

TRABAJO FINAL

**CARRERA DE ESPECIALIZACIÓN EN INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**DETERMINACIÓN DE LARVAS DE NEMATODES DE LA FAMILIA
ANISAKIDAE EN PESCADILLA DE CALADA (*Cynoscion guatucupa*) Y EN
CALAMAR (*Illex argentinus*), CAPTURADOS EN EL RÍO DE LA PLATA Y EN EL
ATLÁNTICO SUDOCCIDENTAL Y COMERCIALIZADOS EN URUGUAY.**

Dra. Cristina Friss de Kereki

**Tutora: Prof. Dra. Perla Cabrera
Co- tutor: Dr. José Pedro Dragonetti**

**FEBRERO
2009**

Agradecimientos

Agradezco a mi tutora de trabajo final la Prof. Dra. Perla Cabrera y al cotutor Dr. José Pedro Dragonetti, ambos por brindarme su sapiencia, permanente apoyo y consejo en la elaboración del mismo.

Mi fraterno agradecimiento a la novel colega Dra. Gabriela Delgado por las horas de trabajo compartido y el esfuerzo mutuo para lograr ambas nuestras metas.

A la Dra. Cristina Ayçaguer, perteneciente al Área de Ciencias del Mar del Instituto de Investigaciones Pesqueras, por enseñarme algunas técnicas, prestar soluciones y facilitar equipos, sin los cuales no hubiera podido realizar este trabajo.

También al Dr. Daniel Carnevia, del Área de Acuicultura del Instituto de Investigaciones Pesqueras, por facilitar el microscopio con cámara para obtener los registros fotográficos.

Al Lic. Oscar Castro de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Veterinaria por su orientación en el manejo de los resultados.

A la Dra. Graciela Fabiano y a la Dra. Estela Delgado por facilitarme material escrito.

Al Dr. Ernesto Varela por sus consejos informáticos y al Dr. Eduardo Aguirre por contribuir con ejemplares de otras especies de pescados para así continuar trabajando en el tema.

Al Sr. Walter Aguiar, al Sr. Mario Garabello y al Sr. Juan Carlos Bellora, personal no docente del Instituto de Investigaciones Pesqueras “Dr. Víctor H. Bertullo” de la Facultad de Veterinaria, por su colaboración en el mantenimiento y condiciones de higiene de la materia prima y utensilios.

A los profesores y compañeros de generación de la CEICA, los cuales enseñaron y compartieron detalladamente toda su experiencia profesional.

Y a quienes me contienen en casa con amor: a mis hijos Belén e Ignacio, a mi esposo Antonio y a mis padres Gladys y Rodolfo, que siempre me alientan y apoyan.

Resumen

Fueron determinadas larvas de *Anisakis* spp., *Pseudoterranova* sp. y *Contracaecum* sp., en pescadilla de calada (*Cynoscion guatucupa*) y calamar (*Illex argentinus*), por el método de examen visual simple y microscopía óptica. Se encontró una prevalencia de 29,9% del género *Anisakis* en *Cynoscion guatucupa* y una prevalencia de 23,3% del género *Anisakis* en *Illex argentinus*, siendo estas prevalencias mayores que las halladas en los géneros *Pseudoterranova* (28,9% y 3,3%) y *Contracaecum* (22,4% y 3,3%). Se determinó intensidad y abundancia media para estos géneros. La totalidad de las larvas en *Cynoscion guatucupa* fueron encontradas en peritoneo visceral, parietal, hígado y gónadas, en *Illex argentinus* se hallaron encapsuladas en la superficie del estómago. En ninguna de las especies fueron encontradas larvas en el músculo.

Palabras clave: anisákidos, larvas de nematodos, prevalencia, *Cynoscion guatucupa*, *Illex argentinus*.

Summary

Anisakis spp., *Pseudoterranova* sp. and *Contracaecum* sp. larvae were found in stripped weakfish (*Cynoscion guatucupa*) and squid (*Illex argentinus*) by visual examination and optical microscopy. Prevalence (P) of *Anisakis* genus was 29,9% in *Cynoscion guatucupa* and P: 23,3% was found in *Illex argentinus*; these P were higher than *Pseudoterranova* (28,4% and 3,3%) and *Contracaecum* (22,4% and 3,3%) genus, intensity and abundance were determined. The larvae were found in visceral peritoneum, parietal peritoneum, liver and gonads in *Cynoscion guatucupa* and all encapsulated larvae were found over stomach in *Illex argentinus*. In both species, no anisakids larvae were found in muscle tissue.

Keywords: anisakids, nematode larvae, prevalence, *Cynoscion guatucupa*, *Illex argentinus*.

1. Introducción

El consumo de productos de la pesca y de la acuicultura ha tenido un incremento a nivel mundial. Durante los últimos cuarenta años, el consumo promedio en el mundo ha ido aumentando de 9 kg pescado/año/ persona en 1961 a 16,6 kg/año/persona en 2004 (FAO, 2007). En América del Sur el consumo de pescado estimado es de 8,7 kg/año/persona y en Uruguay, según los datos calculados por la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) es de 6,74 kg/año/persona y en la capital Montevideo es de 9,64 kg/año/persona.

El 75% del consumo mundial es de pescado propiamente dicho y el 25% restante es de mariscos (moluscos y crustáceos). El pescado proporciona a más de 2800 millones de personas, el 20% del aporte medio *per capita* de proteínas de origen animal (FAO, 2007).

El crecimiento del consumo puede deberse a múltiples causas: aumento del consumo de “carne blanca” (pescado y pollo), divulgación sobre dietas “saludables” con disminución de la ingesta de grasas saturadas y promoción del consumo de ácidos grasos poli insaturados, EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosaheptaenoico) del grupo omega 3, de origen marino. La ingestión de estos ácidos grasos reduce los triglicéridos totales y el colesterol sanguíneo, aumenta las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y produce un efecto vasodilatador y antitrombótico. Además para una dieta equilibrada, galenos y nutricionistas aconsejan un consumo mínimo de pescado de tres veces a la semana.

El incremento de consumo de pescado, el cambio en los hábitos alimentarios de los consumidores, la diversidad de métodos de preparación culinaria y la “globalización gastronómica”, que ha llevado por ejemplo al consumo de pescado crudo al estilo japonés como *sushi* y *sashimi*, moda de los *Sushi* Bar en Occidente, potencian la ocurrencia de las enfermedades transmitidas por los productos de la pesca y de la acuicultura. También el comercio internacional y la emigración favorecen la transmisión de las enfermedades a través de los alimentos. El intercambio comercial de productos frescos (por ej.: pescados enteros, crustáceos vivos) de naciones tan distantes geográficamente ha vehiculado enfermedades parasitarias (v.g. FBT – Food-borne trematode) (Martinez *et al*, 2005). Los emigrantes, provengan de cualquiera de los continentes, llevan los hábitos alimentarios, preferencias y costumbres con ellos. Lo expuesto anteriormente, son algunas de las causas que han conducido a la presencia de enfermedades exóticas para algunas regiones o a un aumento de ciertas enfermedades emergentes en otras.

Un claro ejemplo, que fue motivador para esta investigación, es la anisakiosis, una de las zoonosis parasitarias transmitidas por los productos de la pesca. Esta enfermedad es producida por la ingestión de larvas infectantes de nematodos de la familia Anisakidae, y se asocia principalmente con el consumo de pescado crudo o insuficientemente cocido.

Los agentes etiológicos pertenecen a los géneros: *Anisakis*, *Pseudoterranova* (anteriormente *Terranova*, *Porrocaecum*, *Phocanema*), *Contracaecum* e *Hysterothylacium* (*Thynnascaris*).

En los humanos las larvas de la tercera fase (L₃) son las responsables de la infección, éstas se encuentran en vísceras o tejido muscular de los peces y cefalópodos parasitados.

La distribución de las larvas de la familia Anisakidae es mundial, se encuentran en la mayoría de los océanos y mares del mundo.

La zoonosis fue descrita por primera vez en Holanda en el año 1955 y se diagnosticaron 160 casos de anisakiasis humana en los Países Bajos hasta 1969. Luego que se impuso

como medida preventiva la congelación del pescado por 24 horas antes del consumo, sólo se han presentado pocos casos (Acha y Szyfres, 2003).

El país con mayor prevalencia es Japón. Otros países asiáticos con alta prevalencia son Corea del Sur e Indonesia. Su ocurrencia ha aumentado desde 1960 en las pesquerías del Atlántico Norte (Smith y Wootten 1978; McClelland *et al.* 1985 in Abollo, 2001) asociado a un aumento de las focas (principales hospedadores definitivos de *Pseudoterranova* sp.) en esa región (Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

En España el primer caso se diagnosticó en 1991 (Arenal y Vera *in* Ferre, 2001).

En Europa se han detectado casos aislados en Alemania, Bélgica, Dinamarca e Inglaterra. Desde mediados de los años 90, en Francia (Bouree *et al.*, 1995) y en España han aumentado los diagnósticos de anisakiosis humana (Ministerio de Sanidad y Consumo - Comité Científico AESA, 2005).

En América, también han aumentado los casos en Estados Unidos de Norteamérica, en Alaska y Hawaii (Acha y Szyfres, 2003). Se han diagnosticado en Chile (Acha y Szyfres, 2003; Mercado *et al.*, 2006), en Perú (Cabrera *et al.*, 2003; Cabrera y Trillo, 2004) y en México, Laffon-Leal *et al.* (2000) sugieren que el cebiche es fuente potencial de anisakiasis en ese país.

En Brasil, en el 2007 Amato *et al.* difunden sobre el probable reconocimiento de la anisakiasis humana en San Pablo. En Argentina (Rey y Silvestre, 2005), al igual que en Uruguay no han existido casos diagnosticados de esta zoonosis.

La anisakidosis humana, es sub-diagnosticada debido a los cuadros gastroentéricos y alérgicos que provoca y que muchas veces pueden no diferenciarse debido a la similitud de síntomas provocados por otros agentes etiológicos que causan patologías digestivas o alérgicas parecidas (Cordero del Campillo y Rojo, 1999; Acha y Szyfres, 2003).

Desde la inspección sanitaria tradicional que realiza el profesional veterinario resulta imposible que los peces y moluscos cefalópodos parasitados no lleguen al consumidor, ya que para la detección de las larvas el examen es destructivo e inutiliza al producto de la pesca para su consumo. Por lo tanto, el mejor método de prevención de la anisakiosis es evitar el consumo de pescado crudo o insuficientemente cocido. Si se desea consumir pescado en estas condiciones se debe congelar previamente; como medida preventiva y de control, algunas normas internacionales plantean el uso de este tipo de tecnología como método de destrucción de las larvas de anisákidos, por ejemplo la Unión Europea (UE), la *Food and Drug Administration* (FDA), la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

El conocer, determinar, cuantificar las larvas de anisákidos (prevalencia, intensidad, abundancia) en especies de importancia comercial en Uruguay, como lo son la pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) y el calamar (*Illex argentinus*), fue necesario principalmente para saber si presentaban estos parásitos y en qué condiciones de infestación se encontraban.

En Uruguay, como antecedente de este estudio en la especie de teleósteo elegida (*Cynoscion guatucupa*), existe la publicación de Botto *et al* en 1976, sobre la presencia únicamente de larvas de *Anisakis* sp. en peces de la costa atlántica uruguaya, que incluye en el estudio ejemplares de merluza (*Merluccius hubbsi*), pescadilla (*Cynoscion guatucupa*), anchoíta (*Engraulis* sp) y burriqueta (*Menticirrhus americanus*). En la investigación anteriormente citada, el resultado para la pescadilla es de sólo un ejemplar parasitado con *Anisakis* spp.

El haber hallado y cuantificado la presencia de larvas de anisákidos en pescadilla y calamar, comercializados en el país, fue un diagnóstico de situación que podrá ser utilizado

para la prevención de enfermedades parasitarias en la salud pública así como para ir conformando una base de datos nacionales y regionales, de los ictioparásitos causa de zoonosis, útiles también para la evaluación de riesgos de los productos de la pesca al elaborar los planes HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) de las industrias pesqueras uruguayas.

Fue importante la determinación de los anisákidos porque si se consideran también los aspectos económicos, el conocimiento previo podría orientar el diagnóstico y así disminuir los probables gastos de salud que podrían generarse por la atención de individuos con anisakidosis.

La industria pesquera conoce las pérdidas por la depreciación de productos como consecuencia de la presencia de los parásitos en el tejido muscular de los peces. Aunque no fueron halladas larvas en la musculatura de los ejemplares estudiados se pueden tomar medidas prácticas para la reducción del riesgo asociado con anisákidos durante la captura y procesamiento (Ministerio de Sanidad y Consumo - Comité Científico AESA, 2005).

La pescadilla de calada (*C. guatucupa*) fue también seleccionada debido a su relevancia en el mercado interno ya que es ampliamente comercializada en estado fresco (sin congelar), lo que aumenta el riesgo de contraer anisakiasis si se consume cruda, poco cocida, ahumada en frío, salada suave o en preserves ácidas.

2 Revisión bibliográfica

2.1 Anisakidosis y Anisákidos. Generalidades.

La anisakidosis también conocida como anisakiosis, enfermedad del gusano del arenque (anisakiasis), enfermedad del gusano del bacalao o enfermedad del gusano de la foca (pseudoterranovosis), es una zoonosis parasitaria producida por larvas L₃ (tercer fase larvaria) de nematodos de la familia Anisakidae. Las larvas pueden ser transmitidas al hombre por los productos de la pesca si éstos se consumen crudos o sin una congelación profunda.

2.1.1 Etiología

Los nematodos anisákidos pertenecen a la Clase Secernentea, Orden Ascaridida, Familia Anisakidae. Dentro de esta familia se destacan por su interés sanitario los siguientes Géneros: *Anisakis*, *Pseudoterranova* (*Phocanema*, *Porrocaecum*, *Terranova*), *Contracaecum* e *Hysterothylacium* (*Tynnascaris*).

Desde el siglo XIII, existen referencias sobre la presencia de gusanos redondos en el pescado pero, recién en 1845 Dujardin identifica y describe la posición taxonómica del *Anisakis* (Bouree *et al.*, 1995).

Las especies más mencionadas en la literatura implicadas en parasitosis humana son *Anisakis simplex* y *Pseudoterranova decipiens* (Huss, 1997; Acha y Szyfres, 2003).

En el caso de *Hysterothylacium* sólo hay un caso reportado en Japón. (Yagi *et al.* 1996 in Rello *et al.* 2004)

Hay más de 12.000 especies conocidas de nematodos, 650 son parásitos de peces en su fase adulta o larvaria; se encuentran libres o adaptados a la vida parasitaria como es el caso de la familia Anisakidae.

2.1.2 Características Morfológicas de L₃ de *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium* .

Como características fundamentales de las L₃ de los diferentes géneros de anisákidos se debe tener en cuenta ciertas estructuras de su anatomía para llegar a una correcta determinación.

Los criterios morfológicos utilizados para la identificación de las larvas presentes en los peces son: la forma y el tamaño del ventrículo esofágico y la presencia o ausencia de apéndice ventricular y ciego intestinal (Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

La presencia de apéndice, si éste se proyecta anteriormente se reconoce como ciego intestinal y si se proyecta hacia posterior del área del ventrículo se conoce como apéndice ventricular. La posición del poro excretor es importante para la determinación (Cheng 1982 in Cheng, 1986). También el color de las larvas contribuye con el reconocimiento.

2.1.2.1 Características morfológicas de la larva III del género *Anisakis*

- a) diente cuticular ventral
- b) poro excretor situado entre las bases de los labios subventrales
- c) un ventrículo
- d) ausencia de apéndice ventricular
- e) ausencia de ciego intestinal
- f) color blanquecino
- g) plano de unión ventrículo-intestino oblicuo (*Anisakis simplex*)
- h) extremo posterior de forma cónica finalizando en un mucrón

2.1.2.2 Características morfológicas de la larva III del género *Pseudoterranova*

- a) diente cuticular cónico y prominente
- b) poro excretor situado entre las bases de los labios subventrales
- c) un ventrículo
- d) presencia de ciego intestinal
- e) color amarillo-rojizo
- f) cola redondeada con mucrón cónico

2.1.2.3 Características morfológicas de la larva III del género *Contracaecum*

- a) Diente cuticular y cónico, ligeramente romo
- b) Poro excretor en el extremo anterior
- c) Ventrículo pequeño y esférico
- d) Presencia apéndice ventricular
- e) Presencia de ciego intestinal
- f) Color blanquecino
- g) Cola cónica, sin mucrón
- h) Cutícula con estriaciones transversales

2.1.2.4 Características morfológicas de la larva III del género *Hysterothylacium*

- a) Poro excretor se abre a la altura del anillo nervioso

- b) Presencia de ciego intestinal
- c) Ventrículo esofágico con un apéndice posterior de medida similar al ciego
- d) Cola con espinas terminales
- e) Color blanquecino

2.1.3 Distribución Geográfica

Los anisákidos se pueden encontrar en la mayoría de los océanos y mares del mundo, parasitando a millones de peces y moluscos cefalópodos.

Según Myers (1979), hay una mayor prevalencia de *Anisakis* en el Océano Pacífico porque existe una mayor población de ballenas y en el Atlántico tiene mayor prevalencia el *Pseudoterranova* porque hay una gran población de focas. Se conoce que una zona de mayor concentración de hospedadores definitivos es una zona con mayor prevalencia (Templeman, 1957; Myers, 1979).

Rello *et al.* (2008) investigando anisákidos en sardinas capturadas en las costas del sur y este de España (O. Atlántico y Mediterráneo), sólo hallaron *Hysterothylacium aduncum* y ningún *Anisakis*, como era lo esperado. En España se puede encontrar *Anisakis* en el 36% del pescado muestreado y la frecuencia es mayor en los del Mar Cantábrico (50%) y Océano Atlántico (36%) y menor en el Mar Mediterráneo (6%) (Ministerio de Sanidad y Consumo- AESA, 2005).

Son muchos los investigadores que han hallado anisákidos en diferentes zonas geográficas y en las más variadas especies de peces marinos, en calamares y pulpos, en peces de agua dulce y las prevalencias también son muy variadas (Rello *et al.*; 2004).

La enfermedad puede presentarse en cualquier país donde la población en general o determinadas minorías étnicas consumen tradicionalmente pescado o moluscos cefalópodos crudos o con un tratamiento térmico insuficiente.

Japón es el país con mayor número de casos diagnosticados. Según Ferré (2001) son más mil casos anuales y según Rello *et al.*, (2004) son dos mil los diagnósticos en Japón, correspondiendo al 95% de la cifra mundial. Esto es debido a los hábitos alimentarios de los nipones y a que existen más de cien especies de peces que los japoneses consumen y que ya se ha constatado presencia de larvas en ellos (Ferré, 2001).

Pardo *et al.*, 2007 reportaron en Colombia la presencia de larvas de la familia Anisakidae (*Contracaecum sp.*) en especies de peces de consumo capturados en los ríos Sinú y San Jorge.

2.1.4 Ciclo Biológico

Las especies de anisákidos responsables de enfermedad en el hombre utilizan mamíferos marinos (cetáceos y pinnípedos) como hospedadores definitivos y todo el ciclo se completa en el medio acuático (Cordero del Campillo y Rojo, 1999). Según este concepto no se estaría incluyendo al género *Hysterothylacium* como causante de enfermedad, ya que son también peces, principalmente gádidos los que albergan a los parásitos adultos en este caso. El ciclo biológico de estos parásitos está constituido por un estadio de huevo, 4 fases larvarias (L₁, L₂, L₃ y L₄) y adulto con sexos separados.

Los adultos de los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova* se encuentran en estómago e intestino de mamíferos marinos y los adultos de *Contracaecum* se encuentran en tracto digestivo de aves o de mamíferos marinos. En el caso del género *Hysterothylacium* los hospedadores definitivos son peces.

Los parásitos adultos de los tres principales géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*, se alojan en la mucosa gástrica o intestinal del huésped definitivo donde la hembra libera sus huevos al medio ambiente marino. Los huevos son elipsoidales, de cáscara gruesa, miden aproximadamente 46-58 x 41-53 μm y no están embrionados cuando son eliminados al agua junto con las heces del hospedador definitivo (Cordero del Campillo, 1999).

En este medio una vez embrionados eclosionan entre 20 a 27 días como L₂, esta larva libre es ingerida por pequeños crustáceos planctónicos (principalmente eufásidos) en los que se desarrolla la L₃ infectante para los hospedadores definitivos.

También los eufásidos con L₃ son ingeridos por peces y calamares, que son hospedadores paraténicos o de transporte, ya que las larvas permanecen en ellos, en la cavidad general, encapsuladas en el hígado, en músculo, etc., y sin sufrir ninguna muda, continúan siendo infectantes para los hospedadores definitivos.

Las larvas L₃ sobreviven en el agua 3-4 semanas a 13-18°C y 6-7 semanas a 5-7°C por encima de los 20°C aumenta la mortalidad (Rello *et al.*, 2004).

En el ciclo biológico participan gran variedad de peces y cefalópodos (hospedadores paraténicos) que ingieren hospedadores intermediarios (pequeños crustáceos) con L₃ lo que aumenta la probabilidad de infectar un hospedador definitivo ya que es muy difícil que éste se alimente casi exclusivamente de pequeños crustáceos.

Si los hospedadores intermediarios que contienen la forma larvaria L₃, son ingeridos por mamíferos marinos, la larva se adhiere a la pared gástrica evolucionando al cuarto estadio larvario L₄ y posteriormente a adulto, cerrándose así el ciclo.

Las larvas de anisákidos pueden causar alteraciones patológicas en muchas especies de peces marinos. Pueden verse afectados varios órganos, y el número de larvas en algunos casos llega a varios cientos por pez. El órgano más afectado suele ser el hígado y su atrofia es la alteración más común. (Acha y Szyfres, 2003)

El hombre es un huésped accidental que se interpone en el ciclo cuando ingiere (hospedadores intermediarios y/o paraténicos con la tercer fase larvaria) pescado o cefalópodos crudos o insuficientemente cocidos.

En el hombre la L₃ no llega a desarrollarse o sólo alcanza el cuarto estadio, y finalmente muere.

El ciclo del *Hysterothylacium* según Koie, 1993 in Rello *et al.*, 2004 es el siguiente: peces (Gadiformes) pueden contener en tracto digestivo las L₄ y los adultos, mientras que entre las vísceras y mesenterio se pueden hallar las L₃. Las hembras adultas liberan los huevos junto con las heces del hospedador y los mismos evolucionan a L₃. Las L₃ son ingeridas por algún hospedador intermediario (pequeños crustáceos, se han descrito más de cien especies que actúan como hospedadores intermediarios) donde han sufrido cierto crecimiento y son infectantes. También los pequeños crustáceos pueden ser comidos por otros peces, moluscos que también ofician de hospedadores intermediarios. Los peces hospedadores definitivos comen al hospedador intermediario (peces pequeños, moluscos, crustáceos) con la L₃ infectante y en el tracto digestivos de los peces se transforma en adulto, teniendo dos fases larvarias previas.

2.1.5 Localización de las Larvas en Peces Hospedadores

La localización de las larvas en los hospedadores es muy variable, se pueden encontrar en la superficie hepática, entre los mesenterios, gónadas o en la submucosa del tubo digestivo.

Por la ingestión y digestión posterior de los hospedadores intermediarios infectados (pequeños crustáceos), las larvas pueden encontrarse libres en la luz del intestino o penetrando a través de la pared de los peces.

Se pueden encontrar las larvas enrolladas en espiral y encapsuladas en distintos órganos del tubo digestivo (hígado, estómago, etc.) y en tejido muscular (Templeman, 1957) según Herreras *et al.*, 2000, más frecuente en región hipoaxial. Pueden permanecer infectantes por largo tiempo (1 a 3 años en el arenque) (Cordero del Campillo y Rojo, 1999).

A las pocas horas de la llegada de las larvas a la cavidad visceral comienza su encapsulación. Los sitios más frecuentes de encapsulación son el hígado y mesenterio, sobretodo el que rodea el tracto intestinal. También se encuentran larvas enquistadas en la musculatura, principalmente en los músculos hipoaxiales y ventrales, ya que son éstos los que rodean la cavidad visceral y por lo tanto, lo primero que encuentra la larva en su migración desde el lumen del tracto intestinal (Rello *et al.*, 2004).

Botto *et al.* en el año 1976, hallaron larvas de *Anisakis sp.* en merluza (*Merluccius hubbsi*) localizadas en el hígado en quistes lenticulares, subcapsulares y pigmentados, en 91 casos (50,5%) y también hallaron larvas libres en peritoneo (33,3%), en mesos genitales (5,5%), en mesos digestivos (5%), en retroperitoneo (5,5%) y en el espesor de la pared gástrica (0,5%). No hallaron larvas en el tejido muscular de la merluza.

2.2 Métodos de Detección de Larvas de Anisákidos en el Pescado

Existen varios métodos para la detección de larvas de nematodos en el músculo y/o las vísceras de los productos de la pesca, aunque la mayoría exigen deteriorar la pieza de pescado en su totalidad, son técnicas destructivas.

Alguno de los métodos utilizados (Gago *et al.*, 2006):

2.2.1 Examen visual simple (macroscópico)

Consiste en la búsqueda directa de las larvas en la superficie de las vísceras y en el músculo del pescado mediante cortes de un espesor de 5 milímetros aproximadamente, tarea que se realiza con pinzas y tijeras.

2.2.2 Examen por transiluminación "Candling"

Se utiliza este método para visualizar larvas en la profundidad del tejido muscular de los pescados, proyectando una fuente luminosa por la parte inferior, este trabajo se realiza con mesas iluminadas ("parasitoscopia").

Las larvas se ven como sombras oscuras en el músculo y se pueden extraer con pinzas y cuchillas.

Es una técnica con baja eficacia, no es recomendable para pescado con musculatura pigmentada y no se puede aplicar sobre una pieza entera.

Es el método que puede ser utilizado para la inspección de filetes en plantas pesqueras, aunque es de muy baja detección, 7 a 10% de los casos. (Levsen *et al.*, 2005)

2.2.3 Examen por digestión en jugo gástrico artificial o método de digestión artificial

En este método se somete la muestra de pescado (vísceras y/o músculo) a la acción de una solución digestiva (ácido clorhídrico y pepsina), reproduciendo las condiciones físico-químicas del estómago de los mamíferos, se recuperan las larvas mediante la digestión del tejido muscular que las rodea.

Con esta solución a pH 2 se incubaba a 37°C, agitando suavemente, por un período aproximado de 24 horas. Posteriormente la muestra se pasa por un filtro observando las larvas que quedan retenidas.

Es una técnica que permite recoger mayor cantidad de larvas, es una técnica costosa, destructiva, se utiliza para búsquedas más precisas en un pequeño número de especímenes. Por lo antes mencionado no es una técnica de rutina para realizar en planta frigorífica.

2.2.4 Examen por iluminación con luz ultravioleta

Es una técnica que tampoco puede llevarse a cabo en la industria. Es necesario un ambiente oscuro y la protección ocular para quien va a manipular los filetes bajo la luz.

Las larvas de *Anisakis* y *Pseudoterranova* se ven de color fluorescente azulado y las de *Contracaecum* de color amarillo (Gago *et al.*, 2006).

2.3 Fuentes de Infección y Patogenia

Una gran variedad de pescados y moluscos cefalópodos pueden transmitir la anisakiasis. En los años 70, Kagei y Oshima en Japón detectaron larvas de anisákidos en más de cien especies de peces (Rello *et al.*, 2004).

Ferré (2001), menciona cincuenta especies de peces: merluza (*Merluccius spp*), Caballa (*Scomber scombrus*), Atún (*Thunnus thynnus*), Salmón (*Salmo salar*), Arenque (*Clupea harengus*), Boquerón (*Engraulis encrasicolus*), Pulpo (*Octopus vulgaris*), Calamar (*Loligo vulgaris*), entre otras que se han estudiado como portadoras de larvas.

Años atrás, se consideraban sólo como posibles fuentes de infección pescados y cefalópodos de aguas saladas, pero estudios han demostrado la presencia de larvas en peces de aguas salobres, peces anádromos y en peces dulceacuícolas (Pardo *et al.*, 2007; Rello *et al.*, 2004).

Los principales alimentos implicados en la transmisión de la enfermedad al hombre, son elaborados a base de pescado o moluscos crudos, poco cocidos, ahumados en frío, salados suaves, conservados en vinagre o curados con limón, como los citados por el Comité Científico de la AESA (2005):

Gravlax en Noruega, Finlandia o Suecia; Cebiche en Perú y Chile; Boquerones en vinagre en España; Arenques salados o escabechados en Holanda; Sashimi, isushi en Japón; Lomi Lomi en Hawaii.

2.3.1 Patogenia:

La ingestión de pescado o moluscos portadores de L3 de anisákidos, pueden provocar en el hombre la aparición de diferentes patologías.

Las larvas infectantes llegan con los alimentos al tracto digestivo pudiéndose localizar en la mucosa gástrica o en la intestinal.

En el estómago, la larva se fija a la mucosa, y mediante la acción de peptidasas produce fenómenos irritativos locales que ocasionan síntomas inespecíficos, provocando sensación de plenitud, epigastralgia y vómitos. Si el parásito no es eliminado el cuadro evoluciona hacia una forma subaguda o crónica.

En ciertos casos las larvas pueden atravesar la pared gástrica o intestinal pudiendo originar granulomas o abscesos acompañados de eosinofilia, fiebre y diarrea.

Eventualmente pueden llevar a la confusión con cuadros de apendicitis o provocar verdaderas apendicitis así como cuadros obstructivos intestinales.

También se lo ha vinculado a casos de poliartritis y en otras localizaciones tales como pulmón, bazo, hígado y páncreas. (Zuloaga *et al* 2004)

En pacientes sensibles se han diagnosticado reacciones alérgicas; el parásito posee varios antígenos que pueden llegar a inducir la síntesis de IgE, y ocasionar cuadros alérgicos, variando desde una simple urticaria hasta un angioedema e incluso un *shock* anafiláctico. (Zuloaga *et al.*, 2004)

2.4 Anisakidosis

2.4.1 Antecedentes Históricos

Enfermedad que está relacionada estrechamente a los hábitos alimentarios de la población, se diagnostica mayormente en países donde se acostumbra a comer pescado crudo o con tratamiento térmico insuficiente.

El primer caso fue reportado en Holanda por Straubb en el año 1955 (boquerones de arenque), desde entonces numerosos nuevos casos se han descrito mundialmente.

Japón es el país con más pacientes diagnosticados, más de 2000 casos anuales, casi el 95% del total mundial. (Rello *et al.*, 2004)

En Europa (Países Bajos, Alemania, Francia, Italia y España) se notifican alrededor de 500 casos por año y en Estados Unidos 50 casos por año. En América Latina se han reportado casos humanos en Chile, Perú y Brasil. (Bandes *et al.*, 2005)

La lista de países en los que se han declarado casos clínicos es muy numerosa, figurando, entre otros: Alemania, Brasil, Canadá, Chile, Corea, Dinamarca, España, Estados Unidos, Francia, Noruega, Nueva Zelanda, Portugal y Reino Unido. (Rello *et al.*, 2004)

En Brasil, en el 2007 Amato *et al.* difunden sobre el probable reconocimiento de la anisakiasis humana en San Pablo; aunque ya otros autores lo nombran como país donde se ha diagnosticado la anisakidosis.

En Argentina, no han existido casos diagnosticados de esta zoonosis (Rey y Silvestre, 2005; comunicación personal Instituto Malbrán, 2006).

Según estudios realizados por Barriga *et al* (1999), la incidencia de casos aumenta por la presencia de comidas a base de pescado crudo o semi-crudo como el “Cebiche”, preparado con jugo de limón y especias que no disminuyen la viabilidad de las larvas presentes.

En Perú se han reportado 8 casos y es muy probable un subregistro de casos por la poca información sobre esta enfermedad (Cabrera y Trillo, 2004).

En Uruguay se hallaron índices de infección por *Anisakis sp.* en merluza (*Merluccius hubbsi*) y en pescadilla (*Cynoscyon guatucupa*) en un trabajo realizado por Botto *et al.*, 1976.

Los mismos autores difunden en ese trabajo que en Uruguay se comunicó un caso humano de parasitismo de la mucosa gástrica y en Venezuela varios casos de iliocolitis seudotumoral eosinofílica producidas por larvas de nematodos no identificados, y esto sugiere que el diagnóstico de esta parasitosis es difícil, y que la mayoría de los casos podían pasar desapercibidos en el pasado.

No se han registrado casos de anisakiosis humana en Uruguay.

2.4.2 Síntomas y lesiones

Los anisákidos pueden producir la enfermedad en el ser humano mediante dos mecanismos:

- Debido a la hipersensibilidad inmediata mediada por IgE
- Mediante el efecto local del parásito sobre la pared del tubo digestivo. (Zuloaga *et al.*, 2004)

2.4.2.1 Hipersensibilidad inmediata mediada por IgE:

El parásito posee varios antígenos que pueden inducir la síntesis de IgE, ocasionando diversos cuadros alérgicos.

Las manifestaciones alérgicas que se pueden presentar es muy variada: urticaria, angioedema, hipotensión y shock anafiláctico, e incluso asma o empeoramiento de un asma previo.

Puede variar la intensidad de los cuadros pero lo único característico es el antecedente de ingesta de pescado poco cocido horas previas a la presentación de los síntomas. (Zuloaga *et al.*, 2004)

A veces aparecen síntomas clínicos digestivos junto a manifestaciones cutáneas o anafilácticas, lo que se conoce como “forma gastroalérgica”, en la que predominarían los síntomas alérgicos y las manifestaciones digestivas quedan en un segundo plano.

Según Gago *et al.* (2006), se puede diferenciar dos tipos de reacciones alérgicas mediadas por *Anisakis simplex*:

- Reacción anafiláctica inducida por antígenos termoestables que se desarrolla aunque se consuma el pescado cocido o congelado.
- Anisakiasis gastroalérgica desencadenada por la ingesta de pescado crudo o insuficientemente cocido. Se diagnostica en pacientes que tras la ingesta de pescado bien cocido dan positivo al alérgeno en las pruebas cutáneas y en las de IgE específica y negativas en las del pescado implicado en la reacción.

Según Audicana *et al.* (2008), desde 1960 se asocia la anisakiasis gastroalérgica desencadenada por la ingesta de pescado crudo o insuficientemente cocido, y desde 1990 se asocia la reacción anafiláctica al consumo de pescado cocido o congelado.

Estos autores estudiaron la patogénesis de las reacciones de hipersensibilidad, sus alérgenos y mediadores.

2.4.2.2 Efecto local del parásito sobre la pared del tubo digestivo:

Anisakiasis gástrica o intestinal: las larvas llegan hasta la submucosa mediante la acción de una peptidasa, causando dolor epigástrico.

Estas larvas pueden anclarse en el estómago (forma gástrica) o en el intestino (forma intestinal), si no se extraen las larvas, la enfermedad evoluciona a una forma subaguda o crónica, pudiendo las larvas atravesar la pared gástrica o intestinal originando inflamaciones junto con fiebre, diarrea y dolor abdominal. (Gago *et al.*, 2006)

En la forma gástrica los síntomas digestivos aparecen rápidamente, en general entre una a 24 horas con una media de 6 horas pos ingesta, los síntomas que pueden presentarse son náuseas, vómitos, gastralgia, sangre oculta en las heces y puede aparecer como hallazgo de laboratorio eosinofilia pero no leucocitosis.

Según Zuloaga *et al.*, 2004, la localización gástrica se produce en un 60-70% de los casos.

En la forma intestinal el período de latencia es de una semana, los síntomas que pueden presentarse son dolor hipogástrico, náuseas, vómitos, fiebre, sangre oculta en las heces y como hallazgo de laboratorio leucocitosis marcada.

La mucosa afectada del intestino delgado, sobre todo en el íleon, se encuentra recubierta frecuentemente de un exudado fibrinoso que, junto con el edema de la pared, puede

provocar cuadros de obstrucción intestinal. También puede localizarse la larva en otros sitios del tracto digestivo como ciego, apéndice, colon y recto. (Rello *et al.*, 2004)

Se conoce una forma de presentación asintomática de la enfermedad, se da cuando el parásito no penetra los tejidos y permanece en el lumen del estómago o del intestino, por lo general esta forma es dada por *Pseudoterranova sp.* (Acha y Szyfres, 2003)

Se ha descrito también una afección mesentérica con ganglios regionales aumentados de tamaño. En menor número de casos se han encontrado larvas en el páncreas, la vesícula biliar y el pulmón. (Zuloaga *et al.*, 2004)

2.4.3 Diagnóstico y Tratamiento

2.4.3.1 Métodos de Diagnóstico:

Para llegar a un correcto diagnóstico de la enfermedad, la anamnesis es imprescindible. Se debe investigar el consumo de pescado o cefalópodos crudos o insuficientemente cocidos en las horas o días previos a la aparición de los síntomas.

El diagnóstico directo por medio del estudio del parásito es el método de elección, pero en el 50% a 70% de los casos gástricos es posible visualizar y recuperar el parásito por endoscopia. (Acha y Szyfres, 2003)

Se puede realizar una endoscopia gástrica en las horas o días siguientes a la aparición de los síntomas y así poder observar las larvas fijadas a la pared gástrica.

La radiografía es otra técnica de diagnóstico que se emplea para detectar la larva. Se utiliza en menor medida que la endoscopia debido a su menor eficacia. Sin embargo, es necesaria cuando no se puede realizar una endoscopia por causa de alguna lesión en el paciente. (Gago *et al.*, 2006)

Otro método de diagnóstico el examen anatomopatológico cuando se ha realizado una laparotomía exploratoria con resección del tramo intestinal afectado, permite confirmar la existencia de larvas o restos de ella.

El examen de sangre puede evidenciar eosinofilia o leucocitosis según sea el caso.

Las pruebas serológicas, particularmente el ELISA y la inmunoelectrotransferencia, son muy útiles para la evaluación clínica; sin embargo, se han notificado reacciones cruzadas con *Áscaris*. (Acha y Szyfres, 2003)

2.4.3.2 Diagnóstico Diferencial:

Debido a que los síntomas clínicos son poco específicos, hay un gran número de sintomatologías que son difíciles de distinguir de las de la Anisakiasis, por esta razón ha sido frecuentemente infradiagnosticada.

- Anisakiasis Gástrica: úlcera péptica, tumor gástrico, gastritis aguda.
- Anisakiasis Intestinal: peritonitis, apendicitis.
- Anisakiasis Gastroalérgica: hipersensibilidad, histamina, cuadros alérgicos.

2.4.3.3 Tratamiento:

Según Ferre (2001), no hay fármacos eficaces para esta afección por lo que el tratamiento de elección es la remoción mecánica por endoscopia.

Según Bolado *et al.* (2003), el mebendazol y el tiabendazol serían eficaces, pero Zuloaga *et al.* (2004), opinan que la eficacia del tratamiento con antihelmínticos, así como la administración de corticoides, con el fin de reducir el edema parietal no ha sido probada en

ensayos clínicos, y según estos autores existe un único trabajo reciente donde se demuestra la eficacia *in vitro* y en cobayas de la ivermectina y el albendazol contra *Anisakis* spp. En el caso de las alergias el tratamiento se basa en el uso de antihistamínicos, corticoides y adrenalina si se produce anafilaxia. (Gago., 2006 *et al.*)

En la tabla I se resumen las diferentes sintomatologías de la Anisakiasis y su diagnóstico.

Resumen de las Diferentes Sintomatologías y Diagnósticos de Anisakiasis

Anisakiasis	Digestiva		Alérgica
	Gástrica	Intestinal	
Síntomas	-Nauseas -Vómitos -Sangre oculta en heces -Gastralgia	-Nauseas -Vómitos -Sangre oculta en heces -Dolor hipogástrico -Fiebre	-Urticaria -Prurito -Conjuntivitis -Exemas -Anafilaxia - <i>Idem.</i> cuadro digestivo
Diagnóstico	-endoscopía -radiología -hallazgos de laboratorio (eosinofilia)	-examen anatomopatológico -hallazgos de laboratorio (eosinofilia)	-IgE específica -Determinación de Ag (Elisa)

Tabla I

2.4.4 Medidas de Prevención y control

La Anisakiasis se puede prevenir evitando el consumo de pescado crudo o insuficientemente cocido.

La mayoría de las especies de anisákidos peligrosos para el hombre mueren cuando son expuestos a temperaturas de -20°C por 24 horas o de 60°C por un minuto. (Acha y Szyfres, 2003)

Medidas preventivas antes de la comercialización, para disminuir el riesgo de padecer Anisakiasis, según el informe de Vigilancia Tecnológica realizado para la Asociación de Pescadores de la Comunidad Autónoma de Madrid (ADEPESCA), 2006:

- Evisceración del pescado en alta mar, inmediatamente después de su captura.
- Someter a las vísceras a algún tratamiento antes de eliminarlas al mar para destruir las larvas y que no infestan a otros peces.
- Examen visual del pescado en el desembarco y eliminación de aquellas partidas muy parasitadas.

La obligatoriedad de someter el pescado a bajas temperaturas antes de comercializarlo ha disminuido drásticamente la infección en los Países Bajos. (Acha y Szyfres, 2003)

Como consecuencia del incremento de casos de anisakiasis, la Unión Europea, la FDA (U.S. Food & Drug Administration), el ICSMF (Comité Internacional de Especificaciones

Microbiológicas) y la AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición), han establecido reglamentos, recomendaciones y guías para prevenir y minimizar su efecto negativo en la salud pública.

2.5 Legislación

2.5.1 Unión Europea

El Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, especifica que los productos de la pesca que se consumirán crudos o prácticamente crudos, se congelen a una temperatura igual o inferior a -20°C en la totalidad del producto, durante un período de al menos 24 horas.

Dicho tratamiento debe aplicarse a productos procedentes de ciertas especies sometidas a un proceso de ahumado en frío en el que la temperatura central del producto de la pesca no sobrepase los 60°C , y a productos de la pesca en escabeche o salados, cuando los mencionados procesos no sean suficientes para destruir las larvas de nematodos. (Departamento de Salud - Gencat, 2007)

Por su parte el Reglamento (CE) N° 2074/2005 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2005, establece normas detalladas que recaen sobre los operadores de empresas alimentarias relativas a las inspecciones visuales para detectar parásitos en los productos de la pesca. (Boletín Oficial Español, 2006)

2.5.2 Food & Drug Administration (FDA)

- a) Congelación y almacenaje a una temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante 7 días (temperatura total) en un congelador doméstico; congelación a $\leq -35^{\circ}\text{C}$ hasta que solidifique y almacenaje a la misma temperatura durante 15 horas;
- b) congelación a $\leq -35^{\circ}\text{C}$ hasta que solidifique y almacenaje a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. (Departamento de Salud. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, 2007)

2.5.3 Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos (ICSMF)

- a) Aconseja congelar a -20°C por 24 horas, alcanzar los 70°C en el centro térmico de la pieza.
- b) La sacarosa también puede inactivar al parásito requiriéndose concentraciones del 12% por 35 días mínimo.
- c) Por acidificación se necesitan 35 días a un pH de 4,2 y 6% de NaCl en el músculo. (AESAN, 2005)

2.5.4 Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)

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:

- a) Los establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades estarán obligados a congelar previamente al pescado que vaya a ser consumido crudo o poco cocido, a una temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante al menos 24 horas para destruir al parásito.

- b) Además, deberán poner en conocimiento de sus clientes, a través de carteles en las cartas del menú, entre otros procedimientos, que los productos que van a consumir han sido sometidos a esta congelación.
- c) Coincidiendo con la aprobación del decreto, los ministros de Sanidad y Agricultura, Pesca y Alimentación lanzan una campaña informativa sobre consejos básicos para prevenir la Anisakirosis, destinada a establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades.
- d) La AESAN pondrá también en marcha un plan nacional de control del *Anisakis* spp. en toda la cadena alimentaria. (www.aesan.msc.es)

3. Objetivos

- a) Determinar la presencia de larvas de anisákidos de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium* en pescadilla de calada (*Cynoscion guatucupa*) y en calamar (*Illex argentinus*), especies de interés comercial para el Uruguay.
- b) Reconocer morfológicamente macroscópicamente y microscópicamente larvas de anisákidos en pescadilla y calamar.
- c) Evaluar cuantitativamente las larvas de anisákidos usando los descriptores ecológicos: prevalencia, intensidad y abundancia media.
- d) Relacionar la infestación con la talla del ejemplar.
- e) Determinar las principales localizaciones anatómicas de las larvas de anisákidos en pescadilla y calamar.

4. Materiales y Métodos

Se buscaron larvas de la familia Anisakidae en 67 ejemplares de pescadilla de calada (*Cynoscion guatucupa*), pescadas en el Río de la Plata y en 30 ejemplares de calamar (*Illex argentinus*), los cuales fueron capturados en el Atlántico Sudoccidental.

El período de recolección de muestras estuvo comprendido entre abril y mayo de 2008, con una frecuencia semanal.

Se investigó la presencia de anisákidos por el método de observación visual directa, previamente de comenzar con la disección los diferentes ejemplares fueron identificados individualmente tomando registro de peso y talla (longitud estándar en el caso de la pescadilla).

El próximo paso fue la apertura de la cavidad abdominal donde se examinó visualmente las vísceras, el peritoneo y músculo buscando la presencia de parásitos nematodos. Se registró sexo de los ejemplares.

Se utilizó lupa-vincha y de mano para mejorar la visualización.

Las vísceras fueron retiradas para una inspección macroscópica detallada, como complemento de esta inspección se procedió a la apertura del aparato digestivo para verificar su contenido.

Para la recolección de datos se utilizó una planilla de muestreo especialmente diseñada para estos fines (figura I).

Todo el material colectado se fijó y conservó en alcohol 70° en tubos Eppendorf debidamente clasificados, según el número de ejemplar de pescadilla del que fueron extraídos ((figura II).

Finalizadas las tareas de recolección de muestras se comenzó con la determinación de las larvas de nematodos, basándose en la descripción de las características morfológicas de los anisákidos de acuerdo a los criterios mencionados por Cheng (1986), Nigmatullin y Shukhgálter (1990) y por Cordero del Campillo y Rojo (1999).

Previo a la observación microscópica, las larvas fueron aclaradas, colocándolas en solución de lactofenol por 24 horas mínimo, para poder apreciar las estructuras internas que ayudan a su identificación morfológica.

Las características morfológicas tenidas en cuenta para la identificación fueron:

- a. Posición del poro excretor
- b. Forma de la cola
- c. Longitud y forma del ventrículo
- d. Presencia, longitud y posición del ciego intestinal
- e. Presencia o ausencia del apéndice ventricular

El algunos casos el color de las larvas también fue utilizado como pauta para la identificación.

Para las tareas de determinación se utilizó:

- Microscopio estereoscópico: Nikon SMZ-10
- Microscopio óptico: Ernst Leitz Wetzlar; objetivos: 3 ½ / 0,10 y 10 / 0,45
- Lupa vincha: P-23 II, aumentos: X 1.8, X 2.3, X 3.7
- Lupa de mano: HI-POWER-COIL 2.3
-

Se tomaron registros fotográficos digitales de los ejemplares más representativos de los diferentes géneros estudiados (Olympus BX50; Rainbow CCTV HI-RES CLD46D 1/3" DSP CCD CAMERA; aumento 10 X 0.25).

PLANILLA DE MUESTREO

FECHA:

Nº MUESTRA:

ORIGEN DE EJEMPLAR:

TEMPERATURA DE EJEMPLAR:

LONGITUD DEL EJEMPLAR:

PESO DEL EJEMPLAR:

SEXO DEL EJEMPLAR: H M

INFESTADO (SI/NO):

Nº PARÁSITOS POR EJEMPLAR:

LOCALIZACIÓN:

CAVITARIA (peritoneo parietal, visceral.)

VISCERAL (intestino, hígado, gónadas, etc.,)

MUSCULAR

Nº DE TUBO:

OBSERVACIONES:

Figura I

Larvas de anisákidos (fijadas con alcohol) halladas en pescadilla



Figura II

G. Delgado, C. Friss de Kereki, 2008

En cada uno de los ejemplares examinados de pescadilla de calada (*Cynoscion guatucupa*) y de calamar (*Illex argentinus*) se cuantificó el número de parásitos encontrados y se determinaron los diferentes géneros hallados.

Se utilizaron como recomendación Bush *et al* (1997), los descriptores ecológicos del parasitismo:

- **Prevalencia:** número de hospedadores infectados con uno o más individuos de una particular especie parásita dividido por el número de hospedadores examinados (expresado en %).
- **Intensidad:** número total de individuos de una especie parásita en particular dividido el número de hospedadores parasitados.
- **Abundancia media:** número total de individuos de una especie parásita en particular dividido el número de hospedadores examinados.

Se compararon la Abundancia media e Intensidad de larvas de la familia Anisakidae presentes en pescadilla de calada (*Cynoscion guatucupa*) y en calamar (*Illex argentinus*).

Se utilizaron gráficos sectoriales y tablas para representar los datos obtenidos.

5 Resultados

5.1 LARVAS DE ANISÁKIDOS EN PESCADILLA (*Cynoscion guatucupa*).

De un total de 67 ejemplares de pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) examinados por el método de examen visual se hallaron 24 ejemplares parasitados con larvas de nematodos anisákidos, lo que representa una prevalencia del 36%, una intensidad de infección de 9,4 y una abundancia media de 3,3. (Tabla II)

Descriptores ecológicos del parasitismo de *Cynoscion guatucupa*

Prevalencia	36%
Intensidad	9,4
Abundancia media	3,3

Tabla II

El rango de infección en pescadilla fue de 1 a 55 larvas de anisákidos. Las larvas de anisákidos halladas durante este período en pescadilla pertenecían a los géneros *Anisakis* (figura III y IV), *Pseudoterranova* (figura V) y *Contracaecum* (figura VI).

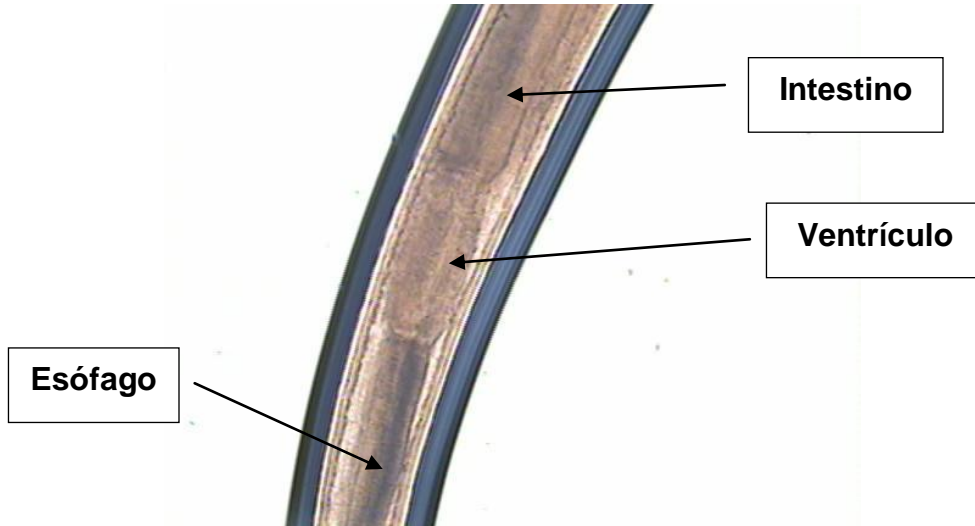


Figura III

Anisakis sp.

G. Delgado, C. Friss de Kereki, 2008

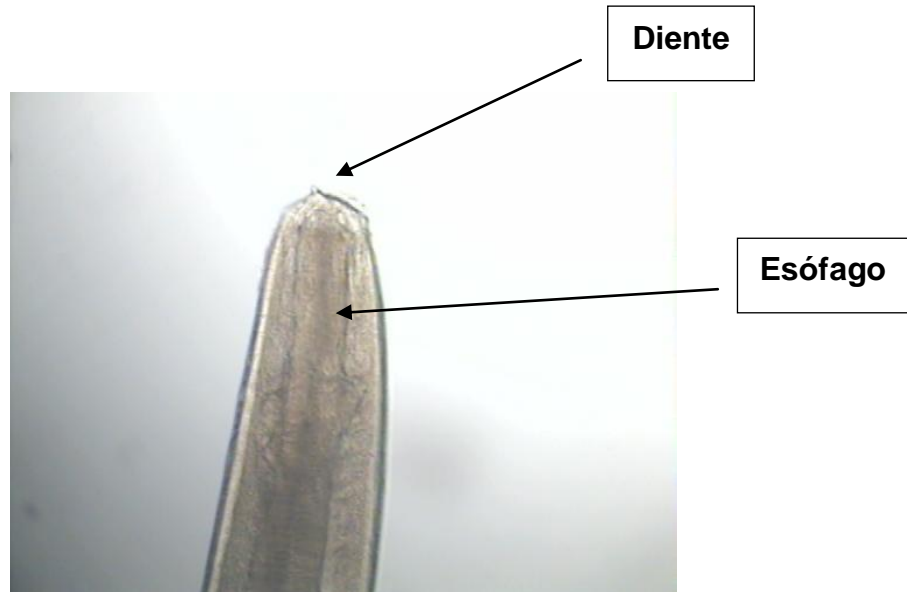


Figura IV
Anisakis sp.
G. Delgado, C. Friss de Kereki, 2008

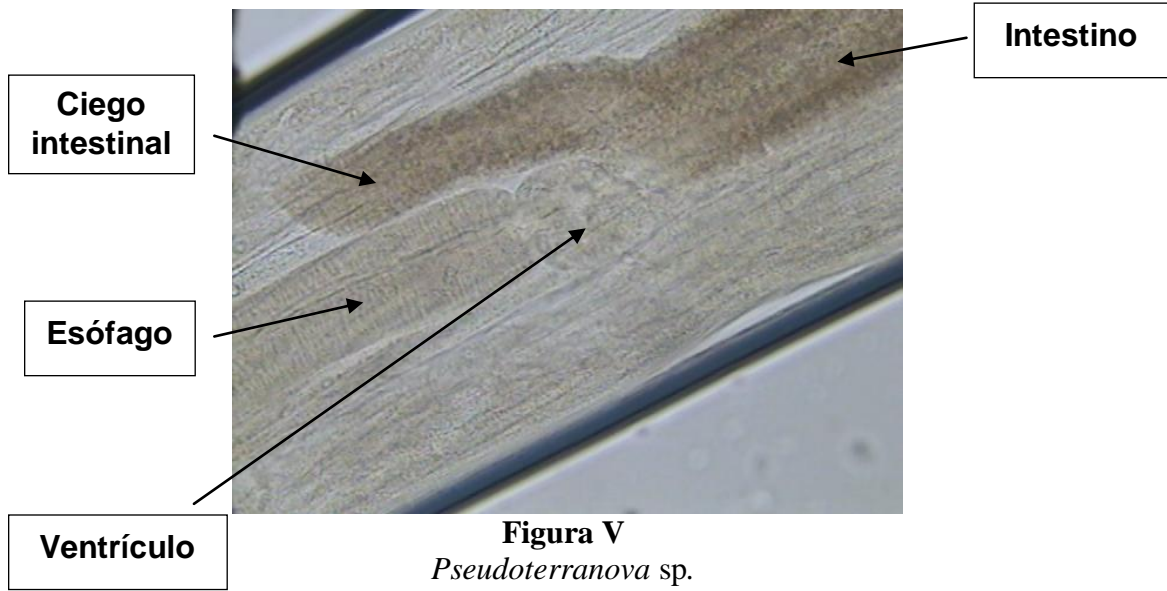
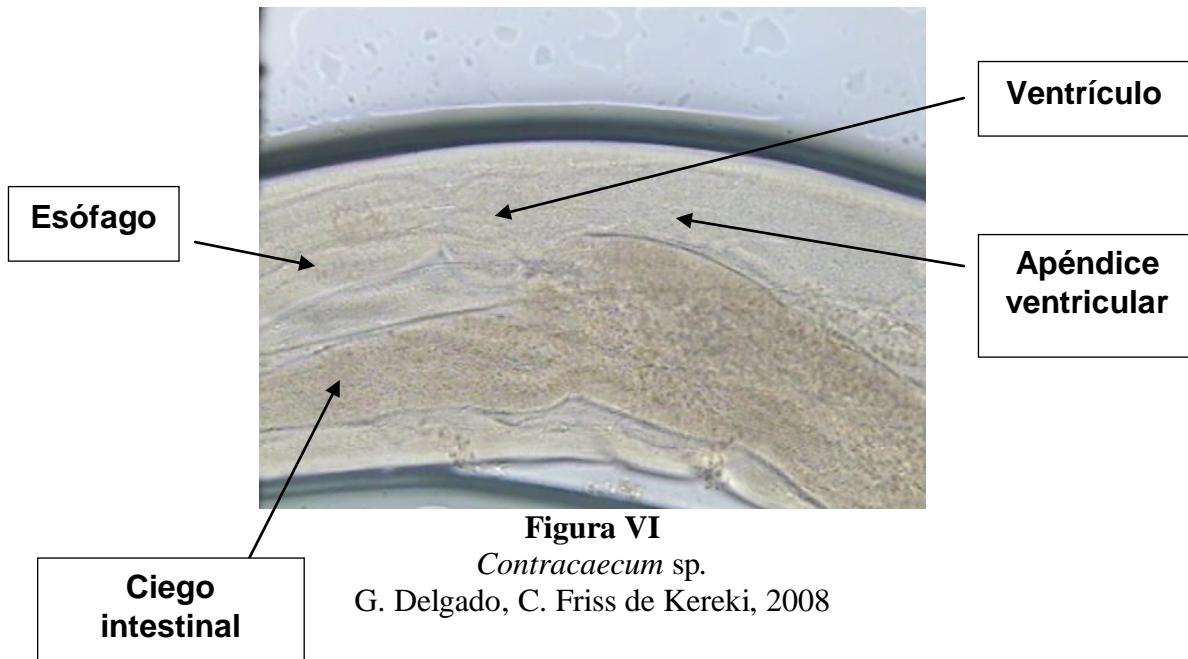
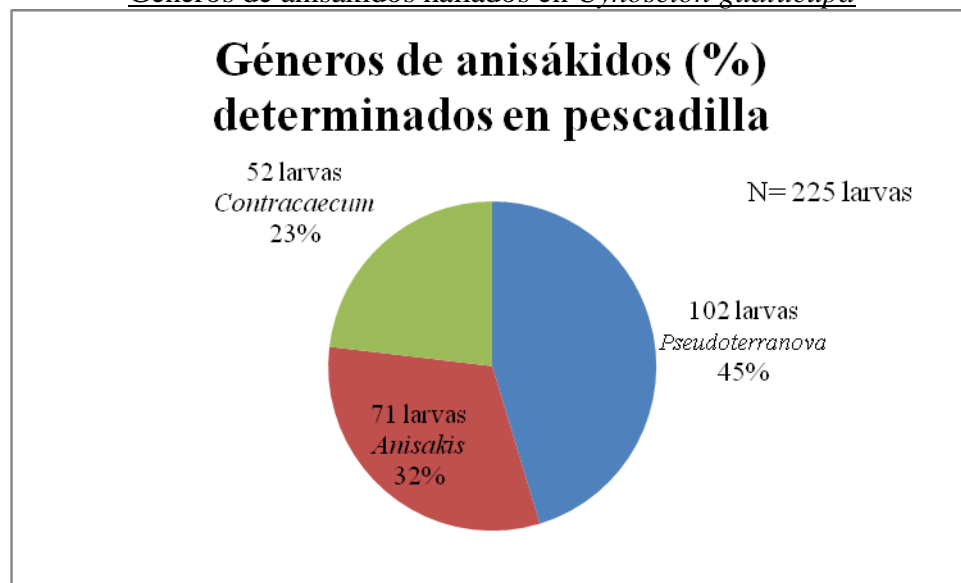


Figura V
Pseudoterranova sp.
G. Delgado, C. Friss de Kereki, 2008



Cómo puede verse en la gráfica I, de un total de 225 larvas el 45% de las larvas encontradas pertenecían al género *Pseudoterranova*, el 32% al género *Anisakis* y el 23% al género *Contracaecum*.

Géneros de anisákidos hallados en *Cynoscion guatucupa*



Gráfica I

En las 24 muestras positivas se recolectaron larvas de anisákidos localizadas anatómicamente en peritoneo parietal, visceral, hígado y gónadas. No fueron halladas larvas en tejido muscular.

Los anisákidos visualizados en el hígado (figura VII) de las muestras de pescadilla se presentaron en la superficie, no en el parénquima, enrollados en espiral y generalmente, dejaban una huella en la superficie hepática por debajo de la cápsula, al extraerlas algunas presentaron motilidad.



Figura VII

Larva en superficie de hígado de *Cynoscion guatucupa*
G. Delgado, C. Friss de Kereki, 2008

Las larvas halladas en la cavidad general (figura VIII) se presentaban libres y con motilidad en algunos casos.



Figura VIII

Larvas en cavidad y peritoneo parietal de *Cynoscion guatucupa*
G. Delgado, C. Friss de Kereki, 2008

Fueron calculados los parámetros ecológicos con los datos obtenidos y resultó que la prevalencia fue mayor para el género *Anisakis*, pero la intensidad y la abundancia fueron mayores para el género *Pseudoterranova* (tabla III).

- N° total de pescadillas examinadas: 67
- N° total de pescadillas parasitadas: 24
- N° total de larvas: 225
- N° larvas de *Anisakis* sp. : 71
- N° larvas de *Pseudoterranova* sp. : 102
- N° larvas de *Contracaecum* sp. : 52
- 20 pescadillas con *Anisakis* sp.
- 19 pescadillas con *Pseudoterranova* sp.
- 15 pescadillas con *Contracaecum* sp.

Prevalencia, Intensidad y Abundancia de cada género encontrado en *Cynoscion guatucupa*

	Prevalencia	Intensidad	Abundancia
<i>Anisakis</i> sp.	29,9%	3,6	1,05
<i>Pseudoterranova</i> sp.	28,4%	5,4	1,5
<i>Contracaecum</i> sp.	22,4%	3,5	0,8

Tabla III

Según los resultados obtenidos, a mayor talla del ejemplar de pescadilla mayor abundancia (tabla IV).

Prevalencia, Intensidad y Abundancia de larvas según talla de *Cynoscion guatucupa*

Talla (cm)	N° pescadillas	Prevalencia	Abundancia	Intensidad
23,1 - 27,0	7	14,3%	0,86 ± 2,27	6
27,1 - 33,0	27	25,9%	1,41 ± 5,06	5,43 ± 9,25
33,1 - 37,0	18	44,4%	5,44 ± 12,90	12,25 ± 17,58
37,1 - 43,0	15	53,3%	5,53 ± 8,75	10,38 ± 9,78

Tabla IV

5.2 LARVAS DE ANISÁKIDOS EN CALAMAR (*Illex argentinus*)

De un total de 30 ejemplares de calamar (*Illex argentinus*) examinados por el método de examen visual se hallaron 8 ejemplares parasitados con larvas de nematodos anisákidos, lo que representó una prevalencia del 27%, una intensidad de infección de 1,5 y una abundancia media de 0,4. (Tabla V)

Descriptores ecológicos del parasitismo de *Illex argentinus*

Prevalencia	27%
Intensidad de infección	1,5
Abundancia media	0,4

Tabla V

El rango de infección en calamar fue de 1 a 3 larvas de anisákidos. Las larvas de anisákidos halladas durante este período en calamar (*Illex argentinus*) pertenecían a los géneros *Anisakis* (figura IX), *Pseudoterranova* y *Contracaecum*.

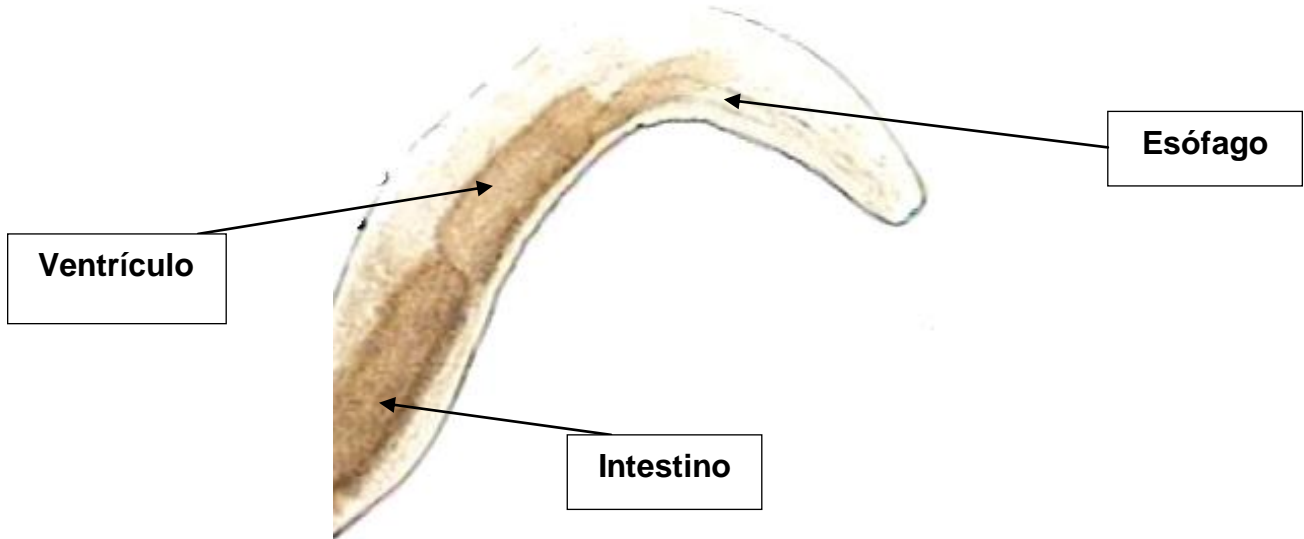
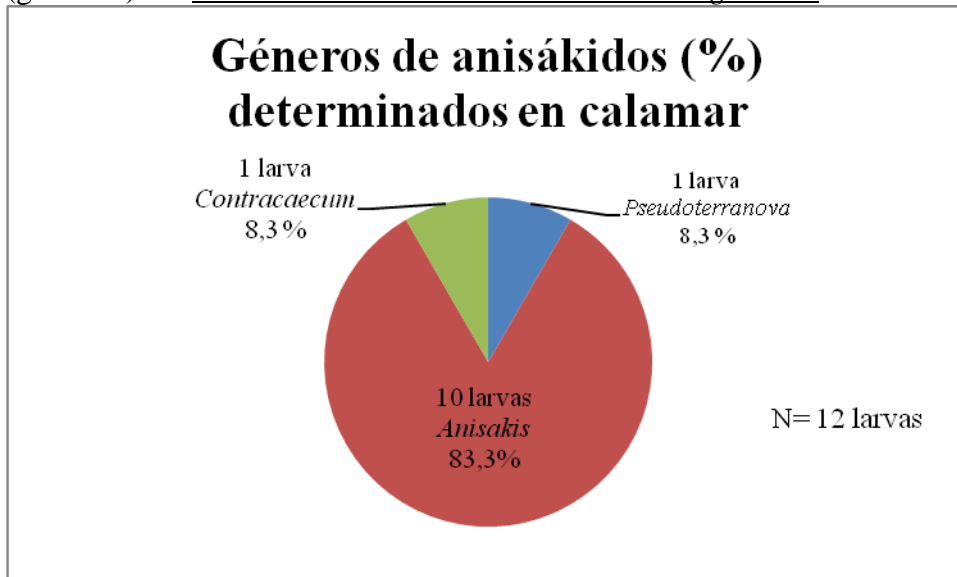


Figura IX *Anisakis* sp.

C. Friss de Kereki, G. Delgado, 2008.

Se encontró un total de 12 larvas de anisákidos y el 83,3 % de las larvas correspondían al género *Anisakis*, el 8,3 % al género *Pseudoterranova* y el 8,3 % al género *Contracaecum* (gráficaII). Géneros de anisákidos hallados en *Illex argentinus*



Gráfica II

En las 8 muestras positivas se recolectó la totalidad de las larvas de anisákidos de la superficie del estómago, encapsuladas y enrolladas en espiral (figura X).



Figura X

Larva encapsulada en estómago de *Illex argentinus*

G. Delgado, C. Friss de Kereki, 2008

Al calcular las varianzas que resultaron ser altamente desiguales, se comparó a través del *Test* de t (de *Student*) la abundancia e intensidad de las larvas de la familia anisakidae entre pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) y calamar (*Illex argentinus*), y se obtuvieron los siguientes datos:

a) Abundancia

- $t = 2,79$ (con 68 grados de libertad)
- $P < 0,01$

b) Intensidad

- $t = 3,09$ (con 24 grados de libertad)
- $P < 0,01$

Podemos interpretar con estos resultados que la abundancia y la intensidad de las larvas en pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) fue mayor ($P < 0,01$) que en calamar (*Illex argentinus*). Según los datos representados en la tabla VI, se puede apreciar que la prevalencia, intensidad y abundancia son mayores para el género *Anisakis*.

- N° total de calamares examinados: 30

- N° total de calamares parasitados: 8
- N° total de larvas: 12
- N° larvas de *Anisakis* sp.: 10
- N° larvas de *Pseudoterranova* sp.: 1
- N° larvas de *Contracaecum* sp : 1
- 7 calamares con *Anisakis* sp.
- 1 calamar con *Pseudoterranova* sp.
- 1 calamar con *Contracaecum* sp.

Prevalencia, Intensidad y Abundancia de cada género encontrado en *Illex argentinus*

	Prevalencia	Intensidad	Abundancia
<i>Anisakis</i> sp.	23,3%	1,42	0,33
<i>Pseudoterranova</i> sp.	3,3%	1	0,03
<i>Contracaecum</i> sp.	3,3%	1	0,03

Tabla VI

En las muestras estudiadas no se determinó *Hysterothylacium* sp., cabe destacar que 92 larvas de nematodos no pudieron ser determinadas morfológicamente porque no fue posible visualizar las estructuras utilizadas para su determinación.

Hay trabajos que determinan la presencia de *Hysterothylacium* sp. en aguas del Océano Atlántico Sudoccidental en peces, crustáceos y cefalópodos (Nigmatullin y Shukhálter, 1990; Navone *et al.*, 1998; Braicovich *et al.*, 2006).

6. Discusión

6.1 Descriptores Ecológicos

La prevalencia fue mayor para *Anisakis* sp. en *Cynoscion guatucupa* coincidiendo con algunos estudios regionales (Herreras *et al.*, 2000; Incorvaia, 2001), americanos (Castillo *et al.*, 1998), europeos (Huang, 1988; Dambrosio *et al.*, 2005; Szostakowska *et al.*, 2005; Valero *et al.*, 2006) y asiáticos (Ma *et al.*, 1997), que todos hallan una mayor prevalencia de *Anisakis* sp. Ninguna de estas investigaciones tienen como especie objetivo a la pescadilla de calada (*Cynoscion guatucupa*), que fue objeto de este estudio. Los regionales centran sus estudios principalmente en merluza (*Merluccius hubbsi*), la cual es una especie de altura. La pescadilla es costera, por lo que su hábitat es diferente y podrían esperarse prevalencias diferentes pero no fue así.

El único antecedente nacional donde se estudia la presencia de *Anisakis* sp. en *Cynoscion guatucupa* es el trabajo publicado por Botto y col. (1976), encontrando una prevalencia

para *Anisakis sp.* del 6,3%, contrastando con el 29,9% que se determinó en este estudio. Es de destacar que Botto *et al.* (1976), comunican que 37,5% de las pescadillas (*Cynoscion guatucupa*) presentan larvas de nematodos que no fueron identificadas.

En cuanto a los géneros *Pseudoterranova* y *Contracaecum*, si bien sus prevalencias (28,4% y 22,4% respectivamente), fueron similares a los de *Anisakis sp.* (29,9%), para *Pseudoterranova sp.* fue mucho mayor que la encontrada por Herreras *et al.* (2000), de 9,5%. Estos resultados estarían justificados debido a que en el Océano Atlántico hay mayor población de pinnípedos que en el Océano Pacífico (Myers, 1979).

Por su parte Bandes *et al.* (2005), encuentran una prevalencia importante de *Pseudoterranova sp.* (56%) y *Contracaecum sp.* (48%) en mugílidos de Venezuela, y Barros y Webb (1998) hallan una prevalencia de *Contracaecum sp.* de 20,7% en pargos (*Lutjanus purpureus*), 48% en doradas (*Coryphaena hippurus*). Estos últimos autores hallan una prevalencia baja para el género *Anisakis* de 2,4% y 1% respectivamente.

Knoff *et al.* (2001), encontraron una prevalencia importante de *Pseudoterranova sp.* (10-14%) en algunos peces elasmobranquios en el Estado de Río Grande do Sul.

Aunque la prevalencia (29,9%) fue mayor para el género *Anisakis*, la intensidad (5,4) y la abundancia (1,5) fueron mayores para el género *Pseudoterranova*.

6.2 Localización Anatómica de Larvas

En la bibliografía se cita que una de las localizaciones frecuentes de las larvas de anisákidos es el tejido muscular (Cordero del Campillo y Rojo, 1999; Herreras *et al.*, 2000; Ferré, 2001; Abollo *et al.*, 2001; Rello *et al.*, 2004; Ministerio de Sanidad y Consumo – AESA, 2005; Gago *et al.*, 2006.)

Sin embargo en este estudio no fueron halladas larvas con esa localización anatómica en los especímenes estudiados, esto es coincidente con los trabajos de Botto y Mañé (1976). Wharton *et al.* (1999), señalan que no encontraron evidencias de la migración de larvas hacia el músculo *post mortem* refutando los hallazgos de Smith y Wootten (1975) y Myers (1979). Según Smith (1984) la migración al músculo es evidente en especies grasas y no en magras; esta afirmación podría corresponder ya que la pescadilla de calada es una especie magra.

Las larvas en pescadilla fueron detectadas en peritoneo parietal, visceral, sobre ciegos pilóricos, encapsuladas en superficie de estómago, encapsuladas o libres en superficie de hígado y libres sobre gónadas. En *Illex argentinus* fueron encontraban todas las larvas en la superficie del estómago (encapsuladas). Al igual que los estudios de Nagasawa y Moravec (2002), donde hallan las larvas de anisákidos encapsuladas en estómago de otras especies de calamar del Océano Pacífico Norte y los de Nigmatullin y Shukhálter (1990) que encuentran la misma localización en *Illex argentinus* del Atlántico Sudoccidental.

6.3 Talla de *Cynoscion guatucupa* y abundancia de larvas de anisákidos

Si bien la prevalencia y la abundancia aumentaron con la talla de *Cynoscion guatucupa*, no se pudo generalizar, sólo con los resultados de este estudio.

Templeman *et al.* (1957) investigaron en más de 15000 ejemplares de bacalao y concluyeron que el tamaño de los ejemplares no influye mayormente en una mayor parasitación, sí el hábitat, la alimentación y los cambios de nicho y comportamiento de los peces a medida que van desarrollándose (juveniles-adultos).

Según Rello *et al.* (2004), la prevalencia e intensidad de los parásitos tendría más relación con la especie de hospedador que con su tamaño, “si bien dentro de una misma especie, el aumento de tamaño suele ir ligado a un aumento en la parasitación (tanto en vísceras como en musculatura)”.

7 Conclusiones

Con la metodología utilizada se logró determinar larvas de *Anisakis* sp., *Pseudoterranova* sp. y *Contracaecum* sp. en pescadilla de calada (*Cynoscion guatucupa*) y calamar (*Illex argentinus*).

La totalidad de las larvas determinadas en *C. guatucupa* se encontraban en peritoneo parietal, visceral, superficie estómago, hígado y gónadas y en *I. argentinus* se encontraban encapsuladas en la superficie de estómago, no habiéndose encontrado ninguna en el músculo de las dos especies inspeccionadas.

Se determinó una mayor prevalencia del género *Anisakis* en las dos especies estudiadas pescadilla y calamar; pero la intensidad y abundancia media fueron mayores para *Pseudoterranova* en la pescadilla.

8.Recomendaciones

Utilizar a los fines de la investigación el método de digestión artificial, a pesar que éste no sea capaz de detectar la totalidad de las larvas en el músculo. Esta actividad sería netamente académica debido a que al no poder utilizarse de rutina en planta, no tendría repercusión práctica, por ser una técnica totalmente destructiva.

Así mismo es importante realizar estudios orientados a confirmar o refutar la teoría de la migración *post mortem* de las larvas hacia el músculo.

Se debería continuar esta investigación por lo menos hasta completar un año calendario abarcando distintas estaciones del año, tallas, edades y sexos.

Este estudio evidenció la necesidad de seguir profundizando en el tema, en cefalópodos en especial calamar, por su importancia comercial para nuestro país, así como incluir otros productos de la pesca de interés comercial.

9. Referencias bibliográficas

1. Abollo, E.; Gestal, C.; Pascual, S. (2001) Anisakis infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an update perspective. *Parasitol. Res* 87: 492-499. 2001.
2. Acha, P.; Szyfres, B. (2003) Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 3ª ed. Washington, Organización Panamericana de la Salud, vol 3 Parasitosis, pp.241-246.
3. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2006) Real Decreto que mejora la protección de los consumidores. Disponible en: www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/proteccion_consumidores.shtml .
Fecha de consulta: 13/11/2008.
4. Amato, V.; Gomes, J.; Sabtuga, V. (2007) Probable recognition of human anisakiasis in Sao Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 49(4): 261-262.
5. Audicana, M. T.; Kennedy, M. W. (2008) Anisakis simplex: from Obscure Infectious worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21 (2): 360-379.
6. Bandes, A. ; Selgred, S. ; Ríos, M. ; Salas, H. (2005) Nematodos de la Familia Anisakidae em el pescado fresco que se expende para el consumo humano em Caracas, Venezuela. *INHRR* 36 (2): 44-71. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve>
Fecha de consulta: 22/5/08
7. Barriga, J.; Salazar, F.; Barriga, E. (1999) Anisakiasis: Presentación de un caso y revisión de la literatura. *Rev. Gastroenterol. Perú*, 19 (4): 317-323.
8. Barros, G.; Webb, J. (1998) Larvas infectantes de anisakídeos em peixes de elevado consumo, provenientes do litoral nordeste do Brasil. *Revista Higiene Alimentar, Sao Pablo.*, 12 (58): 71-75.
9. Botto, C.; Osimani, J.; Mañé F. (1976) Sobre la presencia de larvas de *Anisakis sp.* en peces de la costa Atlántica Uruguaya y su patogenicidad experimental para el perro y el gato. *Revta. Urug. Patol. Clin. y Microbiol.*, 3(2): 49-62.

10. Bolado, A.; Gorriño, O.; Ruiz, P.; Lecumberri, I.; Grande, D. (2003) Anisakiasis intestinal. Diagnóstico radiológico. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 95(6): 440-445.
11. Bouree, P.; Paugam, A.; Petithory, J.C. (1995) Anisakidosis: report of 25 cases. *Comp. Inn. Microbiol. Infect. Dis.*, 18: 75-84.
12. Braicovich, P. E.; Timi, J. T.; Etchegoin, J. A. (2006) Determinación de unidades poblacionales de pez palo *Percophis brasiliensis* (Percophidae) mediante el uso de sus parásitos como indicadores biológicos. VI Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. Puerto Madryn, Argentina. Libro de resúmenes, p126.
13. Bush, A.; Lafferty, K.; Lotz, J.; Shostak, A. (1997) Parasitology meets ecology in its own term: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.*, 83(4): 575-583.
14. Cabrera, R.; Luna – Pineda, M.; Suarez – Ognio, L. (2003) Nuevo caso de infección humana por una larva de *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) en el Perú. *Rev. Gastroenterol. Perú.*, 23(3): 217-220.
15. Cabrera, R.; Trillo-Altamirano, M. (2004) Anisakidosis: ¿Una zoonosis parasitaria desconocida o emergente en el Perú? *Rev. Gastroenterol. Perú.*, 24: 335-342.
16. Castillo, E.; Rosales, J.; Pérez, G. (1998) Helmintos parásitos de *Paralichthys californicus* (Osteichthyes: Paralichthyidae) en el estero de Punta Banda, Bahía de Todos Santos y Bahía de San Quintín, Baja California, México. *Ciencias marinas*, 24(4): 443-462.
17. Cordero del Campillo, M.; Rojo, F. (1999) Parasitología Veterinaria. Madrid. Mc. Graw-Hill, Interamericana, pp. 901-907.
18. Cheng, T. (1986) General Parasitology. 2^a ed. Orlando. Academic Press, pp 523-528.
19. Dambrosio, A.; Normando, G.; Quaglian, N.; Lia, R.; Lorusso, V.; Laneve, A.; Celano, G.; Germinario, L. (2005) Microbiological quality and presence of *Anisakis spp.* in fresh fish marketed in Abulia Region. *Ind. Alimentari.*, 44(452): 1105-1111.
20. España. 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. (302): 44547-44549.

21. España. Departamento de Salud. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. (2007) La eficacia de la congelación para la destrucción de nematodos en los productos de la pesca.
Disponible en: www.gencat.com Fecha de consulta: 25/10/2008.
22. España. Ministerio de Sanidad y Consumo. (2005) Opinión del comité científico de la Agencia Española de Sanidad y Alimentaria sobre una cuestión presentada por la Presidencia en relación con los factores favorecedores de la aparición de alergia a anisakis, así como de las medidas de prevención aplicables. Madrid, AESA, 20pp.
Disponible en:
www.aesan.msc.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/detalle/anisakis.shtml
Fecha de consulta: 13/01/08.
23. Ferre, I. (2001) Anisakiosis y otras zoonosis parasitarias transmitidas por consumo de pescado. *Revista AquaTIC*, 14(7): 1-21.
Disponible en: <http://aquatic.unizar.es/N3/art1401/anisakis.htm>
Fecha de consulta: 11/10/05
24. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2007) El estado mundial de la pesca y la acuicultura- 2006. Roma. FAO Fisheries Department, 176pp.
25. Food And Drug Administration. (2005) Anisakis simplex and related worms, Bad Bug Book.
Disponible en: www.cfsan.fda.gov Fecha de consulta: 6/07/08.
26. Gago, L.; García, E.; Fernández, J. L.; González, J. M. (2006) Métodos para la detección e inactivación de *Anisakis simplex* y patologías que producen. Informe de Vigilancia Tecnológica. Madrid, ADEPESCA, 55pp.
27. Herreras, V.; Aznar, J.; Balbuena, J.; Raga, J. (2000) Anisakid larvae in the musculatura of the argentinean hake, *Merluccius hubbsi*. *Journal of Food Protection*, 63(8): 141-1143.
28. Huang, W. (1988) Anisakids and human anisakiasis. Investigation of the anisakids of comercial fish in the district of Paris. *Ann Parasitol Hum Comp*, 63(3):197-208.
29. Huss, H. H. (1997) Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. Roma. FAO. Documento Técnico N° 334, pp. 37-40.

30. Incorvaia, I. (2001) *Anisakis simplex* parasita de *Merluccius hubbsi*. Mar del Plata. INIDEP Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. Informe técnico. 12 pp.
31. Knoff, M.; Carmona de Sao Clemente, S.; Magalhaes, R.; Correa, D. (2001) Nematodos of elasmobranch fishes from the southern coast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(1): 81-87.
32. Laffon-Leal, S.; Vidal Martinez, V.; Arjona-Torres, G. (2000) "Cebiche" – a potential source of human anisakiasis in Mexico? *Journal of Helminthology*, 74:151-154
33. Levsen, A., Lunestad, B.T., Berland, B. (2005) Low detection efficiency of candling as a commonly recommended inspection method for nematode larvae in the flesh of pelagic fish. *J. Food Prot.* 68(4):828-32.
34. Ma, H. W.; Jiang, T. J.; Quan, F. S.; Chen, X. G.; Wang, H.; Zhang, Y. S.; Cui, M. S.; Zhi, W. Y.; Jiang, D. C. (1997) The infection status of anisakid larvae in marine fish and cephalopods from the Bohai Sea, China and their taxonomical consideration. *The Korean Journal of Parasitology*, 35(1): 19-24.
35. Mercado, R.; Torres, P.; Gil, L.; Goldin, L. (2006) Anisakiasis en una paciente portadora de una pequeña hernia hiatal. Caso clínico. *Revista Médica de Chile*, 134: 1562-1564.
36. Martinez, I.; James, D.; Loréal, H. (2005) Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity. Food and Agriculture Organization. *Fisheries Technical Paper* N° 455. Rome, FAO. 73 p
37. Myers, B. J. (1979) Anisakine nematodes in fresh commercial fish from waters along the Washington, Oregon and California Coasts. *Journal of Food Protection*, 42(5):44-48.
38. Nagasawa, K.; Moravec, F. (2002) Larval anisakid nematodes from four species of squid (Cephalopoda: Teuthoidea) from the central and western North Pacific Ocean. *Journal of Natural History*, 36: 883-891.

39. Navone, G.; Sardella, N.; Timi, J. (1998) Larvae and adults of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi 1802) (Nematoda: Anisakidae) in fishes and crustaceans in the South West Atlantic. *Parasite* 5: 127-136.
40. Nawa, Y.; Hatz, C.; Blue, J. (2005) Sushi delights and parasites: The risk of fishborne and foodborne parasitic zoonoses in Asia. *Clinical Infectious Diseases*, 41: 1297-1303.
41. Nigmatullin, Ch.; Shukhgálter, O. A. (1990) Helmintofauna y aspectos ecológicos de las relaciones parasitarias del calamar (*Illex argentinus*) en el Atlántico Sudoccidental. Comisión Técnica Mixta del Frente marítimo. Montevideo. *Revista Frente Marítimo*, 7: 57-68.
42. Pardo S.; Mejía, K.; Navarro, Y.; Atencio, V. (2007) Prevalencia y abundancia de *Contracaecum sp.* en rubio *Salminus affinis* en el Río Sinú y San Jorge: descripción morfológica. *Rev. Med.Vet.Zoot. Córdoba* 12(1): 887-896.
43. Pereira, A. D.; Atui, M. B.; Torres, D.; Mangini, A. C.; Zamboni, C. Q. (2000) Incidencia de parasitos da familia Anisakidae em bacalhau (*Gadus morhua*) comercializado no Estado de Sao Paulo. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 59(1/2):45-49.
44. Rello, F. J.; Adroher, F. J.; Valero, 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(1): 173-197.
45. Rello, F. J.; Adroher, F. J.; Valero, A. (2008) *Hysterothylacium aduncum*, the only anisakid parasite of sardines (*Sardina pilchardus*) from the southern and Eastern coasts of Spain. *Parasitol. Res.* 104(1):117-21.
46. Rey, A. M.; Silvestre, A. (2005) Comer sin Riesgo 2. Las enfermedades transmitidas por alimentos. 2ª ed. Buenos Aires. Hemisferio Sur, pp.174-177.
47. Smith, J.W.; Wooten, R. (1975) Experimental studies on migration of *Anisakis sp.* Larvae into the flesh of herring *Clupea harengus*. *Int. J. Parasitol.* 5:133-136.
48. Smith, J.W.; Wooten, R. (1978) *Anisakis* y anisakiasis. *Adv.Parasitol.* 16: 93-163.
49. Szostakowska, B.; Myjak, P.; Wyszynski, M.; Pietkiewicz, H.; Rockicki, J. (2005) Prevalence of Anisakin Nematodos in Fish from Southern Baltic Sea. *Polish Journal of Microbiology*, 54(1): 41-45.

50. Templeman, W.; Squires, H.; Fleming, A. (1957) Nematodes in the fillets of cod and other fishes in Newfoundland and Neighbouring Areas. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 14 (6): 831-897
51. United States of America. Food and Drug Administration. (2001) Fish and Fisheries products hazards and controls guidance. 3^a ed., US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington DC.
Disponible en: www.cfsan.fda.gov/~comm/haccpsea.html
Fecha de consulta: 3/10/08.
52. Valero, A.; López-Cuello, M^a.; Benítez, R.; Adroher, F. (2006) *Anisakis* spp. In European hake, *Merluccius merluccius* (L.) from the Atlantic off north-west Africa and the Mediterranean off southern Spain. *Acta Parasitologica*, 51(3), 209-212.
53. Wharton, D. A.; Hassall, M. L.; Alders, O. A. (1999) *Anisakis* (Nematoda) in some New Zealand inshore fish. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 33: 643-648.
54. Zuloaga, J.; Arias, J.; Balibrea, J. L. (2004) Anisakiasis digestiva. Aspectos de interés para el cirujano. *Cirugía Española* 75(1): 9-13.