,95 (0,30)	1-37	190
<u>Anisákidos</u>					
Vísceras	28	13,90	0,93 (0,30)	1-35	186
Músculo	10	5,00	0,06 (0,02)	1-2	13
Total	32	15,90	0,99 (0,31)	1-37	199

Resultados y Discusión

Tabla 3.58.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **sardina** y por microhábitat de parasitación; para cada procedencia.

	ATLÁNTICO (N=100)					MEDITERRÁNEO (N=101)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<u>Anisakis</u>										
Vísceras	1	1,00	0,01	1-1	1	1	1,00	0,04	1-4	4
Músculo	1	1,00	0,01	1-1	1	3	3,00	0,03	1-1	3
Total	2	2,00	0,02	1-1	2	3	2,40	0,07	1-5	7
<u>Hysterothylacium</u>										
Vísceras	6	6,00	0,46	1-35	46	20	19,80	1,34	1-32	135
Músculo	2	2,00	0,04	1-2	4	4	4,00	0,05	1-2	5
Total	6	6,00	0,50	1-37	50	21	20,80	1,39	1-32	140
<u>Anisákidos</u>										
Vísceras	7	7,00	0,47	1-35	47	21	20,80	1,38	1-32	139
Músculo	3	3,00	0,05	1-2	5	7	6,90	0,08	1-2	8
Total	8	8,00	0,52	1-37	52	24	23,20	1,46	1-32	147

Tabla 3.59.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y n° L₃ halladas en **sardina** y por microhábitat de parasitación; para cada estación de captura.

	OTOÑO (N=100)					PRIMAVERA (N=101)				
	%	Am	Rango	N° L ₃ Halladas		%	Am	Rango	N° L ₃ Halladas	
<u>Anisakis</u>										
Vísceras	2	2,00	0,05	1-4	5	0	0,00	0,00	0	0
Músculo	3	3,00	0,03	1-1	3	1	1,00	0,01	1-1	1
Total	4	4,00	0,08	1-5	8	1	1,00	0,01	1-1	1
<u>Hysterothylacium</u>										
Vísceras	8	8,00	0,88	1-32	88	18	17,80	0,92	1-35	93
Músculo	2	2,00	0,03	1-2	3	4	4,00	0,06	1-2	6
Total	8	8,00	0,91	1-32	91	19	18,80	0,98	1-37	99
<u>Anisákidos</u>										
Vísceras	10	10,00	0,93	1-32	93	18	17,80	0,92	1-35	93
Músculo	5	5,00	0,06	1-2	6	5	5,00	0,07	1-2	7
Total	12	12,00	0,99	1-32	99	20	19,80	0,99	1-37	100

3.6.2.2.- Comparación de Prevalencias: Test de χ^2

A continuación se muestra la tablas de contingencias (agrupadas en la tabla 3.60) derivadas de la comparación de las prevalencias de anisákidos totales.

Tabla 3.60.- Comparación de prevalencias de **anisákidos** por microhábitat de parasitación, por procedencia y por estación de captura para el total de muestra analizada de **sardina**.

Microhábitat parasitación	VÍSCERAS			MUSCULATURA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	173	28	201	191	10	201	8,399	0,003

Procedencia	ATLÁNTICO			MEDITERRÁNEO			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	92	8	100	77	24	101	8,186	0,003

Estación	OTOÑO			PRIMAVERA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	88	12	100	81	20	101	1,739	0,177

Se dieron diferencias estadísticamente significativas en microhábitat de parasitación (mayor en vísceras) y en

procedencia (mayor en Mediterráneo) mientras que por estación de captura, aunque las prevalencias fueron mayores en primavera, las diferencias respecto a otoño no resultaron ser significativas.

3.6.2.3.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre la prevalencia: Regresión Logística Binaria

En la tabla 3.61 se muestran los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos mediante esta prueba.

Tabla 3.61.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de **anisákidos**, para el total de la muestra de **sardina** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i>	Variables independientes	χ^2	P<0,05	Variables incluidas
TOTAL SARDINA (N=32)	procedencia estación, peso, longitud	9,700	0,002	PROCEDENCIA
ATLÁNTICO (N=8)	estación,	15,907	0,001	LONGITUD, ES- TACIÓN Y PESO
MEDITERRÁNEO (N=24)	longitud, peso	-	-	-
OTOÑO (N=12)	procedencia,	6,550	0,01	PROCEDENCIA
PRIMAVERA (N=20)	longitud, peso	-	-	-

Solamente la procedencia mostró influencia con significancia estadística sobre las prevalencias de anisákidos obtenidas en la muestra total de sardina, siendo estas mayores en el Mediterráneo.

Teniendo en cuenta solamente a los hospedadores parasitados y añadiendo el factor días pescado, ningún factor mostró influencia en las prevalencias en músculo, probablemente debido al bajo número de hospedadores parasitados en este microhábitat.

3.6.2.4.- Comparación de abundancias

Test de Mann-Whitney

En la tabla 3.62 se resumen los resultados obtenidos mediante esta prueba.

Tabla 3.62.- Comparación de abundancias de **anisákidos** para muestras no relacionadas, según clases longitud, peso, estación y procedencia, para el total de la muestra de **sardina**.

TOTAL SARDINA Abundancia media=0,99	U	Z	P
ATLÁNTICO	4230,0	-3,124	0,002
MEDITERRÁNEO			
OTOÑO	4675,0	-1,428	0,153
PRIMAVERA			
CLASE LONGITUD ≤18 cm	5046,5	-0,010	0,992
CLASE LONGITUD >18 cm			
CLASE PESO ≤40 g	4604,5	-1,255	0,210
CLASE PESO >40 g			

Se obtuvieron diferencias significativas únicamente en la procedencia (las abundancias en el Mediterráneo fueron mayores que en el Atlántico), sin diferencias en cuanto a la estación y clases longitud y peso.

Test de Wilcoxon

En la tabla 3.63 se resumen los resultados obtenidos mediante esta prueba.

Tabla 3.63.- Comparación de abundancias de **anisákidos** por microhábitat de parasitación, para el total de la muestra de **sardina** así como para cada procedencia y estación de captura.

MUESTRA	Z	P
TOTAL SARDINA	-4,452	<0,0001
ATLÁNTICO	-2,154	0,031
MEDITERRÁNEO	-3,922	<0,0001
OTOÑO	-2,680	0,007
PRIMAVERA	-3,587	<0,0001

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas a favor de las vísceras. Sin embargo cabe destacar que, en el caso de *Anisakis*, aunque solamente se aislaron 9 larvas, 4 de ellas se extrajeron de la musculatura.

3.6.2.5.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias

Rho de Spearman

Los resultados estadísticamente significativos sobre las abundancias de anisákidos para datos cuantitativos de los factores, se muestran en la tabla 3.64.

Tabla 3.64.- Influencia de los factores intrínsecos sobre las abundancias de **anisákidos**, para el total de la muestra de **sardina** así como para cada procedencia y estación de captura.

	LONGITUD		PESO	
	Rho	P<0,05	Rho	P<0,05
TOTAL SARDINA	0,051	-	-0,020	-
ATLÁNTICO	0,351	<0,0001	0,236	0,018
MEDITERRÁNEO	0,077	-	0,041	-
OTOÑO	0,151	-	0,043	-
PRIMAVERA	-0,029	-	0,007	-

Únicamente en la muestra del Atlántico, el peso y la longitud mostraron influencia sobre las abundancias de anisákidos mediante esta prueba, siendo estas mayores en los individuos de mayor longitud y peso. Ninguno de los dos factores influyó en la muestra total.

ANOVA

Ninguno de los factores mostró influencia en las abundancias de anisákidos totales mediante esta prueba.

3.6.3.- DISCUSIÓN

La sardina es otra especie de pescado de elevado consumo en nuestro país siendo su principal método de preparación el asado o la plancha. Aunque las prevalencias y abundancias de *Anisakis* en musculatura son muy bajas en esta especie hospedadora, hay que tener presente el método de preparación, ya que algunos casos de anisakidosis reportados en España por sardina fueron debidos a que se consumieron crudas (BARROS et al., 1992; ACEBES et al., 1996).

Especies halladas y prevalencias

Los únicos géneros identificados en sardina también fueron *Anisakis* (2,50%) e *Hysterothylacium* (13,40%). Las mayores prevalencias de anisákidos en primavera y en el Mediterráneo concuerdan con los resultados obtenidos en otras especies hospedadoras analizadas en este trabajo, muy probablemente debido a la mayor presencia de larvas de *Hysterothylacium*, que, tal como se comentó anteriormente, es más frecuente en primavera y en el Mediterráneo.

Estudios anteriores también reportan mayores prevalencias de especies del género *Hysterothylacium* que de *Anisakis*: 29,60% de *Hysterothylacium* sp. y 0,00% de *Anisakis* sp. (CUÉLLAR et al., 1991); 40,00% de *Hysterothylacium* sp. y 10,00% de *A. simplex* (SANMARTÍN et al., 1994); 11,85% de *Hysterothylacium aduncum* y 0,00% de *Anisakis* (RELO et al., 2009); mientras que otros reportan prevalencias de anisákidos muy bajas en sardina (RUIZ VALERO et al., 1992; RENON &

MALDRANA, 1993; CHALIGIANNIS et al., 2012); incluso nulas (PEREIRA BUENO et al., 1989; OLMEDO MEDICOUAGUE & SOLER, 1991; LÓPEZ GIMÉNEZ & MONSALVE, 1994; VIU et al., 1996; DE LA TORRE MOLINA et al., 2000; ABOLLO et al., 2001; OSANZ MUR, 2001).

Las bajas prevalencias de *Anisakis* en sardina sugieren que el hospedador invertebrado ideal no figura en su dieta habitual o bien que este no es un hospedador óptimo para *Anisakis* (MATTIUCCI & NASCETTI, 2006). Las sardinas se alimentan de zooplacton pero también de fitoplancton (PALOMERA et al., 2007), siendo los primeros hospedadores de ambos anisákidos pequeños crustáceos presentes en el zooplacton. La mayor presencia de *Hysterothylacium* respecto a *Anisakis* podría indicar que los primeros hospedadores intermediarios de ambos nematodos fueran diferentes.

La única larva analizada molecularmente era de procedencia mediterránea y se identificó como *A. pegreffii*. Este resultado también lo obtuvieron otros autores en sardina (MELONI et al., 2011; TEDDE et al., 2011; CHALIGIANNIS et al., 2012) y también en otras especies hospedadoras procedentes del Mediterráneo (FARJALLAH et al., 2008; en pescado de las costas de Tetuán y SANTORO et al., 2010; en tortuga boba mediterránea).

Influencia de la procedencia

Las prevalencias y abundancias de anisákidos (y a diferencia del resto de las especies analizadas en este estudio) fueron mayores en el Mediterráneo (23,20% y 1,46; respectivamente)

que en el Atlántico (8,00% y 0,52; respectivamente), con diferencias significativas en ambos casos, mostrando, además, la procedencia influencia en las prevalencias obtenidas. Esta mayor prevalencia en la procedencia mediterránea, como se ha comentado anteriormente, podría ser debida a la elevada presencia de *Hysterothylacium* en esta zona, reportada también por otros autores (CUÉLLAR et al., 1991; RELLO et al., 2009).

Influencia de la estación de captura

Aunque las prevalencias de anisákidos fueron algo mayores en primavera, ni la comparación de prevalencias ni la de abundancias dieron resultados estadísticamente significativos. Al observar ambos géneros por separado, las prevalencias y abundancias de *Hysterothylacium* fueron mayores en primavera siendo las de *Anisakis* mayores en otoño. La mayor presencia de *Hysterothylacium* en primavera también fue anteriormente reportada por otros autores en sardina (SANMARTÍN et al., 1994) y en otras especies de pescado (DE LA TORRE MOLINA et al., 2000) y las posibles causas ya han sido ampliamente comentadas con anterioridad en otras especies analizadas en este trabajo.

Influencia de la longitud y el peso

Ninguno de los factores intrínsecos analizados, longitud y peso, mostró influencia ni en las prevalencias ni en las abundancias

de anisákidos en la muestra total. Estos factores únicamente influyeron en las abundancias en la muestra procedente del Atlántico, aunque los rangos de peso y longitud no diferían en gran medida del resto de muestras analizadas. Otros estudios realizados en sardina mostraron resultados similares aunque, la muestra que resultó influenciada por la longitud fue la de procedencia mediterránea (al contrario que en nuestro caso), pero las diferencias con los de menor longitud no fueron significativas (RELLO et al., 2008). Estos resultados podrían ser debidos al pequeño tamaño de los ejemplares analizados en ambos estudios, ya que otros trabajos realizados en especies hospedadoras de mayor tamaño sí que obtuvieron una relación estadísticamente significativa entre prevalencias y longitud (ADROHER et al., 1996; VALERO et al., 2006).

Microhábitat de parasitación y migración "post mortem"

Se obtuvieron mayores prevalencias y abundancias de anisákidos en vísceras que en musculatura. Llama la atención que la escasa migración a músculo de *Hysterothylacium* en esta especie hospedadora en particular coincide con la mayor presencia de larvas de *Anisakis* en musculatura, ya que, aunque sus prevalencias y abundancias fueron bastante menores a las de *Hysterothylacium*, en todas las muestras fueron superiores en musculatura que en vísceras (excepto en la del Atlántico, cuyas prevalencias en músculo coincidieron con las de vísceras: 1,00%).

Las menores prevalencias de *Anisakis* en las ocho especies analizadas se obtuvieron en sardina (2,50%), pero como se ha comentado anteriormente, su presencia en musculatura

(aunque baja) fue mayor que en vísceras, factor importante a tener en cuenta a la hora de valorar el riesgo de parasitación humana. En otros estudios, mencionados anteriormente, no se nombra la presencia de anisákidos en musculatura de sardina. Únicamente en el realizado por [RELLO et al. \(2008\)](#) se comenta la presencia en músculo solamente de *Hysterothylacium* (4,96%), con prevalencias muy similares a las obtenidas en este trabajo (3,00%).

En general se puede postular que:

- La presencia de *Anisakis* en sardina fue escasa pero con mayores prevalencias en músculo que en vísceras.
- Fue la única especie analizada que presentó mayores abundancias y prevalencias de ambos anisákidos en la procedencia mediterránea.

3.7.- CABALLA

3.7.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS

3.7.1.1.- **Aislado e identificación morfológica**

Se extrajeron 808 L₃ de anisákidos (611 de vísceras y 197 de musculatura) de las 169 caballas analizadas, del género *Anisakis* principalmente (798). También se aislaron larvas del género *Hysterothylacium* (10) pero solamente en la procedencia atlántica y en primavera (9 en vísceras y 1 en musculatura). La figura 3.14 muestra la presencia de anisákidos en vísceras de caballa y bajo lupa binocular.

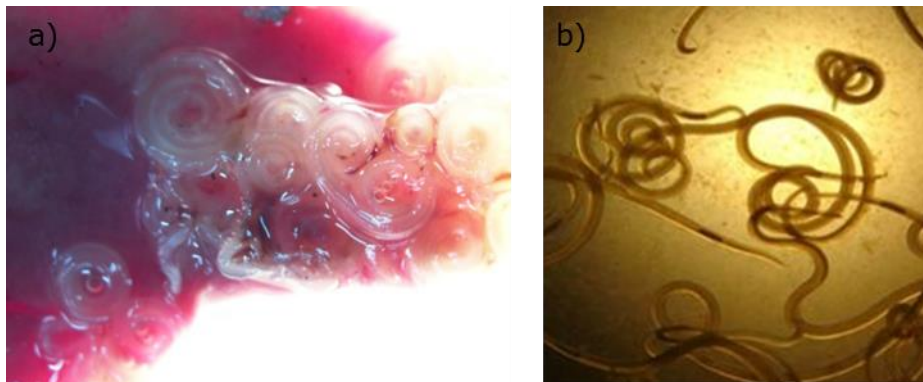


Figura 3.14.- a) Larvas de *Anisakis* en vísceras de caballa; b) Observación bajo lupa de L₃ de *Anisakis* extraídas de vísceras.

3.7.1.2.- Análisis molecular PCR-RFLP

Se realizó el análisis molecular a 29 L₃, únicamente de la procedencia atlántica, identificándose las especies *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* (solamente 1 y se encontraba en vísceras) y el genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* en base a la longitud de los fragmentos obtenidos tras la digestión, como se muestra en la tabla 3.65.

Tabla 3.65.- N° de L₃ de *Anisakis* aisladas de **caballa**, n° de L₃ analizadas, especie y/o genotipo identificado a nivel molecular. A.s. (s.s.)=*A. simplex* (*sensu stricto*).

	N° L ₃ Halladas	N° L ₃ Analizadas	Especie/ Genotipo
Vísceras	602	23	11 A.s. (s.s.) 11 híbridos 1 <i>A. Pegreffii</i>
Músculo	196	6	6 A.s. (s.s.)
Total	798	29	17 A.s. (s.s.) 11 híbridos 1 <i>A. Pegreffii</i>

Estos resultados coinciden con otras especies analizadas en cuanto a la mayor presencia de *A. simplex* (s.s.) en la procedencia atlántica y también en cuanto a su presencia en musculatura, ya que fue la única especie identificada en este microhábitat, mientras que el único ejemplar identificado de *A. pegreffii* estaba presente en vísceras. Tampoco se identificó ningún genotipo híbrido de musculatura en esta especie hospedadora en concreto.

3.7.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

3.7.2.1.- Estadística descriptiva

A continuación se comentan los resultados más relevantes obtenidos en el total de muestra de caballa que se resumen en las tablas 3.66 a 3.68.

Análisis de las prevalencias

Las prevalencias de parasitación por anisákidos en caballa fueron del 45,60% (45,60% por *Anisakis* y 3,00% por *Hysterothylacium*). Para el total de anisákidos, las prevalencias fueron superiores en vísceras (43,80%) que en musculatura (21,90%), en el Atlántico (62,50%) que en el Mediterráneo (30,30%) y mayores en otoño (62,10%) que en primavera (24,30%).

Análisis de los rangos

La población de *Anisakis* presentó rangos máximos de parasitación superiores a la de *Hysterothylacium*, con infrapoblaciones máximas de 198 (150 en vísceras, 48 en musculatura) y 3 (2 en vísceras y 1 en musculatura) helmintos respectivamente. Los mayores rangos se obtuvieron en el Atlántico y durante el otoño (198 larvas; 150 en vísceras y 48 en musculatura).

Análisis de las abundancias

Las abundancias medias fueron de 4,78 para el total de anisákidos. Superiores para *Anisakis* (4,72) que para *Hysterothylacium* (0,06), superiores en vísceras (3,62) que en musculatura (1,17), mayores en el Atlántico (6,50) que en el Mediterráneo (3,24) y mayores en otoño (7,02) respecto a primavera (1,91). Cabe destacar que no se halló ninguna larva de *Hysterothylacium* en la población del Mediterráneo ni tampoco en la de otoño.

Tabla 3.66.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am) con su error (ϵA), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en la muestra total de **caballa** y para cada microhábitat de parasitación.

TOTAL (N=169)	N	%	Am (ϵA)	Rango	Nº L₃ Halladas
<u>Anisakis</u>					
Vísceras	74	43,80	3,56 (0,98)	1-150	602
Músculo	37	21,90	1,16 (0,37)	1-48	196
Total	77	45,60	4,72 (1,28)	1-198	798
<u>Hysterothylacium</u>					
Vísceras	5	3,00	0,05 (0,02)	1-2	9
Músculo	1	0,60	0,01 (0,01)	1-1	1
Total	5	3,00	0,06 (0,03)	1-3	10
<u>Anisákidos</u>					
Vísceras	74	43,80	3,62 (0,98)	1-150	611
Músculo	37	21,90	1,17 (0,37)	1-48	197
Total	77	45,60	4,78 (1,29)	1-198	808

Resultados y Discusión

Tabla 3.67.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **caballa** y por microhábitat de parasitación; para cada procedencia.

	ATLÁNTICO (N=80)					MEDITERRÁNEO (N=89)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<u>Anisakis</u>										
Vísceras	47	58,80	5,19	1-150	415	27	30,30	2,10	1-30	187
Músculo	24	30,00	1,19	1-48	95	13	14,60	1,13	1-26	101
Total	50	62,50	6,38	1-198	510	27	30,30	3,24	1-40	288
<u>Hysterothylacium</u>										
Vísceras	5	6,30	0,11	1-2	9					
Músculo	1	1,30	0,01	1-1	1					
Total	5	6,30	0,13	1-3	10					
<u>Anisákidos</u>										
Vísceras	47	58,80	5,30	1-150	424	27	30,30	2,10	1-30	187
Músculo	24	30,00	1,20	1-48	96	13	14,60	1,13	1-26	101
Total	50	62,50	6,50	1-198	520	27	30,30	3,24	1-40	288

Nota: Para la muestra del Mediterráneo, el total de anisákidos se corresponde con el total de *Anisakis*, ya que no se hallaron ejemplares de otros géneros en dicha muestra.

Tabla 3.68.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **caballa** y por microhábitat de parasitación; para cada estación de captura.

	OTOÑO (N=95)					PRIMAVERA (N=74)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<u>Anisakis</u>										
Vísceras	56	58,90	5,12	1-150	486	18	24,30	1,57	1-22	116
Músculo	27	28,40	1,91	1-48	181	10	13,50	0,20	1-2	15
Total	59	62,10	7,02	1-198	667	18	24,30	1,77	1-24	131
<u>Hysterothylacium</u>										
Vísceras						5	6,80	0,12	1-2	9
Músculo						1	1,40	0,01	1-1	1
Total						5	6,80	0,14	1-3	10
<u>Anisákidos</u>										
Vísceras	56	58,90	5,12	1-150	486	18	24,30	1,69	1-22	125
Músculo	27	28,40	1,91	1-48	181	10	13,50	0,22	1-2	16
Total	59	62,10	7,02	1-198	667	18	24,30	1,91	1-24	141

Nota: Para la muestra de otoño, el total de anisákidos se corresponde con el total de *Anisakis*, ya que no se hallaron ejemplares de otros géneros en dicha muestra.

3.7.2.2.- Comparación de Prevalencias: Test de χ^2

A continuación se muestran las tablas de contingencia derivadas de la comparación de las prevalencias de *Anisakis* (agrupadas en la tabla 3.69).

Tabla 3.69.- Comparación de prevalencias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, por procedencia y por estación de captura para el total de muestra analizada de **caballa**.

Microhábitat parasitación	VÍSCERAS			MUSCULATURA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	95	74	169	132	37	169	17,385	<0,0001

Procedencia	ATLÁNTICO			MEDITERRÁNEO			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	30	50	80	62	27	89	16,298	<0,0001

Estación	OTOÑO			PRIMAVERA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	36	59	95	56	18	74	22,440	<0,0001

Se dieron diferencias estadísticamente significativas en microhábitat de parasitación, procedencia y estación (mayor en vísceras, en Atlántico y en otoño).

3.7.2.3.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria

En las tablas 3.70 y 3.71 se muestran los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos mediante esta prueba.

Tabla 3.70.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **caballa** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i>	Variables independientes	χ^2	P<0,05	Variables incluidas
TOTAL CABALLA (N=77)	procedencia, estación, peso, longitud	53,151	0,0001	PESO
ATLÁNTICO (N=50)	estación,	-	-	-
MEDITERRÁNEO (N=27)	longitud, peso	62,301	0,0001	LONGITUD, ESTACIÓN
OTOÑO (N=59)	procedencia,	-	-	-
PRIMAVERA (N=18)	longitud, peso	52,461	0,0001	PROCEDENCIA

Solamente el factor peso mostró influencia estadísticamente significativa sobre las prevalencias en la muestra total, siendo los ejemplares de mayor peso los más parasitados.

Teniendo en cuenta solo a los hospedadores parasitados y añadiendo el factor días pescado, únicamente el peso mostró influencia en las prevalencias, siendo los hospedadores de mayor tamaño los más parasitados también en musculatura. El factor días pescado no influyó sobre las prevalencias de *Anisakis* debido a que se hallaban parasitados en músculo tanto los ejemplares que llevaban varios días capturados como los que solamente había transcurrido un día desde la pesca hasta el análisis, por tanto, en las caballas más frescas también se encontraron helmintos en musculatura.

Tabla 3.71.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre la prevalencia de *Anisakis* en músculo, solo en **individuos parasitados**, para el total de la muestra de **caballa** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i> en músculo	Variables independientes	χ^2	P <0,05	Variables incluidas
TOTAL CABALLA (N=37)	procedencia, estación, longitud, peso, días pescado	9,816	0,002	PESO
ATLÁNTICO (N=24)	estación, longitud, peso, días pescado	10,207	0,001	PESO
MEDITERRÁNEO (N=13)		-	-	-
OTOÑO (N=27)	procedencia, longitud, peso, días pecado	-	-	-
PRIMAVERA (N=10)		7,979	0,005	PESO

3.7.2.4.- Comparación de abundancias

Test de Mann-Whitney

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.72.

Tabla 3.72.- Comparación de abundancias de *Anisakis* para muestras no relacionadas, según clases longitud, peso, estación y procedencia, para el total de la muestra de **caballa**.

TOTAL CABALLA Abundancia media=4,72	U	Z	P
ATLÁNTICO MEDITERRÁNEO	2575,0	-3,395	0,001
OTOÑO PRIMAVERA	2178,5	-4,636	<0,0001
CLASE LONGITUD <27 cm CLASE LONGITUD ≥27 cm	1572,5	-6,574	<0,0001
CLASE PESO ≤200 g CLASE PESO >200 g	1350,0	-7,079	<0,0001

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las abundancias en todos los casos (procedencia, estación, clase longitud y clase peso), siendo estas mayores en el Atlántico, en otoño y en los individuos de mayor longitud y peso.

Test de Wilcoxon

En la tabla 3.73 se resumen los resultados obtenidos mediante esta prueba.

Tabla 3.73.- Comparación de abundancias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, para el total de la muestra de **caballa** así como para cada procedencia y estación de captura.

MUESTRA	Z	P
TOTAL CABALLA	-5,559	<0,0001
ATLÁNTICO	-5,815	<0,0001
MEDITERRÁNEO	-1,753	0,080
OTOÑO	-4,359	<0,0001
PRIMAVERA	-3,645	<0,0001

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas a favor del microhábitat de parasitación vísceras en todas las muestras, excepto en la del Mediterráneo.

3.7.2.5.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias

Rho de Spearman

Los resultados estadísticamente significativos se muestran en la tabla 3.74.

Tabla 3.74.- Influencia de los factores intrínsecos sobre las abundancias de *Anisakis*, para el total de la muestra de **caballa** así como para cada procedencia y estación de captura.

	LONGITUD		PESO	
	Rho	P<0,05	Rho	P<0,05
TOTAL CABALLA	0,556	<0,0001	0,520	<0,0001
ATLÁNTICO	0,331	0,003	0,195	-
MEDITERRÁNEO	0,669	<0,0001	0,661	<0,0001
OTOÑO	0,218	0,033	0,165	-
PRIMAVERA	0,558	<0,0001	0,553	<0,0001

En la muestra total, tanto el peso como la longitud mostraron influencia sobre las abundancias.

ANOVA

Ninguno de los factores analizados mediante esta prueba mostró influencia en las abundancias de anisákidos totales.

3.7.3.- DISCUSIÓN

La caballa también figura entre los pescados más consumidos en nuestro país y, aunque no aparece como agente causal en los casos de anisakidosis reportados en España, sí es frecuente en Japón, donde su consumo (tanto de caballa como de estornino) es elevado. A nivel económico también es importante ya que es frecuente su preparación enlatada y, también en Japón, se ha observado alguna larva de anisákido en pescados en conserva, lo cual disminuye su valor, afecta a las características organolépticas y puede suponer un riesgo debido a la presencia de antígenos termoestables del parásito, que podrían ocasionar reacciones alérgicas al consumidor. Otro método de preparación frecuente es cocinarla a la plancha, por lo tanto debe tenerse en cuenta el gran tamaño que pueden presentar algunos ejemplares (rango de las caballas de este estudio, entre: 29,96-466,80 g de peso y 15,0-39,2 cm de longitud) ya que no se alcanza la misma temperatura en el centro de la pieza, zona más alejada de la fuente de calor.

Especies halladas y prevalencias

Al igual que en la mayoría de las especies hospedadoras analizadas, *Anisakis* e *Hysterothylacium* fueron los dos géneros presentes en caballa, con unas prevalencias de parasitación por anisákidos totales y por *Anisakis* del 45,60%, mientras que las prevalencias de *Hysterothylacium* fueron bastante inferiores (3,00%) y presente este último únicamente en las muestras del Atlántico y en primavera. [SANMARTÍN et al. \(1994\)](#)

también reportaron la presencia de ambos géneros en caballas procedentes del Atlántico con prevalencias similares a las de este estudio para *Anisakis* (48,70%) pero muy superiores para *Hysterothylacium* (29,00%).

Otros autores también reportan elevadas prevalencias de anisákidos en caballa: 32,00% (OLMEDO MEDICOUAGUE & SOLER, 1991; LÓPEZ GIMÉNEZ & MONSALVE, 1994); 67,00% (CUÉLLAR et al., 1991) y 20,60% (DE LA TORRE MOLINA et al., 2000).

La comparación de la prevalencia total de *Anisakis* muestra la existencia de diferencias significativas en cuanto a la procedencia atlántica, estación de captura otoño y microhábitat de parasitación vísceras. Sin embargo, al analizar mediante RLB los factores que influyeron en las prevalencias, únicamente el peso mostró influencia con significancia estadística tanto en la muestra total como teniendo en cuenta solamente a los hospedadores parasitados para analizar qué factores influyeron en la presencia del parásito en musculatura.

Las L₃ de *Anisakis* analizadas a nivel molecular procedían únicamente del Atlántico y dieron como resultado la presencia de *A. simplex* (s.s.), el genotipo híbrido *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* y un único ejemplar de *A. pegreffii*. En vísceras se identificaron las tres especies mientras que en musculatura únicamente *A. simplex* (s.s.). ABOLLO et al. (2001) también identificaron *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii* pero no ejemplares híbridos en caballas capturadas en aguas de Galicia. En cuanto a la procedencia mediterránea, no se pudo identificar ninguna larva en este trabajo pero otros autores muestran a *A. pegreffii* como la especie mayoritaria en caballas de esta procedencia: FARJALLAH et al. (2008), en Marruecos y Mauritania; MELONI

et al. (2011), en Cerdeña; CHALIGIANNIS et al. (2012), en el mar Egeo).

Influencia de la procedencia

En la muestra de caballa, la procedencia influyó en los géneros identificados, ya que *Hysterothylacium* no apareció en la muestra del Mediterráneo. Tanto las prevalencias como las abundancias de *Anisakis* fueron mayores en el Atlántico (62,50% y 6,38; respectivamente) y con diferencias estadísticamente significativas respecto al Mediterráneo en ambos casos (30,30% y 3,24; respectivamente). Esta elevada prevalencia en el Atlántico también fue observada por otros autores en estudios anteriores: 74,54% en Galicia (ABOLLO et al., 2001) y 48,70% (SANMARTÍN et al., 1994). Sin embargo, en el Mediterráneo los valores reportados fueron menores: 14,20% (RENON & MALDRANA, 1993) y 9,50-18,50% en caballa pescada en la zona de Tarragona (OSANZ MUR, 2001); mientras que MELONI et al. (2011) obtuvieron un 50,00% de prevalencia en caballas procedentes de Cerdeña. Esto podría deberse a influencia de la zona estudiada, ya que procedían del este, mientras que las del presente estudio procedían de las costas españolas (zona oeste del Mediterráneo); aunque también debemos tener en cuenta que en el estudio de MELONI et al. (2011) el número de hospedadores analizados fue muy bajo (únicamente 10 ejemplares).

A la vista de estos datos también se podría postular que las prevalencias en el Mediterráneo han ido aumentando a lo largo de los años, ya que nuestros datos también son superiores a

los anteriormente mencionados en caballas capturadas en costas españolas.

Influencia de la estación de captura

Tanto las prevalencias como las abundancias de *Anisakis* fueron mayores en otoño y con diferencias estadísticamente significativas respecto a las de primavera, al contrario de lo observado en el resto de especies analizadas en este trabajo. Sin embargo, los ejemplares del género *Hysterothylacium* se observaron únicamente en primavera.

Ya se ha comentado en otras especies analizadas en este estudio la mayor presencia de este género en esta estación y los posibles factores que podrían influir; principalmente la mayor presencia de hospedadores en esta época del año y la mayor cantidad de zooplacton, tal y como se comentó en el apartado de la bacaladilla (KØIE & FAGERHOLM, 1995; KØIE et al., 1995; MARCOGLIESE, 1995b). Otros autores (CHOU et al., 2011), reportaron mayores abundancias de anisákidos en primavera en ejemplares de *Scomber australicus* capturados en las costas japonesas del Pacífico y mar de China.

Influencia de la longitud y el peso

En esta especie de pescado es en la que mayor relación se ha obtenido entre el tamaño y las prevalencias y abundancias, ya que las prevalencias fueron mayores en los individuos de mayor peso y, al analizar los factores que influyeron en la

presencia de *Anisakis* por RLB (particularmente en músculo), en ambos casos el peso fue el único factor que influyó en las prevalencias obtenidas, tanto en el total de muestra, como en la muestra solo de hospedadores parasitados. En cuanto a las abundancias, ambos factores (peso y longitud) mostraron influencia y las diferencias fueron estadísticamente significativas; además, al analizar los factores que influyeron en las abundancias, también en este caso únicamente el peso y la longitud mostraron influencia, con diferencias significativas en todos ellos. Otros autores como [OSANZ MUR \(2001\)](#) no encontraron esta relación. Sin embargo, son numerosos los estudios que sí mostraron relación entre el tamaño de las caballas (y otras especies de pescado) y las prevalencias y/o abundancias, como el realizado por [CHOU et al. \(2011\)](#), en *Scomber australicus* de aguas japonesas. Incluso hay un modelo de predicción que correlaciona el número de larvas presentes en pescado con la longitud del mismo con una precisión del 80,50% ([TANTANASI et al., 2012](#)).

Las causas de esta influencia podrían ser la acumulación de helmintos debida a una mayor cantidad de primeros hospedadores intermediarios ingeridos. [STRØMNES & ANDERSEN \(2000\)](#) postulan que a mayor tamaño del pez más alto está en la cadena trófica, y por tanto la probabilidad de ingerir hospedadores intermediarios infestados es mayor.

Microhábitat de parasitación y migración "post mortem"

Los resultados obtenidos mostraron mayores prevalencias y abundancias en vísceras respecto a musculatura en todas las muestras analizadas. Aún así, las prevalencias de *Anisakis* en musculatura fueron elevadas (21,90% para el total de hospedadores analizados y el 50,00% de los hospedadores parasitados presentaba larvas en musculatura). Otros autores mostraron prevalencias bastante menores en musculatura de caballa: 0-1,90% (OSANZ MUR, 2001); 4,30% (ABOLLO et al., 2001) e incluso nulas (CHOU et al., 2011).

Pero, tal como se menciona en el estudio realizado por TANTANASI et al. (2012) en jurel, las prevalencias han ido en aumento con los años y ésta es una causa de preocupación en Salud Pública. Además, también tiene efectos financieros negativos (FARJALLAH et al., 2006; CABRERA, 2010). Estudios realizados en la distribución de larvas de *Anisakis* en algunas especies de pescado muestran una gran variación en las prevalencias entre vísceras y musculatura, y factores como los hábitos alimenticios del hospedador o la distancia de migración de la larva en el hospedador se han utilizado para explicar las preferencias por un microhábitat u otro (SMITH & WOOTEN, 1975; CATTAN & CARVAJAL, 1984; SMITH 1984; STRØMNES & ANDERSEN, 1998; ABOLLO et al., 2001; SILVA & EIRAS, 2003).

Cabe mencionar en este apartado que aunque se identificaron las especies *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* y el genotipo híbrido entre ambos, en musculatura únicamente se identificó *A. simplex* (s.s.). Este resultado concuerda con el estudio realizado en *Scomber japonicus* por SUZUKI et al. (2010) en el

cual, aunque la especie mayoritaria fue *A. pegreffii*, la migración a músculo de *A. simplex* (s.s.) fue doce veces superior a la de *A. pegreffii*. Además, en un estudio realizado en pez sable (*Trichiurus* spp.), se menciona que, aunque en pescado se detectó tanto *A. simplex* (s.s.) como *A. pegreffii*, el 99,00% de las larvas extraídas de pacientes afectados fueron identificadas como *A. simplex* (s.s) (UMEHARA et al., 2006; 2007; 2008).

Hysterothylacium

Como ya se ha comentado anteriormente en esta especie, así como en el resto de especies hospedadoras analizadas, los ejemplares del género *Hysterothylacium* se hallaron únicamente en primavera y solo en las caballas de procedencia atlántica.

A la vista de los resultados obtenidos de todos los datos analizados, lo más importante a destacar como riesgo de adquirir anisakidosis por consumo en caballa sería:

- la elevada presencia de larvas de *A. simplex* (s.s.) en musculatura en los ejemplares de mayor peso y,
- su mayor presencia en la procedencia atlántica y en otoño.

3.8.- ESTORNINO

3.8.1.- LARVAS DE ANISÁKIDOS. GÉNEROS HALLADOS Y ESPECIES IDENTIFICADAS

3.8.1.1.- *Aislado e identificación morfológica*

Se obtuvieron 120 L₃ de anisákidos en los 108 estorninos analizados, únicamente del género *Anisakis* (figura 3.15).

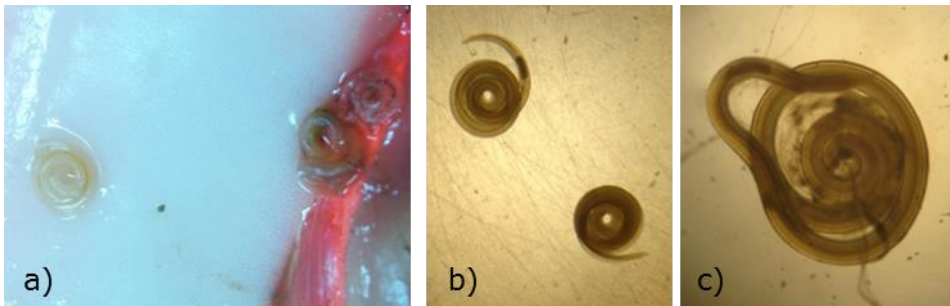


Figura 3.15.- a) Larvas de *Anisakis* enquistadas en vísceras de estornino; b) quistes aislados de vísceras; c) L₃ de *Anisakis* saliendo del quiste.

3.8.1.2.- *Análisis molecular PCR-RFLP*

Se analizaron 11 larvas, 8 de procedencia atlántica y 3 del Mediterráneo, identificándose las especies *A. simplex* (s.s), *A. pegreffii* y genotipo híbrido entre ambas, como se muestra en la tabla 3.75.

Tabla 3.75.- N° de L₃ de *Anisakis* aisladas de **estornino**, n° de L₃ analizadas, especie y/o genotipo identificado a nivel molecular para cada procedencia. A.s. (s.s.)=*A. simplex (sensu stricto)*.

Atlántico	N° L₃	N° L₃	Especie/ Genotipo
	Halladas	Analizadas	
Vísceras	112	8	1 A.s. (s.s.) 5 híbridos 2 <i>A. pegreffii</i>
Músculo	2		
Total	114	8	1 A.s. (s.s.) 5 híbridos 2 <i>A. pegreffii</i>

Mediterráneo	N° L₃	N° L₃	Especie/ Genotipo
	Halladas	Analizadas	
Vísceras	4	2	2 híbridos
Músculo	2	1	1 híbrido
Total	6	3	3 híbridos

Al igual que en caballa, en la procedencia atlántica se identificaron ambas especies así como el genotipo híbrido entre ambas, aunque este último en mayor proporción. Las tres larvas analizadas de la procedencia mediterránea se identificaron también como híbridos, por tanto, en esta especie hospedadora en particular, el genotipo híbrido fue el mayoritario en ambas procedencias.

3.8.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

3.8.2.1.- Estadística descriptiva

Los parámetros que caracterizan a la población de *Anisakis* hallada en estornino se muestran en las tablas 3.76 a 3.78.

Análisis de las prevalencias

El 17,60% de los estorninos analizados estaban parasitados por *Anisakis*. Las prevalencias fueron mayores en vísceras (16,70%) que en musculatura (2,80%), mayores en primavera (22,00%) que en otoño (13,80%) y mayores en el Atlántico (19,20%) que en el Mediterráneo (14,30%).

Análisis de los rangos

Los mayores rangos se obtuvieron en el Atlántico y durante el otoño (1-95) siendo bastante mayores en vísceras (1-93) que en musculatura (1-2).

Análisis de las abundancias

Las abundancias medias fueron de 1,11, siendo mayores en vísceras (1,07) que en musculatura (0,04), en el Atlántico (1,56) mayores que en el Mediterráneo (0,17) y mayores en otoño (1,84) respecto a primavera (0,26).

Tabla 3.76.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am) con su error (ϵA), rangos mínimo-máximo (Rango) y N° L₃ halladas en la muestra total de **estornino** y para cada microhábitat de parasitación.

TOTAL (N=108)	N	%	Am (ϵA)	Rango	N° L₃ Halladas
<u>Anisakis</u>					
Vísceras	18	16,70	1,07 (0,86)	1-93	116
Músculo	3	2,80	0,04 (0,02)	1-2	4
Total	19	17,60	1,11 (0,88)	1-95	120

Nota: Para la muestra de estornino, el total de anisákidos se corresponde con el total de *Anisakis*, ya que no se hallaron ejemplares de otras especies en dicha muestra.

Tabla 3.77.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **estornino** y por microhábitat de parasitación; para cada procedencia.

	ATLÁNTICO (N=73)					MEDITERRÁNEO (N=35)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<i>Anisakis</i>										
Vísceras	14	19,20	1,53	1-93	112	4	11,40	0,11	1-1	4
Músculo	1	1,40	0,03	1-2	2	2	5,70	0,06	1-1	2
Total	14	19,20	1,56	1-95	114	5	14,30	0,17	1-2	6

Tabla 3.78.- Número de hospedadores parasitados (N), prevalencias de parasitación (%), abundancias medias (Am), rangos mínimo-máximo (Rango) y nº L₃ halladas en **estornino** y por microhábitat de parasitación; para cada estación de captura.

	OTOÑO (N=58)					PRIMAVERA (N=50)				
	%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas		%	Am	Rango	Nº L ₃ Halladas	
<i>Anisakis</i>										
Vísceras	8	13,80	1,81	1-93	105	10	20,00	0,22	1-2	11
Músculo	1	1,70	0,03	1-2	2	2	4,00	0,04	1-1	2
Total	8	13,80	1,84	1-95	107	11	22,00	0,26	1-2	13

3.8.2.2.- Comparación de Prevalencias: Test de χ^2

A continuación se muestran las tablas de contingencia (agrupadas en la tabla 3.79) derivadas de la comparación de las prevalencias de *Anisakis*.

Tabla 3.79.- Comparación de prevalencias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, por procedencia y por estación de captura para el total de muestra analizada de **estornino**.

Microhábitat parasitación	VÍSCERAS			MUSCULATURA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	90	18	108	105	3	108	10,338	0,0009

Procedencia	ATLÁNTICO			MEDITERRÁNEO			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	59	14	73	30	5	35	0,126	0,600

Estación	OTOÑO			PRIMAVERA			χ^2	P
	0	1	TOTAL	0	1	TOTAL		
TOTAL	50	8	58	39	11	50	0,746	0,316

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas únicamente en el microhábitat de parasitación (mayor en vísceras). Las prevalencias en el Atlántico fueron superiores a las del Mediterráneo pero sin diferencias significativas entre ambas. Las diferencias por estación de captura, aunque fueron mayores en primavera, tampoco resultaron ser significativas.

3.8.2.3.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las prevalencias: Regresión Logística Binaria

En la tabla 3.80 se muestran los resultados estadísticamente significativos ($P < 0,05$) obtenidos mediante esta prueba.

Tabla 3.80.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre la prevalencia de *Anisakis*, para el total de la muestra de **estornino** así como para cada procedencia y estación de captura.

V. dependiente: Nº Hospedadores parasitados por <i>Anisakis</i>	Variables independientes	χ^2	P<0,05	Variables incluidas
TOTAL	procedencia			
ESTORNINO (N=19)	estación, peso, longitud	-	-	-
ATLÁNTICO (N=14)	estación,	4,636	0,031	ESTACIÓN
MEDITERRÁNEO (N=5)	longitud, peso	-	-	-
OTOÑO (N=8)	procedencia,	-	-	-
PRIMAVERA (N=11)	longitud, peso	3,792	0,050	PROCEDENCIA

Ningún factor influyó significativamente en las prevalencias para la muestra total de estornino, probablemente debido al bajo número de hospedadores parasitados. Sin embargo, en la

muestra del Atlántico sí que influyó la estación mientras que en la de primavera fue la procedencia.

Teniendo en cuenta solamente a los hospedadores parasitados y añadiendo el factor días pescado, ninguno de ellos mostró influencia en las prevalencias obtenidas en músculo, probablemente debido al bajo número de hospedadores parasitados en este microhábitat (solo 3).

3.8.2.4.- Comparación de abundancias

Test de Mann-Whitney

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.81.

Tabla 3.81.- Comparación de abundancias de *Anisakis* para muestras no relacionadas, según clases longitud, peso, estación y procedencia, para el total de la muestra de **estornino**.

TOTAL ESTORNINO Abundancia media=1,11	U	Z	P
ATLÁNTICO MEDITERRÁNEO	1210,5	-0,664	0,506
OTOÑO PRIMAVERA	1342,5	-1,001	0,317
CLASE LONGITUD <30 cm CLASE LONGITUD ≥30 cm	1337,0	-0,082	0,935
CLASE PESO ≤200 g CLASE PESO >200 g	1410,5	-0,326	0,744

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso, ya que las abundancias entre los grupos

comparados para cada una de las variables estudiadas (tanto estación y procedencia como clases longitud y peso) fueron bajas.

Test de Wilcoxon

En la tabla 3.82 se resumen los resultados obtenidos mediante esta prueba.

Tabla 3.82.- Comparación de abundancias de *Anisakis* por microhábitat de parasitación, para el total de la muestra de **estornino** así como para cada procedencia y estación de captura.

MUESTRA	Z	P
TOTAL ESTORNINO	-3,596	<0,0001
ATLÁNTICO	-3,438	<0,0001
MEDITERRÁNEO	-1,000	0,317
OTOÑO	-2,585	0,010
PRIMAVERA	-2,496	0,013

Los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas a favor del microhábitat de parasitación vísceras en todas las muestras excepto en la del Mediterráneo.

3.8.2.5.- Influencia de los factores intrínsecos y extrínsecos sobre las abundancias

Rho de Spearman

En ningún caso, el peso y la longitud mostraron influencia en las abundancias, ni en la muestra total ni analizando cada procedencia y estación de captura por separado, debido probablemente a que la abundancia detectada en este hospedador, tanto en los de mayor longitud y peso como en los ejemplares más pequeños, fue únicamente de una larva.

ANOVA

Ninguno de los factores mostró influencia en las abundancias de *Anisakis* totales mediante esta prueba, debido a la baja abundancia obtenida en este hospedador.

Por tanto, en la muestra de estornino, ningún factor (ni intrínseco ni extrínseco) influyó en las abundancias ya que en los ejemplares parasitados solo se detectó, excepto en tres, una larva.

3.8.3.- DISCUSIÓN

Los estudios realizados en estornino son numerosos en Japón, debido a que es una especie de elevado valor comercial y al hábito de consumirlo crudo. Además, las prevalencias e intensidades son elevadas, hecho que puede significar un grave problema en Salud Pública. En España, el estornino suele confundirse con la caballa ya que su apariencia es muy similar. Sin embargo, es importante que el consumidor sepa diferenciarlos ya que los resultados helmintológicos obtenidos en este estudio varían considerablemente entre ambas especies de pescado.

Especies halladas y prevalencias

En la muestra de estornino únicamente se identificaron larvas del género *Anisakis*, con prevalencias bajas (17,60%). Otros autores obtuvieron valores muy superiores, observando además la presencia de otros géneros (aunque se debe tener en cuenta que la procedencia era distinta). Así, [CREMONTE & SARDELLA \(1997\)](#) reportaron en Argentina una prevalencia de anisákidos en estornino del 36,00-87,00%, identificando larvas de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium* y *Contracaecum*. Sin embargo, el estudio realizado por [SUZUKI et al. \(2010\)](#) en la costa pacífica de Japón y Mar de China, mostró unas prevalencias del 74,30% de L₃ de *Anisakis* tipo I.

La comparación de prevalencias mostró la existencia de diferencias significativas únicamente en el microhábitat de parasitación, siendo mayores en vísceras, no obteniéndose

diferencias significativas para el resto de factores analizados, aunque las prevalencias fueron superiores en el Atlántico y en primavera; así como tampoco ningún factor mostró influencia en las prevalencias.

En el análisis molecular de las L₃ de procedencia atlántica analizadas se identificó mayoritariamente el genotipo híbrido pero también *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii* (todas aisladas de vísceras); mientras que las tres larvas analizadas de procedencia mediterránea se identificaron como genotipo híbrido. Por tanto, mientras que en el Mediterráneo solo se identificó el genotipo híbrido, en la procedencia atlántica estuvieron también presentes las otras dos especies. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores en el Atlántico pero no en el Mediterráneo, donde es más frecuente la presencia de *A. pegreffii* (FARJALLAH et al., 2008; TEDDE et al., 2011; CHALIGIANNIS et al., 2012). Estas diferencias podrían ser debidas al bajo número de larvas analizadas en este trabajo.

Influencia de la procedencia

La comparación de prevalencias y abundancias no dio resultados estadísticamente significativos en cuanto a procedencia aunque ambas fueron superiores en el Atlántico, así como tampoco ningún factor, ni intrínseco ni extrínseco mostró influencia en ninguna de ellas. Ya se ha comentado en otras especies analizadas en este estudio la mayor presencia en el Atlántico y las posibles causas, aunque hay trabajos realizados recientemente en el Mediterráneo en los cuales se

reportan altas prevalencias en esta procedencia (FARJALLAH et al., 2008; TEDDE et al., 2011; CHALIGIANNIS et al., 2012).

Influencia de la estación de captura

Aunque las prevalencias fueron mayores en primavera, las abundancias fueron superiores en otoño, pero los resultados no resultaron ser estadísticamente significativos. Diversos estudios (comentados anteriormente en otras especies analizadas) mencionan mayores abundancias en primavera y sus posibles causas. En nuestro trabajo cabe destacar que, aunque las abundancias fueron mayores en otoño, al igual que lo observado en caballa, las prevalencias obtenidas en estornino fueron mayores en primavera, aunque sin diferencias significativas, mientras que en caballa fueron mayores en otoño.

Otros autores (COSTA et al., 2003) tampoco observaron variaciones estacionales de las abundancias en esta especie hospedadora.

Influencia de la longitud y el peso

Ninguno de los dos factores mostró influencia ni en las prevalencias ni en las abundancias. Estos datos contrastan con los obtenidos en caballa, donde el peso es un factor importante influyendo en ambas variables. Estas diferencias podrían ser debidas a las bajas prevalencias y abundancias observadas en estornino. Otros autores (COSTA et al., 2003) observaron

relación entre la longitud y las prevalencias (sin diferencias estadísticamente significativas) y con las abundancias (en este caso las diferencias fueron significativas).

Microhábitat de parasitación y migración "post mortem"

Únicamente se obtuvieron diferencias con significancia estadística en cuanto a mayores prevalencias y abundancias en vísceras que en musculatura, siendo la prevalencia baja en esta última (2,80% de los hospedadores analizados), con una abundancia media de 0,04 y un rango de 1-2 en la muestra total, siendo ambas, prevalencias y abundancias, superiores en la muestra del Mediterráneo y en la de primavera. Sin embargo, aunque los rangos fueran bajos, no hay que olvidar el hecho de que una única larva presente en la parte comestible del pescado es suficiente para causar anisakiosis.

Se obtuvieron diferencias con significancia estadística únicamente en microhábitat de parasitación, tanto en las prevalencias como en las abundancias obtenidas, con baja presencia en musculatura. Ningún otro factor, ni procedencia, ni estación, ni tamaño influyeron en ningún caso. Así como tampoco los días transcurridos.

A la vista de los resultados, puede postularse que las especies del género de *Anisakis* han sido las únicas presentes en estornino, pero con menores prevalencias y abundancias que en caballa, por lo tanto, con menor riesgo. Dentro de este género, el genotipo híbrido ha sido el más frecuente y el único hallado en los ejemplares de procedencia mediterránea.

SÍNTESIS DE RESULTADOS

Tabla 4.1.- Cuadro resumen con las prevalencias obtenidas para cada especie hospedadora, tanto de anisákidos totales como para cada uno de los géneros identificados en cada una de las muestras analizadas; totales y para cada procedencia y estación de captura por separado.

ESPECIE	PREVALENCIAS	PREVALENCIAS	PREVALENCIAS	PREVALENCIAS	PREVALENCIAS	A DESTACAR
	TOTALES Anisákidos (<i>Anisakis/Hyst.</i>)	ATLÁNTICO Anisákidos (<i>Anisakis/Hyst.</i>)	MEDITERRÁNEO Anisákidos (<i>Anisakis/Hyst.</i>)	OTOÑO Anisákidos (<i>Anisakis/Hyst.</i>)	PRIMAVERA Anisákidos (<i>Anisakis/Hyst.</i>)	
Bacaladilla (N=284)	55,60% (53,90%/12,00%)	78,10% (77,50%/12,40%)	22,60% (19,10%/11,30%)	48,50% (47,80%/0,70%)	62,00% (59,30%/22,00%)	↑ % <i>Anisakis</i>
Pescadilla europea (N=200)	45,50% (45,00%/1,00%)	84,00% (84,00%/1,00%)	7,00% (6,00%/1,00%)	7,50% (7,50%/0,00%)	55,00% (54,40%/0,20%)	↑ % <i>Anisakis</i> <i>Anisakis</i> Tipo II
Pescadilla americana (N=116)	59,50% (59,50%/3,40%*)	59,50% (59,50%/3,40%*)		64,30% (64,30%/0,00%*)	55,00% (55,00%/6,70%*)	↑ % <i>Anisakis</i> * <i>Contraecaecum</i>
Salmonete (N=155)	27,70% (3,20%/25,20%)		27,70% (3,20%/25,20%)	17,30% (5,30%/13,30%)	37,50% (1,20%/36,30%)	% <i>Hysterothlacium</i> >>> % <i>Anisakis</i>
Boquerón (N=209)	32,10% (17,20%/22,00%)	34,90% (21,10%/25,70%)	29,00% (13,00%/18,00%)	22,00% (8,30%/13,80%)	43,00% (27,00%/31,00%)	% <i>Hysterothylacium</i> > % <i>Anisakis</i>
Sardina (N=201)	15,90% (2,50%/13,40%)	8,00% (2,00%/6,00%)	23,20% (2,40%/20,80%)	12,00% (4,00%/8,00%)	19,80% (1,00%/18,80%)	% <i>Hysterothylacium</i> >> % <i>Anisakis</i>
Caballa (N=169)	45,60% (45,60%/3,00%)	62,50% (62,50%/6,30%)	30,30% (30,30%/0,00%)	62,10% (62,10%/0,00%)	24,30% (24,30%/6,80%)	∅ <i>Hysterothylacium</i> en Mediterráneo
Estornino (N=108)	17,60% (17,60%/0,00%)	19,20% (19,20%/0,00%)	14,30% (14,30%/0,00%)	13,80% (13,80%/0,00%)	22,00% (22,00%/0,00%)	solo <i>Anisakis</i>

Síntesis de Resultados

Tabla 4.2.- Cuadro resumen con las prevalencias de *Anisakis* obtenidas para cada especie hospedadora y por microhábitat de parasitación, en cada una de las muestras analizadas; totales y para cada procedencia y estación de captura por separado.

ESPECIE	PREVALENCIAS TOTALES <i>Anisakis</i> (vísceras/musculo)	PREVALENCIAS ATLÁNTICO <i>Anisakis</i> (vísceras/musculo)	PREVALENCIAS MEDITERRÁNEO <i>Anisakis</i> (vísceras/musculo)	PREVALENCIAS OTOÑO <i>Anisakis</i> (vísceras/musculo)	PREVALENCIAS PRIMAVERA <i>Anisakis</i> (vísceras/musculo)	A DESTACAR
Bacaladilla (N=284)	53,90% (49,60%/26,20%)	77,50% (73,40%/38,50%)	19,10% (14,40%/7,80%)	47,80% (44,80%/23,10%)	59,30% (54,00%/28,70%)	↑ % en músculo
Pescadilla europea (N=200)	45,00% (35,00%/29,50%)	84,00% (65,00%/57,00%)	6,00% (5,00%/2,00%)	7,50% (7,50%/2,50%)	54,40% (41,90%/36,30%)	↑ % en músculo (>> Atl.)
Pescadilla americana (N=116)	59,50% (46,60%/28,40%)	59,50% (46,60%/28,40%)		64,30% (53,60%/25,00%)	55,00% (40,00%/31,70%)	↑ % en músculo
Salmonete (N=155)	3,20% (3,20%/0,00%)		3,20% (3,20%/0,00%)	5,30% (5,30%/0,00%)	1,20% (1,20%/0,00%)	0% en músculo
Boquerón (N=209)	17,20% (13,40%/5,70%)	21,10% (19,30%/4,60%)	13,00% (7,00%/7,00%)	8,30% (5,50%/3,70%)	27,00% (22,00%/8,00%)	↓ % en músculo
Sardina (N=201)	2,50% (1,00%/2,00%)	2,00% (1,00%/1,00%)	2,40% (1,00%/3,00%)	4,00% (2,00%/3,00%)	1,00% (0,00%/1,00%)	%músculo > víscera
Caballa (N=169)	45,60% (43,80%/21,90%)	62,50% (58,80%/30,00%)	30,30% (30,30%/14,60%)	62,10% (58,90%/24,80%)	24,30% (24,30%/13,50%)	↑ % en músculo
Estornino (N=108)	17,60% (16,70%/2,80%)	19,20% (19,20%/1,40%)	14,30% (11,40%/5,70%)	13,80% (13,80%/1,70%)	22,00% (20,00%/4,00%)	↓ % en músculo

Tabla 4.3.- Cuadro resumen con las abundancias obtenidas para cada especie hospedadora, tanto de anisákidos totales como para cada uno de los géneros identificados en cada una de las muestras analizadas; totales y para cada procedencia y estación de captura por separado.

ESPECIE	ABUNDANCIAS	ABUNDANCIAS	ABUNDANCIAS	ABUNDANCIAS	ABUNDANCIAS	A DESTACAR
	TOTALES	ATLÁNTICO	MEDITERRÁNEO	OTOÑO	PRIMAVERA	
	Anisákidos (<i>Anisakis/Hyst.</i>)	Anisákidos (<i>Anisakis/Hyst.</i>)	Anisákidos (<i>Anisakis/Hyst.</i>)	Anisákidos (<i>Anisakis/Hyst.</i>)	Anisákidos (<i>Anisakis/Hyst.</i>)	
Bacaladilla (N=284)	4,51 (3,87/0,64)	5,17 (4,83/0,34)	3,54 (2,45/1,09)	4,36 (4,35/0,10)	4,65 (3,43/1,21)	↓ abundancia <i>Hysterothylacium</i>
Pescadilla europea (N=200)	10,22 (10,21/0,01)	20,35 (20,34/0,01)	0,09 (0,08/0,01)	0,10 (0,10/0,00)	12,75 (12,74/0,01*)	↑ abundancia en Atlántico
Pescadilla americana (N=116)	1,46 (1,42/0,003)	1,46 (1,42/0,003)		1,75 (1,75/0,00)	1,18 (1,12/0,07)	↓ abundancia * <i>Contraecaecum</i>
Salmonete (N=155)	0,63 (0,05/0,58)		0,63 (0,05/0,58)	0,65 (0,08/0,57)	0,60 (0,01/0,59)	<i>Hysterothylacium</i> > <i>Anisakis</i>
Boquerón (N=209)	2,51 (0,34/2,17)	3,95 (0,52/3,43)	0,94 (0,14/0,80)	1,07 (0,20/0,87)	4,08 (0,49/3,59)	<i>Hysterothylacium</i> >>> <i>Anisakis</i>
Sardina (N=201)	0,99 (0,04/0,95)	0,52 (0,02/0,50)	1,46 (0,07/1,39)	0,99 (0,08/0,91)	0,99 (0,01/0,98)	<i>Hysterothylacium</i> >> <i>Anisakis</i>
Caballa (N=169)	4,78 (4,72/0,06)	6,50 (6,38/0,13)	3,24 (3,24/0,00)	7,02 (7,02/0,00)	1,91 (1,77/0,14)	↑ abundancia en Atlántico
Estornino (N=108)	1,11 (1,11/0,00)	1,56 (1,56/0,00)	0,17 (0,17/0,00)	1,84 (1,84/0,00)	0,26 (0,26/0,00)	solo <i>Anisakis</i>

Síntesis de Resultados

Tabla 4.4.- Cuadro resumen con las abundancias de *Anisakis* obtenidas para cada especie hospedadora y por microhábitat de parasitación, en cada una de las muestras analizadas; totales y para cada procedencia y estación de captura por separado.

ESPECIE	ABUNDANCIAS TOTALES <i>Anisakis</i> (vísceras/musculo)	ABUNDANCIAS ATLÁNTICO <i>Anisakis</i> (vísceras/musculo)	ABUNDANCIAS MEDITERRÁNEO <i>Anisakis</i> (vísceras/musculo)	ABUNDANCIAS OTOÑO <i>Anisakis</i> (vísceras/musculo)	ABUNDANCIAS PRIMAVERA <i>Anisakis</i> (vísceras/musculo)	A DESTACAR
Bacaladilla (N=284)	3,87 (3,15/0,72)	4,83 (4,02/0,81)	2,45 (1,87/0,58)	4,35 (3,75/0,60)	3,43 (2,61/0,82)	↑ abundancia Atlántico
Pescadilla europea (N=200)	10,21 (3,71/6,50)	20,34 (7,36/12,98)	0,08 (0,06/0,02)	0,10 (0,08/0,03)	12,74 (4,62/8,12)	músculo>>> vísceras
Pescadilla americana (N=116)	1,42 (1,02/0,41)	1,42 (1,02/0,41)		1,75 (1,30/0,45)	1,12 (0,75/0,37)	↓ abundancias
Salmonete (N=155)	0,05 (0,05/0,00)		0,05 (0,05/0,00)	0,08 (0,08/0,00)	0,01 (0,01/0,00)	∅ en músculo
Boquerón (N=209)	0,34 (0,27/0,07)	0,52 (0,46/0,06)	0,14 (0,07/0,07)	0,20 (0,17/0,04)	0,49 (0,39/0,10)	↓ abundancias
Sardina (N=201)	0,04 (0,02/0,02)	0,02 (0,01/0,01)	0,07 (0,04/0,03)	0,08 (0,05/0,03)	0,01 (0,00/0,01)	↓↓ abundancias
Caballa (N=169)	4,72 (3,56/1,16)	6,38 (5,19/1,19)	3,24 (2,10/1,13)	7,02 (5,12/1,91)	1,77 (1,57/0,20)	↑ abundancia Atlántico
Estornino (N=108)	1,11 (1,07/0,04)	1,56 (1,53/0,03)	0,17 (0,11/0,06)	1,84 (1,81/0,03)	0,26 (0,22/0,04)	↓ abundancia en músculo

DISCUSIÓN GENERAL

5.- DISCUSIÓN GENERAL

Los anisákidos son parásitos eurixenos en cuanto al hospedador intermediario ya que muestran poca especificidad y se han hallado en un gran número de peces de diferentes especies e incluso en cefalópodos (ABOLLO et al., 2001). En los últimos 30 años la anisakidosis humana se ha convertido en un problema de Salud Pública cuya incidencia ha ido aumentando en todo el mundo. La prevalencia en España también ha aumentado a lo largo de las últimas décadas, como demuestran diversos estudios, entre ellos los del Centro Nacional de Epidemiología (CNE) y los del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN). Este aumento se debe principalmente a una mejora en técnicas diagnósticas, destacando la endoscopia, a un aumento en la demanda de productos pesqueros, y a los cambios culturales en la alimentación, como el incremento del consumo de alimentos crudos o ligeramente cocinados. Además, su importancia no radica solamente en el hecho de ser un problema en Salud Pública, también hay que tener en cuenta que la presencia de anisákidos en pescado de consumo disminuye su valor comercial (las especies más parasitadas son las de menor precio). Así mismo, las altas prevalencias constituyen un peligro también en piscifactorías si los peces de cultivo son alimentados con vísceras contaminadas y no tratadas (CORDERO DEL CAMPILLO et al., 1999).

Todos estos problemas han motivado que en el presente trabajo se analicen los riesgos de transmisión de esta zoonosis por el consumo de ocho especies de pescado de alto valor comercial en España: bacaladilla, pescadilla europea, pescadilla americana, salmonete, boquerón, sardina, caballa y estornino.

Anisakis, *Hysterothylacium* y *Contracaecum* fueron los géneros de anisákidos identificados morfológicamente. Las larvas de *Anisakis* estaban presentes en todas las especies hospedadoras analizadas, en ambas procedencias, estaciones y microhábitats (excepto en salmonete, que no presentó larvas de este género en musculatura). El morfotipo I fue el mayoritario, apareciendo escasos ejemplares de *Anisakis* Tipo II, únicamente en pescadilla europea del Mediterráneo capturada en primavera y presente tanto en vísceras como en musculatura. *Hysterothylacium* apareció en todas las especies de pescado analizadas excepto en pescadilla americana y estornino, siendo su presencia mayoritaria en primavera en todos los casos.

El zooplacton de capas superiores está menos parasitado por *Anisakis* que los de aguas más profundas (OSANZ MUR, 2001), por tanto, las tasas de infección de peces pelágicos por este nematodo serían más bajas. Esto concuerda con los datos obtenidos en este estudio, en el cual las menores prevalencias de parasitación por *Anisakis* se han obtenido en especies pelágicas (sardina y boquerón). En el resto de las muestras analizadas la presencia de *Anisakis* fue mayor a la de *Hysterothylacium*. Se suma a este hecho que *Anisakis* fue además el único que continuó viable tras la digestión artificial de la musculatura, por tanto el de mayor riesgo para el consumidor.

Los escasos ejemplares de *Contracaecum* aislados se obtuvieron de pescadilla americana, que, tal como se comentó en su apartado, fue la única especie analizada procedente de la zona noroeste del Atlántico. Por tanto, se puede concluir que este género no está presente en los pescados capturados en nuestras costas, ni en la atlántica ni en la mediterránea; aunque su presencia haya sido reportada anteriormente por

otros autores (OSANZ MUR, 2001). En este hecho se debe considerar que, al igual que en este estudio, la identificación estuvo basada únicamente en las características morfológicas, ya que en ningún caso se realizó una identificación genética posterior, siendo la principal diferencia de este género con *Hysterothylacium* la posición del poro excretor, difícilmente visible incluso al microscopio.

Aunque recientemente se han realizado numerosos estudios de diferente complejidad en aguas europeas (CHORD-AUGER, 1995; ABOLLO et al., 2001; COSTA et al., 2003, 2009; PETRIE, & WOOTEN, 2009; RELLO et al., 2009), en la actualidad, únicamente en Noruega hay un Sistema de Vigilancia disponible para larvas de *Anisakis* diseñado para revelar las tendencias espaciales y temporales en su presencia y el patrón de migración de sus hospedadores, debido a la amplia gama de hospedadores y los costes necesarios para realizar el seguimiento, siendo solo viable para un número restringido de especies. El programa se lleva a cabo por el National Institute of Nutrition and Seafood Research (NIFES; www.nifes.no) y los datos allí recogidos son de fácil acceso para la Norwegian Food Safety Authority (NFSA; www.mattilsynet.no).

Las especies de *Anisakis* identificadas a nivel molecular en las 182 muestras analizadas fueron *A. simplex* (s.s.) (63,19%), *A. pegreffii* (6,04%) y un genotipo híbrido entre ambas (30,77%). Según algunos autores, *A. simplex* (s.l.) suele aparecer con mayor frecuencia en peces bentónicos o demersales, como la bacaladilla o la pescadilla, mientras que *A. pegreffii* se encuentra con mayor frecuencia en especies pelágicas, como la sardina o el boquerón (PAGGI et al., 1991; ANDERSON, 1992; MATTIUCCI et al., 1997; ABOLLO et al., 2001), aunque estas

diferencias parecen estar más relacionadas con la distribución geográfica y los hábitos alimenticios de los hospedadores que con las preferencias por hospedador de los parásitos. Esta última teoría concuerda más con los datos obtenidos en el presente estudio, ya que, analizando estos dos factores en una única especie, por ejemplo el boquerón, se puede observar que la mayor presencia de *A. simplex* (s.s) se da en ejemplares de procedencia atlántica mientras que los híbridos y *A. pegreffii* son más frecuentes en el Mediterráneo. Este mismo hecho también se da en especies demersales como bacaladilla, pescadilla europea y pescadilla americana donde en los ejemplares de procedencia atlántica la presencia de *A. simplex* (s.s) también es mayoritaria.

En cuanto a las distintas especies de anisákidos en función de los hospedadores analizados cabe comentar que en estornino el genotipo híbrido fue el predominante en ambas procedencias y el único que se identificó en las larvas analizadas del Mediterráneo.

La procedencia mostró gran importancia, no solo por las mayores prevalencias de *Anisakis* en el Atlántico con respecto al Mediterráneo, sino también en cuanto a especies mayoritarias en cada una de ellas, siendo *A. simplex* (s.s.) la mayoritaria en la procedencia atlántica (67,86%) mientras que en el Mediterráneo predominaron el genotipo híbrido y *A. pegreffii* (53,14% y 35,71%; respectivamente).

Ambas especies anisákidas comparten los mismos hospedadores definitivos en diferentes áreas geográficas e involucran en sus ciclos de vida a una gran variedad de peces pelágicos y demersales (MATTIUCCI & NASCETTI, 2008). En la costa atlántica de España, las dos especies gemelas se han

hallado en simpatria en un mismo hospedador definitivo, el calderón (*Globicephala melas*). *A. pegreffii* se ha aislado de delfines (*Stenella coeruleoalba*) en el Mediterráneo mientras que *A. simplex* (s.s.) estaba presente en ballena enana (*Balaenoptera acutorostrata*) de aguas del noreste Atlántico, pero en ninguna de las tres especies hospedadoras mencionadas se identificó el genotipo híbrido. Por tanto, se constata la existencia de especificidad por hospedador de ambos por delfines oceánicos y ballenas (MATTIUCCI & NASCETTI, 2008; CAVALLERO et al., 2011; MATTIUCCI et al., 2014). La cuenca del Mediterráneo tiene una población mixta de especies de *Anisakis* debido a la conexión con el Atlántico a través del Estrecho de Gibraltar, que es un punto de encuentro importante de diferentes áreas ecológicas y una ruta migratoria de muchas especies de peces y mamíferos marinos (CAVALLERO et al., 2012). Así, el genotipo híbrido se ha identificado, además de en Japón (UMEHARA et al., 2006), en aguas de la península ibérica, Túnez y Cerdeña (ABOLLO et al., 2003; FARJALLAH et al., 2008; MELONI et al., 2011).

Al comparar únicamente las muestras de procedencia mediterránea (de las especies analizadas) se observaron mayores prevalencias y abundancias de *Hysterothylacium* respecto a *Anisakis* en las especies de menor tamaño y costeras (salmonete, sardina y boquerón) mientras que en pescadilla y bacaladilla fueron predominantes las especies del género *Anisakis*. Además, no se aisló ninguna larva de *Hysterothylacium* ni en caballa ni en estornino de dicha procedencia.

La estación no fue un factor determinante, en general, en cuanto a la presencia de especies del género *Anisakis*. Únicamente las escasas larvas del morfotipo II aisladas de

pescadilla europea del Mediterráneo se detectaron solo en primavera. Sin embargo, *Hysterothylacium* mostró una marcada relación con la estación, siendo su presencia mayor en primavera en todos los casos. Los pocos ejemplares de *Contraecum* en pescadilla americana solamente se detectaron en primavera.

El tamaño fue un factor importante en cuanto a las abundancias de *Anisakis*, ya que estas fueron mayores en los ejemplares de mayor peso y longitud en general, siendo esta relación más evidente en la muestra de caballas en particular.

Algunos autores postulan que las especies grasas, y el pescado azul en general, muestran menores prevalencias de parasitación pero una mayor migración al músculo, mientras que en bacaladilla y en el pescado no graso, las prevalencias son mayores pero la migración es menor y preferentemente al hígado (SMITH, 1984; CORDERO DEL CAMPILLO et al., 1999). Sin embargo, en este trabajo, aunque la parasitación en musculatura de caballa ha sido elevada, cabe destacar la elevada presencia de larvas en musculatura de algunas especies de pescado blanco, como la bacaladilla y la pescadilla americana, pero especialmente de la pescadilla europea de procedencia atlántica, por sus mayores abundancias en este microhábitat, siendo esta especie hospedadora, por tanto, la que mayor riesgo de parasitación humana presentó del total de las analizadas.

En cuanto a las especies de *Anisakis* presentes en musculatura, la mayor migración la presentó *A. simplex* (s.s) tanto en la muestra total (69,49%; 41/59 L₃ identificadas de este microhábitat) como en la del Atlántico (78,43%; 40/51 L₃ analizadas en musculatura de esta procedencia), mientras que

de las 8 larvas analizadas de procedencia mediterránea en musculatura, 4 de ellas pertenecían al genotipo híbrido (50,00%), 3 L₃ de *A. pegreffii* (37,50%) y solamente una se identificó como *A. simplex* (s.s.) (12,50%) en esta procedencia.

Los días transcurridos entre la pesca y el análisis (hipotética fecha de consumo) influyeron en la presencia de larvas en musculatura, aunque no en todas las especies hospedadoras analizadas, siendo este factor más importante en bacaladilla y pescadilla europea y siendo *A. simplex* (s.s) la especie mayoritaria en este microhábitat.

Como se puede observar a la vista de estos datos y los reportados en la discusión por especies, los estudios más recientes son los que obtienen mayores prevalencias. Esto puede ser debido a diversos factores, el más importante a la hora de valorar el riesgo sería la evisceración en el propio barco de algunas especies de pescado y desecho de sus vísceras contaminadas y no tratadas al mar, que se convertirían en alimento de otros pescados e implicaría un mayor número de parásitos, derivando todo ello en un aumento de las prevalencias. Por tanto, el tratamiento de las vísceras antes de arrojarlas al mar es un paso previo muy importante si se quiere disminuir dicha transmisión.

Cabe mencionar que es importante observar los datos mostrados en la etiqueta del producto, en el cual aparecen la procedencia, fecha de captura y especie, principalmente, y que es obligatorio tener a la vista del consumidor. Aunque se debe comentar en este sentido que no todos los establecimientos cumplen con esta normativa y en algunos casos nos podemos encontrar que, o no se muestra esta información, o no se han

actualizado los datos a la recepción de nuevo género, siendo las etiquetas mostradas de fechas anteriores, pudiendo ser por tanto de una procedencia diferente a la indicada.

Como medidas de prevención, excepto en algunos casos de alergias, no es necesario suprimir el pescado de la dieta, solo tomar las medidas adecuadas en cuanto a su preparación para el consumo de cada especie; consumir preferiblemente la musculatura epiaxial, al estar esta menos parasitada, seleccionando y consumiendo los pescados más frescos, de menor tamaño; y seleccionar preferentemente el pescado de procedencia mediterránea. Es importante congelar el pescado también en el ámbito doméstico al menos 24-48 h antes de su consumo (sobre todo los boquerones preparados crudos en vinagre) y/o cocinarlo a una Tª que alcanzara los 60°C en toda la pieza. En cuanto a la presencia de anisákidos de otros géneros, también se deben tener en cuenta como posibles causantes de alergias, de contaminación bacteriana de la parte comestible del pescado y como parásitos deteriorantes de los alimentos, produciendo el rechazo del pescado por parte del consumidor, por la presencia de nematodos anisákidos, aunque en este caso se trate de larvas con una casi nula capacidad infestante para la especie humana.

Todos estos factores deberían ser considerados adicionalmente por las autoridades sanitarias en las campañas de prevención, como determinantes en la valoración del riesgo de anisakidosis humana por consumo de pescado fresco en el ámbito doméstico, así como de anisakidosis alérgica y/o sensibilización de la población.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

Conforme a los resultados obtenidos en este trabajo y teniendo en cuenta los argumentos presentados en la discusión, a continuación se exponen las principales conclusiones a las que se ha llegado.

PRIMERA

Los anisákidos presentes en las especies de pescado de mayor consumo en nuestro país pertenecen a los géneros *Anisakis* e *Hysterothylacium*, excepto en pescadilla americana, que son *Anisakis* y *Contraecum*.

SEGUNDA

El morfotipo I de *Anisakis* es el mayoritario. Únicamente en pescadilla del Mediterráneo capturada en primavera se detectó alguna larva del tipo II.

TERCERA

Las especies de *Anisakis* identificadas han sido *A. simplex* (s.s), *A. pegreffii* y el genotipo híbrido entre ambas, todas ellas presentes en las dos procedencias, siendo *A. simplex* (s.s) mayoritaria en el Atlántico mientras que en el Mediterráneo predominan *A. pegreffii* y el genotipo híbrido.

CUARTA

Las larvas de *Anisakis* han estado presentes en todas las especies hospedadoras, y en la mayoría de los casos asociadas a otros anisákidos, siendo sus prevalencias elevadas en pescadilla, tanto europea como americana, bacaladilla y

Conclusiones

caballa. Así pues, el riesgo de adquirir anisakidosis o de padecer reacciones alérgicas por consumo de pescado es elevado.

QUINTA

La procedencia es un factor importante en cuanto al riesgo de transmisión por diversos motivos: en todos los casos las prevalencias de *Anisakis* fueron mayores en el Atlántico, siendo la especie mayoritaria *A. simplex (s.s)*, la cual a su vez es la que presenta mayor migración a musculatura.

SEXTA

El tamaño también es un factor importante en la transmisión, ya que los ejemplares más grandes son, en general, los más parasitados.

SÉPTIMA

El riesgo de sufrir reacciones alérgicas por consumo de estas especies de pescado es mayor en primavera, ya que, aunque la estación no es un factor importante en cuanto a la presencia de *Anisakis* sí lo es para *Hysterothylacium* y *Contracaecum*, más frecuentes en primavera.

OCTAVA

La presencia de larvas en musculatura es elevada en pescadilla europea de origen atlántico, siendo *A. simplex (s.s)* la especie que, en general, presenta mayor migración y por tanto mayor riesgo para el consumidor. La sardina y el salmonete presentan bajas prevalencias de parasitación por *Anisakis*.

NOVENA

Las especies del género *Anisakis* siguen siendo viables tras la digestión artificial y los días transcurridos entre la pesca y el consumo aumentan el riesgo de adquirir anisakidosis, ya que favorece la migración de las larvas a la parte comestible del pescado, sobre todo en bacaladilla y en pescadilla, europea y americana.

DÉCIMA

Los géneros *Hysterothylacium* y *Contracaecum* presentan menor riesgo de transmisión de anisakidosis, ya que no son viables tras la digestión artificial, pero sus antígenos podrían estar implicados en las reacciones alérgicas producidas en algunas personas afectadas.

CONCLUSIÓN FINAL

Las especies de pescado que conllevan mayor riesgo de contraer anisakidosis a los consumidores en el ámbito doméstico son: la pescadilla, por la elevada presencia de larvas en musculatura; la bacaladilla, por las elevadas prevalencias obtenidas; y la caballa, sobre todo los ejemplares de mayor tamaño; todas ellas de origen atlántico.

En cuanto al boquerón, las prevalencias y abundancias en musculatura no son elevadas pero los hábitos de preparación, de esta especie en particular, son un factor de riesgo importante a tener en cuenta, ya que en el ámbito casero se consumen sin congelación previa y la preparación en vinagre no inactiva las larvas.

Conclusiones

Las especies que presentan menor riesgo son la sardina y sobre todo el salmonete de procedencia mediterránea, ya que ambas presentaron bajas prevalencias de *Anisakis*, siendo el salmonete el único hospedador que no presentó larvas de *Anisakis* en musculatura.

En adición a las recomendaciones de congelar el pescado a -20°C al menos durante 24 horas (en el caso de consumo de pescado crudo o poco cocinado), se proponen otras recomendaciones para evitar la anisakidosis, sobre todo a nivel del hogar (profilaxis individual), concienciando al consumidor de la importancia de la información que ofrece la etiqueta del producto, concretamente: la especie, el tamaño y la procedencia del pescado, la estación de captura a lo largo del año y los días transcurridos desde la pesca.

BIBLIOGRAFÍA

ABOLLO, E., GESTAL, C. and PASCUAL, S., 2001. *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitology Research*, **87**(6), pp. 492-499.

ABOLLO, E., PAGGI, L., PASCUAL, S. and D'AMELIO, S., 2003. Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infection, genetics and evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, **3**(3), pp. 175-181.

ACEBES REY, J.M., FERNÁNDEZ ORCAJO, P., DÍAZ GONZÁLEZ, G., VELICIA LLAMES, R., GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, J.M., and CITORES GONZÁLEZ, R., 1996. Dos casos de anisakiasis en el Hospital del Río Hortega (Valladolid). *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, **88**, pp. 59-60.

ADROHER, F.J., VALERO, A., RUIZ-VALERO, J. and IGLESIAS, L., 1996. Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). *Parasitology Research*, **82**(3), pp. 253-256.

AESAN (AGENCIA ESPAÑOLA DE SEGURIDAD ALIMENTARIA Y NUTRICIÓN), 2009. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre la incidencia de la eliminación del pescado o partes del mismo en relación con la reducción de la prevalencia de la anisakiosis humana. *Revista del Comité Científico*, **10**, pp. 19-25.

ALONSO-GÓMEZ, A., MORENO-ANCILLO, A., LÓPEZ-SERRANO, M.C., SUAREZ-DE-PARGA, J.M., DASCHNER, A., CABALLERO, M.T., BARRANCO, P. and CABANAS, R., 2004. *Anisakis simplex*

only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. *Parasitology Research*, **93**(5), pp. 378-384.

AMIN, O., EIDELMAN, W., DOMKE, W., BAILEY, J. and PFEIFER, G., 2000. An unusual case of anisakiasis in California, USA. *Comparative Parasitology*, **67**(1), pp. 71-75.

ANADON, A.M., ROMARIS, F., ESCALANTE, M., RODRIGUEZ, E., GARATE, T., CUÉLLAR, C. and UBEIRA, F.M., 2009. The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clinical and Experimental Immunology*, **156**(3), pp. 471-478.

ANDERSON, R.C., 1992. Subfamily Anisakinae. En: *Nematode Parasites of Vertebrates: their development and transmission*. 2nd edition (R.C. Anderson ed.). CAB International, Wallingford, pp. 256-270.

ANDERSON, R.C., 2000. *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*, CAB International, Wallingford, 672 pp.

ANDERSON, R.C., CHABAUD, A.G. and WILLMOTT, S., 2009. *Keys to the nematode parasites of vertebrates, Archival volume*, CAB International, Wallingford, 463 pp.

ANGELUCCI, G., MELONI, M., MERELLA, P., SARDU, F., MADEDDU, S., MARROSU, R., PETZA, F. and SALATI, F., 2011. Prevalence of *Anisakis* spp. and *Hysterothylacium* spp. larvae in teleosts and cephalopods sampled from waters off Sardinia. *Journal of Food Protection*, **74**(10), pp. 1769-1775.

AÑIBARRO, B., FONTELA, J.L. and DE LA HOZ, F., 1997. Occupational asthma induced by garlic dust. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **100**(6), pp. 734-738.

AÑIBARRO, B. and SEOANE, F.J., 1998. Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **102**(2), pp. 331-332.

AÑIBARRO, B., SEOANE, F.J. and MUGICA, M.V., 2007. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, **17**(3), pp. 168-172.

ARDUINO, P., NASCETTI, G., CIANCHI, R., PLÖTZ, J., MATTIUCCI, S., D'AMELIO, S., PAGGI, L., ORECCHIA, P., and BULLINI, L., 1995. Isozyme variation and taxonomic rank of *Contraecaecum radiatum* (v. Linstow, 1907) from the Antarctic Ocean (Nematoda, Ascaridoidea). *Systematic Parasitology*, **30**, pp. 1-9.

ARENAL VERA, J., MARCOS RODRÍGUEZ, J., BORREGO PINTADO, M., BOWAKIN DIB, W., CASTRO LORENZO, J. and BLANCO ÁLVAREZ, J., 1991. Anisakiasis como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico: primer caso en la literatura médica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, **79**(5), 355-358.

ARIZONO, N., YAMADA, M., TEGOSHI, T. and YOSHIKAWA, M., 2012. *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii*: biological characteristics and pathogenetic potential in human

Bibliografía

anisakiasis. *Foodborne Pathogens and Disease*, **9**(6), pp. 517-521.

ARMENTIA, A., LOMBARDERO, M., CALLEJO, A., MARTÍN SANTOS, J.M., GIL, F.J., VEGA, J., ARRANZ, M.L. and MARTÍNEZ, C., 1998. Occupational asthma by *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **102**(5), pp. 831-834.

ARMENTIA, A., MARTÍN-GIL, F., PASCUAL, C., MARTÍN-ESTEBAN, M., CALLEJO, A. and MARTÍNEZ, C., 2006. *Anisakis simplex* allergy after eating chicken meat. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, **16**(4), pp. 258.

ARRIAZA, B.T., REINHARD, K.J., ARAUJO, A.G., ORELLANA, N.C. and STANDEN, V.G., 2010. Possible influence of the ENSO phenomenon on the pathoecology of diphyllbothriasis and anisakiasis in ancient Chinchorro populations. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **105**(1), pp. 66-72.

ARTHUR, J.R., MARGOLIS, L., WHITAKER, D.J. and McDONALD, T.E., 1982. A quantitative study of economically important parasites of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) from British Columbian waters and effects of post-mortem handling on their abundance in the musculature. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **39**, pp. 710-726.

ASTURIAS, J.A., ERASO, E., MARTÍNEZ, A., 2000. Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **108** pp. 263-7.

AUDÍCANA, M.T., 2002. *Anisakis simplex* y alergia alimentaria. *Tesis Doctoral*. Universidad del País Vasco, España.

AUDÍCANA, M.T. and KENNEDY, M.W., 2008. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, **21**(2), pp. 360-379.

AUDÍCANA, M.T., FERNÁNDEZ DE CORRES, L., MUÑOZ, D., DEL POZO, M., FERNÁNDEZ, E., GARCÍA, M. and DÍEZ, J., 1995. *Anisakis simplex*: una nueva fuente de antígenos alimentarios. Estudio de sensibilización a otros parásitos del orden Ascaridoidae. *Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica*, **10**, pp. 325-331.

AUDÍCANA, M.T., GARCÍA, M., DEL POZO, M.D., MONEO, I., DÍEZ, J., MUÑOZ, D., FERNÁNDEZ, E., ECHENAGUSIA, M., FERNÁNDEZ DE CORRES, L., and ANSOTEGUI, I.J., 2000. Clinical manifestations of allergy to *Anisakis simplex*. *Allergy* **55**, pp. 28-33.

AUDÍCANA, M.T., ANSOTEGUI, I.J., DE CORRES, L.F. and KENNEDY, M.W., 2002. *Anisakis simplex*: dangerous--dead and alive? *Trends in Parasitology*, **18**(1), pp. 20-25.

BALBUENA, J.A., KARLSBAKK, E., SAKSVIK, M., KVENSETH, A.M. and NYLUND, A., 1998. New data on the early development of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda, Anisakidae). *Journal of Parasitology*, **84**(3), pp. 615-617.

BALBUENA, J.A., KARLSBAKK, E., KUENSETH, A.M., SAKSUIK, M., NYLUND, A., 2000. Growth and migration of third-stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae)

Bibliografía

in larval herring *Clupea harengus*. *Journal of Parasitology*, **86**, pp. 1271-1275.

BARROS, C., MANZARBEITIA, F., LÓPEZ-VÉLEZ, R. and OÑATE, J.M., 1992. Anisakiasis humana en España por consumo de sardinas crudas. *Alimentaria*, **28**, pp. 57-61.

BERLAND, B., 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, **2**(1), pp. 1-50.

BERLAND, B., 1964. *Phocascaris cystophorae* sp. nov. (Nematoda) from the hooded seal, with an emendation of the genus. *Arbok for Universitetet i Bergen, Mat.-naturv.*, **17**, pp. 1-21.

BERLAND, B., 1989. Identification of larval nematodes from fish. En: *Nematode problems in North Atlantic fish. Report from a workshop in Kiel, 3-4 April 1989* (H. Möller ed.), ICES CM/F **6**, pp. 16-22.

BERLAND, B., 1998. Biology of *Hysterothylacium* species. En: *Proceedings of the 9th International Congress of Parasitology, Makuhari Messe, Chiba, Japan, August 24-28* (I. Tada, S. Kojima & M. Tsuji ed.), Monduzzi Editore, Bologna, pp. 373-378.

BERLAND, B., 2006. *Musings on nematode parasites. Fisken og Havet. Report for Institute of Marine Research*, **11**, pp. 1-26.

BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO), 1993. Real Decreto 1437/1992, de 27 de noviembre, por el que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los

productos pesqueros y de la acuicultura. Boletín Oficial del Estado, **11**, pp. 808-820.

BOE (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO), 2006. Real Decreto 1420/2006, de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por Anisakis en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades. Boletín Oficial del Estado, **302**, pp. 44547-44549.

BOILY, F. and MARCOGLIESE, D.J., 1995. Geographical variations in abundance of larval anisakine nematodes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) from the Gulf of St. Lawrence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**(1), pp. 105-115.

BOUREE, P., PAUGAM, A. and PETITHORY, J.C., 1995. Anisakidosis: report of 25 cases and review of the literature. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **18**(2), pp. 75-84.

BROOKS, D.R. and HOBERG, E.P., 2007. How will global climate change affect parasite-host assemblages? *Trends in Parasitology*, **23**(12), pp. 571-574.

BRUCE, N. and CANNON, L., 1990. Ascaridoid nematodes from sharks from Australia and the Solomon Islands, southwestern Pacific Ocean. *Invertebrate Systematics*, **4**(4), pp. 763-783.

BULLINI, L., NASCETTI, G., PAGGI, L., ORECCHIA, P., MATTIUCCI, S., and BERLAND, B., 1986. Genetic variation of

Bibliografía

ascaridoid worms with different life cycles. *Evolution*, **40**, pp. 437-440.

BULLINI, L., ARDUINO, P., CIANCHI, R., NASCETTI, G., D'AMELIO, S., MATTIUCCI, S., PAGGI, L., and ORECCHIA, P., PLOTZ, J., SMITH, J. H., and BRATTEY, J., 1997. Genetic and ecological research on anisakid endoparasites of fish and marine mammals in the Antarctic and Arctic-Boreal regions. In "*Antarctic Communities: Species, Structure and Survival*" (B. Battaglia, J. Valencia, and D.W.H. Walton, ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 39-44.

BUSH, A.O., LAFFERTY, K.D., LOTZ, J.M. and SHOSTAK, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, **83**(4), pp. 575-583.

CABALLERO, M.L., UMPIERREZ, A., MONEO, I. and RODRIGUEZ-PÉREZ, R., 2011. Anis 10, a new *Anisakis simplex* allergen: cloning and heterologous expression. *Parasitology International*, **60**(2), pp. 209-212.

CABALLERO, M.L., ASERO, R., ANTONICELLI, L., KAMBERI, E., COLANGELO, C., FAZII, P., DE BURGOS, C. and RODRIGUEZ-PÉREZ, R., 2013. *Anisakis* allergy component-resolved diagnosis: clinical and immunologic differences between patients from Italy and Spain. *International Archives of Allergy and Immunology*, **162**(1), pp. 39-44.

CABRERA, R., 2010. Anisakiasis outbreak by *Anisakis simplex* larvae associated to Peruvian food in Spain. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, **102**(10), pp. 610-611.

CARRETERO ANÍBARRO, P., BLANCO CARMONA, J., GARCÍA GONZÁLEZ, F., MARCOS DURANTEZ, M., ALONSO GIL, L., GARCÉS SOTILLOS, M., PÉREZ GIMÉNEZ, R., JUSTE PICÓN, S. and GUTIERREZ ORTEGA, M.C., 1997. Protein contact dermatitis caused by *Anisakis simplex*. *Contact Dermatitis*, **37**(5), pp. 247.

CARRETERO, P., RIVAS, C., TODO, P., GÓMEZ, B., NUÑÉZ, C., ALDAYA, E.M.I. and MONEO, I., 1998. Anafilaxia tras la realización de prick test a *Anisakis simplex*. *Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica*, **13**, pp. 226-228.

CASTÁN, B., BORDA, F., IÑARRAIRAEGUI, M., PASTOR, G., VILA, J. and ZOZAYA, J.M., 2002. Digestive anisakiasis: clinical manifestations and diagnosis according to localization. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, **94**(8), pp. 463-472.

CATTAN, P. and CARVAJAL, J., 1984. A study of the migration of larval *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridida) in the Chilean hake, *Merluccius gayi* (Guichenot). *Journal of Fish Biology*, **24**(6), pp. 649-654.

CAVALLERO, S., NADLER, S.A., PAGGI, L., BARROS, N.B. and D'AMELIO, S., 2011. Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from southeastern Atlantic coasts of USA, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Parasitology Research*, **108**(4), pp. 781-792.

CAVALLERO, S., LIGAS, A., BRUSCHI, F. and D'AMELIO, S., 2012. Molecular identification of *Anisakis* spp. from fishes collected in the Tyrrhenian Sea (NW Mediterranean). *Veterinary Parasitology*, **187**(3), pp. 563-566.

Bibliografía

CEBALLOS-MENDIOLA, G., VALERO, A., POLO-VICO, R., TEJADA, M., ABATTOUY, N., KARL, H., DE LAS HERAS, C. and MARTÍN-SÁNCHEZ, J., 2010. Genetic variability of *Anisakis simplex* s.s. parasitizing European hake (*Merluccius merluccius*) in the Little Sole Bank area in the Northeast Atlantic. *Parasitology Research*, **107**(6), pp. 1399-1404.

CHAI, J.Y., DARWIN MURRELL, K. and LYMBERY, A.J., 2005. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *International Journal for Parasitology*, **35**(11-12), pp. 1233-1254.

CHALIGIANNIS, I., LALLE, M., POZIO, E. and SOTIRAKI, S., 2012. Anisakidae infection in fish of the Aegean Sea. *Veterinary Parasitology*, **184**(2), pp. 362-366.

CHAPPUIS, F. and LOUTAN, L., 2006. Helminthiases humaines transmises par les poissons. *Revue Médicale Suisse*, **2**(65), pp. 1245-1247.

CHENG, T., 1982. Anisakiasis. *CRC Handbook Series in Zoonoses, Section C: Parasitic Zoonoses*, **2**, pp. 37-54.

CHOI, S., LEE, S., SONG, H., RYU, J. and AHN, M., 2014. Parasitic infections based on 320 clinical samples submitted to Hanyang University, Korea (2004-2011). *Korean Journal of Parasitology*, **52**(2), pp. 215-220.

CHORD-AUGER, S., MIEGEVILLE, M. and PAPE, P.L., 1995. Anisakiasis in the Nantes region. From fishmonger stall to consulting room. *Parasite*, **2**, pp. 395-400.

CHOU, Y., WANG, C., CHEN, H., CHEN, H., CHEN, S. and SHIH, H., 2011. Parasitism between *Anisakis simplex* (Nematoda:

Anisakidae) third-stage larvae and the spotted mackerel *Scomber australasicus* with regard to the application of stock identification. *Veterinary Parasitology*, **177**(3), pp. 324-331.

CLAVEL, A., DELGADO, B., SÁNCHEZ-ACEDO, C., CARBONELL, E., CASTILLO, J., RAMIREZ, J., and KAGEI, N., 1993. A live *Anisakis physeteris* larva found in the abdominal cavity of a woman in Zaragoza, Spain. *Kiseichugaku Zasshi*, **42**(5), pp. 445-448.

COCHETON, J., CABOU, I. and LECOMTE, I., 1991. Anisakiase et infections par les Anisakidés, *Annales de Médecine Interne* 1991, Masson, pp. 121-130.

CORDERO DEL CAMPILLO, M., ROJO VÁZQUEZ, F.A., MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A.R., SÁNCHEZ ACEDO, C., HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S., NAVARRETE LÓPEZ-COZAR, J., DÍEZ BAÑOS, P., QUIROZ ROMERO, M. and CARVALHO VARELA, M., 1999. *Parasitología Veterinaria*. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid, 968 pp.

COSTA, G., PONTES, T., MATTIUCCI, S. and D'AMELIO, S., 2003. The occurrence and infection dynamics of *Anisakis* larvae in the black-scabbard fish, *Aphanopus carbo*, chub mackerel, *Scomber japonicus*, and oceanic horse mackerel, *Trachurus picturatus* from Madeira, Portugal. *Journal of Helminthology*, **77**(2), pp. 163-166.

COSTA, G.P., SANTOS, M.J., COSTA, L., BISCOITO, M., PINHEIRO DE CARVALHO, M.A., MELO-MOREIRA, E., 2009. Helminth parasites from the stomach of conger eel, *Conger conger*, from Madeira island, Atlantic Ocean. *Journal of Parasitology*, **95**(4), pp. 1013-1015.

Bibliografía

COSTALAGO, D., NAVARRO, J., ÁLVAREZ-CALLEJA, I. and PALOMERA, I., 2012. Ontogenetic and seasonal changes in the feeding habits and trophic level of two small pelagic fish species. *Marine Progress Series*, **460**, pp. 169-181.

COUTURE, C., GAGNON, J. and DESBIENS, C., 2003. Human intestinal anisakiosis due to consumption of raw salmon. *American Journal of Surgical Pathology*, **27**(8), pp. 1167-1172.

CREMONTE, F. and SARDELLA, N.H., 1997. The parasita Fauna of *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782 (Pisces: Scombridae) in two zones of the Argentine sea. *Fisheries Research*, **31**(1), pp. 1-9.

CRUZ, C., BARBOSA, C. and SARAIVA, A., 2007. Distribution of larval anisakids in blue whiting off Portuguese fish market. *Helminthologia*, **44**(1), pp. 21-24.

CUÉLLAR, M.C., FONTANILLAS, J.C., PÉREZ-FUENTES, J. and PÉREZ-TAULER, M.P., 1991. Biología y epidemiología de la anisakidosis larvaria. Enfermedad del arenque. *Ciencias Veterinarias*, **4**, pp. 57-63.

CUENDE, E., AUDÍCANA, M.T., GARCÍA, M., ANDA, M., FERNÁNDEZ CORRES, L., JIMENEZ, C. and VESGA, J.C., 1998. Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. *Clinical and Experimental Rheumatology*, **16**(3), pp. 303-304.

D'AMELIO, S., MATHIOPOULOS, K., SANTOS, C.P., PUGACHEV, O.N., WEBB, S.C., PICANÇO, M., PAGGI, L., 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by
328

polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal of Parasitology*, **30**, pp. 223-226.

DASCHNER, A., ALONSO-GÓMEZ, A., CABALLERO, T., BARRANCO, P., SUAREZ-DE-PARGA, J.M. and LÓPEZ-SERRANO, M.C., 1998. Gastric anisakiasis: an underestimated cause of acute urticaria and angio-oedema? *British Journal of Dermatology*, **139**(5), pp. 822-828.

DASCHNER, A., ALONSO-GÓMEZ, A., CABALLERO, T., SUÁREZ-DE-PARGA, J.M. and LÓPEZ-SERRANO, M.C., 1999. Usefulness of early serial measurement of specific and total immunoglobulin E in the diagnosis of gastro-allergic anisakiasis. *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **29**(9), pp. 1260-1264.

DASCHNER, A., CUÉLLAR, C. and VALLS, A., 2008. Towards a differential definition of atopy: *Anisakis simplex* and the relationship between parasites and arthropods in respiratory allergy. *Parasite Immunology*, **30**(8), pp. 417-424.

DASCHNER, A., CUÉLLAR, C. and RODERO, M., 2012. The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help? *Trends in Parasitology*, **28**(1), pp. 9-15.

DAVEY, J.T., 1971. A revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridata). *Journal of Helminthology*, **45**(1), pp. 51-72.

DEARDOFF, T.L. and OVERSTREET, R.M., 1979. *Contraecum multipapillatum* (= *C. robustum*) from fishes and birds in the

Bibliografía

northern Gulf of Mexico. *Journal of Parasitology*, **66**, pp. 853-856.

DEBENEDETTI, A., MADRID, E. and FUENTES, M.V., 2013. Study of helminth parasites in the red mullet, *Mullus barbatus*, from the Mediterranean Sea and acquired in greater València, Spain. *Revista IberoLatinoamericana de Parasitología*, **72**(2), pp. 118-123.

DE LA TORRE MOLINA, R., PÉREZ APARICIO, J., HERNANDEZ BIENES, M., JURADO PÉREZ, R., MARTÍNEZ RUSO, A. and MORALES FRANCO, E., 2000. Anisakiasis in fresh fish sold in the north of Córdoba. *Revista Española de Salud Pública*, **74**(5-6), pp. 517-526.

DE LIBERATO, C., BOSSU, T., SCARAMOZZINO, P., NICOLINI, G., CEDDIA, P., MALLOZZI, S., CAVALLERO, S. and D'AMELIO, S., 2013. Presence of anisakid larvae in the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*, fished off the Tyrrhenian coast of central Italy. *Journal of Food Protection*, **76**(9), pp. 1643-1648.

DEL OLMO ESCRIBANO, M., COZAR IBANEZ, A., MARTÍNEZ DE VICTORIA, J.M. and URENA TIRAO, C., 1998. Anisakiasis at the ileal level. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, **90**(2), pp. 120-123.

DEL OLMO MARTÍNEZ, L., GONZÁLEZ DE CANALES, P. and SANJOSÉ GONZÁLEZ, G., 2000. Anisakiasis gástrica diagnosticada por endoscopia. *Anales de Medicina Interna*, **17**, pp. 429-431.

DÍAZ ESTRUCH (J.), 1992.- Parasitosis por nematodos. *Alimentaria*, **28**, pp. 43-45.

DOMÍNGUEZ ORTEGA, J., CIMARRA, M., SEVILLA, M., ALONSO LLAMAZARES, A., MONEO, I., ROBLEDO ECHARREN, T. and MARTÍNEZ-COCERA, C., 2000. *Anisakis simplex*: a cause of intestinal pseudo-obstruction. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, **92**(3), pp. 132-139.

DOMÍNGUEZ ORTEGA, J., ALONSO-LLAMAZARES, A., RODRIGUEZ, L., CHAMORRO, M., ROBLEDO, T., BARTOLOME, J.M. and MARTÍNEZ-COCERA, C., 2001. Anaphylaxis due to hypersensitivity to *Anisakis simplex*. *International Archives of Allergy and Immunology*, **125**(1), pp. 86-88.

EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY), 2010. Risk assessment on parasites in fishery products. *EFSA Journal*, **8**(4), pp. 1543.

FAGERHOLM, H.P., 1989. Intra-specific variability of the morphology in a single population of the seal parasite *Contraecum osculatum* (Rudolphi)(Nematoda, Ascaridoidea), with a redescription of the species. *Zoologica Scripta*, **18**(1), pp. 33-41.

FAGERHOLM, H.P., 1991. Systematic implications of male caudal morphology in ascaridoid nematode parasites. *Systematic Parasitology*, **19**(3), pp. 215-229.

FAGERHOLM, H. and GIBSON, D.I., 1987. A redescription of the pinniped parasite *Contraecum ogorhini* (Nematoda, Ascaridoidea), with an assessment of its antiboreal circumpolar distribution. *Zoologica Scripta*, **16**(1), pp. 19-24.

Bibliografía

FALCAO, H., LUNET, N., NEVES, E., IGLESIAS, I. and BARROS, H., 2008. *Anisakis simplex* as a risk factor for relapsing acute urticaria: a case-control study. *Journal of Epidemiology and Community Health*, **62**(7), pp. 634-637.

FARJALLAH, S., SLIMANE, B.B., BLEL, H., AMOR, N. and SAID, K., 2006. Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the eastern Mediterranean coasts in Tunisia. *Parasitology Research*, **100**(1), pp. 11-17.

FARJALLAH, S., SLIMANE, B.B., BUSI, M., PAGGI, L., AMOR, N., BLEL, H., SAID, K. and D'AMELIO, S., 2008. Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitology Research*, **102**(3), pp. 371-379.

FELDMEIER, H., POGGENSEE, G. and POGGENSEE, U., 1993. The epidemiology, natural history, and diagnosis of human anisakiasis. *European Microbiology*, **2**, pp. 30-38.

FERNÁNDEZ, M., AZNAR, F.J., MONTERO, F.E. and RAGA, J.A., 2005. Endoparasites of the blue whiting, *Micromesistius poutassou* from north-west Spain. *Journal of Helminthology*, **79**(1), pp. 15-21.

FERNÁNDEZ-CALDAS, E., QUIRCE, S., MARAÑÓ, F., GÓMEZ, M. L. D., BOTELLA, H. G. and ROMÁN, R. L., 1998. Allergenic cross-reactivity between third stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* and *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **101**(4), pp. 554-555.

FERNÁNDEZ DE CORRES, L., AUDÍCANA, M., DEL POZO, M.D., MUNOZ, D., FERNÁNDEZ, E., NAVARRO, J.A., GARCÍA, M. and

DIEZ, J., 1996. *Anisakis simplex* induces not only anisakiasis: report on 28 cases of allergy caused by this nematode. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, **6**(5), pp. 315-319.

FIORAVANTI, M., GAVAUDAN, S., VAGNINI, V. and TONUCCI, F., 2004. Indagine sulla diffusione di larve di *Anisakis* e *Hysterothylacium* (Nematoda, Anisakidae) in pesci del mar Adriatico centrale. *Sanità Pubblica Veterinaria*, **23**. Available at: <http://spvet.it/indice-spv.html>.

FUENTES, M.V., MEJALLI, S.I., SAINZ-ELIPE, S. and GALÁN-PUCHADES, M.T., 2008. Prevalence of anisakids in frequently consumed fish sold in supermarkets of the city of València (Spain). En: *X European Multicolloquium of Parasitology (EMOP X)*, 24-28 de Agosto, Paris, pp. 152.

FUMAROLA, L., MONNO, R., IERARDI, E., RIZZO, G., GIANNELLI, G., LALLE, M. and POZIO, E., 2009. *Anisakis pegreffii* etiological agent of gastric infections in two italian women. *Foodborne Pathogens and Disease*, **6**(9), pp. 1157-1159.

GAJADHAR, A.A., SCANDRETT, W.B. and FORBES, L.B., 2006. Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, **25**(2), pp. 595-606.

GANNIER, A., 2005. Summer distribution and relative abundance of delphinids in the Mediterranean Sea. *La Terre et la Vie-Revue d'Écologie*, **60**(3), pp. 223-238.

Bibliografía

GARCÍA, F., BLANCO, J.G., GARCES, M., JUSTE, S., FUENTES, M. and HERRERO, D., 2001. Freezing protects against allergy to *Anisakis simplex*. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, **11**(1), pp. 49-52.

GIBBONS, L.M., 2010. *Keys to the nematode parasites of vertebrates, Supplementari volume*. CAB International, Wallingford, 416 pp.

GIBSON, D.I., 1983. The systematics of ascaridoid nematodes: A current assessment. En "*Concepts in Nematode Systematics*" (A.R. Stone, H. M. Platt and L.F. Khalil, ed.). Academic Press, New York pp. 321-338.

GÓMEZ, B., TABAR, A.I., TUNON, T., LARRINAGA, B., ALVAREZ, M.J., GARCÍA, B.E., OLAGUIBEL, J.M., 1998. Eosinophilic gastroenteritis and *Anisakis*. *Allergy*, **53**, pp. 1148-1154.

GÓMEZ, B., LASA, E., ARROABARREN, E., GARRIDO, S., ANDA, M. and TABAR, A.I., 2003. Allergy to *Anisakis simplex*. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, **26** (2), pp. 25-30.

GÓMEZ-RINCÓN, C., LANGA, E., MURILLO, P., VALERO, M.S., BERZOSA, C. and LÓPEZ, V., 2014. Activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil against L3 larvae of *Anisakis simplex*. *BioMed Research International*, **2014**, pp. 549-510.

GONZÁLEZ, L., 1998. The life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in Chilean marine farms. *Aquaculture* **162**, pp. 173-186.

GONZÁLEZ, L. and CARVAJAL, J. 1994. Parásitos en los cultivos marinos de salmónidos en el sur de Chile. *Investigaciones Pesqueras* (Chile), **38**, pp. 87-96.

GONZÁLEZ QUIJADA, S., GONZÁLEZ ESCUDERO, R., ARIAS GARCÍA, L., GIL MARTÍN, A.R., VICENTE SERRANO, J. and CORRAL FERNÁNDEZ, E., 2005. Anisakiasis gastrointestinal manifestations: description of 42 cases. *Revista Clínica Española*, **205**(7), pp. 311-315.

GOPAR-MERINO, L., OSORIO-SARABIA, D. and GARCÍA-PRIETO, L., 2005. A new species of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) parasite of *Ariopsis guatemalensis* (Osteichthyes: Ariidae) from Tres Palos lagoon, Mexico. *Journal of Parasitology*, **91**(4), pp. 909-914.

GOTO, C., KASUYA, S., KOGA, K., OHTOMO, H. and KAGEI, N., 1990. Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in *Anisakis* larvae in vitro. *Parasitology Research*, **76**(8), pp. 653-656.

GRABDA, J., 1991. *Marine fish Parasitology. An outline*. PWN-Polish scientific Publishers, Warszawa,, 306 pp.

GRACIA-BARA, M.T., MATHEU, V., ZUBELDIA, J.M., RUBIO, M., ORDOQUI, E., LÓPEZ-SAEZ, M.P., SIERRA, Z., TORNERO, P. and BAEZA, M.L., 2001. *Anisakis simplex*-sensitized patients: should fish be excluded from their diet? *Annals of Allergy, Asthma and Immunology : Official Publication of The American College of Allergy, Asthma, and Immunology*, **86**(6), pp. 679-685.

Bibliografía

GUTIÉRREZ-GALINDO, J.F., OSANZ-MUR, A.C. and MORA-VENTURA, M.T., 2010. Occurrence and infection dynamics of anisakid larvae in *Scomber scombrus*, *Trachurus trachurus*, *Sardina pilchardus*, and *Engraulis encrasicolus* from Tarragona (NE Spain). *Food Control*, **21**(11), pp. 1550-1555.

HARTWICH, G., 1974. Keys to genera of the Ascaridoidea. In "CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates" (R. C. Anderson, A. G. Chabaud, and S. Wilmott, ed.). Farnham Royal, Commonwealth Agriculture Bureau, Richmond, 153 pp.

HERRERAS, M.V., KAARSTAD, S.E., BALBUENA, J.A., KINZE, C.C., RAGA, J.A., 1997. Helminth parasites of the digestive tract of the harbor porpoise *Phocoena phocoena* in Danish waters: a comparative geographical analysis. *Diseases of Aquatics Organisms*, **28**, pp.163-167.

HIERRO, I., VALERO, A., PÉREZ, P., GONZÁLEZ, P., CABO, M.M., MONTILLA, M.P. and NAVARRO, M.C., 2004a. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex s.l.* L3 larvae. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, **11**(1), pp. 77-82.

HIERRO, I., VALERO, A., GONZÁLEZ DE SELGAS, J.M. and NAVARRO, M.C., 2004b. Actividad larvicida del timol frente a *Anisakis simplex s. l.* *Revista de Fitoterapia*, **4**, pp. 175-176.

HIERRO, I., VALERO, A. and NAVARRO, M.C., 2006. In vivo larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex s.l.* *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, **13**(7), pp. 527-531.

HOCHBERG, N.S. and HAMER, D.H., 2010. Anisakidosis: Perils of the deep. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of The Infectious Diseases Society of America*, **51**(7), pp. 806-812.

HOJGAARD, D.P., 1998. Impact of temperature, salinity and light on hatching of eggs of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae), isolated by a new method, and some remarks on survival of larvae. *Sarsia*, **83**, pp. 21-28.

HUANG, W., 1990. Méthodes de recherche de larves d'Anisakides dans les poissons marins. Possibilités d'application à l'inspection des poissons commercialisés en région parisienne. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, **166**, pp. 895-900.

ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS), 1996. Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 524 pp.

IGLESIAS, L., VALERO, A., GÁLVEZ, L., BENÍTEZ, R. and ADROHER, F., 2002. In vitro cultivation of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) from 3rd-stage larvae to egg-laying adults. *Parasitology*, **125**(05), pp. 467-475.

IM, K.I., SHIN, H.J., KIM, B.H. and MOON, S.I., 1995. Gastric anisakiasis cases in Cheju-do, Korea. *Korean Journal of Parasitology*, **33**(3), pp. 179-186.

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA MADRID, 2005. Nutrición y salud: El pescado en la dieta. En: Nutrición y Salud Nº 6. *Dirección General de Salud Pública Alimentación y Consumo*.

Bibliografía

Consejería de Sanidad y Consumo. Comunidad de Madrid, 128 pp.

KAGEI, N. and ISOGAKI, H., 1992. A case of abdominal syndrome caused by the presence of a large number of *Anisakis* larvae. *International Journal for Parasitology*, **22**(2), pp. 251-253.

KAKIZOE, S., KAKIZOE, H., KAKIZOE, K., KAKIZOE, Y., MARUTA, M., and KAKIZOE, T., 1995. Endoscopic findings and clinical manifestation of gastric anisakiasis. *American Journal of Gastroenterology*, **90**(5), pp. 761-763.

KASSAI, T., CORDERO DEL CAMPILLO, M., EUZEBY, J., GAAFAR, S., HIEPE, T. and HIMONAS, C.A., 1988. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Veterinary Parasitology*, **29**(4), pp. 299-326.

KEISER, J. and UTZINGER, J., 2005. Emerging foodborne trematodiasis. *Emerging Infectious Diseases*, **11**(10), pp. 1507.

KLIMPEL, S., 2005. Distribution of nematodes of the family Anisakidae in commercially important fish species from the central and northern North Sea. *Bulletin of Fish Biology*, **7**, pp. 161-168.

KLIMPEL, S. and PALM, H.W., 2011. Anisakid nematode (Ascaridoidea) life cycles and distribution: increasing zoonotic potential in the time of climate change? En: *Progress in Parasitology. Parasitology Monographs 2* (H. Mehlhorn ed). Springer-Verlag, Berlin, pp. 201-222.

KLIMPEL, S. and RÜCKERT, S., 2005. Life cycle strategy of *Hysterothylacium aduncum* to become the most abundant anisakid fish nematode in the North Sea. *Parasitology Research*, **97**(2), pp. 141-149.

KLIMPEL, S., PALM, H.W. and SEEHAGEN, A., 2003. Metazoan parasites and food composition of juvenile *Etmopterus spinax* (L., 1758) (Dalatiidae, Squaliformes) from the Norwegian Deep. *Parasitology Research*, **89**, pp. 245-251.

KLIMPEL, S., PALM, H.W., BUSCH, M.W., KELLERMANN, E. and RÜCKERT, S., 2006a. Fish parasites in the Arctic deep-sea: Poor diversity in pelagic fish species vs. heavy parasite load in a demersal fish. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **53**(7), pp. 1167-1181.

KLIMPEL, S., RÜCKERT, S., PIATKOWSKI, U., PALM, H.W., HANEL, R., 2006b. Diet and metazoan parasites of silver scabbard fish *Lepidopus caudatus* from the Great Meteor Seamount (North Atlantic). *Marine Ecology Progress Series*, **315**, pp. 249-257.

KLIMPEL, S., KLEINERTZ, S., HANEL, R. and RÜCKERT, S., 2007. Genetic variability in *Hysterothylacium aduncum*, a raphidascarid nematode isolated from sprat (*Sprattus sprattus*) of different geographical areas of the northeastern Atlantic. *Parasitology Research*, **101**(5), pp. 1425-1430.

KOBAYASHI, Y., ISHIZAKI, S., SHIMAKURA, K., NAGASHIMA, Y. and SHIOMI, K., 2007. Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. *Parasitology Research*, **100**(6), pp. 1233-1241.

Bibliografía

KOBAYASHI, Y., OHSAKI, K., IKEDA, K., KAKEMOTO, S., ISHIZAKI, S., SHIMAKURA, K., NAGASHIMA, Y. and SHIOMI, K., 2011. Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitology International*, **60**(2), pp. 144-150.

KØIE, M., 1993. Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802)(Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Zoology*, **71**(7), pp. 1289-1296.

KØIE, M. and FAGERHOLM, H.P., 1995. The life cycle of *Contraecum osculatum* (Rudolphi, 1802) sensu stricto (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in view of experimental infections. *Parasitology Research*, **81**(6), pp. 481-489.

KØIE, M., BERLAND, B. and BURT, M.D., 1995. Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudotetranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**(1), pp. 134-139.

KULIKOWSKI, M., ROLBIECKI, L., SKÓRA, K. and ROKICKI, J., 2012. Nematodes found in the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*), a rare visitor to the Baltic Sea. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, **41**(3), pp. 99-102.

LAFFON-LEAL, S., VIDAL-MARTÍNEZ, V. and ARJONA-TORRES, G., 2000. 'Cebiche'-a potential source of human anisakiasis in Mexico? *Journal of Helminthology*, **74**(2), pp. 151-154.

LEVSEN, A. and LUNESTAND, B.T., 2010. *Anisakis simplex* third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh. *Veterinary Parasitology*, **171**(3-4), pp. 247-253.

LEWIS, R., and SHORE, J., 1985. Anisakiasis in the United Kingdom. *Lancet*, **326**(8462), pp. 1019.

LOPES, L.P., PIMPÃO, D.M., TAKEMOTO, R.M., MALTA, J.C. and VARELLA, A., 2011. *Hysterothylacium* larvae (Nematoda, Anisakidae) in the freshwater mussel *Diplodon suavidicus* (Lea, 1856)(Mollusca, Unioniformes, Hyriidae) in Aripuanã River, Amazon, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*, **106**(3), pp. 357-359.

LÓPEZ GIMÉNEZ, R. and MONSALVE, C., 1994. Estudio de la tasa de parasitación por nematodos del género *Anisakis* en el pescado fresco de venta más frecuente en Castilla-La Mancha. *Alimentaria*, **31**, pp. 37-42.

LÓPEZ PEÑAS, D., RAMÍREZ ORTIZ, L.M., DEL ROSAL PALOMEQUE, R., LÓPEZ RUBIO, F., FERNÁNDEZ-CREHUET NAVAJAS, R. and MIÑO FUGAROLAS, G., 2000. Estudio de 13 casos de anisakiasis en la provincia de Córdoba. *Medicina Clínica*, **114**(5), pp. 177-180.

LÓPEZ-SERRANO, M.C., ALONSO GÓMEZ, A., DASCHNER, A., MORENO-ANCILLO, A., SUÁREZ DE PARGA, J.M., CABALLERO, M.T., BARRANCO, P., CABAÑAS, R., 2000. Gastroallergic anisakiasis: findings in 22 patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **15**, pp. 503-506.

Bibliografía

LOUREDO, M.A., ACEDO, D.L.R.F., OFFIBAS, D.P.V., SANZ, O.E., BERNARDO, Q.L. and GOYANES, M.A., 1997. Anisakidosis of the colon as a cause of acute abdomen. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, **89**(5), pp. 403-406.

MACKENZIE, K., 2002. Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology*, **124**(07), pp. 153-163.

MACKENZIE, K., CAMPBELL, N., MATTIUCCI, S., RAMOS, P., PINTO, A. L., and ABAUNZA, P., 2008. Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus*. *Fisheries Research*, **89**(2), pp. 136-145.

MADRID, E., GALÁN-PUCHADES, M.T. and FUENTES, M.V., 2012. Risk analysis of human anisakidosis through the consumption of the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, sold at Spanish supermarkets. *Foodborne Pathogens and Disease*, **9**(10), pp. 934-938.

MARCOGLIESE, D.J., 1995a. Geographic and temporal variations in levels of anisakid nematode larvae among fishes in the Gulf of St. Lawrence, eastern Canada. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, **2029**, 16 pp.

MARCOGLIESE, D.J., 1995b. The role of zooplankton in the transmission of helminth parasites to fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **5**(3), pp. 336-371.

MARCOGLIESE, D.J., 2005. Parasites of the superorganism: are they indicators of ecosystem health? *International Journal for Parasitology*, **35**(7), pp. 705-716.

MARM (MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, MEDIO RURAL Y MARINO), 2010. *Consumo Alimentario en España*, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino e Instituto Cerdá, Madrid.

MARTÍN, V.J., 2008. "1987-2007: dos décadas del Panel de Consumo Alimentario, evolución de los hábitos de compra y consumo en España", *Distribución y Consumo*, **100**, pp. 208-240.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J., DÍAZ, M., ARTACHO, E.M. and VALERO, A., 2003. Molecular arguments for considering *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Anisakidae) a complex of sibling species. *Parasitology Research*, **89**(3), pp. 214-220.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J., ARTACHO-REINOSO, M.E., DIAZ-GAVILAN, M. and VALERO-LÓPEZ, A., 2005. Structure of *Anisakis simplex s.l.* populations in a region sympatric for *A. pegreffii* and *A. simplex s.s.* Absence of reproductive isolation between both species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **141**(2), pp. 155-162.

MARTÍNEZ, N. and CASADEVALL, M., 2010. *Engraulis encrasicolus*: Análisis de la parasitosis en lonjas de Girona. En: *XVI Simposio Ibérico de Estudios de Biología Marina*, pp. 6-10.

MATTIUCCI, S. and NASCETTI, G., 2006. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite*, **13**(2), pp. 99-113.

MATTIUCCI, S. and NASCETTI, G., 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with

Bibliografia

implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology*, **66**, pp. 47-148.

MATTIUCCI, S., NASCETTI, G., BULLINI, L., ORECCHIA, P. and PAGGI, L., 1986. Genetic structure of *Anisakis physeteris*, and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). *Parasitology*, **93**(02), pp. 383-387.

MATTIUCCI, S., NASCETTI, G., CLANCHI, R., PAGGI, L., ARDUINO, P., MARGOLIS, L., BRATTEY, J., WEBB, S., D'AMELIO, S., ORECCHIA, P. and BULLINI, L., 1997. Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Journal of Parasitology*, **83**(3), pp. 401-416.

MATTIUCCI, S., PAGGI, L., NASCETTI, G., ISHIKURA, H., KIKUCHI, K., SATO, N., CIANCHI, R. and BULLINI, L., 1998. Allozyme and morphological identification of shape *Anisakis*, *Contraecaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). *Systematic Parasitology*, **40**(2), pp. 81-92.

MATTIUCCI, S., PAGGI, L., NASCETTI, G., ABOLLO, E., WEBB, S.C., PASCUAL, S., CIANCHI, R. and BULLINI, L., 2001. Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae)s. *International Journal for Parasitology*, **31**(1), pp. 9-14.

MATTIUCCI, S., PAGGI, L., NASCETTI, G., SANTOS, C.P., COSTA, G., DI BENEDETTO, A., RAMOS, R., ARGYROU, M., CIANCHI, R. and BULLINI, L., 2002. Genetic markers in the
344

study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology*, **51**(3), pp. 159-170.

MATTIUCCI, S., CIANCHI, R., NASCETTI, G., PAGGI, L., SARDELLA, N., TIMI, J., WEBB, S.C., BASTIDA, R., RODRIGUEZ, D. and BULLINI, L., 2003. Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. *Systematic Parasitology*, **54**(1), pp. 13-23.

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

MATTIUCCI, S., NASCETTI, G., DAILEY, M., WEBB, S.C., BARROS, N.B., CIANCHI, R. and BULLINI, L., 2005. Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology*, **61**(3), pp. 157-171.

MATTIUCCI, S., CONTADINI, R., PAOLETTI, M., and NASCETTI, G., 2006. Relazioni genetiche tra specie del genere *Contracaecum* (Railliet et Henry, 1912), parassiti di pinnipedi, ed aspetti coevolutivi ospite-parassita. Abstracts XVI Congresso Societa Italiana di Ecologia, pp. 98.

Bibliografía

MATTIUCCI, S., ABAUNZA, P., DAMIANO, S., GARCÍA, A., SANTOS, M.N. and NASCETTI, G., 2007. Distribution of *Anisakis* larvae, identified by genetic markers, and their use for stock characterization of demersal and pelagic fish from European waters: an update. *Journal of Helminthology*, **81**(2), pp. 117-127.

MATTIUCCI, S., FARINA, V., CAMPBELL, N., MACKENZIE, K., RAMOS, P., PINTO, A.L., ABAUNZA, P. and NASCETTI, G., 2008a. *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock identification. *Fisheries Research*, **89**, pp. 146-171.

MATTIUCCI, S., PAOLETTI, M., WEBB, S.C., SARDELLA, N., TIMI, J.T., BERLAND, B. and NASCETTI, G., 2008b. Genetic relationships among species of *Contraecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaris* Host, 1932 (Nematoda: Anisakidae) from pinnipeds inferred from mitochondrial cox2 sequences, and congruence with allozyme data. *Parasite*, **15**(3), pp. 408-419.

MATTIUCCI, S., PAOLETTI, M., OLIVERO-VERBEL, J., BALDIRIS, R., ARROYO-SALGADO, B., GARBIN, L., NAVONE, G., and NASCETTI, G., 2008c. *Contraecum bioccai* n. sp. from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): Morphology, molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds. *Systematic Parasitology*, **69**, pp. 101-121.

MATTIUCCI, S., PAOLETTI, M. and WEBB, S.C., 2009. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic

relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology*, **74**(3), pp. 199-217.

MATTIUCCI, S., PAOLETTI, M., BORRINI, F., PALUMBO, M., PALMIERI, R.M., GOMES, V., CASATI, A. and NASCETTI, G., 2011. First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infectious Diseases*, **11**, pp. 82.

MATTIUCCI, S., CIPRIANI, P., WEBB, S.C., PAOLETTI, M., MARCER, F., BELLISARIO, B., GIBSON, D.I. and NASCETTI, G., 2014. Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *Journal of Parasitology*, **100**(2), pp. 199-214.

McCLELLAND, G., 1990. Larval sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) infections in benthic macrofauna. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*, **222**, pp. 47-65.

McCLELLAND, G., 2002. The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. *Parasitology*, **124**(07), pp. 183-203.

McCLELLAND, G., MISRA, R.K. and MARTELL, D.J., 1985. Variations in abundance of larval anisakines, sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) and related species, in eastern Canadian cod and flatfish. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, **1392**, pp. 57.

Bibliografía

MEHLHORN, H., DUWEL, D. and RAETHER, W., 1992. *Parasitología Veterinaria*. Grass, Barcelona, 822 pp.

MELONI, M., ANGELUCCI, G., MERELLA, P., SIDDI, R., DEIANA, C., ORRÙ, G. and SALATI, F., 2011. Molecular characterization of *Anisakis* larvae from fish caught off Sardinia. *Journal of Parasitology*, **97**(5), pp. 908-914.

MENDIZABAL-BASAGOITI, L., 1999. Hypersensitivity to *Anisakis simplex*: apropos of 36 cases. *Allergie et Immunologie*, **31**(1), pp. 15-17.

MERCADO, R., TORRES, P., MUÑOZ, V. and APT, W., 2001. Human infection by *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) in Chile: report of seven cases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**(5), pp. 653-655.

MERCASA, 2009. *Alimentación en España 2009. Producción, industria, distribución y consumo*, Mercasa, Madrid.

MLADINEO, I., SIMAT, V., MILETIC, J., BECK, R. and POLJAK, V., 2012. Molecular identification and population dynamic of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) isolated from the European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Adriatic Sea. *International Journal of Food Microbiology*, **157**(2), pp. 224-229.

MONEO, I., CABALLERO, M.L., GÓMEZ, F., ORTEGA, E. and ALONSO, M.J., 2000. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **106**(1), pp. 177-182.

MONEO, I., CABALLERO, M.L., RODRIGUEZ-PÉREZ, R., RODRIGUEZ-MAHILLO, A.I. and GONZÁLEZ-MUNOZ, M., 2007. Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Parasitology Research*, **101**(4), pp. 1051-1055.

MONTORO, A., PERTEGUER, M.J., CHIVATO, T., LAGUNA, R. and CUÉLLAR, C., 1997. Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*. *Allergy*, **52**(10), pp. 985-991.

MORENO-ANCILLO, A., CABALLERO, M.T., CABANAS, R., CONTRERAS, J., MARTÍN-BARROSO, J.A., BARRANCO, P. and LÓPEZ-SERRANO, M.C., 1997. Allergic reactions to *Anisakis simplex* parasitizing seafood. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology : Official Publication of The American College of Allergy, Asthma, and Immunology*, **79**(3), pp. 246-250.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. and ERLICH, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, **51**, pp. 263-273.

MURAOKA, A., SUEHIRO, I., FUJII, M., NAGATA, K., KUSUNOKI, H., KUMON, Y., SHIRASAKA, D., HOSOOKA, T. and MURAKAMI, K., 1996. Acute gastric anisakiasis: 28 cases during the last 10 years. *Digestive Diseases and Sciences*, **41**(12), pp. 2362-2365.

MYERS, B.J., 1976. Research then and now on the Anisakidae nematodes. *Transactions of The American Microscopical Society*, **95**(2) pp. 137-142.

Bibliografia

NADLER, S.A., 1992. Phylogeny of some ascaridoid nematodes, inferred from comparison of 18s and 28s rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, pp. 932-944.

NADLER, S.A., 1995. Microevolution and genetic structure of parasite populations. *Journal of Parasitology*, **81**, pp. 395-403.

NADLER, S.A., 2005. Speciation and species delimitation. In "Marine Parasitology" (K. Rohde, ed.), CABI Publishing, Oxon, pp. 339-345.

NADLER, S.A. and HUDSPETH, D.S., 1998. Ribosomal DNA and phylogeny of the Ascaridoidea (Nemata: Secernentea): implications for morphological evolution and classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **10**(2), pp. 221-236.

NADLER, S.A., D'AMELIO, S., FAGERHOLM, H., BERLAND, B. and PAGGI, L., 2000. Phylogenetic relationships among species of *Contraecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocasaris* Høst, 1932 (Nematoda [ratio] Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. *Parasitology*, **121**(04), pp. 455-463.

NADLER, S.A., D'AMELIO, S., DAILEY, M.D., PAGGI, L., SIU, S. and SAKANARI, J.A., 2005. Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contraecum* from northern Pacific marine mammals. *Journal of Parasitology*, **91**(6), pp. 1413-1429.

NASCETTI, G., PAGGI, L., ORECCHIA, P., SMITH, J.W., MATTIUCCI, S. and BULLINI, L., 1986. Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida:Anisakidae) from

the Mediterranean and North-East Atlantic. *International Journal for Parasitology*, **16**(6), pp. 633-640.

NASCETTI, G., CIANCHI, R., MATTIUCCI, S., D'AMELIO, S., ORECCHIA, P., PAGGI, L., BRATTEY, J., BERLAND, B., SMITH, J. and BULLINI, L., 1993. Three sibling species within *Contraecum osculatum* (nematoda, ascaridida, ascaridoidea) from the atlantic arctic-boreal region: Reproductive isolation and host preferences. *International Journal for Parasitology*, **23**(1), pp. 105-120.

NAVARRO, M.C., NOGUERA, M.A., ROMERO, M.C., MONTILLA, M.P., GONZÁLEZ DE SELGAS, J.M. and VALERO, A., 2008. *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpenic derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology*, **120**(4), pp. 295-299.

NAVARRO CANTARERO, E., CARRO ALONSO, B., CASTILLO LARIO, C. and FERNÁNDEZ GÓMEZ, J., 2005. Diagnóstico de la infestación por *Anisakis*. Experiencia en nuestro medio. *Allergologia et Immunopathologia*, **33**(1), pp. 27-30.

NAVARRO-MOLL, M.C., ROMERO, M.C., MONTILLA, M.P. and VALERO, A., 2011. In vitro and in vivo activity of three sesquiterpenes against L(3) larvae of *Anisakis* type I. *Experimental Parasitology*, **127**(2), pp. 405-408.

NAVONE, G.T., SARDELLA, N.H. and TIMI, J.T., 1998. Larvae and adults of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda: Anisakidae) in fishes and crustaceans in the south west Atlantic. *Parasite*, **5**(2), pp. 127-136.

Bibliografía

NORRIS, D. and OVERSTREET, R.M., 1976. The public health implications of larval *Thynnascaris* nematodes from shellfish. *Journal of Milk and Food Technology*, **39**(1), pp. 47-54.

OJEDA-TORREJÓN, A.J., COLLADO-JARA, A. and SALAS-VÁZQUEZ, M., 2001. Investigación de parásitos en bacaladillas capturadas en la bahía de Cádiz. *Medicina General*, **38**, pp. 808-811.

OLIVEIRA, A., SÁNCHEZ-RANCANO, S., Ò, CONDE-GACHO, P., MORENO, A., MARTINEZ, A., COMAS, C., 1999. Anisakiasis gastrointestinal: siete casos en tres meses. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, **91**, pp. 70-72.

OLMEDO MEDICOUAGUE, J. and SOLER, B., 1991. Control de la incidencia de parasitación por nematodos del género *Anisakis* sobre peces destinados al consumo humano. *Información Veterinaria*, pp. 31-35.

OLSON, A.C., LEWIS, M.D. and HAUSER, M.L., 1983. Proper identification of anisakine worms. *American Journal of Medical Technology*, **49**, pp. 111-114.

ORECCHIA, P., PAGGI, L., MATTIUCCI, S., SMITH, J., NASCETTI, G. and BULLINI, L., 1986a. Electrophoretic identification of larvae and adults of *Anisakis* (Ascaridida: Anisakidae). *Journal of Helminthology*, **60**(4), pp. 331-339.

ORECCHIA, P., BERLAND, B., PAGGI, L., NASCETTI, G., MATTIUCCI, S., and BULLINI, L., 1986b.

Divergenza genetica di specie dei generi *Contracaecum* e *Phocascaris* (Ascaridida, Anisakidae) con diverso ciclo biologico. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, **22**, pp. 345-348.

ORECCHIA, P., MATTIUCCI, S., D'AMELIO, S., PAGGI, L., PLÖTZ, J., CIANCHI, R., NASCETTI, G., ARDUINO, P. and BULLINI, L., 1994. Two new members in the *Contraecaecum osculatum* complex (nematoda, ascaridoidea) from the antarctic. *International Journal for Parasitology*, **24**(3), pp. 367-377.

OSANZ MUR, A.C., 2001. Presencia de larvas de anisákidos (Nematoda: Ascaridoidea) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona.

OSCHE, G., 1963. Morphological, biological, and ecological considerations in the phylogeny of parasitic nematodes. In "*The Lower Metazoa, Comparative Biology and Phylogeny*" (E.C. Dougherty, ed.), California University Press, Berkeley, pp. 283-302.

OSHIMA, T., 1972. *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. *Progress of Medical Parasitology in Japan*, **4**, pp. 305-393.

OSHIMA, T., 1987. Anisakiasis-is the sushi bar guilty? *Parasitology Today* (Personal ed.), **3**(2), pp. 44-48.

PAGGI, L. and BULLINI, L., 1994. Molecular taxonomy in anisakids. *Bulletin of the Scandinavian Society of Parasitology*, **4**, pp. 25-39.

PAGGI, L., NASCETTI, G., CIANCHI, R., ORECCHIA, P., MATTIUCCI, S., D'AMELIO, S., BERLAND, B., BRATTEY, J., SMITH, J. and BULLINI, L., 1991. Genetic evidence for three

Bibliografia

species within *Pseudoterranova decipiens* (nematoda, ascaridida, ascaridoidea) in the north atlantic and norwegian and barents seas. *International Journal for Parasitology*, **21**(2), pp. 195-212.

PAGGI, L., NASCETTI, G., WEBB, S.C., MATTIUCCI, S., CIANCHI, R. and BULLINI, L., 1998. A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae) from beaked whales (Ziphiidae): allozyme and morphological evidence. *Systematic Parasitology*, **40**(3), pp. 161-174.

PAGGI, L., MATTIUCCI, S., GIBSON, D.I., BERLAND, B., NASCETTI, G., CIANCHI, R. and BULLINI, L., 2000. *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda, Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. *Systematic Parasitology*, **45**(3), pp. 185-197.

PAGGI, L., MATTIUCCI, S. and D'AMELIO, S., 2001. Allozyme and PCR-RFLP markers in anisakid nematodes, aetiological agents of human anisakidosis. *Parassitologia*, **43**(1), pp. 21-27.

PALM, H.W., 2011. Fish Parasites as Biological Indicators in a Changing World: Can We Monitor Environmental Impact and Climate Change? En: *Progress in Parasitology. Parasitology Monographs 2* (H. Mehlhorn ed). Springer-Verlag, Berlin pp. 223-250.

PALM, H.W., KLIMPEL, S. and BUCHER, C., 1999. *Checklist of metazoan fish parasites of German coastal waters*. Institut für Meereskunde, Kiel, 148 pp.

PALOMERA, I., OLIVAR, M.P., SALAT, J., SABATÉS, A., COLL, M., GARCÍA, A. and MORALES-NIN, B., 2007. Small pelagic fish in the NW Mediterranean Sea: an ecological review. *Progress in Oceanography*, **74**, pp. 377-396.

PALTRIDGE, G.P., FAOAGALI, J.L. and ANGUS, H.B., 1984. Intestinal anisakiasis: a new New Zealand disease. *The New Zealand Medical Journal*, **97**(762), pp. 558-559.

PANEBIANCO A., and LO SCHIAVO A., 1985. Indagine sulla presenza di larve Anisakidi in aringhe salate e affumicate del commercio. Considerazioni d'ordine ispettivo. *La Clinica Veterinaria*, **2**, pp. 285.

PEREIRA BUENO, J.M., 1992. Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiosis. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Dirección General de Salud Pública. Valladolid.

PEREIRA BUENO, J.M. and FERRÉ PÉREZ, I., 1997. Nematodos. En: *Parásitos del pescado*. Junta de Castilla-León, Conserjería de Sanidad y Bienestar Social, pp. 33-41.

PEREIRA BUENO, J.M, DEHESA SANTISTEBAN, F.L. and CORDERO DEL CAMPILLO, M., 1989. Anisákidos en teleósteos de interés comercial. En: *VI Congreso Nacional de Parasitología y I Congreso Ibérico de Parasitología, 25-29 de Septiembre*, Cáceres, pp. 220.

PÉREZ CACHAFEIRO, S., MARTÍN-POZUELO CANTOS, A. and CABRERA VÉLEZ, R., 2004. Anisakiasis ¿Un problema de difícil digestión?. *Médicos de Familia-Revista de la Sociedad*

Madriileña de Medicina de Familia y Comunitaria, **2**(6).

PÉREZ-PÉREZ, J., FERNÁNDEZ-CALDAS, E., MARANON, F., SASTRE, J., BERNAL, M.L., RODRIGUEZ, J. and BEDATE, C.A., 2000. Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *International Archives of Allergy and Immunology*, **123**(2), pp. 120-129.

PERTEGUER, M.J., ORTIZ, G., GARCÍA, E., FLORES, M., RODRÍGUEZ, E., UBEIRA, F. M. and GÁRATE, T., 2004. Aplicación de la técnica PCR-RFLP en la identificación de nematodos implicados en la anisakiasis humana. *Medicina Clínica*, **122**(18), pp. 686-689.

PETERSEN, F., PALM, H., MÖLLER, H., and CUZI, M.A., 1993. Flesh parasites of fish from central Philippine waters. *Diseases of Aquatic Organisms*, **15**(2), pp. 81-86.

PETITHORY, J.C., PAUGAM, B., BUYET-ROUSSET, P. and PAUGAM, A., 1990. *Anisakis simplex*, a co-factor of gastric cancer? *Lancet*, **336**(8721), pp. 1002.

PETRIE, A.B., J. and WOOTEN, R., 2009. A survey of *Anisakis* and *Pseudoterranova* in scottish fisheries and the efficacy of current detection methods. *Report of Food Standard Agency*, Project S14008.

PIPPY, J.H. and VAN BANNING, P., 1975. Identification of *Anisakis* larva (I) as *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe 1878)(Nematoda: Ascaridata). *Journal of The Fisheries Board of Canada*, **32**(1), pp. 29-32.

PIRAS, M.C., TEDDE, T., GARIPPA, G., VIRGILIO, S., SANNA, D., FARJALLAH, S. and MERELLA, P., 2014. Molecular and epidemiological data on *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in commercial fish caught off northern Sardinia (western Mediterranean Sea). *Veterinary Parasitology*, **203**(1-2), pp. 237-240.

POULIN, R., 2006. Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology*, **132**(01), pp. 143-151.

PRAVETTONI, V., PRIMAVESI, L. and PIANTANIDA, M., 2012. *Anisakis simplex*: current knowledge. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, **44**(4), pp. 150-156.

QUINTEIRO, P., OUTEDA, M., ALVAREZ, F., GARCÍA, J. and SANMARTÍN, M.L., 1987. Helminthofauna de algunos peces de interés comercial capturados en el noroeste de España. III. Nematoda. En: *V Congreso Nacional de Parasitología, 29 de Septiembre-2 de Octubre*, Salamanca, pp. 245-246.

RELLO, F.J., ADROHER, F.J. and VALERO, A., 2008. *Hysterothylacium aduncum*, the only anisakid parasite of sardines (*Sardina pilchardus*) from the southern and eastern coasts of Spain. *Parasitology Research*, **104**(1), pp. 117-121.

RELLO, F.J., ADROHER, F.J., BENÍTEZ, R. and VALERO, A., 2009. The fishing area as a possible indicator of the infection by anisakids in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) from southwestern Europe. *International Journal of Food Microbiology*, **129**(3), pp. 277-281.

Bibliografía

RELLO-YUBERO, F.J., ADROHER, F.J. and VALERO, L.A., 2004. Anisákidos parásitos de peces comerciales. Riesgos asociados a la Salud Pública. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, **17**, pp. 173-197.

RENON, P. and MALANDRA, R., 1991. Anisakiasis, investigation about Anisakidae larvae presence in sea fish caught in Italian sea. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, **12**, pp. 73-79.

RENON, P. and MALANDRA, R., 1993. Frequenza di infestione dell'anisakidosi in Teleostei marini pervenuti presso il mercato ittico di Milano nel triennio "91-93". *Archivio Veterinario Italiano*, **44**, pp. 118-130.

REPISO ORTEGA, A., ALCÁNTARA TORRES, M., GONZÁLEZ DE FRUTOS, C., DE ARTAZA VARASA, T., RODRÍGUEZ MERLO, R., VALLE MUÑOZ, J. and MARTÍNEZ POTENCIANO, J., 2003. Anisakiasis gastrointestinal. Estudio de una serie de 25 pacientes. *Gastroenterología y Hepatología*, **26**(6), pp. 341-346.

RODRIGUEZ-MAHILLO, A.I., GONZÁLEZ-MUÑOZ, M., GÓMEZ-AGUADO, F., RODRIGUEZ-PÉREZ, R., CORCUERA, M.T., CABALLERO, M.L. and MONEO, I., 2007. Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *International Journal for Parasitology*, **37**(8), pp. 907-917.

RODRIGUEZ-PÉREZ, R., MONEO, I., RODRIGUEZ-MAHILLO, A. and CABALLERO, M.L., 2008. Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **159**(2), pp. 92-97.

ROMERO, M.D.C., VALERO, A., MARTÍN-SÁNCHEZ, J. and NAVARRO-MOLL, M.C., 2012. Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. *Phytomedicine*, **19**(6), pp. 520-523.

ROSALES, M., MASCARÓ, C., FERNÁNDEZ, C., LUQUE, F., SÁNCHEZ MORENO, M., PARRAS, L., COSANO, A. and RAMÓN MUÑOZ, J., 1999. Acute intestinal anisakiasis in Spain: a fourth-stage *Anisakis simplex* larva. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**(6), pp. 823-826.

ROSEL RIOJA, L., DEL POZO GIL, M.D., LOBERA LABAIRU, T., IBARRA CUCALON, V., BLASCO SARRAMIAN, A. and OTEO REVUELTA, J.A., 1998. Allergy to *Anisakis simplex*. Report of 2 cases and review of the literature. *Revista Clínica Española*, **198**(9), pp. 598-600.

RUIZ-VALERO, J., VALERO, A., ADROHER, F., ORTEGA, J. and LÓPEZ-GRANDE, F., 1992. Presencia de ascáridos en peces comerciales de frecuente consumo en Granada. En: *In memoriam" al Prof.Doctor D. Francisco de Paula Martínez-Gómez* (S. Hernández Rodríguez ed) Universidad de Córdoba, Servicio de Publicaciones, Córdoba, pp. 335-349.

SAKANARI, J.A., and McKERROW, J.H., 1989. Anisakiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, **2**(3), pp. 278-284.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. and MANIATIS, T., 1989. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, **2**(9), pp. 16-19.

SANMARTÍN, M.L., QUINTEIRO, P., IGLESIAS, R., SANTAMARÍA, M.T., LEIRO, J. and UBEIRA, F.M, 1994.

Bibliografía

Nematodos parásitos en peces de las costas gallegas. Díaz de Santos, Madrid, 80 pp.

SANTORO, M., MATTIUCCI, S., PAOLETTI, M., LIOTTA, A., UBERTI, B.D., GALIERO, G. and NASCETTI, G., 2010. Molecular identification and pathology of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) infection in the Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Veterinary Parasitology*, **174**(1-2), pp. 65-71.

SASTRE, J., LLUCH-BERNAL, M., QUIRCE, S., ARRIETA, I., LA HOZ, C., DEL AMO, A., FERNÁNDEZ-CALDAS, E. and MARANON, F., 2000. A double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite, *Anisakis simplex*. *Allergy*, **55**(6), pp. 560-564.

SERRACCA, L., CENCETTI, E., BATTISTINI, R., ROSSINI, I., PREARO, M., PAVOLETTI, E., FIORAVANTI, M.L., RIGHETTI, M., DI DONFRANCESCO, B. and ERCOLINI, C., 2013. Survey on the presence of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in fishes and squids caught in Ligurian Sea. *Veterinary Parasitology*, **196**(3), pp. 547-551.

SHAMSI, S. and BUTCHER, A.R., 2011. First report of human anisakidosis in Australia. *Medical Journal of Australia*, **194**(4), pp. 199-200.

SHIRAKI, T., 1974. Larval nematodes of family Anisakidae (Nematoda) in the Northern Sea of Japan as a causative agent of eosinophilic phlegmone or granuloma in the human gastrointestinal tract. *Acta Medica et Biologica*, **22**, pp. 57-98.

SILVA, M. and EIRAS, J., 2003. Occurrence of *Anisakis* sp. in fishes off the Portuguese West coast and evaluation of its zoonotic potential. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **23**(1), pp. 13-17.

SIMONS, F., ARDUSSO, L., BILÒ, M.B., EL-GAMAL, Y.M., LEDFORD, D.K., RING, J., SÁNCHEZ-BORGES, M., SENNA, G.E., SHEIKH, A. and THONG, B.Y., 2011. World Allergy Organization guidelines for the assessment and management of anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **593**, pp. 1-22.

SLUITERS, J., 1974. *Anisakis* sp. larvae in the stomachs of herring (*Clupea harengus* L.). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **44**(4), pp. 279-288.

SMITH, J.W., 1984. The abundance of *Anisakis simplex* L3 in the body-cavity and flesh of marine teleosts. *International Journal for Parasitology*, **14**(5), pp. 491-495.

SMITH, J.W. and WOOTTEN, R., 1975. Experimental studies on the migration of *Anisakis* sp. larvae (Nematoda: ascaridida) into the flesh of herring, *Clupea harengus* L. *International Journal for Parasitology*, **5**(2), pp. 133-136.

SMITH, J.W. and WOOTTEN, R., 1978. *Anisakis* and Anisakiasis. *Advances in Parasitology*, **16**, pp. 93-163.

SPRENT, J., 1977. Ascaridoid nematodes of amphibians and reptiles: *Dujardinascaris*. *Journal of Helminthology*, **51**(03), pp. 253-287.

Bibliografía

SPRENT, J., 1978. Ascaridoid nematodes of amphibians and reptiles: *Gedoelestascaris* ng and *Ortleppascaris* ng. *Journal of Helminthology*, **52**(03), pp. 261-282.

SPRENT, J., 1979. Ascaridoid nematodes of amphibians and reptiles: *Multicaecum* and *Brevimulticaecum*. *Journal of Helminthology*, **53**(03), pp. 91-116.

SPRENT, J., 1983. Ascaridoid nematodes of amphibians and reptiles: *Typhlophorus*, *Hartwichia* and *Trispiculascaris*. *Journal of Helminthology*, **57**, pp. 179-189.

STEELE, J.H., 2004. Regime shifts in the ocean: reconciling observations and theory. *Progress in Oceanography*, **60**(2), pp. 135-141.

STRØMNES, E. and ANDERSEN, K., 1998. Distribution of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematoda, Ascaridoidea) L3 larvae in three species of marine fish; saithe (*Pollachius virens* (L.)), cod (*Gadus morhua* L.) and redfish (*Sebastes marinus* (L.)) from Norwegian waters. *Parasitology Research*, **84**(4), pp. 281-285.

STRØMNES, E. and ANDERSEN, K., 2000. "Spring rise" of whaleworm (*Anisakis simplex*; Nematoda, Ascaridoidea) third-stage larvae in some fish species from Norwegian waters. *Parasitology Research*, **86**(8), pp. 619-624.

SURES, B., 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology*, **20**(4), pp. 170-177.

SUZUKI, J., MURATA, R., HOSAKA, M. and ARAKI, J., 2010. Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *International Journal of Food Microbiology*, **137**(1), pp. 88-93.

SVANEVIK, C.S., LEVSEN, A. and LUNESTAD, B.T., 2013. The role of muscle invading anisakid larvae on bacterial contamination of the flesh of post-harvest blue whiting (*Micromesistius poutassou*). *Food Control*, **30**, pp. 526-530.

TANTANASI, J., DIAKOU, A., TAMVAKIS, A. and BATJAKAS, I., 2012. *Anisakis* spp. burden in *Trachurus trachurus*. *Helminthologia*, **49**(1), pp. 16-20.

TEDDE, T., PIRAS, M., PINNA, C., VIRGILIO, S., TERROSU, G., PIRAS, A., GARIPPA, G. and MERELLA, P., 2011. First results on the presence and the molecular characterization of anisakid nematodes in marine fish caught off northern Sardinia. *Italian Journal of Food Safety*, **1**(1), pp. 185-190.

THOMPSON, R. M., MOURITSEN, K. N., and POULIN, R., 2005. Importance of parasites and their life cycle characteristics in determining the structure of a large marine food web. *Journal of Animal Ecology*, **74**(1), pp. 77-85.

TORRES, P., JERCIC, M.I., WEITZ, J., DOBREW, E. and MERCADO, R., 2007. Human pseudoterranovosis, an emerging infection in Chile. *Journal of Parasitology*, **93**(2), pp. 440-443.

TRUJILLO, M.J., RODRIGUEZ, A., GRACIA BARA, M.T., MATHEU, V., HERRERO, T., RUBIO, M., ZUBELDIA, J.M. and BAEZA, M.L., 2002. Dietary recommendations for patients

Bibliografía

allergic to *Anisakis simplex*. *Allergologia et Immunopathologia*, **30**(6), pp. 311-314.

UMEHARA, A., KAWAKAMI, Y., MATSUI, T., ARAKI, J. and UCHIDA, A., 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitology International*, **55**(4), pp. 267-271.

UMEHARA, A., KAWAKAMI, Y., ARAKI, J. and UCHIDA, A., 2007. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitology International*, **56**(3), pp. 211-215.

UMEHARA, A., KAWAKAMI, Y., ARAKI, J. and UCHIDA, A., 2008. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International*, **57**(1), pp. 49-53.

VALENTINI, A., MATTIUCCI, S., BONDANELLI, P., WEBB, S.C., MIGNUCCI-GIANNONE, A.A., COLOM-LLAVINA, M.M. and NASCETTI, G., 2006. Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial cox2 sequences, and comparison with allozyme data. *Journal of Parasitology*, **92**(1), pp. 156-166.

VALERO, A., MIRA, J., PÉREZ, R., SANZ, J., GERALDÍA, M., GARCÍA, J., GARCÍA, P and ADROHER, F.J., 1992. Descripción de un caso de anisakiosis humana. León (Spain): *IX reunión científica Asociación de parasitólogos españoles*, pp. 24.

VALERO, A., MARTÍN-SÁNCHEZ, J., REYES-MUELAS, E. and ADROHER, F.J., 2000. Larval anisakids parasitizing the blue
364

whiting, *Micromesistius poutassou*, from Motril Bay in the Mediterranean region of southern Spain. *Journal of Helminthology*, **74**(4), pp. 361-364.

VALERO, A., TERRADOS, S., DÍAZ, V., REGUERA, V., LOZANO, J., 2003. Determination of IgE in the serum of patients with allergic reactions to four species of fish-parasite anisakids. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, **13**, pp. 94-99.

VALERO, A., LÓPEZ-CUELLO, M.M., BENÍTEZ, R., ADROHER, F.J., 2006. *Anisakis* spp. in European hake, *Merluccius merluccius* (L.) from the Atlantic off north-west Africa and the Mediterranean off southern Spain. *Acta Parasitológica*, **51**, pp. 209-212.

VALLS, A., PASCUAL, C. and MARTÍN ESTEBAN, M., 2003. *Anisakis* y anisakiosis. *Allergologia et Immunopathologia*, **31**(6), pp. 348-355.

VAN THIEL, P., 1960. *Anisakis*. *Parasitology*, **53**(16), pp. 4.

VERCAMMEN, F., KUMAR, V., BOLLEN, J., LIEVENS, C., VAN DEN BERGH, L. and VERVOORT, T., 1997. Gastric involvement with *Anisakis* sp. larva in a Belgian patient after consumption of cod. *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, **60**(4), pp. 302-303.

VÍU, M., SÁNCHEZ ACEDO, C., DEL CACHO, E., QUÍLEZ, J. and LÓPEZ-BERNARD, F., 1996. Ocurrence of anisákido larvae (Nematoda: Ascaridida) in fresh market fish from Zaragoza (Spain). *Research and Reviews in Parasitology*, **56**, pp. 25-28.

Bibliografia

VUONG, P., RICHARD, F., SNOUNOU, G., COQUELIN, F., RENIA, L., GONNET, F., CHABAUD, A. and LANDAU, I., 1999. Development of irreversible lesions in the brain, heart and kidney following acute and chronic murine malaria infection. *Parasitology*, **119**(06), pp. 543-553.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 1989. Report of WHO consultation on public health aspects of seafood-borne zoonotic diseases. Hanover, Federal Republic of Germany, 14-16 November, WHO/CDS/VPH/ 90.86: 62 pp.

WOOTTEN, R. and WADDELL, I., 1977. Studies on the biology of larval nematodes from the musculature of cod and whiting in Scottish waters. *Journal du Conseil*, **37**(3), pp. 266-273.

YAGI, K., NAGASAWA, K., ISHIKURA, H., NAGASAWA, A, SATO, N., KIKUCHI, K. and ISHIKURA, H., 1996. Female worm *Hysterothylacium aduncum* excreted from human: a case report. *Japanese Journal of Parasitology*, **45**(1), pp. 12-23.

YORIMITSU, N., HIRAOKA, A., UTSUNOMIYA, H., IMAI, Y., TATSUKAWA, H., TAZUYA, N., YAMAGO, H., SHIMIZU, Y., HIDAKA, S., TANIHIRA, T., HASEBE, A., MIYAMOTO, Y., NINOMIYA, T., ABE, M., HIASA, Y., MATSUURA, B., ONJI, M. and MICHITAKA, K., 2013. Colonic intussusception caused by anisakiasis: a case report and review of the literature. *Internal Medicine*, **52**(2), pp. 223-226.

ZAR, J.H., 2010. *Biostatistical analysis. 5th edition*. Pearson Education International, Upper Saddle River, NJ, 944 pp.

ZHANG, L., HU, M., SHAMSI, S., BEVERIDGE, I., LI, H., XU, Z., LI, L., CANTACESSI, C. and GASSER, R.B., 2007. The specific
366

identification of anisakid larvae from fishes from the Yellow Sea, China, using mutation scanning-coupled sequence analysis of nuclear ribosomal DNA. *Molecular and Cellular Probes*, **21**(5-6), pp. 386-390.

ZHU, X., GASSER, R.B., JACOBS, D.E., HUNG, G. and CHILTON, N.B., 2000. Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitology Research*, **86**(9), pp. 738-744.