

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología Departamento de Farmacología

Capacidad infectiva de las larvas L₃ de *Anisakis* y
búsqueda de nuevos compuestos naturales activos
frente a la anisakiosis



D^a. María del Carmen Romero López

Granada, Julio de 2014

Biología Fundamental y de Sistemas

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María del Carmen Romero López
D.L.: GR 1987-2014
ISBN: 978-84-9083-187-8

La Dra. Adela Valero López, Catedrática del Departamento de Parasitología, la Dra. M^a Concepción Navarro Moll, Catedrática del Departamento de Farmacología, y la Dra. Joaquina Martín Sánchez, Catedrática del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, Directoras de la Tesis “Capacidad infectiva de las larvas L₃ de *Anisakis* y búsqueda de nuevos compuestos naturales activos frente a la anisakiosis”, de la que es autora D^a María del Carmen Romero López;

AUTORIZAN la presentación de la referida Tesis para su defensa e informan que cumple todos los requisitos legales.

Fdo. D^a Adela Valero López Fdo. D^a M^a Concepción Navarro Moll

Fdo. D^a Joaquina Martín Sánchez

Granada, Julio de 2014.

El Dr. Francisco Javier Adroher Auroux, Catedrático y Director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada;

AUTORIZA la presentación de la Tesis “Capacidad infectiva de las larvas L₃ de *Anisakis* y búsqueda de nuevos compuestos naturales activos frente a la anisakiosis”, de la que es autora D^a María del Carmen Romero López, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Fdo. Francisco Javier Adroher Auroux

Granada, Julio de 2014.

La doctoranda María del Carmen Romero López y las directoras de Tesis D^a Adela Valero López, D^a María Concepción Navarro Moll y D^a Joaquina Martín Sánchez garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de las directoras de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 3 de Marzo de 2014.

Directoras de la Tesis

Doctoranda

Fdo. D^a Adela Valero López Fdo. D^a María del Carmen Romero López

Fdo. D^a María Concepción Navarro Moll

Fdo. D^a Joaquina Martín Sánchez

A mis padres y hermanas

Con estas líneas cierro uno de los capítulos más importantes de mi vida al que he dedicado muchos años, esfuerzo y que ha sido posible concluir por la ayuda de muchas personas. Por ello es para mí un verdadero placer, utilizar este espacio para expresar mis más sinceros agradecimientos.

Ante todo, recalcar que esta Tesis nunca se habría podido concluir sin la paciencia, interés, consejos y apoyo de las Dras. D^a Adela Valero y D^a Concepción Navarro. Siempre han tenido tiempo para enseñarme, guiarme, hacerme razonar y mostrarme que no hay dificultades insuperables. Por esa gran amistad que me han brindado en todo momento y sus esfuerzos para facilitarme todos los medios suficientes. También quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Joaquina Martín por el tiempo dedicado.

Gracias a la Dra. D^a Rocío Benítez, por sus guiños, consejos y preocupación por el desarrollo de esta Tesis. Y por supuesto a los Drs. D. Javier Adroher, D^a Margarita Campos, D^a M^a Josefa Lozano, D^a Inmaculada Mañas, D^a Marina Jiménez, D^a Herminia Gijón, D. Francisco Morillas, D. Luis Hueli, D. Victoriano Díaz, D^a Amparo Soler por su apoyo. A todos los demás miembros del Departamento sin excepción por su cariño, porque no puedo olvidarme de grandes personas como son Santiago, Ignacio, quien tan pacientemente me enseñó a moverme por el laboratorio, Isabel, nuestra técnico que siempre con una gran sonrisa está disponible a ayudar. A David, Alejandro, M^a Antonia, Rafa, Laura, Rubén, Gregorio, Víctor, Gema, así como a Lola por su dulzura y por supuesto a Magda. No puedo olvidar a mi amiga Blanca, con quien he reído tanto como trabajado y sobre todo, a *mis niñas de Micro*: Cinta, Kadiya y Patri, porque hemos vivido juntas tanto los momentos buenos como los no tan buenos. Gracias por haber estado a mi lado y por animarme en los momentos clave. A Natalia, por su ayuda durante sus prácticas y por ser tan buena amiga. No puedo olvidarme de José Antonio, a quien tanto cariño y respeto teníamos en el laboratorio y de quien no nos olvidamos ni un segundo aquellos que más lo conocimos. Al Dr. D. Francisco Ocaña, que siempre encontraba un hueco para orientarme con la estadística.

Un agradecimiento especial a Sergio, mi experto en biología molecular, por ser la persona que ha compartido el mayor tiempo a mi lado, porque en su compañía las cosas

malas se convierten en buenas, por su cariño y su apoyo incondicional. A Manolo, por hacer que las mañanas fueran más alegres y por su amistad.

Aunque he estado poco tiempo en el departamento de Farmacología, he conseguido grandes amigos que siempre han encontrado un hueco para enseñarme y ayudarme, por eso tengo que estar tremendamente agradecida a la Dra. M^a del Pilar Montilla, a Miguel, Mercedes, Belén y especialmente a Desi e Isa por su disponibilidad, paciencia y generosidad para compartir su experiencia.

Agradecerle a todo el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional de México su atención y ayuda en mi estancia. Especialmente al Dr. Rosales Encina por sus enseñanzas y acogerme en su laboratorio con tanta amabilidad así como a la Dra. Talamás. A mi querida Lidia, que siempre estuvo a mi lado durante toda la investigación con gran amabilidad y dulzura. A mis compañeros Pancho, Alex, Paty Espiritu, Jorge, Marisol, Paty Pulido, Sonia, Azael, Alondra y mis queridas Aurora y Chío.

Y por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura empresa. A mis padres, María del Carmen y José Miguel, por su ejemplo de lucha y apoyo. A mis hermanas Lourdes y Sara, porque en ocasiones su paciencia fue infinita.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis y que han permitido que viva una experiencia tan importante para mi formación como investigador.

Muchas gracias a todos.

RESUMEN.

La parasitación del hombre con nematodos del género *Anisakis*, debido a la ingesta de pescado crudo o poco cocinado infectado, es muy frecuente en Japón y distintos países de Europa, entre ellos España. Son numerosos los pacientes afectados con manifestaciones gastrointestinales más o menos severas y reacciones alérgicas de sintomatología variable, siendo España el país europeo con mayor número de casos de anisakiosis (Abollo et al., 2003; FEAD, 2013). En Japón, *A. simplex* s.s. se considera el principal agente etiológico de esta enfermedad parasitaria, en Italia se ha señalado como tal a *A. pegreffii* (D'Amelio et al., 1999; Fumarola et al., 2009; Mattiucci et al., 2011, 2013a), pero en España no se ha identificado la especie involucrada en la anisakiosis humana. Algunos autores han encontrado que *A. pegreffii* presenta menor poder de penetración en el músculo de determinados peces que *A. simplex* s.s.; lo que podría indicar que tiene una menor capacidad patógena (Suzuki et al., 2010). A pesar, de que las larvas de *Anisakis* tipo II, son capaces de infectar al hombre (Clavel et al., 1993), no se conoce bien la implicación de sus especies en esta parasitosis, ya que del total de casos humanos, son pocas las larvas identificadas por métodos moleculares.

Para el estudio de la patogenicidad de las distintas especies de *Anisakis* se han utilizado ratas Wistar, ya que estos animales presentan una serie de ventajas: el tamaño del aparato digestivo de la rata tiene un calibre adecuado para las larvas, el menor requerimiento espacial y de cuidados que otros animales de mayor tamaño y sobre todo el comportamiento y distribución de las larvas L₃ de *Anisakis* es similar a los casos humanos (Huang, 2005; Navarro et al, 2008).

En el presente trabajo se ha observado que del 21'6% de las larvas Tipo I que fueron capaces de atravesar, fijarse y/o producir lesión en el tracto gastrointestinal de los animales, el 10% fueron identificadas como *A. simplex* s.s., el 7'8% como genotipos híbridos y el 3'8% restante como *A. pegreffii*. De acuerdo con estos datos hemos encontrado que el riesgo de penetración de *A. pegreffii* es menor que el de *A. simplex* s.s., concretamente, un 65% (IC 95%: 11 a 86%). En el caso de las larvas tipo II, tan sólo el 7'1% (4/56) fueron capaces de producir daños en los animales de experimentación, dos larvas de *A. physeteris* y dos de *A. paggiae*. Estos resultados indican que ambas especies pueden actuar como agentes etiológicos de

la anisakiosis. Al comparar estos resultados con los obtenidos en las larvas tipo I, se observa que el potencial patógeno de estas últimas es más elevado ($p < 0'001$).

Otro hecho a considerar es la situación de las larvas en el pescado; es decir, si son igualmente patógenas las encapsuladas en vísceras o las que se encuentran libres en la cavidad corporal del pescado. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran cómo las larvas encapsuladas parecen tener un comportamiento diferente, ya que ninguna de ellas atravesó la pared gastrointestinal, aunque sí fueron capaces de fijarse en la mucosa gástrica y producir daños vasculares. Por tanto, las medidas profilácticas no deben diferir.

Si bien son diversos los fármacos probados frente a la anisakiosis (antibióticos, antihistamínicos, anticolinérgicos y/o corticosteroides), hasta la fecha ninguno de ellos ha mostrado una eficacia contrastada (Cocheton et al., 1991; Domínguez-Ortega y Martínez-Cócera, 2000; Matsui et al., 1985; Oshima, 1972). Así, con el fin de evitar la intervención quirúrgica, se han propuesto tratamientos con antihelmínticos (De Vera et al., 2002; Filauro et al., 2011; Ioli, 1998; Magnaval et al., 2002; Manley y Embil, 1989; Moore et al., 2002; Pacios et al., 2005), entre los cuales cabe citar al albendazol, derivado benzimidazólico ampliamente utilizado para tratar los parásitos intestinales que parece presentar cierta actividad frente a *Anisakis* (Arias-Díaz et al., 2006; Dziekoeska-Rynko et al., 2002; Moore et al., 2002). Por otra parte, se han ensayado, *in vitro* e *in vivo*, sustancias de origen natural frente a las larvas de anisákidos (Hierro et al., 2004 a, b, c, 2006; Lin et al., 2010; Navarro et al., 2008).

La manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y menta (*Mentha piperita*) son plantas medicinales ampliamente utilizadas (Herro y Jacob, 2010; Srivastava et al., 2010). Ambas han mostrado ser biocidas frente a un amplio rango de agentes patógenos, al igual que ocurre con compuestos de otros aceites esenciales, como son el farnesol, nerolidol y elemol (Hoet, 2006; Inoue et al., 2004; Kpoviessi et al., 2014; Morales-Yuste, 2006).

En los estudios *in vitro*, el mentol, el aceite esencial de manzanilla y especialmente α -bisabolol, fueron los productos naturales más efectivos frente a las L₃ de *Anisakis* Tipo I. En cuanto a los otros derivados sesquiterpénicos testados en las pruebas *in vitro*, los resultados muestran que tanto nerolidol, como farnesol

y elemol ocasionan el 100% de mortalidad de las larvas L₃ desde la primera lectura a las concentraciones de 125 µg/ml. Ahora bien, cabe reseñar una mayor actividad *in vitro* del α-bisabolol y nerolidol, ya que mantuvieron la máxima actividad larvicida incluso a la más baja de las concentraciones ensayadas (31'2 µg/ml).

Respecto a los resultados *in vivo*, todas las ratas tratadas con los productos naturales mostraron mejores resultados que las del lote control, especialmente aquellas que recibieron A.E. de menta y sus componentes que además de no presentar ningún tipo de lesión, mostraron actividad. Para los dos tipos de ensayo, albendazol, fármaco de referencia para el tratamiento de la anisakiosis, fue menos eficaz que los productos testados, ya que en ningún momento mostró actividad larvicida y en los animales de experimentación aparecieron lesiones similares a las encontradas en el grupo control, aunque en menor número.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	21
1. Anisakiosis	23
1.1. Concepto	23
1.2. Clasificación taxonómica	24
2. Identificación del parásito	28
2.1. Características morfológicas de la larva de tercer estadio de <i>Anisakis</i> spp.....	28
2.2. Identificación genética	31
2.2.1. Isoenzimas	31
2.2.2. Marcadores genéticos derivados del ADN.....	32
3. Estudios taxonómicos y filogenéticos.....	38
4. Ciclo biológico	42
5. Epidemiología	46
6. Distribución	50
7. Localización de las larvas en el hospedador	56
8. Profilaxis	61
9. Legislación.....	69
10. Patología y sintomatología	72
11. Diagnóstico.....	80
12. Tratamiento	88
13. Aceites esenciales	93
13.1. Concepto de aceite esencial	93
13.2. Propiedades generales	93
13.3. Extracción.....	94
13.4. Normalización	95
13.5. Toxicidad.....	96
13.6. Interés farmacológico	97
14. Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>).....	100
14.1. Componentes activos	100
14.2. Acción terapéutica.....	101
15. Menta (<i>Mentha piperita</i>)	103
15.1. Componentes activos	103
15.2. Acción terapéutica.....	103
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	107

RESULTADOS.....	111
Capítulo I. Comparación experimental del potencial patógeno de las dos especies hermanas <i>Anisakis simplex</i> s.s. y <i>Anisakis pegreffii</i> en ratas Wistar.....	113
Capítulo II. Demostración del potencial patógeno de <i>Anisakis</i> Tipo II en ratas Wistar	121
Capítulo III. Infección experimental de larvas libre y enquistadas de <i>Anisakis</i> Tipo I	137
Capítulo IV. Actividad del aceite esencial de <i>Matricaria chamomilla</i> frente a la anisakiasis.....	145
Capítulo V. Menta (<i>Mentha piperita</i>) y albendazol frente la anisakiasis en un modelo animal	151
Capítulo VI. Actividad de albendazol y los aceites esenciales de menta (<i>Mentha piperita</i>) y manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) frente a <i>Anisakis</i> Tipo I.....	163
Capítulo VII. Actividad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de tres sesquiterpenos frente a larvas L ₃ de <i>Anisakis</i> Tipo I.....	170
DISCUSIÓN.....	177
CONCLUSIONES	191
BIBLIOGRAFÍA	195
ANEXO.....	261

INTRODUCCIÓN

1. ANISAKIOSIS.

1.1. Concepto.

La anisakiosis es una parasitosis producida por el tercer estadio larvario (L₃) de nematodos del género *Anisakis* que el hombre adquiere al ingerir pescado parasitado crudo o insuficientemente cocinado. El primer caso de esta enfermedad lo describió Van Thiel et al. (1960) en un paciente aquejado de fuertes dolores abdominales. La causa de la enfermedad fue un nematodo encontrado en un flemón eosinofílico intestinal, ingerido con arenques crudos ligeramente salados. El nematodo responsable de la lesión se identificó como *Anisakis* (Rudolphi, 1809) y a la enfermedad humana se le denominó anisakiasis (Van Thiel, 1962). En 1965, sanitarios japoneses revisaron numerosos casos de úlcera gástrica o duodenal, apendicitis aguda y tumor gástrico y comprobaron que muchos de ellos habían sido mal diagnosticados.

A lo largo de los años, anisakiasis se ha empleado para referirse a la infección parasitaria producida por nematodos de la familia Anisakidae, aunque más tarde Margolis (1977) aconseja:

- **Anisakiasis inespecífica** para la parasitación humana producida por larvas pertenecientes a la familia Anisakidae.
- **Anisakiasis** para la parasitación debida a las larvas del género *Anisakis*.

Posteriormente, Oshima y Kliks (1987) diferenciarían entre anisakiasis y pseudoterranovasis, en función del género de la larva, *Anisakis* o *Pseudoterranova*. Un año después, se revisó la nomenclatura de las enfermedades de origen parasitario por expertos nombrados por el “Executive Committee of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology” (WAAVP), el cual aconsejó el término **anisakidosis** para designar las parasitosis causadas por miembros de la familia *Anisakidae* y **anisakiosis** si la parasitación implicaba al género *Anisakis*.

Los géneros de nematodos que producen la anisakidosis humana son: *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium*; aunque este último parece estar más implicado en cuadros alérgicos (Alonso-Gómez et al., 2004; Castán et al., 2002; Pravettoni et al., 2012; Repiso Ortega et al., 2003; Shamsi y Butcher, 2011). Dentro de los dos primeros se incluyen las principales especies

encontradas en el hombre: *Anisakis simplex* s.s., *A. pegreffii* y en menor medida *A. physeteris* y *Pseudoterranova decipiens*.

1.2. Clasificación taxonómica.

De acuerdo con las propuestas realizadas por Anderson (2000), Klimpel et al. (2008, 2010), Mattiucci et al. (2009; 2013 b) y Mattiucci y Nascetti (2008), la clasificación de los anisákidos es la siguiente:

Phylum Nematelminthes

Clase Nematoda

Subclase Secernentea

Orden Ascaridida

Superfamilia Ascaridoidea

Familia Anisakidae

Subfamilia Anisakinae

Género *Anisakis*

Clado I:

Anisakis simplex s.l. { *A. simplex* s.s.
A. pegreffii
A. berlandi

Anisakis ziphidarum

Anisakis typica

Anisakis nascetti

Anisakis sp.

Anisakis sp. 1

Clado II:

Anisakis physeteris

Anisakis brevispiculata

Anisakis paggiae

Anisakis sp. 2

De Ley y Blaxter, (2004) sugirieron la siguiente clasificación taxonómica para *Anisakis*:

Phylum Nematelminthes
 Clase Chromodorea
 Subclase Chromodoria
 Orden Rhabditida
 Suborden Spirurina
 Infraorden Ascaridomorpha
 Familia Anisakidae
 Subfamilia Anisakinae
 Género *Anisakis*

Berland (1961) sólo reconocía dos tipos de larvas de *Anisakis* en función de sus caracteres morfológicos, correspondiendo la Tipo I a *A. simplex* y la Tipo II a *A. physeteris*. En cambio, Davey (1971) aceptaba tres especies válidas, *A. simplex*, *A. typica* y *A. physeteris*, considerando que no se podía identificar a las restantes especies por no disponerse de suficientes datos descriptivos. Ante esta situación, Shiraki (1974), atendiendo a determinadas características morfológicas, clasificó las larvas como *Anisakis* Tipo I, II, III, IV (Tabla 1).

	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
Ventrículo	Largo	Corto	Corto	Corto
Unión ventrículo-intestino	Oblicua	Horizontal	Horizontal	Horizontal
Porción terminal	Redondeada	Larga y cónica	Redondeada	Corta y cónica
Mucrón	Sí	No	No	No
Diente	Corto	Más largo		
Estriaciones cuticulares	Sí	No		

Tabla 1. Clasificación de Shiraki (1974).

En 1976, Grabda a partir de adultos obtenidos en cultivo *in vitro* pudo catalogar la larva Tipo I como *A. simplex* y la larva Tipo II como *A. physeteris*. Más tarde, se identificaron dentro de *A. simplex sensu latum* (s.l.) dos especies idénticas en cuanto a morfología pero, diferentes isoenzimáticamente y con distinta

localización geográfica: *A. pegreffii*, se encuentra preferentemente en el Mediterráneo, y *A. simplex sensu stricto* (s.s.), en aguas noratlánticas (Orecchia et al., 1986). Más adelante Mattiucci et al. (1997) definen una nueva especie gemela dentro del complejo *A. simplex* s.l., *A. simplex* C, localizada en el Pacífico norte y en regiones australes que además difería en su estructura genética y ciclo de vida. En 2013, Mattiucci et al. la denominaron *A. berlandi*.

En 1998, Paggi et al. descubrieron *A. ziphidarum*, una nueva especie aislada en ballenas (*Ziphius cavirostris* y *Mesoplodon layardii*) del Mediterráneo y de la costa africana. Mattiucci et al. (2001) demostraron que, *A. brevispiculata*, distribuida en las zonas sur y central del Océano Atlántico, es una especie aislada reproductivamente de *A. physeteris*, perteneciendo ambas al tipo morfológico II. Seguidamente se incluyó una nueva especie al morfotipo I localizada en aguas templadas y tropicales, denominada *A. typica* (Mattiucci et al., 2002). Mediante estudios isoenzimáticos, Mattiucci et al. (2005), aislaron una nueva especie, *A. paggiae*, en el estómago de la ballena *Logia breviceps* de la costa atlántica de Florida. También se localizaron algunas larvas en unas pocas merluzas (*Merluccius merluccius*) capturadas en costas gallegas, ubicándolas dentro del Tipo II.

En 2006, se encontraron L₄ de *Anisakis* en el zifio de True (*Mesoplodon mirus*) y zifio de Gray (*M. grayi*) de las costas surafricanas y Nueva Zelanda. Este parásito constituye un grupo genético diferente denominado hasta el momento *Anisakis* sp. y aislado reproductivamente de *A. ziphidarum* en zonas de simpatria. Aparentemente, es una larva Tipo I que en raras ocasiones se ha identificado en peces. Genéticamente es diferente de las otras especies de *Anisakis* pero está muy relacionada con *A. ziphidarum* (Mattiucci y Nascetti, 2006; Valentini et al., 2006).

Recientemente, en peces de Malasia, se ha identificado mediante isoenzimas y análisis de ADN mitocondrial un nuevo taxón genéticamente distinto de todas las especies conocidas de *Anisakis*, pero más estrechamente relacionado con *A. typica*. Este grupo se llama *Anisakis* sp. 1 y hasta el momento sólo se conoce la fase larvaria, que corresponde con las larvas Tipo I (sensu Berland, 1961); parece tratarse de una especie hermana de *A. typica* del Pacífico (Mattiucci y Nascetti, 2008).

Dentro de las larvas Tipo II también se ha descrito un nuevo taxón denominado *Anisakis* sp. 2 mediante isoenzimas y secuenciación del gen mitocondrial *cox2*. La identificación se ha realizado en larvas recogidas en el pez espada (*Xiphias gladius*) de la zona ecuatorial. Se trata de un taxón diferenciado genéticamente de las otras especies de *Anisakis* que se agrupa con las especies del clado II estando más íntimamente relacionado con *A. physeteris* (Mattiucci et al., 2007; Mattiucci y Nascetti, 2008).

2. IDENTIFICACIÓN DEL PARÁSITO.

2.1. Características morfológicas de la larva de tercer estadio de *Anisakis* spp.

Anisakis es un nematodo filiforme cuyo diámetro va disminuyendo hacia el extremo posterior. La longitud abarca un amplio espectro, desde 7 mm hasta más de 36 mm, y 0'49-0'55 mm de anchura (Grainger, 1959; Huang, 1988; Huang y Bussieras, 1984; Murata et al., 2011; Sanmartín et al., 1994; Shiraki, 1974; Smith, 1984). El tamaño de las larvas puede variar según se trate de larvas Tipo I o II, pero en muchas ocasiones estos valores se solapan dificultando su utilización para identificarlas. A simple vista, cerca del extremo anterior, puede observarse una pequeña mancha opaca alargada correspondiente al ventrículo (Figura 1).

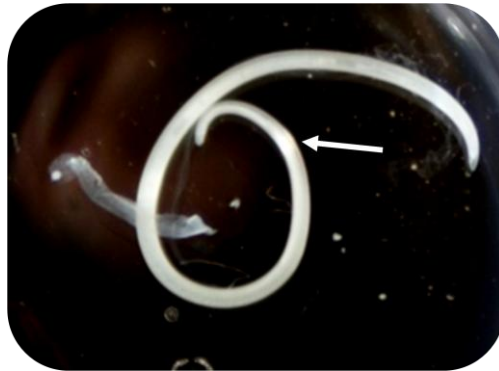


Figura 1. L₃ de *Anisakis* spp. en la que se observa el ventrículo a simple vista.

En el extremo anterior se encuentra una estructura triangular denominada diente que ayuda a la penetración en los tejidos, una boca triangular con tres labios rudimentarios, uno dorsal bilobulado y dos subventrales monolobulados, y el poro excretor entre las bases de los labios subventrales (Grabda, 1976); (Figura 2). Según Murata et al. (2011), la posición y tamaño del diente pueden variar ligeramente dentro de las especies de larvas Tipo II.

De acuerdo con los trabajos de Buzzell y Sommerville (1985), el esófago está constituido por tres regiones: Una primera región preventricular, que es la más larga de las tres, formada por células musculares radiales y por una glándula dorsal que se abre a la luz del esófago. Después le sigue una pequeña región de transición que tiene una glándula subventral que también se abre a la luz esofágica. Finalmente, la región glandular o ventrículo, donde hay una glándula dorsal que se

expande rodeando el lumen y una subventral que la abraza y ocupa la mayor parte del espacio esofágico.

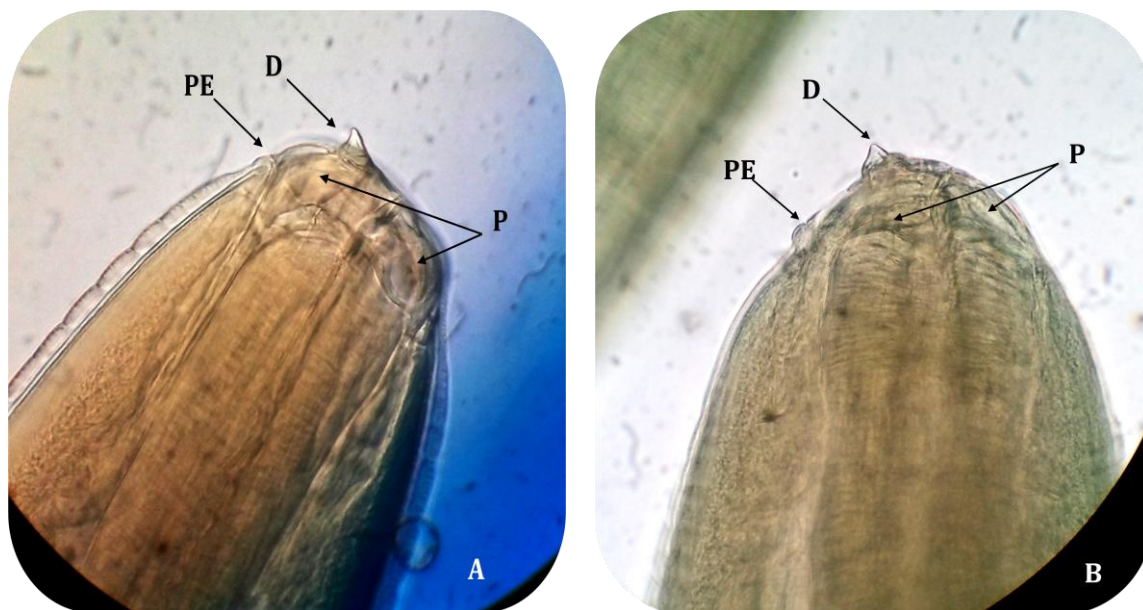


Figura 2. A. Extremo anterior de *Anisakis* Tipo I. **B.** Extremo anterior de *Anisakis* Tipo II. D: diente; PE: poro excretor; P: papilas.

En el caso de las L₃ de *Anisakis* Tipo I, el ventrículo es largo y se une al intestino de forma oblicua mientras que en la Tipo II el tamaño del ventrículo es menor y la unión con el intestino es recta (Figura 3). Quiazon et al. (2011) han observado que las L₃, L₄ y adultos de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* son morfológicamente diferenciables en función de la longitud del ventrículo. Así mientras *A. simplex* s.s. tiene un ventrículo entre 0'78-0'9 mm, en el caso de *A. pegreffii* es más corto (0'5-0'78 mm); además la relación esófago-ventrículo de las dos especies también difiere. Por otro lado, la coloración y aspecto puede variar según el tipo de *Anisakis*, mientras las larvas de *Anisakis* Tipo I suelen ser de color blanquecino, en la mayoría de las larvas Tipo II se puede apreciar una coloración rojiza y de aspecto más robusto (Ruíz Valero, 1991).

En la tercera fase larvaria no se aprecia el primordio genital diferenciándose así de la L₄. El intestino ocupa la mayor parte de la longitud de la larva y la luz intestinal es trirradial, debido a la diferente longitud de las células. Iglesias et al. (1997) indican que puede haber absorción de nutrientes a través de la cutícula.

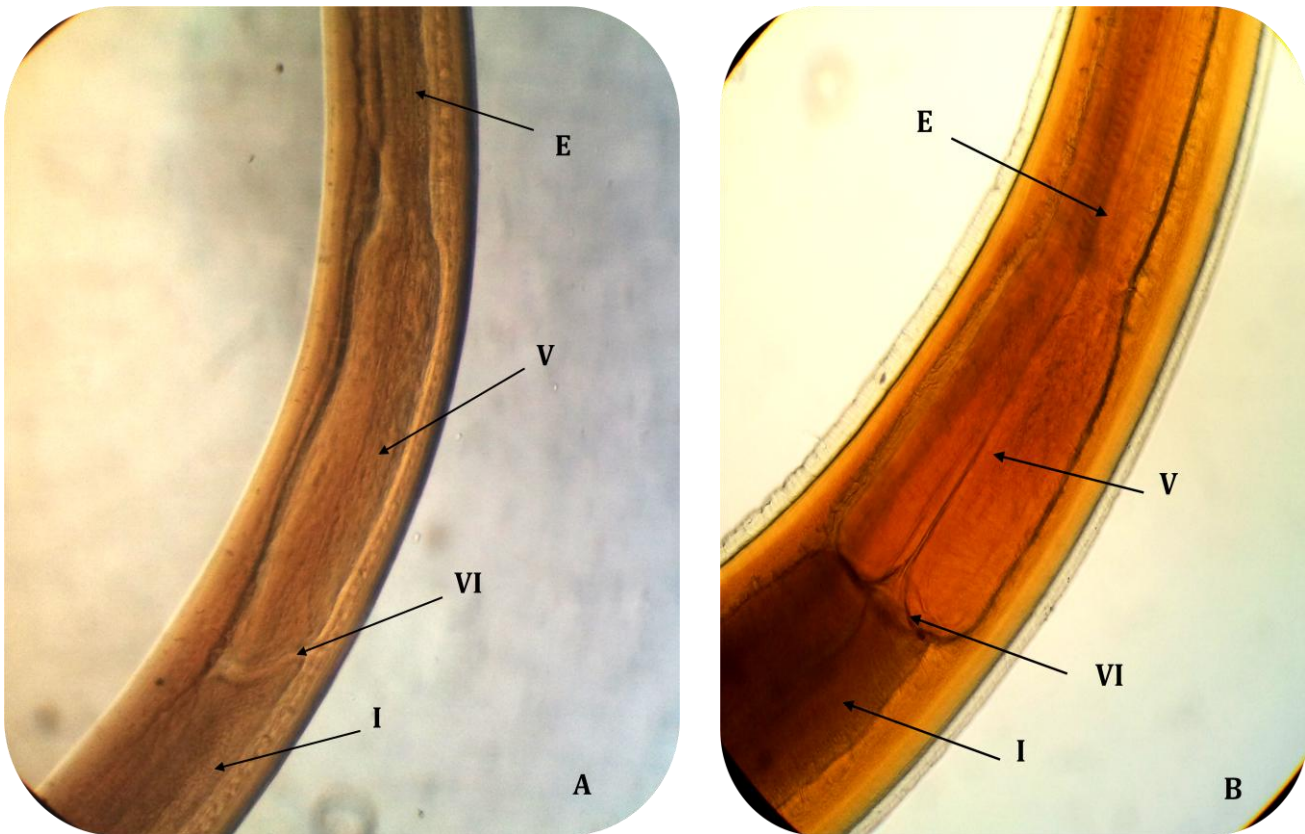


Figura 3. A. Extremo anterior de L₃ de *Anisakis* Tipo I. B. Extremo anterior de L₃ de *Anisakis* Tipo II. E: esófago; V: ventrículo; VI: unión ventrículo-intestino; I: intestino.

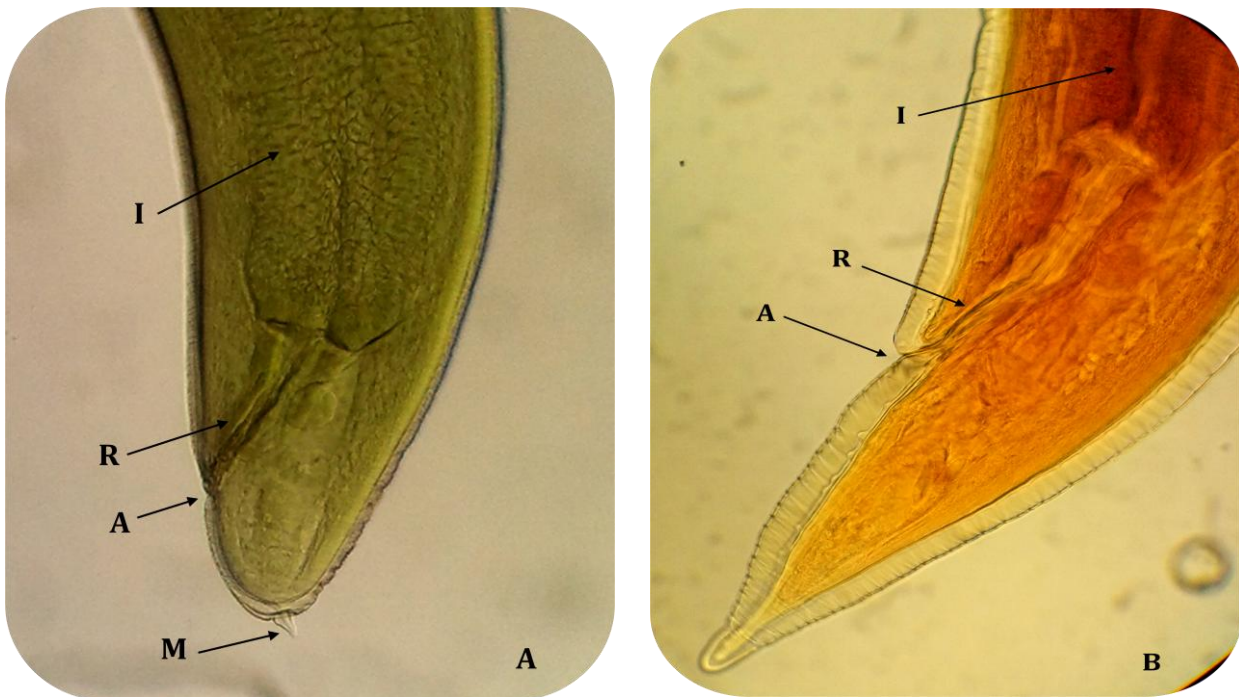


Figura 4. A. Extremo posterior de L₃ de *Anisakis* Tipo I. B. Extremo posterior de L₃ de *Anisakis* Tipo II. I: intestino; R: recto; A: ano; M: mucrón.

En las larvas Tipo I, la cola es corta y cónica finalizando en un mucrón. El recto se encuentra rodeado de 3 glándulas rectales en forma de pera, dos dorsales y una ventral (Grabda, 1976). En las larvas Tipo II la forma final de la cola puede cambiar según la especie. En el caso de *A. physeteris* la cola es larga, cónica y no posee espina al igual que en *A. brevispiculata* aunque esta última tiene una cola más corta (Figura 4). En el caso de *A. paggiae* parece que la cola es corta y presenta una pequeña espina (Murata et al., 2011).

2.2. Identificación genética.

2.2.1. Isoenzimas.

Las isoenzimas son proteínas que a pesar de catalizar la misma reacción química, difieren en la secuencia de aminoácidos y por tanto en el peso molecular y/o carga eléctrica, lo que se traduce en una diferente movilidad al someterlas a electroforesis. Estas moléculas se pueden encontrar en diferentes tejidos de un mismo individuo o bien en distintos individuos, permitiendo así su comparación y su uso como marcadores genéticos.

Las enzimas en solución presentan una carga eléctrica que hace que se desplacen hacia el cátodo o ánodo al aplicar un campo eléctrico. La distancia que recorran dependerá además de la carga eléctrica y de las condiciones experimentales a la que las sometamos (tiempo de electroforesis, voltaje, amperaje, etc.), de las características de la proteína como son su peso molecular, asociación con otros compuestos susceptibles de ionizarse, entre otras. Una vez realizada la migración, aprovechando la capacidad catalítica de las enzimas podemos proceder a su revelado, presentándose un conjunto de bandas denominado zimograma. Los fenotipos obtenidos pueden traducirse en términos de genes y alelos. Así, un genotipo homocigótico vendrá representado en el zimograma por una única banda, mientras que en individuos heterocigotos, el número de bandas será igual al número de subunidades proteicas que compone la enzima más uno.

Los primeros estudios genéticos de poblaciones de anisakidos se realizaron con esta técnica de electroforesis e incluían el análisis de entre 19 y 24 loci isoenzimáticos (Mattiucci et al., 1986, 1997, 2001, 2002, 2003, 2004; Mattiucci y

Nascetti, 2008; Nascetti et al., 1986). De esta manera se ha puesto de manifiesto la gran heterogeneidad existente en este género, pudiéndose identificar un número elevado de especies nuevas así como la detección de especies hermanas y revalidación de especies conocidas (Mattiucci et al., 1997, 1998, 2001, 2002, 2005; Mattiucci y Nascetti, 2006, 2008).

Los análisis de isoenzimas han contribuido en gran medida a la construcción de la actual clasificación taxonómica de las especies de *Anisakis* como se observa en el apartado 1.2. (Klimpel et al., 2007; Mattiucci et al., 1986; Mattiucci y Nascetti, 2008; Valentini et al., 2006). Los loci Aat-2 y Pep C-1 ayudan a diferenciar entre los dos clados y entre las mismas especies del Tipo I. La diferenciación entre las larvas de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* es posible mediante esta técnica con el análisis de tres loci diferentes: Sod, Lap-1 y Adk-2 (Nascetti et al., 1986), mientras que para diferenciar entre las especies Tipo II bastaría con los loci Icdh y 6Pgdh (Mattiucci et al., 2007; Mattiucci y Nascetti, 2006).

2.2.2. Marcadores genéticos derivados del ADN.

- **Fragmento ITS 1-5,8S-ITS 2.**

A pesar de las importantes aportaciones de la electroforesis de isoenzimas, la complejidad que presenta la interpretación del patrón de bandas obtenido, junto con el inconveniente de que se necesita gran cantidad de muestra adecuadamente conservada, hace que su utilización esté más restringida. Zhu et al. (1998) analizaron por primera vez la variabilidad del fragmento de ADN ribosómico (ANDr) ITS 1-5,8S-ITS 2 en larvas de *A. simplex* s.l., *Hysterothylacium aduncum* y *Contracaecum osculatatum*.

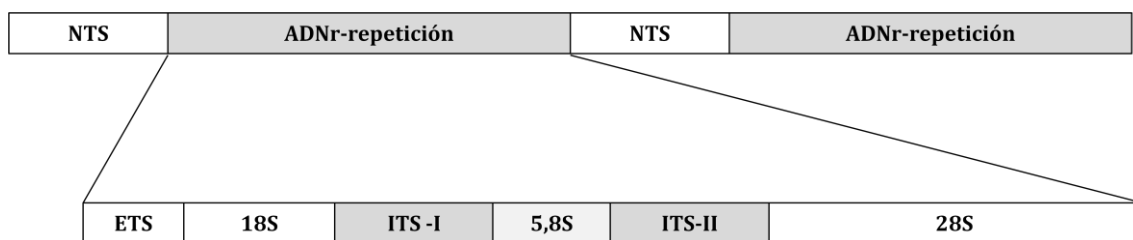


Figura 5. Disposición del ADNr eucariótico 18S; 5,8S y 28S en tándem. NTS: espaciador no transcribible; ETS: espaciador transcribible externo; ITS: espaciador transcribible interno.

La técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) consiste en realizar primero una amplificación de aquellos genes o fragmentos génicos que hayan mostrado variabilidad entre especies; el resultado se somete después a distintas endonucleasas de restricción. De esta manera, se obtienen unos patrones de bandas característicos para cada especie que nos permitirá distinguirlas.

Ésta técnica fue utilizada por D'Amelio et al. (2000) para buscar marcadores genéticos que pudieran diferenciar entre las especies conocidas de *Anisakis* spp. Para ello se ha utilizado la PCR-RFLP del fragmento de ADNr ITS 1-5,8S-ITS 2, con diferentes enzimas de restricción con el fin de obtener un patrón de bandas distintivo para cada especie. Las tres enzimas de restricción que han mostrado ser más utilizadas y útiles a la hora de diferenciar entre las diferentes especies de ambos clados de *Anisakis* han sido TaqI, HinfI y CfoI (Abattouy et al., 2011; Cavallero et al., 2011, 2012; Ceballos-Mendiola et al., 2010; Chaligiannis et al., 2012; D'amelio et al., 2000, 2010; Farjallah et al., 2008; Iglesias et al., 2008; Kijewska et al., 2002; Marques et al., 2006; Murata et al., 2011; Pontes et al., 2005; Quiazon et al., 2009). El uso de las tres enzimas mencionadas aportan patrones de bandas diferentes según la especie, la enzima CfoI no diferencia entre *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* y *A. ziphidarum* (D'amelio et al., 1999; 2010 Pontes et al., 2005). De ahí que algunos autores no la utilicen.

La PCR-RFLP ha sido de gran utilidad en países como Japón, para identificar los anisakidos presentes en los pescados más consumidos y considerados responsables de un gran número de casos de anisakiosis humanas (Abe, 2008; Abe et al., 2005, 2006; Umehara et al., 2006, 2007). También ha sido usada en España, Corea, Taiwán, Marruecos, Estados Unidos o México (Abattouy et al., 2011; Baldwin et al., 2011; Cavallero et al., 2011; Fang et al., 2010; Farjallah et al., 2008; Martín-Sánchez et al., 2005; Shih et al., 2010). La identificación de las larvas por PCR-RFLP del ITS 1-5,8S-ITS 2 y su relación con las zonas de captura de sus hospedadores ha permitido establecer la distribución de las diferentes especies en las costas de estos países. Así, en Japón se conoce que mientras en el Pacífico *A. simplex* s.s. es la especie predominante, en el mar de Japón lo es *A. pegreffii*. Debido a la migración de los diferentes hospedadores, la separación de estas especies no

es estricta lo que genera zonas de simpatría. Precisamente en estas zonas, la técnica de PCR-RFLP ha puesto de manifiesto la existencia de híbridos entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* no solo en la fase infectiva (L₃) sino también en adultos (Suzuki et al., 2010; Umehara et al., 2006).

En la Península Ibérica se ha podido observar con esta técnica que *Anisakis simplex* s.s. se encuentra principalmente distribuido en las costas atlánticas, disminuyendo su proporción conforme nos acercamos al estrecho de Gibraltar; también está presente, aunque en menor proporción, en el Mediterráneo occidental debido a la migración de peces pelágicos desde el Atlántico (Hermida et al., 2012; Martín-Sánchez et al., 2005; Mattiucci et al., 2004, 2007). Por el contrario, *A. pegreffii* es la especie dominante en el mar Mediterráneo, disminuyendo su presencia en el Atlántico noreste. De esta manera, las costas de la Península Ibérica se convierten en una zona de simpatría en donde se pueden encontrar individuos híbridos (Abollo et al., 2001, 2003; Martín-Sánchez et al., 2005).

La especificidad, sensibilidad de la técnica, así como la rapidez con la que se obtienen resultados y facilidad para interpretar los patrones de bandas, ha hecho de esta técnica una herramienta útil para identificar las larvas en los casos de anisakiosis humanas (D'Amelio et al., 1999; Mattiucci et al., 2011; Perteguer et al., 2004). De esta manera, se ha puesto de manifiesto que de los tres genotipos agrupados en el morfotipo I, *A. simplex* s.s. es el principal nematodo causante de la anisakiosis humana describiéndose sólo unos casos causados por *A. pegreffii* (Abe et al., 2006; D'Amelio et al., 1999; Fumarola et al., 2009; Mattiucci et al., 2011; Suzuki et al., 2010; Umehara et al., 2007). Aún queda por conocer si se podría usar esta técnica en los casos de anisakiosis crónicas, donde el material genético puede haber sido destruido en su mayoría por acción del sistema inmunitario del hombre (Perteguer et al., 2004).

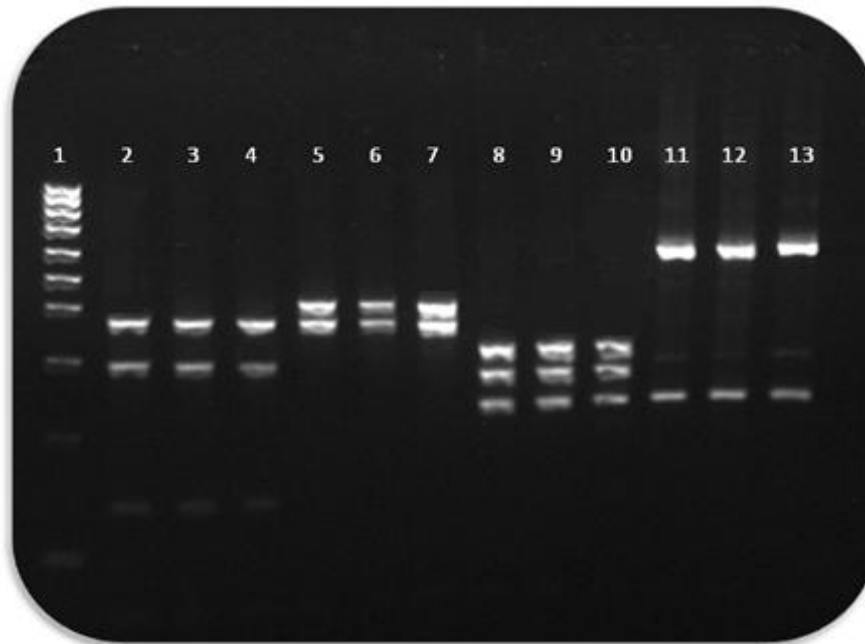


Figura 6. Identificación de las especies por PCR-RFLP. 1 Marcador peso molecular (Hyper lader IV) **Taq I:** 2-4 *A. pegreffii*; 5-7 *A. simplex* s.s. **Hinf I:** 8-10 *A. pegreffii*; 11-13 *A. simplex* s.s.

- **Otros marcadores genéticos.**

La existencia de aspectos taxonómicos sin resolver ha promovido la búsqueda de nuevos marcadores genéticos que ayuden al estudio de estos parásitos. Las secuencias 18S y 28S del ADNr no varían entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* por lo que no son útiles para su diferenciación. Técnicas como RAPD muestran la variabilidad de un gran número de loci anónimos, teóricamente distribuidos a través de todo el genoma del parásito, generando un elevado número de marcadores genéticos útiles para el estudio de poblaciones ya que la mayoría de ellos son polimórficos (Martín-Sánchez et al., 2005). El resultado de esta técnica es la producción de un patrón de bandas, que traducido a datos de presencia/ausencia de las mismas en los distintos individuos, permite la utilización de técnicas taxonómicas o filogenéticas (Martín-Sánchez et al., 2000).

El ADN mitocondrial (ADNmt) de *Anisakis* spp. es una estructura circular, relativamente conservada, constituido generalmente por 37 genes que al tener una alta tasa evolutiva (con respecto a los genes nucleares) lo convierte en un marcador útil para la genética de poblaciones y estudios filogenéticos tal y como se ha comprobado en otros parásitos (Barón et al., 2008). Además, al ser el ADNmt de

herencia materna, los genes mitocondriales representan loci genéticamente independientes de los genes del núcleo cuya herencia parental implica recombinación genética. Kim et al. (2006), han secuenciado el ADNmt de *A. simplex* s.l. obteniendo una estructura circular de 13.916 pb, cuyas características generales coinciden con las del ADNmt de otros nematodos, tanto en composición como en disposición. La secuencia mitocondrial completa es rica en A+T (71'2%) y está compuesto por 36 genes de los cuales 12 codifican proteínas (nad1-6, atp6, cox1-3, citb, nad4), 22 son genes ARNt, 15 regiones intergénicas no codificantes y 2 genes ARN ribosomales. Mantiene la estructura típica de otros nematodos faltando el gen atp8 tal y como ocurre en otros nematodos a excepción de *Trichinella spiralis* (Kim et al., 2006).

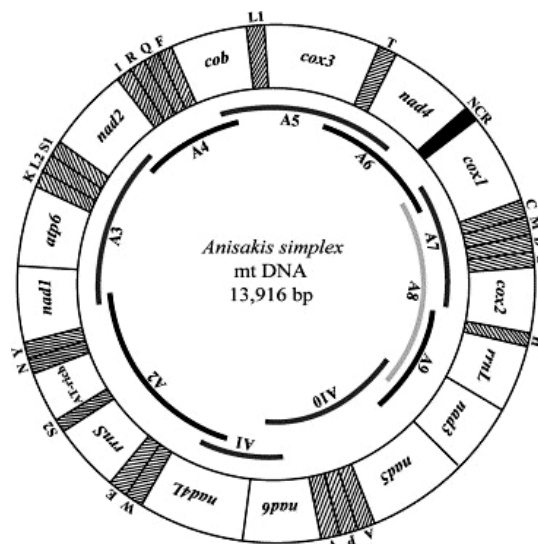


Figura 7. ADN mitocondrial de *Anisakis* (Kim et al., 2006).

La subunidad II de la citocromo oxidasa es un componente clave de la cadena de transporte electrónico durante la respiración aeróbica. Con los cebadores 211 y 210 descritos por Nadler y Hudspeeth (2000) se amplifica el 90% de su secuencia codificante en todos los Ascaridida. Al igual que ocurre en otras secuencias mitocondriales de nematodos, el contenido A+T de la secuencia codificante de la citocromo oxidasa II en Ascaridida es extremadamente alto, con elevada proporción de T en todas las posiciones del codón. Esta situación es consistente con un patrón de sustitución *nonrandom* A+T, particularmente en sitios sinónimos. A pesar de esta desviación, las secuencias de aminoácidos de la

citocromo oxidasa II se muestran conservadas y retienen los residuos funcionales críticos, como se deduce de la comparación con otros organismos (Nadler y Hudspeth, 2000). El análisis de la secuencia del gen *cox2* se ha utilizado para estudios de estructura genética de poblaciones de *A. simplex* s.l. y reconstrucción filogenética de los anisákidos (Baldwin et al., 2011; Kijewska et al., 2009; Valentini et al., 2006).

3. ESTUDIOS TAXONÓMICOS Y FILOGENÉTICOS.

La identificación de un parásito con fines diagnósticos se basa en la búsqueda de factores discriminantes que permitan su individualización. De otro lado tenemos el enfoque clasificatorio que busca definir las relaciones entre los parásitos o grupos de parásitos, al que nos vamos a referir a continuación. El objetivo es clasificar un grupo de unidades de acuerdo a sus diferentes propiedades o caracteres; las unidades pueden ser individuos o representar poblaciones o especies. Al principio, se construían fundamentalmente relaciones jerárquicas simples; a esta etapa le ha seguido otra concentrada en la evolución y la construcción de árboles filogenéticos.

La filogenia persigue trazar la relación entre los ancestros y descendientes de los organismos, representando las relaciones evolutivas en forma de diagrama arborescente o árbol filogenético. Los árboles filogenéticos surgen partir de la teoría de que todos los seres orgánicos provienen del mismo ancestro común que se ha diversificado evolutivamente a lo largo del tiempo. Los grupos, según su origen, se clasifican como monofiléticos (todos los individuos incluidos en el grupo derivan de una misma población ancestral y todos los descendientes de ese ancestro están incluidos en el grupo), parafiléticos (todos los individuos incluidos en el grupo derivan de una misma población ancestral pero no contiene todos los descendientes de ese ancestro común sino sólo algunos) o polifiléticos (grupo que contiene organismos que carecen de ancestro común) y los caracteres como primitivos (plesiomorfías) o derivados (apomorfías), que a su vez pueden clasificarse en sinopomorfías (apomorfías compartidas por dos o más grupos) y autapomorfías (apomorfías que sólo aparecen en un grupo). La realización de este tipo de estudios con enfoque simplemente taxonómico o bien filogenético, requieren del empleo de un gran número de caracteres, habiéndose utilizado tanto caracteres morfológicos como isoenzimáticos, y más recientemente moleculares. Las afinidades entre los individuos se calculan usando coeficientes elegidos de acuerdo con el objeto del estudio (Índice de Jaccard, Nei, Manhattan, distancia euclidiana, etc.), se seleccionan las técnicas clasificatorias a utilizar o métodos de construcción de árboles (métodos basados en matrices de distancias como UPGMA y Neighbor-Joining, análisis de parsimonia, análisis de máxima verosimilitud) y se

verifica la fiabilidad del árbol construido, siendo uno de los métodos el bootstrap que es un test estadístico que determina los límites de confianza de las ramas internas del árbol. Todo ello es posible gracias al empleo de programas informáticos específicos que permiten su realización automática.

- **UPGMA** (*Unweighted Pair Group Method using arithmetic Average*). Construye un árbol por un método de agrupamiento secuencial. Este método asume que los taxones son grupos por sí mismos, y agrupa los dos taxones más cercanos entre sí basándose en la matriz de distancias, para posteriormente crear una matriz reducida considerando al agrupamiento como un único taxón. El mismo proceso de agrupamiento se repite y se crea otra nueva matriz reducida. La interacción continúa hasta que todos los taxones se colocan en el árbol. Con este método se asume que hay una tasa constante de evolución.
- **Neighbor-Joining (NJ)**. Consiste en agrupar secuencialmente los individuos menos distanciados genéticamente, considerándolos como una sola entidad, y posteriormente se busca el siguiente taxón que tenga la menor distancia con este primer grupo para formar un nuevo agrupamiento. El proceso continúa hasta unir todos los taxones formando un único árbol. En cada paso del análisis, se van originando nuevas matrices de distancias a partir de la matriz original, de manera que la divergencia entre cada par de nodos se ajusta basándose en la divergencia promedio de ellas con respecto al resto de los taxones.
- **Parsimonia**. La asunción básica es que la existencia de compatibilidad entre las agrupaciones derivadas de los caracteres es el resultado de la presencia de antepasados comunes (Arnedo, 1999). El árbol más parsimonioso es aquél que requiere los menores cambios evolutivos para explicar las diferencias entre los taxones (Hillis et al., 1993). Se pueden obtener más de un árbol parsimonioso, de diferente topología pero igualmente parsimonioso. La parsimonia asume la existencia de una serie de condiciones: independencia de los caracteres, independencia de los taxones (ausencia de hibridación, introgresión o transferencia lateral de información), y tasas similares de cambios a lo largo de las ramas del árbol

(Arnedo, 1999). Una ventaja de este método es que lo único necesario para polarizar los caracteres es situar la raíz del árbol. Para hacer esto se han de añadir uno o más taxones externos (outgroups) y situar la raíz en el internodo que separa a estos taxones externos de los taxones a estudiar.

- **Máxima verosimilitud (MV).** El método es probabilístico. Se basa en que como es imposible conocer cuál es la filogenia real de los taxones, lo que hace es adoptar un criterio que permita evaluar los méritos relativos de los cladogramas (árboles filogenéticos), de forma que la hipótesis elegida es la más congruente en la distribución de las sinapomorfías. El análisis consiste pues en hallar el árbol o árboles que presenten una mayor verosimilitud, teniendo en cuenta la ramificación, longitud de las ramas y la estimación de parte de los parámetros del modelo adoptado.

En lo que se refiere a los estudios taxonómicos y filogenéticos de los anisákidos, la electroforesis de isoenzimas, el RAPD y las secuencias de ADN como ITS1-5,8S-ITS2 y *cox2* generan caracteres para la construcción de dendogramas o árboles, en algunos casos con implicaciones filogenéticas, que nos muestran las relaciones de los anisákidos (Farjallah et al., 2008; Iglesias et al., 2008; Martín-Sánchez et al., 2005; Mattiucci et al., 2005; Nadler et al., 2005; Quiazon et al., 2009; Umehara et al., 2007; Valentini et al., 2006).

Mattiucci y Nascetti (2008) han realizado una revisión de la sistemática filogenética de anisákidos. Generalmente, la concordancia entre los árboles generados a partir de caracteres distintos (datos isoenzimáticos, secuencias ITS, secuencias *cox2*, etc.) o diferentes métodos (dendogramas UPGMA, árboles consenso NJ, análisis máxima parsimonia, etc.), suelen inspirar mayor confianza en los resultados obtenidos. Estos autores encuentran gran congruencia entre el árbol generado a partir de los datos isoenzimáticos y el obtenido a partir de secuencias del gen mitocondrial *cox2* (Figura 7). En ambos árboles se puede observar la existencia de dos clados principales que se corresponden con los grupos morfológicos larva Tipo I y Tipo II. El Clado I compuesto por los tres miembros del complejo *A. simplex*, *A. typica*, *A. ziphidarum* y *Anisakis* sp. (Mattiucci y Nascetti, 2008; Valentini et al., 2006). La separación entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* esta

soportada por el análisis bootstrap únicamente en el árbol generado con los datos de la secuencia mitocondrial (Figura 8 A).

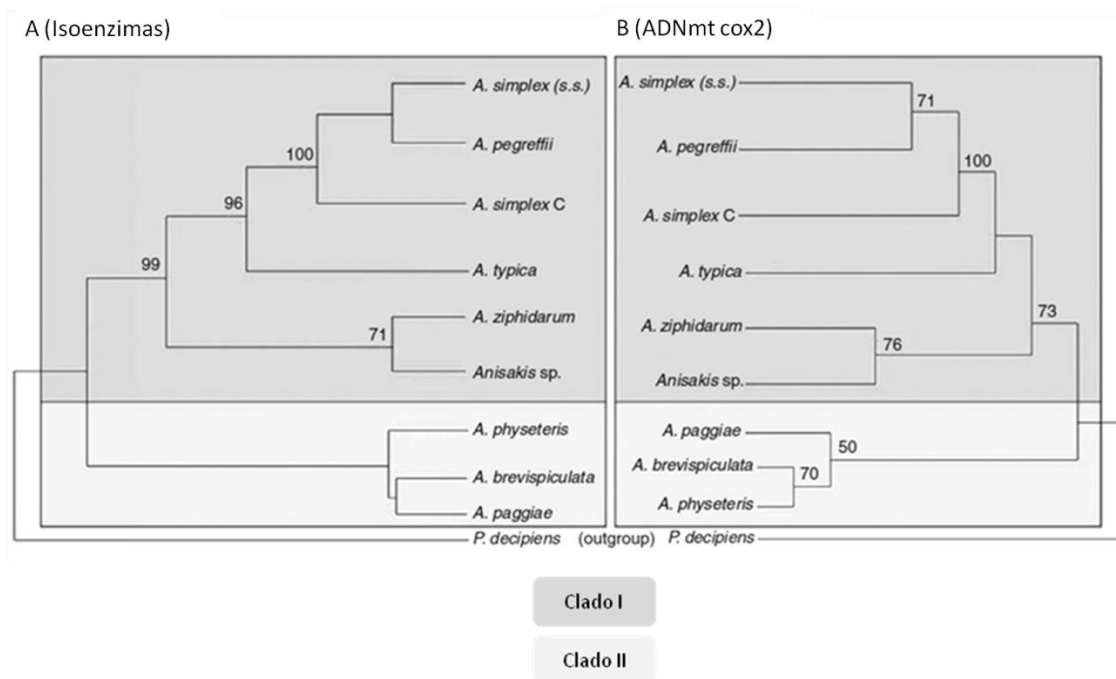


Figura 8. A. Relación genética de *Anisakis* spp. por Neighbour-Joining a partir de distancias genéticas obtenidos de datos isoenzimáticos. **B.** Relación genética de *Anisakis* spp. a partir del análisis de las secuencias cox2. Como outgroup se ha utilizado *Pseudoterranova decipiens*. Solo se muestran valores $\geq 50\%$ bootstrap (Mattiucci et al., 2008).

4. CICLO BIOLÓGICO.

Son varios los autores que han descrito el ciclo de vida de *Anisakis* spp. (Grabda, 1976; Klimpel et al., 2004, 2008; Kjøie et al., 1995; Smith y Wootten, 1978). Así, las hembras depositan los huevos fecundados en el interior del estómago de grandes mamíferos marinos como cetáceos (ballenas, cachalotes, delfines, etc.) y en ocasiones, de pinnípedos (focas, leones marinos, etc.). Estos huevos, de unos 50 µm de diámetro y de pared gruesa, junto con las heces del hospedador se liberan al agua donde embrionan.



Figura 9. Adulto de *Anisakis* Tipo I.

La viabilidad de los huevos en el mar varía en función de la temperatura del agua (Højgaard, 1998). Tras un periodo de incubación en el medio acuático, tienen lugar dos mudas dentro del huevo y eclosiona a los 20-27 días de la puesta, a una temperatura del agua comprendida entre 5° y 7° C (Bratney y Clark, 1992; Cocheton et al., 1991). En estas condiciones se libera mediante movimientos ondulatorios el tercer estadio larvario aún envuelto por la cutícula de la L₂ (Smith y Wootten, 1978), que le proporciona la resistencia suficiente para sobrevivir libres en el medio marino hasta 7 semanas a 5°-7° C o 3-4 semanas a 13°-18° C. La mortalidad de estas larvas aumenta por encima de los 20° C (Banning, 1971).

Para que el ciclo continúe, estas larvas debe ingerirlas un hospedador intermediario, bien directamente por pequeños crustáceos, especialmente eufáusidos del plancton (Géneros *Thysanoessa*, *Euphausia*, *Nyctiphanes*, etc.) o indirectamente, a través de un copépodo que actúa como un hospedador de transporte del cual se alimentan los crustáceos. Klimpel et al. (2004) observaron en aguas noruegas que los eufáusidos no tienen un papel relevante en el ciclo de vida de *Anisakis*. En este caso concreto, el primer hospedador intermediario es un

copépodo (*Paraeuchaeta norvegica*), del que se alimentan pequeños peces (*Maurolicus muelleri*), actuando como segundo hospedador. El ciclo continúa cuando estos peces son ingeridos por otros de mayor tamaño, *Pollachius virens*, que finalmente sirven de alimento a hospedadores definitivos ya que al parecer, es poco probable que cetáceos y pinnípedos de la zona se infecten a través del copépodo.

Sin embargo, la principal vía de transmisión sigue transcurriendo a través de un gran número de peces teleósteos y cefalópodos (principalmente calamares) que se infectan cuando ingieren crustáceos con larvas L₃. En estos hospedadores, las larvas atraviesan la pared intestinal y se encapsulan en vísceras, sobre todo hígado y gónadas; aunque pueden migrar a la musculatura por causas no bien conocidas o moverse libremente en la cavidad. Cuando estos hospedadores son ingeridos por otros peces mayores, pasan a las vísceras y musculatura por el mismo procedimiento, pudiendo tener lugar un fenómeno de acumulación de parásitos en estos predadores (Klimpel et al., 2004). El ciclo continúa al llegar las L₃ al interior de los hospedadores definitivos, a través del zooplancton o de peces y cefalópodos. En el hospedador definitivo, se fija en la mucosa del estómago y evoluciona mediante dos mudas alcanzando la forma adulta (machos y hembras) y madurez sexual.



Figura 10. Larvas L₃ de *Anisakis* en pequeños crustáceos digeridos por bacaladillas.

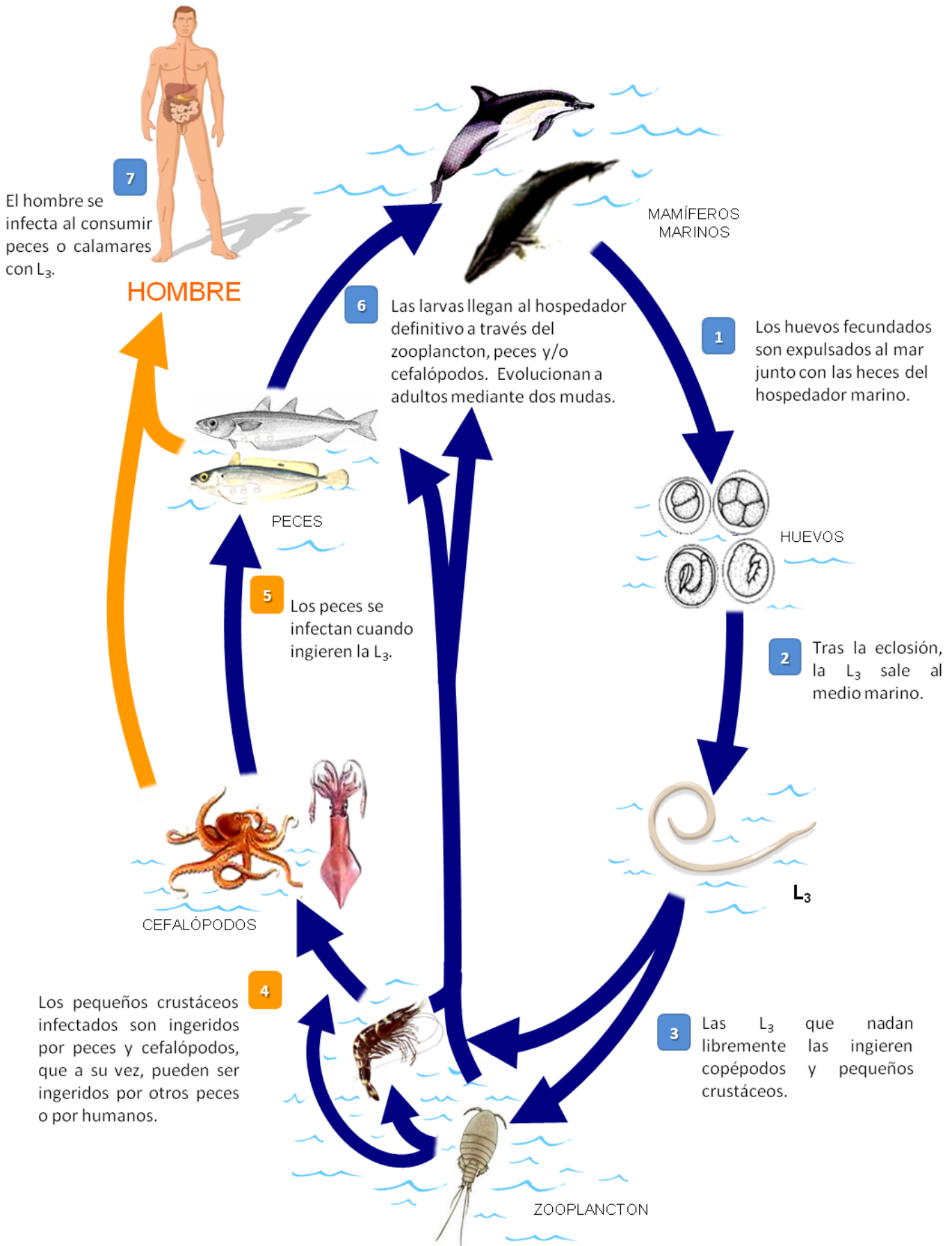


Figura 11. Ciclo biológico de *Anisakis* spp.; en naranja se encuentra la fase infectiva para el hombre.

El hombre actúa como hospedador accidental, y se infecta al consumir pescados o calamares crudos o con insuficiente tratamiento térmico, parasitados por el estadio infectivo de *Anisakis* spp. Lo frecuente es que la(s) larva(s) mueran a las pocas semanas tras la infección aunque se han descrito algunos casos en el que la larva ha evolucionado hasta L₄, así como un estado de transición entre el L₃-L₄ o incluso la presencia de un macho inmaduro en duodeno (Clavel et al., 1993; Fujino et al., 1984; Ishikura et al., 1995; Kagei y Isogaki, 1992; Kliks, 1986; Rosales et al., 1999; Weerasooriya et al., 1986).

5. EPIDEMIOLOGÍA.

La anisakiosis humana es una enfermedad ligada estrechamente a determinados hábitos alimentarios como es el consumo de pescado crudo o con un tratamiento térmico insuficiente, asociados principalmente a culturas orientales. El hombre actúa como hospedador accidental del parásito, ya que una vez que ingiere la larva, no suele evolucionar sino que muere por acción del sistema inmune.

El primer caso de anisakiosis humana identificado fue en Holanda (1955) por la ingestión de arenques (*Clupea harengus*) crudos o ligeramente salados que estaban parasitados. Este hecho hizo que se conociera como la “enfermedad del gusano del arenque” (Van Thiel et al., 1960). Según Hubert et al. (1989) antes del año 1965 se daban en este país hasta 300 casos anuales, disminuyendo a partir de entonces (Ishikura et al., 1992). Como consecuencia de los estudios realizados en 1968 por el “Comité de *Anisakis*” (*Anisakis* Committee) (Smith y Wootten, 1978), el gobierno holandés obligó a congelar los arenques destinados al consumo crudo a -20° C, y almacenarlos 24 horas a esa temperatura. Según Oshima (1972) para el marinado, los arenques debían permanecer en un baño a pH 4'0 y a una concentración de NaCl superior al 6'5% durante 30 días. Si estaban destinados al ahumado, durante el proceso, se sometieron a una temperatura de 50° C. Estas medidas redujeron el número de casos de 46 en 1967 a sólo 5 en 1968 (Ruitenbergh et al., 1971).

En Japón, debido a la cultura culinaria en la que destaca el consumo de pescado crudo o poco cocinado, se detectan miles de casos cada año debido al uso de técnicas como la gastroscopia, así como a la familiaridad del personal sanitario con los síntomas asociados a esta enfermedad (Arizono et al., 2012). En general, la caballa (*Scomber japonicus*), que alcanza un 100% de parasitación en determinadas zonas y en menor medida el calamar (*Todarodes pacificus*), se han considerado como los principales hospedadores responsables de la transmisión de la enfermedad en este país.

En Europa, países como Alemania, Holanda, Francia, Italia y España son donde se detecta mayor número de casos de anisakiosis (Audicana et al., 2002; Bouree et al., 1995; Bucci et al., 2013; Mattiucci et al., 2013) aunque están notificándose cada vez más en otros países como E.E.U.U., Australia, Canadá, Chile,

Perú, Nueva Zelanda, Egipto, Croacia, Austria (Amin et al., 2000; Céspedes et al., 2011; Cocheton et al., 1991; Couture et al., 2003; Juric et al., 2013; Kapral et al., 2009; Mercado et al., 2001, 2006; Paltridge et al., 1984; Shamsi y Butcher, 2011).

En España, el primer caso de anisakiosis publicado fue en 1991 por Arenal-Vera et al. A partir de esta fecha se han notificado otros muchos, tanto de infecciones como de reacciones de hipersensibilidad por el consumo de pescado crudo o poco cocinado (Acebes Rey et al., 1996; Canut et al., 1996; Cruchaga et al., 1995; López-Vélez, 1992 a, b; Moreno-Ancillo et al., 1997; Obispo et al., 2000; Olveira et al., 1999; Valero et al., 1992, entre otros). En lo que se refiere a incidencia de anisakiosis gastrointestinal, Repiso Ortega et al. (2003), aporta 3'87 casos por cada 100.000 habitantes/año, todos ellos por el consumo de boquerones crudos, detectándose el parásito en el 50% de ellos. Según los Boletines Epidemiológicos Semanales del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, el número de casos de anisakiosis humana recogidos durante los años 1997, 1998 y 1999, fue de 3, 1 y 2, respectivamente (Figura 12).

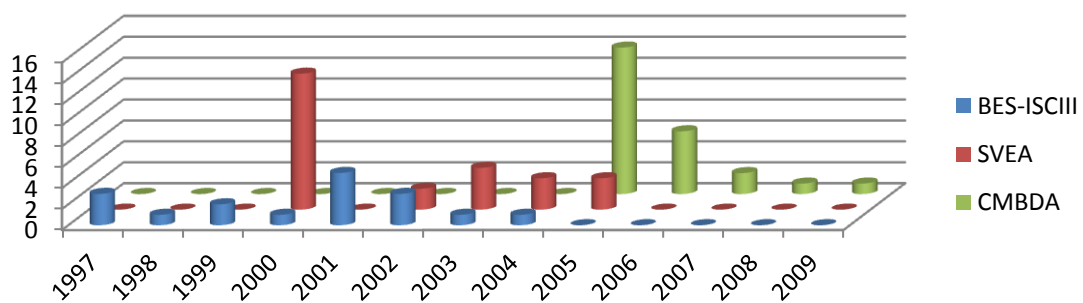


Figura 12. Evolución del número de casos de anisakiosis recogidos en el Boletín Epidemiológico Semanal del Instituto de Salud Carlos III (BES-ISCIH); Sistema Vigilancia Epidemiológica de Andalucía (SVEA) y Conjunto Mínimo Básico de Datos al alta hospitalaria de Andalucía (CMBDA).

Desde el año 2000 a 2005 el número de casos fue de 1, 5, 3, 1, 1 y 0 respectivamente, si bien hay que tener en cuenta que probablemente el número de casos reales sea mayor, ya que la anisakiosis no es una enfermedad de declaración obligatoria en España. De hecho, estos datos nacionales son inferiores a los ya recogidos en la comunidad autónoma andaluza en los mismos años.

En Andalucía, en el año 2000, se diagnosticaron 13 anisakiosis intestinales (López Peñas et al., 2000) y dos en 2002 convirtiéndose en enfermedad de declaración obligatoria (EDO) en el año 2003. A partir de esa fecha, las notificaciones han sido de cuatro casos en ese mismo año, tres en 2004 y otros tres en 2005. De estos 10 pacientes, ocho requirieron hospitalización, dos por cuadros alérgicos graves y seis por presentar un abdomen agudo con clínica compatible con apendicitis aguda o suboclusión intestinal [Sistema de Vigilancia Epidemiológico Andaluz (SVEA)]. En total se han registrado 50 casos de EDO en Andalucía desde principios de 2003 y abril de 2013 (SVEA, 2013 a, b). Entre 2005 y 2011, en el Conjunto Mínimo Básico de Datos al alta hospitalaria de Andalucía (CMBDA) se registraron 50 casos. En España, entre 1997 y 2011 en el CMBD se anotaron 747 casos (SVEA, 2013 b).

En 1997, de 120 pacientes que acudieron a un centro hospitalario de Madrid con síntomas alérgicos por *Anisakis*, en 96 de ellos, se pudo visualizar el parásito (López-Serrano et al., 2000 a). Este mismo año se diagnosticó un caso de anisakiosis masiva en un paciente con 20 larvas de *Anisakis* (Daschner et al., 1997). También Daschner et al. (2000), detectaron 20 pacientes infectados con una o más L₃. En un centro de urgencias de una zona de Madrid, se diagnosticaron en un año 96 casos de anisakiosis gástrica alérgica (Alonso-Gómez et al., 2004). En Pamplona, en un trabajo de Castán et al. (2002), se notificaron 8 anisakiosis gástricas y 13 intestinales. Al año siguiente, en Toledo aparecieron 10 casos gástricos y 15 intestinales (Repiso Ortega et al., 2003). En 2004, se detectó en León un caso de anisakiosis en el que la principal manifestación clínica fue un fuerte dolor torácico de características anginosas (García-García y Romero-Arauzo, 2004). En el año 2010, en el hospital de La Paz de Madrid, se atendió a una paciente en la que se localizaron más de 200 larvas tras la ingesta de merluza frita y huevas (Jurado-Palomo et al., 2010).

El primer caso publicado de anafilaxia severa en nuestro país se produjo por ingestión de merluza parasitada (Audicana et al., 1995). Las reacciones alérgicas frente a *Anisakis* es muy desigual en el conjunto de la geografía española; en el centro y noreste de la Península es alta, mientras que son poco frecuentes los casos en la zona sur y sureste de España (Audicana y Kenedy, 2008; Daschner et

al., 2000; Valls et al., 2003). Es posible que esta diferencia se deba no sólo a la procedencia del pescado, sino también a otros factores; así, mientras que en el sur de la Península predomina la fritura del pescado a altas temperaturas, en la zona norte y centro, los tratamientos térmicos se realizan a temperaturas más suaves durante menos tiempo (Buendía, 2000).

En España, la prevalencia de sensibilización a *Anisakis* spp. en adultos varía entre un 6 y un 56% (Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) 2005, 2009; Fernández de Corres et al., 2001). Los datos obtenidos con técnicas de diagnóstico más específicas, muestran diferentes resultados de prevalencia: 22% en la región de Antequera (Del Rey Moreno et al., 2006) y 12'4% en la ciudad de Madrid (Puente et al., 2008). En 200 pacientes con síntomas de dispepsia encontraron una seropositividad del 13'8% al antígeno de *A. simplex* Ani s 1 (Toro et al., 2004).

En el Hospital Santiago Apóstol de Álava, se detectaron 152 casos con cuadros de urticaria y 46 casos con anafilaxia desde el año 2000 a 2005. Según un informe de la Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria (ELIKA, 2005), se da una media de 308 casos de alergia a *Anisakis* spp. al año.

6. DISTRIBUCIÓN.

La distribución de larvas de *Anisakis* es muy amplia, encontrándose en un gran número de hospedadores como crustáceos, sobre todo eufáusidos, mamíferos marinos como cetáceos y pinnípidos, calamares, recientemente en tortugas marinas y en más de 200 especies de peces pelágicos muchos de gran valor comercial como boquerón (*Engraulis encrasicolus*), arenque (*Clupea harengus*), bacalao (*Gadus morhua*), besugo (*Pagellus bogaraveo*), sardina (*Sardina pilchardus*), bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), carbonero (*Pollachius virens*), faneca (*Trisopterus luscus*), brótola del fango (*Phycis blennoides*), merluza, jurel (*Trachurus trachurus*), caballa (*Scomber scombrus*), y congrio (*Conger conger*), entre otros (Angelucci et al., 2011; Baldwin et al., 2011; Cavallero et al., 2012; Céspedes et al., 2011; Cho et al., 2012; Cross et al., 2007; Dailey y Brownell, 1972; Davey, 1971; Gračan et al., 2012; Hermida et al., 2012; Jabbar et al., 2013; Klimpel et al., 2004; Koinari et al., 2013; Levsen y Lunestad, 2010; Mattiucci et al., 2007; McGladdery, 1986; Meloni et al., 2011; Mladineo et al., 2012; Nadler et al., 2005; Pelloux et al., 1992; Pereira Bueno y Ferre, 1997; Quiazon et al., 2011, 2013; Rello et al., 2009; Sanmartín et al., 1994; Santoro et al., 2010 a, b; Serracca et al., 2013; Smith y Snider, 2005; Umehara et al., 2006; Valero et al., 2000, 2006 a, b; Vardić et al., 2012).

Aunque no se ha podido confirmar, en algunos casos los moluscos y crustáceos se han considerado como posibles transmisores (AESAN, 2005). El éxito de *Anisakis* spp. para tener una distribución tan amplia y llegar a diferentes hospedadores se debe a diferentes factores: distribución y patrones de migración de los hospedadores, así como a la especificidad del parásito hacia ellos (Klimpel et al., 2004, 2008). El complejo *A. simplex* tiene baja especificidad hacia su hospedador definitivo, infectando ballenas dentadas y barbadas en sus extensas migraciones oceánicas. Esto contrasta con el complejo *A. physeteris* que se limita a las ballenas dentadas de la familia Kogiidae y Physeteridae. Sin embargo, ambos complejos presentan una baja especificidad frente a peces teleósteos, por lo que es posible localizar diferentes especies de *Anisakis* en el mismo hospedador (Klimpel et al., 2008).

A. simplex s.s., reconocida como la principal fuente de anisakiosis humana en Japón (Umehara et al., 2007), está muy extendida a lo largo del Círculo Polar Ártico, Atlántico oriental y occidental y el Océano Pacífico (Abollo et al., 2001; Abe et al., 2005, 2006; Ceballos-Mendiola et al., 2010; Martín-Sánchez et al., 2005; Mattiucci y Nascetti et al., 2008; Nadler et al., 2005; Umehara et al., 2006, 2008). En el Atlántico noreste, las zonas cercanas al Estrecho de Gibraltar son el límite de esta especie. En el caso de *A. ziphidarum*, se extiende por el Atlántico sur y Mar Mediterráneo al igual que *A. pegreffii*, aunque éste último es predominante en el Mediterráneo, disminuyendo su presencia conforme se aproxima al Atlántico noreste de la Península Ibérica (Farjallah et al., 2008; Mattiucci et al., 2007; Mattiucci y Nascetti, 2008). Los movimientos migratorios de los peces pelágicos desde el Atlántico al Mar de Alborán, hacen que *A. simplex* s.s. este presente en las aguas del Mediterráneo (Martín-Sánchez et al., 2005; Mattiucci et al., 2006, 2007).

De esta manera, se crean zonas simpátricas de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* a lo largo de las costas de la Península Ibérica (Abollo et al., 2001; Marques et al., 2006; Martín-Sánchez et al., 2005; Mattiucci et al., 2004; Pontes et al., 2005) y también en aguas japonesas (Umehara et al., 2006). En estas zonas, donde es frecuente encontrar infecciones mixtas, se han hallado genotipos híbridos entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* (Abollo et al., 2003; Du et al., 2010; Hermida et al., 2012; Marques et al., 2006; Martín-Sánchez et al., 2005; Sequeira et al., 2010; Suzuki et al., 2010). La distribución de las diferentes especies se puede observar en la figura 14.

Tanto la prevalencia de los anisakidos, como la intensidad de parasitación son variables y dependen de varios factores como son: la especie de pescado, zona geográfica, época del año, migraciones, y características individuales de cada especie parasitaria, entre otros.

Numerosos estudios realizados en diferentes zonas geográficas han puesto de manifiesto la alta prevalencia de anisakidos en diferentes especies de interés comercial: 41'6% del pescado capturado en Boston, San Francisco y Los Ángeles (Marquardt et al., 2000); en productos de pesca de Brasil hay prevalencias del 40-100% (Manfredi et al., 1994). En Australia, recientemente se han encontrado en peces comerciales prevalencias que oscilan entre el 10 y 100% según la especie

(Jabbar et al., 2013). En Europa Holst (1993) encontró una prevalencia del 83'3% en salmón noruego (*Salmo salar*), y del 100% en el arenque (Campbell et al., 2007; Levsen y Lunestad, 2010; Van Thiel, 1976; Verhamme y Ramboer, 1988). Para las diferentes especies de bacalao (*Gadus* spp.) la prevalencia varía entre el 88% y 100% (Bublitz y Choudhury, 1993; Nadolna y Podolska, 2013; Perdiguero-Alonso et al., 2008).

En cuanto a España, la presencia de *A. simplex* se ha detectado en la mayoría de las especies marinas que se consumen, describiéndose en las lonjas prevalencias entre un 25 y 80%, llegando a alcanzar en peces el 100% (Tejada, 2009). Los trabajos publicados indican elevados porcentajes de parasitación en merluza, jurel, bacaladilla (Figura 13) y una escasa o nula infección en sardina (Baldwin et al., 2011). Recientemente, Molina-Fernández et al. (2013), analizaron sardinas de diferentes puntos del Atlántico y Mediterráneo peninsular; las capturadas en La Coruña fueron las que presentaron una mayor prevalencia de larvas de *Anisakis*, con riesgo de infección hasta 15 veces más que las recogidas en otros puntos del Atlántico como Cádiz.

En 1982, Gómez-Cabrera y Martínez-Gómez señalan la presencia de *Anisakis* en la merluza capturada en la costa africana y desembarcada en la lonja pesquera de Huelva, con una prevalencia del 95% de *Anisakis*.



Figura 13. Bacaladilla infectada con *Anisakis* spp.

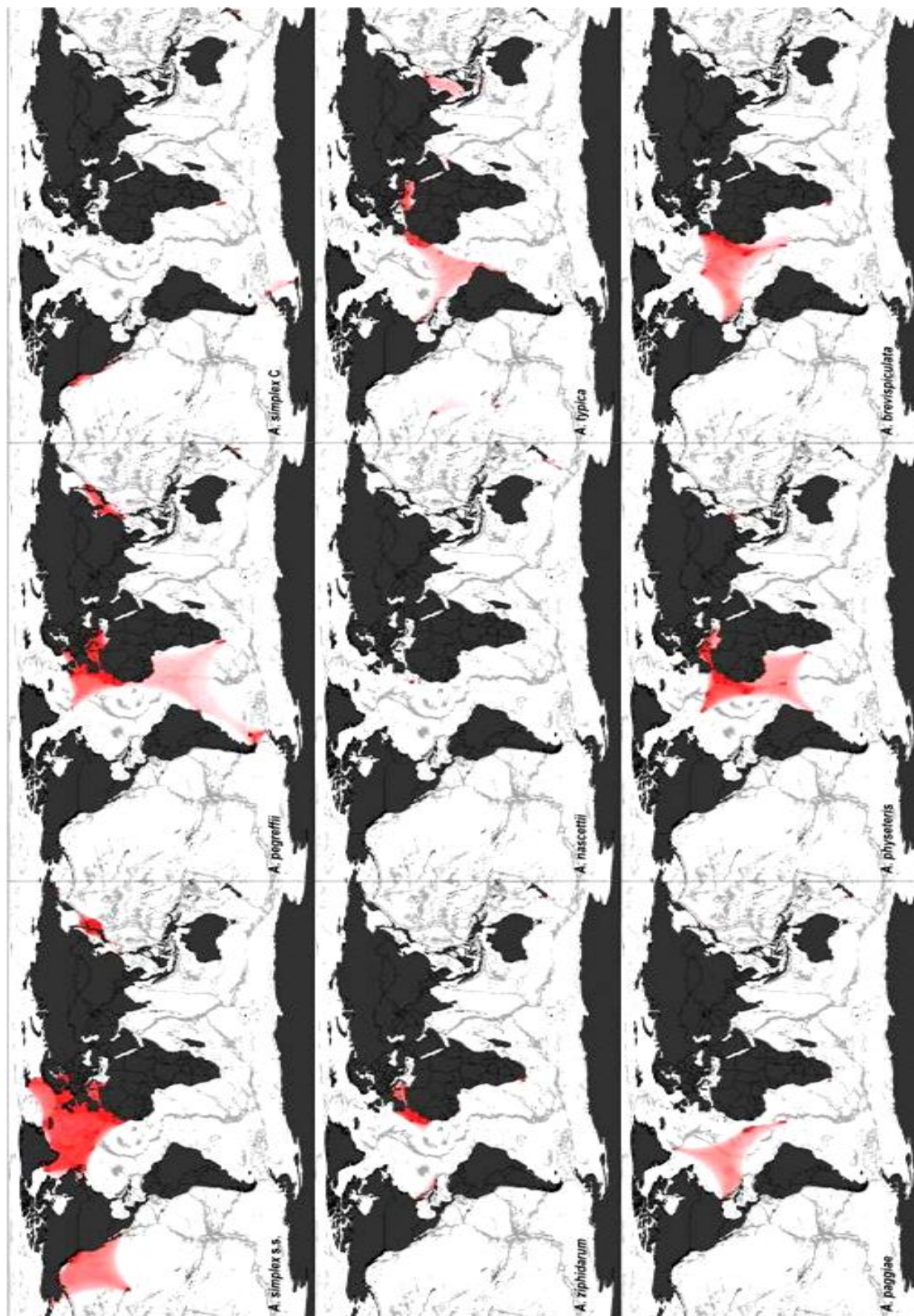


Figura 14. Distribución geográfica de *Anisakis* spp. La intensidad de color refleja la probabilidad de encontrar *Anisakis*. Las zonas rojas intensas muestran el área de captura de los anisákidos identificados molecularmente (Kuhn et al., 2011).

Quinteiro et al. (1987), en un estudio sobre 496 peces de 12 especies diferentes, capturados en época invernal en el noroeste español, obtuvieron índices de parasitación de *Anisakis* spp. en bacaladillas de 62'69%. Olmedo y Berenguer (1991) analizaron 92 pescadillas, de zona de captura no indicada, con prevalencias del 30%. Por otra parte, Cuéllar et al. (1991) encontraron 88'6% de *Anisakis* spp. en merluzas adquiridas en pescaderías; no detectaron parásitos en las sardinas ni en los boquerones analizados. En un estudio realizado en Granada (Ruíz-Valero et al., 1992) sobre 914 peces de 3 especies en el que se tuvieron en cuenta distintos parámetros del hospedador (longitud, época de captura y localización de las larvas), se halló una prevalencia en bacaladillas del 67'9% de *Anisakis* spp. Otros datos se reflejan en la tabla 2.

Los resultados obtenidos en un trabajo posterior (Adroher et al., 1996) en el que se procedió al análisis de jureles procedentes de distintos puertos españoles, mostraron una prevalencia cercana al 40%, la cual fue más elevada en los ejemplares procedentes de puertos del mar Cantábrico que en los del Mediterráneo. Víu et al. (1996) obtuvieron en ejemplares adquiridos en el mercado mayor de Zaragoza, porcentajes de parasitación del 60% para la bacaladilla, jurel y merluza. De la Torre Molina et al. (2000), en un estudio de pescado comercializado en la zona norte de la provincia de Córdoba, detectaron una prevalencia del 42% en bacaladillas. En ese mismo año Valero et al., aportan datos sobre la parasitación en la bacaladilla capturada en la bahía de Motril, encontrando un 10'63% de *Anisakis* Tipo I. En 2003, se realizó un estudio sobre prevalencia de anisákidos en pescado comercializado en Merca-Granada (Rello et al., 2004) con prevalencias de *Anisakis* del 25% en faneca (*Trisopterus luscus*) y del 9'34% en boquerón. También Chía et al. (2010) analizaron 119 bacaladillas de las costas gallegas obteniendo una prevalencia en *Anisakis* Tipo I del 100% , con una intensidad y abundancia medias de 55'89.

Área geográfica	Especie	N	Prevalencia	Autor
Galicia	Merluza	25	100%	Abollo et al. (2001)
	Bacaladilla	147	91'16%	
	Caballa	55	74'54%	
	Jurel	100	88%	
	Aguja (<i>Belone belone</i>)	25	100%	
Portugal	Jurel	58	76%	Silva y Eiras (2002)
	Caballa	45	96%	
	Merluza	3	100%	
	Bacaladilla	65	94%	
	Jurel	360	6'3%	
Costa mediterránea española	Bacaladilla (17-24 cm)	224	12%	Adroher et al. (1996)
	Bacaladilla (>25 cm)	77	17%	Valero et al. (2000)
	Merluza	63	41%	
	Brótola de fango (<i>Phycis blennoides</i>)	209	13'4%	Valero et al. (2006 a, b)
	Brótola de roca (<i>Phycis phycis</i>)	58	5'2%	

Tabla 2. Prevalencia de *Anisakis* spp. en peces de interés comercial capturados en la Península Ibérica. N: número de ejemplares.

7. LOCALIZACIÓN DE LAS LARVAS EN EL HOSPEDADOR.

La localización del parásito es importante para el consumidor, especialmente en el caso de la infección de la musculatura ya que es la parte que se consume. Así, dentro de los peces (principalmente teleósteos), es frecuente encontrar larvas de *Anisakis* spp. encapsuladas en espirales planas y apretadas, de aproximadamente 4-5 mm de sección, sobre los órganos viscerales, mesenterio y peritoneo. Sin embargo, también pueden encontrarse libres sobre las vísceras o migrar de la cavidad abdominal a la musculatura de los peces, principalmente en la ventral (hipoaxial), pero también pueden penetrar profundamente en la musculatura dorsal (epiaxial) de su hospedador (Chía et al., 2010; EFSA, 2010; Petersen et al., 1993; Smith y Wootten, 1978).

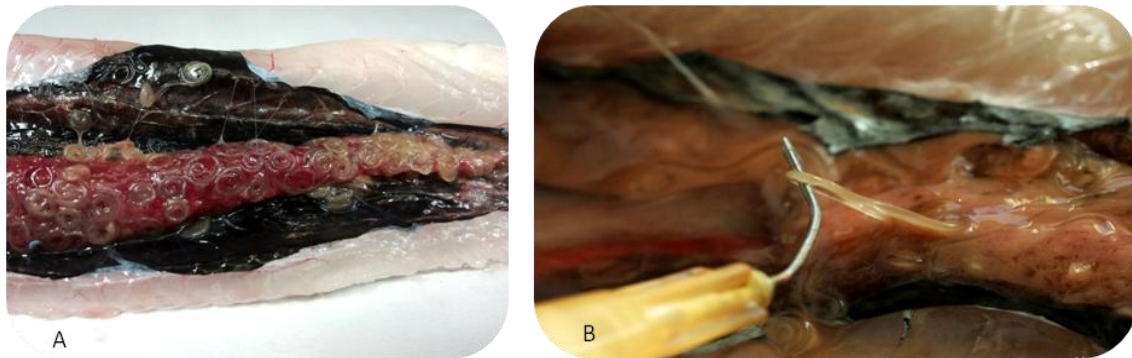


Figura 15. A. Larvas de *Anisakis* spp. enquistadas en la superficie hepática. B. L₃ de *Anisakis* spp. libre en hígado.

Según varios autores (Chía et al., 2010; Smith, 1984; Tejada, 2009; Valero et al., 2006 a, b), la localización de la larva en el pescado está influenciada por diferentes factores tales como:

- Especie del hospedador.
- Alimentación de los peces. Así, aquellos peces que se alimentan principalmente de eufáusidos (bacaladillas, arenque, caballa, etc.), la mayoría de las L₃ se encuentran en la cavidad abdominal y vísceras, mientras que en peces piscívoros [abadejo (*Pollachius pollachius*), bacalao, merluza, etc.], suelen estar presentes también en la musculatura hipoaxial que rodea a la cavidad abdominal.
- Grado de infección. Generalmente a un mayor número de parásitos en vísceras le acompaña un mayor número de parásitos en musculatura.

- Edad. Cuanto más viva el pez, mayor será la posibilidad de adquirir parásitos.
- Condiciones del almacenamiento después de su captura.

Recientemente se están observando diferencias de capacidad de penetración en la musculatura del pez entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*. Así, Suzuki et al. (2010) detectaron una mayor capacidad de penetración de *A. simplex* s.s. en la musculatura del estornino (*Scomber japonicus*) que *A. pegreffii*. Quiazon et al. (2011) mediante infecciones experimentales en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y en la platija de aceite de oliva (*Paralinchthys olivaceus*), vieron que la presencia de *Anisakis* en la musculatura de los peces, no solo obedece al tipo de pescado sino también a la especie parásita y al tiempo que transcurre desde que se infecta el pez. Posteriormente, Arizono et al. (2012) apreciaron una mayor capacidad de penetración de *A. simplex* s.s. en medios de cultivo con agar a diferentes pH. Estos resultados identifican a *A. simplex* s.s. como el principal agente etiológico de la anisakiosis, mientras que en Italia es *A. pegreffii* aunque la frecuencia de casos es menor (D'Amelio et al., 1999; Fumarola et al., 2009; Mattiucci y Nascetti, 2008). A pesar de ser las larvas de *Anisakis* Tipo I las más frecuentes en la musculatura de peces, Valero et al. (2006 a) localizaron larvas de *A. physeteris* en brótolas.

Existen varios trabajos en los que hay una relación positiva entre el tamaño corporal/edad de los peces, y la prevalencia y abundancia media de larvas de estos nematodos en diversas especies de peces comerciales de diferentes áreas del Atlántico y Mediterráneo (Abattouy et al., 2011; Banning y Becker, 1978; Bussmann y Ehrlich, 1979; Davey, 1972; Levsen y Midthun, 2007; McGladdery, 1986; Platt, 1975; Smith, 1984; Smith y Wootten, 1978; Valero et al., 2000).

Levsen y Midthun (2007), en un estudio sobre la presencia y distribución de L₃ de *A. simplex* s.l. en pescados comerciales del noreste atlántico, encontraron diferencias en los diversos parámetros de infección entre los peces hospedadores. Los resultados sugieren que la infección por *A. simplex* s.l. en peces pelágicos está relacionada con su hábitos de alimentación, edad, características inmunológicas, y la distribución y tamaño de los órganos. Así, el hígado que es relativamente mayor

en las bacaladilla que en otros peces, probablemente "atrapa" la mayoría de las larvas inmediatamente después de su aparición en la cavidad visceral. Se sabe que las larvas son capaces de sobrevivir durante al menos 60 semanas en los peces aunque su supervivencia depende de la respuesta inmunológica del pez (Levsen y Midthun, 2007; Smith, 1984).

En general, ha existido la creencia de que en el músculo del pez vivo no había larvas y que éstas pasaban a musculatura una vez muerto el hospedador. Sin embargo, se ha probado que muchas especies de peces presentan larvas de *Anisakis* encapsuladas en su musculatura en el momento de su captura, especialmente en la zona ventral, aunque también pueden encontrarse en la dorsal (Tejada, 2009). Las causas que originan la migración de las larvas de *Anisakis* hacia los músculos no están bien definidas; así Huss (1988) indicó que el 50% de arenques tenían larvas en la musculatura en el momento de la captura y que las prácticas durante la pesca no parecían intervenir en la posible migración. Huss y Drewes (1989) ratificaron que, independientemente de las condiciones de almacenamiento, no existía certeza de migración hacia la musculatura después de la captura; además, remarcaron que las prácticas realizadas a bordo para eliminar o reducir el número de larvas en el pescado, no parecen influir.

Por el contrario, hay autores que han puesto de manifiesto que la migración de las larvas desde la cavidad abdominal hacia la musculatura del pescado puede seguir produciéndose tras su captura. Así, Smith y Wootten (1975) observaron cómo aumentaba significativamente el número de larvas en el músculo del arenque mientras lo conservaban en hielo durante 48 horas, lo cual sugiere que primero se encontraban encapsuladas en las vísceras y después se daba la migración al músculo. Hauck (1977) también encontró, después de la captura, un aumento significativo en el número de larvas de *Anisakis* Tipo I en el músculo de arenque del Pacífico (ahumado en frío). En estos estudios se sugirió que la migración se ve estimulada: por el tiempo desde su captura, por los cambios post-mortem en la descomposición de las vísceras y/o exposición a las temperaturas de ahumado y salmueras.

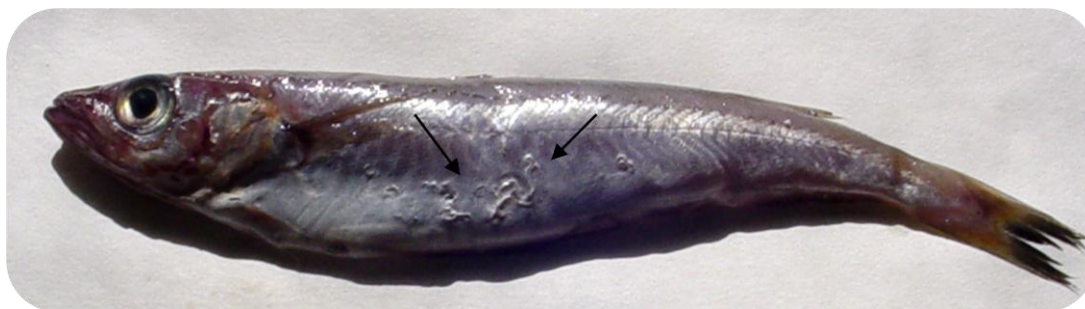


Figura 16. Larvas de *Anisakis* spp. en la musculatura de una bacaladilla.



Figura 17. Larva de *Anisakis* spp. atravesando la musculatura.

Según Smith (1984), las larvas parecen migrar a la musculatura en peces que acumulan gran cantidad de lípidos en el tejido muscular (caballa, arenque), mientras que en peces que almacenan sus lípidos en hígado y mesenterios, la migración no suele darse [bacaladilla, merlán (*Merlangius merlangus*)]. Ahora bien, aparte de la reserva de lípidos en el tejido muscular, deben de influir en la migración otros factores, puesto que se han notificado en diversos trabajos larvas en la musculatura de la bacaladilla y otros peces no grasos (Abollo et al., 2001; Chía et al., 2010; Ruíz-Valero et al., 1992; Sanmartín et al., 1994). Las condiciones de conservación constituyen uno de los factores que pueden afectar a la migración de las larvas. Así, Wharton et al. (1999) observaron que además de influir la cantidad de grasa en los tejidos de los pescados, en los conservados en hielo hay una menor migración. Por otro lado, Karl et al. (2011) no constataron diferencias de migración entre peces recién capturados y los conservados tras 24 horas en hielo o bien por sistema de refrigeración con agua de mar.

La especie de pescado, tiempo que transcurre desde que se infecta el pez, peso total, longitud, peso del hígado, peso de las gónadas, época del año, zona de captura y la especie de *Anisakis*, están relacionadas con la parasitación de *A. simplex* s.l. (Abattouy et al., 2011, 2013; Quiazon et al., 2011; Suzuki et al., 2010).

Ocasionalmente, se han encontrado anisákidos en vísceras y músculo de peces de cultivo, aunque no es frecuente debido al exhaustivo control en la alimentación de estos ejemplares. Las vías de transmisión esporádicas en estos casos podrían deberse a la presencia en el medio marino de hospedadores intermediarios como crustáceos, o a través de la alimentación con productos contaminados (Rückert et al., 2009).

8. PROFILAXIS.

El Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2005) y de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010) han propuesto una serie de medidas encaminadas a reducir el riesgo asociado con la contaminación de los pescados con larvas de *Anisakis*:

a) Medidas en la producción primaria.

- Evitar faenar en las áreas donde se conozca que existe alta parasitación y no capturar determinadas especies de peces o tallas que con mayor frecuencia están infectados con *Anisakis*. Aunque ninguna de estas dos medidas son muy factibles.
- Evisceración del pescado inmediatamente después de su captura. Según Huang (1990) y Petithory et al. (1991) puede resultar eficaz sobre todo en especies que acumulan sus reservas lipídicas en la musculatura, a los cuales parece que existe una tendencia de migración larvaria desde las vísceras y cavidad corporal; no obstante, en algunos peces, los parásitos ya se encuentran en la musculatura en el momento de la captura (Huss et al., 1992). En contrapartida, esta práctica favorece la parasitación de los peces de la zona si las vísceras infectadas sin previo tratamiento, como es la congelación, se arrojan al mar. La eliminación al mar de vísceras y otros restos de peces y cefalópodos incrementa la prevalencia de *Anisakis* en las especies que permanecen en el mar.

b) Prácticas durante la captura y manipulación a bordo.

- Para evitar la presencia de larvas de *Anisakis* en músculo de pescado, es imprescindible que el tiempo que transcurre entre la captura y la evisceración sea mínimo.
- El número de larvas detectadas en la musculatura hipoaxial hace que sea recomendable la eliminación de esta parte (ventresca o ijada), en las especies que más frecuentemente están infectadas, contribuyendo a disminuir el riesgo.
- Liberar y lavar convenientemente las huevas (paquete ovárico) ya que pueden contener larvas vivas.

c) Manipulación en tierra e inspección:

- Si no se ha llevado a cabo en el buque, debe procederse a la evisceración y lavado de la cavidad abdominal lo más rápidamente posible tras el desembarque y, si es posible, eliminación de la musculatura hipoaxial.
- Inspección visual del pescado en el punto de desembarco y eliminación de aquellas partidas muy parasitadas. Esto es muy difícil de poner en práctica por lo que es frecuente que los peces parasitados lleguen al consumidor (FAO, 2004; Osanz, 2001). Se ha demostrado que el 45-83% de las larvas del músculo del jurel y bacaladilla no se visualiza (Huang, 1990). En el caso de filetes, se debe realizar un examen visual de la superficie y eliminar las larvas con un cuchillo. Llarena-Reino et al. (2012) declaran la baja eficiencia de la inspección visual, de merluza y caballa, como método de eliminación de estos nematodos.
- Transparentado o “candling” (Smith y Wootten, 1978). Método usado en las industrias, que consiste en observar visualmente las larvas de anisákidos en filetes del pescado colocado sobre mesas iluminadas que proyectan una fuerte luz. La observación se complica a partir de los 6 mm de grosor del filete. Además, la técnica no es muy eficiente ya que sólo se detectan del 7-10% de las larvas (Levsen et al., 2005, Tejada, 2009).
- Espectroscopía de imagen. Método de imagen no invasivo, factible para fines industriales, con el que es posible identificar los parásitos en la superficie de los filetes de pescado, así como parásitos incrustados. Con esta metodología se pudo detectar los parásitos a 0’8 cm por debajo de la superficie redondeada, lo que sería de 2 a 3 mm más profundo que lo que se puede encontrar por la inspección manual de los filetes de peces (Heia et al., 2007).
- Iluminación con luz ultravioleta. Consiste en hacer incidir luz ultravioleta de una longitud de onda de 366 nm, a unos diez centímetros de distancia sobre la superficie del filete de pescado por ambos lados, observándose las larvas de color fluorescente azulado (Dixon, 2006; Osanz, 2001). Aunque es un método fácil y relativamente

rápido, sólo diferencia larvas intactas y preferiblemente si han sido congeladas y descongeladas previamente (Bratney, 1988; Dixon, 2006; Osanz, 2001; Tejada, 2009; Tejada et al., 2006).

- Digestión por jugo gástrico artificial. Método muy eficaz que consiste en someter el pescado (carne y/o vísceras) a la actuación de una solución digestiva artificial (ácido clorhídrico-pepsina a 37° C). Sirve para búsquedas precisas en muestras pequeñas, complicándose en pescados grandes, ya que se necesita la observación de la totalidad de la muestra (Huang, 1990); está desaconsejado para las inspecciones industriales.
- Diferencias de conductividad. La técnica se basa en el uso de magnetómetros que registran de forma automática las diferencias de conductividad del músculo del pescado con respecto a las de las larvas y permite su discriminación del resto de los componentes del pescado (Jenks et al., 1996).
- Actividad ATPasa. Se ha observado que los peces que se encuentran parasitados tienen una actividad ATPasa elevada en las mitocondrias del músculo; ésta es proporcional al número de parásitos por pescado por lo que se puede utilizar para valorar la infección del hospedador (Boczon y Bier, 1986).

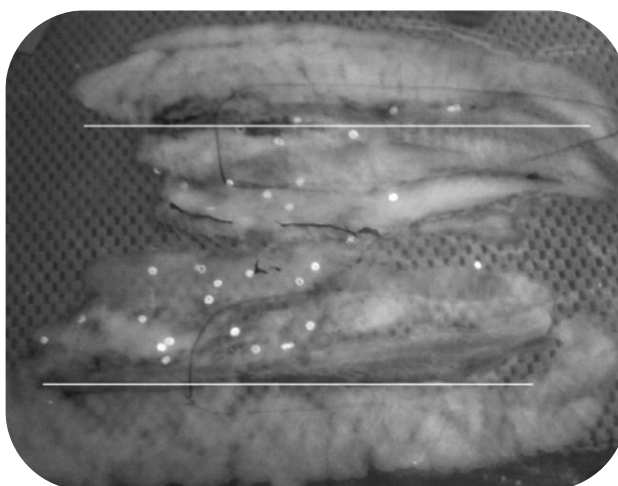


Figura 18. Larvas de *Anisakis* spp. en filetes de bacaladilla, prensadas y posteriormente congeladas, observadas bajo la luz ultravioleta. Las líneas rectas marcan la frontera aproximada entre la ventresca y la musculatura dorsal de cada lado de los peces (EFSA, 2010).

d) Recomendaciones para la población en general:

- Adquirir pescados y cefalópodos frescos.
- Para pescados de tamaño mediano y grande, procurar adquirirlos eviscerados. Si no lo están, hacerlo inmediatamente.
- No consumir pescados ni cefalópodos crudos ni productos de la pesca ahumados en frío, marinados, en vinagre, ceviche, sushi, o procesados de cualquier otra forma que no garantice la inactivación del parásito, salvo que éstos se hayan sometido a congelación comercial a -20° C durante el tiempo adecuado.

En todo momento, hay que asegurarse que haya un tratamiento térmico completo. El cocinado a la plancha y en microondas es menos seguro que la cocción completa o la fritura (Adams et al., 1999). En lo relativo a los pacientes sensibilizados a los antígenos de *Anisakis*, algunos autores como Audicana et al. (1995), recomiendan evitar el consumo de pescado y marisco, basándose en que la parasitación repetida, a veces asintomática, desencadenaría una respuesta de IgE y con ello un cuadro cutáneo y/o anafiláctico.

A pesar de los diferentes métodos de tratamiento del pescado para dar muerte a las larvas y evitar las infecciones, puede darse procesos alérgicos en individuos previamente sensibilizados. Sin embargo este hecho no está dilucidado. Se ha observado que el antígeno Ani s 4 se detecta incluso en las condiciones más extremas de temperatura, tiempo, presión y tratamientos con pepsina tanto en larvas refrigeradas como congeladas (Tejada, 2009; Tejada et al., 2006).

Según algunos autores, los síntomas agudos alérgicos como urticaria, angioedema o anafilaxia se producen sólo cuando larvas vivas de *A. simplex* s.l. invaden el tracto gastrointestinal (Daschner et al., 2012) causando anisakiosis gastroalérgica (AGA). La anafilaxia ha sido diagnosticada en el 35% de los pacientes con AGA (Daschner et al., 2000, 2012).

Se considera que es necesaria la infección de la mucosa gástrica o intestinal con L₃ vivas para la liberación de antígenos de excreción-secreción y una respuesta inmediata frente a la parasitación, especialmente debido a Ani s 7, para que se sintetice IgE y aparezcan los síntomas alérgicos (Daschner et al., 2012; Domínguez-Ortega y Martínez-Cócera, 2000; Moneo et al., 2000). Así, pacientes con

alergia a *Anisakis* toleran bien la ingesta de pescado congelado o preparado a altas temperaturas, a pesar de presentar antígenos resistentes a la congelación, calor y pepsina (Daschner et al., 2012; García et al., 2001; Rodríguez-Mahillo et al., 2008, 2010). Sin embargo, también se han recogido casos de pacientes con alergia tras el consumo de pescado correctamente congelado, cocinado o incluso en conserva, tratamientos que aseguran la muerte del parásito (Audicana et al., 1997, 2002; Moneo et al., 2005; Montoro et al., 1997; Tejada, 2009). Se ha observado pacientes sensibilizados que no han mostrado síntomas alérgicos tras la provocación oral con larvas liofilizadas (Baeza et al., 2004; Gómez et al., 2003).

Aunque parece que la ingestión de la larva es la principal causa de anisakiosis alérgica, se han dado casos de alergia ocupacional con sintomatología de asma y/o conjuntivitis en trabajadores de la industria del pescado, causados por la inhalación de antígenos (Armentia et al., 1998; Purello-D'ambrosio et al., 2000). Incluso al ingerir carne de pollo alimentado con piensos realizados con harina de pescado (Armentia et al., 2006).

Actualmente no existen medidas concretas para evitar los casos alérgicos pero sí para evitar la infección y otras posibles complicaciones. Tal y como se ha visto, las larvas de *Anisakis* spp. no resisten las altas temperaturas, por lo que es esencial realizar un buen tratamiento térmico antes de consumir el pescado. Las medidas con las que contamos para destruir el parásito son:

a) Tratamientos térmicos.

Las larvas que se encuentran en el tejido muscular son las que más riesgo presentan para el hombre. Por ello, es necesario incrementar o disminuir, según el caso, el tiempo de exposición con el fin de que la pieza alcance los valores térmicos adecuados.

Congelación.

Para que sea eficaz esta técnica es necesario que todos los puntos del pescado se mantengan a -20° C al menos durante 24 horas, sin contar el tiempo que se requiere para llegar a la temperatura dada. Esta técnica ofrece buenos resultados ya que altera la cutícula del parásito. En el trabajo de Dong et al. (2000), un congelador doméstico usado para el halibut del Pacífico (*Atheresthes stomias*)

necesitó 9'5 horas para alcanzar -20° C y al menos 60 horas para la inactivación total de la larva.

La OMS (*Organización Mundial de la Salud*) recomienda la congelación a una temperatura igual o inferior a -20° C en el interior del pescado, durante un período de al menos 24 horas (Adams y Motarjemi, 1999). La FDA (*Food and Drug Administration*) especifica una congelación y almacenamiento a una temperatura de $\leq -20^{\circ}$ C y mantenerlo a la misma temperatura durante 15 horas. En el ámbito doméstico, a la hora de hacer recomendaciones al consumidor hay que tener en cuenta la capacidad de congelación de los frigoríficos. La ultracongelación realizada por algunas industrias, asegura una congelación rápida a -40° C y es capaz en tan solo una hora de matar más del 99% de las larvas presentes en el músculo de algunos peces, con la ventaja adicional de no alterar las propiedades culinarias del pescado. Esta técnica es capaz de inactivar las larvas pero no de destruir la capacidad de sensibilización de todos los antígenos. Así, un 10% de los pacientes desarrollan síntomas tras la ingesta de pescado congelado (Baeza et al., 2001; Valls et al., 2003).

Altas temperaturas.

Para asegurar la muerte de las larvas de *Anisakis* spp. mediante calor se recomienda someterlas a una temperatura de 55° C durante 10-60 segundos, (AESAN 2005). La OMS y FDA consideran que un tratamiento a 60° C en el centro del producto durante un minuto es suficiente para matar a las larvas siempre que se tengan en cuenta las características fisicoquímicas, su presentación, sistema de calentamiento ya que influyen en la transmisión del calor (Tejada, 2009; Wootten y Cann, 2001). De esta manera, los productos fritos, hervidos, ahumados en caliente, pasteurizados y cocinados al vacío son seguros desde el punto de vista de la inactivación del parásito. Sin embargo, no lo son los productos ahumados en frío o cocinados inadecuadamente en la plancha o microondas, pudiendo aparecer casos de anisakiosis (Canut et al., 1996; Tejada, 2009; Tejada et al., 2006). Mientras que el ahumado en caliente (70-80° C) durante un tiempo de 3 a 8 horas, es suficiente para producir la muerte de las larvas de *Anisakis* (FDA/CFSAN, 2001; Sainclivier, 1985), en el caso del ahumado en frío (<38° C), la temperatura alcanzada no es suficiente (EFSA, 2010). Para productos asados hay que asegurarse que el pescado

se encuentre bien cocinado por dentro. En estos casos sería recomendable congelarlo previamente para que el consumidor pueda darle la textura que desee sin posibilidad de infectarse.

Al someter las larvas a altas temperaturas por métodos tradicionales, se aprecian importantes alteraciones en la forma y en la superficie del parásito con importantes daños en la cutícula. Además, la deshidratación producida provoca la pérdida de la forma cilíndrica (Tejada, 2009; Tejada et al., 2006).

Los aparatos de microondas tienen una capacidad de penetración limitada hasta cierta profundidad. Además, no producen un calentamiento homogéneo, pudiendo quedar dentro del pescado puntos fríos y puntos sobrecalentados. Esto hace que se necesiten altas temperaturas para inactivar a las larvas (Adams y Devlieger, 2000; Tejada, 2009; Tejada et al., 2006). En el trabajo de Lanfranchi y Sardella (2010), se indica una supervivencia del 10% de las larvas de *Anisakis* spp. a la temperatura interna de 64'5° C durante un minuto en microondas, mientras a una temperatura de 75'5° C, todos los parásitos murieron. Los daños que aparecen en la cutícula de las larvas son similares a los producidos por calentamiento convencional. Respecto al uso del microondas para cocinar, la FDA recomienda calentar al menos 15 segundos a 74° C, cubriendo y rotando la pieza y finalmente reposar el alimento durante 2 minutos una vez cocinado (ELIKA, 2009).

En el caso de los antígenos, generalmente los alérgenos de bajo peso molecular tras ser calentados incluso a 100° C son capaces de mostrar cierta capacidad para unirse a la IgE, aunque se reduce su antigenicidad.

b) Altas presiones.

Someter el pescado a altas presiones (≥ 200 MPa ≥ 1 min) produce alteraciones en la cutícula favoreciendo la muerte de la larva, incluso en aquellos nematodos que se encuentran en el interior de los tejidos. La presión hidrostática se extiende de forma homogénea e instantánea sin alterar las características sensoriales del pescado siempre que no se superen los 300 Mpa (Vidacek et al., 2009). La presión para matar a los parásitos puede ser menor cuando se combina con otros tratamientos parcialmente letales para *Anisakis* spp., tales como marinados o ahumados en frío. Éste método puede ser una

alternativa para controlar la seguridad en los pescados mínimamente procesados (Molina-García y Sanz, 2002).

c) Succión por vacío.

Consiste en introducir una boquilla en la cavidad abdominal del pescado para succionar los parásitos y restos de vísceras que quedan tras la evisceración. Se acumulan en un tanque y se destruyen los parásitos mediante aplicación de agua caliente, vapor o bien por trituración (Gómez, 2005).

d) Electrocutación.

En los barcos pesqueros se somete a los peces capturados a una descarga eléctrica que destruye a los parásitos. Cuando se trata de ejemplares grandes se hace de forma individual, mientras que en los ejemplares de menor tamaño puede hacerse de forma masiva practicando la electrocutación por inmersión del pescado en grandes recipientes con una disolución electrolítica. La intensidad aplicada puede variar según el tamaño o características del pescado. Con este procedimiento se consigue la muerte de la larva de forma rápida y sencilla, quedando por tanto el pescado apto para el consumo (Bereciartua, 2003).

e) Otros métodos.

La eficacia del salazón y la acidificación para producir la muerte de los parásitos depende mucho de la concentración de sus componentes y la cantidad añadida de los mismos pudiendo variar entre 35-119 días (Karl et al., 1995). Los anisákidos son resistentes a la salmuera que habitualmente se utiliza en los hogares. Sin embargo, en una solución salina al 22%, los nematodos mueren a los 10 días (Smith, 1983). Investigadores de la Universidad de Alcalá de Henares emplean una concentración aproximada del 12% de cloruro sódico (sal común) y ácido acético a 10% en lugar de vinagre comercial. El tiempo empleado es de 5 días a 4° C (Armas et al., 2005).

9. LEGISLACIÓN.

9.1. Legislación europea.

Como consecuencia de los casos crecientes de anisakiosis, la Unión Europea a partir del año 1991, comenzó a emitir una serie de normativas específicas para reducir esta enfermedad.

- I. Directiva sanitaria del Consejo 91/493/CEE, de 22/07/91; (DO L 24/09/91, pp. 15) por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros. Establece en el apartado V del capítulo IV los requisitos referentes a los peces y en el apartado II del capítulo V los controles parasitológicos (DO L 268 de 24/9/1991).

Normativa que ha afectado posteriormente a esta norma:

- Directiva 95/71/CE del Consejo de 22 de diciembre de 1995. Nº L332, pp. 40. Disposición Vigente. Modifica Anexo.
 - Directiva 96/23/CE del Consejo de 20 abril de 1996. Nº L125, pp. 10. Disposición Vigente. Deroga Anexo.
 - Directiva 97/79/CE del Consejo de 19 diciembre de 1997. Nº L24, pp. 31. Disposición Vigente. Modifica art. 10. 2. y art. 12. 2.
 - Directiva 2004/41/CE de 21 de abril de 2004. (DO L 30 abril 2004, núm. 157, pp. 33). Deroga determinadas Directivas que establecen las condiciones de higiene de los productos alimenticios y las condiciones sanitarias para la producción y comercialización de determinados productos de origen animal destinados al consumo humano y modifica Directivas 89/662/CEE, de 11-12-1989 (LCEur 1989, 1892), 92/118/CEE, de 17-12-1992 (LCEur 1993\637) y la Decisión 95/408/CE, de 22-6-1995 (LCEur 1995\2408).
- II. Decisión de la Comisión 93/140/CEE de 19 de enero (DOCE de 9 de marzo de 1993), establece las modalidades del control visual para detectar parásitos en los productos de la pesca (DO L 056 de 09/03/1993, pp. 42).
 - III. Reglamento (CE) nº 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. En el capítulo III de la sección VIII del anexo

- III se establece los métodos de congelación para eliminación de parásitos en productos que se consuman crudos o poco cocinados (DO L 226 de 25/06/2004, pp. 22-82).
- IV. Reglamento (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano en el que se señala que el pescado que se va a consumir crudo o prácticamente crudo debe congelarse a temperaturas iguales o inferiores a -20° C en la totalidad del producto y mantenerse a esa temperatura durante al menos 24 horas (DO L 226 de 25/06/2004, pp. 83-127).
- V. Reglamento 1276/2011 de la Comisión de 8 de diciembre de 2011 por el que se modifica el Anexo III del Reglamento 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente al tratamiento para matar parásitos viables en los productos de la pesca destinados al consumo humano. Unión Europea (DOUE 327, 09-1-11).

La legislación de la Unión Europea señala que el pescado que vaya a consumirse crudo o poco cocinado debe congelarse a una temperatura $\leq -20^{\circ}$ C en la totalidad del producto y debe mantenerse a esa temperatura al menos durante 24 horas. Se procederá de la misma manera para aquellos productos que se encuentren ahumados en frío (procedimiento por el cual en el interior de la pieza no se superan los 60° C), en escabeche, salados o cuando el proceso no baste para destruir las larvas.

9.2. Legislación española.

En aplicación de la Normativa de la Unión Europea, España publicó en 1993 el R.D. 1437/92 del 27 de noviembre por el que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de acuicultura. En este R.D. se determina que tanto los pescados como productos derivados deben pasar un control visual para detectar los posibles parásitos visibles y desecharlos. Por otra parte, se prohíbe la venta de los pescados o las partes que estén visiblemente parasitadas. Además, son los barcos factoría y las industrias dedicadas a la elaboración y preparación de los productos de pesca los

responsables de realizar el control para garantizar el cumplimiento de dicha ley. El Ministerio de Sanidad y Consumo ha legislado al respecto, [según se recoge en el BOE del 19 de diciembre de 2006 (R.D. 1420/2006)] en lo referente a la prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades.

De esta manera, el R.D. pretende evitar la infección con la larva viva e impedir la instauración de alergia a *Anisakis* en consumidores, sin que se considere su incidencia en individuos previamente sensibilizados a los alérgenos del parásito (Tejada et al., 2009).

Hay que recalcar que, de todos los métodos existentes para inactivar las larvas presentes en el pescado de consumo humano, los más eficaces y recomendados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) son: calentamiento del pescado a más de 60° C, aumentando el tiempo con el grosor, o congelación a una temperatura igual o inferior a -20° C, durante un período de al menos 24 horas, (considerando en ambos casos, que las condiciones recomendadas se tienen que dar en el centro térmico del producto). Estos métodos son los recogidos en el mencionado R.D.

En el caso de la Food and Agriculture Organization (FAO), las medidas son similares, recomendando congelar el pescado que se va a consumir a -20° C durante siete días o a -35° C durante 15 horas.

10. PATOLOGÍA Y SINTOMATOLOGÍA.

La ingestión de pescado parasitado puede provocar en el hombre la aparición de dos patologías diferenciadas: por un lado, la larva puede infectar el tracto digestivo y en ocasiones otros órganos (anisakiosis) y, por otro, reacciones alérgicas con o sin síntomas digestivos. La mayoría de los casos de anisakiosis humana se dan en estómago y en íleon por el efecto barrera que frente a las larvas hacen tanto el píloro como la válvula de Bauhin respectivamente, concentrándose en dichas zonas un mayor número de parásitos (Ishikura et al., 1992; Louredo Méndez, 1997; Pérez Millan et al., 1998; Romero Ramírez y Polydorides., 1997). Dependiendo del grado de invasión de las larvas en el tracto digestivo, se diferencian varias formas clínicas:

10.1. Forma clínica no invasiva.

La sintomatología es leve y aparece pocas horas después de la ingesta de pescado. Cursa con dolores leves de estómago y normalmente, las larvas que se encuentran en la luz del tracto digestivo, se expulsan por la tos, vómitos o excretadas por las heces (Hubert et al., 1989; Kliks, 1983; Sapunar et al., 1976).

10.2. Forma clínica invasiva.

La larva invade los tejidos con la ayuda del diente que posee en la parte anterior y gracias a la presencia de hialuronidasas, que facilitan la penetración tisular y de proteasas que son las responsables de la destrucción del tejido (Audicana y Kennedy, 2008; Hotez et al., 1994). De acuerdo a su sintomatología diferenciamos:

- **Anisakiosis gástrica aguda.**

La forma aguda se da a las 4 ó 6 horas de haber ingerido pescado crudo o poco cocinado y se debe a la presencia de la larva viva en la pared del estómago. A las pocas horas de la ingesta, aparecen principalmente dolor abdominal de tipo cólico localizado en el epigastrio, que puede acompañarse de náuseas y vómitos (Castán et al., 2002; Cocheton et al., 1991; Kim, 1994). La mayoría de los casos de anisakiosis se han asociado a *A. simplex s.s.*, que se considera el agente etiológico de la anisakiosis en Japón (Umehara et al., 2007); aunque también se han observado casos provocados por *A. pegreffii*

(Abe et al., 2006; D'Amelio et al., 1999; Fumarola et al., 2009; Mattiucci et al., 2011, 2013; Suzuki et al., 2010; Umehara et al., 2007).

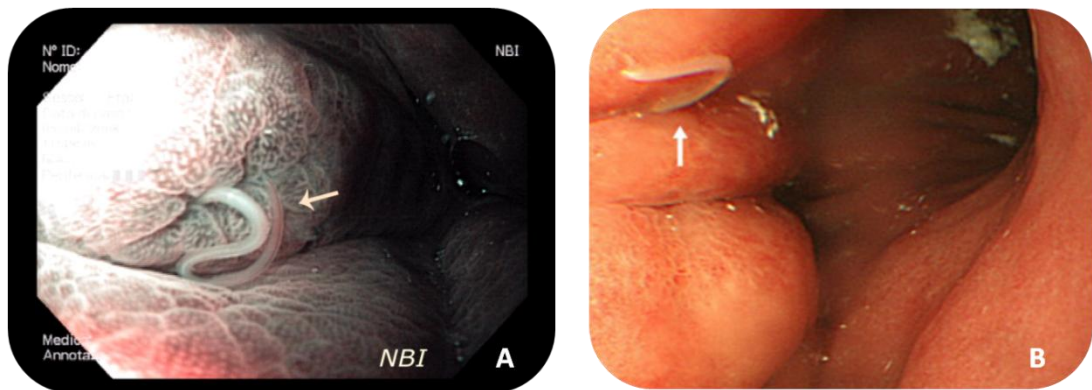


Figura 19. A. Anisakiosis invasiva. Perforación de la pared intestinal (Taranto et al., 2011). B. Larva de *Anisakis* atravesando la pared gástrica (Nakajo et al., 2011).

- **Anisakiosis gástrica crónica.**

Es frecuente que los síntomas sean inespecíficos y recidivantes, y a veces evolucionan durante meses o años pudiendo provocar tumores submucosos (Esteve et al., 2000; Yokogawa y Yoshimura, 1967). Algunos trabajos relacionan la anisakiosis con procesos neoplásicos, por lo que se ha valorado su papel como factor adyuvante (Hernández-Prera et al., 2012; Ishii et al., 2009; Mineta et al., 2006; Yoo et al., 2008).

- **Anisakiosis intestinal.**

Provocada por la localización de la larva de anisákidos vivos en la pared del intestino, generalmente en el íleon terminal. El dolor es difuso y no localizado, con náuseas, vómitos, alteraciones del ritmo intestinal, simulando un cuadro obstructivo e incluso heces sanguinolentas. Estos síntomas aparecen a los 3-7 días tras la ingestión del pescado parasitado (Ishikura, 1990; Matsui et al., 1985). El curso de la enfermedad suele ser benigno, salvo que se produzca perforación y peritonitis.

- **Anisakiosis intestinal aguda.**

Las manifestaciones clínicas comienzan a los 2-7 días tras la ingesta de pescado infectado (Clavel et al., 1993; Cocheton et al., 1991; López Peñas et al., 2000; López-Vélez et al., 1992 b; Petithory et al., 1991). Las náuseas, vómitos, heces sanguinolentas y dolor difuso son los principales síntomas

que conforman el cuadro clínico de esta enfermedad, pudiendo verse afectado el tránsito intestinal (González Quijada et al., 2005; Louredo Méndez et al., 1997; Navarro-Cantarero et al., 2005; Repiso Ortega et al., 2003; Shirama et al., 1992). La pared intestinal suele engrosarse, provocando obstrucción intestinal parcial y distensión proximal, acompañadas de ascitis con un alto contenido en eosinófilos. Es frecuente que aparezcan ulceraciones con focos de hemorragia adyacente. El intestino delgado suele ser el más afectado, simulando una enteritis regional (Bouree et al., 1995; López Peñas et al., 2000; Yokogawa y Yoshimura, 1967).

- **Anisakiosis intestinal crónica.**

Al igual que en la anisakiosis gástrica, la anisakidosis intestinal también puede evolucionar a su forma crónica, con síntomas leves e inespecíficos como dolor abdominal vago que puede permanecer durante meses o años.

- **Anisakiosis extra-gastrointestinal.**

Este tipo de anisakiosis, también llamada heteróloga o ectópica, se da con mucha menos frecuencia que las anteriores (Cocheton et al., 1991; Smith y Wootten, 1978). Las localizaciones de las larvas fuera del conducto gastrointestinal pueden ser: boca, faringe, laringe y esófago, donde producen picores e incluso pueden penetrar en la mucosa, dando lugar al “síndrome del hormigueo en la garganta”; en estos casos se suelen expulsar al toser. Por otra parte, puede ocurrir que alguna larva consiga atravesar la pared del tracto gastrointestinal y produzca el llamado “síndrome de larva migrans”, alcanzando zonas como: pulmón, mesenterio, hígado, vesícula, páncreas, ovarios, pleura, nodos linfáticos, etc. (Saito et al., 2005); la larva puede morir o encapsularse, permaneciendo así hasta que el cuerpo humano la va degradando paulatinamente. En este proceso se liberan antígenos que sensibilizan al paciente tanto en el paso de la larva, como en su encapsulación y/o descomposición (Ishikura et al., 1992). También es frecuente en este tipo de anisakiosis, la formación de granulomas con restos de larva en su interior (Yokogawa y Yoshimura, 1967).

- **Anisakiosis gastroalérgica.**

La hipersensibilidad a *Anisakis* spp. está mediada por la IgE y la manifestación más frecuente es la urticaria (73%), aunque también se ha descrito hipotensión arterial, angioedema, bronco-espasmo e incluso choque anafiláctico. En algunos casos, los síntomas cutáneos o de anafilaxia acompañan a los síntomas digestivos, y suelen preceder a estos últimos (Daschner et al., 2000). El tiempo de latencia para los síntomas gastro-intestinales es de 3-6 horas, y para los alérgicos 5 horas (Alonso et al., 1997; López-Serrano et al., 2000 a, b). Daschner et al. (2012) sugieren que la mayoría de la IgE específica detectada, se debe a infecciones subclínicas anteriores en pacientes que consumen habitualmente pescado y sólo se produce cuando la L₃ invade el tracto gastrointestinal. Al mes de la infección aumenta la IgE pero también se detecta IgG, IgG₄, IgA e IgM específicas en suero de pacientes (Daschner et al., 2000). Todas estas características parecen corresponder con una respuesta típica frente a helmintos y no está relacionada con una predisposición del individuo si no que se trata de una respuesta general, evolutivamente conservada, frente a la invasión de helmintos. De esta manera, la respuesta de IgE sería independiente de la manifestación de los síntomas alérgicos y en respuesta a la invasión del parásito (Daschner et al., 2012; Urban et al., 1992).

- **Alergia e hipersensibilidad a *Anisakis* spp.**

La posibilidad de existencia de sensibilización a *Anisakis* spp. aumenta con la edad, en sujetos con elevada IgE total y en aquellos que consumen frecuentemente pescado fresco. En España, la prevalencia de sensibilización a *Anisakis* spp. en adultos varía entre un 6 y un 56% (AESAN, 2005; Del Rey Moreno et al., 2006; Fernández de Corres et al., 2001; Toro et al., 2004). Algunos pacientes sin sintomatología digestiva pueden presentar reacciones de hipersensibilidad con episodios de anafilaxia, angioedema facial, síntomas respiratorios, urticaria y/o angioedema, hipotensión y choque anafiláctico (Del Pozo et al., 1997; Fernández de Corres et al., 1996; López Sáez et al., 1999).

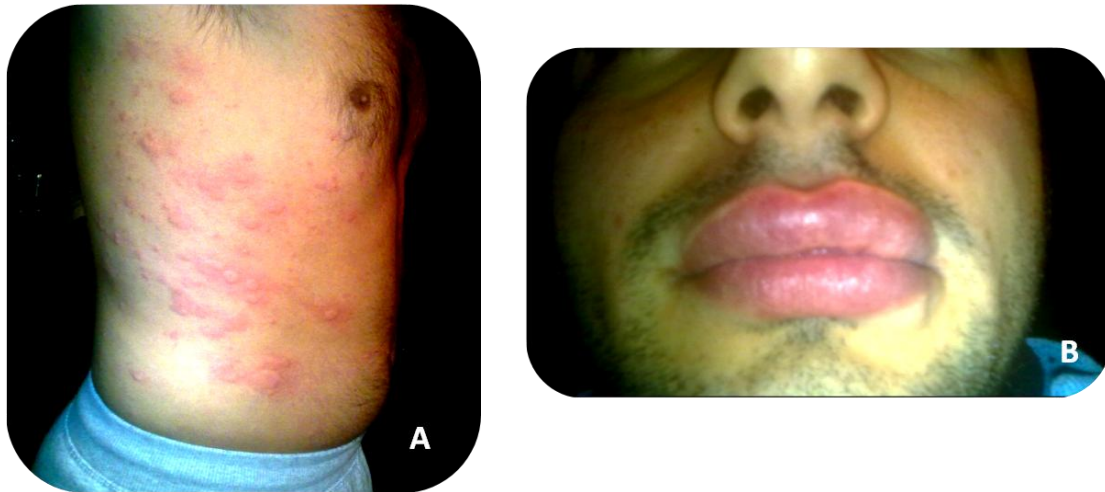


Figura 20. Sarpullido difuso con urticaria (A) y angioedema (B) en paciente tras un primer contacto con *Anisakis* spp. (Pontone et al., 2012).

El grado e intensidad de estas reacciones alérgicas es muy variable y los síntomas pueden comenzar a las 5-8 horas tras la ingestión de pescado congelado y/o cocinado o enlatado (Daschner et al., 1998, 2000). La existencia de alérgenos termo-resistentes de *Anisakis* spp. parece ser la causa de la sensibilidad producida en estos pacientes (Audícana et al., 1997; Caballero y Moneo, 2004).

Es tal la importancia de esta afección, en nuestro país, que figura dentro de las pruebas de atención primaria del Marco Estratégico para la mejora de la Atención Primaria (Melguizo et al., 2007). Otro tipo de alergias son las ocupacionales o profesionales, en personal que por motivos laborales se ven expuestos a alérgenos de *A. simplex* s.l., como profesionales que manipulan productos marinos, tanto en la industria como en la pescadería o restauración.

En este proceso alérgico puede aparecer:

- Dermatitis de contacto tras la exposición al pescado parasitado (Beitia et al., 2002; Carretero Añíbarro et al., 1997).
- Conjuntivitis profesional y asma alérgica en pacientes que trabajan con pescado o con harina del mismo, motivada por alérgenos aéreos (Añíbarro y Seoane, 1998; Armentia et al., 1998).
- Manifestaciones reumáticas en forma de artralgias/artritis, asociadas a manifestaciones alérgicas cutáneas, respiratorias y sintomatología digestiva (Cuende et al., 1998).

- Lesiones ulcerosas descamativas, gingivitis erosiva, afectándose también el labio tras la ingesta de merluza parasitada (Figura 21).

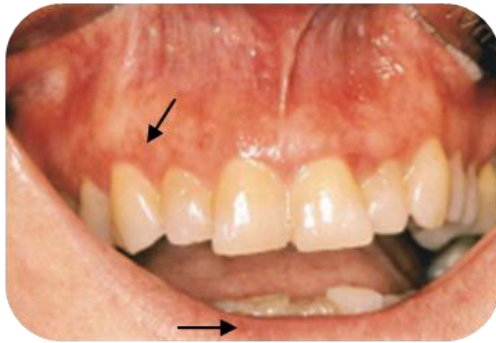


Figura 21. Gingivostomatitis tras la ingesta de pescado infectado por *Anisakis* spp. (Eguia et al., 2003).

Esta hipersensibilidad frente a *Anisakis* tras la ingesta de pescado se debe a la unión de diversos antígenos del parásito a la IgE de los pacientes, provocando los síntomas típicos (López-Serrano et al., 2000 a). Los antígenos de *Anisakis* pueden clasificarse en tres grupos desde un punto de vista estructural y funcional:

I. Antígenos de excreción-secreción (ES).

Son liberados por las larvas vivas cuando invaden la mucosa gastrointestinal del hospedador; estas enzimas se liberan al comienzo de la infección siendo los primeros antígenos reconocidos por el sistema inmunológico (Akao et al., 1990; Iglesias et al., 1993). Además, estos antígenos de ES son capaces de inducir granulación mastocitaria en ratones sensibilizados, confirmando la posibilidad de reacciones anafilácticas (Kobayashi et al., 1972).

II. Antígenos somáticos.

Son los antígenos más abundantes en los nematodos y sólo son funcionales después de la muerte y degradación del parásito. Son útiles para el diagnóstico, pero en este caso su detección con anticuerpos indica que se trata de una infección antigua, al contrario de lo que mostrarían los antígenos de ES. Los antígenos somáticos se obtienen mediante la homogeneización de larvas enteras y extracción de todos los antígenos solubles del parásito (Sugane et al., 1992). Mediante inmunodetección, se han encontrado entre 30 y 40 bandas con pesos moleculares que oscilan entre 13 y 150 kDa (Iglesias et al., 1993). Se ha demostrado que estos antígenos presentan un alto grado de reactividad cruzada con otros ascáridos, por lo que pueden ser responsables de falsos positivos en el diagnóstico (Iglesias et al., 1995; Lozano et al., 2004).

III. Antígenos de superficie.

El tegumento de los nematodos es una mezcla compleja de colágeno, proteínas estructurales e hidrofóbicas cuya capa más externa (epicutícula) está compuesta por polisacáridos (Kennedy, 2000). Cuando las larvas evolucionan de L₃ a L₄ (ecdisis) se liberan los antígenos de superficie, desarrollando patologías crónicas como los granulomas. No obstante, parece que estos antígenos son menos específicos y con menor poder antigénico que los antígenos de ES (Baeza et al., 2001).

Recientemente se han realizado estudios de caracterización de los alérgenos de la L₃ de *A. simplex* s.l. para así poder llegar a un diagnóstico específico de la anisakiosis y alergia provocada por éste parásito. Hasta el momento se han identificado doce alérgenos (tabla 3); de los que siete son antígenos ES.

Nombre	Tipo Alérgeno	Peso molecular	Características	Referencias
Ani s 1	ES	24 kDa	Proteína de la glándula excretora, caracterizada por actividad inhibidora adecuada. Alérgeno mayor. Termoestable	Moneo et al. (2000) Shimakura et al. (2004)
Ani s 2	Somático	97 kDa	Paramiosina, presenta reacciones cruzadas con la paramiosina de otros nematodos, trematodos y artrópodos.	Pérez-Pérez et al. (2000)
Ani s 3	Somático	41 kDa	Tropomiosina, presenta reacciones cruzadas con la tropomiosina de otros invertebrados (crustáceos, insectos y ácaros). Responsable de altos títulos de IgE específica en personas asintomáticas. Termoestable.	Asturias et al. (2000 a, b)
Ani s 4	ES	9 kDa	Cistanina, inhibidor de cisteína proteasa, se localiza en la glándula excretora y cutícula. Termoestable y resistente a la digestión péptica.	Moneo et al. (2005) Rodríguez-Mahillo et al. (2007)
Ani s 5	ES	15 kDa	Se localiza en la glándula excretora, ventrículo y superficie luminal del epitelio intestinal. Homólogo con las proteínas de nematodos SXP/RAL-2. Termoestable.	Caballero et al. (2008) Kobayashi et al. (2007 a)
Ani s 6	ES	Desconocido	Inhibidor de serina proteasas con secuencia similar a los inhibidores serina proteasa de otros animales. Termoestable y resistente a la digestión péptica.	Kobayashi et al. (2007 a)
Ani s 7	ES	139 kDa	Glicoproteína, con secuencias repetidas en tándem. Reconocido por el MAb UA3. Alérgeno principal reconocido por el 100% de los pacientes alérgicos a <i>Anisakis</i> . No da reacciones cruzadas.	Anadón et al. (2009) Rodríguez et al. (2008)

Ani s 8	ES	15 kDa	Miembro de la familia de proteínas SXP-RAL-2 de varias especies de nematodos. Termoestable. Da reacciones cruzadas con Ani s 5.	Kobayashi et al. (2007 b)
Ani s 9	ES	14 kDa	Miembro de la familia de proteínas SXP-RAL-2 de varias especies de nematodos. Comparte secuencias con Ani s 5 y Ani s 8 en un 34% y 35% respectivamente. Termoestable.	Rodríguez-Pérez et al. (2008)
Ani s 10	Somático	21 kDa	Proteína con función desconocida. Presenta 7 repeticiones casi idénticas de 29 aminoácidos. Termoestable.	Caballero et al. (2011)
Ani s 11	ES	27 kDa	Proteína con función desconocida. Estructura única, 5-6 tipos de secuencias repetidas cortas que comprenden de 6-15 aminoácidos.	Kobayashi et al. (2011)
Ani s 12	ES	31 kDa	Proteína con función desconocida. Estructura repetida de 40-52 aminoácidos, con 4 residuos de cisteína.	Kobayashi et al. (2011)

Tabla 3. Principales características de los antígenos de *A. simplex* s.l.

11. DIAGNÓSTICO.

Desde que por primera vez se diagnosticó un caso de anisakiosis humana en Holanda en 1955 (Van Thiel et al., 1960), ha ido incrementándose el número de casos descritos debido a dos factores, mayor conocimiento de la enfermedad por parte de los profesionales sanitarios y a la mejora de técnicas de diagnóstico. Un ejemplo de ello, es el trabajo de Ishikura (1969), quién diagnosticó 153 casos con anisakiosis gástrica, tras operación quirúrgica, los cuales inicialmente se consideraron como: 37 úlceras gástricas, 31 cánceres estomacales, 32 pólipos estomacales, 6 gastritis crónicas, etc.; así mismo los 66 con anisakiosis intestinal fueron previamente 22 casos de apendicitis aguda, 12 ileítis agudas, 6 obstrucciones intestinales, 4 tumores abdominales, etc.

Otro ejemplo de diagnóstico fallido tuvo lugar en Japón entre 1976 y 1990 donde de 71 casos de “tumor de estómago que desaparece” (*vanishing tumor of the stomach*), al menos en 29 se descubrió que el agente causante fue este nematodo, y 15 como probable anisakiosis (Ishikura et al., 1992).

La anisakiosis humana, a diferencia de otras parasitosis producidas por helmintos, no se puede diagnosticar por técnicas coprológicas, ya que, por lo general, durante su evolución no se liberan formas parasitarias en las heces del paciente; por otro lado, las manifestaciones clínicas con las que cursa esta enfermedad no son específicas, sino que más bien son comunes a numerosas dolencias del tracto digestivo. En consecuencia, el diagnóstico sólo se puede establecer cuando la larva, único signo patognomónico de la enfermedad, se visualiza e identifica. El diagnóstico de la anisakiosis puede realizarse por diversos procedimientos:

Diagnóstico clínico.

Se basa en el estudio de los signos y síntomas clínicos, complementados con distintas técnicas de diagnóstico. Por ello es importante conocer si el paciente ha consumido previamente pescado crudo o semicrudo y cuando fue la última vez para así poder descartar otras causas. La eosinofilia es frecuente pero no una característica constante en las infecciones por *Anisakis* por el reclutamiento de eosinófilos hacia los tejidos inflamados. Además, ésta no suele aparecer hasta

después de aproximadamente 10 días, por lo que no es un signo con excesiva importancia en el diagnóstico.

El diagnóstico va a depender así en gran medida de la anamnesis, del grado de sospecha y de un seguimiento de cerca del enfermo (Verhamme y Ramboer, 1988). Es muy orientativo que el afectado informe de la ingestión de cefalópodos y/o pescado crudo o poco cocinado (salazón, ahumado, escabeche, en vinagre o inadecuadamente preparado en microondas) en las horas o días precedentes a los síntomas (Alonso-Gómez et al., 2004; Del Rey Moreno, 2003; Domínguez-Ortega y Martínez-Cócera, 2000 c). En pacientes con dolor abdominal, la ingesta de pescado crudo o poco cocinado tiene elevada sensibilidad y valores predictivos positivos (VPN) de 98'39% y negativos (VPP) de 70'83%, por lo que nos ayuda principalmente a descartar la anisakidosis (Del Rey Moreno et al., 2008).

Pruebas de diagnóstico por imagen.

Estas técnicas se utilizan como complemento en el diagnóstico y aunque no son específicas pueden ser de gran ayuda. Suelen emplearse en los casos intra y extraintestinales.

En la anisakiosis gástrica, la radiología permite visualizar al nematodo como una forma filiforme (Figura 22), aparte del edema mucoso con pliegues engrosados que provoca (Sugimachi et al., 1985). En las formas crónicas se puede observar un efecto de masa que simula un tumor, debido a la formación de un granuloma tras la penetración de la larva (Kim, 1994).

En el caso de cuadros intestinales, se realizará una ecografía en la que se observarán signos inespecíficos como engrosamientos de la pared intestinal, líquido libre, estrechamiento de la luz y disminución del peristaltismo (Domínguez-Ortega y Martínez-Cócera, 2000 b; Navarro-Cantarero et al., 2005). Estos signos pueden confundirse con otras patologías como obstrucción intestinal, apendicitis y linfoma intestinal maligno, entre otros, pero ayudan al diagnóstico (Arenal-Vera et al., 1991).

En la localización intestinal, en las pruebas radiológicas aparece estrechamiento irregular y dilatación de asas, entre otras lesiones. En más del 70% de los casos, el íleon suele ser la zona más afectada (Ikeda et al., 1989).

En las formas cólicas, el enema opaco muestra un marcado edema en la pared del colon, con estrechamiento de la luz y engrosamiento de la pared en la zona más adenomatosa, lo que nos sugiere la presencia de la larva (Louredo Méndez et al., 1997).

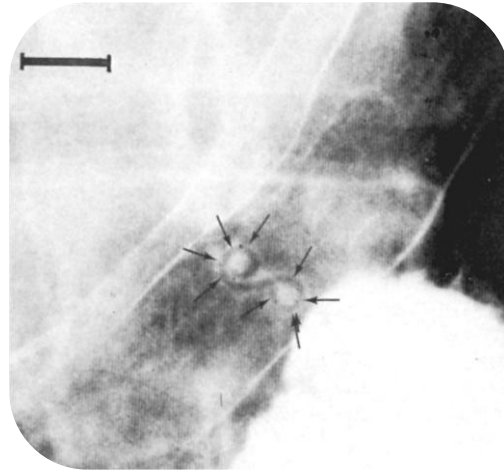


Figura 22. Radiografía de estómago con contraste de bario <http://tmcr.usuhs.mil/tmcr/chapter11/differential.htm>

La endoscopia es fundamental a la hora de diagnosticar la anisakiosis gástrica aguda, incluso se recomienda realizarla en pacientes con dolor gástrico y que han ingerido pescado en las 12 horas anteriores a los síntomas (Bucci et al., 2013). Por tanto, es la técnica de elección en el diagnóstico de la anisakiosis gástrica y cólica aguda. Con ella, además de poder observar la totalidad de la larva o fragmentos mediante gastro-endoscopia o colonoscopia, tenemos la posibilidad de extraerla y determinar sus características morfológicas, evitándose así intervenciones quirúrgicas innecesarias (Akasaka et al., 1979; Suguimachi et al., 1985).

La ultrasonografía endoscópica es una técnica que combina la endoscopia y el ultrasonido con la que se puede detectar larvas de *Anisakis* spp. Esta técnica permite observar de una manera más detallada las lesiones de la pared gástrica, además de poder realizar punciones del tejido afectado. Pocos centros hospitalarios cuentan con estos equipos debido a su elevado coste, por lo que no es una técnica muy utilizada (López-Viedma y Domper-Bardají, 2007).

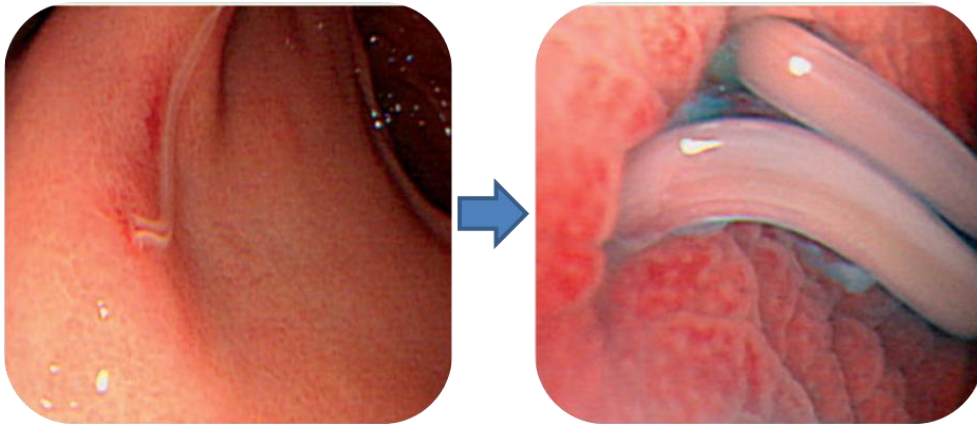


Figura 23. *Anisakis* spp. en estómago (Nakagawa et al., 2009).

Diagnóstico postoperatorio.

Se lleva a cabo cuando se ha practicado una laparotomía exploratoria con resección del tramo intestinal afectado; posteriormente, se establece su diagnóstico bien por observación de la larva o tras el estudio histológico del segmento intestinal resecado.

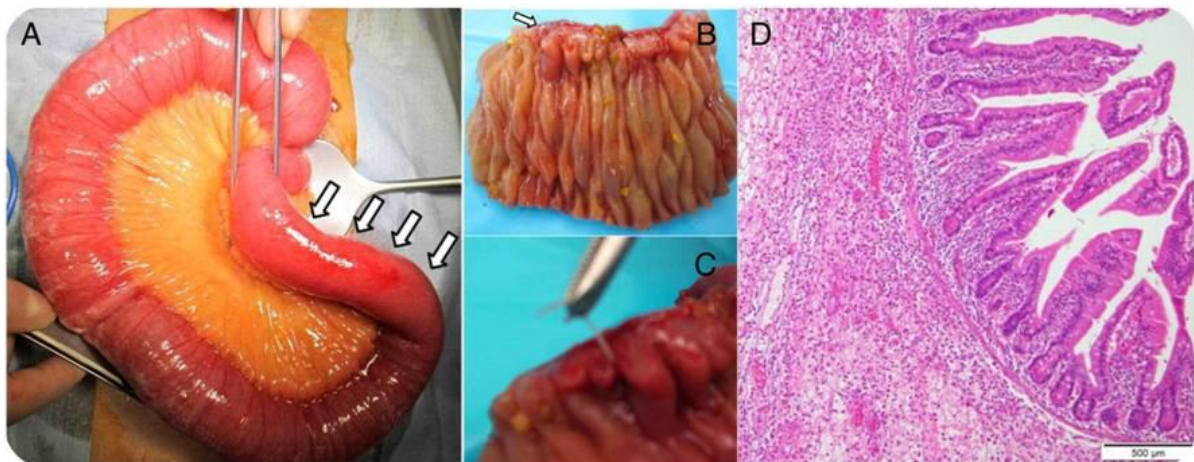


Figura 24. **A.** Zona del intestino eritematosa y edematosa. **B y C.** Larva de *Anisakis* spp. penetrando en el intestino. **D.** Corte histológico del intestino delgado con infiltración eosinofílica (Kojima et al., 2013).

Diagnóstico inmunológico.

Se utiliza cuando la larva no se ha podido observar mediante endoscopia y/o radiología, su identificación ha sido difícil en el material de biopsia o se sospecha de la existencia de localizaciones ectópicas (Akao et al., 1990); también cuando la infección se encuentra en estado avanzado y la ha destruido el sistema

inmune del hospedador (Ito et al., 2007). Aunque el sistema inmunológico tiene un papel esencial en la patogénesis de la enfermedad (Asaishi et al., 1980), son varias las dificultades que impiden que el diagnóstico inmunológico sea totalmente eficaz, así:

- Solo es válido en individuos inmunocompetentes.
- En una infección primaria, los anticuerpos se detectan entre la segunda y tercera semana.
- Los antígenos de *Anisakis* spp. presentan una marcada reactividad cruzada con los anticuerpos desarrollados por el organismo frente a otros nematodos parásitos (Iglesias et al., 1996; Lozano et al., 2004).
- En los casos de anisakiosis aguda, no transcurre el tiempo necesario para que aparezca seropositividad por lo que el diagnóstico serológico no tiene valor.

Las infecciones por ascáridos suelen originar en el hospedador una buena respuesta en todos los tipos de inmunoglobulinas, siendo de gran importancia conocer el título y tipo de las mismas para poder confirmar el estado en el que se encuentra la infección. Las inmunoglobulinas que se encuentra en mayor proporción son la IgM y la IgG1, seguida de la IgG4, tanto en humanos como en animales de experimentación (Daschner et al., 2012; Sakanari et al., 1988).

La detección de anticuerpos IgM es útil solamente para el diagnóstico precoz, en los casos de infección primaria, pero se requiere confirmación mediante la determinación de otros isotipos de inmunoglobulinas (Daschner et al., 2002; Ubeira e Iglesias, 2000). Cuando penetra la larva en los tejidos del hombre, se produce la liberación de antígenos ES respondiendo el organismo con la producción de anticuerpos IgE específicos que puede mantenerse elevada durante más de 5 años, posiblemente por un continuo contacto del hospedador con el parásito sin la aparición de manifestaciones clínicas (Akao et al., 1990; Gómez et al., 1998).

El diagnóstico inmunológico se puede realizar con diversas técnicas o procedimientos:

Prueba cutánea (Prick-Test).

Se trata de una prueba inmunológica cutánea frente a antígenos de *A. simplex* s.l. Presenta, en general, elevada sensibilidad y baja especificidad, pues no distingue entre los verdaderos positivos y las reacciones cruzadas con otros parásitos como *Ascaris* o *Toxocara*. Se realiza un control positivo con histamina (10 mg/ml) y otro negativo con solución salina al 0'9%. Finalmente se pone al paciente en contacto con extracto de *Anisakis* a una concentración de 1 mg/ml, practicándose una lectura a los 15 minutos. Si pasado ese tiempo, aparece una pápula mayor de 3 mm en comparación con el control negativo, la prueba se considera positiva.

En pacientes con anafilaxia tras la ingesta de pescado parasitado, el test cutáneo es positivo en el 87-100 % de los mismos (Lorenzo et al., 2000). Cuando esta técnica se realiza en pacientes con anisakiosis gástrica o intestinal, da positivo en el 90-100% de los casos (Domínguez-Ortega et al., 2000; López-Serrano et al., 2000 b; Obispo et al., 2000).

Del Rey Moreno et al. (2008) determinaron la utilidad de la técnica del *prick test* en pacientes en los que se confirmó anisakidosis y en los que la enfermedad fue excluida como diagnóstico, encontrándose diferencias significativas ($p < 0'001$) en ambos grupos. Estos autores obtuvieron en esta prueba cutánea un VPN de 95'56% y un VPP de 87'5%. La ausencia de sensibilización cutánea al extracto crudo de *Anisakis* apoya la ausencia de anisakiosis con una probabilidad del 95'6%.

A pesar de que existe correlación entre la prueba cutánea y el valor de la IgE específica (Gómez et al., 1998), no se relaciona ni con la IgE total ni con la intensidad de los síntomas (Lorenzo et al., 2000).

Otro tipo de prueba es la de provocación conjuntival en individuos con una historia clínica muy sugestiva de anisakiosis gastroalérgica e individuos sin tal historia (Llunch-Bernal et al., 2002). La prueba se realizó con un extracto de *A. simplex* s.l. a una concentración de 1 mg de material liofilizado por ml. El ensayo tuvo un valor predictivo positivo del 67'7% y negativo del 75'9% .

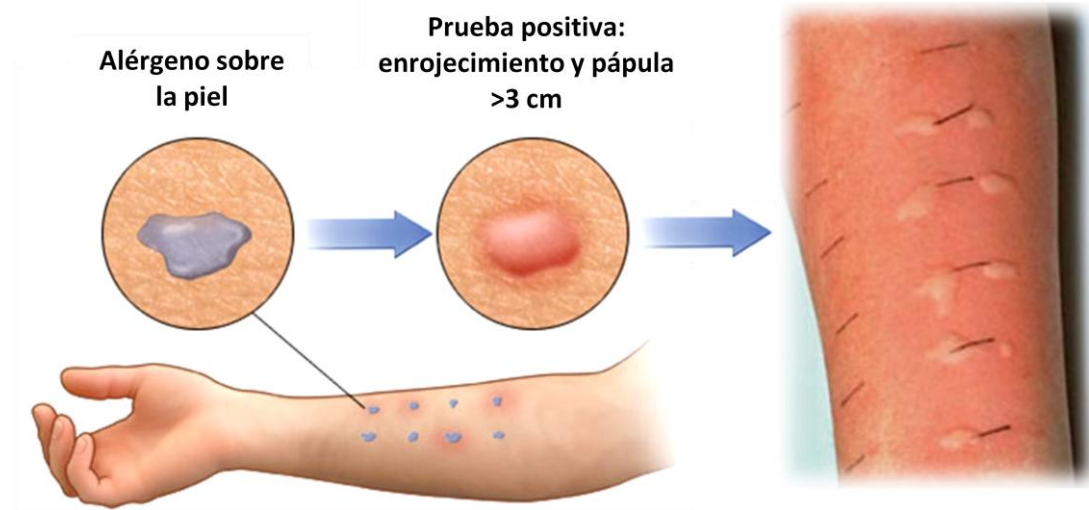


Figura 25. Prueba cutánea.

Otras técnicas de determinación de IgE específica.

La determinación de la IgE específica se puede hacer con diferentes técnicas tales como CAP-radioinmunoensayo, Enzimo-inmuno-análisis (ELISA), Fluoroenzimo-inmuno-análisis (FEIA) e Inmunoblott, que muestran distintas sensibilidades y especificidades (Del Rey Moreno et al., 2008; Kim et al., 2011).

La técnica de ELISA presenta una alta especificidad y sensibilidad aunque depende del antígeno usado (Lorenzo et al., 2000; Rodríguez et al., 2006; Valiñas et al., 2001). Permite detectar IgE y diversos isotipos de IgG específicos para *Anisakis simplex* s.l., utilizando antígenos de excreción secreción o antígenos somáticos del parásito. Anadón et al. (2010), determinaron que la mejor opción para el serodiagnóstico de la anisakiosis es la detección de IgE específica mediante ELISA, utilizando los alérgenos recombinantes Ani s 1 y Ani s 7 (alérgenos mayores). Además consideran que los sueros clasificados como positivos para Ani s 1 y negativos para Ani s 7, se corresponden frecuentemente con infecciones antiguas, esto puede ayudar al clínico para distinguir entre infección reciente y pasada.

Prueba (IC95%)	Sensibilidad	Especificidad	VPP/VPN	Seguridad Diagnóstica	Autor
Anamnesis	Alta (98'08%)	Alta (74'39%)	70'83%/98'39%	83'58%	Del Rey Moreno et al. (2008)
Prueba cutánea (Prick test)	Alta (87'50%)	Alta (95'56%)	87'50%/95'56%	93'44%	
Inmunoblot	Alta (86'21%)	Alta (80'77%)	62'5% / 94'03%	82'24%	
CAP- Radioinmunoensayo	Alta (100%)	Baja (50%)	-	-	
Provocación conjuntival	Baja (75%)	Baja (68%)	67'7% / 75'9%	Alta	Lluch-Bernal et al. (2002)

Tabla 4. Sensibilidad, especificidad, seguridad diagnóstica y valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) de las diferentes técnicas inmunológicas para la detección de *Anisakis* spp.

12. TRATAMIENTO.

En la anisakiosis aguda, cuando la larva se localiza en estómago, duodeno o colon, la técnica de endoscopia puede resultar útil: la acción simultánea de un fórceps de biopsia junto con el fibroscopio, permite la extracción del parásito de la zona lesionada y posibilita la curación del individuo (Castán et al., 2002; Deardorff et al., 1986; Ikeda et al., 1989; Kasuya et al., 1989). En la anisakiosis gástrica crónica, el área afectada se puede resear y establecer posteriormente el diagnóstico.

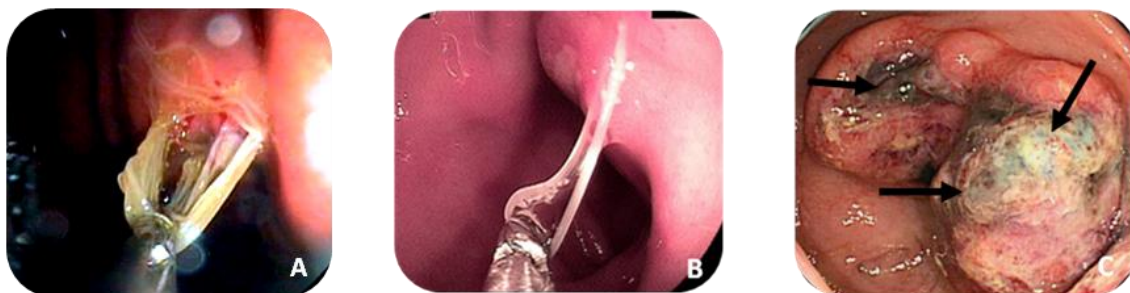


Figura 26. A y B. Extracción de la larva mediante endoscopia (Hwang et al., 2012; Imanishi et al., 2012). C. Colonoscopia donde se muestra una lesión en el ciego provocada por *Anisakis* spp. (Ishii et al., 2009).

Cuando la larva se asienta en localizaciones inaccesibles para el fibroscopio y se establece un diagnóstico de presunción, hay autores que recomiendan un tratamiento conservador si los síntomas abdominales no son graves (Del Rey Moreno, 2003; Obispo et al., 2000); ahora bien, si los síntomas no ceden o se agravan (perforación, peritonitis, determinadas formas oclusivas) se recurre al tratamiento quirúrgico mediante laparotomía y resección de la zona afectada (Del Rey Moreno, 2003).

En las formas extradigestivas, se interviene cuando hay algún tipo de complicación, generalmente obstrucción intestinal por adherencias al tumor inflamatorio (Takabe et al., 1998).

Las formas de hipersensibilidad inmediata a *Anisakis* (alrededor del 50-65 % de los pacientes) deben de tratarse en el servicio de Urgencias (Audicana et al., 2000); en estos casos, el tratamiento se basará en la actuación médica mediante el uso de antihistamínicos y/o corticoides parenterales e incluso de adrenalina (Domínguez-Ortega et al., 2000).

A pesar de que son muchos los fármacos probados frente *Anisakis* spp., hasta ahora ninguno de ellos ha mostrado una eficacia contrastada. De hecho, muchos han sido los autores que han propuesto diferentes tratamientos antihelmínticos para evitar la cirugía, sin embargo, los resultados son muy similares a los obtenidos con un tratamiento conservador (Lorenzo et al., 2000).

Aunque no se dispone de evidencias suficientes, para el caso de la epigastralgia producida por la acción local del parásito (inflamación), ayuda la toma de inhibidores de la bomba de protones. Se conoce que el desarrollo de la larva se ve favorecido por la secreción gástrica y rara vez se ha descrito en pacientes mayores de 60 años o gastrectomizados, en ambos casos con un pH gástrico superior a los valores normales (Henríquez-Santana y Villafruela Cives, 2009; Muraoka et al., 1996).

En aquellos casos en los que el diagnóstico esté claro, se puede prescribir un tratamiento conservador, con antibióticos (estreptomicina combinada con eritromicina), antipiréticos y solución de glucosa isotónica (Oshima, 1972). La administración de tiabendazol (25 mg/kg, 2 veces al día, durante 3 días), se aconseja como alternativa (Kwee y Sautter, 1987), si no requiere intervención porque la obstrucción intestinal no sea muy grande.

Manley y Embil (1989) observaron que la ivermectina era eficaz frente *A. simplex* s.l. a la concentración de 500 µg/ml a las 48 horas. Son varios los casos clínicos de anisakosis recogidos en la literatura científica en los que se administra una dosis única de albendazol de 400 mg por vía oral a los pacientes diagnosticados por esta enfermedad. En 1998 Ioli et al., obtuvieron una evolución favorable en un paciente posiblemente infectado con *Anisakis* al ser tratada con albendazol. Más tarde, Moore et al. (2002) administraron 400 mg de albendazol durante 21 días a una paciente en la que sospechaban infección por *Anisakis*. A partir de estos trabajos, el uso de albendazol para el tratamiento de esta enfermedad ha sido frecuente. Un paciente de León con dolor abdominal, positivo en la prueba cutánea frente a *Anisakis* y que había ingerido boquerones en vinagre, fue tratado con 400 mg de albendazol durante 4 semanas (Simón et al., 2002). De vera et al. (2002) trataron con 400 mg de albendazol durante 4 semanas, a un

paciente consumidor habitual de pescado en vinagre que presentó durante meses fuertes dolores abdominales pese a estar tratado con esteroides.

Dziekońska-Rynko et al. (2002) estudiaron *in vitro* los efectos de albendazol frente *Anisakis* a diferentes valores de pH. Finalmente se observó que la eficacia de albendazol dependía del pH, siendo más efectivo en medio básico a la concentración de 400 µg/ml. Posteriormente, Arias-Díaz et al. (2006) obtuvieron resultados similares *in vitro*, a una concentración de 500 µg/ml con este mismo fármaco.

En un trabajo de Kim et al. (2006) tres de cuatro pacientes sospechosos de anisakiosis gástrica, se les prescribe albendazol (400 mg) dos veces al día durante 14 días, mejorando los síntomas y daños gástricos entre los 13 y 135 días. Filauro et al. (2011) también utilizó albendazol como tratamiento frente *Anisakis* en un paciente que presentaba desde hacía al menos 3 semanas, entre otros síntomas, ulceración de la mucosa gástrica y sangrado.

El uso de albendazol se recoge como tratamiento en el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de E.E.U.U. [Center for Disease Control and Prevention, (CDC)], aunque se indica que no es un tratamiento aceptado por la FDA para esta enfermedad (CDC, 2013).

Teniendo en cuenta que no se conoce ningún fármaco de eficacia totalmente contrastada en el mercado, algunos investigadores, han ensayado la acción de distintos compuestos naturales frente a las larvas de anisákidos, tanto *in vitro* como *in vivo*.

En experimentos *in vitro* se ha observado que las larvas L₃ de *Anisakis* pierden la movilidad a las 24 horas en contacto con extractos salinos de las plantas *Perilla frutescens* (5%), *Zingiber officinale* (5% y 2'5%), *Wasabia japonica* (5% y 2'5%), *Allium sativum* (5%), y etanol (8% v/v), además de conseguir una letalidad máxima con algunos de sus componentes tales como: [6]-shogaol (62'5 µg/ml), [6]-gingerol (250 µg/ml), perillaldehído (125 µg/ml) y perillil alcohol (250 µg/ml) (Goto e al., 1990; Kasuya et al., 1988).

AUTORES	TRATAMIENTOS
Matsui et al. (1985)	Conservador con anticolinérgicos.
Verhamme y Ramboer (1988)	Prednisolona intravenosa (50 mg al día) en cuadros intestinales.
Petithory y Marty (1988)	Antihelmínticos (tiabendazol o flubendazol) en anisakiosis intestinal subaguda y crónica. Corticoides para los fenómenos alérgicos.
Cocheton et al. (1991)	Antiácidos en formas gástricas poco dolorosas. En casos de granulomas eosinofílicos: corticoides, ACTH o ACTH+antihelmínticos. Antihistamínicos en formas intestinales sin cirugía. Antihelmínticos: piperazina, mebendazol y derivados de imidazol.
Shirama et al. (1992)	Sintomático sin cirugía en anisakiosis intestinal.
Ioli et al. (1998)	Albendazol.
Moore et al. (2002)	Albendazol 400 mg 2 veces al día durante 21 días.
Dziekońska-Rynko et al. (2002)	Albendazol 400 µg/ml.
De Vera et al. (2002)	Albendazol 400 mg 4 semanas.
Magnaval et al. (2002)	Albendazol 10 mg/kg/día por 7 días
Simón et al. (2002)	Albendazol 400 mg 4 semanas
Pacios et al. (2005)	Albendazol 400 mg 2 veces al día.
Nawa et al. (2005)	Albendazol 400-800 mg por 6-21 días.
Arias-Díaz et al. (2006)	Albendazol, 500 µg/ml.
Kim et al. (2006)	Albendazol 400 mg 2 veces al día.
Filauro et al. (2011)	Albendazol.
Pontone et al. (2012)	Albendazol 100 mg al día durante 7 días.

Tabla 5. Resumen de algunos tratamientos probados o citados por diferentes autores.
ACTH = hormona adrenocorticotrópica

Más adelante, Kasuya et al. (1990) profundizaron en el estudio *in vitro* de los componentes del extracto de la hoja de *Perilla frutescens*, usada en la medicina tradicional China y también como condimento del pescado crudo. El perillaldehído resultó el más eficaz, alcanzando a las 24 horas el 100% de letalidad a la concentración de 125 µg/ml (Hierro et al., 2004 a, c). Esto hablaría a favor de que en las zonas de China donde se utiliza *Perilla frutescens* como condimento del pescado crudo, la prevalencia de la anisakiosis sea menor.

Hierro et al. (2004 c) pusieron de manifiesto en estudios *in vitro* e *in vivo* la alta eficacia de distintos aceites esenciales como lemongrass (*Cymbopogon citratus*), geranio (*Pelargonium graveolens*) y orégano (*Coridothymus capitatus*) frente a *Anisakis*. También se han ensayado determinados componentes de aceites esenciales como carvacrol, citral, citranelol, α -pineno y ocimeno con muy buenos resultados en la mayoría de los casos, tanto *in vitro* como en animales de experimentación (Hierro et al., 2004 b, 2006; Navarro et al., 2008, 2011; Noguera, 2006).

Hay que tener en cuenta que los datos sobre la mortalidad de las larvas en los estudios *in vitro* son solo orientativos ya que los resultados más prometedores frente a este parásito son los obtenidos en los estudios *in vivo*. En los trabajos donde se utilizan animales de experimentación se muestra no solo la efectividad del fármaco frente al parásito, sino también su capacidad para evitar que las larvas produzcan lesiones a lo largo del tránsito gastro-intestinal. También es importante verificar que aquellos productos que han sido eficaces frente *Anisakis* no alteren los tejidos del sistema digestivo. Así, con el terpeno perillaldehído no hubo animales que sufrieran lesiones en el tracto digestivo mostrando una alta mortalidad de las larvas (Hierro et al., 2004 c).

13. ACEITES ESENCIALES.

13.1. Concepto de Aceite Esencial.

Los aceites esenciales (A.E.) son sustancias volátiles de naturaleza compleja obtenidas por procesos físicos a partir de especies vegetales aromáticas, en cuya composición entran a formar parte, de manera mayoritaria, derivados terpénicos (mono y sesquiterpénicos), y en menor proporción, derivados fenilpropánicos y, en ocasiones, otros componentes correspondientes a distintas categorías químicas (Navarro et al., 1999).

Los aceites esenciales se encuentran de forma casi exclusiva en vegetales superiores (Croteau, 1977) de más de 50 familias pertenecientes a las Angiospermas (Labiadas o Lamiáceas, Compuestas o Asteráceas, Lauráceas, Mirtáceas, Rutáceas, Coníferas, Magnoliáceas, etc.), pudiendo almacenarse en todos los órganos vegetales: flores, hojas y de forma menos habitual en cortezas, leños, raíces, rizomas, frutos y semillas. Aunque todos los órganos de una misma especie pueden contener aceite esencial, su composición puede variar según su localización. Generalmente, la síntesis y acumulación de los aceites esenciales se da en estructuras histológicas especializadas.

Los aceites esenciales tienen un papel ecológico en las plantas que las sintetizan ya que pueden ser inhibidores de la germinación, actuar como atrayentes de los agentes polinizantes y como defensa frente agente nocivos como insectos y hongos (Dodson et al., 1969; Halligan, 1975; Oh et al., 1967; Rao y Nigam, 1970).

13.2. Propiedades generales.

Los aceites esenciales se caracterizan por una serie de propiedades fisicoquímicas y composición química (Bruneton, 2001).

Propiedades fisicoquímicas:

- Son líquidos a temperatura ambiente excepto el alcanfor.
- Son volátiles.
- Arrastrables por corriente de vapor de agua.
- Prácticamente inmiscibles con agua.

- Solubles en alcohol, éter y la mayoría de los disolventes orgánicos.
- Tienen un alto índice de refracción.
- Su densidad es inferior a la del agua, excepto los de la canela, clavo y sazafrán.
- Tienen un olor característico.
- No tienen color, salvo el A.E. manzanilla que es azul por el camazuleno.

Composición química:

La composición de los aceites esenciales es compleja. Están compuestos principalmente por:

- Derivados monoterpénicos como hidrocarburos monoterpénicos (acíclicos, monocíclicos y bicíclicos) y derivados oxigenados de los mismos (alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, peróxidos y fenoles).
- Hidrocarburos sesquiterpénicos (acíclicos, monocíclicos y bicíclicos) y sus derivados oxidados.
- Derivados fenilpropánicos, como propenilfenoles.
- Dentro de los A.E. hay compuestos de bajo peso molecular extraíbles por hidrodestilación (carburos, ácidos entre C₃ y C₁₀, alcoholes, aldehídos, ésteres y en algunos casos, cumarinas como la herniarina).

La composición de estos A.E. dentro de la misma especie, puede variar de forma cualitativa y cuantitativa por diversas razones, tales como el momento del ciclo vegetativo, características edáficas y climáticas de la zona de crecimiento. También cuando encontramos un A.E. en diferentes órganos de un mismo pie de planta suele presentarse diferente composición química (Navarro et al., 1999).

13.3. Extracción.

En términos generales, todas las plantas aromáticas se deben recolectar en la época de floración, para proceder a la obtención de los aceites esenciales. Existen varios métodos (hidrodestilación, expresión, extracción con disolventes, destilación-extracción simultánea, extracción por fluidos supercríticos); de entre

ellos, el de hidrodestilación es con el que se obtienen los productos extractivos que en mayor medida responden al concepto de aceite esencial (Navarro et al., 1999).

13.3.1. Hidrodestilación.

El proceso se basa en las propiedades de volatilidad y de ser arrastrables en corriente de vapor de agua. Los componentes son arrastrados a una trampa fría donde se condensan y, por diferencia de densidad e insolubilidad con el agua, se forman dos fases de fácil separación por decantación. El agua residual que pueda quedar en el aceite extraído puede eliminarse con Na_2SO_4 anhidro.

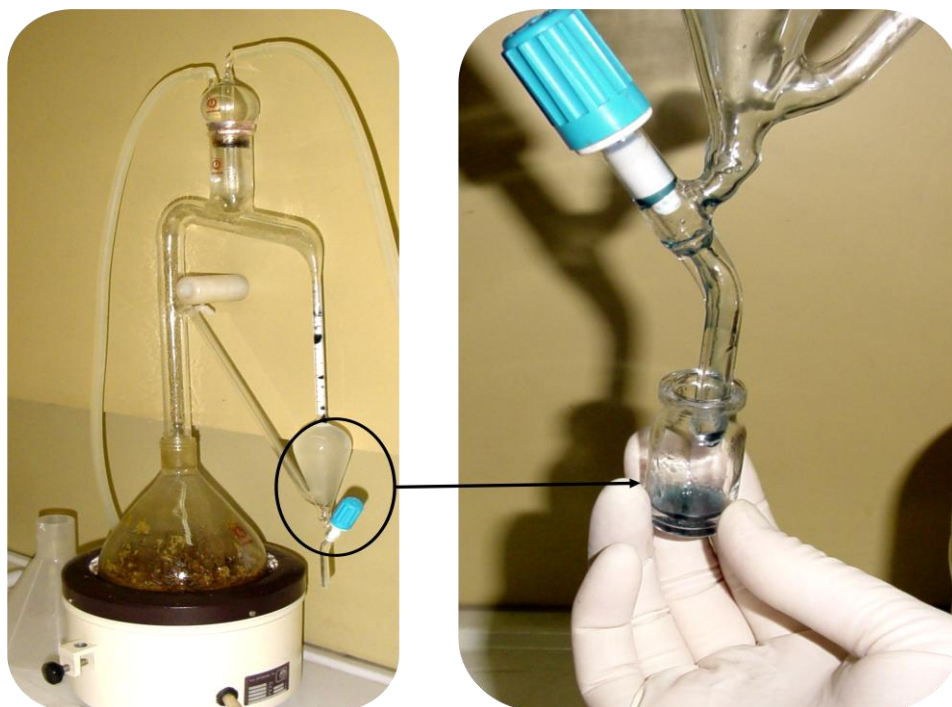


Figura 27. Extracción de aceite esencial de manzanilla por hidrodestilación.

13.4. Normalización.

En la normalización de los A.E., las farmacopeas recomiendan la determinación de ciertos índices físicos (poder rotatorio, índice de refracción, solubilidad en alcohol) y químicos (saponificación, aceto, método de la mezcla bisulfítica, solubilidad en soluciones alcalinas), así como de reacciones colorimétricas y técnicas cromatográficas y espectroscópicas para ayudar al

establecimiento de la composición de los A.E. (Hierro, 2004 c; Pérez Galindo, 2005).

Para el establecimiento de la composición cuali y cuantitativa de los aceites esenciales es habitual la aplicación de técnicas cromatográficas (cromatografía en capa fina, técnicas de espacio de cabeza, cromatografía líquido-líquido de alta resolución). La manera más rápida, sensible y con mayor poder resolutivo para separar las mezclas volátiles complejas como son los aceites esenciales, es la cromatografía gaseosa (Cabo et al., 1980; Mateo et al., 1978). Los sistemas de detección acoplados que más se utilizan son el detector de ionización de llama y el detector de espectrometría de masas (Bruins, 1979; Papageorgiou y Argyriadov, 1981). En el caso de la cromatografía de gases con detector de ionización de llama, la identificación se realiza habitualmente por comparación de los tiempos de retención de los componentes con los de los patrones puros correspondientes. La aplicación de la cromatografía de gases acoplada a un detector de espectroscopía de masas es imprescindible para poder confirmar la identidad de los distintos componentes de los aceites esenciales, por comparación de los espectros de masas de cada uno de los constituyentes con los de productos puros o con los de otras fuentes (bibliografía especializada, base de datos del espectrómetro de masas). La cuantificación se puede realizar mediante el método de normalización interna de áreas, así como por aplicación del método del patrón interno (Kanas y Loukis, 1987).

13.5. Toxicidad.

Los aceites esenciales tienen un amplio margen terapéutico, siendo la dosis letal 50 (DL₅₀) mayor de 1 g/kg de peso corporal en los empleados con más frecuencia. Determinados componentes, como los derivados fenilpropánicos asarona, safrol y estragol, están provistos de toxicidad crónica y, si se administran de manera continua, sus metabolitos pueden inducir la formación de tumores hepáticos e intestinales. Algunos derivados oxidados de los monoterpenos, como la pinocanfona y la tuyona, y aceites esenciales de eucalipto, nuez moscada y clavo, a altas dosis, pueden dar lugar a crisis de tipo epiléptico, convulsiones tetánicas y alteraciones psíquicas por depresión del sistema nervioso central. Además los A.E.

de alto contenido en apiol y acetato de sabinilo están considerados como abortivos (Navarro et al., 1999; Tisserand y Balacs 1995).

13.6. Interés Farmacológico.

La importancia farmacológica de los aceites esenciales se basa principalmente en tres acciones: antimicrobiana, espasmolítica e irritante. Por otra parte, también se ha visto que los aceites esenciales (tomillo, melisa, romero y mentas) se comportan como espasmolíticos frente a distintos agentes espasmógenos (Boettge, 1954; Rochat, 1970; Van den Broucke y Lemli, 1980), tales como acetilcolina, noradrenalina e histamina, debido a que inhiben la disponibilidad del calcio. Se usan en dolores cólicos intestinales y en mala digestión, ya que, en mayor o menor grado, estimulan las secreciones gástricas. Por último, el carácter irritante de los aceites esenciales hace que se usen en forma de linimentos con efecto rubefaciente (dolores musculares y articulares), descongestivo (procesos catarrales) y analgésico (Navarro et al., 1999). También se toman vía oral como expectorantes (eucalipto, tomillo y niauli), y como carminativos ante hinchazones epigástricas, flatulencias y digestiones lentas (anís verde, anís estrellado e hinojo), ya que incrementan la motilidad intestinal e inhiben las fermentaciones.

Determinados aceites esenciales son capaces de dar lugar a otras acciones distintas a las ya relacionadas. Así, la administración continuada del aceite esencial de melisa reduce el colesterol plasmático. Los de clavo y nuez moscada son inhibidores de la agregación plaquetaria (por su contenido en eugenol e isoeugenol).

Acción antimicrobiana.

La mayoría de aceites esenciales presentan en mayor o menor grado actividad antimicrobiana (Burt, 2004). Son activos frente a un gran número de bacterias, hongos inductores de micosis y levaduras (Agarwall y Mathela, 1979; Azaz et al., 2002; Bendimerad et al., 2005; Bullerman et al., 1977; Inoue et al., 2004; Inouye et al., 2001; Navarro et al., 1999; Pellecuer et al., 1977). Los aceites de

mayor actividad antimicrobiana pertenecen a los géneros *Thymus* y *Bupleurum*, además de los aceites esenciales de clavo, hinojo, lavanda y ajedrea.

Se ha demostrado que los derivados oxidados de los monoterpenos son los más activos, entre ellos: timol, carvacrol, linalol, geraniol, alcanfor y citral (Kurita et al., 1981; Megalla et al., 1980; Yousef y Tawil, 1979). Debido a esta acción, se usan de manera tópica (llagas, ulceraciones, forúnculos), o como antisépticos de las vías renales (en nefritis benigna y uretritis benigna) y respiratorias.

Acción antiparasitaria.

El aceite esencial de árbol de té (*Melaleuca alternifolia*) y su principal componente, terpinen-4-ol, además de ser activos frente a un amplio rango de especies de bacterias patógenas y hongos como *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Candida*, presentan una importante actividad frente a *Sarcoptes scabiei* (Carson et al., 2002; Farag et al., 2004; Hammer et al., 1997, 2008; Sudjana et al., 2012; Walton et al., 2004). También se ha mostrado eficaz frente a piojos y liendres (Priestley et al., 2006). Componentes de A.E. como geraniol, citronellol, citral y carvacrol resultaron ser activos frente a *Anisakis* a la concentración de 12'5 µg/ml (Hierro et al., 2004 a, c) al igual que en el caso de ocimeno, α-pineno y acetato de geranilo (Navarro et al., 2008). Tanto el eugenol como el α-bisabolol, han resultado ser eficaces frente a promastigotes de *Leishmania infantum* (Morales-Yuste, 2006).

En este sentido, cabe citar entre otros, el efecto inhibitorio que ejercen algunos derivados monoterpénicos como carvacrol, linalol y α-terpineol frente a promastigotes de *Leishmania infantum* (Morillas Márquez et al., 2004), así como la actividad antihelmíntica *in vivo* mostrada por una mezcla de *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis* y *Echinacea purpurea*, frente a *Ascaris suum* (Gaasenbeek et al., 2004).

Otros aceites esenciales se han mostrado igualmente activos como biocidas frente a un amplio rango de agentes patógenos, entre los que se encuentran incluso larvas de mosquito (*Aedes aegypti*) (Chao et al. 2000; Dorman y Deans, 2000; Megalla et al., 1980).

En relación con la posible actividad de aceites esenciales y/o de sus principales componentes frente a larvas L₃ de *Anisakis simplex* s.l., destacan los

trabajos realizados por Kasuya et al. (1988, 1990), quienes ponen de manifiesto la actividad larvica *in vitro* del aceite esencial de *Perilla frutescens* y de su principal componente, el aldehído perilla. En nuestro grupo de investigación, se ha podido estudiar la actividad *in vitro* e *in vivo* de varios componentes de aceites esenciales frente *Anisakis* spp. Así Hierro et al. (2004 c) obtuvieron una mortalidad del 100% de las larvas a las 4 horas del inicio de la experiencia con carvacrol, timol, citronelol y citral.

A su vez, las dosis administradas en los animales de experimentación de geraniol, perillaldehído, citral y citronelol impidieron la fijación y/o penetración de las larvas de *A. simplex* s.l. en las paredes gastro-intestinales de las ratas, sin que ninguno de los productos administrados produjeran lesiones. Resultados similares se han obtenido con cimeno, α -pineno, acetato de geraniol, cineol, β -pineno y mirceno, siendo los dos primeros, los componentes que dieron mejores resultados tanto *in vivo* como *in vitro* (Navarro et al., 2008).

14. MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*).

La manzanilla es una planta medicinal ampliamente utilizada por sus propiedades carminativas y espasmolíticas, además de ser muy popular en productos de belleza por sus efectos calmantes y antiinflamatorios en la piel.

Según la Farmacopea Europea 2001 y Real Farmacopea Española 2010 (4^a Edición), la flor de manzanilla común consiste en los capítulos florales desecados de *Matricaria chamomilla* L. de la familia de las Compuestas o Asteráceas y contiene al menos 4 ml/kg de aceite esencial de color azul (Figura 27).



Figura 28. Detalle de la inflorescencia de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). Imagen cedida por gentileza del Dr. Bernat Vanaclocha.

14.1. Componentes activos.

La composición del aceite esencial puede variar por diversos factores como la época de recolección, secado e incluso país de procedencia, entre otros, lo que podría dar lugar a variaciones en sus efectos farmacológicos, fundamentalmente antiinflamatorios. Los dos componentes principales del aceite esencial son (-)- α -bisabolol y camazuleno que junto con otros tales como óxidos de bisabolol, óxido de bisabolona, espatulenol y matricina son los principales compuestos biológicamente activos del A.E. (Anónimo, 2008; Bruneton, 2001; Soković et al., 2010).

14.2. Acción terapéutica.

La infusión de manzanilla se ha utilizado para el tratamiento de diversos tipos de inflamación, irritación y dolores como: enfermedades de la piel, eczemas, úlceras, flebitis, neuralgias y dolores reumáticos (Dos Reis et al., 2011; McKay y Blumberg, 2006 a; Srivastava et al., 2007). Además, la manzanilla ha mostrado poseer ciertos beneficios en personas con insomnio crónico, frente a la ansiedad y estrés, sin efectos adversos incluso a altas dosis. Los compuestos más eficaces frente a estos trastornos son el α -bisabolol y apigenina, aunque los mecanismos de acción no están del todo dilucidados (Amsterdam et al., 2009; Avallone et al., 2000; Award et al., 2007; Salgueiro et al., 1997; Sarris et al., 2011; Viola et al., 1995; Zick et al., 2011).

Se ha observado que es capaz de reducir la actividad de la enzima aldosa reductasa además de la acumulación del sorbitol en eritrocitos humanos, contribuyendo así a la prevención de la hiperglucemia y complicaciones en diabetes (Kato et al., 2008). La manzanilla se ha mostrado también eficaz frente a alteraciones gastrointestinales como diarreas y cólico del lactante (Anónimo, 2008; Weizman et al., 1993). Además puede prevenir daños gástricos producidos por fármacos como la indometacina en el que el papel del α -bisabolol es crucial (Moura Rocha et al., 2010). Por otro lado, el camazuleno tiene un importante papel como antiinflamatorio gástrico junto con el α -bisabolol ya que pueden inhibir la síntesis de leucotrienos, óxido nítrico y prostaglandina E2 en macrófagos previamente estimulados con lipopolisacáridos (Bezerra et al., 2009; Kim et al., 2011; Safayhi et al., 1994).

El α -bisabolol es un alcohol sesquiterpénico monocíclico usado ampliamente en fragancias y cosméticos. Junto con el camazuleno, el α -bisabolol tiene propiedades antiinflamatorias sin efecto ulcerogénico y protectoras de la piel (Russell y Jacob, 2010). Recientemente se ha estudiado su capacidad para bloquear los nervios periféricos, pudiendo atenuar la nocicepción (percepción del dolor) de forma similar a la lidocaína (Alves et al., 2010). Se ha evaluado también como agente anticanceroso y ha demostrado ser eficaz induciendo la apoptosis en células de glioma humano y de rata (Cavaliere et al., 2004), así como de células de carcinoma pancreático humano (Darra et al., 2008) y células de carcinoma

hepático (Chen et al., 2010) mediante la inducción de la vía apoptótica en células cancerosas.

El A.E. de manzanilla posee además actividad antimicrobiana. Es capaz de disminuir el tamaño de las colonias de *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*, por lo que sería eficaz en combinación con el tratamiento tradicional (Shikov et al., 2008). Es activa en estudios *in vitro* frente a gran cantidad de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Pseudomonas aeruginosa* y además se conoce su actividad fungicida frente a *Candida albicans* (Aggag y Yousef, 1972; Berry, 1995; Brehm-Stecher y Johnson, 2003; Cinco et al., 1983; Nogueira et al., 2008; Silva et al., 2012). A su vez, presenta actividad frente *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium*, afecta al crecimiento *in vitro* del polio virus y herpes virus tanto tipo I (HSV-I) como tipo II (HSV-II) y componentes como el camazuleno y α -bisabolol favorecen la actividad antibacteriana y fungicida frente a *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* (Anónimo, 2008; Koch et al., 2008 a, b; Turi et al., 1997).

Respecto a la actividad antiparasitaria, el A.E. manzanilla es eficaz frente al piojo de los búfalos en Egipto (*Haematopinus tuberculatus*) destacando como producto ovicida y pediculicida tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*. En este mismo trabajo, se observó cómo la manzanilla actuaba a su vez repeliendo a varias especies de moscas como *Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans*, *Hippobosca equina* y *Haematobia irritans* (Khater et al., 2009). Dicha actividad ha sido puesta de manifiesto por otros autores (Khater et al., 2011; Shoukry, 1997), así como su capacidad de producir alteraciones en las diferentes fases de desarrollo de moscas productoras de miasis.

El α -bisabolol ha demostrado tener actividad frente a promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania infantum* en ensayos *in vitro* (Corpas-López, 2011; Morales-Yuste et al., 2010). Aceites esenciales de otras plantas, ricos en α -bisabolol, se han mostrado eficaces frente a *L. donovani*, *L. aethiopica* y *Plasmodium* spp. (Kamatou et al., 2005; Tariku et al., 2010).

15. MENTA (*Mentha piperita*).

Para la obtención del aceite esencial se utilizan las hojas desecadas, enteras o cortadas, de *Mentha piperita* L. La droga entera contiene al menos 12 ml/kg de aceite esencial. La hoja de menta tiene un olor penetrante y un sabor aromático característicos; de color verde a verde-parduzco, con nerviaciones violeta parduzcas en algunas variedades (RFE 2010, 4ª Edición).



Figura 29. Flores y hojas de menta (*Mentha piperita*). Imagen cedida por gentileza del Dr. Bernat Vanaclocha.

15.1. Componentes activos.

Al igual que con la manzanilla, la composición del aceite esencial puede variar según la época de recolección, secado, país de procedencia, etc. Los principales componentes son: mentol, mentona, acetato de mentilo, limoneno y cineol. Todos los componentes son líquidos a excepción del mentol que es un polvo cristalino, suelto o aglomerado que se presenta en forma de cristales prismáticos o aciculares, incoloros, brillantes, prácticamente insoluble en agua (RFE 2010, 4ª Edición).

15.2. Acción terapéutica.

El uso tradicional de la menta es muy frecuente para trastornos biliares, dispepsia, enteritis, flatulencia, gastritis, cólicos intestinales, y los espasmos del

conducto biliar, la vesícula biliar y gastrointestinal además de poseer actividad anticancerosa, antialérgica y anestésica (McKay y Blumberg., 2006 b).

En el trabajo de Ohara y Matsuhisa (2002), la menta fue una de las plantas que mostraron actividad anticancerígena. Tanto el A.E. de menta como el mentol y otros de sus componentes, han demostrado tener actividad antialérgica al suprimir de forma significativa la producción de mediadores de la inflamación (Juergens et al., 1998 a, b). En animales de experimentación también se ha mostrado eficaz aliviando los síntomas de la rinitis alérgica (Inoue, 2001).

El uso de la menta y del mentol para aliviar el malestar en el sistema respiratorio es ampliamente conocido. La inhalación de mentol mejora significativamente la tos y la sensación de malestar respiratorio (Morice et al., 1994; Naito et al., 1991, 1997; Nishino et al., 1997).

Respecto a la actividad antimicrobiana, el A.E. de la menta presenta incluso mayor actividad *in vitro* que la manzanilla, siendo muy similar a la de la estreptomicina frente a determinados microorganismos. Es eficaz frente a *Micrococcus flavus*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella epidermidis*, *Salmonella typhimurium*, entre otros. Esta actividad del A.E. de menta probablemente se deba al alto contenido en mentol, para el que se ha demostrado una buena actividad bactericida (Soković et al., 2010). Este hecho ya se conocía en estudios previos en los que el mentol era más efectivo que el A.E. de menta frente a patógenos del tracto respiratorio como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus aureus* (Inouye et al., 2001).

La mentona es otro de los componentes del aceite esencial de menta que presenta, junto con el A.E. y el mentol, actividad inhibitoria frente a *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus epidermis*, *Listeria monocytogenes* y una potente actividad frente a *Pseudomonas* (Inouye et al., 2001; Iscan et al., 2002). Además, dentro de los distintos tipos de menta, *Mentha piperita* ha sido la variedad más eficaz frente a cepas resistentes de *Shigella sonnei* y *Micrococcus flavus* (Mimica-Dukic et al., 2003). Al igual que la manzanilla, el A.E. de menta afecta a *Helicobacter pylori*, a diferentes serotipos del influenza virus A, al virus de la enfermedad de Newcastle, al HSV-I y

HSV-II disminuyendo su capacidad replicativa (Azuma et al., 2003; McKay y Blumberg, 2006 b; Minami et al., 2003; Schuhmacher et al., 2003). El extracto alcohólico de menta en combinación con otras plantas (*Viscum album*, *Salvia officinalis*, *Thymus serpyllum*, *Glycyrrhiza glabra*) inhibe la reproducción de varios serotipos del influenza virus e inhibe la transcriptasa inversa del VIH, disminuyendo así su capacidad replicativa (Manolova et al., 1995; Minami et al., 2003; Yamasaki et al., 1998).

La actividad fungicida del aceite esencial de menta ha sido ampliamente demostrada frente a hongos como *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus* y *Cryptococcus neoformans* y también como plaguicida en cultivos y productos alimentarios junto con mentol, mentona y acetato de mentilo como potenciales fungicidas y conservantes naturales (Araujo et al., 2003; Blaszczyk et al., 2000; Choi et al., 2003; Damayanti et al., 1996; Duarte et al., 2005; Ezzat, 2001; Guerin y Reveillere, 1985; Guynot et al., 2003; Pattnaik et al., 1996; Rai y Upadhyay, 1988; Soković et al., 2009; Tampieri et al., 2005; Tassou et al., 1995).

Frente a parásitos, la menta se ha descrito como buen agente protoescolicida frente a *Echinococcus granulosus*, disminuyendo al 50% el número de protoescolices a las 24 horas en ratones infectados (Maggiore et al., 2012). También mostró actividad antihelmintica *in vitro* frente a *Strongyloides venezulensis* (Carvalho et al., 2012). En un estudio de Warikoo et al. (2011) se evaluó la eficacia de cinco aceites esenciales para evitar la ovoposición de las hembras de *Aedes aegypti* en el agua, obteniéndose interesantes resultados con el A.E. de menta. Previamente, Samarasekera et al. (2008) indicaron resultados similares con mentol, mentona y acetato de mentilo con respecto a *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* y *Anopheles tessellatus*, mosquitos comunes de Sri Lanka. La mentona también tiene efectos como insecticida frente a *Musca domestica* provocando su muerte tras 15 minutos de su exposición (Rossi et al., 2012); de todos los aceites ensayados por Rossi et al. (2012), el de menta a una concentración del 10% fue el más eficaz reduciéndose la ovoposición en un 97'5%. El A.E. ha sido eficaz *in vitro* también en protozoos como *Giardia lamblia*, alterando

Capacidad infectiva de las larvas L₃ de *Anisakis* y búsqueda de nuevos compuestos naturales activos frente a la anisakiosis.

la membrana y capacidad de adhesión del parásito (Machado 2010; Vidal et al., 2007).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La parasitación del hombre con nematodos del género *Anisakis*, por ingerir pescado crudo o poco cocinado infectado, es muy frecuente en Japón y distintos países de Europa, entre ellos España. Son numerosos los casos publicados de manifestaciones gastrointestinales más o menos severas y reacciones alérgicas de sintomatología variable, convirtiéndose España en el país con mayor número de casos de anisakiosis, después de Japón (Abollo et al., 2003; Audicana et al., 2002; Daschner et al., 2000; Del Pozo et al., 1997; FEAD, 2013). La mayoría de estas infecciones están producidas por el morfotipo Tipo I de *Anisakis* (Umehara et al., 2007). Así, mientras en Japón *A. simplex* s.s. se considera el principal agente etiológico de la anisakiosis y en Italia se ha señalado como tal a *A. pegreffii* (D'Amelio et al., 1999; Fumarola et al., 2009; Mattiucci et al., 2011, 2013 a; Umehara et al., 2007), en España no se ha identificado la especie involucrada por métodos moleculares. En este sentido, algunos autores han encontrado que las larvas de *A. pegreffii* tienen menor poder de penetración en el músculo de determinados peces que las de su especie hermana *A. simplex* s.s., lo que podría indicar una menor capacidad patógena de la primera (Suzuki et al., 2010). A pesar de que las larvas de *Anisakis* Tipo II, son capaces de infectar al hombre (Clavel et al., 1993) no se conoce bien la implicación de sus especies en esta enfermedad, ya que son pocas las larvas procedentes de casos humanos que se han identificado por métodos moleculares.

Si bien son diversos los fármacos probados frente a la anisakiosis (antibióticos, antihistamínicos, anticolinérgicos y/o corticosteroides), hasta la fecha ninguno de ellos ha mostrado una eficacia contrastada (Cocheton et al., 1991; Domínguez-Ortega y Martínez-Cócera, 2000; Matsui et al., 1985; Oshima, 1972). Así mismo, con el fin de evitar la intervención quirúrgica, se han propuesto tratamientos con antihelmínticos (De Vera et al., 2002; Filauro et al., 2011; Ioli, 1998; Magnaval et al., 2002; Manley y Embil, 1989; Moore et al., 2002; Pacios et al., 2005), entre los cuales cabe citar al albendazol, derivado benzimidazólico ampliamente utilizado para tratar los parásitos intestinales que parece presentar cierta actividad frente a *Anisakis* (Arias-Díaz et al., 2006; Dziekoeska-Rynko et al., 2002; Moore et al., 2002). Por otra parte, se han ensayado, *in vitro* e *in vivo*, sustancias de origen natural frente a las larvas de anisákidos (Hierro et al., 2004 a, b, c, 2006; Lin et al., 2010; Navarro et al., 2008).

La manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y menta (*Mentha piperita*) son plantas medicinales ampliamente utilizadas (Herro y Jacob, 2010; Srivastava et al., 2010). Ambas han mostrado ser biocidas frente a un amplio rango de agentes patógenos, al igual que ocurre con componentes de otros aceites esenciales, como son el farnesol, nerolidol y elemol (Hoet, 2006; Inoue et al., 2004; Kpoviessi et al., 2014; Morales-Yuste, 2006).

Por todo lo expuesto, y dado que actualmente no existe ningún tratamiento totalmente eficaz frente a la anisakidosis humana, los objetivos de esta Tesis han sido:

- Comprobar la posible diferencia en la patogenicidad entre las larvas de los morfotipos I y II y sus diferentes especies, mediante la infección en animales de experimentación.
- Estudiar el comportamiento en ensayos *in vivo* de larvas enquistadas y libres en vísceras.
- Probar la eficacia del albendazol, fármaco de referencia, frente a la anisakiosis.
- Establecer la posible eficacia de los aceites esenciales de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y menta (*Mentha piperita*) así como sus principales componentes frente a *Anisakis* Tipo I en estudios *in vitro* e *in vivo*.
- Examinar la actividad larvicida de componentes de otros aceites esenciales como nerolidol, farnesol y elemol frente a *Anisakis* Tipo I en estudios *in vitro* e *in vivo*.
- Identificar genéticamente las larvas utilizadas en el estudio *in vivo* con el fin de establecer si existe relación entre la capacidad patógena de las larvas, susceptibilidad a los compuestos naturales y la especie del parásito.

RESULTADOS

Capítulo I. Comparación experimental del potencial patógeno de las dos especies hermanas *Anisakis simplex* s.s. y *Anisakis pegreffii* en ratas Wistar.

María del Carmen Romero, Adela Valero, María Concepción Navarro-Moll, Joaquina Martín-Sánchez.

Resumen

Objetivos: Son pocos los datos que se conocen sobre la patología producida por cada una de las dos especies hermanas, *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*. Las diferencias señaladas en su habilidad de penetración en el músculo del pez podrían también manifestarse en el hombre. El propósito del presente trabajo es comprobar la posible existencia de diferencias en la patogenicidad entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* utilizando un modelo experimental que simula la infección humana. Se infectaron 51 ratas hembras Wistar con 190 larvas L₃ de *Anisakis* tipo I de diferentes puntos de las costas de la Península Ibérica que, tras la eutanasia del animal, se recuperaron e identificaron mediante PCR-RFLP del ITS1-5,8S-ITS2.

Metodología: Se analizaron los datos mediante regresión logística para establecer si existe asociación entre el potencial patógeno y la especie a la que pertenece la larva.

Resultados: La distribución de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* entre las aguas del Mediterráneo y Atlántico de la Península Ibérica mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0'001$) que no se observaron con los genotipos híbridos ($p > 0'3$). El 21'6% de las larvas mostraron ser patógenas, entendido como la capacidad de la larva para causar lesión, fijarse a la pared gastrointestinal o penetrar a través de ella. La variable especie mostró asociación con el poder patógeno de la larva ($p = 0'008$). Tomando *A. simplex* s.s. como referencia, la OR para *A. pegreffii* fue 0'351 ($p = 0'028$).

Conclusión: A pesar de esta diferencia de potencial patógeno, *A. pegreffii* es también capaz de producir anisakiosis, de forma que el 14'3% de las formas gástricas en rata se deben a ella, justificando la consideración de ambas especies como agente etiológico de esta afección parasitaria.

Experimental comparison of pathogenic potential of two sibling species *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* in Wistar rat

María del Carmen Romero¹, Adela Valero¹, María Concepción Navarro-Moll² and Joaquina Martín-Sánchez¹

¹ Parasitology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

² Pharmacology Department, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

Abstract

OBJECTIVES There are little data available on the pathology caused by the sibling species *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii*. The differences shown in their ability to penetrate the muscle of fish may also be manifested in humans. The purpose of this study is to confirm possible differences in pathogenicity between *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* using an experimental model which simulates infection in humans.

METHODS Female Wistar rats were infected with 190 *Anisakis* type I L3 larvae from the Iberian coastline. After the animal was sacrificed, these L3 larvae were then recovered and identified via PCR-RFLP of the ITS1-5.8S-ITS2. A logistic regression analysis was performed searching for association between experimental pathogenic potential and species.

RESULTS The distribution of *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* between Atlantic and Mediterranean waters of the Iberian Peninsula showed statistically significant differences ($P < 0.001$) which were not observed in the hybrid genotypes ($P > 0.3$). 21.6% showed pathogenic potential, interpreted as the capacity of the larvae to cause lesions, stick to the gastrointestinal wall or penetrate it. The species variable showed association with the pathogenic role of the larva ($P = 0.008$). Taking *A. simplex* s.s. as our reference, the OR for *A. pegreffii* is 0.351 ($P = 0.028$).

CONCLUSIONS Despite this difference, *A. pegreffii* is also capable of causing anisakiasis, being responsible for 14.3% of the penetrations of the gastric mucosa found in rats, which justifies both species being considered aetiological agents of this parasitic disorder.

keywords anisakiasis, *Anisakis simplex* s.s., *Anisakis pegreffii*, pathogenic potential, Wistar rat

Introduction

There is no doubt that one of the main risk factors for anisakiasis is the consumption of fish, especially the way in which it is consumed, that is, raw or undercooked; another factor is the susceptibility of man as an accidental host of this parasite. The third larval stage (L3) of species of the *Anisakis* genus occurs as parasites in a large number of fish and cephalopods which form part of the human diet (Pereira-Bueno 1992; Koie 1993; Valero *et al.* 2006). The accidental ingestion of the parasite causes gastrointestinal symptoms ranging from minor to severe and/or allergic reactions whose symptoms vary from urticaria to anaphylactic shock (Daschner *et al.* 2000; Del Rey Moreno *et al.* 2006; Solas *et al.* 2009). The scarcity or even absence of distinguishing morphological features in the third larval stage complicates or prevents species differentiation. This means that we must

resort to molecular techniques, mainly to PCR-RFLP of the ribosomal ITS1-5.8S-ITS-2 fragment (D'Amelio *et al.* 2000; Martín-Sánchez *et al.* 2005; Abattouy *et al.* 2011). Almost all of the thousands of cases of parasitism in humans reported in 27 countries are caused by the morphotype I of *Anisakis* (Repiso Ortega *et al.* 2003; Umehara *et al.* 2007). Although few larvae from human cases have been identified by molecular methods, the most important study carried out in Japan by Umehara *et al.* (2007) and more recently Arizono *et al.* (2012) identified *Anisakis simplex* s.s. as the principal aetiological agent of anisakiasis in this country, whilst in Italy, *Anisakis pegreffii* is attributed this same status with a significantly lower number of cases (D'Amelio *et al.* 1999; Mattiucci & Nascetti 2008; Fumarola *et al.* 2009). On this subject, some authors have found that *A. pegreffii* larvae have less penetrative power, not only in the muscle of certain fish but also in solid agar, and even

worse survival in artificial gastric juice than *A. simplex* s.s., which may indicate a lower pathogenic potential in the case of *A. pegreffii* (Suzuki *et al.* 2010; Quiazon *et al.* 2011; Arizono *et al.* 2012).

The purpose of this study is to corroborate the existence of differences in pathogenicity between *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* through the infection of laboratory animals, specifically using the Wistar rat.

Materials and methods

Parasites, fish and geographical area

The parasites were obtained from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) caught at different points along the Atlantic and Mediterranean coastlines of the Iberian Peninsula (Figure 1). We selected 190 *Anisakis* type I L3 larvae measuring at least 20 mm, all of which were highly mobile. The criteria used for their morphological identification were those indicated by Berland (1961) and Koie (1993).

Among the larvae extracted from blue whiting for use in the experimental infection, 79.5% (151/190) came from fish caught off the Atlantic Ocean coastlines surrounding the Iberian Peninsula, of which 70.2% (106/151) were from Galicia, 15.2% (23/151) from Portugal and 14.6% (22/151) from Huelva. The remaining 20.5% (39/190) were from the Spanish Mediterranean coastline: 23.1% (9/39) from Alicante, 7.7% (3/39) from Murcia, 17.9% (7/39) from Almería and 51.3% (20/39) from Motril (Granada).

Experimental infection

The study was conducted on 51 female Wistar rats weighing between 100 and 120 g. Three to four larvae (depending on the number of larvae available) were introduced into the lumen of the stomach of each rat using a gastric probe. After necropsy (Zúñiga *et al.* 2011) performed 4 h post-infection, data were gathered on the larvae in the rats. To detect the presence of lesions, a thorough visual examination was performed under stereoscopic microscope of the content and wall of the digestive tract, organs (liver, pancreas, kidneys and ovaries) and adjacent body cavity fat.

The larvae recovered from the rodent were then washed in 0.9% NaCl solution and placed individually into Eppendorf tubes at -20°C to await genetic analysis.

Identification of the larvae

PCR-RFLP was used to identify the species, extracting genomic DNA by using the RealPure kit (Ref RBMEG01). PCR amplification of rDNA fragment ITS1-5.8S-ITS2 used primers NC5 (forward), 5' GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT 3' and NC2 (reverse), 5' TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT 3' reported by Zhu *et al.* (1998), followed by digestion with 10 U/ μl restriction enzymes *HinfI* (Bioron international), *TaqI* (Bioron international). The digestion product was subjected to 3% agarose gel electrophoresis for species



Figure 1 Areas of the Atlantic and Mediterranean coasts of the Iberian Peninsula where blue whiting were caught and proportions of the *Anisakis* type I species identified.

identification according to the band pattern (D'Amelio *et al.* 2000; Martín-Sánchez *et al.* 2005; Abattouy *et al.* 2011).

Statistical study

A logistic regression analysis was performed using the categorical variable pathogenic potential of L3 larvae (no, yes) – defined as its capacity to cause lesions, attach itself onto the gastric or intestinal wall, or penetrate through them to reach the abdominal cavity – as the dependent variable ($N = 190$). The independent variables consisted of the species or genotype (*A. simplex* s.s., *A. pegreffii* and hybrid genotypes) and the geographical origin of the larva, classified as Mediterranean/Atlantic or as more specific geographical locations: Galicia, Portugal, Huelva, Alicante, Murcia, Almeria and Granada. The statistical study was carried out using SPSS 15.0.; P -values of ≤ 0.05 were considered significant.

Ethical clearance

All experiments were carried out in accordance with European Parliament and of the Council of 22 September 2010 (2010/63/UE and RD 1201/2005). The ethical clearance for conducting the experiments was obtained from the Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (Zúñiga *et al.* 2011).

Results

Experimental infection

A thorough examination of the sacrificed animals made it possible to locate 100% of the larvae used in the experimental infection, all of which were alive (Table 1). 16.3% of the L3 larvae (31/190) had caused lesions in the digestive tract. These lesions were mainly (87.1%, 27/31) located in the greater curvature of the

wall of the body of stomach and pyloric antrum, whilst the rest (12.9% 4/31) were found in the small intestine. The lesions varied in size from <1 to 24 mm^2 . When the larva attaches onto the wall of the gastrointestinal tract, the lesion consists of a small haemorrhagic ulcer accompanied by oedema of various dimensions, and on occasions, the parasite leaves tunnels with oedema. Some of the larvae were seen just as they passed through the stomach or intestine wall of the rodent and moved towards the abdominal cavity, all with a hood surrounding the lips. The larvae that passed through the stomach wall left authentic holes in it. In one of the rats, three L3s were found attached to the abdominal muscle. In the abdominal cavity of the animal were found 12.1% of the larvae (23/190); 34.8% of the larvae (8/23) found in the abdominal cavity did not leave any lesions which were perceivable with the method used.

Identification of species

42.1% of the L3 larvae (80/190) belonged to *A. simplex* s.s.; 37.4% (71/190) were identified as *A. pegreffii*. The remaining 13.7% (26/190) showed a hybrid PCR-RFLP band pattern with the two restriction enzymes, *HinfI* and *TaqI*, which is the sum of the patterns generated for the species mentioned above, and the remaining 6.8% (13/190) showed this hybrid genotype with only one enzyme, whilst with the other, the pattern generated was indistinguishable from *A. pegreffii*. The distribution of these species between Atlantic and Mediterranean waters of the Iberian Peninsula showed statistically significant differences ($P = 0.001$); namely, in the proportions of *A. simplex* s.s. and of *A. pegreffii* ($P < 0.001$), but not in those of the hybrid genotypes ($P > 0.3$). In this study, we observed that is six times more likely (CI95% 2.4–15.0) to find *A. pegreffii* L3 larvae in blue whiting from the Mediterranean than in those from the Atlantic.

Table 1 Classification of larvae according to their pathogenic potential, showing the species or genotype to which it belongs and their location after necropsy

Species or genotypes	Pathogenic larvae (%)			Non-pathogenic larvae (%)		
	Cavity	Stomach	Intestine	Stomach	Intestine	Total
<i>Anisakis simplex</i> s.s.	11 (5.8)	5 (2.6)	3 (1.6)	21 (11)	40 (21)	80 (42.1)
<i>Anisakis pegreffii</i>	5 (2.6)	2 (1.1)	–	35 (18.4)	29 (15.3)	71 (37.4)
Hybrid genotype with the two restriction enzymes	4 (2.1)	5 (2.6)	2 (1)	9 (4.8)	6 (3.2)	26 (13.7)
Hybrid genotype with only one enzyme	3 (1.6)	1 (0.5)	–	4 (2.1)	5 (2.6)	13 (6.8)
Total	23 (12.1)	13 (6.9)	5 (2.6)	69 (36.3)	80 (42.1)	190

Association between experimental pathogenic potential and genotype

Within the framework of the method used, the pathogenic potential of the larva was defined as its capacity to cause lesions, attach itself onto the gastric or intestinal wall, or penetrate through them to reach the abdominal cavity. 21.6% (41/190) of the larvae used displayed this pathogenic role (Table 1).

A logistic regression analysis of the data was conducted in order to detect the potential association between experimental pathogenic potential and characteristics of the larva such as the *Anisakis* species and the geographical origin. The variable of geographical origin (Mediterranean/Atlantic) was not associated with experimental pathogenic potential ($P = 0.785$), nor was it when the geographical origins of the larvae were specified more precisely ($P = 0.761$). Only the species variable showed association with the pathogenic role of the larva ($P = 0.008$). Taking *A. simplex* s.s. as our reference, the OR for *A. pegreffii* is 0.351 ($P = 0.028$), whilst there are no statistically significant differences with the hybrid genotypes.

Discussion and conclusions

Anisakis simplex s.s. and *A. pegreffii* are parapatric species and the coasts of the Iberian Peninsula are areas in which the two species are found in sympatric conditions, sharing both permanent and intermediate/paratenic hosts (Mattiucci & Nascetti 2008). Differentiation between the two species using ribosomal DNA markers is based exclusively on the existence of two fixed differences in the ITS-1 sequence, which means different restriction patterns are produced with *HinfI* and *TaqI* enzymes (Ceballos-Mendiola *et al.* 2010). The restriction enzyme *Cfo* was not used in this study because it generates the same pattern for the two sibling species. The detection of the mix of genotypes of both species (hybrid genotypes) has been the cause of some controversy in terms of its interpretation: whilst some authors believe these mixed genotypes reflect hybridisation, others adduce 'incomplete homogenisation in a multiple-copy repeated DNA region' (Martín-Sánchez *et al.* 2005; Hermida *et al.* 2012). For the purposes of this study, we chose to consider them to be different genotypes, which is in line with either of the above interpretations.

In Japan, most cases of human anisakiasis for which molecular species identification has been carried out are caused by infection by *A. simplex* s.s., whilst in Italy, the species responsible is *A. pegreffii* (D'Amelio *et al.* 1999; Mattiucci *et al.* 2007, 2011; Umehara *et al.* 2007; Fumarola *et al.* 2009; Arizono *et al.* 2012). In Spain,

despite an increase in the number of cases published in recent years, the species involved has not been identified (Repiso Ortega *et al.* 2003). In reality, little is known about the pathology caused by each of these sibling species in their different hosts. Experimental studies on fish conducted by Suzuki *et al.* (2010) and Quiazon *et al.* (2011) highlighted differences between the two sibling species indicating a greater tendency for *A. simplex* s.s. to migrate towards the muscle than *A. pegreffii*. These differences in ability to penetrate the muscle of fish may also be manifested in their capacity to penetrate into the tissue of accidental hosts such as man, thus influencing their pathogenic potential. Recently, Arizono *et al.* 2012 have demonstrated that *A. simplex* s.s. larvae survived the acidic artificial gastric juice for approximately 1 day more than *A. pegreffii* larvae. With this in mind, this study attempts to shed some light on the many questions still surrounding these parasites regarding their pathology in humans, using the Wistar rat as an experimental model. The rat has a larger digestive system than the mouse and fewer space and care requirements than other larger animals; moreover, the size of the parasite requires the use of a cannula 2 mm wide, which makes the rat an ideal animal for this type of study (Zúñiga *et al.* 2011; Romero *et al.* 2012). Furthermore, administering the *Anisakis* larvae orally is an effective and simple technique which allows us to simulate human infection, as the *Anisakis* L3 larvae display distribution and behaviour patterns in the rat digestive system which are similar to those seen in human cases (Navarro-Moll *et al.* 2011; Zuloaga *et al.* 2013). Given that the number of larvae found in fish muscle can be high (Pereira-Bueno 1992; Jurado-Palomo *et al.* 2010), we considered it appropriate to use several larvae per laboratory animal.

The majority of human anisakiasis cases occur in the stomach and ileum due to the barrier effect against larvae created, respectively, by both the pylorus and the Bauhin valve, causing greater numbers of larvae to concentrate in these areas (Ishikura *et al.* 1992). In our experimental model, 87.1% (27/31) of the larvae which penetrate or attach onto the gastrointestinal wall do so in the stomach, the preferred area being the wall of the body of stomach or sometimes the pyloric antrum (Paulsen 2011). This preference may be due, on one hand, to a progressive peristaltic movement in the fundic region which would push the larvae towards the region of the body of stomach, and on another, to there being less secretion in the stomach body area, which would facilitate their remaining and becoming attached. In the remaining 12.9%, the area affected is the intestine. Both species of *Anisakis* have been incriminated as aetiologic agents of gastric and intestinal anisakiasis in humans (D'Amelio

et al. 1999; Suzuki *et al.* 2010; Mattiucci *et al.* 2011). Among the different cases documented in Spain, gastric complaints represent 40–70% of parasitisation (Castán *et al.* 2002; Repiso Ortega *et al.* 2003). In these cases, superficial erosions and ulcers similar to those observed in this study were reported. In our case, we were unable to perform a histological examination of biopsies; thus, we cannot confirm the existence of a non-specific inflammatory infiltrate with or without an increase in eosinophils and foreign body granulomas as occurs in humans. We found some larvae in the abdominal cavity with an absence of lesions in the digestive tract (three *A. simplex* s.s., three *A. pegreffii* and two hybrid genotypes); self-limiting clinical signs which disappear within hours of treatment of symptoms have also been reported in humans (Repiso Ortega *et al.* 2003).

The results obtained show that pathogenic potential is associated with the species or genotype to which the larva belongs. Thus, we found that the risk of *A. pegreffii* penetrating is 65% lower than that of *A. simplex* s.s. (CI 95%: 11–86%). Conversely, the hybrid genotypes with the two restriction enzymes show double the penetration risk of *A. simplex* s.s. (CI 95% 1–6) with a *P*-value close to statistical significance (*P* = 0.072). The larvae identified as hybrid genotypes with only one enzyme did not display statistically significant differences in pathogenic potential when compared to *A. simplex* s.s. (*P* = 0.588). In summary, we have demonstrated through our experimental model in rats that *A. simplex* s.s. is a more pathogenic species than *A. pegreffii*, a factor which, coupled with its greater penetration capacity into fish muscle and acid tolerance (Suzuki *et al.* 2010; Quiazon *et al.* 2011; Arizono *et al.* 2012) could justify its purported status of aetiologic agent in the majority of human cases, even in areas where *A. pegreffii* is the predominant species (Umehara *et al.* 2007; Arizono *et al.* 2012). In spite of this difference, *A. pegreffii* is also capable of causing anisakiasis (responsible for 14.8% of the penetrations of the gastric mucosa in rats), thus justifying it being considered the aetiologic agent of anisakiasis in Italy, given that in Italian waters *A. simplex* s.s. is not found, and *A. pegreffii* is widely represented in all species of fish (Mattiucci *et al.* 2007). Obviously, there are several other aspects which could affect the pathogenetic role of these zoonotic species to humans such as human susceptibility (Audicana & Kennedy 2008).

Acknowledgements

We are grateful to the Junta de Andalucía (Regional Autonomous Government of Andalusia) for the project grant P07-CVI-03249, and Ictioparasitology group cvi-03249.

References

- Abattouy N, Valero A, Benajiba MH, Lozano J & Martín-Sánchez J (2011) *Anisakis simplex* s.l. parasitization in mackerel (*Scomber japonicus*) caught in the North of Morocco-prevalence and analysis of risk factors. *International Journal of Food Microbiology* **150**, 136–139.
- Arizono N, Yamada M, Tegoshi T & Yoshikawa M (2012) *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii*: biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. *Foodborne Pathogens and Disease* **9**, 517–521.
- Audicana MT & Kennedy MW (2008) *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews* **21**, 360–379.
- Berland B (1961) Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* **2**, 1–50.
- Castán B, Borda F, Iñarrairaegui M, Pastor G, Vila J & Zozoya M (2002) Anisakiasis digestiva: clínica y diagnóstico según localización. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* **94**, 463–467.
- Ceballos-Mendiola G, Valero A, Polo-Vico R *et al.* (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**, 1399–1404.
- D'Amelio S, Mathiopoulou KD, Brandonisio O, Lucarelli G, Doronzo F & Paggi L (1999) Diagnosis of a case of gastric anisakidosis by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Parassitologia* **41**, 591–593.
- D'Amelio S, Mathiopoulou KD, Santos CP *et al.* (2000) Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal of Parasitology* **30**, 223–226.
- Daschner A, Alonso-Gómez A, Cabañas R, Suarez de Parga M & López-Serrano MC (2000) Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease. Clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105**, 176–181.
- Del Rey Moreno AR, Valero A, Mayorga C *et al.* (2006) Sensitization to *Anisakis simplex* s.l. in a healthy population. *Acta Tropica* **97**, 265–269.
- Fumarola L, Monno R, Lerardi E *et al.* (2009) *Anisakis pegreffii* etiological agent of gastric infections in two Italian women. *Foodborne Pathogens and Disease* **6**, 1157–1159.
- Hermida M, Mota R, Pacheco CC *et al.* (2012) Infection levels and diversity of anisakid nematodes in blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* from Portuguese waters. *Parasitology Research* **110**, 1919–1928.
- Ishikura H, Kikuchi K, Nagasawa K *et al.* (1992) Anisakidae and anisakidosis. In: *Progress in Clinical Parasitology III* (ed. T Sun) Springer-Verlag, New York, pp. 43–102.
- Jurado-Palomo J, López-Serrano MC & Moneo I (2010) Multiple acute parasitization by *Anisakis simplex*. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* **20**, 437–441.

M. C. Romero *et al.* **Experimental comparison of pathogenic potential of two sibling species**

- Koie M (1993) Nematode parasites in teleosts from 0 to 1540 M depth off the Faroe Islands (The North Atlantic). *Ophelia* **38**, 217–243.
- Martín-Sánchez J, Artacho-Reinoso ME, Díaz-Gavilán M & 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**, 155–162.
- Mattiucci S & Nascetti G (2008) Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology* **66**, 47–148.
- Mattiucci S, Abaunza P, Damiano S, García A, Santos MN & 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**, 117–127.
- Mattiucci S, Paoletti M, Borrini F *et al.* (2011) First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infectious Diseases* **11**, 82.
- Navarro-Moll MC, Romero MC, Montilla MP & Valero A (2011) *In vitro* and *in vivo* activity of three sesquiterpenes against L3 larvae of *Anisakis* type I. *Experimental Parasitology* **127**, 405–408.
- Paulsen F (2011) Sobotta, Atlas of Anatomy, Volume 2: Internal Organs, 15th edn. Elsevier Limited, Oxford.
- Pereira-Bueno J (1992) Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiasis. Valladolid. Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad.
- Quiazon KM, Yoshinaga T & Ogawa K (2011) Experimental challenge of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* **60**, 126–131.
- Repiso Ortega A, Alcántara Torres M, González de Frutos C *et al.* (2003) Anisakiasis gastrointestinal. Estudio de una serie de 25 pacientes. *Gastroenterology & Hepatology* **26**, 341–346.
- Romero MC, Valero A, Martín-Sánchez J & Navarro-Moll MC (2012) Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. *Phytomedicine* **19**, 520–523.
- Solas MT, Garcia ML, Rodriguez-Mahillo AI, Gonzales-Munoz M, de las Heras C & Tejada M (2009) *Anisakis* antigens detected in fish muscle infested with *Anisakis simplex* L3. *Journal of Food Protection* **71**, 1273–1276.
- Suzuki J, Murata R, Hosaka M & Araki J (2010) Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *International Journal of Food Microbiology* **137**, 88–93.
- Umehara A, Kawakami Y, Araki J & Uchida A (2007) Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitology International* **56**, 211–215.
- Valero A, López Cuello MM, Benítez R & Adroher FJ (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**, 209–212.
- Zhu X, Gasser RB, Podolska M & Chilton NB (1998) Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology* **28**, 1911–1921.
- Zuloaga J, Rodríguez-Bobada C, Corcuera MT *et al.* (2013) A rat model of intragastric infection with *Anisakis* spp. live larvae: histopathological study. *Parasitology Research* **112**, 2409–2411.
- Zúñiga JM, Orellana JM & Tur JA (2011) Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio Universidad de Alcalá de Henares y SECAL, Madrid.

Corresponding Author María del Carmen Romero, Parasitology Department, Faculty of Pharmacy, Granada University, Granada, Spain. Tel.: +34 958 243857; Fax: +34 958 243862; E-mail: romero@ugr.es

Capítulo II. Demostración experimental del potencial patógeno de *Anisakis physeteris* y *Anisakis paggiae* en ratas Wistar.

María del Carmen Romero, Adela Valero, María Concepción Navarro-Moll, Joaquina Martín-Sánchez.

Resumen

Anisakis Tipo I es el principal agente etiológico de la anisakiasis humana detectándose diferencias de patogenicidad entre las especies *Anisakis simplex* y *Anisakis pegreffii*. Sin embargo, no se conoce bien el papel que juegan las larvas Tipo II en esta enfermedad. El objetivo de este estudio ha sido comprobar la capacidad de la larva para invadir tejidos mediante infección experimental de ratas Wistar. En el estudio *in vivo*, el 7'1% (4/56L3) de las larvas mostraron ser patógenas, entendido como la capacidad de la larva para causar lesión, fijarse a la pared gastrointestinal o penetrar a través de ella. Mediante electroforesis de isoenzimas, PCR-RFLP del ITS1-5,8-ITS2 y PCR-secuenciación del gen mitocondrial *cox2* se han identificado *A. physeteris* (48'9%), *A. brevispiculata* (1'8%) y *A. paggiae* (30'3%). Aunque las larvas del morfotipo II *A. physeteris* y *A. paggiae* muestran menos poder patógeno que las larvas de *A. simplex* del morfotipo I (93% y 91% menos respectivamente). En la infección experimental no se ha observado diferencias de patogenicidad entre *A. physeteris* y *A. paggiae*. Aunque las larvas Tipo I son 10 veces más patógenas que las especies de *Anisakis* Tipo II ($p < 0.001$), éstas pueden estar implicadas en la anisakiasis humana al ser capaces de fijarse y penetrar en el tracto gastrointestinal de los animales. Las técnicas utilizadas para la identificación de las especies ponen de manifiesto la gran heterogeneidad existente entre *A. paggiae* y *A. physeteris* lo que indica la posibilidad de que haya diferentes especies hermanas.

Artículo enviado a *Parasitology Research*.

Experimental demonstration of pathogenic potential of *A. physeteris* and *A. paggiae* in Wistar rats

M^a Carmen Romero,^a Adela Valero^a, M^a Concepción Navarro,^b Joaquina Martín-Sánchez,^a

Department of Parasitology, University of Granada, Spain^a, and Department of Pharmacology, University of Granada, Spain^b

Abstract

Anisakis morphotype I is the principal etiologic agent of human anisakiasis, with differences in pathogenicity found between the *Anisakis simplex* s.s. and *A. pegreffii* species; however, the role of morphotype II larvae in this illness is not well understood. The purpose of this study is to verify the ability of morphotype II larvae to invade tissues via the experimental infection of Wistar rats, an animal model which simulates infection in humans. In the *in vivo* assay, 7.1% (4/56L3 morphotype II) showed pathogenic potential, defined as the capacity of the larvae to cause lesions, attach to the gastrointestinal wall or penetrate it. Isoenzyme electrophoresis, PCR-RFLP of ITS1-5.8s-ITS2 and PCR-sequencing of the *cox2* mitochondrial gene were used to identify these larvae as *A. physeteris* (42.9%), *A. paggiae* (30.3%) and *A. brevispiculata* (1.8%). Although the morphotype II larvae of *A. physeteris* and *A. paggiae* have lower pathogenic potential than morphotype I larvae of *A. simplex* s.s. (93% and 91% lower, respectively), they may still be implicated in human anisakiasis, as they are capable of attaching to and penetrating the gastrointestinal wall of animals, demonstrating a similar pathogenicity to that of *A. pegreffii*. The techniques used for the identification of species reveal a great genetic heterogeneity of *A. paggiae* and *A. physeteris*, suggesting the existence of sibling species.

Keywords: Anisakiasis, *Anisakis physeteris*, *Anisakis paggiae*, pathogenic potential, Wistar rat, isoenzyme electrophoresis, ITS1-5,8s-ITS2, *cox2*.

Introduction

Anisakiasis is a parasitic disease occurring in certain countries in which insufficiently cooked or raw fish is regularly eaten. The majority of the reported cases are caused by *Anisakis* L3 larvae of morphotype I which are capable of producing gastrointestinal illnesses and/or allergic reactions in humans (Daschner et al., 2000; Repiso Ortega et al., 2003; Umehara et al., 2007). Recently, it was found that *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* larvae of morphotype I have different abilities of penetrating the muscular tissue of fish and surviving in artificial gastric fluids, also presenting pathogenicity differences in Wistar rats, an animal model used to simulate the infection occurring in humans (Suzuki et al., 2010; Quiazón et al., 2011; Romero et al., 2013; Zuloaga et al., 2013). However, little is known regarding the ability of morphotype II larvae to infect humans, as only a few cases of infections have been reported (Clavel et al., 1993; Arizono et al., 2012). In the Iberian Peninsula, *A. physeteris* is the most frequent morphotype II anisakid, found mainly in the Mediterranean region. However, it is not very prevalent (Mattiucci et al., 2007; Valero et al., 2000, 2006 a, b). Only a few larvae of *A. paggiae* have been reported in several hake (*Merluccius merluccius*) specimens from the Galician coasts (northeastern Spain), and *A. brevispiculata* has not been found in this region (Mattiucci et al., 2007). The limited

morphological differences found in the species of each of these morphotypes, particularly in the L3 larval stage, suggest the need for species identification by biochemical or molecular techniques (D'Amelio et al., 2000; Perteguer et al., 2004; Martín-Sánchez et al., 2005; Umehara et al., 2007, 2008; Murata et al., 2011). Techniques such as isoenzyme analysis, PCR-RFLP of the ITS1-5,8s-ITS2 or PCR-sequencing of the *cox2* mitochondrial gene have been shown to be usefulness in the genetic characterization and specific identification of these parasites, even in cases of human infection (D'Amelio et al., 1999; Perteguer et al., 2004; Umehara et al., 2007; Fumarola et al., 2009; Mattiucci et al., 2007, 2011, 2013). Given the limited information on the pathogenicity of the *Anisakis* species of morphotype II in humans, this study was designed to determine its behavior in an animal model that simulates a human infection, for comparison with morphotype I, whose pathogenicity is better known. The use of molecular tools allowed for proper species identification.

Materials and Methods

2.1. Parasite

Anisakis spp. L3 larvae were obtained from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) caught at different points along the Atlantic and Mediterranean coasts of the Iberian Peninsula (Fig. 1). Collected larvae were identified

morphologically using a stereo microscope, and based on their characteristics, they were subsequently assigned to morphotypes I or II. For this study, those larvae with the

2.2. Experimental infection

81 female Wistar rats weighing approximately 150 g were infested with one L3 of morphotype II or morphotype I *Anisakis* via gastric probe. Regulated necropsy of the rats was performed at 4 h post-infestation (Zúñiga et al. 2011), recording the morphotype and locations of the larvae, whether they were alive or dead and the presence of any gastrointestinal lesions. Later, larvae that were recovered in good condition were introduced individually into Eppendorf tubes and frozen at -80° C prior to their genetic identification.

2.3. Isoenzyme analysis

Each individual larva was cut into two fragments, reserving the smaller piece for subsequent molecular identification. The larger piece was subjected to physical and mechanical disruption by freezing/thawing in liquid nitrogen and the use of a pestle. After the addition of Triton (5%) to encourage cell lysis, the samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes. In order to prevent enzyme degradation, the entire manipulation process was carried out under cold conditions. The enzymes studied in order to identify the different species of morphotype II were: Isocitrate dehydrogenase (ICD, EC 1.1.1.42) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6 PGD, EC 1.1.1.44) whose alleles are considered to be of diagnostic value for the identification of *A. brevispiculata* and *A. physeteris* at a

greatest degree of mobility were selected (56 morphotype II L3 larvae and 25 morphotype I L3 larvae).

99% level (Mattiucci et al., 2001). L3 larvae of *A. simplex* s.s. were used as references. For electrophoresis and the subsequent enzymatic activity processing, the buffers and solutions listed in Table 1 were used. For the result interpretation and allele identification, different values were assigned so as to indicate their mobility, with 100 being the most common allele value (Martín-Sánchez et al., 2004). Subsequently, attempts were made to find a match of these alleles with those described by Mattiucci et al. (2001).

2.4. DNA extraction and PCR-RFLP

The DNA of each larva was extracted individually using the RealPure kit for genomic DNA extraction by REAL (Ref RBMEG01), having previously ruptured the tissue of the fragment parasite by mechanical means using a pestle and subjecting it to processes of freezing/thawing in liquid N₂. The precipitated pellet was resuspended in 20 µl of bidistilled water and maintained at -20° C until use.

PCR amplification of the ITS1-5,8s-ITS2 of the rDNA was carried out using the primers NC5 (Forward), 5' GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT 3' and NC2 (Reverse), 5' TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT 3' reported by Zhu et al. (1998). Digestion with Taq I (Bioron international), Hinf I (Bioron international), and Cfo (Roche) enzymes was carried out following the manufacturer's recommendations.



Figure 1. Areas of the Atlantic and Mediterranean coasts of the Iberian Peninsula where blue whiting were caught and proportions of the *Anisakis* morphotype II species identified.

The digestion product was subjected to 3% agarose gel electrophoresis for species identification according to the generated band pattern, using the genetic markers identified by D'Amelio et al., 2000; Martín-Sánchez et al., 2005; Cavallero et al., 2011; and Murata et al., 2011 as a reference.

2.5. PCR-Sequencing and comparative sequence analysis

For further confirmation of the taxonomical identity of the PCR-RFLP-identified morphotype II *Anisakis* species, the mtDNA *cox2* region of 38 specimens was amplified and sequenced. The mitochondrial *cox2* region was amplified using the forward primer 211 (5'-TTT TCT AGT TAT ATA GAT TGR TTY AT-3') and the reverse primer 210 (5'-CAC CAA CTC TTA AAA TTA TC-3'); (Nadler and Hudspeth, 2000). The PCR products were purified using the Real Clean Spin Kit (Real; Ref. RBMCS01) and then were directly sequenced in both directions using the primers used for DNA amplification. The obtained sequences were aligned using the Clustal X 1.81 program and were adjusted when necessary so as to identify the different haplotypes. They were compared with those published in the GenBank using the BLASTn and Megablast tools.

Once the sequences were compared, phylogenetic analysis of the same was undertaken using the PHYLIP 3.65 software package (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip>). A published sequence of the *A. simplex* s.s. (DQ116426; Valentini et al., 2006) corresponding to our capture area was used as an outgroup. Phylogenetic analysis was carried out using maximum parsimony (MP) and analysis based on distance matrices (Neighbor Joining and UPGMA). We used the F84 model of nucleotide substitution (the default method) with both NJ and UPGMA methods of clustering. The F84 model incorporates different rates of transition and

transversion, and different frequencies of the four nucleotides. We used the bootstrap as a measure of support or stability of the clades. In order to be considered sufficiently robust, the clades had to have a bootstrap percentage greater than or equal to 50%. Estimation of genetic distance (p-distance) and number of nucleotide base differences between and within the *Anisakis* species was carried out using the MEGA 5.05 software (<http://www.megasoftware.net/>).

For intra-specific analyses, statistical parsimony in TCS (v. 1.21) software was used. TCS is a Java computer program used to estimate genetic genealogies including multifurcations and/or reticulations (i.e. networks) (Clement et al., 2000).

2.6. Statistical analysis

Logistic regression analysis was performed using the categorical variable of L3 larvae pathogenic potential (no, yes) –defined as its capacity to cause lesions, attach itself onto the gastric or intestinal wall, or penetrate them to reach the abdominal cavity– as the dependent variable (N=81). The independent variable consisted of the larval morphotype (morphotype I, morphotype II) or the species (*A. simplex* s.s., *A. pegreffii*, *A. physeteris*, *A. paggiae*, *A. brevispiculata* and unknown species). A similar analysis was also conducted using “ability to cause lesions” as the dependent variable.

Statistical analysis was carried out using SPSS 15.0.; p-values of ≤ 0.05 were considered significant.

2.7. Ethical clearance

All experiments were carried out in accordance with European Parliament and of the Council of 22 September 2010 (2010/63/UE and RD 1201/2005).



Figure 2. Lesion found in a rat caused by *Anisakis* morphotype I (a) and morphotype II (b). Morphotype II larva of *Anisakis* attached to the stomach of a rat (c).

Enzyme/Locus/ EC Code	Electrophoresis	Enzyme activity processing		
	Buffer TME (pH 7.4)	Reaction buffer	Substrate	Cofactors and additional colorants
Glucose-6-phosphate dehydrogenase (6PGD) EC 1.1.1.44	Tris (0.1M) Maleic Acid (0.1M) EDTA (0.01M) MgCl ₂ · 6H ₂ O (0.01M)	Tris-HCl (0.2M) pH8, 10 ml	MgCl ₂ +6H ₂ O (0.5M) Gluconate-6-phosphate (0.1M)	NADP1% NBT1%
Isocitrate dehydrogenase (ICD) EC 1.1.1.42	Distilled water	Tris-HCl (0.2M) pH8, 8 ml	MgCl ₂ +6H ₂ O (0.25M) Isocitric acid (0.1M)	NADP1% NBT1%

Table 1. Composition of solutions used for electrophoresis and enzyme processing. Electrophoretic separation was conducted in starch gels prepared at 10% in TME solution with pH of 7.4, adding 1% NADP

Results:

3.1. Experimental infection

7.1% of the morphotype II larvae (4/56) displayed pathogenic potential, in accordance with the aforementioned description. Two of these larvae, one of *A. physeteris* and one of *A. paggiae*, penetrated the stomach wall and were found within the abdominal cavity, with the first one producing a small lesion with blood vessel breakage (1mm²) (Fig. 2 b). The other two larvae, also of the *A. physeteris* and *A. paggiae* species, were found attached to the rodent's stomach wall (Fig. 2 c), with the latter causing a lesion with vascular damage (1mm²) (Table 2). The majority of the L3 larvae of morphotype II were found in the intestine (51.8%; 29/56) with the caecum being the least frequent location (8.9%; 5/56). In contrast, 44.0% (11/25) of the morphotype I larvae demonstrated pathogenic potential; details of this classification and location of both larvae types in the animal upon necropsy are shown in Table 2.

3.2. Isoenzyme analysis

42 of the 56 morphotype II larvae used in the *in vivo* assay were recovered alive and were available for use in the isoenzymatic study. Table 3 shows the alleles identified in each of the two loci studied (6PGD and ICD), as well as their corresponding allele frequencies.

3.3. Identification of species by PCR-RFLP

Of the morphotype II larvae, *A. physeteris* represented 42.9% (24/56L3), 30.3% (17/56L3) were identified as *A. paggiae* and 1.8% (1/56L3) as *A. brevispiculata*. The remaining 25% could not be identified at a species level. Table 4 shows the band patterns obtained through use of the three restriction enzymes, HinfI, Cfo and TaqI. Of the morphotype I larvae, 48.0% (12/25) were identified as *A. simplex* s.s. and 40.0% (10/25) were

identified as *A. pegreffii*. In this case, the differentiating enzymes were HinfI and TaqI. As for the remainder of the morphotype I larvae, 12.0% (3/25) revealed a hybrid PCR-RFLP band pattern with the two restriction enzymes, which is the sum of the patterns generated for the two above-mentioned species (Table 2).

3.4. Comparative analysis of *cox 2* sequences

In the 38 morphotype II *Anisakis* larvae, comparative analysis sequences allowed us to identify 32 haplotypes defined by 137 polymorphic sites (Table 5). 98 sites were found to be parsimony informative, occurring in more than one haplotype. The trees generated by the *cox2* sequence confirmed the identification of the larvae by PCR-RFLP of the ITS1-5,8s-ITS2 fragment as *A. physeteris* (22 samples, 17 haplotypes), *A. paggiae* (15 samples, 14 haplotypes) and *A. brevispiculata* (1 sample, 1 haplotype). The topology of the trees constructed with both distance analysis methods (UPGMA and NJ) and maximum parsimony (MP) analysis was very similar (Fig. 3, NJ and MP trees not shown). In all three cases, 3 large branches strongly supported by the bootstrap analysis (values between 71% and 100%) were differentiated, formed by the haplotypes of *A. physeteris*, *A. brevispiculata* and *A. paggiae*, respectively (Fig. 3); a closer relationship was found between the first two. The intra-specific study of the *A. brevispiculata* species reveals a p-distance value of between 0.019 and 0.032 and the existence of 12 to 20 polymorphic sites in their sequences. For *A. physeteris*, the p-distance ranges from 0.002 to 0.04 and between 2 and 25 polymorphic sites are found in its sequences. Relative to *A. paggiae*, in all of the trees, two sub-branches are generated having bootstrap values of 100%. In one sub-branch the 14 identified haplotypes having p-distance of between 0.005 and 0.022 (3-24 polymorphic sites) were found while the

	Species	Pathogenic larvae			Non-pathogenic larvae		
		Cavity	Attached in stomach	Intestine	Stomach	Intestine	Total
Morphotype II	<i>A. physeteris</i>	2 (3.6%)	-	-	12 (21.4%)	10 (17.9%)	24 (42.9%)
	<i>A. paggiae</i>	-	2 (36%)	-	3 (5.4 %)	12 (21.4%)	17 (30.3%)
	<i>A. brevispiculata</i>	-	-	-	-	1 (1.8%)	1 (1.8%)
	Unidentified	-	-	-	3 (5.4 %)	11 (19.6%)	14 (25%)
	Total	2 (3.6%)	2 (3.6%)	-	18 (32.2%)	34 (60.7%)	56 (100%)
Morphotype I	<i>A. simplex</i>	2 (8%)	2 (8%)	3 (12%)	2 (8%)	3 (12%)	12 (48%)
	<i>A. pegreffii</i>	1 (4%)	-	-	5 (20%)	4 (16%)	10 (40%)
	<i>Hybrid genotype</i>	2 (8%)	-	1 (4%)	-	-	3 (12%)
	Total	5 (20%)	2 (8%)	4 (16%)	7 (28%)	7 (28%)	25 (100%)

Table 2. Classification of larvae according to their experimental pathogenic potential, showing the morphotype and the species to which it belongs and their location upon necropsy.

other sub-branch contained the sequences deposited in GenBank (KC342895, KC342896, EU560910, DQ116434). Between the haplotypes integrated in these two sub-branches, the p-distance value ranged between 0.040 and 0.061 and 25 to 38 polymorphic sites were found. The number of fixed differences was 18 for *A. physeteris*, 19 for *A. paggiae* and 12 for *A. brevispiculata*.

The cox2 haplotype sequences were subjected to further analysis by statistical parsimony. This algorithm sorted the 32 sequences into 14 independent networks: three for *A. brevispiculata*, two for *A. physeteris* and nine for *A. paggiae* (Fig. 4). The program calculates the frequencies of the haplotypes in the sample. These frequencies are used to estimate haplotype outgroup probabilities, which correlate with haplotype age. The oldest ancestral haplotype, from which the rest would have been derived by mutation, appears in each network, enclosed within a rectangle. A certain relationship was found to exist between these networks (Fig. 4) and the subgroups of the phylogenetic tree (Fig. 3). Fixed differences were detected, characterizing some of these networks (Table 5).

3.5. Association between experimental pathogenic potential and *Anisakis* morphotype or species

Within the framework of the method used, the pathogenic potential of the larva was defined as its ability to cause lesions, attach itself to the gastric or intestinal wall or penetrate them to reach the abdominal cavity. 7.1% (4/56) of the morphotype II larvae and 44.0% (11/25) of the morphotype I larvae used in the *in vivo* tests displayed this pathogenic potential.

A logistic regression analysis of the data was conducted in order to detect the potential association between experimental pathogenic potential and morphotype of the larva or *Anisakis* species. In these univariate models, both independent variables showed associations with the pathogenic role of the larva. In the first of these, using morphotype I as our reference, the OR for the morphotype II was 0.1 ($p < 0.001$). In the second one, using *A. simplex* s.s. as our reference, the OR for *A. pegreffii* was 0.079 ($p = 0.036$), for *A. physeteris* it was 0.068 ($p = 0.004$) and for *A. paggiae* it was 0.089 ($p = 0.011$). Statistically significant differences were not detected between the pathogenic potentials of *A. pegreffii*, *A. physeteris* and *A. paggiae* ($p \geq 0.543$).

4. Discussion

A. physeteris is the predominant anisakid species of morphotype II found in the Iberian Peninsula coasts, followed by *A. paggiae*. Their prevalences are much lower than those of species of morphotype I (Valero et al., 2000; Mattiucci et al., 2007). *A. brevispiculata* is not well represented here, given that only one larva has been found in a blue whiting from the Atlantic Coast and this was the first time that this species has been cited along the coasts of the Iberian Peninsula. It was also the first time that *A. paggiae* was found in different fishing points of the Mediterranean, thus broadening the geographic zone and host organisms of this species. Despite the fact that the presence of *Anisakis* of morphotype II is apparently low, a case of human infection in Spain has been reported and allergic reactions have been attributed to this morphotype (Clavel et al., 1993; Valero et al., 2000, 2003). In our experimental model using *Wistar*

rats (Romero et al., 2013; Zuloaga et al., 2013), 7.1% (4/56L3) of the morphotype II larvae penetrated or were found attached to the animal's gastric wall, and therefore, *A. physeteris*, like *A. paggiae* were responsible for lesions with signs of vascular damage (Table 2). This preference for the wall of the stomach was also observed in the *Anisakis* morphotype I species (Fig. 2 a) (Romero et al., 2013).

The obtained results reveal that pathogenic potential is linked to the larva's morphotype or species. Thus it was found that the morphotype II larva had a 90% lower risk of penetrating than morphotype I larva (CI 95%: 64 to 97). In addition, as seen in Table 2 and Figure 2, morphotype II larvae produced less vascular damage, as found in previous studies (Romero et al., 2012, 2013). In our study, morphotype I larvae were 42 times more likely to produce lesions than the morphotype II larvae ($p=0.001$) (Fig. 2).

Alleles	Allelic frequencies for <i>A. physeteris</i>		Allelic frequencies for <i>A. paggiae</i>		Allelic frequencies for <i>A. brevispiculata</i>	
	for	A.	for	A.	for	A.
ICD-95	0.056		0.214		0	
ICD-100	0.555		0.643		0	
ICD-105	0.389		0.143		0	
ICD-150	0		0		1	
6PGD-50	0.222		0		0	
6PGD-60	0.223		0		0	
6PGD-95	0.185		0.154		1	
6PGD-100	0.259		0.769		0	
6PGD-105	0.074		0.077		0	
6PGD-110	0.037		0		0	

Table 3. Allele frequencies for each of the two loci studied for each species of morphotype II *Anisakis* obtained in waters of the Iberian Peninsula.

Romero et al. (2013), using the same experimental model, demonstrated that within the morphotype I, *A. simplex* s.s. is a more pathogenic species than *A. pegreffii*, thus justifying its status as an etiological agent in the majority of human cases. In addition, this study finds that the respective risk of *A. physeteris* and *A. paggiae* morphotype II larvae penetrating the rodent's gastric wall is 93% (CI 95%: 57 to 99) and 91% (CI 95%: 42 to 99) lower than that of *A. simplex* s.s. The pathogenic potential of these species of morphotype II is similar to that of *A. pegreffii*.

The *cox2* gen sequences were useful in confirming the species identification of the morphotype II

larvae, based on the PCR-RFLP technique of the ITS1-5,8S-ITS2 fragment (D'amelio et al., 2000; Cavallero et al., 2011; Murata et al., 2011). On the other hand, isoenzyme analysis was not found to be useful. Comparative analysis of the sequences obtained in this study and those taken from the GeneBank allowed us to verify the existence of a wide genetic diversity in morphotype II larvae, particularly within *A. paggiae* (Fig. 3 and 4). The p-distance values obtained for this species are similar to those obtained by Valentini et al. (2006) for the complex of sibling species, *A. simplex*. It has been argued that traditional phylogenetic methods are based on certain assumptions which make them inappropriate for intra-specific studies but which, on the other hand, would be well represented by network approaches such as those presented in figure 4 (Posada and Crandall, 2001; Franco et al., 2010). In natural populations, ancestral haplotypes are expected to persist in the population and to be sampled together with their descendants. Figure 4 reveals that morphotype II larvae identified by PCR-RFLP as *A. physeteris* form two independent networks while those identified as *A. paggiae* form nine networks. This, along with the existence of fixed differences (Table 5), supports the hypothesis that each of the two is a complex of sibling species, as previously observed in *A. paggiae* of the Philippine archipelago (Quiazon et al., 2013).

Acknowledgements: We are grateful to the Junta de Andalucía (Regional Autonomous Government of Andalusia) for project P07-CVI-03249.

	TaqI	HinfI	CFO
<i>A. physeteris</i>	300-280	380-290-270	520-430-290-270
<i>A. brevispiculata</i>	300	900	400-320-200
<i>A. paggiae</i>	380-290	900	520-400

Table 4. Diagnostic band patterns for each species of the *Anisakis* morphotype II larvae obtained via PCR-RFLP of the ITS1-5,8S-ITS2.

References

- Arizono N, Yamada, M, Tegoshi T, Yoshikawa M (2012) *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii*: Biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. *Foodborne Pathog Dis* 9:517-521.
- Cavallero S, Nadler SA, Paggi L, Barros NB, 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. *Parasitol Res* 108:781-792.
- Clavel A, Delgado B, Sánchez-Acedo C, Carbonell E, Castillo J, Ramírez J, Quílez J, Gómez-Lus R, Kagei N

- (1993) A live *Anisakis physeteris* larvae found in the abdominal cavity of a woman in Zaragoza, Spain. *Jpn J Parasitol*, 42:445-448.
- Clement M, Posada D, Crandall K (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9:1657-1660.
- D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Brandonisio O, Lucarelli G, Doronzo F, Paggi L (1999) Diagnosis of a case of gastric anisakidosis by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Parassitologia* 41:591-593.
- D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanço M, Paggi L (2000) Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol* 30:223-226.
- Daschner A, Alonso-Gómez A, Cábanas R, Suárez-de-Parga JM, López-Serrano MC (2000) Gastroallergic anisakiasis: Borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol* 105(1 Pt 1):176-181
- Franco FAL, Morillas-Márquez F, Barón SD, Morales-Yuste M, Gálvez R, Díaz V, Pesson B, Alves-Pires C, Depaque J, Molina R, Afonso MO, Gállego M, Guernaoui S, Bounamous A, Martín-Sánchez J (2010) Genetic structure of *Phlebotomus (Larrousius) ariasi* populations, the vector of *Leishmania infantum* in the western Méditerranéen, Epidemiological implications. *Int J Parasitol* 40:1335-1346.
- Fumarola L, Monno R, Lerardi E, Rizzo G, Giannelli G, Lalle M, Pozio E (2009) *Anisakis pegreffii* etiological agent of gastric infections in two Italian women. *Foodborne Pathog Dis* 6:1157-1159.
- Martín-Sánchez J, Gállego M, Barón S, Castillejo S, Morillas-Marquez F (2006) Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:527-532.
- Martín-Sánchez J, Artacho-Reinoso ME, Díaz-Gavilán M, 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. *Mol Biochem Parasitol* 141:155-162.
- Mattiucci S, Fazio P, De Rosa A, Paoletti M, Megna AS, Glielmo A, De Angelis M., Costa A, Meucci C, Calvaruso V, Sorrentini I, Palma G, Bruschi F, Nascetti G (2013) Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. *Emerg Infect Dis* 19:496-499.
- Mattiucci S, Abaunza P, Damiano S, Garcia A, Santos MN, 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. *J Helminthol* 81:117-127.
- Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Abollo E, Webb SC, Pascual S, Cianchi R, Bullini L (2001) Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (nematoda: Anisakidae)s. *Int J Parasitol* 31:9-14.
- Mattiucci S, Paoletti M, Borrini F, Palumbo M, Palmieri RM, Gomes V, Casati A, Nascetti G (2011) First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infect Dis* 11:82.
- Murata R, Suzuki J, Sadamasu K, Kai A (2011) Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Berix splendens* from Japanese waters. *Parasitol Int* 60:193-198.
- Nadler SA, Hudspeth DS (2000) Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J Parasitol* 86:380-393.
- Perteguer MJ, Ortiz G, García E, Flores M, Rodríguez E, Ubeira FM, Gárate T (2004) Application of the PCR-RFLP technique for the species-specific identification of nematodes involved in human anisakiasis. *Med Clin*, 122:686-689.
- Posada P, Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol Evol* 16:37-45.
- Quiazon KM, Santos MD, Yoshinaga T. (2013) *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) of Dwarf Sperm Whale *Kogia sima* (Owen, 1866) stranded off the Pacific coast of southern Philippine archipelago. *Vet Parasitol*, 197:221-230.
- Quiazon K.M, Yoshinaga, T., Ogawa, K. (2011) Experimental challenge of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitol Int*, 60:126-131.
- Repiso Ortega A, Alcántara Torres M, González de Frutos C, de Artaza Varasa T, Rodríguez Merlo R, Valle Muñoz J, Martínez Potenciano JL (2003) Anisakiasis gastrointestinal. Estudio de una serie de 25 pacientes. *Gastroenterol. Hepatol* 26:341-346.

- Romero MC, Valero A, Martín-Sánchez J, Navarro-Moll MC (2012) Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. *Phytomedicine* 19:20-523.
- Romero MC, Valero A, Navarro-Moll MC, Martín-Sánchez J (2013) Experimental comparison of pathogenic potential of two sibling species *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* in Wistar rat. *Trop Med Int Health* 18:979-984.
- Suzuki J, Murata R, Hosaka M, Araki J (2010) Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *Int J Food Microbiol* 137:88-93.
- Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A (2007) Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol Int* 56:211-215.
- Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A (2008) Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitol Int*, 57:49-53
- Valentini A, Mattiucci S, Bondanelli P, Webb SC, Mignucci-Giannone AA, Colom-Llavina MM, Nascetti G (2006) Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial cox2 sequences, and comparison with allozyme data. *J Parasitol* 92:156-166.
- Valero A, del Mar López-Cuello M, Benítez R, Adroher FJ (2006a) *Anisakis* spp. in european hake, *Merluccius merluccius* (L.) from the atlantic off north-west africa and the mediterranean off southern Spain. *Acta Parasitol* 51:209-212.
- Valero A, Martín-Sánchez J, Reyes-Muelas E, Adroher FJ (2000) Larval anisakids parasitizing the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, from Motril Bay in the Mediterranean region of southern Spain. *J Helminthol* 74:361-364.
- Valero A, Paniagua M, Hierro I, Díaz V, Valderrama M, Benítez R, Adroher F (2006b) Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the mediterranean coasts of Andalucía (southern Spain). *Parasitol Int* 55:1-5.
- 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. *J Investig Allergol Clin Immunol* 13:94-98.
- Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB (1998) Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 28:1911-1921.
- Zuloaga J, Rodríguez-Bobada C, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Gonzalez P, Rodríguez-Pérez R, Árias-Díaz J, Caballero ML (2013). A rat model of intragastric infection with *Anisakis* spp. live larvae: Histopathological study. *Parasitol Res* 112:2409-2411.
- Zúñiga JM, Orellana JM, Tur JA (2011) *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio*. Universidad de Alcalá de Henares y SECAL, Madrid

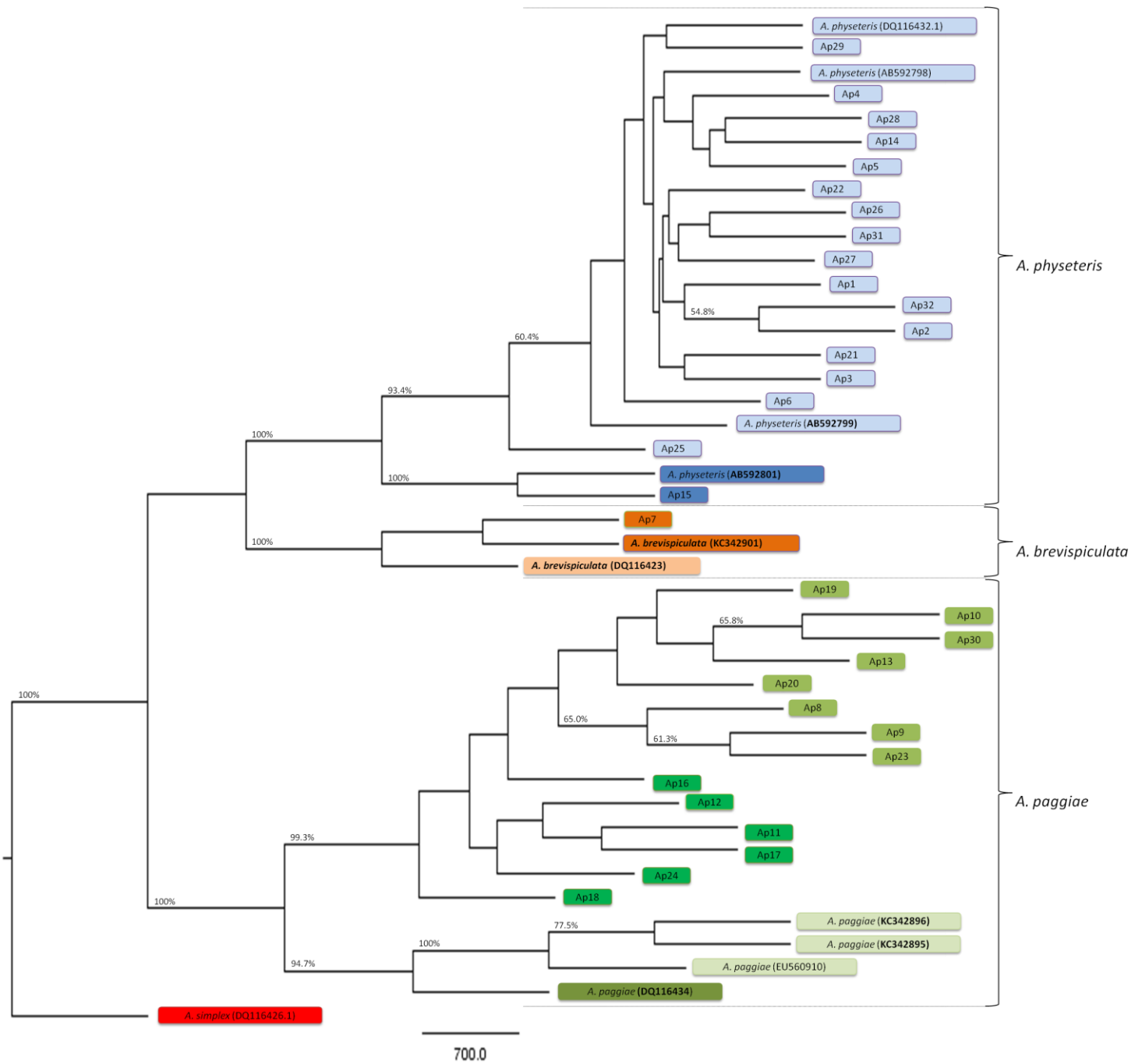


Figure 3: Phylogenetic tree based on mtDNA cox2 sequence data and obtained by distance analysis with a UPGMA method of clustering. *Anisakis simplex* s.s. is used as an outgroup. The numbers above the branches are bootstrap percentages (1000 replications) for clades supported above the 50% level.

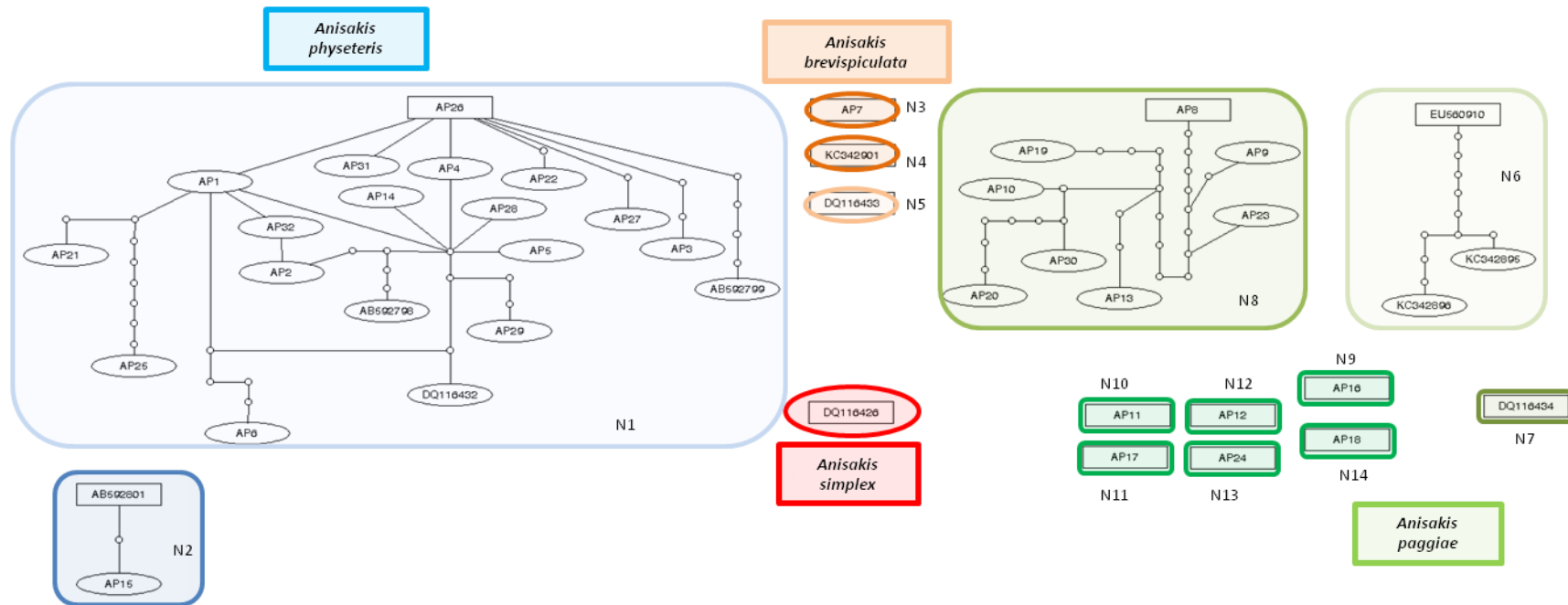


Figure 4: Parsimony network based on mtDNA *cox2* sequence data. The haplotype with the highest outgroup probability is displayed as a rectangle, while other haplotypes are displayed as ovals. The size of the rectangle or oval corresponds to the haplotype frequency.

Table 5. Haplotypes, networks and species identified in the *Anisakis* morphotype II larvae studied. Alignment of the 137 polymorphic positions identified in the amplified 629 bp fragment of the *cox2* gene. The apparent fixed differences detected in each of the 3 species are highlighted in light grey while the apparent fixed differences in the networks generated by analysis of statistical parsimony are highlighted in dark grey.

Capítulo III. Infección experimental de larvas libres y enquistadas de *Anisakis* Tipo I en ratas Wistar.

María del Carmen Romero, Adela Valero.

Resumen

En este trabajo se realiza un estudio sobre el papel patógeno de las larvas de *Anisakis* encapsuladas en las vísceras del pez y las que se encuentran libres en la cavidad corporal del mismo, mediante la estimación de las lesiones causadas en el tracto digestivo de ratas Wistar. Los resultados muestran que el porcentaje de lesiones fue mayor (92'9%) en las ratas infectadas con larvas libres que en aquellas a las cuales se les administraron las larvas encapsuladas (35'7%), además, ninguna de ellas se encontró en la cavidad corporal del animal.

Ars Farmacéutica
2010, volumen 51 nº 3 pp 835-839
doi:10.1111/tmi.12131

ARTÍCULO ORIGINAL

Infección experimental de larvas libres y enquistadas de *Anisakis* tipo I en ratas Wistar

Experimental infection of encapsulated and free larvae of *Anisakis* larvae type I in Wistar rats

Romero MC, Valero A.

Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. avalero@ugr.es

RESUMEN

En este trabajo se realiza un estudio sobre el papel patógeno de las larvas de *Anisakis* encapsuladas en las vísceras del pez y las que se encuentran libres en la cavidad corporal del mismo, mediante la estimación de las lesiones causadas en el tracto digestivo de ratas Wistar. Los resultados muestran que el porcentaje de lesiones fue mayor (92,9%) en las ratas infectadas con larvas libres que en aquellas a las cuales se les administraron las larvas encapsuladas (35,7%), además, ninguna de ellas se encontró en la cavidad corporal del animal.

PALABRAS CLAVE: *Anisakis*, ensayos *in vivo*, larvas encapsuladas, larvas libres, lesiones gastrointestinales

ABSTRACT

In this study we performed a research on the pathogenic role of encapsulated *Anisakis* larvae in the viscera of the fish and free larvae in the body cavity of the fish, through the evaluation of the lesions induced in the digestive tract of Wistar rats. The results show that the percentage of lesions was higher (92.9%) in rats infected with free larvae than in those receiving encapsulated larvae (35.7%), besides, none of the larvae was found in the body cavity of the animals.

KEY WORDS: *Anisakis*, *in vivo* assay, encapsulated larvae, free larvae, digestive tract lesion.

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 835-839.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Anisakis* realizan su ciclo biológico en el medio marino, infectando a mamíferos, crustáceos, cefalópodos y peces. Estos últimos albergan el tercer estado larvario (L3) que llega a ellos al alimentarse de crustáceos o por depredación de otros peces y cefalópodos, de menor tamaño, parasitados con la L3. A las pocas horas, las larvas se encuentran en la cavidad corporal y comienza su encapsulación aunque en algunas especies puede producirse incluso después de los 24 días¹. En los calamares, las larvas se asientan normalmente en la pared externa del estómago, mientras que en los peces estas suelen distribuirse principalmente en el hígado y mesenterio, e incluso en cualquier órgano de la cavidad corporal. También pueden encontrarse larvas en la musculatura, principalmente en los músculos hipoaxiales por ser los primeros con los que se pone en contacto los nematodos en el proceso de migración. Las larvas se enrollan en forma de espiral y van formando la capsula a partir del tejido conectivo del hospedador. La capa interna de la cápsula es fina y rodea cada vuelta de espira del nematodo. En algunas especies de pescado, como la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), muchas larvas se hallan libres en la cavidad corporal. Según algunos autores^{2,3}, cuando se captura el pescado y muere, parece que existe un proceso de desencapsulamiento de las larvas como consecuencia de los cambios *post mortem* que sufre el pescado, ello puede estar influenciado por la localización de las larvas, especies del pez, temperatura de mantenimiento, entre otros factores^{2,3,4,5,6}.

La razón por la que algunas especies de peces presentan abundantes larvas libres en la cavidad corporal no parece estar netamente definida y es objeto de controversia por parte de los investigadores. Desde el punto de vista sanitario es importante conocer los distintos aspectos de las larvas de *Anisakis* relacionados con su poder infectivo. Por ello, en este trabajo se ha planteado como objetivo determinar mediante experimentos *in vivo* si las larvas (L3) encapsuladas y aquellas que se encuentran libres en la cavidad corporal del pescado son igualmente patógenas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Obtención de las larvas de *Anisakis*. Las larvas se aislaron de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*) de procedencia atlántica (península Ibérica), adquiridas en diferentes centros comerciales de Granada. Tras su disección se extrajeron las larvas libres que se encontraban presentes en la cavidad corporal y a continuación las encapsuladas en el paquete visceral que se depositaron en placas de Petri que contenían solución de ClNa al 0,9%.

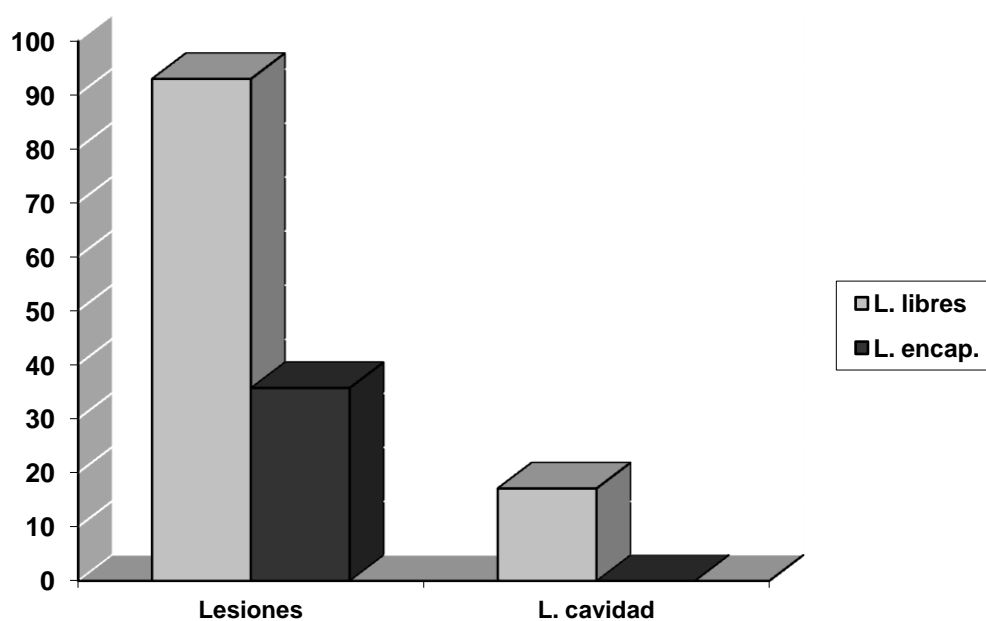
2.-Estudio *in vivo*. El ensayo se ha realizado en dos grupos de 15 ratas Wistar hembras de 120-130 g de peso. A cada animal se le infectó con seis larvas, las cuales se depositaron

directamente en el estómago mediante sonda gástrica, junto con 0,5 ml de solución de ClNa al 0,9%.^{7,8} Los parásitos se administraron al animal conservando intacta su estructura capsular. Las ratas se mantuvieron en ayunas (con agua), en jaulas individuales. A las cuatro horas del inicio de la experiencia se sacrificó el animal y se inició la necropsia reglada⁹, comprobando las lesiones producidas en el tracto digestivo, así como la localización de cada una de ellas.

3.-Identificación de los parásitos. La identificación morfológica de las larvas libres se llevó a cabo al microscopio estereoscópico, después de aislarlas del pescado, previa eliminación de los restos del hospedador y lavados con solución de ClNa al 0,9%. En el caso de las larvas encapsuladas, el estudio de sus caracteres tuvo lugar después del ensayo *in vivo*, una vez extraídas de las ratas. Teniendo en cuenta los criterios aportados por Berland^{10,11}, todas las larvas se identificaron como *Anisakis* tipo I.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos *in vivo* realizados con larvas L3 de *Anisakis* tipo I han mostrado resultados diferentes, así, las ratas infectadas con las larvas que se encontraban libres en el pescado presentaron un porcentaje de lesiones de 92,9%, localizándose un 17,1% de larvas en la cavidad corporal; mientras el grupo de ratas infectadas con las larvas encapsuladas los valores de lesiones obtenidos fue de 35,7% y ningún *Anisakis* se encontró en la cavidad corporal (Gráfica 1).



Gráfica 1. Estudio *in vivo* de larvas de *Anisakis* spp. libres y encapsuladas.

A pesar de las implicaciones sanitarias que conlleva, se conocen pocos trabajos sobre este tema. No obstante, los datos obtenidos en este estudio parecen poner de manifiesto un mayor poder patógeno de las larvas libres que aquellas que se hallan encapsuladas. Teniendo en cuenta que unas y otras tienen la misma morfología, cabe pensar que el grosor de la capsula que rodea a los parásitos le impida, en algunos casos, salir de ella y por tanto queden atrapados. Este hecho, se traduce en una falta de contacto parásito-pared gastrointestinal y en consecuencia en la ausencia de lesiones. Otro aspecto importante es que ninguna de las larvas encapsuladas que produjeron lesiones en las ratas, fueron capaces de atravesar la pared del tracto digestivo, sólo se encontraron fijadas en la pared gástrica y nunca en cavidad. Según Mikhailova et al.¹² y Prusevich¹³, las cápsulas más viejas pueden albergar la larva muerta y con el tiempo llegar a calcificar. Estos mismos autores indican que estas cápsulas son de menor tamaño, sin embargo, las utilizadas en nuestras experiencias no mostraban diferencias ni en el tamaño ni en el color e igualmente, todas las larvas presentaban un alto grado de movilidad.

Trabajo financiado por el proyecto: P07-CVI-03249.

Bibliografía

- 1.-Berland B. (1961). Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarcia*, 2:1-50.
- 2.-Feldman DB, Seely JC. (1988). *Necropsy guide: Rodents and the Rabbit*. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- 3.-Hauck AK. (1977). Occurrence and survival of the larval nematode *Anisakis* sp. in the flesh of flesh, frozen, brined, and smoked pacific herring, *Clupea harengus pallasi*. *J. Parasitol.*, 63: 515:519.
- 4.-Hierro I, Valero A, Navarro MC. (2006). *In vivo* larvicidal activity of monoterpene derivatives from aromatic plants against L₃ larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomed.*, 13: 527–531
- 5.-Huss HH. (1988). Nematodes in herring and herring products. 18th Annual meeting of the Western European fish Technologists Association. Tromsø.
- Smith JW. (1984). The abundance of *Anisakis simplex* L3 in the body-cavity and flesh of marine teleosts. *Int. J. Parasitol.*, 14: 491-495.
- 6.-Mikhailova IG, Prazdnikov EV, Prusevich TO. (1964). Morphological changes in the fish tissue around the larvae of some parasitic worms. *Tru. Murman Biol. Inst.*, 2: 251-264.
- 7.-Petter AJ, Maillard C. (1988). Larves d'ascarides parasites de poissons en Méditerranée occidentale. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat., Paris, 4^e Sér. 10 (sect. A): 347-369.*
- 8.-Prusevich TO. (1964). On the formation of capsules around larvae of *Anisakis* sp. In the tissues of the shorthorn sculpin *Mysocephalus scorpius*. *Tru. Murman Biol. Inst.*, 5: 265-273.
- 9.-Smith JW, Wooten R. (1978). *Anisakis* and anisakiasis. *Adv. Parasitol.*, 16:93-163.

- 10.-Roepstorff A, Karl H, Bloemsma B, Huss H. (1993). Catch handling and possible migration of *Anisakis* larvae in herring (*Clupea harengus*). J. Food Protect., 56: 783-787.
- 11.-Valero A, Hierro I, González P, Montilla P, Navarro MC. (2006). Activity of various essential oils and their main components against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. In: J.N. Govil, V.K. Singh, P. Arunachalam, Editors, *Recent Progress in Medicinal Plants, Drug Development from Molecules* vol. 11, Studium Press, LLC, Houston, pp. 247–265.
- 12.-Wootten R, Smith JW. (1975). Observational an experimental studies on the acquisition of *Anisakis* sp. Larvae (Nemaroda: Ascaridida) by trout in fresh water. Int. J. Parasit., 5: 373-378.

Capítulo IV. Actividad del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* frente a la anisakiasis.

María del Carmen Romero, Adela Valero, Joaquina Martín-Sánchez, María Concepción Navarro-Moll.

Resumen

El aumento de los casos diagnosticados de anisakiasis y la ausencia de tratamientos eficaces, hace necesario la búsqueda de nuevos compuestos activos contra las larvas L₃ de *Anisakis*. La eficacia biocida mostrada por varios aceites esenciales (A.E.) contra diferentes patógenos, nos llevó a estudiar el A.E. de *Matricaria chamomilla* y dos de sus principales componentes (camazuleno y α -bisabolol) contra las larvas L₃ de *Anisakis* tipo I. La actividad del A.E. de *M. chamomilla*, camazuleno y α -bisabolol fue establecido mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. El A.E. a la concentración de 125mg/ml, causó la muerte de todos los nematodos, que mostraron cambios en la cutícula y ruptura de la pared intestinal. En los ensayos *in vivo*, solo el 2'2% \pm 1'8 de las ratas infectadas con el A.E. de *M. chamomilla* mostraron lesiones en la pared gástrica en comparación con el 93'3% \pm 3'9 del control. Camazuleno fue ineficaz mientras que en los ensayos *in vitro* α -bisabolol mostró una mayor actividad larvicida en comparación con el A.E., pero resultó menos activo *in vivo*. Estos hallazgos sugieren que la actividad larvicida puede ser resultado de la acción sinérgica de diferentes compuestos del A.E. de *M. chamomilla*. Ninguno de los productos analizados indujeron daño irritativo en los tejidos intestinales. En conclusión, el A.E. de *M. chamomilla* es un buen candidato para una mayor investigación como agente biocida contra *Anisakis* tipo I.

Phytomedicine
2012, volumen 19 pp 520–523
doi:10.1016/j.phymed.2012.02.005



Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis

Maria del Carmen Romero^a, Adela Valero^a, Joaquina Martín-Sánchez^a, María Concepción Navarro-Moll^{b,*}

^a Department of Parasitology, University of Grenade, Campus de Cartuja, 18071 Grenade, Spain

^b Department of Pharmacology, University of Grenade, Campus de Cartuja, 18071 Grenade, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Anisakis
Anisakiasis
Matricaria
Essential oil
 α -Bisabolol

ABSTRACT

The increase in diagnosed cases of anisakiasis and the virtual absence of effective treatments have prompted the search for new active compounds against *Anisakis* L₃ larvae. The biocidal efficacy against different pathogens shown by various essential oils (EO) led us to study the *Matricaria chamomilla* EO and two of its main components (chamazulene and α -bisabolol) against the L₃ larvae of *Anisakis* type I. The activity of *M. chamomilla* EO, chamazulene and α -bisabolol was established by *in vitro* and *in vivo* experiments. The EO (125 μ g/ml) caused the death of all nematodes, which showed cuticle changes and intestinal wall rupture. In the *in vivo* assays, only 2.2% \pm 1.8 of infected rats treated with *M. chamomilla* EO showed gastric wall lesions in comparison to 93.3% \pm 3.9 of control. Chamazulene was ineffective, while α -bisabolol showed a high activity to that of the EO *in vitro* tests but proved less active *in vivo*. These findings suggest that the larvicidal activity may result from the synergistic action of different compounds of *M. chamomilla* EO. Neither of the tested products induces irritative damage in the intestinal tissues. In conclusion, *M. chamomilla* EO is a good candidate for further investigation as a biocidal agent against *Anisakis* type I.

© 2012 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Anisakiasis is an especially important health problem in countries with high fish consumption, and reported cases have increased exponentially since 1980. Sakanari and McKerrow (1989) gathered the main causes in their review, pointing to the growth in popularity of raw fish dishes such as sushi. More than a thousand cases are reported annually in Japan, representing 95% of cases worldwide Abe et al. (2005). Clinical symptoms and signs develop as a result of the inflammatory reaction caused by penetration of larvae into the digestive tract wall mucosa. *Anisakis* larva also has high allergenic potency and can induce manifestations of hypersensitivity ranging from urticaria or angioedema to anaphylactic shock as well as mixed gastrointestinal and allergic symptoms. Over the past 20 years, the application of molecular techniques has considerably improved our knowledge of the taxonomic position of the species of the *Anisakis* genre Mattiucci et al. (2009) and of diagnostic aspects. However, these advances have not been paralleled by the development of more effective treatments of anisakiasis, prompting the search for new molecules with possible anti-anisakis activity. Our

research work group has established a research line on the action against the L₃ larvae of *A. simplex* exerted by various natural products, especially the essential oils (EO) of different aromatic plants and the main EO components (Hierro et al. 2004, 2006; Valero et al. 2006; Navarro et al. 2008). In this sense, taking into account the biocide activity of *Matricaria chamomilla* EO and its main components against various pathogenic agents (Aggag and Yousef 1972; Franke and Schilcher 2005; McKay and Blumberg 2006; Koch et al. 2008; Morales-Yuste et al. 2010; Tolouee et al. 2010; De Lucca et al. 2011), the objective of the present study was to examine the activity of this EO and two of its main components against L₃ larvae of type I *Anisakis*.

Materials and methods

The essential oil of *M. chamomilla*, collected in the flower period in the locality of Carboneras (Spain) (GDA 25225, Herbarium of Grenade University), was obtained by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus, following the method recommended by the Real Farmacopea Española (2002).

The yield was expressed as the volume of essential oil with respect to the weight of dried plant distilled (% v/w). The isolated oil was dried over anhydrous sodium sulphate and stored at 4 °C.

The composition of EO (essential oil) was analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using a Hewlett-Packard GC/MS 5973/6890 system. DB5 cross-linked 5%-PH-95%

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Grenade, Campus de Cartuja s/n, Grenade, Spain. Tel.: +34 958243890; fax: +34 958248964.

E-mail address: cnavarro@ugr.es (M.C. Navarro-Moll).

ME siloxane (HP-5MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness) and polyethylene glycol (HP-Innowax 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness) fused capillary columns were used, with helium as carrier gas (flow rate = 1.2 ml/min). Oven temperature was kept at 65 °C for 3 min and raised to 210 °C at 3.5 °C/min; then kept at 210 °C for 30 min. Split ratio was adjusted to 1:70. Injector and detector were at 250 °C. Mass spectra were acquired in electron impact mode (70 eV). Components were identified by mass spectral fragmentation, by comparing Kovats-calculated (Dabrio 1973) retention indices with those of known constituents and by using a mass spectral matching library search system (Adams 2001).

In vitro larvicidal activity

Three concentrations of EO and two of its main components [chamazulene (Extrasynthese, >90% chromatographic purity grade) and (–)-α-bisabolol (Sensient Fragrances, 96.2% chromatographic purity grade)] were prepared with 96% ethanol: 12.50 mg/ml; 6.50 mg/ml, or 3.25 mg/ml.

L₃ larvae of *Anisakis* type I were collected by dissecting *Micromesistius poutassou* (blue whiting), selecting only larvae with a length > 2.0 cm. Larvae were axenised in antibiotic solution (Iglesias et al. 1997), introduced into polystyrene plate wells with 2 ml of sterile solution of 0.9% NaCl and 20 μl of each dilution of test compound, and then incubated at 36 °C in 5% CO₂ atmosphere. As controls, larvae were assayed without test compound under identical experimental conditions. The final concentrations of the tested compounds were: 125 μg/ml; 65 μg/ml, and 32.5 μg/ml. Each dilution was tested three times on larvae from fish captured on different days.

Larvae were examined under stereoscopic microscope at 4 h, 8 h, 24 h and 48 h to test the biocidal effect of the compound. Larvae with no mobility at all were considered dead. Mortality of these larvae was verified by absence of infectivity after administration by gastric probe to animals (Wistar rats)

Histological study

Conventional histological methods were used to detect damage in the dead larvae, which were transferred from the wells into tubes with 10% formalin buffer, staining 1 (m thick sections with toluidine blue.

In vivo larvicidal activity

Selection of the dose (46.9 mg) was based on earlier findings by our research group (Hierro et al. 2004, 2006; Valero et al. 2006; Navarro et al. 2008); dilutions were in 0.5 ml olive oil (vehicle). Female Wistar rats weighing around 150 g were infested with six L₃ of *Anisakis* type I by gastric probe. Test compounds were simultaneously administered using the same procedure. Three groups of fifteen rats were used for each product (EO and (–)-α-bisabolol, one of the four stereoisomers of this compound). A control test was performed in three groups of 15 animals, infesting each with six L₃ of *Anisakis* type I in 0.5 ml olive oil but without administering a test product. Regulated necropsy of the rats was performed (Feldman and Seely 1988), recording the locations of the larvae, whether they were alive or dead and the presence of any gastrointestinal lesions.

Measurement of tissue myeloperoxidase (MPO) activity

Because EO tend to irritate the mucosa, we investigated the presence of local inflammatory reaction in the gastrointestinal tract after administration of the test compound (46.9 mg), using the method of Krawisz et al. (1984) to measure the MPO activity (marker of neutrophilic infiltration).

Statistics

For the measurements of *in vitro* and *in vivo* larvicidal activity, the results are presented as mean percentages ± SEM of three independent experiments. In the case of MPO, a logistic regression analysis was used to test for differences between groups. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL) was used for the data analyses.

Results

The EO yield was 0.4%, v/w (mean of four determinations). We detected 130 compounds in *Matricaria chamomilla* EO; the main components were: E-β-farnesene (4.68%), α-bisaboloxide B (8.44%), (–)-α-bisabolol (5.90%), chamazulene (1.85%) and bisaboloxide A (49.02%). Only two of the main components (α-bisabolol and chamazulene) of *M. chamomilla* EO were assayed in the *in vitro* tests, because the other major components of this EO were not available. At 125 μg/ml, the EO was effective *in vitro*

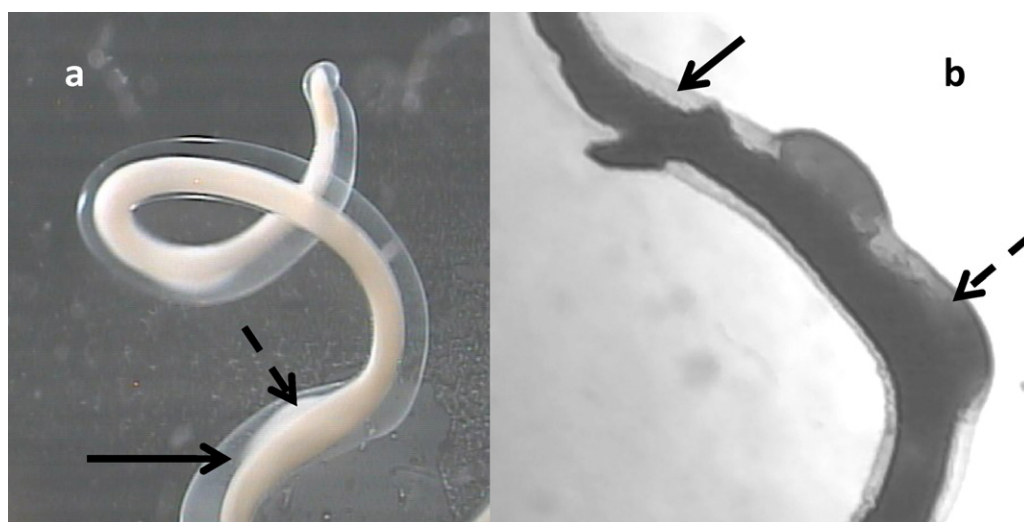


Fig. 1. Stereoscopic microscope images of L₃ larvae of *A. simplex* treated with (a) *Matricaria chamomilla* EO and (b) α-bisabolol. Solid arrows indicate the damage on the cuticle and the broken arrows alterations in the digestive tract of the nematode.

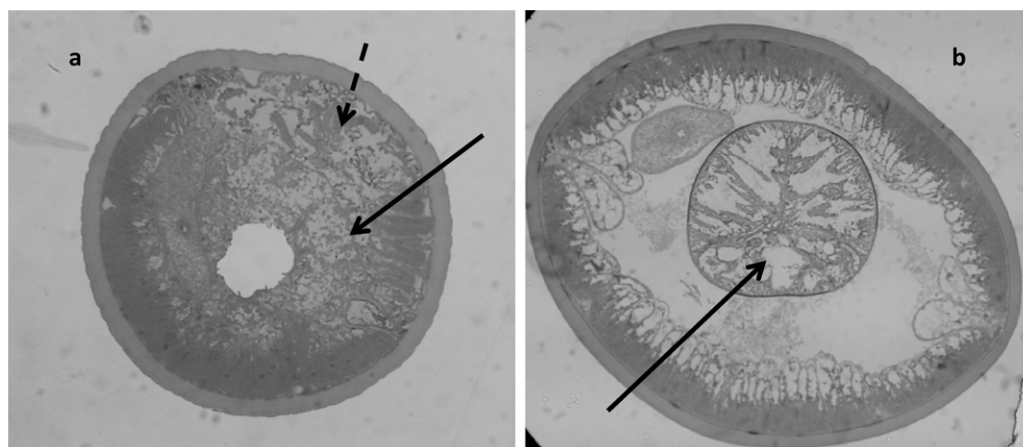


Fig. 2. Histological sections of *L3* larvae of *A. simplex* treated with (a) *Matricaria chamomilla* EO and (b) α -bisabolol. Solid arrows indicate changes in the digestive tract and broken arrows alterations in the muscle cells.

Table 1

Values of MPO in stomach, intestine and cecum in the groups treated with olive oil (control), chamomille EO, and α -bisabolol; mU = milli units of MPO; prot. = protein.

	Stomach MPO (mU/g prot.)	Intestine MPO (mU/g prot.)	Cecum MPO (mU/g prot.)
Control (0.5 ml olive oil)	574.72	4759.92	3088.24
Chamomille EO (46.9 mg/0.5 ml)	1486.80	2397.06	2712.3
	$p < 0.001$	$p = 0.019$	$p = 0.122$
α -Bisabolol (46.9 mg/0.5 ml)	761.52	1243.08	1351.78
	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

against *L3* larvae of *Anisakis* type I, achieving 100% mortality at the first reading (4 h). At the remaining concentrations, *M. chamomilla* EO was completely ineffective against the *Anisakis* type I *L3* larvae. Treatment with α -bisabolol achieved 100% mortality at all concentrations assayed according to the methodology previously described: the larvae recovered showed no infectivity in any of the cases. Chamazulene was ineffective at all concentrations. Changes in the cuticle and digestive tract of *L3* larvae treated with *M. chamomilla* EO or α -bisabolol were observed under stereoscopic microscope (Fig. 1) and confirmed by histological study results; muscle cell alterations were also detected in the *L3* larvae treated with *M. chamomilla* EO (Fig. 2).

Given the absence of effect of chamazulene in studies *in vitro*, only the EO and α -bisabolol were tested *in vivo*. Gastric lesions were observed in $2.2\% \pm 1.8$ of EO-treated animals, $5.5\% \pm 3.2$ of α -bisabolol-treated animals, and $93.3\% \pm 3.9$ of controls. In relation with the larvae isolated from the digestive tract, $23.9\% \pm 5.6$ and $4.4\% \pm 2.2$ were dead in the case of rats treated respectively, with essential oil and α -bisabolol. In the control, all isolated larvae were alive. In any case we have observed significant changes in the MPO values (Table 1).

Discussion

According to Singh et al. (2011), the essential oil obtained by us from the floral chapters of *M. chamomilla* belongs to the chemotype A, in which the bisaboloxide A appears as its main component. We report here, to our best knowledge for the first time, the *in vitro* activity of *M. chamomilla* EO against the *L3* larvae of *Anisakis* type I, which was found to be 100% at $125 \mu\text{g/ml}$. This high mortality rate appears to result from damage caused to the cuticle, muscular cells and digestive apparatus of the parasite (Figs. 1 and 2). We did not perform studies to determine the mechanism underlying the observed action, but authors have emphasized the role of hydrophobia/lipophilia in the biocidal action exerted by terpenic

components of EO. Sikkema et al. (1995) related their effect to their toxic capacity against microorganisms, whose cytoplasmic membrane has low permeability for charged and polar molecules, while apolar compounds (e.g., monoterpenes and sesquiterpenes) can readily penetrate the lipidic bilayer, whose hydrophobic interior is a perfect matrix for lipophilic molecules. Interaction between the EO components and bacterial membranes produces major structural changes, and the accumulation of these compounds in the hydrophobic part of the membranes modifies their permeability, sometimes causing swelling (Sikkema et al. 1995; Carson et al. 2002; Burt 2004). According to Juven et al. (1994) and Sikkema et al. (1995), this interaction has two possible mechanisms of action: by accumulation in the lipidic bilayer, distorting the lipid–protein interaction; or binding the hydrophobic parts of the membrane proteins. All the above will eventually result in cell death.

On the other hand, the biological effects of EO directly depend on their composition. *Matricaria chamomilla* EO includes α -bisabolol and chamazulene, which have both demonstrated biocidal activity (Cwikla et al. 2010). In the present study, chamazulene was not active against *L3* larvae, whereas α -bisabolol caused the death of 100% of the parasites at the three concentrations studied. Under stereoscopic microscope, α -bisabolol-treated larvae showed alterations in cuticle and in digestive apparatus, more marked in the ventricular area, which were not observed after chamazulene treatment. Our findings are consistent with reports on the biocidal activity of α -bisabolol against other pathogen organisms; thus, Brehm-Stecher and Jonson (2003) found that a low concentration (0.5 mM) α -bisabolol modified the permeability of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* membranes. Pauli (2006) reported that α -bisabolol from *M. chamomilla* may inhibit fungal growth via specific inhibition of ergosterol biosynthesis, probably by inhibiting one of the enzymes responsible for the formation of farnesyl pyrophosphate (FPP) precursors (Arruda et al. 2005).

In relation to the *in vivo* activity of *M. chamomilla* EO and α -bisabolol, the results obtained show that only $2.2\% \pm 1.8$ of animals

treated with *M. chamomilla* EO plus L₃ larvae of *Anisakis* type I showed gastric lesions versus 93.3% ± 3.9 of controls treated with larvae alone; although only 23.9% ± 5.6 of larvae were dead, the effect of the EO may be explained not only by a larvicidal effect but also by an EO-induced reduction in the L₃ infective capacity. Although the percentage of animals with lesions was higher (5.5% ± 3.2) with α-bisabolol than with the EO, it was considerably lower in both groups treated than in controls. Furthermore, unlike with the EO, the percentage of dead larvae was only 4.4% ± 2.2, suggesting that the EO produces greater damage to the cuticle, muscular cells and digestive apparatus of the nematode in comparison to α-bisabolol. Based on these findings, we postulate that components other than α-bisabolol are mainly responsible for the biocidal effect observed against L₃ larvae of *Anisakis* type I.

These *in vitro* and *in vivo* data and the very low toxicity of *M. chamomilla* EO (Tisserand and Balacs 1995) support its use in the treatment of anisakiasis. Further research is required to establish the potential benefits of combining *M. chamomilla* EO with other antianisakiasis agents, given the demonstrated synergistic effect of different EO components with various chemotherapeutic agents (Rosato et al. 2007, 2008; Wagner and Ulrich-Merzenich 2009).

Financial support

This survey has been funded by the grant from Junta de Andalucía (Spanish) n° P07-(CVI-03249).

Acknowledgements

The English translation was done by Mr. Richard Davies, MA. The experiments complied with current Spanish legislation.

References

- Abe, N., Ohya, N., Yanagiguchi, R., 2005. Molecular characterization of *Anisakis pegreffii* larvae in Pacific cod in Japan. *J. Helminthol.* 79, 303–306.
- Adams, R.P., 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry. Carol Stream. Allured Publishers Corporation, Illinois, 485.
- Aggag, M.E., Yousef, R.T., 1972. Study of antimicrobial activity of chamomile oil. *Planta Med.* 22, 140–144.
- Arruda, D.C., DiAlexandri, F.L., Katzin, A.M., Uliana, S.R., 2005. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1679–1687.
- Brehm-Stecher, B.F., Jonson, E.A., 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3357–3360.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1914–1920.
- Cwikla, C., Schmidt, K., Matthias, A., Bone, K.M., Lehmann, R., Tiralongo, E., 2010. Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytother. Res.* 24, 649–656.
- Dabrio, V., 1973. Análisis cualitativo: índices de retención. In: *Cromatografía de gases II*, Ed. Alhambra, Madrid, pp. 8–13.
- De Lucca, A.J., Pauli, A., Schilcher, H., Sien, T., Bhatnagar, D., Walsh, T.J., 2011. Fungicidal and bactericidal properties of Bisabolol and Dragasantol. *J. Essent. Oil Res.* 23, 47–54.
- Feldman, D.B., Seely, J.C., 1988. *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 23–76.
- Franke, R., Schilcher, H., 2005. Chamomille Industrial Profiles. Chapter 4: Active Chemical Constituents of *Matricaria chamomilla* L. syn. *Chamomilla recutita* (L.) Ruschert, vol. 99. CRC-Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, pp. 55–76.
- Hierro, I., Valero, A., Pérez, P., González, P., Cabo, M.M., Montilla, M.P., Navarro, M.C., 2004. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L₃ larvae. *Phytomedicine* 11, 77–82.
- Hierro, I., Valero, A., Navarro, M.C., 2006. *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L₃ larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomedicine* 13, 527–531.
- Iglesias, L., Valero, A., Adroher, F.J., 1997. Some factors which influence the *in vitro* maintenance of *Anisakis simplex* (Nematoda). *Folia Parasitol.* 44, 297–301.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 626–631.
- Koch, C., Reichling, J., Schneele, J., Schnitzler, P., 2008. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine* 15, 71–78.
- Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F., 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterologia* 87, 1344–1350.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Webb, S.C., 2009. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Syst. Parasitol.* 74, 199–217.
- McKay, D.L., Blumberg, J.B., 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother. Res.* 20, 519–530.
- Morales-Yuste, M., Morillas-Márquez, F., Martín-Sánchez, J., Valero-López, A., Navarro-Moll MC, 2010. Activity of (–)alpha-bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. *Phytomedicine* 17, 279–281.
- Navarro, M.C., Noguera, M.A., Romero, M.C., Montilla, M.P., González de Selgas, J.M., Valero, A., 2008. *Anisakis simplex* s.l.: larvicidal activity of various monoterpenic derivatives of natural origin against L₃ larvae *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Parasitol.* 120, 295–299.
- Pauli, A., 2006. α-Bisabolol from chamomile – a specific ergosterol biosynthesis inhibitor? *Int. J. Aromather.* 16, 21–25.
2002. *Real Farmacopea Española*, 2^a ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, p. 197.
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Ármense, D., Antonietta Milillo, M., 2007. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine* 14, 727–732.
- Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., Mallamaci, R., 2008. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 15, 635–638.
- Sakanari, J.M., McKerrow, J.H., 1989. Anisakiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 278–284.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59, 201–222.
- Singh, O., Khanam, Z., Misra, N., Srivastava, M.K., 2011. Chamomille (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. *Pharmacogn. Rev.* 5, 82–95.
- Tisserand, R., Balacs, T., 1995. *Essential Oil Safety. A Guide for Health Care Professionals*. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 204.
- Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S.J., Jaimand, K., Taeb, J., Rezaee, M.B., Kawachi, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M., 2010. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 127–133.
- Valero, A., Hierro, I., González, P., Montilla, P., Navarro, M.C., 2006. Activity of various essential oils and their main components against L₃ larvae of *Anisakis simplex* s.l. In: Govil, J.N., Singh, V.K., Arunachalam, P. (Eds.), *Recent Progress in Medicinal Plants. Drug Development from Molecules*, vol. 11. Studium Press, LLC, Houston, pp. 247–265.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97–110.

Capítulo V. Menta (*Mentha piperita*) y albendazol frente a la anisakiasis en un modelo animal.

María del Carmen Romero, María Concepción Navarro-Moll, Joaquina Martín-Sánchez, Adela Valero.

Resumen

Objetivos: La terapia frente a la anisakiasis requiere técnicas invasivas para extraer las L₃, lo que hace patente la necesidad de buscar un fármaco eficaz frente a este nematodo. El objetivo del presente trabajo es comprobar la eficacia del aceite esencial de menta y sus principales componente frente al parásito y compararlos con albendazol, uno de los fármacos más prescritos frente *Anisakis*.

Metodología: Para ello se han realizado ensayos *in vitro* y un modelo experimental con ratas wistar que simula la infección humana. Se ha utilizado la técnica de PCR-RFLP para identificar *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* y determinar la posible existencia de diferencias en su patogenicidad y susceptibilidad al tratamiento.

Resultados: Tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*, el aceite esencial de menta, mentol, mentona y acetato de mentona, mostraron una mayor actividad larvicida que albendazol. El 46'7% de las ratas tratadas con albendazol presentaron grandes lesiones en estómago, mientras que las tratadas el aceite esencial de menta y sus componentes mentol, mentona y acetato de mentilo, no mostraron lesiones en el tracto gastrointestinal.

Conclusiones: Nuestros resultados indican que el tratamiento con el aceite esencial de menta o sus componentes es más eficaz que albendazol. *A. simplex* s.s. fue el responsable principal de las lesiones.

Artículo enviado a Phytomedicine

Peppermint (*Mentha piperita*) and albendazole against Anisakiasis in an animal model

M^a Carmen Romero^a, M^a Concepción Navarro^b, Joaquina Martín-Sánchez, Adela Valero^a

Department of Parasitology, University of Granada, Spain^a, and Department of Pharmacology, University of Granada, Spain^b

Abstract

Therapy against anisakiasis requires invasive techniques to extract L₃, and an effective drug against this nematode is needed. The aim of this study was to determine the efficacy of peppermint essential oil (EO) and its main components against the parasite in comparison to albendazole, a drug currently prescribed to treat *Anisakis*.

We conducted *in vitro* experiments and studied an experimental model simulating the human infection in Wistar rats. We used polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism to identify *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* and determine any differences in their pathogenicity and susceptibility to the treatments.

The *in vitro* and *in vivo* experiments both evidenced that the larvicidal activity of peppermint EO, menthol, menthone, and menthyl acetate is higher than that of albendazole. Large stomach lesions were observed in 46.7% of the albendazole-treated rats, whereas no gastrointestinal lesions were detected in those treated with peppermint EO, menthol, menthyl acetate, or menthone.

Conclusions: In this animal model, treatment with peppermint EO or its main components was more effective than was treatment with albendazole. Lesions were more frequently produced by *A. simplex* s.s. larvae than by *A. pegreffii* larvae.

Keywords: Albendazole, Peppermint Essential Oil, Menthol, Menthone, Menthyl acetate, Anisakiasis.

1. Introduction

Anisakiasis is a parasitosis that can affect humans through the intake of fish infected with *Anisakis* larvae. Although this disease is mainly associated with Eastern cultures, cases have been reported in numerous countries, mainly caused by *Anisakis* type I (Valero et al., 1992; Umehara et al., 2007; Fumarola et al., 2009; Mattiucci et al., 2011). The diversity and abundance of hosts means that the third larval stage (L₃) of the *Anisakis* genus has a cosmopolitan distribution and parasitizes numerous fish and cephalopods consumed by humans (Pereira-Bueno, 1992; Koie, 1993). Accidental intake of the parasite produces important gastrointestinal symptoms and allergic reactions in humans (Del Pozo et al., 1997; Daschner et al., 2000). The main technique currently employed is fiberoptic, which permits visualizing and extracting the parasite from the lesioned area (Bucci et al., 2013; Castán et al., 2002). Surgery by laparotomy and resection of the affected area is indicated when the larva settles in locations inaccessible to the fiberoptic and symptoms do not ease or become worse, producing perforation, peritonitis, or occlusions (Del Rey, 2003). Various drugs

have been tested against *Anisakis* spp. (antibiotics, antihistaminics, anticholinergics, and/or corticosteroids), but none have proven effective (Oshima, 1972; Cocheton et al., 1991; Domínguez-Ortega and Martín-Cócera, 2000). Numerous authors have proposed that surgery might be avoided by treatment with anthelmintics (Bucci et al., 2013; De vera et al., 2002; Kim et al., 2006; Moore et al., 2002; Pacios et al., 2005; Filauro et al., 2011). These include albendazole, a benzimidazole derivative used to treat intestinal parasites, which appears to exert a certain activity against *Anisakis* (Moore et al., 2002; Dziekoeska-Rynkoet al., 2002; Arias-Díaz et al., 2006). Researchers have tested the action of various natural substances against *Anisakis* larvae *in vitro* and *in vivo* (Hierro et al., 2004; Lin et al., 2010; Navarro-Moll et al., 2011; Romero et al., 2012).

The objective of the present study was to analyze the effectiveness of peppermint essential oil (EO) (*Mentha piperita*) and its components against *Anisakis* type I in *in vitro* and *in vivo* assays, using albendazole as reference drug. A further aim was to identify the larvae used in the *in*

vivo study by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in order to determine any relationship between the larvicidal activity of the compounds and the parasite species.

2. Materials and methods

2.1. Parasite

We selected L₃ larvae of *Anisakis* type I sized ≥ 2 cm with high mobility in blue whiting specimens (*Micromesistius poutassou*) from Galicia (Spain) and Portugal. Morphological identification followed the criteria of Berland (1961) and Petter and Maillard (1988).

2.2. *Mentha piperita* EO

M. piperita EO was obtained by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus, following the method recommended by the *Real Farmacopea Española* (2005). The composition of the EO was analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using a Hewlett-Packard GC/MS 5973/6890 system. Polyethylene glycol (HP-Innowax 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m film thickness) fused capillary columns were used, with helium as carrier gas (flow rate = 1.2 ml/min). Oven temperature was kept at 65° C for 3 min, raised to 210° C at 3.5° C/min, then kept at 210° C for 30 min. The split ratio was adjusted to 1:70. Injector and detector were at 250° C. Mass spectra were acquired in electron impact mode (70 eV). Components were identified by mass spectral fragmentation using a mass spectral matching library search system (Adams, 2001).

2.3. *In vitro* larvicidal activity

Six concentrations of the EO and of three of its main components [(menthyl acetate, 94% chromatographic purity grade); menthone, and menthol (Sensient Fragrances, 93% and 95% chromatographic purity grade, respectively)] were prepared with 96% ethanol: 25.0, 18.75, 15.6, 12.50, 6.25 and 3.12 mg/ml. Two concentrations of albendazole were used, 0.5 and 1 mg/ml, in 0.9% NaCl sterile solution (Albendex 2%, S.P. veterinary, S.A.). Albendex ® consists in a suspension of albendazole (2%) in purified water.

After axenizing 12 L₃ specimens were individually placed in polystyrene plates with 2.0 ml sterile 0.9% NaCl solution and 20 μ l of the test product, followed by incubation at 36° C in 5% CO₂ atmosphere; the final concentrations of each natural compound were 250, 187.5, 125, 62.5 and 31.25 μ g/ml. Two controls were used (0.9% NaCl solution, control 1; and 1% ethanol, control 2). Larvae were examined under stereoscopic microscope at 4 h, 8 h, 24 h and 48 h to test the biocidal effect of the compound. Larvae with no mobility or rupture of ventriculus and alteration of the nematode cuticle, at all were considered dead. Experiments were conducted in quintuplicate on different days in order to rule out other causes of parasite death.

2.4. *In vivo* assays

For each compound, we infected 15 female Wistar rats (\pm 150 g body weight) by using a gastric probe with six L₃ specimens and the test product. The dose was 46.9 mg dissolved in 0.5 ml olive oil (vehicle) for the natural compounds, and 5.4 mg/150 g body weight for albendazole (adaptation of dose used in humans by Ruckebusch (Ruckebusch, 1977)). After necropsy at 4 h post-infestation, data were gathered on the larva localization, number of alive and dead larvae and the presence of gastrointestinal lesions. A parallel control test was also performed, administering six L₃ larvae in 0.5 ml olive oil to each control animal (n = 15). Recovered larvae were washed in 0.9% saline solution and incubated in polystyrene plates with 2 ml saline solution following the *in vitro* test methodology. We recorded the number of surviving parasites, which were then individually stored at -20° C until genetic analysis.

All experiments were carried out in accordance with European Parliament and of the Council of 22 September 2010 (2010/63/UE and RD 1201/2005).

2.5. Measurement of tissue myeloperoxidase (MPO) activity

In order to test whether the products cause mucosa irritation, we investigated the presence of local inflammatory reaction in the gastrointestinal tract after administering the test compound, measuring MPO activity (neutrophil infiltration marker) (Krawisz et al., 1984).

2.6. DNA extraction and PCR-RFLP

After the *in vivo* study, we identified the species of 50% of the larvae recovered at each site (stomach, intestine, and/or cecum) by means of PCR-RFLP, extracting genomic DNA with the Real Pure kit (Ref RBMEG01). PCR amplification of rDNA fragment ITS1-5.8S-ITS2 used NC5 (Forward), 5' GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT 3' and NC2 (Reverse), 5' TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT 3' (Zhu et al., 1998), followed by digestion with 10 U/ μ l restriction enzymes Hinf I (Bioron international) and Taq I (Bioron international). The digestion product was subjected to 3% agarose gel electrophoresis for species identification according to the band pattern (D'Amelio et al., 2000; Martín-Sánchez et al., 2005). We identified all larvae that produced lesions in the abdominal cavity or were attached to the gastrointestinal tract.

2.7. Statistical analysis

The *in vivo* effectiveness of the different test compounds was analyzed by using a non-parametric ANOVA, comparing: the number of lesions found in each treatment group, the number of larvae killed by each product, the number surviving after the *in vivo* test and the parasite species involved. SPSS 15.0 (IBM, Chicago, IL) was used for data analyses, and $p \leq 0.05$ was considered significant.

3. Results

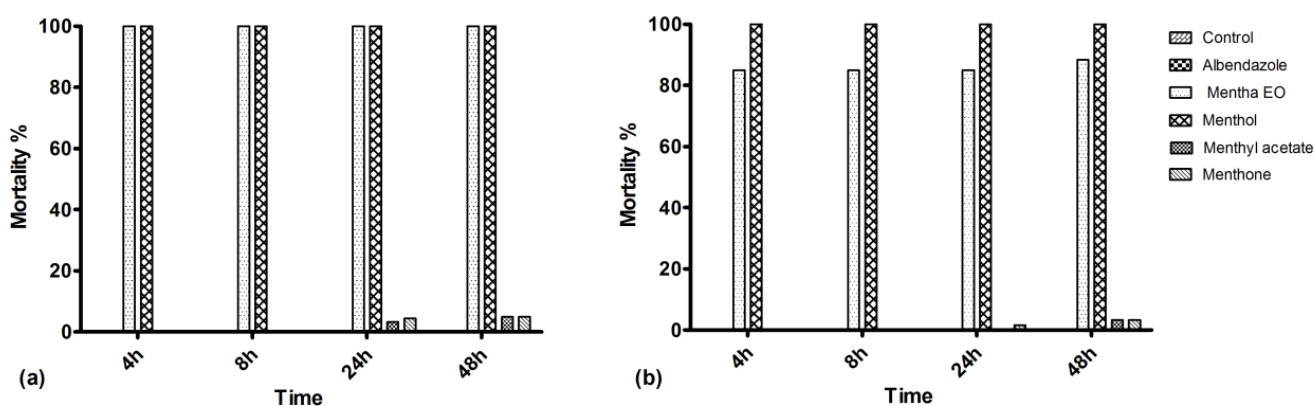


Figure 1. *In vitro* activity of albendazole (1 mg/ml), peppermint EO, menthol, menthone and menthyl acetate [(a) 250 μ g/ml and (b) 187.5 μ g/ml] against *Anisakis* type I versus controls. The activity is expressed as the mortality.

3.1. Essential Oil

The EO yield was 1.9% v/w (mean of three determinations). The components of *Mentha piperita* EO were menthyl acetate (68.1%), menthone (23.1%), and menthol (< 1%).

3.2. In vitro tests

Mentha piperita EO was effective *in vitro* at 250 μ g/ml, producing the death of 100% of L₃ of *Anisakis* type I by the first reading (4 h). The mortality at 187.5 μ g/ml seem to be above 83% at as early as 48 h. The remaining concentrations were not effective against the larvae. At 4 h, menthol obtained 100% mortality at the two highest concentrations, decreasing to 61.7% mortality at 125 μ g/ml. Menthyl acetate and menthone showed very low activity against *Anisakis*, and the mortality at 48 h was below 6% with the highest concentrations (250 μ g/ml and 187.5 μ g/ml) (Fig. 1). Under stereoscopic microscope, all L₃ larvae showed cuticle and digestive tract alterations that were more marked in the larvae treated with the natural products and clearly affected the ventricle (Fig. 2). Albendazole showed no larvicidal activity at the concentrations studied and produced no visible alterations in larvae until after 15 days.

3.3. *In vivo* tests

The experimental animals treated with EO or its components showed no gastric lesions.

Almost half of the animals treated with albendazole (46.7%) evidenced lesions in stomach and intestine with haemorrhagic areas between 2 and 21 mm² (Fig. 3). These lesions were localized in the greater curvature of the gastric body and pyloric antrum (85.7%) or in the small intestine (14.3%). Larvae were most frequently detected in the stomach in all cases (Table 1). Live larvae recovered from the *in vivo* study were kept in sterile saline solution at 36° C. The viability of the larvae that had been in contact with the natural products was reduced at 4 h after extraction from the rats, whereas those in contact with albendazole remained alive for more than 15 days.

In the control rats, 93.3% had lesions in the stomach ranging from <1 to 24 mm² in size; 16.7% of the parasites were localized in the abdominal cavity, and 15.5% were attached to the stomach or intestine wall. The thorough examination of all animals permitted the localization of 100% of larvae used in the experimental infection (Fig. 3).

In our opinion, the pathogenic effects of the larvae derive from their capacity to produce lesions, attaching to the gastric or intestinal wall of the animal, or penetrating into the abdominal cavity. The pathogenicity of *Anisakis* L₃ was only observed in the control and albendazole-treated rats. Thus, EO, menthol, menthyl acetate, and menthone were significantly more effective in reducing the pathogenic capacity of the larvae in comparison to the control ($p < 0.001$ in all cases) and albendazole ($p < 0.01$) treatments. The number of dead larvae found and the shorter survival of the live L₃ recovered after the *in vivo* study, confirm the higher larvicidal activity of the natural products in comparison to albendazole ($p < 0.01$) and olive oil vehicle alone ($p < 0.01$). A smaller number of lesions was observed in the albendazole-treated group than in the controls ($p < 0.01$), but these groups did not differ in the survival time of the larvae after the *in vivo* experiments (Fig. 3).

According to the MPO values, none of the tested products showed significant change. These results lead us to consider that no irritative damage occur in stomach, small intestine or cecum (Table 2).

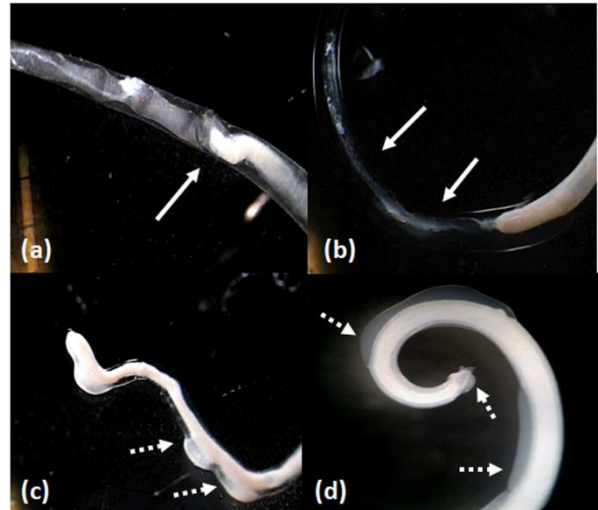


Figure 2. Alterations in the ventricle of the larvae due to the action of peppermint EO (a) and menthol (b). Damage in the cuticle produced by these natural products (c and d).

3.4. PCR-RFLP

According to the genetic markers (DÁmelio et al., 2000; Martín-Sánchez et al., 2005), 54.2% (104/192) of the L₃ larvae were *A. simplex* s.s., and 29.2% (56/192) were *A. pegreffii*. Out of the L₃ larvae studied, 14.1% (27/192) showed a hybrid PCR-RFLP band pattern (sum of patterns for the two species with both Hinf I and Taq I). This hybrid genotype was observed with only one enzyme in 2.6% (5/192) of specimens, and the pattern with the other was indistinguishable from *A. pegreffii*. Lesions were more frequently produced by *A. simplex* s.s. (80%) than by *A. pegreffii* (2.5%).

4. Discussion

Anisakis represents a public health problem due to the widespread distribution, prevalence and degree of parasitization in habitually consumed fish (Lin et al., 2010). When humans become infected, the larva can penetrate the gastric and intestinal mucosa, producing digestive alterations and allergic reactions. Human anisakiasis usually evolves favorably in a spontaneous manner, but major damage requiring surgery can be produced in the most severe cases, including obstruction, perforation, and peritonitis (Oshima et al., 1972). An effective drug against this parasite could shorten the clinical course of anisakiasis and

prevent the complications of endoscopic and surgical procedures (Lin et al., 2010).

Various drugs have been used against this disease with no clear results. Single albendazole doses have shown to be effective for the treatment of *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* and *Trichuris trichiura*³⁶, explaining its frequent use to combat human anisakiasis (Kim et al., 2006; Moore et al., 2002; Pacios et al., 2005; Filauro et al., 2011; Pontone et al., 2012).

At the concentrations studied, albendazole was ineffective *in vitro* against *Anisakis* and produced no damage to the parasites until after 15 days. Peppermint EO and menthol both showed 100% effectiveness at the highest concentration at 4 h, whereas menthyl acetate and menthone displayed a more modest larvicidal effect at 24 h. The high mortality obtained with peppermint EO and menthol can be attributed to damage caused to the cuticle and digestive apparatus of the parasite (Fig. 2). In the *in vivo* tests, albendazole reduced the percentage of lesions produced by the larvae (46.7%; $p=0.002$) versus controls (93.3%) but showed no larvicidal activity, and the recovered larvae remained mobile for more than 48 h. These results can be explained by the low solubility of albendazole at acid pH (Flórez et al., 2003), which would reduce its capacity to inhibit glucose absorption through the cuticle of the parasite (Dziekoeska-Rynko et al., 2002; Arias-Díaz et al., 2006). The effectiveness of different EOs and their components against *Anisakis* has been demonstrated in various studies, which have reported elevated post-treatment parasite mortality (Hierro et al., 2004; Lin et al., 2010; Navarro-Moll et al., 2011; Romero et al., 2012; Kasuya et al., 1990). In addition, peppermint EO and its main components have demonstrated activity against various pathogenic agents (Inouye et al., 2001) and parasites, including *Echinococcus granulosus*, *Strongyloides venezuelensis* and *Giardia lamblia* (Vidal et al., 2007; Machado et al., 2010; Carvalho et al., 2012; Maggiore et al., 2012). In the present study, no lesions were detected in the gastrointestinal tract and no larvae were attached to the digestive tract of infested rats treated with EO, menthol, menthyl acetate, or menthone, indicating that the pathogenic capacity of the larvae is significantly reduced by these products in comparison to albendazole ($p<0.01$) and control ($p<0.001$) treatments. The fact that menthyl acetate and menthone were active in the *in vivo* tests but not in

the *in vitro* tests can be attributed to the presence of gastric pH (2.5), which produces hydrolysis of menthyl acetate, giving rise to menthol, and which can reduce ketone group in menthone, with the consequent formation of menthol.

In the *in vivo* study, larvicidal activity was higher for EO (47.7%) than for menthol (12.2%), menthyl acetate (15.1%), or menthone (21.5%) (Fig.3). Hence, the larvicidal activity of peppermint EO is attributable to a synergic effect of its different components.

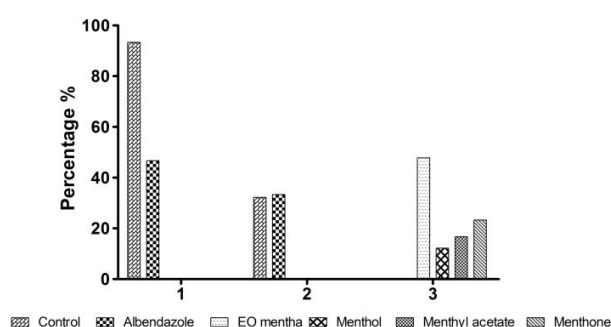


Figure 3. The vertical axis represents the percentage of 1. Lesions in rats, 2. L₃ findings in cavity and attached in stomach, 3. L₃ dead, after the different treatments in the *in vivo* study.

A further issue of interest is the capacity of the larvae to penetrate the fish musculature. In this regard, some authors (Suzuki et al., 2010; Quiazón et al., 2011; Romero et al., 2013) reported a higher tendency to migrate towards the muscle for *A. simplex* s.s. than for *A. pegreffii*, and this may also be the case for their ability to penetrate the tissue of accidental hosts, such as humans, thereby influencing their infective power. The PCR-RFLP results in the present study showed that damage to the digestive system was more frequently produced by *A. simplex* s.s. than by *A. pegreffii* ($p=0.011$), in agreement with the results obtained by other authors (Suzuki et al., 2010; Quiazón et al., 2011).

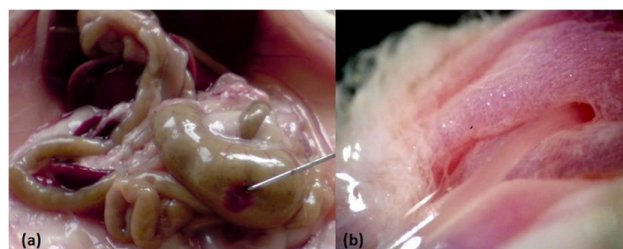


Figure 4. (a) Lesion found in stomach of control rat caused by *Anisakis* type I. (b) Larvae attached to the stomach wall.

The MPO values observed in the stomach, small intestine, and cecum show that peppermint EO and the other natural products tested do not induce irritative damage in these tissues, despite the irritative effect that to a greater or lesser extent have the essential oils. This lack of irritative effect on the intestinal mucous membrane can be explained by the high dilution of peppermint essential oil and its main components administered in the *in vivo* tests. In the case of albendazole, the MPO values obtained show no significant differences with controls.

Acknowledgements:

We are grateful to the Junta de Andalucía (Regional Autonomous Government of Andalusia) (P07-CVI-03249).

	STOMACH MPO (mU/g prot.)	INTESTINE MPO (mU/g prot.)	CECUM MPO (mU/g prot.)
CONTROL (0.5 ml olive oil)	5742.72	4759.92	3088.24
PEPPERMINT EO (46.9 mg/0.5 mL)	1486.80 p<0.001	2397.06 p<0.001	2712.93 p=0.122
MENTHOL (46.9 mg/0.5 mL)	1507.35 p<0.001	2481.35 p<0.001	2534.34 p=0.016
MENTHYL ACETATE (46.9 mg/0.5 mL)	3252.1 p< 0.001	4070.4 p= 0.040	2611.9 p= 0.176
MENTHONE (46.9 mg/0.5 mL)	1629.1 p< 0.001	3949.4 p= 0.027	2461.3 p= 0.058
ALBENDAZOLE (20 mg/ml)	5959.7 p= 0.741	3032.2 p= 0.426	2888.6 p= 0.510

Table 2. MPO values in stomach, intestine, and cecum in the groups treated with olive oil (control), peppermint EO, menthol, menthyl acetate, menthone, or albendazole; mU = milli units of MPO; prot. = protein.

		Localization				
	Product	Cavity	Attached	Stomach lumen	Intestinal lumen	Unrecovered
Live	Control	16.7% (15/90L3)	15.5% (14/90L3)	48.9% (44/90L3)	18.9% (17/90L3)	-
	Albendazole	5.5% (5/90L3)	27.8% (25/90L3)	14.4% (13/90L3)	52.3% (47/90L3)	-
	<i>EO Mentha</i>	-	-	50% (45/90L3)	2.2% (2/90L3)	-
	<i>Menthol</i>	-	-	84.4% (76/90L3)	2.2% (2/90L3)	1.1% (1/90L3)
	<i>Menthyl acetate</i>	-	-	53.3% (48/90L3)	30% (27/90L3)	-
	<i>Menthone</i>	1.1% (1/90L3)	-	60% (54/90L3)	15.6% (14/90L3)	-
Dead	Control	-	-	-	-	-
	Albendazole	-	-	-	-	-
	<i>EO Mentha</i>	-	-	47.8% (43/90L3)	-	-
	<i>Menthol</i>	-	-	12.2% (11/90L3)	-	-
	<i>Menthyl acetate</i>	-	-	16.7% (15/90L3)	-	-
	<i>Menthone</i>	-	-	23.3% (21/90L3)	-	-

Table 1. Distribution of the L3 of *Anisakis* recovered after the *in vivo* study for each compound studied.

References:

- Adams, R.P., 2001. *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectrometry*. Illinois: Carol Stream, Allured Publishers Corporation.
- Arias-Díaz, J., Zuloaga, J., Varab, E., Balibrea, J., Balibrea, J.L., 2006. Efficacy of albendazole against *Anisakis simplex* larvae *in vitro*. *Dig. Liver Dis.* 38, 24-26.
- Berland, B., 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*. 2, 1-50.
- Bucci, C., Gallotta, S., Morra, I., Fortunato, A., Ciacci, C., Iovino, P., 2013. *Anisakis*, just think about it an emergency!. *Int. J. Infect. Dis.* 17, e1071-2.

- Carvalho, C.O., Chagas, A.C., Cotinguiba, F., Furlan, M., Brito, L.G., Chaves, F.C., Stephan, M.P., Bizzo, H.R., Amarante, A.F. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Vet. Parasitol.* 183, 260-268.
- Castán, B., Borda, F., Iñarrairaegui, M., Pastor, G., Vila, J., Zozaya, J.M., 2002. Anisakiasis digestiva: clínica y diagnóstico según localización. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 94: 463-467.
- Cocheton, J.J., Cabou, I., Lecomte, I., 1991. Anisakiase et infections par les anisakidés. *Ann. Méd. Interne.* 142, 121-130.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., 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 polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Parasitol.* 30: 223-226.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Cabañas, R., Suarez-de-Parga, J.M., López-Serrano, M.C., 2000. Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease. Clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 176-181.
- De Vera, F., Carnicer, F., Morales, C., Niveiro, M., 2002. Ileitis with recurrent ascites. *Rev. Clin. Esp.* 202, 37-38.
- Del Pozo, M.D., Audicana, M., Diez, J.M., Muñoz, D., Ansotegui, I.J., Fernández, E., Etxenaquisia, M., Moneo, I., Fernández de Corres, L., 1997. *Anisakis simplex*, a relevant etiologic factor in acute urticaria. *Allergy* 52, 576-579.
- Del Rey, A., 2003. *Estudio parasitológico, epidemiológico y clínico de la anisakidosis en la comarca de Antequera*. Universidad de Granada: Tesis Doctoral.
- Domínguez-Ortega, J., Martínez-Cócerca, C., 2000. Guía de actuación en patología producida por *Anisakis*. *Alergol. Immunol. Clín.* 15, 267-272.
- Dziekoeska-Rynko, J., Rokicki, J., Jabàonowski, Z., 2002. Effects of 3rd stage *Anisakis simplex* larvae on digestive tract protease activity of guinea pigs 24 and 48 hours after infection. *Helminthologia* 41, 21-24.
- Filauro, M., Rollandi, G.A., Cassola, G., Quilici, G.P., Angelini, G., Belli, F., Boccardo, C., 2011. Gastrointestinal bleeding due to suspected anisakiasis: challenging differential diagnosis for a rare disease. *Updates Surg.* 63, 213-217.
- Flórez J., 2003. Fármacos antiparasitarios: protozoos y helmintos. In: Flórez, J. (Ed.), *Farmacología humana*. Masson, Barcelona, pp. 1361-1390.
- Fumarola, L., Monno, R., Lerardi, E., Rizzo, G., Giannelli, G., Lalle, M., Pozio, E., 2009. *Anisakis pegreffii* etiological agent of gastric infections in two Italian women. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1157-1159.
- Hierro, I., Valero, A., Pérez, P., González, P., Cabo, M.M., Montilla, M.P., Navarro, M.P., 2004. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine* 11, 77-82.
- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 565-573.
- Kasuya, S., Goto, C., Koga, K., Ohtomo, H., Kagei, N., Honda, G., 1990. Lethal efficacy of leaf extract from *Perilla frutescens* (traditional Chinese medicine) or perillaldehyde on *Anisakis* larvae *in vitro*. *Jpn. J. Parasitol.* 39, 220-225.
- Kim, S.G., Jo, Y.J., Park, Y.S., Kim, S.H., Song, M.H., Lee, H.H., Kim, J.S., Ryou, J.W., Joo, J.E., Kim, D.H., 2006. Four cases of gastric submucosal mass suspected as anisakiasis. *Korean J. Parasitol.* 44, 81-86.
- Koie, M., 1993. Nematode parasites in teleosts from 0 to 1540 M depth off the Faroe Islands (The North Atlantic). *Ophelia* 38, 217-243.
- Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F.. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87, 1344-1350.

- Lin, R.J., Chen, C.Y., Lee, J.D., Lu, C.M., Chung, L.Y., Yen, C.M., 2010. Larvicidal constituents of *Zingiber officinale* (ginger) against *Anisakis simplex*. *Planta Med.* 76: 1852-1858.
- Machado, M., Sousa Mdo, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., 2010. Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Nat. Prod. Commun.* 5, 137-141.
- Maggiore, M.A., Albanese, A.A., Gende, L.B., Eguaras, M.J., Denegri, G.M., Elisondo, M.C., 2012. Anthelmintic effect of *Mentha* spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. *Parasitol. Res.* 110: 1103-1112.
- Martín-Sánchez, J., Artacho-Reinoso, M.E., Díaz-Gavilán, M., 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. *Mol. Biochem. Parasitol.* 141, 155-162.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Borriani, F., Palumbo, M., Palmieri, R.M., Gomes, V., Casati A., Nascetti, G., 2011. First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infect. Di.* 11, 82.
- Moore, D., Girdwood, R., Chiodini, P., 2006. Treatment of anisakiasis with albendazole. *The Lancet* 360, 54.
- Navarro-Moll, M.C., Romero, M.C., Montilla, M.P., Valero, A., 2011. *In vitro* and *in vivo* activity of three sesquiterpenes against L3 larvae of *Anisakis* type I. *Exp. Parasitol.* 127, 405-408.
- Oshima, T., 1972. *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. In: Morishita, K., Komiya, Y., Matsubayashi, H. (Eds.), *Progress of Medical Parasitology in Japan IV*. Meguro Parasitological Museum, Tokio, pp. 301-393.
- Pacios, E., Arias-Díaz, J., Zuloaga, J., González-Armengol, J., Villarroel, P., Balibrea, J.L., 2005. Albendazole for the treatment of anisakiasis ileus. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1825-1826.
- Pereira-Bueno, J., 1992. *Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiasis*. Valladolid: Consejería de Sanidad.
- Petter, A.J., Maillard, C., 1988. Larves d'ascarides parasites de poissons en Méditerranée occidentale. *Bull. Mus. Hist. Nat.* 10, 347-369.
- Pontone, S., Leonetti, G., Guaitoli, E., Mocini, R., Manfredelli, S., Catania, A., Pontone, P., Sorrenti, S., 2012. Should the host reaction to anisakiasis influence the treatment? different clinical presentations in two cases. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 104: 607-610.
- Quiazon, K.M., Yoshinaga, T., Ogawa, K., 2011. Experimental challenge of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitol. Int.* 60, 126-131.
- Real Farmacopea Española, 2002. 2a ed. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Romero, M.C., Valero, A., Martín-Sánchez, J., Navarro-Moll, M.C., 2012. Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. *Phytomedicine* 19, 520-523.
- Romero, M.C., Valero, A., Navarro-Moll, M.C., Martín-Sánchez, J., 2013. Experimental comparison of pathogenic potential of two sibling species *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* in Wistar rat. *Trop. Med. Int. Health* 8, 979-984.
- Ruckebusch, Y., 1977. *Données numériques et miscellanées. Physiologie pharmacologie thérapeutique animales*. Maloine S.M., París.
- Suzuki, J., Murata, R., Hosaka, M., Araki, J., 2010. Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 88-93.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A., 2007. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol. Int.* 56, 211-215.
- Valero, A., Mira-Gutiérrez, J., Pérez-Cano, R., Sanz-Domínguez, J., Geraldía-Loma, M., García-Herruzo, J., García-Martos, P., Adroher, F.J., 1992. Descripción de un caso de anisakiosis humana. León: Actas IX Reunión Científica de Parasitólogos Españoles, 69.
- Vidal, F., Vidal, J.C., Gadelha, A.P., Lopes, C.S., Coelho, M.G., Monteiro-Leal, L.H., 2007. *Giardia lamblia*: the effects of

extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae)
on trophozoites. *Exp. Parasitol.* 115: 25-31, 2007.

Zhu, X., Gasser, R.B., Podolska, M., Chilton, N.B., 1998.
Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential
by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 28:
1911-1921.

Zúñiga, J.M., Orellana, J.M., Tur, J.A., 2011. *Ciencia y Tecnología del
Animal de Laboratorio*. Universidad de Alcalá de Henares y
SECAL, Madrid.

Capítulo VI. Actividad de albendazol y los aceites esenciales de menta (*Mentha piperita*) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*) frente a *Anisakis* Tipo I.

María del Carmen Romero, María Concepción Navarro-Moll, Joaquina Martín-Sánchez, Adela Valero.

Resumen

Objetivos: Estudiar la posible actividad sinérgica de los aceites esenciales de *Mentha piperita* y *Matricaria chamomilla* frente *Anisakis* tipo I.

Material y métodos: Se ensayó tanto *in vitro* como *in vivo*, la actividad larvicida de la mezcla de los aceites esenciales utilizando albendazol como fármaco de referencia y comparando sus eficacias por métodos estadísticos mediante un modelo estadístico.

Resultados y conclusiones: En los ensayos *in vitro*, a las concentraciones de 250 y 187'5 µg/ml, la mortalidad de las larvas fue del 100% mientras que albendazol no mostró eficacia. *In vivo*, la mezcla de aceites esenciales fue eficaz, reduciendo las lesiones en ratas en comparación con las tratadas con albendazol y control. Albendazol no redujo de forma significativa el porcentaje de lesiones producidas por las larvas frente al control.

Discusión: La mezcla de aceite esencial de menta y manzanilla podría ser candidata para su uso en el tratamiento/profilaxis de la anisakiasis humana.

Ars Pharmaceutica
2013, volumen 55 n° 1 pp 45-49

Revisiones

- » **Tratamiento de la neutropenia febril: filgrastim y pegfilgrastim.**
Franco-Trigo L, Calleja-Hernández MA, García-Corpas JP.
- » **Actualización en terapéutica de anticuerpos monoclonales.**
Pellicer-Corbí M, García-Ramos SE, García-Poza P, Ramos-Díaz F, Matoses-Asensio SM.

Originales

- » **Evaluación y establecimiento de las especificaciones de calidad del pool de aceite de hígado de tiburón.**
García Caridad M, Fernández M, Castiñeira M, Rodríguez M, Romero J, Márquez T.
- » **Design and evaluation of cedrela gum based microparticles of theophylline.**
Odeniyi MA, Takeuchi H.
- » **Efectos de un programa de atención farmacéutica para pacientes con esclerosis múltiple sobre la adherencia al tratamiento inmunomodulador.**
Sánchez Casanueva T, Tenías Burillo JM, Martínez-Martínez F, Valenzuela Gámez JC, Navarro Maestre E, Calleja Hernández MA.

Originales Breves

- » **Actividad de albendazol y los aceites esenciales de menta (*Mentha piperita*) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*) frente *Anisakis* tipo I.**
Romero López MC, Navarro Moll MC, Martín Sánchez J, Valero López A.

Artículos Especiales

- » **Importancia de la polietilenimina en biomedicina y sus aplicaciones en terapia génica.**
López-Viota Gallardo M, Megías Iglesias R, Ruiz Martínez MA, Arias Mediano LJ.

Actividad de albendazol y los aceites esenciales de menta (*Mentha piperita*) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*) frente *Anisakis* tipo I

María del Carmen Romero López¹, María Concepción Navarro Moll², Joaquina Martín Sánchez², Adela Valero López¹.

1. Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. (España)

2. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. (España)

Short reports

Original Breve

Correspondence/Correspondencia:

María Concepción Navarro Moll
Departamento de Farmacología.
Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
cnavarro@ugr.es

Competing interest / Conflicto de intereses:

Authors declared that there was no conflict of interest associated with this research work.

Fundings / Financiación:

Trabajo financiado por el proyecto: P07-CVI-03249.

Received: 06.11.2013

Accepted: 28.12.2013

RESUMEN

Objetivos: Estudiar la posible actividad sinérgica de los aceites esenciales de *Mentha piperita* y *Matricaria chamomilla* frente *Anisakis* tipo I.

Material y métodos: Se ensayó tanto *in vitro* como *in vivo*, la actividad larvicida de la mezcla de los aceites esenciales utilizando albendazol como fármaco de referencia y midiendo su eficacia mediante un modelo estadístico.

Resultados: En los ensayos *in vitro*, a las concentraciones de 250 y 187.5 µg/ml, la mortalidad de las larvas fue del 100% mientras que albendazol no mostró eficacia. *In vivo*, la mezcla de aceites esenciales fue más eficaz, reduciendo las lesiones en ratas en comparación con las tratadas con albendazol y control. Albendazol no redujo de forma significativa el porcentaje de lesiones producidas por las larvas frente al control.

Conclusión: La mezcla de aceite esencial de menta y manzanilla podría ser candidata para su uso en el tratamiento/profilaxis de la anisakiasis humana.

PALABRAS CLAVE: *Anisakis*, Albendazol, Manzanilla, Menta, PCR-RFLP.

ABSTRACT

Aim: We have studied the possible synergistic activity of the essential oils of *Mentha piperita* and *Matricaria chamomile* against *Anisakis* type I.

Materials and methods: the larvicidal activity of the mixture of essential oils was tested *in vitro* and *in vivo*, using as a reference the drug Albendazole and effectiveness measured through a statistical model.

Results: The *in vitro* and *in vivo* experiments both evidenced that the larvicidal activity of essential oils, was higher than the Albendazole activity. In the *in vitro* assay, at concentrations of 250 and 187.5 µg/ml, the mortality was 100% with the mixture of essential oils while albendazole was ineffective at the concentrations studied. In the *in vivo* assay, the mixture of essential oils, was significantly more effective in the reduction of numbers of lesions with rats in comparison to albendazole treatments and control. Albendazole did not significantly reduce the percentage of lesions caused by larvae vs. control.

Conclusion: Considering the results, we have come to the conclusion that the mixture of peppermint essential oils and chamomile could be used in the treatment/prophylaxis of human *Anisakis*.

KEY WORDS: *Anisakis*, Albendazole, Chamomile, Mentha, PCR-RFLP.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Anisakis* son parásitos de animales marinos que pueden causar zoonosis en el hombre. En su tercer estadio (L3) las larvas llegan al hombre al ingerir pescado crudo o semicrudo. Las manifestaciones clínicas tienen lugar después de que las larvas penetren en la pared del tubo digestivo, lo que puede conducir a cuadros digestivos y alérgicos. Aunque no se dispone de evidencia suficiente, en el caso de clínica digestiva, se han utilizado inhibidores de la secreción gástrica por el conocido efecto positivo que el pH ácido tiene sobre el desarrollo de la larva¹. También se han usado corticoides para reducir el edema parietal, antibióticos y distintos antihelmínticos, sobre todo el albendazol². Productos naturales, como distintos aceites esenciales (A.E.) y sus principales componentes³⁻⁶, han sido activos *in vitro* e *in vivo* frente a larvas de *Anisakis*. De lo expuesto, se desprende la necesidad de disponer de un fármaco capaz de aliviar los síntomas digestivos provocados por este nematodo, y evitar en algunos casos la endoscopia o cirugía.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la posible actividad sinérgica *in vitro* e *in vivo* de los aceites esenciales de *Mentha piperita* y *Matricaria chamomilla* frente las L3 de *Anisakis* tipo I, utilizando albendazol como fármaco de referencia y midiéndose su eficacia mediante un modelo estadístico. Las larvas utilizadas *in vivo* se identificaron mediante PCR-RFLP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han empleado larvas L3 de *Anisakis* tipo I de un tamaño >2 cm, obtenidos de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*) procedentes del norte de España y de Portugal. En las diferentes experiencias se han utilizado una mezcla de aceites esenciales de menta y manzanilla (1:1) obtenidos por hidrodestilación⁷.

Estudio *in vitro*

Se prepararon cinco disoluciones alcohólicas (alcohol de 96°) de la mezcla de aceites esenciales: 25,0; 18,7; 15,6; 12,5; 6,25 y 3,12 mg/ml. Para albendazol se utilizó 2 ml a las concentraciones de 0,5 y 1 mg/ml en 0,9% de NaCl (Albendex® 2%, S.P. veterinaria, S.A.). La axenización de las larvas se realizó en campana de flujo laminar durante 20 minutos con solución antibiótica cuya composición por cada 10 ml es: sulfato de gentamicina 80mg; anfotericina 0,625 mg; Penicilina 10.000 U.I. y solución de Hank's 4,5 ml. (Iglesias et al., 1997). Posteriormente, se introdujeron individualmente en placas de poliestireno con 2,0 ml de NaCl 0,9% y 20 µl de producto. Las concentraciones finales ensayadas fueron: 250; 187,5; 125; 62,5 and 31,25 µg/ml y

posteriormente se incubaron a 36° C con una atmosfera al 5% de CO₂. Se utilizaron dos controles, uno de NaCl al 0,9% (control 1) y otro de etanol al 1% (control 2). Las experiencias se realizaron por quintuplicado, en distintos días, para descartar que la muerte del parásito fuese debida a otras circunstancias. La mortalidad de las larvas fue observada bajo microscopio estereoscópico a las 4, 8, 24 y 48 h del inicio de la experiencia.

Estudio *in vivo*

Se infectaron 15 ratas hembras Wistar (150 g de peso), mediante sonda gástrica con 6 larvas y 46,9 mg de la mezcla de aceites esenciales en 0,5 ml de aceite de oliva (vehículo). Para albendazol, se utilizó la dosis humana de 400 mg/día v.o.⁸, adaptándola a ratas en función de su peso según Ruckebusch⁹. A las 4h se sacrificó el animal¹⁰ anotándose la localización de las larvas, número de parásitos vivos/muertos y número de lesiones. El control se realizó siguiendo la misma metodología y usando como vehículo 0,5 ml de aceite de oliva. Las larvas recuperadas se lavaron e incubaron en placas de poliestireno con 2 ml de NaCl al 0,9%, anotándose la supervivencia de los parásitos durante 15 días atendiendo a criterios de movilidad. Posteriormente se conservaron -20°C. Todos los experimentos con animales de laboratorio se realizaron siguiendo la normativa 2010/63/EU del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, de 22 de septiembre de 2010 y R.D. 1201/2005.

Tras el estudio *in vivo*, se identificaron por PCR-RFLP el 50% de L3 las larvas recuperadas según su localización en los animales (estómago, intestino y/o ciego) mientras que las que estaban clavadas en la mucosa gástrica o localizadas en la cavidad corporal fueron identificadas en su totalidad. La amplificación del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 de ADNr se realizó con los cebadores NC5 y NC2 descritos por Zhu et al.¹¹. A continuación se utilizaron las enzimas de restricción Hinf I y Taq I (Bioron international) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En la identificación de las especies se siguieron los patrones descritos por D'Amelio et al.¹².

Para verificar la eficacia *in vivo* de los aceites esenciales se realizó un análisis de los datos mediante ANOVA no paramétrica (SPSS 15.0., Chicago, IL) comparando el número de larvas muertas, lesiones encontradas, supervivencia tras el ensayo *in vivo*, y la especie del parásito. Se consideraron significativos los valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

In vitro

La mezcla de aceite esencial fue eficaz a las concentraciones

de 250 y 187 µg/ml ocasionando el 100% de mortalidad de las larvas de *Anisakis* tipo I a las 4h (tabla 1). La mortalidad disminuyó a la concentración de 125 µg/ml, muriendo todas las larvas a las 48h (Tabla 1). Finalmente el producto no resultó eficaz a la concentración de 62,5 y 31,2 µg/ml. Albendazol no mostró ninguna actividad hasta pasados 15 días.

In vivo

El 93,9% de las ratas control presentaron lesiones en el estómago con áreas hemorrágicas comprendidas entre 1-24 mm², mientras que con albendazol casi la mitad de los roedores (46,7%) mostraron lesiones gástricas muy similares. En los animales tratados con la mezcla de aceite esencial, sólo el 33,3% de las ratas presentaron lesiones, sobre todo en el estómago (67,7%). El 8,9% de las larvas no fueron recuperadas. La distribución en las ratas de las distintas especies identificadas se encuentra en la tabla 2 El tratamiento con la mezcla de aceites esenciales no sólo redujo el número de lesiones respecto al control y albendazol, (p=0,002 y p=0,137 respectivamente), sino también la viabilidad de las larvas recuperadas de los roedores (p<0,001). En el estudio estadístico no se encontró relación ente la especie de las larvas y susceptibilidad al producto (p=0,34), siendo *A. simplex* s.s. y genotipos híbridos más patógenos que *A. pegreffii* (p=0,022).

Tabla 1. Supervivencia media in vitro de L3 de Anisakis a diferentes concentraciones de la mezcla de aceite esencial de menta y manzanilla.

Concentración	Nº L ₃	Supervivencia media (%)			
		4h	8h	24h	48h
250 µg/ml	60	0	0	0	0
187,5 µg/ml	60	0	0	0	0
125 µg/ml	60	60	31,7	15	0
62,5 µg/ml	60	91,6	86,7	81,7	81,7
31,2 µg/ml	60	100	100	100	100

DISCUSIÓN

El albendazol es un antihelmíntico eficaz frente a parásitos intestinales, utilizado por algunos clínicos en la anisakiasis humana^{2,13}. En el estudio *in vitro*, este fármaco resultó inactivo frente a los parásitos mientras que la mezcla de aceite esencial de menta y manzanilla mostró una notable actividad. Esto puede deberse a que la eficacia del albendazol es mayor en medios básicos¹⁴ y la solución salina presenta pH neutro. En el estudio *in vivo*, la mezcla de A.E. de menta y manzanilla, disminuyó de forma significativa el número lesiones en ratas respecto al control. En el caso de albendazol, aunque redujo de forma significativa el porcentaje de lesiones frente al control (p=0,002), no mostró actividad larvicida y las larvas recuperadas se mantuvieron móviles más de 48 h. Este menor efecto del albendazol puede atribuirse a que se comporta como un

Tabla 2. Distribución e identificación de L3 de Anisakis recuperadas del estudio in vivo para cada compuesto estudiado.

Productos	Vivas			Muertas		
	Control	Albendazol	A.E. Menta-manzanilla	Control	Albendazole	EO Menta-manzanilla
Cavidad	<i>A. simplex</i>	25,4% (15/59L3)	6,4% (3/47L3)	-	-	-
	<i>A. pegreffii</i>	-	2,1% (1/47L3)	-	-	-
	Híbridos <i>A. simplex/A. pegreffii</i>	-	2,1% (1/47L3)	2,1% (1/48L3)	-	-
Clavadas	<i>A. simplex</i>	23,7% (14/59L3)	-	37,3% (22/59L3)	-	-
	<i>A. pegreffii</i>	-	-	-	-	-
	Híbridos <i>A. simplex/A. pegreffii</i>	-	10,6% (5/47L3)	-	-	-
Estómago	<i>A. simplex</i>	37,3% (22/59L3)	8,5% (4/47L3)	37,4% (18/48L3)	-	-
	<i>A. pegreffii</i>	-	12,8% (6/47L3)	10,4% (5/48L3)	-	-
	Híbridos <i>A. simplex/A. pegreffii</i>	-	4,3% (2/47L3)	6,2% (3/48L3)	-	2,1% (1/48L3)
Intestino	<i>A. simplex</i>	13,6% (8/59L3)	25,5% (12/47L3)	-	-	31,3% (15/48L3)
	<i>A. pegreffii</i>	-	25,5% (12/47L3)	2,1% (1/48L3)	-	-
	Híbridos <i>A. simplex/A. pegreffii</i>	-	2,1% (1/47L3)	-	-	-

profármaco que ha de sufrir metabolización hepática para dar lugar a la formación del metabolito activo, albendazol sulfóxido. Además, presenta baja solubilidad a pH ácido¹⁵, reduciendo así su posible actividad inhibitoria de la absorción de glucosa por la cutícula del parásito¹⁴.

Conclusión: Los datos obtenidos permiten concluir que *A. simplex* y los genotipos híbridos son más patógenas que *A. pegreffii*. La mezcla de aceite esencial de menta y manzanilla podría ser candidata para su uso en el tratamiento/profilaxis de la anisakiasis humana, si bien ello debe ser confirmado con estudios clínicos.

REFERENCIAS

1. Muraoka A, Suehiro I, Fujii M, Nagata K, Kusunoki H, Kumon Y, et al. Acute gastric anisakiasis: 28 cases during the last 10 years. *Dig Dis Sci.* 1996; 41(12):2362-2365.
2. Filauro M, Rollandi GA, Cassola G, Quilici P, Angelini G, Belli F, et al. Gastrointestinal bleeding due to suspected anisakiasis: challenging differential diagnosis for a rare disease. *Updates Surg.* 2011; 63(3):213-217.
3. Hierro I, Valero A, Perez P, Gonzalez P, Cabo MM, Montilla MP, et al. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomed.* 2004; 11(1):77-82.
4. Navarro-Moll MC, Romero MC, Montilla MP, Valero A. *In vitro* and *in vivo* activity of three sesquiterpenes against L₃ larvae of *Anisakis* type I. *Exp Parasitol.* 2011; 127(2):405-408.
5. Romero M, Valero López A. Actividad *in vivo* del mentol frente a larvas L3 de *Anisakis* tipo I. *Ars Pharm.* 2010; 51(3):841-846.
6. Romero MC, Valero A, Martin-Sanchez J, Navarro-Moll MC. Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. *Phytomed.* 2012; 19(6):520-523.
7. Real Farmacopea Española. Agencia Española del Medicamento. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2005.
8. Moore DA, Girdwood RW, Chiodini PL. Treatment of anisakiasis with albendazole. *Lancet.* 2002; 360(9326):54.
9. Ruckebusch Y. Données numériques et miscellanées. *Physiologie pharmacologie thérapeutique animales.* París: Maloine S.M.; 1977.
10. Zúñiga JM, Orellana JM, Tur JA. *Ciencia y Tecnología del Animal de Laboratorio.* Madrid: Universidad de Alcalá de Henares; 2011.
11. Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol.* 1998; 28(12):1911-1921.
12. D'Amelio S, Mathiopoulou KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanco M, et al. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol.* 2000; 30(2):223-226.
13. Pontone S, Leonetti G, Guaitoli E, Mocini R, Manfredelli S, Catania A, et al. Should the host reaction to anisakiasis influence the treatment? Different clinical presentations in two cases. *Rev Esp Enferm Dig.* 2012; 104(11):607-610.
14. Arias-Díaz J, Zuloaga J, Vara E, Balibrea J, Balibrea JL. Efficacy of albendazole against *Anisakis simplex* larvae *in vitro*. *Dig Liver Dis.* 2006; 38(1):24-26.
15. Flórez J. Fármacos antiparasitarios: protozoos y helmintos. En: Flórez J, editor. *Farmacología humana.* Barcelona: Masson; 2003. p. 1361-1390.

Capítulo VII. Actividad *in vitro* e *in vivo* de tres sesquiterpenos frente a larvas L₃ de *Anisakis* Tipo I.

María Concepción Navarro-Moll, María del Carmen Romero, María Pilar Montilla, Adela Valero.

Resumen

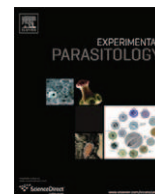
Con el fin de investigar el posible uso de derivados terpénicos para tratar la anisakiasis causada por larvas L₃ de *Anisakis*, se estudió la actividad *in vitro* e *in vivo* de tres sesquiterpenos (nerolidol, farnesol y elemol). Se incluyó un estudio histológico de las larvas tratadas *in vitro* para determinar los daños producidos en las mismas y la medición de la actividad de la enzima mieloperoxidasa, en el tracto gastrointestinal de rata, tras administrar los sesquiterpenos. En los ensayos *in vitro*, el compuesto más activo frente a las larvas L₃ fue nerolidol, seguido por farnesol. Ambos causaron la muerte de los nematodos, que mostraron alteraciones en la cutícula y ruptura de la pared intestinal. En los ensayos *in vivo*, solo el 20% de las ratas tratadas con nerolidol o farnesol mostraron lesiones en la pared gástrica en comparación con el 88'6% del control. De acuerdo con estos resultados, nerolidol y farnesol son buenos candidatos para futuras investigaciones como agentes biocidas contras las L₃ de anisakis tipo I.

Experimental Parasitology
2011, volumen 127 pp 405–408
doi: 10.1016/j.exppara.2010.09.008



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

In vitro and *in vivo* activity of three sesquiterpenes against L₃ larvae of *Anisakis* type I

M^a Concepción Navarro-Moll^{a,*}, M^a Carmen Romero^b, M^a Pilar Montilla^a, Adela Valero^b^a Department of Pharmacology, Pharmacy Faculty, University of Granada, Granada 18071, Spain^b Department of Parasitology, Pharmacy Faculty, University of Granada, Granada 18071, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2010

Received in revised form 15 September 2010

Accepted 21 September 2010

Available online 20 October 2010

Keywords:

Anisakis

Anisakiasis

Sesquiterpenes

Nerolidol

Farnesol

Elemol

ABSTRACT

In order to investigate the possible use of terpenic derivatives to treat anisakiasis caused by L₃ larvae of *Anisakis*, we studied the *in vitro* and *in vivo* larvicidal activity of three sesquiterpenes (nerolidol, farnesol and elemol). *In vitro* experiments included the histological study of larval damage and *in vivo* studies the measurement of myeloperoxidase activity in rat gastrointestinal tract after administration of the sesquiterpenes. In the *in vitro* assays, the most active compound against the L₃ larvae was nerolidol, followed by farnesol; both caused the death of all nematodes, which showed cuticle changes and intestinal wall rupture. In the *in vivo* assays, only 20% of infected rats treated with nerolidol or farnesol showed gastric wall lesions in comparison to 86.6% of control animals. According to these results, nerolidol and farnesol are good candidates for further research as biocidal agents against L₃ larvae of *Anisakis* type I.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Anisakiasis is a widely distributed zoonosis associated with fish consumption. Most cases have been attributed to infection by *A. simplex* s.l. Recent genetic molecular studies by Mattiucci et al. (2009) and other authors described two clades of the *Anisakis* genus. Clade I includes larvae of *Anisakis* type I (*sensu* Berland, 1961) with six species, three of which constitute the *A. simplex* s.l. complex (*Anisakis simplex* s.s., *A. pegreffii* and *A. simplex* C), which differ in their genetic structure, biological cycle and geographical distribution.

Anisakiasis is characterized by an eosinophilic infiltration which evolves to the formation of granuloma in the digestive tract. Endoscopic excision of larvae is the most widely reported treatment for acute cases of gastric, duodenum or colon anisakiasis (Oshima, 1972; Petithory and Marty, 1988; Kasuya et al., 1989; De Montigni et al., 1991; Plath et al., 2001; Repiso et al., 2003). In chronic gastric anisakiasis or in severe cases with endoscopically inaccessible larvae, the most frequent approach is surgery to excise the affected area (Deardorff et al., 1986; Kwee and Sautter, 1987; Petithory and Marty, 1988; Repiso et al., 2003). When abdominal symptoms are not severe, the treatment is usually conservative; a wide variety of drugs have been prescribed (Matsui et al., 1985; Verhamme and Ramboer, 1988; Moore et al., 2002; Ramos et al., 2005), but no comparative data are available on their effec-

tiveness. Some researchers, mainly Japanese, have investigated the action of traditional natural products against L₃ larvae of *Anisakis* (Kasuya et al., 1988,1990; Goto et al., 1990; Suzuki et al., 1994). Our group has established a research line on the *in vitro* and *in vivo* activity of different essential oils and their main components against L₃ larvae of *Anisakis* (Hierro et al., 2004a; Valero et al., 2006; Navarro et al., 2008). The present study analyses the larvicidal activity of three sesquiterpenes: nerolidol, farnesol and elemol, which have shown biocidal activity against different pathogens, including protozoa (Brehm-Stecher and Johnson, 2003; Arruda et al., 2005; Hoet et al., 2006).

2. Material and methods

2.1. Sesquiterpenes tested

Three concentrations of each sesquiterpene (nerolidol, farnesol and elemol) were prepared with 96% ethanol: 12.50, 6.25 and 3.12 mg/ml. Selection of these concentrations was based on the study by Kasuya et al. (1990).

2.2. *In vitro* larvicidal activity

L₃ of *Anisakis* type I were collected by dissecting the fish *Micromesistius poutassou* (blue whiting), fished in the Cantabric sea, and selecting only larvae with a length >2.0 cm. Larvae were axenised in antibiotic solution (Iglesias et al., 1997), introduced into polystyrene plate wells with 2 ml of sterile solution of 0.9%

* Corresponding author. Fax: +34 958248964.

E-mail address: cnavarro@ugr.es (M^aC. Navarro-Moll).

NaCl and 20 μ l of each dilution of test compound, and then incubated at 36 °C in 5% CO₂ atmosphere. As controls, larvae were assayed without test compound under identical experimental conditions. Larvae were examined under stereoscopic microscope at 4, 8, 24 and 48 h to test the biocidal effect of the compound. Larvae with no mobility at all were considered dead. Each dilution was tested three times on larvae from fish captured on different days.

2.3. Histological study

Conventional histological methods were used to detect damage in the dead larvae, which were transferred from the wells into tubes with 10% formalin buffer, staining 1 μ m thick sections with toluidine blue.

2.4. *In vivo* larvicidal activity

Selection of the dose of each compound (46.9 mg) was based on earlier findings by our research group (Hierro et al., 2004a; Navarro et al., 2008); dilutions were in 0.5 ml olive oil (vehicle). Female Wistar rats weighing around 150 g were infested with six L₃ of *Anisakis* type I by gastric probe. Test compounds were simultaneously administered using the same procedure. Fifteen rats were used for each compound. A control test was performed in one group of 15 animals, infesting each with six L₃ of *Anisakis* type I in 0.5 ml olive oil and with no administration of test compound. Regulated necropsy of the rat was performed (Feldman and Seely, 1988), recording the locations of the larvae, whether they were alive or dead and the presence of any gastrointestinal lesions.

2.5. Measurement of tissue myeloperoxidase (MPO) activity

Because essential oils tend to irritate the mucosa, we investigated the presence of local inflammatory reaction in the gastrointestinal tract after administration of the test compound (46.9 mg), measuring MPO activity (marker of neutrophilic infiltration) by the method of Krawisz et al. (1984).

3. Results and discussion

3.1. *In vitro* assays

At the maximum concentration of 125 μ g/ml, all three sesquiterpenes tested were effective *in vitro* against L₃ larvae of *Anisakis* type I, achieving 100% mortality at the first reading (4 h). Cuticular alterations were observed under stereoscopic microscope (Fig. 1). At concentrations of 62.5 μ g/ml, the mortality at 4 h was 100% with nerolidol and elemol but 90% with farnesol. At concentrations of 31.2 μ g/ml, the mortality at 4 h was 100% with nerolidol and 80% with farnesol obtained 80%, while elemol was ineffective at

this time. Because of the high mortality obtained by nerolidol and farnesol at this concentration, we tested them at half the dose (15.6 μ g/ml), finding no significant reduction in the mortality rates (Fig. 2). According to these findings; the order of *in vitro* activity against the L₃ larvae is nerolidol > farnesol > elemol.

Histological studies revealed that nerolidol produced *in vitro* an alteration of the nematode cuticle and a rupture of the intestinal wall of the parasite, while farnesol and elemol only damaged the cuticle (Fig. 3). Inoue et al. (2004) found that the activity of nerolidol and farnesol against *Staphylococcus aureus* is at least in part due to their action on its cell membrane. Both nerolidol and farnesol showed greater *in vitro* activity in comparison to the following monoterpenes investigated by us: cuminic aldehyde, carvacrol, citral, citronelol, eucalyptol, geraniol, myrcene, perillaldehyde, α and β pinenes, and ocimene (Hierro et al., 2004a,2004b,2006; Valero et al., 2006; Navarro et al., 2008).

3.2. *In vivo* assays

In the *in vivo* test, gastric wall lesions were observed in 20% of infected rats treated with nerolidol or farnesol, in 40% of those treated with elemol, and in 86.6% of those treated with vehicle (olive oil) alone. Lesions were smaller in all nerolidol and farnesol-treated animals than in the control group (Fig. 4), whereas they were similar between elemol-treated animals and controls. Under our experimental conditions, the order of their *in vivo* activity is nerolidol = farnesol > elemol.

According to the MPO values, farnesol and nerolidol do not induce irritative damage in stomach, small intestine or caecum and may exert some protective effect on these tissues. There was no difference in MPO findings between elemol-treated animals and with controls (Table 1).

The lower level of activity against *Anisakis* shown by elemol may be related to its different structure (monocyclic sesquiterpene), since both nerolidol and farnesol derive from an acyclic skeleton. This possibility is supported by the observation of Priestley et al. (2003) that small structural modifications can have a large effect on the activity of a molecule by changing its bioavailability and capacity to access action sites.

Our findings are consistent with reports on the biocidal activity of nerolidol against other pathogen organisms. Hoet et al. (2006) demonstrated that nerolidol, the main component of the essential oil of *Strychnos spinosa* (plant used traditionally in Africa for the treatment of African trypanosomiasis), has a powerful and selective effect against *Trypanosoma brucei*. The biocidal activity of nerolidol against amastigotes and promastigotes of different *Leishmania* species (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. chagasi*) has also been demonstrated (Arruda et al., 2005); the authors related this action to its capacity to block the formation of ergosterol and dolichols 11 and 12 in both forms of *Leishmania* (amastigotes and promastigotes), thereby inhibiting one of the

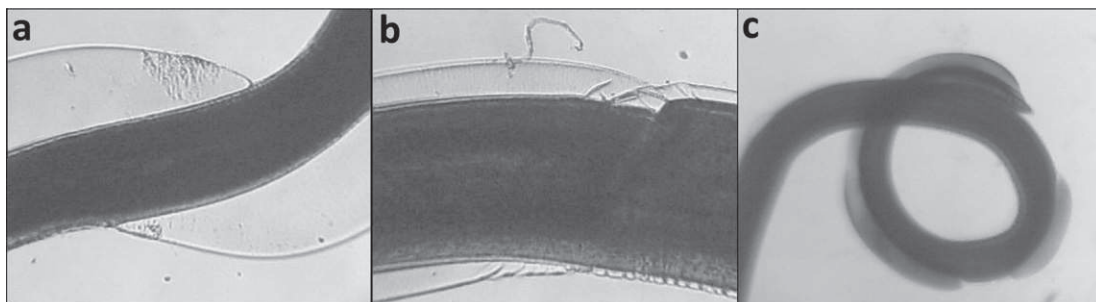


Fig. 1. Cuticular alteration, visible under stereoscopic microscope, in L₃ larvae treated *in vitro* with (a) nerolidol; (b) farnesol; (c) elemol.

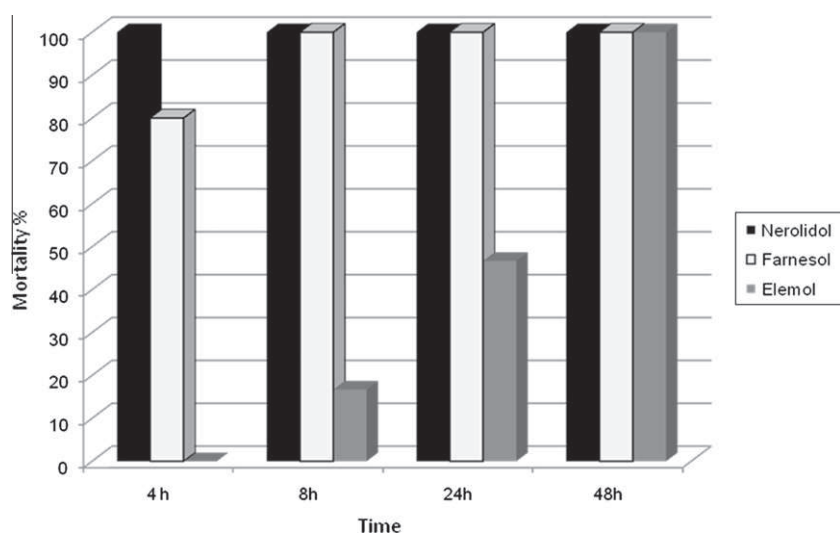


Fig. 2. *In vitro* activity of nerolidol, farnesol and elemol against L₃ larvae of *Anisakis simplex* type I at the lowest concentration tested (31.2 µg/ml). (1) Nerolidol; (2) farnesol; (3) elemol. Activity is expressed as mortality.

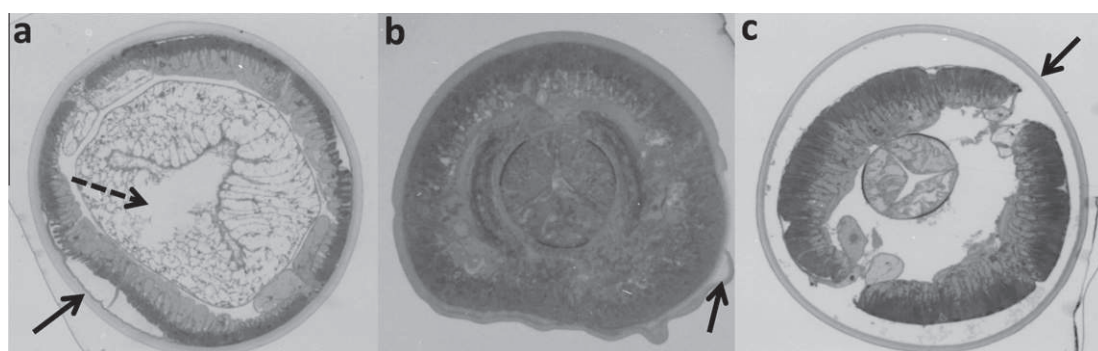


Fig. 3. Histological damage produced *in vitro* by nerolidol, farnesol and elemol in L₃ larvae of *Anisakis simplex* type I. Continuous arrows indicate cuticular alterations; discontinuous arrows indicate intestinal alterations. (a) Nerolidol; (b) farnesol; (c) elemol.

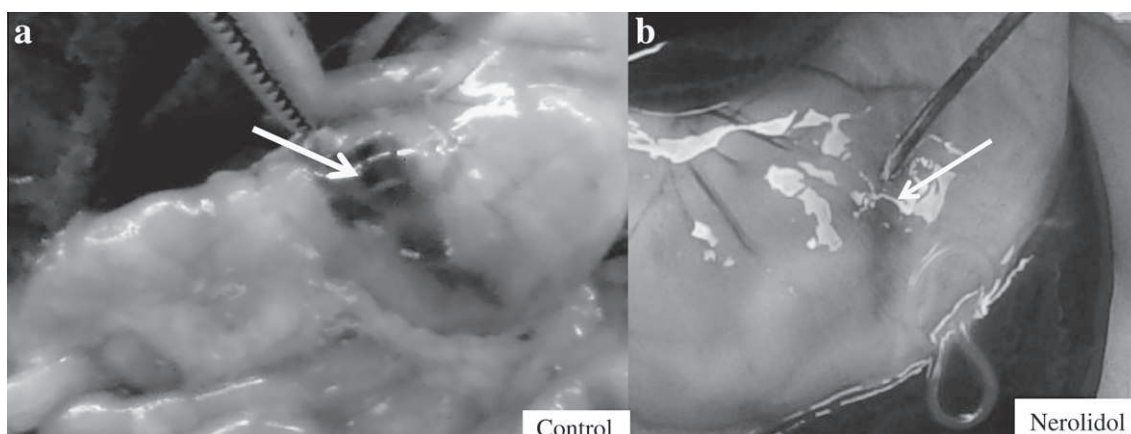


Fig. 4. Lesions caused in the stomach by L₃ larvae of *A. simplex* type I. (a) Control group; (b) group treated with nerolidol.

enzymes responsible for the formation of farnesyl pyrophosphate (FPP) precursors. Other authors, in a study on *Plasmodium falciparum*, attributed the action of nerolidol to the elongation of isoprene chains of dolichols and ubiquinone (Rodrigues Goulart et al., 2004). Hence, nerolidol may act *via* more than one pathway on isoprenoid

derivatives in eukaryotic cells. Lopes et al. (1999) proposed that nerolidol acts on the trophozoite stage of *P. falciparum* *via* competitive inhibition of the biosynthesis of isoprene derivatives (e.g., dolichols), resulting in the inhibition of protein glycosylation. Inoue et al. (2004) and Brehm-Stecher and Johnson (2003) reported that

Table 1

MPO values in stomach, small intestine and caecum of rats treated with nerolidol, farnesol and elemol. Vehicle: olive oil.

	Stomach (mU/g prot.)	Small bowel (mU/g prot.)	Caecum (mU/g prot.)
Control (0.5 ml olive oil)	8228.9	3640.9	4543.4
Nerolidol (46.9 mg/0.5 ml)	1126.48 <i>p</i> < 0.001	1219.88 <i>p</i> < 0.001	1257.83 <i>p</i> < 0.001
Farnesol (46.9 mg/0.5 ml)	2356.56 <i>p</i> < 0.001	2035.26 <i>p</i> = 0.019	1293.32 <i>p</i> < 0.001
Elemol (46.9 mg/0.5 ml)	6672.8 <i>p</i> = 0.173	5140.65 <i>p</i> = 0.171	3070.08 <i>p</i> = 0.027

nerolidol and farnesol acted against *Staphylococcus aureus* by increasing its membrane permeability and hence its susceptibility to different antibiotics.

Based on the above data, two mechanisms can be proposed for the action of nerolidol and farnesol on L₃ larvae of *Anisakis* type I: inhibition of the biosynthesis of isoprene compounds indispensable for protein glycosylation in eukaryotic cells; and an increase in the permeability of the membrane.

In comparison to the monoterpenic derivatives previously studied by us (Hierro et al., 2004a,2004b,2006; Valero et al., 2006; Navarro et al., 2008), nerolidol and farnesol are less active against L₃ larvae of *Anisakis* type I *in vivo* in comparison to citral, citronellol and perillyl aldehyde but are more active than the other terpenic derivatives tested.

Given these findings on the efficacy and low toxicity of nerolidol and farnesol, further investigation is warranted into their use as biocidal agents against L₃ larvae of *Anisakis* type I.

Acknowledgments

This survey has been funded by the grant from Junta de Andalucía (Spanish) n° P07-(CVI-03249). The English translation was done by Mr. Richard Davies, MA. The experiments complied with current Spanish legislation.

References

- Arruda, D.C., D'Alexandri, F.L., Katzin, A.M., Uliana, S.R., 2005. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 49, 1679–1687.
- Berland, B., 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2, 1–50.
- Brehm-Stecher, B.F., Johnson, E.A., 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3357–3360.
- Deardorff, T.L., Fukumura, T., Raybourne, R.B., 1986. Invasive anisakiasis. A case report from Hawaii. *Gastroenterology* 90, 1047–1050.
- De Montigni, S., Prevot, S., Basset, D., 1991. Anisakiasis gastrique: guérison par extraction endoscopique retardée. *La Presse Médicale* 20, 180.
- Feldman, D.B., Seely, J.C., 1988. *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Goto, C., Kasuya, S., Koga, K., Ohtomo, H., 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, 653–656.
- Hierro, I., Valero, A., Pérez, P., González, P., Cabo, M.M., Montilla, M.P., Navarro, M.C., 2004a. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L₃ larvae. *Phytomedicine* 11, 77–82.
- Hierro, I., Valero, A., González de Selgas, J.M., Navarro, M.C., 2004b. Actividad larvívica del timol frente a *Anisakis simplex* s.l. *Revista de Fitoterapia* 4, 175–176.

- Hierro, I., Valero, A., Navarro, M.C., 2006. *In vivo* larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L₃ larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomedicine* 13, 527–531.
- Hoet, S., Stéveny, C., Herent, M.F., Quetin-Leclercq, J., 2006. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medica* 72, 480–482.
- Iglesias, L., Valero, A., Adroher, F.J., 1997. Some factors which influence the *in vitro* maintenance of *Anisakis simplex* (Nematoda). *Folia Parasitologica* 44, 297–301.
- Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H., Shimada, J., 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters* 237, 325–331.
- Kasuya, S., Hamano, H., Izumi, H., 1989. Gastric anisakiasis with anaphylactoid reactions. *A.C.I. News* 1, 13–14.
- Kasuya, S., Goto, C., Ohtomo, H., 1988. Studies on prophylaxis against *Anisakis*. A screening of killing effects of extract from foods on the larvae. *Japanese Association for Infectious Diseases* 62, 1152–1156.
- Kasuya, S., Goto, C., Koga, K., Ohtomo, H., Kagei, N., Honda, G., 1990. Lethal efficacy of leaf extract from *Perilla frutescens* (traditional Chinese medicine) or perillaldehyde on *Anisakis* larvae *in vitro*. *Japanese Journal of Parasitology* 39, 220–225.
- Krawisz, J.E., Sharon, P., Stenson, W.F., 1984. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 87, 1344–1350.
- Kwee, H.G., Sautter, R.L., 1987. Anisakiasis. *AFP* 36, 137–141.
- Lopes, N.P., Kato, M.J., Andrade, E.H., Maia, J.G.S., Yoshida, M., Planchart, A.R., Katzin, A.M., 1999. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiapi Amazon Indians. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 313–319.
- Matsui, T., Lida, M., Murakami, M., Kimura, Y., Fujishima, M., Yao, Y., Tsuji, M., 1985. Intestinal anisakiasis: clinical and radiological features. *Radiology* 6, 119–139.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Webb, S.C., 2009. *Anisakis nascentii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology* 74, 199–217.
- Moore, D.A.J., Girdwood, R.W.A., Chiodini, P.L., 2002. Treatment of anisakiasis with albendazole. *Lancet* 360, 54.
- Navarro, M.C., Noguera, M.A., Romero, M.C., Montilla, M.P., González de Selgas, J.M., 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, 295–299.
- Oshima, T., 1972. *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. In: Komiya, K., Matsubayashi, Y.H. (Eds.), *Progress of Medical Parasitology in Japan IV*. Morishita. Meguro Parasitological Museum, Tokyo, pp. 303–304.
- Petithory, J.C., Marty, B., 1988. Anisakiasis en France. *La Lettre de l'Infectiologue* 3, 96–99.
- Plath, F., Holle, A., Zende, D., Möller, F.W., Barten, M., Reisinger, E.C., Liebe, S., 2001. Anisakiasis of the stomach—a case report from Germany. *Zeitschrift Für Gastroenterologie* 39, 177–180.
- Priestley, C.M., Williamson, E.M., Wafford, K.A., Sattelle, D.B., 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA (A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British Journal of Pharmacology* 140, 1363–1372.
- Ramos, L., Alonso, C., Guilarte, M., Vilaseca, J., Santos, J., Malagelada, J.R., 2005. *Anisakis simplex*-induced small bowel obstruction after fish ingestion: preliminary evidence for response parenteral corticosteroids. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3, 667–671.
- Repiso, A., Alcántara, M., González, C., De Artea, T., Rodríguez, R., Valle, J., Martínez, J.L., 2003. Anisakiasis gastrointestinal. Estudio de una serie de 25 pacientes. *Gastroenterología y Hepatología* 26, 341–346.
- Rodrigues Goulart, H., Kimura, E.A., Péres, V.J., Couto, A.S., Aquino Duarte, F.A., Katzin, A.M., 2004. Terpenes arrest parasite development and inhibit biosynthesis of isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 2502–2509.
- Suzuki, J., Murata, I., Enokida, R., Yasuda, Y., 1994. Effects of Chinese medicine for helminth (VII): minimum lethal concentration on 3rd stage larvae of *Anisakis simplex* with the natural compounds, isolated from crude drugs and several kinds of derivatives. *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health* 45, 35–41.
- Valero, A., Hierro, I., González, P., Montilla, P., Navarro, M.C., 2006. Activity of various essential oils and their main components against L₃ larvae of *Anisakis simplex* s.l. In: Govil, J.N., Singh, V.K., Arunachalam, P. (Eds.), *Recent Progress in Medicinal Plants, Drug Development from Molecules*, vol. 11. Studium Press, LLC, Houston, pp. 247–265.
- Verhamme, M.A.M., Ramboer, C.H.R., 1988. Anisakiasis caused by herring in vinegar: a little known medical problem. *Gut* 29, 843–847.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN GENERAL.

La alta prevalencia de larvas de *Anisakis* en peces de interés comercial capturados en aguas de la Península Ibérica, constituye un problema sanitario y económico (Abollo et al., 2001; AESAN, 2005). Desde que se publicara en 1991 el primer caso de anisakiosis en España por Arenal-Vera et al., se han notificado otros muchos, tanto es así, que después de Japón, España ocupa el segundo lugar en cuanto a la prevalencia de esta enfermedad (Acebes Rey et al., 1996; Canut et al., 1996; Cruchaga et al., 1995; FEAD, 2013, López-Vélez, 1992 a, b; Moreno-Ancillo et al., 1997; Obispo et al., 2000; Oliveira et al., 1999; Valero et al., 1992). Dos de las especies que conforman el morfotipo I (*A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*) han mostrado diferente capacidad para invadir los tejidos de los peces, además de ser las responsables de la mayoría de los casos de anisakiosis en el hombre (Clavel et al., 1993; Quiazón et al., 2011; Suzuki et al., 2010). La amplia distribución de estas especies en la Península Ibérica, así como de algunas de las que integran el Tipo II, nos ha llevado a estudiar su capacidad patógena en un modelo animal. Al realizar el muestreo que nos permitiría recoger las larvas que usaríamos en estas infecciones experimentales hemos confirmado que *A. simplex* s.s. se concentra principalmente en aguas atlánticas peninsulares, disminuyendo su presencia conforme nos acercamos al Mar Mediterráneo, en el que la especie más prevalente es *A. pegreffii*. Sin embargo, los genotipos híbridos que según algunos autores (Abollo et al., 2003), se concentraban principalmente en las zonas cercanas al Estrecho de Gibraltar, en nuestro estudio no han mostrado una localización específica. En cuanto a las larvas Tipo II, se ha podido comprobar que *A. physeteris* y *A. paggiae* están presentes en las costas de la Península Ibérica aunque con prevalencias mucho más bajas (Fernández et al., 2005; Hermida et al., 2012; Mattiucci et al., 2007; Valero et al., 2000, 2006 a, b). Hemos hallado *A. physeteris* tanto en aguas del Atlántico como del Mediterráneo, aunque predomina en éste último. En el caso de *A. paggiae*, sólo se habían aislado L₃ de esta especie en merluzas capturadas en aguas de Galicia (Mattiucci et al., 2007; Mattiucci y Nascetti, 2008); sin embargo, en el presente estudio esta especie se ha encontrado por primera vez en bacaladillas y en diferentes puntos de pesca del Mediterráneo, lo cual amplía su zona geográfica y hospedador. Por otro lado, *A. brevispiculata*, no parece ser muy frecuente en

bacaladillas de la Península Ibérica, ya que sólo se ha encontrado un ejemplar de procedencia atlántica.

Conviene indicar que es difícil la diferenciación morfológica entre las larvas pertenecientes a un mismo morfotipo; la confirmación de la especie, en la mayoría de los casos, sólo se ha podido realizar gracias a la utilización de técnicas moleculares. Las técnicas de PCR-RFLP y la PCR-secuenciación han sido utilizadas con anterioridad para tal fin por Cavallero et al. (2011), D'amelio et al. (1999, 2000, 2010), Martín-Sánchez et al. (2005), Murata et al. (2011) y Quiazon et al. (2013). En nuestro caso, la diferenciación entre las distintas especies, se ha basado en la utilización de marcadores del ADN ribosómico (ADNr) a través del uso de distintos patrones de restricción definidos por la existencia de diferencias fijas entre sus secuencias. Así, en el caso concreto de *A. simplex* y *A. pregreffii*, viene determinada por la existencia de dos únicas diferencias fijas en la secuencia del ITS-1 del ADNr, lo que se traduce en distintos patrones de restricción con las enzimas Hinf I y Taq I (Ceballos-Mendiola et al., 2010). Estas mismas enzimas también se han utilizado para la determinación de las especies del morfotipo II, además de la enzima Cfo I. De acuerdo con esta técnica, del total de larvas Tipo I analizadas, el 42'1% (80/190 L₃) aparecían con el patrón específico de *A. simplex*, el 37'4% (71/190 L₃) con el de *A. pregreffii* y el 20'5% (39/190 L₃) con el genotipo híbrido (13'74% son híbridos con las dos enzimas y 6'8% con una sola enzima de restricción). La interpretación de estos últimos individuos es compleja y aún suscita controversia; ya que estos individuos podrían ser el resultado de una hibridación entre ambas especies o tratarse de una homogeneización incompleta de una región de ADN que está constituida por múltiples copias repetidas (Abollo et al., 2003; Farjallah et al., 2008; Marques et al., 2006; Martín-Sánchez et al., 2005; Umehara et al., 2006).

La PCR-secuenciación del gen *cox2* del ADN mitocondrial (ADNm) de las larvas Tipo II, ha permitido confirmar la identificación específica realizada con los patrones de bandas generados mediante la PCR-RFLP del fragmento ITS1-5,8s-ITS2 (D'amelio et al., 2000; Cavallero et al., 2011; Murata et al., 2011). Así, en este trabajo el 57'1% (24/42 L₃) eran *A. physeteris*, 40'5% (17/42 L₃) se identificaron como *A. paggiae*, y 2'4% (1/42 L₃) *A. brevispiculata*.

La secuenciación del gen *cox2* nos han permitido observar una gran diversidad genética dentro y entre las especies del morfotipo II. En las 38 larvas de *Anisakis* morfotipo II, se identificaron 32 haplotipos con 137 sitios polimorficos, 98 de ellos localizados en más de un haplotipo. Los árboles generados con la secuencia *cox2* confirmaron la identificación de las larvas por PCR-RFLP del fragmento ITS1-5,8s-ITS2 como *A. physeteris* (22 ejemplares, 17 haplotipos), *A. paggiae* (15 ejemplares, 14 haplotipos), y *A. brevispiculata* (1 ejemplar, 1 haplotipo). La morfología de los tres árboles generados por métodos de distancia (UPGMA y NJ) así como máxima parsimonia (MP) son muy similares. En ellos se diferencian 3 grandes ramas bien soportadas por el análisis bootstrap (valores entre 71% y 100%) formadas respectivamente por los haplotipos de *A. physeteris*, *A. brevispiculata* y *A. paggiae*, con una mayor relación entre los dos primeros. El estudio intraespecífico de la especie *A. brevispiculata* nos muestra un valor de p-distancia entre 0'019 y 0'032, y la existencia de 12 a 20 bases diferentes en sus secuencias. En el caso de *A. physeteris*, la p-distancia varía entre 0'002 y 0'04, y en sus secuencias se detectan entre 2 y 25 bases diferentes. Respecto a *A. paggiae*, en todos los árboles se generaron dos subramas con valores de bootstrap del 100%. En una subrama quedaban agrupados los 14 haplotipos identificados por nosotros con valores de p-distancia entre 0'005 y 0'022 (3-24 bases diferentes) y en la otra subrama las secuencias depositadas en GenBank (KC342895, KC342896, EU560910, DQ116434). Entre los haplotipos integrados en estas dos subramas, el valor de p-distancia varió entre 0'040 y 0'061, y se detectaron entre 25 y 38 bases diferentes. En este último caso, los valores son similares a los obtenidos por Valentini et al. (2006) para las especies hermanas del complejo *Anisakis simplex*.

El hecho de que las diferencias observadas en las secuencias de *cox2* sean netamente superiores a las observadas en el ITS-2 se debe a que, aunque sus secuencias se mantienen relativamente conservadas, la tasa mutagénica del ADNm es mayor que la del ADNr debido al estrés oxidativo al que está sometido, por lo que suele presentar una mayor variabilidad tal y como se ha podido comprobar en diversos estudios realizados sobre distintos parásitos, incluidos los anisakidos (Barón et al., 2008; Franco et al., 2010; Nadler y Hudspeth, 2000; Valentini et al., 2006). Aún así, la gran cantidad de diferencias halladas entre individuos de la misma especie podrían representar una variación local o especies hermanas de

estas especies, como ya se ha observado en los *A. paggiae* del archipiélago filipino (Quiazon et al., 2013). Esta característica se ha podido observar tanto en *A. paggiae*, como en *A. physeteris*, y se ha podido constatar en los árboles filogenéticos, distintos networks y diferencias fijas.

Para el estudio de la patogenicidad de las distintas especies de *Anisakis* se han utilizado modelos animales de diversas especies, basados en la infección experimental con larvas L₃ (Hong y Lee, 1987; Dziekoeska-Rynko et al., 2002; Cho et al., 2006, Zuloaga et al., 2013). En nuestro caso, se ha realizado en ratas Wistar, ya que estos animales presentan una serie de ventajas: el tamaño del aparato digestivo de la rata tiene un calibre adecuado para las larvas, el menor requerimiento espacial y de cuidados que otros animales de mayor tamaño y sobre todo que el comportamiento y distribución de las larvas L₃ de *Anisakis* es similar a los casos humanos (Huang, 2005; Navarro et al, 2008).

De acuerdo con la definición de poder patógeno considerada en este trabajo, los resultados obtenidos indican que éste está asociado a la especie o genotipo al que pertenece la larva. Así, del 21'6% de las larvas Tipo I que fueron capaces de atravesar, fijarse y/o producir lesión en el tracto gastrointestinal de los animales de experimentación, el 10% fueron identificadas como *A. simplex* s.s., el 7'8% como genotipos híbridos y el 3'8% restante como *A. pegreffii*. De acuerdo con estos datos hemos encontrado que el riesgo de penetración de *A. pegreffii* es menor que el de *A. simplex* s.s., concretamente, un 65% (IC 95%: 11 a 86%). En Japón, la mayoría de los casos de anisakiosis humana en los que se ha realizado identificación específica, están causados por *A. simplex* s.s. mientras que en Italia la especie señalada es *A. pegreffii* (D'Amelio et al., 1999; Fumarola et al., 2009; Mattiucci et al., 2007, 2011; Umehara et al., 2007). Esta última afirmación está fundamentada en la identificación molecular, ausencia de *A. simplex* s.s. en las costas italianas y a que *A. pegreffii* está presente en numerosos peces del Mediterráneo (Mattiucci et al., 2007). En España, a pesar del incremento de casos de anisakiosis, debidos en su mayor parte al consumo de pescado crudo en forma de boquerones en vinagre (FEAD, 2013; Repiso Ortega et al., 2003), no se ha identificado en ningún caso la especie implicada. En la actualidad, se conocen pocos datos sobre la patología producida por cada una de estas especies hermanas en sus diferentes

hospedadores. Estudios experimentales realizados en peces por Suzuki et al. (2010) y Quiazon et al. (2011) han puesto de manifiesto que existen diferencias en la migración hacia el tejido muscular del pez, señalando una mayor tendencia de *A. simplex* s.s. a migrar hacia la musculatura que *A. pegreffii*. Según estos autores, es posible que estas diferencias en la habilidad de penetración en el músculo del pez también se manifiesten en la capacidad de penetración en el tejido de hospedadores accidentales como el hombre, influyendo por tanto en su poder patógeno. De acuerdo con nuestros resultados, la zona de captura de las larvas no influye en su capacidad infectiva; sin embargo, el hecho de que en el Mediterráneo la especie más frecuente sea *A. pegreffii* que como hemos puesto de manifiesto en el presente trabajo, tiene un poder patógeno inferior al de *A. simplex* s.s., podría ser de interés económico, ya que favorecería la imagen sanitaria de los peces capturados en estas aguas. A este respecto, podemos resumir que, según nuestro modelo experimental, *A. simplex* s.s. es una especie más patógena que *A. pegreffii*, lo cual sumado a su mayor capacidad de penetración en la musculatura del pez (Suzuki et al., 2010; Quiazon et al., 2011), justificaría que la mayoría de los casos humanos se deban a esta especie, incluso en áreas donde *A. pegreffii* es predominante (Umehara et al., 2007).

Siguiendo el mismo criterio de patogenicidad, en el caso de las larvas Tipo II, tan sólo el 7'1% (4/56) fueron capaces de producir daños en los animales de experimentación, dos larvas de *A. physeteris* y dos de *A. paggiae*. Estos resultados indican que ambas especies pueden actuar como agentes etiológicos de la anisakiosis ya que son capaces de penetrar e incluso perforar la pared gástrica. Sin embargo, de las 4 larvas que produjeron patología sólo dos de ellas, identificadas respectivamente como *A. physeteris* y *A. paggiae*, dieron daños vasculares visibles, si bien de un tamaño más reducido que las generadas por las Tipo I.

La única larva identificada como *A. brevispiculata* no mostró ninguna actividad patógena.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en las larvas Tipo I, se observa que el potencial patógeno de estas últimas es más elevado ($p < 0'001$). Así *A. physeteris* y *A. paggiae* muestran respectivamente una capacidad para penetrar la mucosa gástrica un 93% (CI 95%: 57 - 99%) y 91% (CI 95%: 42 - 99%) menor que el

de *A. simplex* s.s. No obstante, el poder patógeno de estas especies del morfotipo II es similar al de *A. pegreffii*. Aunque las larvas Tipo II pueden suponer un problema de Salud Pública al localizarse prácticamente en todas las costas peninsulares, su baja prevalencia en el pescado, junto con la menor capacidad patógena mostrada en el estudio, explicaría por qué casi la totalidad de casos de anisakiosis humanas identificadas hasta el momento, están producidos por larvas Tipo I (Clavel et al., 1993; Fumarola et al., 2009; Mattiucci et al., 2011, 2013; Repiso et al., 2003; Umehara et al., 2007).

En resumen podríamos decir que el potencial patógeno de las larvas de *Anisakis* Tipo I y II quedaría en el siguiente orden:

A. simplex s.s. > *A. pegreffii* = *A. physeteris* = *A. paggiae* > *A. brevispiculata*

Otro hecho a considerar es la situación de las larvas en el pescado. Es decir, si son igualmente patógenas las encapsuladas en vísceras o las que se encuentran libres en la cavidad corporal del pescado. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran cómo las larvas encapsuladas parecen tener un comportamiento diferente, ya que ninguna de ellas atravesó la pared gastrointestinal, aunque sí fueron capaces de fijarse en la mucosa gástrica y producir daños vasculares. Por tanto, aunque las larvas libres en vísceras son más patógenas que las enquistadas ($p < 0.001$); en ambos casos se puede producir enfermedad y, en consecuencia, las medidas profilácticas no deben diferir. Sin embargo, este hecho puede tener repercusión desde el punto de la actuación del clínico, ya que la endoscopia es la técnica de elección si la larva se encuentra clavada en la pared del estómago, duodeno o colon. Por el contrario, cuando se asienta en localizaciones inaccesibles para el fibroscopio y no se puede visualizar, se suele recurrir a la laparotomía y resección de la zona afectada.

Hay que indicar, que en general, el pronóstico de la anisakiosis intestinal aguda suele ser bueno y que la sintomatología desaparece espontáneamente a las dos semanas tras la infección. Diversos autores han sugerido que algunos medicamentos eficaces frente a nematodos intestinales podrían ser de aplicación en el tratamiento de esta enfermedad (Árias-Díaz et al., 2006; Dziekońska-Rynko et al., 2002; Filauro et al., 2011; Ioli et al., 1998; Kim et al., 2006; Moore et al., 2002;

Nawa et al., 2005; Pacios et al., 2005; Pontone et al., 2012; Simón et al., 2002). Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado ningún antihelmíntico eficaz para el tratamiento de esta parasitosis.

Un fármaco útil frente a este parásito podría acortar el curso clínico de la anisakiosis y prevenir las posibles complicaciones de los procedimientos endoscópicos y quirúrgicos (Lin et al., 2010). Teniendo en cuenta el interés suscitado por esta parasitosis, la ausencia en el mercado de fármacos de eficacia contrastada y las posibilidades que oferta el mundo vegetal, diversos investigadores han ensayado la acción tanto *in vitro* como *in vivo* de distintos productos naturales frente a las larvas L₃ de *Anisakis* Tipo I, (Hierro et al., 2004; Kasuya et al. 1990; Lin et al., 2010; Navarro et al., 2011; Valero et al., 2006). Entre los distintos productos de origen natural con posible interés en el tratamiento de esta parasitosis se encuentran los derivados terpénicos presentes en la composición de los aceites esenciales obtenidos a partir de plantas aromáticas. Existe abundante literatura especializada en la que se pone de manifiesto el efecto de estos compuestos sobre una gran variedad de agentes patógenos. Partiendo de esta premisa, en el presente trabajo de Tesis Doctoral, se ha procedido al estudio *in vitro* e *in vivo* de la actuación de los aceites esenciales de dos especies aromáticas de consumo ampliamente extendido entre la población: manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y menta (*Mentha piperita*). Igualmente se han estudiado los principales componentes de dichos aceites esenciales (camazuleno y α -bisabolol en el caso de la manzanilla; mentol, mentona y acetato de mentilo para la menta), y de tres derivados sesquiterpénicos (farnesol, nerolidol y elemol). La selección de estas especies se ha realizado teniendo en cuenta que los aceites esenciales de manzanilla y de menta, así como sus principales componentes, y los sesquiterpenos antes citados, han mostrado actividad frente a distintos agentes patógenos (Aggag y Yousef, 1972; Carvalho et al., 2012; Inouye et al., 2001; Machado 2010; Maggiore et al., 2012; Vidal et al., 2007).

Por otra parte, dado que el albendazol es empleado por algunos clínicos en el tratamiento de la anisakiosis, se ha realizado el estudio *in vivo* de la actuación de este derivado benzimidazólico frente a las L₃ de *Anisakis* Tipo I.

En relación con los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*, mientras que el aceite esencial de manzanilla a la concentración de 125 µg/ml produce el 100% de mortalidad a las 4 horas del inicio de la experiencia, para el aceite esencial de menta esta mortalidad tan solo se observa a las 4 h cuando la concentración es de 250 µg/ml. Esta diferencia de potencia en la actividad larvicida de ambos aceites esenciales tan solo puede ser atribuida a la distinta composición de ambos. Así, mientras que en el aceite esencial de manzanilla predominan compuestos sesquiterpénicos tales como el α -bisabolol y el camazuleno, en el de menta sus principales componentes responden a una estructura monoterpénica derivada del mentol. Cuando se someten a consideración los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* con los principales componentes del A.E. de menta, se observa que ninguno de los tres monoterpenos ensayados (mentol, mentona y acetato de mentilo) es capaz de provocar el 100% de mortalidad a la concentración de 125 µg/ml, y tan solo el mentol produce el 100% de la muerte de las larvas a las dos concentraciones más altas ensayadas (250 µg/ml y 187'5 µg/ml). En el caso de los principales componentes del aceite esencial de manzanilla, el α -bisabolol dio lugar a la muerte de todas las larvas a todas las concentraciones ensayadas, siendo la menor de 31'2 µg/ml, dato que puede justificar la mayor potencia larvicida del aceite esencial de manzanilla en los ensayos *in vitro*, mientras que el camazuleno, no mostró actividad larvicida a ninguna de las concentraciones ensayadas.

En cuanto a los restantes compuestos sesquiterpénicos testados en las pruebas *in vitro*, los resultados muestran que tanto nerolidol, como farnesol y elemol ocasionan el 100% de mortalidad de las larvas L₃ desde la primera lectura cuando se emplearon las concentraciones de 125 µg/ml. Ahora bien, cabe reseñar la mayor actividad *in vitro* del nerolidol, ya que este sesquiterpeno mantuvo la máxima actividad larvicida incluso a la más baja de las concentraciones ensayadas (31'2 µg/ml).

A la vista de los datos obtenidos, se propone la siguiente capacidad larvicida *in vitro* para los distintos productos ensayados:

Nerolidol = α -bisabolol > farnesol > elemol > A.E. manzanilla > mentol = A.E. menta-manzanilla > A.E. menta = mentona = acetato de mentilo = camazuleno

Cuando se plantea la posible causa de la mortalidad de las larvas, los estudios histológicos revelan que, en términos generales, tanto los dos aceites esenciales (menta y manzanilla), como sus principales componentes y el nerolidol, producen una alteración en la cutícula y tracto digestivo del parásito, impidiendo de esta forma su viabilidad. En el caso de elemol y farnesol, tan solo se afectó la cutícula. Y si bien en nuestras experiencias no se han incluido estudios tendentes a poner de manifiesto el mecanismo de acción de los distintos productos ensayados, se conoce que la interacción de los aceites esenciales y de sus componentes sobre las membranas celular y mitocondrial de las bacterias da lugar a cambios importantes en la estructura de las mismas, con acumulación de los A.E. en la parte hidrofóbica de las membranas, lo cual ocasiona una modificación de su permeabilidad, provocando en ocasiones el hinchamiento de las mismas (Burt, 2004; Sikkema et al., 1995).

Con respecto a los resultados *in vivo*, en las ratas a las que se administró el A.E. de manzanilla junto con las larvas, tan sólo se observaron lesiones en la mucosa gástrica en un 2'2% de los animales, frente al 93'3% del grupo control. En las ratas tratadas con el A.E. de menta, no aparecieron lesiones en el tracto gastrointestinal ni larvas clavadas en el tracto digestivo de los animales, por lo que podemos deducir que este A.E. reduce la capacidad patogénica de las larvas de manera significativa frente al control ($p < 0'001$). En relación con los derivados mono y sesquiterpénicos ensayados, para el α -bisabolol tan sólo se encontraron lesiones en el 5'5% de los animales del grupo tratado y un reducido número de larvas en cavidad (3'3%), a diferencia de los otros derivados sesquiterpénicos testados en las pruebas *in vivo*, nerolidol y farnesol. En este caso, se encontraron menos larvas en cavidad (1'1% para ambos productos) pero el 20% de las ratas del grupo tratado, presentó lesiones, siendo todavía menor la actividad larvicida *in vivo* del elemol, ya que el 40% de las ratas a las que se administró este sesquiterpeno mostraron lesiones, frente al 86'6 % del grupo control.

El mentol, acetato de mentilo y mentona, mostraron la misma actividad protectora frente a lesiones, disminuyendo así el poder patógeno de las larvas. El hecho de que estos componentes sean activos en los ensayos *in vivo*, a diferencia de lo observado *in vitro*, puede ser atribuido a que en presencia del pH gástrico

(2'5) el acetato de mentilo se hidrolice, dando lugar a mentol, mientras que en la mentona su agrupación cetónica podría sufrir una reducción con la consiguiente formación de dicho alcohol monoterpénico. Habida cuenta de que las concentraciones de cada uno de estos compuestos en el aceite esencial de menta [acetato de mentilo (68'1%), mentona (23'1%), y mentol (< 1%)], cabría suponer que la composición de este A.E., tras la actuación de las condiciones hidrolizantes y reductoras del pH gástrico, correspondería a un contenido en mentol superior al 90%.

Hay que tener también en consideración que el porcentaje de larvas muertas encontradas en las ratas tratadas con el A.E. de menta es mayor (47'7%) que el del mentol (12'2%), acetato de mentilo (16'7%) y mentona (23'3%), por lo cual el efecto larvicida del A.E. de menta debe ser atribuido al efecto sinérgico de los distintos componentes del mismo. Algo similar ocurre con el A.E. de manzanilla, de muy inferior actividad larvicida (23'9%) al de menta, pero muy superior a la encontrada para el α -bisabolol (4'4%). Este conjunto de datos ratifica la tesis (Bruneton, 2001) según la cual, los distintos compuestos presentes en cada uno de los aceites esenciales actúan de forma sinérgica, lo que justifica, tanto para el A.E. de menta como para el de manzanilla, que su actividad larvicida sea claramente superior a la de cada uno de los componentes por separado.

Las dosis únicas de albendazol se han mostrado eficaces para el tratamiento de diversos helmintos (Flórez, 2003), lo cual ha podido favorecer el uso frecuente de este fármaco para combatir la anisakiosis humana (De Vera et al., 2002; Filauro et al., 2011; Ioli, 1998; Magnaval et al., 2002; Moore et al., 2002; Pacios et al., 2005). Ahora bien, los resultados obtenidos en las experiencias *in vitro* mostraron, a las concentraciones estudiadas, una nula actividad larvicida. Ello es lógico, habida cuenta de que el albendazol se comporta como un profármaco, que ha de sufrir metabolización hepática para dar lugar a la formación del metabolito activo (sulfóxido de albendazol). En las pruebas *in vivo* los datos obtenidos muestran que el A.E. de menta y sus principales componentes, comparados con el albendazol, son significativamente más activos que este derivado benzimidazólico (46'7%), si bien a su vez éste reduce el porcentaje de lesiones con respecto al control (93'3%) así como de larvas en cavidad y fijas en el tracto gastrointestinal. Por otro lado, no

muestra actividad larvicida ya que los nematodos recuperados mantienen su movilidad más de 48 h. Estos resultados pueden ser debidos a la baja solubilidad del albendazol a pH ácido (Flórez, 2003), reduciendo así su posible actividad inhibitoria de la absorción de glucosa por la cutícula del parásito (Árias-Díaz et al., 2006; Dziekonska-Rynko et al., 2002).

Una de las principales limitaciones de la administración por vía oral de los aceites esenciales, es la posibilidad de que produzcan un efecto irritante sobre las mucosas del tracto gastrointestinal. En este sentido, en ningún caso las dosis ensayadas de los distintos productos produjeron cambios significativos en los valores de MPO (mieloperoxidasa), enzima indicativo del daño irritativo sobre la mucosa de estómago, intestino delgado y ciego.

A la vista de los resultados obtenidos en las experiencias *in vitro* e *in vivo*, se puede concluir que el A.E. de menta y sus principales componentes podrían ser de interés en la profilaxis/tratamiento de las infecciones por *Anisakis*.

En las larvas extraídas de los animales tratados con los productos naturales hemos detectado que *A. simplex* s.s. es la especie más implicada en los daños producidos en el sistema digestivo ($p=0'011$), lo cual estaría en consonancia con los resultados obtenidos anteriormente en la determinación del poder patógeno experimental. La ausencia de lesiones, larvas en cavidad y/o fijas en el tracto gastrointestinal en las ratas tratadas con el A.E. de menta y sus componentes muestran claramente su eficacia frente a este parásito. El tratamiento con A.E. manzanilla y α -bisabolol también se mostró capaz de reducir la viabilidad de las larvas. Así en las ratas control, las larvas extraídas presentaron un riesgo de producir lesión de 20'58 y 11'38 veces mayor que en el caso de las larvas procedentes de los animales tratados con A.E. de manzanilla y α -bisabolol respectivamente. En las ratas tratadas con albendazol, las larvas presentaron un riesgo de producir lesión un 7'5% menor que el control ($p=0'002$) y un riesgo 5'21 veces mayor que en las tratadas con manzanilla ($p=0'042$), mientras que no se observaron diferencias significativas en relación con α -bisabolol ($p=0'129$).

CONCLUSIONES

Conclusiones.

1. Se ha aislado por primera vez *A. brevispiculata* de bacaladillas capturadas en la costa atlántica española y *A. paggiae* en diferentes puntos de pesca del Mediterráneo, ampliándose así la zona geográfica y hospedador.
2. La capacidad patógena de las larvas L₃ de *Anisakis* está asociada al morfotipo y especie a los que pertenecen. Así, *Anisakis* Tipo I muestra una capacidad para producir lesiones 42 veces mayor que las larvas del morfotipo II. Además, los daños vasculares producidos son mayores.
3. El riesgo de penetración en el tracto gastrointestinal de *A. pegreffii* es un 65% (IC 95%: 11 a 86%) menor que el de *A. simplex* s.s., siendo por lo tanto *A. pegreffii* menos patógena que *A. simplex* s.s.
4. Entre *A. physeteris* y *A. paggiae* no se observaron diferencias de patogenicidad mostrando la misma capacidad patógena que *A. pegreffii* ($p \geq 0,543$).
5. Nuestros resultados justifican que *A. simplex* s.s. se considere como principal agente etiológico de la anisakiosis humana, incluso en zonas donde *A. pegreffii*, es la especie predominante en peces. A pesar de ello, *A. pegreffii*, *A. paggiae* y *A. physeteris* también son capaces de provocar la infección, especialmente *A. pegreffii* por su mayor presencia en el pescado de consumo.
6. Las larvas encapsuladas en vísceras del pez presentan menor patogenicidad que las encontradas libres en la cavidad.
7. Las secuencias del gen *cox2* han sido útiles para confirmar la identificación específica de las larvas Tipo II realizada con la técnica PCR-RFLP del fragmento ITS1-5,8s-ITS2. El análisis comparativo de nuestras secuencias y las obtenidas de GenBank nos ha permitido comprobar la existencia de una gran diversidad genética dentro del morfotipo II, especialmente dentro de *A. paggiae* y *A. physeteris*.
8. Los dos aceites esenciales ensayados (*Matricaria chamomilla* y *Mentha piperita*) poseen actividad *in vitro* a la concentración de 125 µg/ml. Los componentes de dichos aceites esenciales que mostraron una mayor actividad larvicida a dicha concentración, fueron α -bisabolol y mentol. El estudio

histológico de las L₃ permite afirmar, *in vitro*, que los distintos productos ensayados afectan al tracto intestinal y cutícula del parásito.

9. La actividad larvicida *in vivo* del A.E. de menta es mayor que la de cualquiera de sus componentes. Algo similar ocurre con el A.E. de manzanilla, de muy inferior actividad larvicida al de menta, pero muy superior a la encontrada para el α -bisabolol.
10. Elemol, farnesol y nerolidol, han sido activos *in vitro* frente a las larvas L₃ de *Anisakis* tipo I, correspondiendo la mayor potencia larvicida al nerolidol. El nerolidol ocasiona daños tanto en la cutícula como en el intestino del parásito, daños que sólo se aprecian en cutícula para farnesol y elemol. La mayor actividad *in vivo* correspondió a farnesol y nerolidol.
11. El albendazol no mostró actividad larvicida en ningún caso, si bien redujo el porcentaje de lesiones con respecto al control. Tanto *in vitro* como *in vivo*, los productos naturales ensayados, con excepción del camazuleno, fueron más activos que el albendazol. Ninguno de los componentes ensayados *in vivo* producen irritación sobre las mucosas gastrointestinales de los animales de experimentación.
12. Los datos obtenidos, conjuntamente con la baja toxicidad de los productos naturales ensayados, permiten concluir que son mejores agentes biocidas frente a las larvas L₃ de *Anisakis* tipo I que albendazol, en especial, el A.E. de menta y sus componentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Abattouy, N., López, A. V., Maldonado, J. L., Benajiba, M. H., y Martín-Sánchez, J. (2013). Epidemiology and molecular identification of *Anisakis pegreffii* (nematoda: Anisakidae) in the horse mackerel *Trachurus trachurus* from northern Morocco. *Journal of Helminthology*, 6, 1-7. doi:10.1017/S0022149X13000102
- Abattouy, N., Valero, A., Benajiba, M. H., Lozano, J., y Martín-Sánchez, J. (2011). *Anisakis simplex* s.l. parasitization in mackerel (*Scomber japonicus*) caught in the north of Morocco--prevalence and analysis of risk factors. *International Journal of Food Microbiology*, 150(2-3), 136-139. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.026
- Abattouy, N., Valero, A., Martín-Sánchez, J., Penalver, M. C., y Lozano, J. (2012). Sensitization to *Anisakis simplex* species in the population of northern Morocco. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 22(7), 514-519.
- Abe, N. (2008). Application of the PCR-sequence-specific primers for the discrimination among larval *Anisakis simplex* complex. *Parasitology Research*, 102(5), 1073-1075. doi:10.1007/s00436-008-0886-7
- Abe, N., Ohya, N., y Yanagiguchi, R. (2005). Molecular characterization of *Anisakis pegreffii* larvae in pacific cod in japan. *Journal of Helminthology*, 79(4), 303-306.
- Abe, N., Tominaga, K., y Kimata, I. (2006). Usefulness of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the internal transcribed spacer region of rDNA for identification of *Anisakis simplex* complex. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 59(1), 60-62.
- Abollo, E., Gestal, C., y Pascual, S. (2001). *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from galician waters: An updated perspective. *Parasitology Research*, 87(6), 492-499.
- Abollo, E., Paggi, L., Pascual, S., y 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), 175-181.

- Acebes Rey, J., Fernández Orcajo, P., y Díaz González, G. (1996). Dos casos de anisakiasis en el hospital del Río Hortega. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 88, 59-60.
- Adams, A. M., Miller, K. S., Wekell, M. M., y Dong, F. M. (1999). Survival of *Anisakis simplex* in microwave-processed arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Journal of Food Protection*, 62(4), 403-409.
- Adams, M., Motarjemi, Y. (1999). *Basic Food Safety for Health Workers*. Ginebra: World Health Organization.
- Adroher, F. J., Valero, A., Ruíz-Valero, J., y Iglesias, L. (1996). Larval *anisakids* (nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). *Parasitology Research*, 82(3), 253-256. doi:10.1007/s004360050105
- Agarwal, I., y Mathela, C. (1979). Study of antifungal activity of some terpenoids. *Indian Drugs Pharmaceutical Industry*, 14, 19-21.
- Aggag, M., y Yousef, R. (1972). Study of antimicrobial activity of chamomile oil. *Planta Medica*, 22(06), 140-144.
- Akao, N., Ohyama, T., y Kondo, K. (1990). Immunoblot analysis of serum IgG, IgA and IgE responses against larval excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex* in patients with gastric anisakiasis. *Journal of Helminthology*, 64(4), 310-318. doi:10.1017/S0022149X00012359
- Akasaka, Y., Kizu, M., Aoike, A., y Kawai, K. (1979). Endoscopic management of acute gastric anisakiasis. *Endoscopy*, 11(2), 158-162. doi:10.1055/s-0028-1098343
- Alonso, A., Daschner, A., y Moreno-Ancillo, A. (1997). Anaphylaxis with *Anisakis simplex* in the gastric mucosa. *The New England Journal of Medicine*, 337(5), 350-351. doi:10.1056/NEJM199707313370518
- Alonso-Gómez, A., Moreno-Ancillo, A., López-Serrano, M. C., Suarez-de-Parga, J. M., Daschner, A., Caballero, M. T., . . . Cabanas, R. (2004). *Anisakis simplex* only

provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. *Parasitology Research*, 93(5), 378-384. doi:10.1007/s00436-004-1085-9

Alves Ade, M., Goncalves, J. C., Cruz, J. S., y Araujo, D. A. (2010). Evaluation of the sesquiterpene (-)-alpha-bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. *Neuroscience Letters*, 472(1), 11-15. doi:10.1016/j.neulet.2010.01.042

Amin, O., Eidelman, W., Domke, W., Bailey, J., y Pfeifer, G. (2000). An unusual case of anisakiasis in California, USA. *Comparative Parasitology*, 67(1), 71-75.

Amsterdam, J. D., Li, Y., Soeller, I., Rockwell, K., Mao, J. J., y Shults, J. (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral *Matricaria recutita* (chamomile) extract therapy for generalized anxiety disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 29(4), 378-382. doi:10.1097/JCP.0b013e3181ac935c

Anadón, A. M., Romaris, F., Escalante, M., Rodríguez, E., Gárate, T., Cuéllar, C., y 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), 471-478. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03919.x

Anadón, A., Rodríguez, E., Gárate, M., Cuéllar, C., Romarís, F., Chivato, T., . . . Ubeira, F. (2010). Diagnosing human anisakiasis: Recombinant ani s 1 and ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(4), 496-502.

Anderson, R. C. (2000). The superfamily Ascaridoidea. En R. C., Anderson (Eds.), *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission* (pp. 267-350). Wallingford, UK: CAB International.

Angelucci, G., Meloni, M., Merella, P., Sardu, F., Madeddu, S., Marrosu, R., . . . 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), 1769-1775. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-482

Anónimo (2008). *Matricaria chamomilla* (german chamomile). (2008). *Alternative Medicine Review*, 13(1), 58-62.

- Añíbarro, B., y Seoane, F. J. (1998). Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102(2), 331-332.
- Araujo, C., Sousa, M. J., Ferreira, M. F., y Leao, C. (2003). Activity of essential oils from mediterranean lamiaceae species against food spoilage yeasts. *Journal of Food Protection*, 66(4), 625-632.
- Arenal-Vera, J. J., Marcos-Rodríguez, J. L., Borrego-Pintado, M. H., Bowakin, W., Castro-Lorenzo, J., y Blanco-Álvarez, J. I. (1991). Anisakiasis como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico: Primer caso en la literatura médica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 79, 355-358.
- Árias-Díaz, J., Zuloaga, J., Vara, E., Balibrea, J., y Balibrea, J. L. (2006). Efficacy of albendazole against *Anisakis simplex* larvae *in vitro*. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 38(1), 24-26. doi:10.1016/j.dld.2005.09.004
- Arizono, N., Yamada, M., Tegoshi, T., y Yoshikawa, M. (2012). *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii*: Biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(6), 517-521. doi:10.1089/fpd.2011.1076
- Armas, C., Martínez, J., Rodríguez, F., Sánchez, I. Elaboración y uso de salmueras que eliminan el riesgo de anisakiosis. España, ES2233194 A1. (Cl. A23B 4/12), 1 de junio 2005. Último acceso el 25 de marzo de 2014, desde http://www.oepm.es/pdf/ES/0000/000/02/23/31/ES-2233194_A1.pdf
- Armentia, A., Lombardero, M., Callejo, A., Martín Santos, J. M., Gil, F. J., Vega, J., . . . Martínez, C. (1998). Occupational asthma by *Anisakis simplex*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102(5), 831-834.
- Armentia, A., Martín-Gil, F. J., Pascual, C., Martín-Esteban, M., Callejo, A., y Martínez, C. (2006). *Anisakis simplex* allergy after eating chicken meat. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16(4), 258-263.

- Arnedo, M. (1999). Cladismo: La reconstrucción filogenética basada en parsimonia. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 26, 57-84.
- Asaishi, K., Nishino, C., Ebata, T., Totsuka, M., Hayasaka, H., y Suzuki, T. (1980). Studies on the etiologic mechanism of anisakiasis. --1. immunological reactions of digestive tract induced by *Anisakis* larva. *Gastroenterologia Japonica*, 15(2), 120-127.
- Asturias, J. A., Eraso, E., Moneo, I., y Martínez, A. (2000b). Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*? *Allergy*, 55(9), 898-899.
- Asturias, J. A., Eraso, E., y Martínez, A. (2000a). Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 108(2), 263-267.
- Audicana, L., Audicana, M. T., Fernandez de Corres, L., y Kennedy, M. W. (1997). Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. *The Veterinary Record*, 140(9), 235.
- Audicana, M. T., Ansotegui, I. J., de Corres, L. F., y Kennedy, M. W. (2002). *Anisakis simplex*: Dangerous--dead and alive? *Trends in Parasitology*, 18(1), 20-25.
- Audicana, M. T., y Kennedy, M. W. (2008). *Anisakis simplex*: From obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(2), 360-79, table of contents. doi:10.1128/CMR.00012-07
- Audicana, M., Fernández de Corres, L., Muñoz, D., Del Pozo, M., Fernández, E., García, M., y 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, 325-331.
- Audicana, M., Garcia, M., Del Pozo, M., Díez, J., Munoz, D., Fernández, E., . . . Moneo, I. (2000). Clinical manifestations of allergy to *Anisakis simplex*. *Allergy*, 55(Supp59), 28-33. doi:10.1034/j.1398-9995.2000.03405.x
- Avallone, R., Zanoli, P., Puia, G., Kleinschnitz, M., Schreier, P., y Baraldi, M. (2000). Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochemical Pharmacology*, 59(11), 1387-1394.

- Awad, R., Levac, D., Cybulska, P., Merali, Z., Trudeau, V. L., y Arnason, J. T. (2007). Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85(9), 933-942. doi:10.1139/Y07-083
- Azaz, D., Demirci, F., Satil, F., Kurkcuoglu, M., y Baser, K. H. (2002). Antimicrobial activity of some satureja essential oils. *Journal of Biosciences*, 57(9-10), 817-821.
- Azuma, K., Ito, H., Ippoushi, K., y Higashio, H. (2003). *In vitro* antibacterial activity of extracts from four labiatae herbs against *Helicobacter pylori* and *Streptococcus mutans*. *Bulletin of the National Institute of Vegetable and Tea Science*, 2, 83-91.
- Baeza, M. L., Rodríguez, A., Matheu, V., Rubio, M., Tornero, P., de Barrio, M., . . . Zubeldia, J. M. (2004). Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: Clinical relevance in comparison with somatic allergens. *Clinical and Experimental Allergy*, 34(2), 296-302.
- Baeza, M. L., Zubeldia, J. M., y Rubio, M. (2001). *Anisakis simplex* allergy. *Allergy and Clinical Immunology International*, 13(6), 242-249.
- Baldwin, R. E., Rew, M. B., Johansson, M. L., Banks, M. A., y Jacobson, K. C. (2011). Population structure of three species of *Anisakis* nematodes recovered from pacific sardines (*Sardinops sagax*) distributed throughout the california current system. *The Journal of Parasitology*, 97(4), 545-554. doi:10.1645/GE-2690.1
- Banning, P. (1971). Some notes on a succesful rearing of the herring-worm *Anisakis marina* L. (Nematoda: Heterocheilidae). *Journal du Conseil International pour L'exploration de la Mer*, 34, 84-88. Doi: 10.1093/icesjms/34.1.84
- Banning, P., y Becker, H. B. (1978). Long-term survey data (1965-1972) on the occurrence of *Anisakis* larvae (nematoda: Ascaridida) in herring, *Clupea harengus* L., from the north sea. *Journal of Fish Biology*, 12(1), 25-33. doi:10.1111/j.1095-8649.1978.tb04147.x
- Barón, S., Martín-Sánchez, J., Gallego, M., Morales-Yuste, M., Boussaa, S., y Morillas-Marquez, F. (2008). Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA cyt b) of

- Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta Tropica*, 107(3), 259-267. doi:10.1016/j.actatropica.2008.07.003
- Beitia, J. M., Tornero, P., Sainz, J. C., Barranco, R., Infante, S., Baeza, M. L., y Herrero, T. (2002). Contact dermatitis caused by *Anisakis simplex*: A case report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 109(1), S78-S78. doi:dx.doi.org/10.1016/S0091-6749(02)81334-3
- Bendimerad, N., Taleb Bendiab, S. A., Benabadji, A. B., Fernández, X., Valette, L., y Lizzani-Cuvelier, L. (2005). Composition and antibacterial activity of *pseudocytisus integrifolius* (salisb.) essential oil from Algeria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2947-2952. doi:10.1021/jf047937u
- Bereciartua, J. A. Procedimiento para eliminar perásitos del pescado. España, ES2213486A1. (Cl. A23B 4/015), 16 de agosto 2004. Último acceso el 25 de marzo de 2014, desde <http://invenes.oepm.es/InvenesWeb/detalle?referencia=P200300158>
- Berland, B. (1961). Nematodes from some norwegian marine fishes. *Sarsia*, 2(1), 1-50.
- Berry, M. (1995). The chamomiles. *The Pharmaceutical Journal*, 254, 191-193.
- Bezerra, S. B., Leal, L. K., Nogueira, N. A., y Campos, A. R. (2009). Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: Role of prostaglandins, nitric oxide, and KATP+ channels. *Journal of Medicinal Food*, 12(6), 1403-1406. doi:10.1089/jmf.2008.0290
- Blaszczyk, T., Krzyzanowska, J., y Lamer-Zarawska, E. (2000). Screening for antimycotic properties of 56 traditional chinese drugs. *Phytotherapy Research: PTR*, 14(3), 210-212.
- Boczon, K., y Bier, J. W. (1986). *Anisakis simplex*: Uncoupling of oxidative phosphorylation in the muscle mitochondria of infected fish. *Experimental Parasitology*, 61(2), 270-279.
- Boettge, K. (1954). Huiles essentielles et spasmodolyse. *Medizinische Natatschrift*, 8, 444-446.

- Bouree, P., Paugam, A., y Petithory, J. C. (1995). Anisakidosis: Report of 25 cases and review of the literature. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 18(2), 75-84. doi:dx.doi.org/10.1016/0147-9571(95)98848-C
- Bratney, J. (1988). A simple technique for recovering larval ascaridoid nematodes from the flesh of marine fish. *The Journal of Parasitology*, 74(4), 735-737.
- Bratney, J., y Clark, K. J. (1992). Effect of temperature on egg hatching and survival of larvae of *Anisakis simplex* B (nematoda: Ascaridoidea). *Canadian Journal of Zoology*, 70(2), 274-279.
- Brehm-Stecher, B. F., y Johnson, E. A. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3357-3360.
- Bruins, A. (1979). Negative ion chemical ionization mass spectrometry in the determination of components in essential oils. *Analytical Chemistry*, 51(7), 967-972.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*, 2ª Edición. Zaragoza, España: Acríbia SA.
- Bublitz, C. G., y Choudhury, G. S. (1993). Effect of light intensity and color on worker productivity and parasite detection efficiency during candling of cod fillets. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(2), 75-89.
- Bucci, C., Gallotta, S., Morra, I., Fortunato, A., Ciacci, C., y Iovino, P. (2013). *Anisakis*, just think about it in an emergency!. *Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, doi:10.1016/j.ijid.2013.05.008;
- Buendía, E. (2000). ¿Cuándo se producen reacciones alérgicas por *Anisakis simplex*?. *Alergología e Inmunología Clínica*, 15, 221-222.
- Bullerman, L., Lieu, F., y Seier, S. A. (1977). Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils. Cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science*, 42(4), 1107-1109.

- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Busmann, B., y Ehrlich, S. (1979). Investigations on infestation of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) with larval *Anisakis* sp. (nematoda: Ascaridida). *Archiv für Fischereiwissenschaft*, 29, 155-165.
- Buzzell, G. R., y Sommerville, R. (1985). The structure of the esophagus in the third-stage infective larva of *Anisakis* sp.(nematoda: Anisakidae). *Transactions of the American Microscopical Society*, , 86-94.
- Caballero, M. L., Moneo, I., Gómez-Aguado, F., Corcuera, M. T., Casado, I., y Rodríguez-Pérez, R. (2008). Isolation of ani s 5, an excretory-secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis* larvae sensitization. *Parasitology Research*, 103(5), 1231-1233. doi:10.1007/s00436-008-1105-2
- Caballero, M. L., Umpierrez, A., Moneo, I., y Rodríguez-Pérez, R. (2011). Ani s 10, a new *Anisakis simplex* allergen: Cloning and heterologous expression. *Parasitology International*, 60(2), 209-212. doi:10.1016/j.parint.2011.01.003
- Caballero, M. L., y Moneo, I. (2004). Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitology Research*, 93(3), 248-251. doi:10.1007/s00436-004-1099-3
- Cabo, J., Bravo, L., Jiménez, J., y Navarro, C. (1980). *Thynus hiemalis* lange. Etude cuali- et quantitative de son huile essentielle per G.C. *Planta Medica*, 39, 270.
- Campbell, N., Cross, M. A., Chubb, J. C., Cunningham, C. O., Hatfield, E., y MacKenzie, K. (2007). Spatial and temporal variations in parasite prevalence and infracommunity structure in herring (*Clupea harengus* L.) caught to the west of the british isles and in the north and baltic seas: Implications for fisheries science. *Journal of Helminthology*, 81(02), 137-146.
- Canut, A., Labora, A., López, J., y Romero, J. (1996). Anisakiosis gástrica aguda por cocción insuficiente en horno microondas. *Medicina Clínica*, 8, 317-318.

- Carretero Añibarro, P., Blanco Carmona, J., García Gonzalez, F., Marcos Durantez, M., Alonso Gil, L., Garces Sotillos, M., . . . Gutiérrez Ortega, M. C. (1997). Protein contact dermatitis caused by *Anisakis simplex*. *Contact Dermatitis*, 37(5), 247. doi:10.1111/j.1600-0536.1997.tb02453.x
- Carson, C. F., Mee, B. J., y Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Carvalho, C. O., Chagas, A. C., Cotinguiba, F., Furlan, M., Brito, L. G., Chaves, F. C., . . . Amarante, A. F. (2012). The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. *Veterinary Parasitology*, 183(3-4), 260-268. doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.051
- Castán, B., Borda, F., Iñarrairaegui, M., Pastor, G., Vila, J., y Zozaya, J. (2002). Anisakiasis digestiva: Clínica y diagnóstico según la localización. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 94(8), 463-472.
- Cavaliere, E., Mariotto, S., Fabrizi, C., de Prati, A. C., Gottardo, R., Leone, S., . . . Suzuki, H. (2004). Alpha-bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(3), 589-594. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.088
- Cavallero, S., Ligas, A., Bruschi, F., y D'Amelio, S. (2012). Molecular identification of *Anisakis* spp. from fishes collected in the tyrrhenian sea (NW mediterranean). *Veterinary Parasitology*, 187(3-4), 563-566. doi:10.1016/j.vetpar.2012.01.033
- Cavallero, S., Nadler, S. A., Paggi, L., Barros, N. B., y 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), 781-792. doi:10.1007/s00436-010-2226-y
- Ceballos-Mendiola, G., Valero, A., Polo-Vico, R., Tejada, M., Abattouy, N., Karl, H., . . . 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), 1399-1404. doi:10.1007/s00436-010-2009-5

Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Anisakiasis, resources for health professionals. Último acceso el 24 de marzo de 2014, desde http://www.cdc.gov/parasites/anisakiasis/health_professionals/

Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. (1997). Boletín Epidemiológico Semanal. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. *Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología*, 5(33), 313-324.

Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. (1998). Boletín Epidemiológico Semanal. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. *Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología*, 6(31), 297-308.

Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. (1999). Boletín Epidemiológico Semanal. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. *Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología*, 7(21), 233-244.

Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. (2000). Boletín Epidemiológico Semanal. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. *Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología*, 8(24), 265-276.

Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. (2001). Boletín Epidemiológico Semanal. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. *Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología*, 9(29), 305-312.

Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. (2002). Boletín epidemiológico semanal. Comentario epidemiológico de las enfermedades de

declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. *Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología*, 10(26), 277-284.

Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. (2003). Boletín epidemiológico semanal. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. *Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología*, 11(29), 325-336.

Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. (2004). Boletín epidemiológico semanal. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. *Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología*, 12(26), 289-296.

Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. (2005). Boletín epidemiológico semanal. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. *Ministerio de Sanidad y Consumo. Centro Nacional de Epidemiología*, 13(23), 265-276.

Céspedes, R. E., Iannacone, J., y Salas, A. (2011). Helmintos parásitos de *Dosidicus gigas* "pota" eviscerada en Arequipa, Perú. *Ecología Aplicada*, 10(1), 1-11.

Chaligiannis, I., Lalle, M., Pozio, E., y Sotiraki, S. (2012). Anisakidae infection in fish of the Aegean sea. *Veterinary Parasitology*, 184(2-4), 362-366. doi:10.1016/j.vetpar.2011.09.007

Chao, S. C., Young, D. G., y Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 639-649.

Chen, W., Hou, J., Yin, Y., Jang, J., Zheng, Z., Fan, H., y Zou, G. (2010). Alpha-bisabolol induces dose- and time-dependent apoptosis in HepG2 cells via a fas- and mitochondrial-related pathway, involves p53 and NFkappaB. *Biochemical Pharmacology*, 80(2), 247-254. doi:10.1016/j.bcp.2010.03.021

Chía, N., Romero, M., Polo-Vico, R., Gómez-Mateos, M., Abattouy, N., y Valero, A. (2010). Estudio epidemiológico de *Anisakis* tipo I en la bacaladilla (*Micromesistius*

- poutassou*) del noroeste de España. *Ars Pharmaceutica*, 51(Suplemento 3), 829-834.
- Cho, S. H., Lee, S. E., Park, O. H., Na, B. K., y Sohn, W. M. (2012). Larval anisakid infections in marine fish from three sea areas of the Republic of Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 50(4), 295-299. doi:10.3347/kjp.2012.50.4.295
- Cho, T. H., Park, H. Y., Cho, S., Sohn, J., Yoon, Y. W., Cho, J. E., y Cho, S. W. (2006). The time course of biological and immunochemical allergy states induced by *Anisakis simplex* larvae in rats. *Clinical and Experimental Immunology*, 143(2), 203-208. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02981.x
- Choi, W. I., Lee, E. H., Choi, B. R., Park, H. M., y Ahn, Y. J. (2003). Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 96(5), 1479-1484.
- Cinco, M., Banfi, E., Tubaro, A., y Loggia, R. D. (1983). A microbiological survey on the activity of a hydroalcoholic extract of camomile. *Pharmaceutical Biology*, 21(4), 145-151.
- Clavel, A., Delgado, B., Sánchez-Acedo, C., Carbonell, E., Castillo, J., Ramírez, J., ... Kagei, N. (1993). A live *Anisakis physeteris* larva found in the abdominal cavity of a woman in Zaragoza, Spain. *Japanese Journal of Parasitology*, 42(5), 445-448.
- Cocheton, J. J., Cabou, I., y Lecomte, I. (1991). Anisakiase et infections par les anisakidés. *Annales de Médecine Interne*, 142(2) 121-130.
- Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2005). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de *Anisakis* (Nº referencia: AESA-2005-008). *Revista del Comité Científico*, 1, 19-35. Último acceso el 13 de octubre de 2012, desde <http://www.parcode.es/centro/guias/Alergia%20por%20Anisakis%20%20AESA.pdf>

- Comité Científico de la 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. (Nº referencia: AESAN-2009-007). *Revista del Comité Científico*, 10, 19-35. Último acceso el 23 de Mayo de 2012, desde http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/revistas/20comite_cientifico_10.pdf
- Consejo de Europa. (2001). *European pharmacopoeia: Fourth edition* (4ª ed.). Strasbourg: Council of Europe.
- Corpas-López, V. (2011). *Actividad del α -bisabolol frente a amastigotes intracelulares de Leishmania infantum* (Trabajo Final de Máster). Universidad de Granada, Granada.
- Couture, C., Gagnon, J., y Desbiens, C. (2003). Human intestinal anisakiosis due to consumption of raw salmon. *The American Journal of Surgical Pathology*, 27(8), 1167-1172.
- Cross, H. (2000). Fish- and invertebrate-Borne Helminths. En Y. H. Hui, S. A. Sattar y W. K. Nip (Eds.), *Foodborne Disease Handbook Vol. 2*, (pp. 258-261). New York: CRC Press.
- Cross, M., Collins, C., Campbell, N., Watts, P., Chubb, J., Cunningham, C., . . . MacKenzie, K. (2007). Levels of intra-host and temporal sequence variation in a large CO1 subunits from *Anisakis simplex sensu stricto* (rudolphi 1809)(nematoda: Anisakidae): Implications for fisheries management. *Marine Biology*, 151(2), 695-702.
- Croteau, R. (1977). Site of monoterpene biosynthesis in majorana hortensis leaves. *Plant Physiology*, 59(3), 519-520.
- Cruchaga, S., Pascual, J., Muñoz, F., Guerra, A., y Ladron de Guevara, C. (1995). Hallazgo endoscopico de una larva de gusano en el fondo de ulcera gastrica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 13, 631-632.

- Cuellar, M., Fontanillas, J., Pérez Fuentes, J., y Pérez Tauler, M. (1991). Biología y epidemiología de la anisakidosis larvaria. Enfermedad del arenque. *Ciencias Veterinarias*, 4, 57-61.
- Cuende, E., Audicana, M. T., García, M., Anda, M., Fernández Corres, L., Jiménez, C., y Vesga, J. C. (1998). Rheumatic manifestations in the course of anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 16(3), 303-304.
- Dailey, M. D., y Brownell, R. L. (1972). En S. Ridgeway (Ed.), *Mammals of the sea: Biology and Medicine*. (pp. 528-589). Springfield, Illinois: Charles C. Thomas.
- Damayanti, M., Susheela, K., y Sharma, G. J. (1996). Effect of plant extracts and systemic fungicide on the pineapple fruit-rotting fungus, *Ceratocystis paradoxa*. *Cytobios*, 86(346), 155-165.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K. D., Brandonisio, O., Lucarelli, G., Doronzo, F., y Paggi, L. (1999). Diagnosis of a case of gastric anisakidosis by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Parassitologia*, 41(4), 591-593.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K. D., Santos, C. P., Pugachev, O. N., Webb, S. C., Picanco, M., y Paggi, L. (2000). Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology*, 30(2), 223-226.
- D'Amelio, S., Paggi, L., Ingrosso, S., Busi, M., y Giuffra, E. (2010). *Anisakis*. En L. Dongou (Ed.), *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. (pp. 757-766). USA: CRC Press.
- Darra, E., Abdel-Azeim, S., Manara, A., Shoji, K., Marechal, J. D., Mariotto, S., . . . Suzuki, H. (2008). Insight into the apoptosis-inducing action of alpha-bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and bid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 113-123. doi:10.1016/j.abb.2008.02.004
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Caballero, T., Barranco, P., Suárez-De-Parga, J. M., y López-Serrano, M. C. (1998). Gastric anisakiasis: An underestimated cause of acute urticaria and angio-oedema? *The British Journal of Dermatology*, 139(5), 822-828.

- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Caballero, T., Suárez-De-Parga, J. M., y López-Serrano, M. C. (1999). Usefulness of early serial measurement of specific and total immunoglobulin E in the diagnosis of gastro-allergic anisakiasis. *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 29(9), 1260-1264.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Cábanas, R., Suárez-de-Parga, J. M., y López-Serrano, M. C. (2000). Gastroallergic anisakiasis: Borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(1 Pt 1), 176-181.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Mora, C., Moreno-Ancillo, A., Villanueva, R., y López-Serrano, M. (1997). Anisakiasis gastro-alérgica con parasitación masiva. *Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica*, 12, 370-372.
- Daschner, A., Cuellar, C., Sánchez-Pastor, S., Pascual, C. Y., y Martín-Esteban, M. (2002). Gastro-allergic anisakiasis as a consequence of simultaneous primary and secondary immune response. *Parasite Immunology*, 24(5), 243-251.
- Daschner, A., Cuellar, C., y Rodero, M. (2012). The *Anisakis* allergy debate: Does an evolutionary approach help? *Trends in Parasitology*, 28(1), 9-15. doi:10.1016/j.pt.2011.10.001
- Davey, J. (1971). A revision of the genus *Anisakis* dujardin, 1845 (nematoda: Ascaridata). *Journal of Helminthology*, 45(11), 51-72. doi:10.1017/S0022149X00006921
- Davey, J. T. (1972). The incidence of *Anisakis* sp. larvae (nematoda: Ascaridata) in the commercially exploited stocks of herring (*Clupea harengus* L., 1758,) (pisces: Clupeidae) in british and adjacent waters. *Journal of Fish Biology*, 4(4), 535-554. doi:10.1111/j.1095-8649.1972.tb05700.x
- De la Torre Molina, Rafaela, Pérez Aparicio, J., Hernández Bienes, M., Jurado Pérez, R., Martínez Ruso, A., y Morales Franco, E. (2000). Anisákiasis en pescados frescos

- comercializados en el norte de Córdoba. *Revista Española de Salud Pública*, 74(5-6), 517-526.
- De Ley, P., y Blaxter, M. (2004). A new system for nematoda: Combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. En R. C. Cokk, y D. J. Hunt (Eds.), *Nematology Monographs and Perspectives* (pp. 633-653). Boston: Brill, Leiden.
- Deardorff, T. L., Fukumura, T., y Raybourne, R. B. (1986). Invasive anisakiasis. A case report from hawaii. *Gastroenterology*, 90(4), 1047-1050.
- Decisión de la comisión europea (93/140/CEE) de 19 de enero por la que se establecen las modalidades del control visual para detectar parásitos en los productos de la pesca Diario oficial nº L 056 de 9/03/1993.
- Del Pozo, M. D., Audicana, M., Díez, J. M., Muñoz, D., Ansotegui, I. J., Fernández, E., . . . Fernández de Corres, L. (1997). *Anisakis simplex*, a relevant etiologic factor in acute urticaria. *Allergy*, 52(5), 576-579.
- Del Rey Moreno, A. (2003). *Estudio parasitológico, epidemiológico y clínico de la anisakidosis en la comarca de Antequera* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, Granada.
- Del Rey Moreno, A., Valero, A., Mayorga, C., Gómez, B., Torres, M. J., Hernández, J., . . . Lozano Maldonado, J. (2006). Sensitization to *Anisakis simplex* s.l. in a healthy population. *Acta Tropica*, 97(3), 265-269. doi:10.1016/j.actatropica.2005.11.007
- Del Rey-Moreno, A., Valero-López, A., Gómez-Pozo, B., Mayorga-Mayorga, C., Hernández-Quero, J., Garrido-Torres-Puchol, M. L., . . . Lozano-Maldonado, J. (2008). Use of anamnesis and immunological techniques in the diagnosis of anisakidosis in patients with acute abdomen. [Utilidad de la anamnesis y de las técnicas inmunológicas en el diagnóstico de la anisakidosis en pacientes con abdomen agudo] *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(3), 146-152.
- De Vera, F., Carnicer, F., Morales, C., y Niveiro, M. (2002). Ileitis with recurrent ascites. [Ileitis con ascitis de curso recurrente] *Revista Clínica Española*, 202(1), 37-38.

Directiva 2004/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de abril de 2004 por la que se derogan determinadas directivas que establecen las condiciones de higiene de los productos alimenticios y las condiciones sanitarias para la producción y comercialización de determinados productos de origen animal destinados al consumo humano y se modifican las Directivas 89/662/CEE y 92/118/CEE del Consejo y la decisión 95/408/CE. Diario Oficial nº L 157/33 del 30/04/04. Último acceso el 8 de agosto de 2013, desde <http://www.boe.es/doue/2004/157/L00033-00044.pdf>

Directiva 91/493/CEE del Consejo de 22 de Julio de 1991 por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros. Diario Oficial nº L 268/15 del 24/09/91. Último acceso el 8 de agosto de 2013, desde http://www.aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/legislacion_comunitaria/directiva91_493.pdf

Directiva 95/71/CE del Consejo, de 22 de diciembre de 1995, que modifica el anexo de la Directiva 91/493/CEE por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros. Diario oficial nº L 332 de 30/12/1995. (1995). Último acceso el 8 de agosto de 2013, desde <http://www.boe.es/doue/1995/332/L00040-00041.pdf>

Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las decisiones 89/187/CEE y 91/664/CE. Diario oficial nº L 125 de 23/05/1996. Último acceso el 8 de agosto de 2013, desde <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996L0023:ES:HTML>

Directiva 97/79/CE del Consejo de 18 de diciembre de 1997 por la que se modifican las Directivas 71/118/CEE, 72/462/CEE, 85/73/CEE, 85/73/CEE, 91/67/CEE, 91/492/CEE y 91/493/CEE y 92/118/CE por lo que se refiere a la organización de controles veterinarios de los productos que se introduzcan en la Comunidad procedentes de países terceros. Diario Oficial nº L 24/31 del 30/01/98. Último

acceso el 8 de agosto de 2013, desde <http://www.boe.es/doue/1998/024/L00031-00032.pdf>

- Dixon, B. (2006). Health products and food branch-ottawa. isolation and identification of anisakid roundworm larvae in fish. *Government of Canada*. Último acceso el 8 de agosto de 2013, desde <http://seafood.oregonstate.edu/.pdf%20Links/Isolation-and-Identification-of-Anisakid-Roundworm-Larvae-in-Fish.pdf>
- Dodson, C. H., Dressler, R. L., Hills, H. G., Adams, R. M., y Williams, N. H. (1969). Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science*, 164(3885), 1243-1249. doi:10.1126/science.164.3885.1243
- Domínguez Ortega, J., Cimarra, M., Sevilla, M., Alonso Llamazares, A., Moneo, I., Robledo Echarren, T., y Martínez Cócera, C. (2000). *Anisakis simplex*: Una causa de pseudobstrucción intestinal. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 92, 132-135.
- Domínguez-Ortega, J. D., y Martínez-Cócera, C. (2000). Guía de actuación en patología producida por *Anisakis*. *Alergología Inmunología Clínica*, 15, 267, 272.
- Dong, F., Ton, M., Adams, A., MacKenzie, A., y Wekell, M. (Junio, 2000). Survival of *Anisakis simplex* in freeze-processed arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Institute of Food Technologist Annual Meeting*, Dallas, E.E.U.U.
- Dorman, H., y Deans, S. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Dos Reis, P. E. D., de Carvalho, E. C., Bueno, P. C. P., y Bastos, J. K. (2011). Aplicación clínica de la *Chamomilla recutita* en flebitis: Estudio de la curva dosis-respuesta. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 19(1), [09 pantallas].
- Du, C., Zhang, L., Shi, M., Ming, Z., Hu, M., y Gasser, R. B. (2010). Elucidating the identity of *Anisakis* larvae from a broad range of marine fishes from the Yellow sea, China, using a combined electrophoretic-sequencing approach. *Electrophoresis*, 31(4), 654-658. doi:10.1002/elps.200900531

- Duarte, M. C. T, Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G., y Delarmelina, C. (2005). Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 305–311.
- Dziekonska-Rynko, J., Rokicki, J., y Jablonowski, Z. (2002). Effects of ivermectin and albendazole against *Anisakis simplex* *in vitro* and in guinea pigs. *Journal of Parasitology*, 88(2), 395-398. doi: [http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0395:EOIAAA\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0395:EOIAAA]2.0.CO;2)
- Eguia, A., Aguirre, J., Echevarria, M., Martinez-Conde, R., y Ponton, J. (2003). Gingivostomatitis after eating fish parasitized by *Anisakis simplex*: A case report. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 96(4), 437-440. doi:[dx.doi.org/10.1016/S1079-2104\(03\)00264-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1079-2104(03)00264-6)
- Esteve, C., Resano, A., Diaz-Tejeiro, P., y Fernández-Benitez, M. (2000). Eosinophilic gastritis due to *Anisakis*: A case report. *Allergologia et Immunopathologia*, 28(1), 21-23.
- European Food Safety Authority. (2010). Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products, EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ), European Food Safety Authority. *EFSA Journal*, 8(4), 1543. doi:[10.2903/j.efsa.2010.1543](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1543)
- Ezzat, S. (2001). *In vitro* inhibition of *Candida albicans* growth by plant extracts and essential oils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(7), 757-759.
- Fang, W., Xu, S., Zhang, S., Wang, Y., Chen, X., y Luo, D. (2010). Multiple primer PCR for the identification of anisakid nematodes from Taiwan strait. *Experimental Parasitology*, 124(2), 197-201. doi:dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.09.011
- Farag, R. S., Shalaby, A. S., El-Baroty, G. A., Ibrahim, N. A., Ali, M. A., y Hassan, E. M. (2004). Chemical and biological evaluation of the essential oils of different melaleuca species. *Phytotherapy Research: PTR*, 18(1), 30-35. doi:[10.1002/ptr.1348](https://doi.org/10.1002/ptr.1348)

- Farjallah, S., Busi, M., Mahjoub, M. O., Slimane, B. B., Paggi, L., Said, K., y D'Amelio, S. (2008). Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the moroccan and mauritanian coasts. *Parasitology International*, 57(4), 430-436. doi:10.1016/j.parint.2008.05.002
- Fernandez, M., Aznar, F. J., Montero, F. E., & Raga, J. A. (2005). Endoparasites of the blue whiting, *Micromesistius poutassou* from north-west Spain. *Journal of Helminthology*, 79(1), 15-21.
- Fernández de Corres, L. F., Del Pozo, M., Aizpuru, F., y Buendía, E. (2001). Prevalencia de la sensibilización a *Anisakis simplex* en tres áreas españolas, en relación a las diferentes tasas de consumo de pescado. Relevancia de la alergia a *Anisakis simplex*. *Alergología e Inmunología Clínica*, 16, 337-346.
- Fernández de Corres, L., Audicana, M., Del Pozo, M. D., Munoz, D., Fernández, E., Navarro, J. A., . . . 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), 315-319.
- Filauro, M., Rollandi, G. A., Cassola, G., Quilici, P., Angelini, G., Belli, F., y Boccardo, C. (2011). Gastrointestinal bleeding due to suspected anisakiasis: Challenging differential diagnosis for a rare disease. *Updates in Surgery*, 63(3), 213-217. doi:10.1007/s13304-011-0055-x
- Flórez, J. (2005). Fármacos antiparasitarios: Protozoos y helmintos. En J. Flórez (Ed.), *Farmacología humana* (pp. 1367-1390). Barcelona: Masson.
- Food and Agriculture Organization. (2004). Assessment and management of seafood safety and quality. *FAO Fisheries Technical Paper*, 44, 5-14.
- Food and Drug Administration. (2001). Processing parameters needed to control pathogens in cold smoked fish. *Potential hazards in cold-smoked fish: Parasites*. U.S (pp. 5-14). *Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition*: Rockville, MD.

- Franco, F. A., Morillas-Marquez, F., Baron, S. D., Morales-Yuste, M., Galvez, R., Diaz, V., . . . Martin-Sanchez, J. (2010). Genetic structure of *Phlebotomus* (Larroussius) *Ariasi* populations, the vector of *Leishmania Infantum* in the western Mediterranean: Epidemiological implications. *International Journal for Parasitology*, 40(11), 1335-1346. doi:10.1016/j.ijpara.2010.03.017; 10.1016/j.ijpara.2010.03.017
- Fujino, T., Ooiwa, T., y Ishii, Y. (1984). Clinical, epidemiological and morphological studies on 150 cases of acute gastric anisakiasis in fukuoka prefecture. *Japanese Journal of Parasitology*, 33, 73-92.
- Fumarola, L., Monno, R., Ierardi, E., Rizzo, G., Giannelli, G., Lalle, M., y Pozio, E. (2009). *Anisakis* pegreffi etiological agent of gastric infections in two italian women. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(9), 1157-1159. doi:10.1089/fpd.2009.0325
- Fundación Española de Aparato Digestivo. (2013). Modas alimentarias y mejoras en la conservación del pescado fresco principales causas de un aumento de los casos de anisakiasis. *Fundación Española de Aparato Digestivo* (FEAD). Último acceso el 23 de marzo de 2014, desde http://www.saludigestivo.es/modulos/noticiasprensa_noticias/img/anisakis-20130304122551.pdf
- Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria. (2005). *Anisakis simplex* en pescado. *Fundación Vasca Para La Seguridad Alimentaria (ELIKA)*. Último acceso el 23 de mayo de 2012, desde http://www.elika.net/datos/consumidor_destacados_docs/Archivo1/anisakis_simplex_005_es.pdf
- Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria. (2009). *Anisakis simplex* en pescado. *Fundación Vasca Para La Seguridad Alimentaria (ELIKA)*. Último acceso el 23 de mayo de 2012, desde <http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo4/Anisakis%20simplex%20en%20pescado%202009.pdf>
- Gaasenbeek, C. P. H., Borgsteede, F. H. M., Eijck, I. A. J. M., Schuurman, T., y Van der Gaag, M. A. (Julio, 2004). *The effect of phytotherapy on experimental Ascaris suum infections in pigs*. IX European Multicollouium of Parasitology (EMOP IX), Valencia.

- García, F., Blanco, J. G., Garces, M., Juste, S., Fuentes, M., y Herrero, D. (2001). Freezing protects against allergy to *Anisakis simplex*. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 11(1), 49-52.
- García-García, J., y Romero-Arauzo, M. J. (2004). Dolor torácico anginoso como manifestación inicial de anisakiasis gástrica. *Anales de Medicina Interna*, 21(4) 39-40. doi:dx.doi.org/10.4321/S0212-71992004000400008
- Gómez, B., Lasa, E., Arroabarren, E., Garrido, S., Anda, M., y Tabar, A. (2003). Alergia a *Anisakis simplex* allergy to *Anisakis simplex*. *Anales del sistema Sanitario de Navarra*, 26(Suplemento 2), 25-30.
- Gómez, B., Tabar, A. I., Tunon, T., Larrinaga, B., Alvarez, M. J., Garcia, B. E., y Olaguibel, J. M. (1998). Eosinophilic gastroenteritis and *Anisakis*. *Allergy*, 53(12), 1148-1154.
- Gómez, F. Metodo de desparasitacion del pescado fresco y equipo para la ejecucion del mismo. España, ES2223261. (Cl. A22C 25/14), 16 de febrero 2005. Último acceso el 25 de marzo de 2014, desde <http://invenes.oepm.es/InvenesWeb/detalle?referencia=P200300158>
- Gómez-Cabrera, S., y Martínez-Gómez, F. (1982). Parasitación por filocapsularia marina (Nematoda: Heterocheilidae) en diversos peces encontrados en mercados españoles. *Revista Ibérica de Parasitología*, 42, 277-281.
- Gonzalez Quijada, S., Gonzalez Escudero, R., Arias Garcia, L., Gil Martin, A. R., Vicente Serrano, J., y Corral Fernández, E. (2005). Anisakiasis gastrointestinal manifestations: Description of 42 cases. [Manifestaciones digestivas de la anisakiasis: descripción de 42 casos] *Revista Clinica Española*, 205(7), 311-315.
- Goto, C., Kasuya, S., Koga, K., Ohtomo, H., y 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), 653-656.
- Grabda, J. (1976). Studies on the life cycle and morphogenesis of *Anisakis simplex* (rudolphi, 1809)(nematoda: Anisakidae) cultured *in vitro*. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 6(1), 119-141.

- Gračan, R., Bursic, M., Mladineo, I., Kucinic, M., Lazar, B., y Lackovic, G. (2012). Gastrointestinal helminth community of loggerhead sea turtle *Caretta caretta* in the adriatic sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, 99(3), 227-236. doi:10.3354/dao02490
- Grainger, J. N. (1959). The identity of the larval nematodes found in the body muscles of the cod (*gadus callarias* L.). *Parasitology*, 49(1-2), 121-131.
- Guerin, J., y Reveillere, H. (1985). Antifungal activity of plant extracts used in therapy. 2. study of 40 plants extracts against 9 fungi species [*Saccharomyces pastorianus*, *Candida albicans*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Trychophyton mentagrophytes*]. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 43, 77-81.
- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V., y Marín, S. (2003). Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 893-899.
- Halligan, J. P. (1975). Toxic terpenes from *Artemisia californica*. *Ecology*, 56, 999-1003.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., y Riley, T. V. (1997). *In vitro* susceptibility of *Malassezia furfur* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 35(5), 375-377.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., y Riley, T. V. (2008). Frequencies of resistance to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and rifampicin in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(2), 170-173. doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.03.013;
- Hauck, A. K. (1977). Occurrence and survival of the larval nematode *Anisakis* sp. in the flesh of fresh, frozen, brined, and smoked pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. *The Journal of Parasitology*, 63(3), 515-519.

- Heia, K., Sivertsen, A. H., Stormo, S. K., Elvevoll, E., Wold, J. P., y Nilsen, H. (2007). Detection of nematodes in cod (*Gadus morhua*) fillets by imaging spectroscopy. *Journal of Food Science*, 72(1), E011-5. doi:10.1111/j.1750-3841.2006.00212.x
- Henríquez-Santana, A., y Villafruela Cives, M. (2009). *Anisakis*: Pasado, presente y futuro. *Medicina Clínica*, 132(10), 400-403.
- Hermida, M., Mota, R., Pacheco, C. C., Santos, C. L., Cruz, C., Saraiva, A., y Tamagnini, P. (2012). Infection levels and diversity of anisakid nematodes in blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, from portuguese waters. *Parasitology Research*, 110(5), 1919-1928. doi:10.1007/s00436-011-2718-4
- Hernández-Prera, J. C., y Polydorides, A. D. (2012). Anisakidosis of the sigmoid colon disguising as metastatic carcinoma: A case report and review of the literature. *Pathology, Research and Practice*, 208(7), 433-435. doi:10.1016/j.prp.2012.05.004
- Herro, E., y Jacob, S. E. (2010). *Mentha piperita* (peppermint). *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 21(6), 327-329.
- Hierro Marín, I. (2004c). *Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas aromáticas y sus componentes principales frente a larvas L3 de Anisakis simplex s.l.* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, Granada.
- Hierro, I., Valero, A., de Selgas, J. G., y Navarro, M. (2004b). Actividad larvicida del timol frente a *Anisakis simplex* sl. *Revista de Fitoterapia*, 4(2), 175-176.
- Hierro, I., Valero, A., Pérez, P., Gonzalez, P., Cabo, M. M., Montilla, M. P., y 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), 77-82. doi:10.1078/0944-7113-00375
- Hierro, I., Valero, A., y 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), 527-531. doi:10.1016/j.phymed.2005.05.001

- Hillis, D. M., Allard, M. W., y Miyamoto, M. M. (1993). Analysis of DNA sequence data: Phylogenetic inference. *Methods in Enzymology*, 224, 456-487.
- Højgaard, 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(1), 21-28. doi:dx.doi.org/10.1080/00364827.1998.10413666
- Hoet, S., Stevigny, C., Herent, M. F., y Quetin-Leclercq, J. (2006). Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medica*, 72(5), 480-482. doi:10.1055/s-2005-916255
- Hong, S. T., y Lee, S. H. (1987). Histopathological and serological observations on experimental anisakiasis of rabbits. *Kisaengch'Unggak Chapchi. The Korean Journal of Parasitology*, 25(2), 168-180.
- Holst, J., Nilsen, F., Hodneland, K., y Nylund, A. (1993). Observations of the biology and parasites of postsmolt atlantic salmon, *Salmo salar*, from the norwegian sea. *Journal of Fish Biology*, 42(6), 962-966. doi:10.1111/j.1095-8649.1993.tb00402.x
- Hotez, P., Cappello, M., Hawdon, J., Beckers, C., y Sakanari, J. (1994). Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: Possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *The Journal of Infectious Diseases*, 170(4), 918-926.
- Huang, W. (1988). Anisakidés et anisakidoses humaines. deuxième partie: Enquête sur les anisakidés de poissons commerciaux du marché parisien. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 63, 119-132.
- Huang, W. (1990). Methods for detecting anisakid larvae in marine fish. possibilities of application to the inspection of fish sold in the Paris region. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 166(10), 895-900.
- Huang, W., y Bussiéras, J. (1984). Anisakidés et anisakidoses humaines. Première partie: Données bibliographiques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 63, 197-208.

- Huang, W. Y. (2005). Survival of the third stage larvae of *Anisakis simplex* in various conditions and experimental infection in rats. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 23(2), 106-109.
- Hubert, B., Bacou, J., y Belveze, H. (1989). Epidemiology of human anisakiasis: Incidence and sources in France. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40(3), 301-303.
- Hurst, R. (1984). Identification and description of larval *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (anisakidae: Nematoda) from New Zealand waters. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 18(2), 177-186. doi:10.1080/00288330.1984.9516040
- Huss, H. H. (Septiembre, 1988). *Nematodes in herring and herring products*. 18th Annual Meeting of the Western European Fish Technologists Association. Tromso.
- Huss, H. H., Roepstorff, A., Karl, H., y Bloemsma, B. (1992). *Handling and processing of herring infected with Anisakis simplex*. En Proceedings 3rd World Congress on Foodborne Infections and Intoxications (pp. 388-394). Berlin: Ostertag-institute.
- Huss, H. H., y Drewes, S. (Junio, 1989). *Occurrence of nematodes (Anisakis sp. larvae) in north sea herring (Clupea harengus). Effect of Commercial Fish Handling*. Proceedings of the World Association of Veterinary Food Hygienists. Estocolmo.
- Hwang, D., Park, S. I., Pack, S. C., Lee, K. S., Choi, S. K., Kang, H., . . . Lee, S. (2012). A case of duodenal anisakiasis with duodenal ulcer. *Chonnam Medical Journal*, 48(1), 73-75. doi:10.4068/cmj.2012.48.1.73; 10.4068/cmj.2012.48.1.73
- Iglesias, L., Valero, A., y Adroher, F. J. (1997). Some factors which influence the *in vitro* maintenance of *Anisakis simplex* (nematoda). *Folia Parasitologica*, 44(4), 297-301.
- Iglesias, R., D'Amelio, S., Ingrosso, S., Farjallah, S., Martínez-Cedeira, J. A., y García-Estevez, J. M. (2008). Molecular and morphological evidence for the occurrence of *Anisakis* sp. A (nematoda, anisakidae) in the blainville's beaked whale *Mesoplodon*

densirostris. *Journal of Helminthology*, 82(4), 305-308.
doi:10.1017/S0022149X08996978

Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F. M., Santamarina, M. T., Navarrete, I., y Sanmartin, M. L. (1996). Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitology Research*, 82(4), 378-381.

Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F. M., Santamarina, M. T., y Sanmartin, M. L. (1993). *Anisakis simplex*: Antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunology*, 15(5), 243-250.

Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F. M., Santamarina, M. T., y Sanmartin, M. L. (1995). *Anisakis simplex*: Stage-specific antigens recognized by mice. *Journal of Helminthology*, 69(4), 319-324.

Ikeda, K., Kumashiro, R., y Kifune, T. (1989). Nine cases of acute gastric anisakiasis. *Gastrointestinal Endoscopy*, 35(4), 304-308.

Imanishi, M., Sato, M., y Tokuda, Y. (2012). Endoscopic capture of *Anisakis* larva (a video demonstration). *BMJ Case Reports*. doi:10.1136/bcr.03.2012.6068

Inoue, T., Sugimoto, Y., Masuda, H., y Kamei, C. (2001). Effects of peppermint (*Mentha piperita* L.) extracts on experimental allergic rhinitis in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(1), 92-95.

Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H., y Shimada, J. (2004). The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*, 237(2), 325-331.
doi:10.1016/j.femsle.2004.06.049

Inouye, S., Takizawa, T., y Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 565-573.

Ioli, A., Leonaldi, R., Gangemi, C., Lo Giudice, L., Bottari, M., y Petithory, J. C. (1998). Apropos of 1 case of anisakiasis contracted in Sicily. [A propos d'un cas

d'anisakiase contractee en Sicile] *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 91(3), 232-234.

- Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuoglu, M., Baser, K. H., y Demirci, F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3943-3946.
- Ishii, N., Matsuda, M., Setoyama, T., Suzuki, S., Uchida, S., Uemura, M., . . . Fujita, Y. (2009). Anisakiasis and vanishing tumor of the cecum. *Endoscopy*, 41 Suppl 2, E226-7. doi:10.1055/s-0029-1214923
- Ishikura, H. (1969). Occurrence of anisakiasis and its clinical presentation. *Saishin Igaku*, 24, 357-365.
- Ishikura, H. (1990). Clinical features of intestinal anisakiasis. En I. Hajime, y K. Kokichi (Eds.), *Intestinal anisakiasis in Japan* (pp. 89-100). Tokyo: Springer-Verlag.
- Ishikura, H., Kikuchi, K., Akao, N., Doutei, M., Yagi, K., Takahashi, S., y Sato, N. (1995). Parasitologic significance of the alteration of the causative anisakidae worm and of the pseudoterranova decipiens female immature adult worm, casting off the cuticles, and excreted from human in Kanazawa city. [*Hokkaido Igaku Zasshi*] the *Hokkaido Journal of Medical Science*, 70(5), 667-685.
- Ishikura, H., Kikuchi, K., Nagasawa, K., Ooiwa, T., Takamiya, H., Sato, N., y Sugane, K. (1992). Anisakidae and anisakidosis. En T. Sun (Ed.), *Progress in Clinical Parasitology* (3th ed., pp. 43-102). New York: Springer-Verlag.
- Ito, Y., Ikematsu, Y., Yuzawa, H., Nishiwaki, Y., Kida, H., Waki, S., . . . Kanematsu, T. (2007). Chronic gastric anisakiasis presenting as pneumoperitoneum. *Asian Journal of Surgery/Asian Surgical Association*, 30(1), 67-71. doi:10.1016/S1015-9584(09)60131-7
- Jabbar, A., Fong, R. W., Kok, K. X., Lopata, A. L., Gasser, R. B., y Beveridge, I. (2013). Molecular characterization of anisakid nematode larvae from 13 species of fish from western Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 247-253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.012

- Jenks, W., Bublitz, C., Choudhury, G., Ma, Y., y Wikswo, J. (1996). Detection of parasites in fish by superconducting quantum interference device magnetometry. *Journal of Food Science*, 61(5), 865-869. doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb10891.x
- Juergens, U. R., Stober, M., y Vetter, H. (1998a). The anti-inflammatory activity of L-menthol compared to mint oil in human monocytes *in vitro*: A novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases. *European Journal of Medical Research*, 3(12), 539-545.
- Juergens, U. R., Stober, M., y Vetter, H. (1998b). Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes *in vitro*. *European Journal of Medical Research*, 3(11), 508-510.
- Jurado-Palomo, J., López-Serrano, M. C., y Moneo, I. (2010). Multiple acute parasitization by *Anisakis simplex*. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 20(5), 437-441.
- Jurić, I., Pogorelić, Z., Despot, R., y Mrklič, I. (2013). Unusual cause of small intestine obstruction in a child small intestine anisakiasis: Report of a case. *Scottish Medical Journal*, 58(1), e32-e36.
- Kagei, N., y 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), 251-253.
- Kamatou, G. P., Viljoen, A. M., Gono-Bwalya, A. B., van Zyl, R. L., van Vuuren, S. F., Lourens, A. C., . . . Steenkamp, P. (2005). The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three south african salvia species. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(3), 382-390. doi:10.1016/j.jep.2005.06.034
- Kanias, G. D., y Loukis, A. (1987). Determination and correlation of active constituents and trace elements in the medicinal plant *Thymus capitatus* hoffm. and link. *Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 327(3-4), 355-357.

- Kapral, C., Haditsch, M., Wewalka, F., Schatzlmayr, W., Lenz, K., y Auer, H. (2009). The first case of anisakiasis acquired in Austria. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 47(10), 1059-1061.
- Karl, H., Baumann, F., Ostermeyer, U., Kuhn, T., y Klimpel, S. (2011). *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild alaska salmon: No indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94(3), 201-209. doi:10.3354/dao02317
- Karl, H., Roepstorff, A., Huss, H. H., y Bloemsma, B. (1994). Survival of *Anisakis* larvae in marinated herring fillets. *International Journal of Food Science and Technology*, 29(6), 661-670.
- Kasuya, S., Goto, C., Koga, K., Ohtomo, H., Kagei, N., y Honda, G. (1990). Lethal efficacy of leaf extract from *Perilla frutescens* (traditional chinese medicine) or perillaldehyde on *Anisakis* larvae *in vitro*. *Japanese Journal of Parasitology*, 39(2), 220-225.
- Kasuya, S., Goto, C., y Ohtomo, H. (1988). Studies on prophylaxis against anisakiasis--a screening of killing effects of extracts from foods on the larvae. *The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 62(12), 1152-1156.
- Kasuya, S., Hamano, H., y Izumi, S. (1989). Gastric anisakiasis with anaphylactoid reactions. *ACI News*, 1, 13-14.
- Kato, A., Minoshima, Y., Yamamoto, J., Adachi, I., Watson, A. A., y Nash, R. J. (2008). Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8206-8211. doi:10.1021/jf8014365
- Kennedy, M. (2000). Immune response to *Anisakis simplex* and other ascarid nematodes. *Allergy*, 55(Supp59), 7-13. doi:10.1034/j.1398-9995.2000.03402.x
- Khater, H. F., Hanafy, A., Abdel-Mageed, A. D., Ramadan, M. Y., y El-Madawy, R. S. (2011). Control of the myiasis-producing fly, *Lucilia sericata*, with egyptian essential oils. *International Journal of Dermatology*, 50(2), 187-194. doi:10.1111/j.1365-4632.2010.04656.x

- Khater, H. F., Ramadan, M. Y., y El-Madawy, R. S. (2009). Lousicidal, ovicidal and repellent efficacy of some essential oils against lice and flies infesting water buffaloes in egypt. *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), 257-266. doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.011
- Kijewska, A., Dzido, J., Shukhgalter, O., y Rokicki, J. (2009). Anisakid parasites of fishes caught on the african shelf. *The Journal of Parasitology*, 95(3), 639-645. doi:10.1645/GE-1796.1
- Kijewska, A., Rokicki, J., Sitko, J., y Węgrzyn, G. (2002). Ascaridoidea: A simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. *Experimental Parasitology*, 101(1), 35-39. doi:dx.doi.org/10.1016/S0014-4894(02)00031-0
- Kim, H. (1994). Chronic gastric anisakiasis: Radiologic and endoscopic features. *AJR.American Journal of Roentgenology*, 162(2), 468-469. doi:10.2214/ajr.162.2.8310956
- Kim, J., Jo, J. O., Choi, S. H., Cho, M. K., Yu, H. S., Cha, H. J., y Ock, M. (2011). Seroprevalence of antibodies against *Anisakis simplex* larvae among health-examined residents in three hospitals of southern parts of Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 49(2), 139-144.
- Kim, K. H., Eom, K. S., y Park, J. K. (2006). The complete mitochondrial genome of *Anisakis simplex* (ascaridida: Nematoda) and phylogenetic implications. *International Journal for Parasitology*, 36(3), 319-328. doi:10.1016/j.ijpara.2005.10.004
- Kim, S. G., Jo, Y. J., Park, Y. S., Kim, S. H., Song, M. H., Lee, H. H., . . . Kim, D. H. (2006). Four cases of gastric submucosal mass suspected as anisakiasis. *The Korean Journal of Parasitology*, 44(1), 81-86.
- Kliks, M. M. (1983). Anisakiasis in the western united states: Four new case reports from California. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32(3), 526-532.

- Kliks, M. M. (1986). Human anisakiasis: An update. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 255(19), 2605.
- Klimpel, S., Busch, M. W., Kuhn, T., Rohde, A., y Palm, H. W. (2010). The *Anisakis simplex* complex off the south Shetland islands (antarctica): Endemic populations versus introduction through migratory hosts. *Mar Ecol Prog Ser*, 403, 1-11. doi:10.3354/meps08501
- Klimpel, S., Kellermanns, E., Palm, H. W., y Moravec, F. (2007). Zoogeography of fish parasites of the pearlside (*maurolicus muelleri*), with genetic evidence of *Anisakis simplex* (ss) from the mid-atlantic ridge. *Marine Biology*, 152(3), 725-732. doi:10.1007/s00227-007-0727-8
- Klimpel, S., Kellermanns, E., y Palm, H. W. (2008). The role of pelagic swarm fish (myctophidae: Teleostei) in the oceanic life cycle of *Anisakis* sibling species at the mid-atlantic ridge, central atlantic. *Parasitology Research*, 104(1), 43-53. doi:10.1007/s00436-008-1157-3
- Klimpel, S., Palm, H. W., Ruckert, S., y Piatkowski, U. (2004). The life cycle of *Anisakis simplex* in the norwegian deep (northern north sea). *Parasitology Research*, 94(1), 1-9. doi:10.1007/s00436-004-1154-0
- Kobayashi, A., Kumada, M., y Ishizaki, T. (1972). Evaluation of somatic and "ES" antigens causing immunological injury of mast cells in mice infected with *Anisakis* larvae. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 25(5), 335-344.
- Kobayashi, Y., Ishizaki, S., Shimakura, K., Nagashima, Y., y Shiomi, K. (2007a). Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. *Parasitology Research*, 100(6), 1233-1241. doi:10.1007/s00436-006-0396-4
- Kobayashi, Y., Ohsaki, K., Ikeda, K., Kakemoto, S., Ishizaki, S., Shimakura, K., . . . Shiomi, K. (2011). Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitology International*, 60(2), 144-150. doi:10.1016/j.parint.2011.01.004

- Kobayashi, Y., Shimakura, K., Ishizaki, S., Nagashima, Y., y Shiomi, K. (2007b). Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 155(2), 138-145. doi:10.1016/j.molbiopara.2007.06.012
- Koch, C., Reichling, J., Kehm, R., Sharaf, M. M., Zentgraf, H., Schneelee, J., y Schnitzler, P. (2008a). Efficacy of anise oil, dwarf-pine oil and chamomile oil against thymidine-kinase-positive and thymidine-kinase-negative herpesviruses. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(11), 1545-1550. doi:10.1016/j.phymed.2007.09.003
- Koch, C., Reichling, J., Schneelee, J., y Schnitzler, P. (2008b). Inhibitory effect of essential oils against *Herpes simplex* virus type 2. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 15(1-2), 71-78. doi:10.1016/j.phymed.2007.0
- Køie, M., Berland, B., y 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(S1), 134-139. doi:10.1139/f95-519
- Koinari, M., Karl, S., Elliot, A., Ryan, U., y Lymbery, A. J. (2013). Identification of *Anisakis* species (nematoda: Anisakidae) in marine fish hosts from Papua New Guinea. *Veterinary Parasitology*, 193(1-3), 126-133. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.008
- Kojima, G., Usuki, S., Mizokami, K., Tanabe, M., y Machi, J. (2013). Intestinal anisakiasis as a rare cause of small bowel obstruction. *The American Journal of Emergency Medicine*, doi:10.1016/j.ajem.2013.05.015
- Kpoviessi, S., Bero, J., Agbani, P., Gbaguidi, F., Kpadonou-Kpoviessi, B., Sinsin, B., . . . Quetin-Leclercq, J. (2014). Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from benin. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 652-659. doi:10.1016/j.jep.2013.11.027; 10.1016/j.jep.2013.11.027

- Kuhn, T., Garcia-Marquez, J., y Klimpel, S. (2011). Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: A zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. *PloS One*, 6(12), e28642. doi:10.1371/journal.pone.0028642
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., y Takahara, Y. (1981). Antifungal activity of components of essential oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(4), 945-952.
- Kwee, H. G., y Sautter, R. L. (1987). Anisakiasis. *American Family Physician*, 36(2), 137-140.
- Lanfranchi, A. L., y Sardella, N. H. (2010). Anisakids survival after microwaving, freezing and salting fish from Argentina. *Food Science and Technology Research*, 16(5), 499-504. doi:10.3136/fstr.16.499
- Levsen, A., Lunestad, B. T., y Berland, B. (2005). Low detection efficiency of candling as a commonly recommended inspection method for nematode larvae in the flesh of pelagic fish. *Journal of Food Protection*, 68(4), 828-832.
- Levsen, A., y Lunestad, 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), 247-253. doi:10.1016/j.vetpar.2010.0
- Levsen, A., y Midthun, E. (2007). Occurrence and spatial distribution of *Anisakis* sp. in three commercially important pelagic fish stocks from the NE atlantic, with comments on the significance to consumer safety. *Parassitologia*, 2, 402-403.
- Lin, R. J., Chen, C. Y., Lee, J. D., Lu, C. M., Chung, L. Y., y Yen, C. M. (2010). Larvicidal constituents of *zingiber officinale* (ginger) against *Anisakis simplex*. *Planta Medica*, 76(16), 1852-1858. doi:10.1055/s-0030-1249971; 10.1055/s-0030-1249971
- Llarena-Reino, M., González, Á. F., Vello, C., Outeiriño, L., y Pascual, S. (2012). The accuracy of visual inspection for preventing risk of *Anisakis* spp. infection in unprocessed fish. *Food Control*, 23(1), 54-58. doi:dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.10

- Lluch-Bernal, M., Sastre, J., Fernández-Caldas, E., Maranon, F., Cuesta-Herranz, J., De las Heras, M., . . . Novalbos, A. (2002). Conjunctival provocation tests in the diagnosis of *Anisakis simplex* hypersensitivity. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 12(1), 21-24.
- López Peñas, D., Ramirez Ortiz, L. M., del Rosal Palomeque, R., López Rubio, F., Fernández-Crehuet Navajas, R., y Mino Fugarolas, G. (2000). Study of 13 cases of anisakiasis in the province of Córdoba. [Estudio de 13 casos de anisakiasis en la provincia de Córdoba] *Medicina Clinica*, 114(5), 177-180.
- López Sáez, M. P., Zubeldia, J. M., Matheu, V., Gracia, M. T., De Barrio, M., Tornero, P.,.... Baeza, M. L. (1999). Sensibilización a *Anisakis simplex*: prevalencia en una consulta de alergia hospitalaria de Madrid. *Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica*, 14, 23-29. doi: 10.2310/6620.2010.09072
- López-Serrano, M. C., Alonso-Gómez, A., Moreno-Ancillo, A., Daschner, A., y Suarez de Parga, J. (2000a). Anisakiasis gastro-alérgica: Hipersensibilidad inmediata debida a parasitación por *Anisakis simplex*. *Alergología e Inmunología Clínica*, 15, 230-236.
- López-Serrano, M. C., Gomez, A. A., Daschner, A., Moreno-Ancillo, A., de Parga, J. M., Caballero, M. T.,... Cabañas, R. (2000b). Gastroallergic anisakiasis: findings in 22 patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(5), 503-506. Doi: 10.1046/j.1440-1746.2000.02153.x
- López-Vélez, R., García, A., Barros, C., Manzarbeitia, F., y Oñate, J. M. (1992a). Anisakiasis en España. Descripción de 3 casos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 10, 158-161.
- López-Vélez, R., García, A., Barros, C., Manzarbeitia, F., y Oñate, J. (1992). Anisakiasis en España. Descripción de 3 casos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 10, 158-161.
- López-Vélez, R., Manzarbeitia, F., Oñate, J. M., y Barros, C. (1992b). Anisakiasis humana en España por consumo de sardinas crudas. *Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, 233, 57-61.

- López-Viedma, B., y Domper-Bardají, F. (2007). Ultrasonografía endoscópica. aplicaciones clínicas. *Revista de La Asociación Castellana de Aparato Digestivo*, 13(4), 173-180.
- Lorenzo, S., Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F. M., Ansotegui, I., Garcia, M., y Fernández de Corres, L. (2000). Usefulness of currently available methods for the diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. *Allergy*, 55(7), 627-633.
- Louredo Méndez, A., Acedo de la Rosa, F., Arribas de Paz, V., Sanz Ortega, E., Bernardo Quirós, L., y Goyanes Martínez, A. (1997). Anisakidosis del colon como causa de abdomen agudo. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 89(5), 403-406.
- Lozano, M. J., Martin, H. L., Diaz, S. V., Manas, A. I., Valero, L. A., y Campos, B. M. (2004). Cross-reactivity between antigens of *Anisakis simplex* s.l. and other ascarid nematodes. *Parasite*, 11(2), 219-223.
- Machado, M., Sousa Mdo, C., Salgueiro, L., y Cavaleiro, C. (2010). Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Natural Product Communications*, 5(1), 137-141.
- Maggiore, M. A., Albanese, A. A., Gende, L. B., Eguaras, M. J., Denegri, G. M., y Elissondo, M. C. (2012). Anthelmintic effect of mentha spp. essential oils on *Echinococcus granulosus* protoscoleces and metacestodes. *Parasitology Research*, 110(3), 1103-1112. doi:10.1007/s00436-011-2595-x
- MagnaVal, J. F., Berry, A., & Nadrigny, M. (2002). Anaphylactic shock revealing anisakiasis. [Choc anaphylactique revelant une anisakiase] *Presse Medicale*, 31(28), 1309-1311.
- Manfredi, M. T., Marone, M., y Traldi, G. (1994). Anisakidae nei prodotti ittici importati. dopo la caduta delle barrier doganali nella ce quale ruolo per il servizio sanitario nazionale. *Obiettivi e Documenti Veterinari*, 15, 49-53.
- Manley, K. M., y Embil, J. A. (1989). *In vitro* effect of ivermectin on *Pseudoterranova decipiens* survival. *Journal of Helminthology*, 63(1), 72-74.

- Manolova, N., Serkedjieva, J., y Ivanova, V. (1995). Antiinfluenza activity of the plant preparation broncho pam. *Fitoterapia*, 66(3), 223-226.
- Margolis, L. (1977). Public health aspects of "codworm" infection: A review. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 34(7), 887-898.
- Marquardt, W. C. (2000). Anisakiosis. En W. C. Marquardt, R. S. Demaree y R. B. Grieve (Eds.), *Parasitology and vector biology* (pp. 442-444). San Diego: Academic Press.
- Marques, J. F., Cabral, H. N., Busi, M., y D'Amelio, S. (2006). Molecular identification of *Anisakis* species from pleuronectiformes off the portuguese coast. *Journal of Helminthology*, 80(1), 47-51.
- Martín-Sánchez, J., Artacho-Reinoso, M. E., Diaz-Gavilan, M., y 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), 155-162. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.02.0
- Martín-Sánchez, J., Gramiccia, M., Pesson, B., y Morillas-Marquez, F. (2000). Genetic polymorphism in sympatric species of the genus phlebotomus, with special reference to *Phlebotomus perniciosus* and *Phlebotomus longicuspis* (diptera, phlebotomidae). *Parasite*, 7(4), 247-254.
- Mateo, C., Morera, M. P., Sanz, J., Calderón, J., y Hernández, A. (1978). Estudio analítico de aceites esenciales procedentes de plantas españolas. 1^º especies del género *Thymus*. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.*, 60, 621-627.
- Matsui, T., Lida, M., Murakami, M., Kimura, Y., Fujishima, M., Yao, Y., y Tsuji, M. (1985). Intestinal anisakiasis: Clinical and radiological features. *Radiology*, 157, 299-302.
- Mattiucci, S., Abaunza, P., Damiano, S., Garcia, A., Santos, M. N., y 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), 117-127. doi:10.1017/S0022149X07754718

- Mattiucci, S., Abaunza, P., Ramadori, L., y Nascetti, G. (2004). Genetic identification of *Anisakis* larvae in european hake from atlantic and mediterranean waters for stock recognition. *Journal of Fish Biology*, 65(2), 495-510.
- Mattiucci, S., Cianchi, R., Nascetti, G., Paggi, L., Sardella, N., Timi, J.,... Bullini, L. (2003). Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston y Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. *Systematic Parasitology*, 54(1):13-23.
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S. C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisario, B., ... y Nascetti, G. (2013b). 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*. In press.
- Mattiucci, S., Fazii, P., De Rosa, A., Paoletti, M., Megna, A. S., Glielmo, A., . . . Nascetti, G. (2013a). Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, italy. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 496-499. doi:10.3201/eid1903.121017
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Bullini, L., Orecchia, P., y Paggi, L. (1986). Genetic structure of *Anisakis physeteris*, and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (ascaridida: Anisakidae). *Parasitology*, 93(Pt 2), 383-387.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Clanchi, R., Paggi, L., Arduino, P., Margolis, L., . . . Bullini, L. (1997). Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (nematoda, ascaridoidea, anisakidae). *The Journal of Parasitology*, 83(3), 401-416.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Dailey, M., Webb, S. C., Barros, N. B., Cianchi, R., y 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), 157-171. doi:10.1007/s11230-005-3158-2
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Abollo, E., Webb, S. C., Pascual, S., . . . Bullini, L. (2001). Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis*

brevispiculata and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae)s. *International Journal for Parasitology*, 31(1), 9-14.

Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Ishikura, H., Kikuchi, K., Sato, N., . . . Bullini, L. (1998). Allozyme and morphological identification of shape *Anisakis*, contracaecum and pseudoterranova from japanese waters (nematoda, ascaridoidea). *Systematic Parasitology*, 40(2), 81-92.

Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Portes Santos, C., Costa, G., Di Benedetto, A. P., . . . Bullini, L. (2002). Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (diesing, 1860): Larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* dujardin, 1845 (nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology*, 51(3), 159-170.

Mattiucci, S., Paoletti, M., Borrini, F., Palumbo, M., Palmieri, R. M., Gomes, V., . . . Nascetti, G. (2011). First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infectious Diseases*, 11, 82-2334-11-82. doi:10.1186/1471-2334-11-82

Mattiucci, S., Paoletti, M., y 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), 199-217. doi:10.1007/s11230-009-9212-8

Mattiucci, S., y Nascetti, G. (2006). Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* dujardin, 1845: An update. *Parasite*, 13(2), 99-113.

Mattiucci, S., y Nascetti, G. (2008). Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology*, 66, 47-148. doi:10.1016/S0065-308X(08)00202-9

McGladdery, S. (1986). *Anisakis simplex* (nematoda: Anisakidae) infection of the musculature and body cavity of atlantic herring (*Clupea harengus harengus*).

Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 43(7), 1312-1317.
doi:10.1139/f86-164

McKay, D. L., y Blumberg, J. B. (2006a). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research: PTR*, 20(7), 519-530. doi:10.1002/ptr.1900

McKay, D. L., y Blumberg, J. B. (2006b). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research: PTR*, 20(8), 619-633. doi:10.1002/ptr.1936

Megalla, S., El-Keltawi, N., y Ross, S. (1980). A study of antimicrobial action of some essential oil constituents. *Herba Polonica*, 26(3), 181-186.

Melguizo, M., Cristina, C., Martínez, J., López, A., Asunción, P., García, T., . . . Carmen, P. (2007). Marco Estratégico para la mejora de la Atención Primaria en España: 2007-2012. *Proyecto AP-21. Estrategias para la mejora de la Atención Primaria. Análisis de situación de la Atención Primaria. Ministerio de Sanidad y Consumo*. Último acceso el 25 de Marzo de 2014, desde http://www.msssi.gob.es/profesionales/proyectosActividades/docs/AP21MarcoEstrategico2007_2012.pdf

Meloni, M., Angelucci, G., Merella, P., Siddi, R., Deiana, C., Orru, G., y Salati, F. (2011). Molecular characterization of *Anisakis* larvae from fish caught off Sardinia. *The Journal of Parasitology*, 97(5), 908-914. doi:10.1645/GE-2742.1

Mercado, R., Torres, P., Carlos Gil, L., & Goldin, L. (2006). Anisakiasis en un paciente portadora de una pequeña hernia hiatal: Caso clínico. *Revista médica de Chile*, 134(12), 1562-1564.

Mercado, R., Torres, P., Muñoz, V., y Apt, W. (2001). Human infection by *Pseudoterranova decipiens* (nematoda, anisakidae) in Chile: Report of seven cases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 653-655.

Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B., y Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three mentha species essential oils. *Planta Medica*, 69(5), 413-419. doi:10.1055/s-2003-39704

- Minami, M., Kita, M., Nakaya, T., Yamamoto, T., Kuriyama, H., y Imanishi, J. (2003). The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication *in vitro*. *Microbiology and Immunology*, 47, 681-684.
- Mineta, S., Shimanuki, K., Sugiura, A., Tsuchiya, Y., Kaneko, M., Sugiyama, Y., . . . Tajiri, T. (2006). Chronic anisakiasis of the ascending colon associated with carcinoma. *Journal of Nippon Medical School*, 73(3), 169-174.
- Mladineo, I., Simat, V., Miletic, J., Beck, R., y 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), 224-229. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.005
- Molina-Fernández, D. (2013). *Anisakis spp. en sardinas (Sardina pilchardus) en las costas sur y norte españolas: epidemiología molecular*. (Trabajo Final de Máster), Universidad de Granada, Granada.
- Molina-García, A., y Sanz, P. (2002). *Anisakis simplex* larva killed by high-hydrostatic-pressure processing. *Journal of Food Protection*, 65(2), 383-388.
- Moneo, I., Caballero, M. L., Gómez, F., Ortega, E., y Alonso, M. J. (2000). Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(1 Pt 1), 177-182.
- Moneo, I., Caballero, M. L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A. I., Rodríguez-Pérez, R., y Silva, A. (2005). Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitology Research*, 96(5), 285-289. doi:10.1007/s00436-005-1362-2
- Montoro, A., Perteguer, M. J., Chivato, T., Laguna, R., y Cuellar, C. (1997). Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*. *Allergy*, 52(10), 985-991.
- Moore, D., Girdwood, R., y Chiodini, P. (2002). Treatment of anisakiasis with albendazole. *The Lancet*, 360, 54.

- Morales-Yuste, M. (2006). *Actividad de varios compuestos monoterpénicos, sesquiterpénicos y derivados fenilpropánicos obtenidos a partir de diversas especies aromáticas, sobre el parásito Leishmania infantum*. (Tesis Doctoral), Universidad de Granada, Granada.
- Morales-Yuste, M., Morillas-Marquez, F., Martin-Sanchez, J., Valero-López, A., y Navarro-Moll, M. C. (2010). Activity of (-)alpha-bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 17(3-4), 279-281. doi:10.1016/j.phymed.2009.05.019;
- Moreno-Ancillo, A., Caballero, M. T., Cabanas, R., Contreras, J., Martin-Barroso, J. A., Barranco, P., y López-Serrano, M. C. (1997). Allergic reactions to *Anisakis simplex* parasitizing seafood. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 79(3), 246-250. doi:10.1016/S1081-1206(10)63009-8
- Morice, A. H., Marshall, A. E., Higgins, K. S., y Grattan, T. J. (1994). Effect of inhaled menthol on citric acid induced cough in normal subjects. *Thorax*, 49(10), 1024-1026.
- Morillas Márquez, F., Navarro Moll, C., Montilla Herrera, P., Pérez Galindo, P., Morales Yuste, M., y Martín-Sánchez, J. (Julio, 2004). Activity of the monoterpene derivatives carvacrol, linalool and α -terpineol, obtained from aromatic plants, on *Leishmania infantum*. *IX European Multicolloquium of Parasitology (EMOP IX)*, Valencia.
- Moura Rocha, N. F., Venancio, E. T., Moura, B. A., Gomes Silva, M. I., Aquino Neto, M. R., Vasconcelos Rios, E. R., . . . de Sousa, F. C. (2010). Gastroprotection of (-)-alpha-bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: The possible involved pharmacological mechanisms. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 24(1), 63-71. doi:10.1111/j.1472-8206.2009.00726.x
- Muraoka, A., Suehiro, I., Fujii, M., Nagata, K., Kusunoki, H., Kumon, Y., . . . Murakami, K. (1996). Acute gastric anisakiasis: 28 cases during the last 10 years. *Digestive Diseases and Sciences*, 41(12), 2362-2365.
- Murata, R., Suzuki, J., Sadamasu, K., y Kai, A. (2011). Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (nematoda: Anisakidae) in beryx splendens

from japanese waters. *Parasitology International*, 60(2), 193-198.
doi:10.1016/j.parint.2011.02.008

Nadler, S. A., D'Amelio, S., Dailey, M. D., Paggi, L., Siu, S., y Sakanari, J. A. (2005). Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from northern pacific marine mammals. *The Journal of Parasitology*, 91(6), 1413-1429. doi:10.1645/GE-522R.1

Nadler, S. A., y Hudspeth, D. S. (2000). Phylogeny of the ascaridoidea (nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: Hypotheses of structural and sequence evolution. *The Journal of Parasitology*, 86(2), 380-393.
doi:dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0380:POTANA]2.0.CO;2

Nadolna, K., y Podolska, M. (2013). Anisakid larvae in the liver of cod (*gadus morhua*) L. from the southern baltic sea. *Journal of Helminthology*, 4, 1-10.
doi:10.1017/S00221
49X13000096

Naito, K., Komori, M., Kondo, Y., Takeuchi, M., y Iwata, S. (1997). The effect of L-menthol stimulation of the major palatine nerve on subjective and objective nasal patency. *Auris, Nasus, Larynx*, 24(2), 159-162. doi:10.1016/S0385-8146(96)00005-3

Naito, K., Ohoka, E., Kato, R., Kondo, Y., y Iwata, S. (1991). The effect of L-menthol stimulation of the major palatine nerve on nasal patency. *Auris, Nasus, Larynx*, 18(3), 221-226.

Nakagawa, Y., Nagai, T., Okawara, H., Nakashima, H., Tasaki, T., Soma, W., . . . Fujioka, T. (2009). Comparison of magnified endoscopic images of ancylostoma duodenale(hookworm) and *Anisakis simplex*. *Endoscopy*, 41,Suppl 2, E189-0029-1214766. Epub 2009 Jul 27. doi:10.1055/s-0029-1214766

Nakajo, M., Setoguchi, Y., Onohara, S., y Nakajo, M. (2011). Computed tomographic features of two cases of acute gastric anisakiasis. *Abdominal Imaging*, 36(5), 509-513. doi:10.1007/s00261-010-9646-0

- Nascetti, G., Paggi, L., Orecchia, P., Smith, J. W., Mattiucci, S., y 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), 633-640.
- Navarro-Cantarero, E., Carro Alonso, B., Castillo Lario, C., y Fernández Gómez, J. A. (2005). Diagnosis of *Anisakis* infestation: Experience in our environment. [Diagnostico de la infestacion por *Anisakis*. Experiencia en nuestro medio] *Allergologia et Immunopathologia*, 33(1), 27-30.
- Navarro, M. C., Cabo, M. M., Crespo, M. E., y Jiménez, J. (1999). Mono-, sesqui- y diterpenos. En M. A. Villar del Fresno (Ed.), *Farmacognosia general* (pp. 153-172). Madrid: Síntesis.
- Navarro, M. C., Noguera, M. A., Romero, M. C., Montilla, M. P., Gonzalez de Selgas, J. M., y Valero, A. (2008). *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpene derivatives of natural origin against L3 larvae *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Parasitology*, 120(4), 295-299. doi:10.1016/j.exppara.2008.07.014
- Nawa, Y., Hatz, C., y Blum, J. (2005). Sushi delights and parasites: The risk of fishborne and foodborne parasitic zoonoses in Asia. *Clinical Infectious Diseases*, 41(9), 1297-1303. doi:10.1086/496920
- Nishino, T., Tagaito, Y., y Sakurai, Y. (1997). Nasal inhalation of l-menthol reduces respiratory discomfort associated with loaded breathing. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156(1), 309-313.
- Nogueira, J. C. R., Diniz, Margareth de Fátima Melo, y Lima, E. O. (2008). *In vitro* antimicrobial activity of plants in acute otitis externa. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 74(1), 118-124. doi:dx.doi.org/10.1590/S0034-72992008000100019
- Noguera, M. A. (2006). *Actividad de distintos componentes de aceites esenciales frente Anisakis simplex s.l.* (Memoria de Licenciatura). Universidad de Granada, Granada.

- Obispo, J., Herrero, J., Borobia, L., Chivato, R., Laguna, J., y Baquedano, J. (2000). Obstrucción intestinal producida por la larva de *Anisakis*. *Cirugía Española*, 67, 368-371.
- Oh, H. K., Sakai, T., Jones, M. B., y Longhurst, W. M. (1967). Effect of various essential oils isolated from douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Applied Microbiology*, 15(4), 777-784.
- Ohara, A., y Matsuhisa, T. (2002). Anti-tumor promoting activities of edible plants against okadaic acid. *Food Science and Technology Research*, 8(2), 158-161.
- Olmedo, J. B., y Berenguer, J. (1991). Control de la incidencia de parasitación por nematodos del género *Anisakis* sobre peces destinados al consumo humano. *Información Veterinaria*, 110, 31-34.
- Olveira, A., Sánchez Rancaño, S., Conde Gacho, P., Moreno, A., Martínez, A., y Comas, C. (1999). Anisakiasis gastrointestinal. siete casos en tres meses. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 91(1), 70-72.
- Orecchia, P., Paggi, L., Mattiucci, S., Smith, J. W., Nascetti, G., y Bullini, L. (1986). Electrophoretic identification of larvae and adults of *Anisakis* (ascaridida: Anisakidae). *Journal of Helminthology*, 60(4), 331-339.
- Organización Mundial de la Salud. Technologies for the control of hazards. Basic Food Safety for Health Workers. Último acceso el 23 de Mayo de 2012, desde <http://www.who.int/foodsafety/publications/capacity/en/5.pdf>
- Osanz Mur, A. C. (2001) *Presencia de larvas de anisákidos (nematoda: Ascaridoidea) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona*. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
- Oshima, T. (1972). *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. *Progress of Medical Parasitology in Japan IV*, 4, 305-393.
- Oshima, T., y Kliks, M. (1987). Effects of marine mammal parasites on human health. *International Journal for Parasitology*, 17(2), 415-421.

- Pacios, E., Arias-Díaz, J., Zuloaga, J., González-Armengol, J., Villarroel, P., y Balibrea, J. L. (2005). Albendazole for the treatment of anisakiasis ileus. *Clinical Infectious Diseases*, 41(12), 1825-1826. doi:10.1086/498309
- Paggi, L., Nascetti, G., Webb, S. C., Mattiucci, S., Cianchi, R., y Bullini, L. (1998). A new species of *Anisakis dujardin*, 1845 (nematoda, anisakidae) from beaked whales (ziphiidae): Allozyme and morphological evidence. *Systematic Parasitology*, 40(3), 161-174. doi:10.1023/A:1006093201920
- Paltridge, G. P., Faoagali, J. L., y Angus, H. B. (1984). Intestinal anisakiasis: A new New Zealand disease. *The New Zealand Medical Journal*, 97(762), 558-559.
- Papageorgiu, V., y Argyriadou, N. (1981). Trace constituents in the essential oil of *thymus capitatus*. *Phytochemistry*, 20, 2295-2297. doi:dx.doi.org/10.1016/0031-9422(81)80135-5
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., y Kole, C. (1996). Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios*, 86(349), 237-246.
- Pellecuer, J., Roussel, J. L., Andrary, C., Privat, G., Jacob, M., y Tomei, M. (1977). Recherche du pouvoir antifongique de quelques huiles essentielles. *Rivista Italiana EPPOS*, 61, 10-11.
- Pelloux, H., Pinel, C., y Ambroise-Thomas, P. (1992). Larves d'*anisakidae*: Détection dans la chair des poissons et prévention de l'anisakiase humaine. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 22(11), 939-940. doi:dx.doi.org/10.1016/S0399-077X(05)80635-3
- Perdiguero-Alonso, D., Montero, F. E., Raga, J. A., y Kostadinova, A. (2008). Composition and structure of the parasite faunas of cod, *Gadus morhua* L. (teleostei: Gadidae), in the north east atlantic. *Parasites and Vectors*, 1(1), 23. doi:10.1186/1756-3305-1-23
- Pereira-Bueno, J., y Ferré, I. (1997). Parásitos del pescado. Zamora: Junta De Castilla y León, Consejería de Sanidad y Bienestar Social, Dirección Técnica y Equipo de Trabajo.

- Pérez Galindo, M. P. (2005). *Salvia lavandulaefolia Vahl ssp. oxyodon: evaluación de su aceite esencial e incidencia en el medio ambiente según intensidades de recolección* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, Granada.
- Pérez Millán, A., Martín Lorente, J., y Pérez Álvarez, L. M. (1998). Ulcera gástrica secundaria a infección por *Anisakis*. *Revista de la Asociación Castellana de Aparato Digestivo*, 14, 25-27.
- Pérez-Pérez, J., Fernandez-Caldas, E., Maranon, F., Sastre, J., Bernal, M. L., Rodríguez, J., y Bedate, C. A. (2000). Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 123(2), 120-129.
- Perteguer, M. J., Ortiz, G., Garcia, E., Flores, M., Rodríguez, E., Ubeira, F. M., y Garate, T. (2004). Application of the PCR-RFLP technique for the species-specific identification of nematodes involved in human anisakiasis. [Aplicación de la técnica PCR-RFLP en la identificación de nematodos implicados en la anisakiasis humana] *Medicina Clinica*, 122(18), 686-689.
- Petersen, F., Palm, H., Möller, H., y Cuzi, M. (1993). Flesh parasites of fish from central philippine waters. *Diseases of Aquatic Organisms*, 15(2), 81-86.
- Petithory, J., Rousseau, M., Siodlak, F., Cavier, R., Cier, J., Brumpt, L., . . . Petithory, M. (1991). Données séroépidémiologiques sur l'anisakiase: Conséquence prophylactiques pour les produits de la pêche. Discussion. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 175(2), 273-279.
- Petithory, J., y Marty, B. (1988). L'anisakiase en France. *La Lettre de l'Infectiologue*, 3, 96-99.
- Platt, N. (1975). Infestation of cod (*Gadus morhua* L.) with larvae of codworm (*Terranova decipiens* krabbe) and herringworm, *Anisakis* sp.(nematoda ascaridata), in north atlantic and arctic waters. *Journal of Applied Ecology*, 12(2), 437-450.
- Pontes, T., D'Amelio, S., Costa, G., y Paggi, L. (2005). Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of madeira by a PCR-based approach, with

- evidence for a new species. *The Journal of Parasitology*, 91(6), 1430-1434. doi:10.1645/GE-565R1.1
- Pontone, S., Leonetti, G., Guaitoli, E., Mocini, R., Manfredelli, S., Catania, A., . . . Sorrenti, S. (2012). Should the host reaction to anisakiasis influence the treatment? different clinical presentations in two cases. *Revista Española de Enfermedades*, 104(11), 607-610.
- Pravettoni, V., Primavesi, L., y Piantanida, M. (2012). *Anisakis simplex*: Current knowledge. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 44(4), 150-156.
- Priestley, C. M., Burgess, I. F., y Williamson, E. M. (2006). Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. *Fitoterapia*, 77(4), 303-309. doi:dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2006.04.005
- Puente, P., Anadón, A. M., Rodero, M., Romaris, F., Ubeira, F. M., y Cuéllar, C. (2008). *Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid (spain) and its relation with fish consumption. *Experimental Parasitology*, 118(2), 271-274. doi:10.1016/j.exppara.20
- Purello-D'Ambrosio, F., Pastorello, E., Gangemi, S., Lombardo, G., Ricciardi, L., Fogliani, O., y Merendino, R. A. (2000). Incidence of sensitivity to *Anisakis simplex* in a risk population of fishermen/fishmongers. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 84(4), 439-444. doi:10.1016/S1081-1206(10)62278-8
- Quiazon, K. M., Santos, M. D., y Yoshinaga, T. (2013). *Anisakis* species (nematoda: Anisakidae) of dwarf sperm whale *Kogia sima* (owen, 1866) stranded off the pacific coast of southern philippine archipelago. *Veterinary Parasitology*, doi:10.1016/j.vetpar.2013.05.019;
- Quiazon, K. M., Yoshinaga, T., Santos, M. D., y Ogawa, K. (2009). Identification of larval *Anisakis* spp. (nematoda: Anisakidae) in alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) in northern Japan using morphological and molecular markers. *The Journal of Parasitology*, 95(5), 1227-1232. doi:10.1645/GE-1751.1;

- Quiazon, K. M., Yoshinaga, T., y Ogawa, K. (2011). Experimental challenge of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitology International*, 60(2), 126-131. doi:10.1016/j.parint.2010.11.007
- Quinteiro, P., Outeda, M., Álvarez, F., García, J., y Sanmartín, M. L. (Septiembre-Octubre, 1987). *Helmintofauna de algunos peces de interés comercial capturados en el noroeste de España*. V Congreso Nacional de Parasitología, Salamanca.
- Rai, M. K., y Upadhyay, S. (1988). Laboratory evaluation of essential oil of *Mentha piperita* linn. against trichophyton mentagrophytes. *Hindustan Antibiotics Bulletin*, 30(3-4), 82-84.
- Rao, B. G., y Nigam, S. S. (1970). The *in vitro* antimicrobial efficiency of essential oils. *The Indian Journal of Medical Research*, 58(5), 627-633.
- 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, N^o 302 de 19.12.06.
- Real decreto 1437/92 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, N^o 11 de 13/01/93.
- Real Farmacopea Española. (2010). 4^a edición (Ministerio de Sanidad y Consumo. *Secretaría General Técnica, Centro de Publicaciones, Madrid*).
- Reglamento (CE) n^o 1276/2011 de la Comisión de 8 de diciembre de 2011 que modifica el anexo III del Reglamento 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente al tratamiento para matar parásitos viables en los productos de la pesca destinados al consumo humano. Diario Oficial n^o L 327/39 de 9/12/2011.

- Reglamento (CE) nº 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. Diario Oficial nº L 139/55 de 29/05/2004.
- Reglamento (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. Diario Oficial nº L 139/206 de 30/04/2004.
- Rello, F. J., Adroher, F. J., Benítez, R., y 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), 277-281. doi:dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.009
- Rello, F., Adroher, F. J., y Valero, A. (2004). Anisakidos parásitos de peces comerciales. riesgos asociados a la salud pública. *Anales de La Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 17, 173-197.
- Repiso Ortega, A., Alcantara Torres, M., Gonzalez de Frutos, C., de Artaza Varasa, T., Rodríguez Merlo, R., Valle Munoz, J., y Martinez Potenciano, J. L. (2003). Gastrointestinal anisakiasis. study of a series of 25 patients. [Anisakiasis gastrointestinal. Estudio de una serie de 25 pacientes] *Gastroenterología y Hepatología*, 26(6), 341-346.
- Rochat, J. (1970). Essential oils. antispasmodic activity and active constituents. *Bulletin Technique Gattefossé SFPA*, 65, 62-67.
- Rodríguez, E., Anadón, A. M., García-Bodas, E., Romaris, F., Iglesias, R., Gárate, T., y Gárate, T. (2008). Novel sequences and epitopes of diagnostic value derived from the *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen. *Allergy*, 63(2), 219-225. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01564.x;
- Rodríguez, E., Romarís, F., Lorenzo, S., Moreno, J., Bonay, P., Ubeira, F. M., y Gárate, T. (2006). A recombinant enolase from *Anisakis simplex* is differentially recognized in natural human and mouse experimental infections. *Medical microbiology and immunology*, 195(1), 1-10. doi: 10.1007/s00430-005-0236-7

- Rodríguez-Mahillo, A. I., Gonzalez-Munoz, M., de las Heras, C., Tejada, M., y Moneo, I. (2010). Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(8), 967-973. doi:10.1089/fpd.2009.0517
- Rodríguez-Mahillo, A. I., Gonzalez-Munoz, M., Gómez-Aguado, F., Rodríguez-Pérez, R., Corcuera, M. T., Caballero, M. L., y Moneo, I. (2007). Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *International Journal for Parasitology*, 37(8-9), 907-917. doi:10.1016/j.ijpara.2007.01.007
- Rodríguez-Mahillo, A. I., Gonzalez-Munoz, M., Moneo, I., Solas, M. T., Mendizabal, A., de las Heras, C., y Tejada, M. (2008). Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion. *Journal of Food Protection*, 71(12), 2578-2581.
- Rodríguez-Pérez, R., Moneo, I., Rodríguez-Mahillo, A., y Caballero, M. L. (2008). Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 159(2), 92-97. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.02.008
- Romero Ramírez, J. A., Martínez-Conde López, A. E., Olivares Galdeano, U., Sancha Pérez, A., López de Torre Ramírez de la Piscina, J., Barros Ingerto, J., y Echavarría Iñigo, J. (1997). Anisakiosis gástrica diagnosticada por endoscopia. *Gastroenterología y Hepatología*, 20(6), 306-308.
- Rosales, M. J., Mascaró, C., Fernandez, C., Luque, F., Sanchez Moreno, M., Parras, L., . . . Ramón Muñoz, J. (1999). Acute intestinal anisakiasis in Spain: A fourth-stage *Anisakis simplex* larva. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(6), 823-826. doi:dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000600020
- Rossi, Y. E., Canavoso, L., y Palacios, S. M. (2012). Molecular response of *Musca domestica* L. to *Mintostachys verticillata* essential oil, (4R)+-pulegone and menthone. *Fitoterapia*, 83(2), 336-342. doi:10.1016/j.fitote.2011.11.019
- Rückert, S., Klimpel, S., Al-Quraishy, S., Mehlhorn, H., y Palm, H. W. (2009). Transmission of fish parasites into grouper mariculture [(serranidae: Epinephelus

- coioides (Hamilton, 1822)] in lampung bay, Indonesia. *Parasitology Research*, 104(3), 523-532. doi:10.1007/s00436-008-1226-7
- Ruitenbergh, E. J., Berkvens, J. M., y Duyzings, M. J. (1971). Experimental *Anisakis* marina infections in rabbits. *Journal of Comparative Pathology*, 81(1), 157-163.
- Ruiz-Valero, J. (1991). *Presencia de larvas de anisakidos en peces de frecuente consumo en la población de Granada*. (Memoria de Licenciatura). Universidad de Granada, Granada.
- Ruiz-Valero, J., Valero, A., Adroher, F., y Ortega, J. (1992). Presencia de ascáridos en peces comerciales de frecuente consumo en Granada. En S., Hernández (ed.), *in memoriam al Profesor Doctor D. F. de P. Martínez Gómez* (pp. 335-349). Córdoba, Universidad De Córdoba.
- Russell, K., y Jacob, S. E. (2010). Bisabolol. *Dermatitis*, 21(1), 57-58.
- Safayhi, H., Sabieraj, J., Sailer, E. R., y Ammon, H. P. (1994). Chamazulene: An antioxidant-type inhibitor of leukotriene B4 formation. *Planta Medica*, 60(5), 410-413. doi:10.1055/s-2006-959520
- Sainclivier, M. (1985). L'industrie alimentaire halieutique. volume II. des techniques ancestrales a leurs réalisations contemporaines: salage, séchage, fumage, marinage, hydrolysats. Sciences Agronomiques. France: ENSAR, Rennes.
- Saito, W., Kawakami, K., Kuroki, R., Matsuo, H., Oishi, K., y Nagatake, T. (2005). Pulmonary anisakiasis presenting as eosinophilic pleural effusion. *Respirology*, 10(2), 261-262. doi:10.1111/j.1440-1843.2005.00643.x
- Sakanari, J., Loinaz, H., Deardorff, T., Raybourne, R., McKerrow, J., y Frierson, J. G. (1988). Intestinal anisakiasis: A case diagnosed by morphologic and immunologic methods. *American Journal of Clinical Pathology*, 90(1), 107-113.
- Salgueiro, J. B., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M. B., Izquierdo, I., y Medina, J. H. (1997). Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 58(4), 887-891.

- Samarasekera, R., Weerasinghe, I. S., y Hemalal, K. P. (2008). Insecticidal activity of menthol derivatives against mosquitoes. *Pest Management Science*, 64(3), 290-295. doi:10.1002/ps.1516
- Sanmartín, M., Quinteiro, P., Iglesias, R., Santamaría, M. T., Leiro, J., y Uberira, F. M. (1994). Nematodos parásitos en peces de las costas gallegas. Madrid: Díaz Santos.
- Santoro, M., Badillo, F. J., Mattiucci, S., Nascetti, G., Bentivegna, F., Insacco, G., . . . Aznar, F. J. (2010a). Helminth communities of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from central and western mediterranean sea: The importance of host's ontogeny. *Parasitology International*, 59(3), 367-375. doi:10.1016/j.parint.2010.04.009
- Santoro, M., Mattiucci, S., Paoletti, M., Liotta, A., Uberti, B. D., Galiero, G., y Nascetti, G. (2010b). Molecular identification and pathology of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) infection in the Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Veterinary Parasitology*, 174(1-2), 65-71. Doi: 10.1186/1471-2334-11-82
- Sapunar, J., Doerr, E., y Letonja, T. (1976). Anisakiasis humana en Chile. *Boletín Chileno de Parasitología*, 31, 79-83.
- Sarris, J., Panossian, A., Schweitzer, I., Stough, C., y Scholey, A. (2011). Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence. *European Neuropsychopharmacology*, 21(12), 841-860. doi:10.1016/j.euro neuro.2011.04.002
- Schuhmacher, A., Reichling, J., y Schnitzler, P. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses *Herpes simplex virus type 1* and *type 2 in vitro*. *Phytomedicine*, 10(6-7), 504-510. doi:10.1078/094471103322331467
- Sequeira, V., Gordo, L. S., Neves, A., Paiva, R. B., Cabral, H. N., y Marques, J. F. (2010). Macroparasites as biological tags for stock identification of the bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (deLaroché, 1809) in Portuguese waters. *Fisheries Research*, 106(3), 321-328. doi:dx.doi.org/10.1016/j.fishres.2010.08.014

- Serracca, L., Cencetti, E., Battistini, R., Rossini, I., Prearo, M., Pavoletti, E., . . . Ercolini, C. (2013). Survey on the presence of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in fishes and squids caught in Ligurian sea. *Veterinary Parasitology*, 196(3-4), 547-551. doi:10.1016/j.vetpar.2013.02.024
- Servicio Andaluz de Salud. (2007). Conjunto mínimo básico de datos al alta hospitalaria de andalucía (CMBDA).
- Servicio Andaluz de Salud. (2008). Conjunto mínimo básico de datos al alta hospitalaria de andalucía (CMBDA).
- Servicio Andaluz de Salud. (2009). Conjunto mínimo básico de datos al alta hospitalaria de andalucía (CMBDA).
- Shamsi, S., y Butcher, A. R. (2011). First report of human anisakidosis in australia. *The Medical Journal of Australia*, 194(4), 199-200.
- Shih, H. H., Ku, C. C., y Wang, C. S. (2010). *Anisakis simplex* (nematoda: Anisakidae) third-stage larval infections of marine cage cultured cobia, *rachycentron canadum* L., in taiwan. *Veterinary Parasitology*, 171(3-4), 277-285. doi:10.1016/j.vetpar.2010.03.023
- Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., y Kvetnaya, A. S. (2008). Antibacterial activity of *Chamomilla recutita* oil extract against *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research: PTR*, 22(2), 252-253. doi:10.1002/ptr.2243
- Shimakura, K., Miura, H., Ikeda, K., Ishizaki, S., Nagashima, Y., Shirai, T., . . . Shiomi, K. (2004). Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 135(1), 69-75.
- Shirahama, M., Koga, T., Ishibashi, H., Uchida, S., Ohta, Y., y Shimoda, Y. (1992). Intestinal anisakiasis: US in diagnosis. *Radiology*, 185(3), 789-793.
- 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 gastro-intestinal tract. *Acta Medica et Biologica*, 22, 57-98.

- Shoukry, I. F. (1997). Toxicological deteriorations of two volatile oils of *Matricaria chamomilla* and *Clerodendron inerme* on the adult house fly *Musca domestica* L. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 27(3), 893-904.
- Sikkema, J., De Bont, J. A., y Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59(2), 201-222.
- Silva, M., y 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), 13-17.
- Silva, N., Barbosa, L., Seito, L., y Fernandes Junior, A. (2012). Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Natural Product Research*, 26(16), 1510-1514.
- Simón, M. R., Alonso, A., Blanco, B., Bueno, P., y Muínelo, I. (Junio, 2002). Anisakiasis. una parasitosis emergente. A propósito de un caso. *XVII Congreso Sociedad Castellano Leonesa de Medicina Interna*, Valladolid.
- Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía (2007). *Junta de Andalucía*, 11(5).
- Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía (2007). *Junta de Andalucía*, 12(2).
- Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía (2007). *Junta de Andalucía*, 12(3).
- Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía (2013a). *Junta de Andalucía*, 11(3).
- Sistema de vigilancia epidemiológica de Andalucía (2013b). Protocolo de Vigilancia y Alerta de Anisakiasis. *Junta de Andalucía*. Último acceso el 26 de Marzo de 2014, desde http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/csalud/galerias/documentos/p_4_p_1_vigilancia_de_la_salud/anisakiasis_v2_2013.pdf
- Smith, J. W. (1983). *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809; det. Krabbe, 1878) (Nematoda, ascaridoidea): Morphology and morphometry of larvae from euphausiida and fish, and a review of the life history and ecology. *Journal of Helminthology*, 57, 205-224.

- 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), 491-495.
- Smith, J. W., y Snyder, J. M. (2005). New locality records for third-stage larvae of *Anisakis simplex (sensu lato)*(Nematoda: Ascaridoidea) in euphausiids *Euphausia pacifica* and *Thysanoessa raschii* from prince william sound, Alaska. *Parasitology Research*, 97(6), 539-542.
- Smith, J. W., y 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), 133-136.
- Smith, J. W., y Wootten, R. (1978). *Anisakis* and anisakiasis. *Advances in Parasitology*, 16, 93-163. doi:dx.doi.org/10.1016/0020-7519(75)90019-3
- Soković, M. D., Vukojevic, J., Marin, P. D., Brkic, D. D., Vajs, V., y van Griensven, L. J. (2009). Chemical composition of essential oils of thymus and mentha species and their antifungal activities. *Molecules*, 14(1), 238-249. doi:10.3390/molecules14010238
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., y Griensven, L. J. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, 15(11), 7532-7546.
- Srivastava, J. K., y Gupta, S. (2007). Antiproliferative and apoptotic effects of chamomile extract in various human cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9470-9478.
- Srivastava, J. K., Shankar, E., y Gupta, S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Molecular Medicine Reports*, 3(6), 895-901. doi:10.3892/mmr.2010.377
- Sudjana, A. N., Carson, C. F., Carson, K. C., Riley, T. V., y Hammer, K. A. (2012). *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. *Medical Mycology*, 50(8), 863-870. doi:10.3109/13693786.2012.683540;

- Sugane, K., Sun, S. H., y Matsuura, T. (1992). Radiolabelling of the excretory-secretory and somatic antigens of *Anisakis simplex* larvae. *Journal of Helminthology*, 66(4), 305-309.
- Sugimachi, K., Inokuchi, K., Ooiwa, T., Fujino, T., y Ishii, Y. (1985). Acute gastric anisakiasis. analysis of 178 cases. *The Journal of the American Medical Association*, 253(7), 1012-1013.
- Suzuki, J., Murata, R., Hosaka, M., y 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), 88-93. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.10.001
- Takabe, K., Ohki, S., Kunihiro, O., Sakashita, T., Endo, I., Ichikawa, Y., . . . Suzuki, K. (1998). Anisakidosis: A cause of intestinal obstruction from eating sushi. *The American Journal of Gastroenterology*, 93(7), 1172-1173.
- Tampieri, M. P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M. S., Falcioni, L., Cioni, P. L., y Morelli, I. (2005). The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*, 159(3), 339-345. doi:10.1007/s11046-003-4790-5
- Taranto, D., Sessa, G., Tortora, R., y Tremolaterra, F. (2011). Narrow band imaging enhancement could improve gastric *Anisakis* detection. *Digestive and Liver Disease*, 43(3), e5. doi:10.1016/j.dld.2010.02.007
- Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A., y Rohloff, J. (2010). Essential-oil composition, antileishmanial, and toxicity study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from ethiopia. *Chemistry and Biodiversity*, 7(4), 1009-1018. doi:10.1002/cbdv.200900375
- Tassou, C., Drosinos, E., y Nychas, G. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10 C. *Journal of Applied Microbiology*, 78(6), 593-600.

- Tejada, M. (2009). *Anisakis*: Efecto de los tratamientos dados al pescado en las larvas y en sus alérgenos. *Revista Alimentación, Nutrición y Salud*, 16(3), 71-83.
- Tejada, M., Solas, M. T., Navas, A., y Mendizabal, A. (2006). Scanning electron microscopy of *Anisakis* larvae following different treatments. *Journal of Food Protection*, 69(6), 1379-1387.
- Tisserand, R., y Balacs, T. (1995). *Essential oil safety: A guide for health care professionals* Churchill Livingstone London.
- Toro, C., Caballero, M. L., Baquero, M., García-Samaniego, J., Casado, I., Rubio, M., y Moneo, I. (2004). High prevalence of seropositivity to a major allergen of *Anisakis simplex*, ani s 1, in dyspeptic patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(1), 115-118. doi:10.1128/CDLI.11.1.115-118.2004
- Turi, M., Turi, E., Koljalg, S., y Mikelsaar, M. (1997). Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strains of different origin. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 105(12), 956-962.
- Ubeira, F., y Iglesias, R. (2000). Monoclonal antibodies in the study of *Anisakis simplex*. *Allergy*, 55(Supp59), 18-27.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., y Uchida, A. (2007). Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in japan. *Parasitology International*, 56(3), 211-215. doi:10.1016/j.parint.2007.02.005
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., y Uchida, A. (2008). Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International*, 57(1), 49-53. doi:10.1016/j.parint.2007.08.003
- Umehara, A., Kawakami, Y., Matsui, T., Araki, J., y 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), 267-271. doi:10.1016/j.parint.2006.07.001

- Urban, J. F., Madden, K. B., Svetic, A., Cheever, A., Trotta, P. P., Gause, W. C., . . . Finkelman, F. D. (1992). The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunological Reviews*, 127, 205-220.
- Valentini, A., Mattiucci, S., Bondanelli, P., Webb, S. C., Mignucci-Giannone, A. A., Colom-Llavina, M. M., y Nascetti, G. (2006). Genetic relationships among *Anisakis* species (nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox2* sequences, and comparison with allozyme data. *The Journal of Parasitology*, 92(1), 156-166. doi:10.1645/GE-3504.1
- Valero, A., del Mar López-Cuello, M., Benítez, R., y Adroher, F. J. (2006a). *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.
- Valero, A., Gutiérrez, J., Pérez, R., Sanz-Domínguez, J., Geraldia, M., García-Herruzo, J., . . . Adroher, F. (Octubre, 1992). *Descripción de un caso de anisakiosis humana*. IX Reunión Científica de La Asociación de Parasitólogos Españoles, León.
- Valero, A., Hierro, I., González, P., Montilla, P., y Navarro, M. (2006b). Activity of various essential oils and their main components against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. En J. N. Govil, V. K. Singh y P. Arunachalam (Eds.), *Recent progress in medicinal plants, drug development from molecules*. Houston: Studium Press, LLC.
- Valero, A., Martin-Sanchez, J., Reyes-Muelas, E., y Adroher, F. J. (2000). Larval anisakids parasitizing the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, from Motril bay in the mediterranean region of southern Spain. *Journal of Helminthology*, 74(4), 361-364.
- Valero, A., Paniagua, M., Hierro, I., Díaz, V., Valderrama, M., Benítez, R., y Adroher, F. (2006a). Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the mediterranean coasts of Andalucía (southern Spain). *Parasitology International*, 55(1), 1-5.
- Valiñas, B., Lorenzo, S., Eiras, A., Figueiras, A., Sanmartín, M., y Ubeira, F. (2001). Prevalence of and risk factors for IgE sensitization to *Anisakis simplex* in a spanish population. *Allergy*, 56(7), 667-671.

- Valls, A., Pascual, C., y Martín Esteban, M. (2003). *Anisakis* and anisakiosis. *Allergologia et Immunopathologia*, 31(6), 348-355.
- Van Den Broucke, C. O., y Lemli, J. A. (1980). Antispasmodic activity of *origanum compactum*. *Planta Medica*, 38(4), 317-331. doi:10.1055/s-2008-1074884
- Van Thiel, P. (1962). Anisakiasis. *Parasitology*, 52, 16-17.
- Van Thiel, P. H. (1976). The present state of anisakiasis and its causative worms. *Tropical and Geographical Medicine*, 28(2), 75-85.
- Van Thiel, P., Kuipers, F., y Roskam, R. T. (1960). A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Tropical and Geographical Medicine*, 12(2), 97-113.
- Vardić Smrzlic, I., Valic, D., Kapetanovic, D., Kurtovic, B., y Teskeredzic, E. (2012). Molecular characterisation of anisakidae larvae from fish in Adriatic sea. *Parasitology Research*, 111(6), 2385-2391. doi:10.1007/s00436-012-3094-4
- Verhamme, M., y Ramboer, C. (1988). Anisakiasis caused by herring in vinegar: A little known medical problem. *Gut*, 29(6), 843-847.
- Vidacek, S., de las Heras, C., y Tejada, M. (2009). Quality of fish muscle infested with *Anisakis simplex*. *Food Science and Technology International*, 15(3), 283-290.
- Vidal, F., Vidal, J. C., Gadelha, A. P., Lopes, C. S., Coelho, M. G., y Monteiro-Leal, L. H. (2007). *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Experimental Parasitology*, 115(1), 25-31. doi:10.1016/j.exppara.2006.05.001
- Viola, H., Wasowski, C., De Stein, M. L., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, F., . . . Paladini, A. (1995). Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Medica*, 61(03), 213-216.

- Víu, M., Sánchez-Acedo, C., Del Cacho, E., Quílez, J., y López-Bernad, F. (1996). Occurrence of anisakid larvae (Nematoda: Ascaridida) in fresh market fish from Zaragoza (Spain). *Research and Reviews in Parasitology*, 56 (1), 25-28.
- Walton, S. F., McKinnon, M., Pizzutto, S., Dougall, A., Williams, E., y Currie, B. J. (2004). Acaricidal activity of *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro* sensitivity of *Sarcoptes scabiei* var hominis to terpinen-4-ol. *Archives of Dermatology*, 140(5), 563.
- Warikoo, R., Wahab, N., y Kumar, S. (2011). Oviposition-altering and ovicidal potentials of five essential oils against female adults of the dengue vector, *Aedes aegypti* L. *Parasitology Research*, 109(4), 1125-1131. doi:10.1007/s00436-011-2355-y
- Weerasooriya, M. V., Fujino, T., Ishii, Y., y Kagei, N. (1986). The value of external morphology in the identification of larval anisakid nematodes: A scanning electron microscope study. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 72(6), 765-778.
- Weizman, Z., Alkrinawi, S., Goldfarb, D., y Bitran, C. (1993). Efficacy of herbal tea preparation in infantile colic. *The Journal of Pediatrics*, 122(4), 650-652.
- Wharton, D., Hassall, M., y Aalders, O. (1999). *Anisakis* (Nematoda) in some New Zealand inshore fish. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 33(4), 643-648.
- Wootten, R., y Cann, C. (2001). *Round worms in fish* Food and Drug Administration. Último acceso el 26 de Marzo de 2014, desde <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5951E/x5951e00.htm>
- Yamasaki, K., Nakano, M., Kawahata, T., Mori, H., Otake, T., Ueba, N., . . . Nakanishi, T. (1998). Anti-HIV-1 activity of herbs in Labiatae. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 21(8), 829-833.
- Yokogawa, M., y Yoshimura, H. (1967). Clinicopathologic studies on larval anisakiasis in Japan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 16(6), 723-728.

- Yoo, H. J., Kim, S. H., Lee, J. M., Kim, M. A., Han, J. K., y Choi, B. I. (2008). The association of anisakiasis in the ascending colon with sigmoid colon cancer: CT colonography findings. *Korean Journal of Radiology*, 9 Suppl, S56-60. doi:10.3348/kjr.2008.9.s.s56
- Yousef, R. T., y Tawil, G. G. (1979). Antimicrobial activity of volatile oil components. *Manufacturing Chemist and Aerosol News*, 50, 59-63.
- Zhu, X., Gasser, R. B., Podolska, M., y Chilton, N. B. (1998). Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 28(12), 1911-1921.
- Zick, S., Wright, B., Sen, A., y Arnedt, J. T. (2011). Preliminary examination of the efficacy and safety of a standardized chamomile extract for chronic primary insomnia: A randomized placebo-controlled pilot study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 78.
- Zuloaga, J., Rodríguez-Bobada, C., Corcuera, M. T., Gómez-Aguado, F., Gonzalez, P., Rodríguez-Pérez, R., . . . Caballero, M. L. (2013). A rat model of intragastric infection with *Anisakis* spp. live larvae: Histopathological study. *Parasitology Research*, 112(6), 2409-2411. doi:10.1007/s00436-013-3359-6

ANEXO

ANEXO.

Figura 1. A. L₃ de *Anisakis* en (A) boca y ojo de bacaladillas (B) enquistadas bajo la piel (C) enquistadas en vísceras y en la musculatura de bacaladillas (D).



Figura 2. Lesión producida por L₃ de *Anisakis* tipo II.

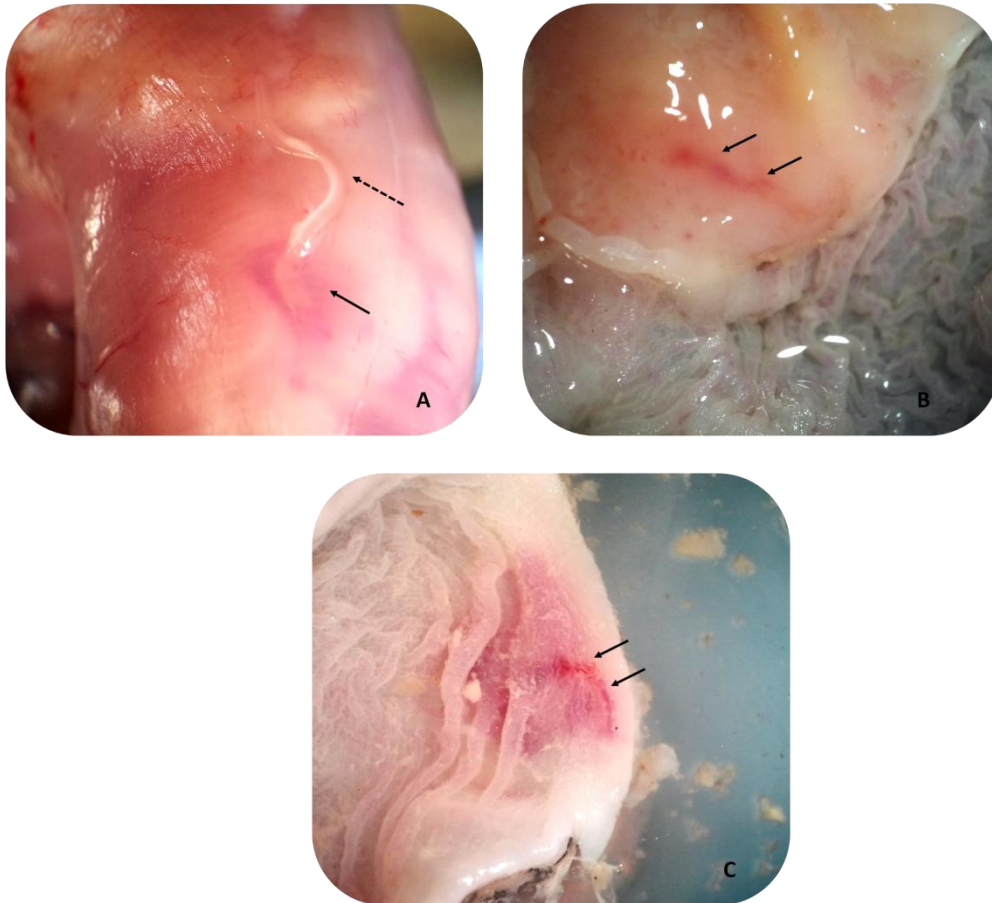


Figura 3. A. Perforación de la pared del estómago de rata y salida a la cavidad corporal de la larva de *Anisakis* tipo I. B y C. Túnel en la pared gástrica producida por el parásito.

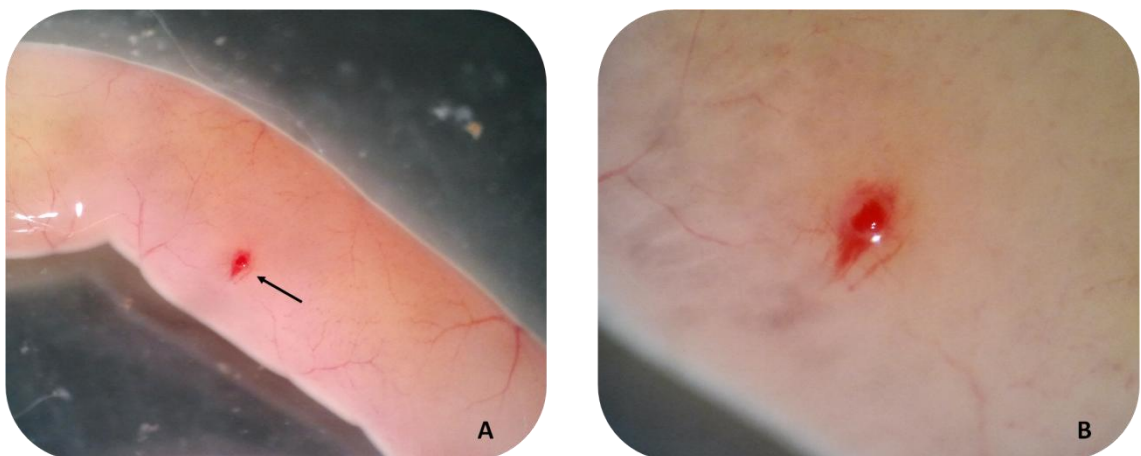


Figura 4. A. Lesión en intestino producido por una larva de *Anisakis* tipo I. B. Imagen ampliada de la lesión.

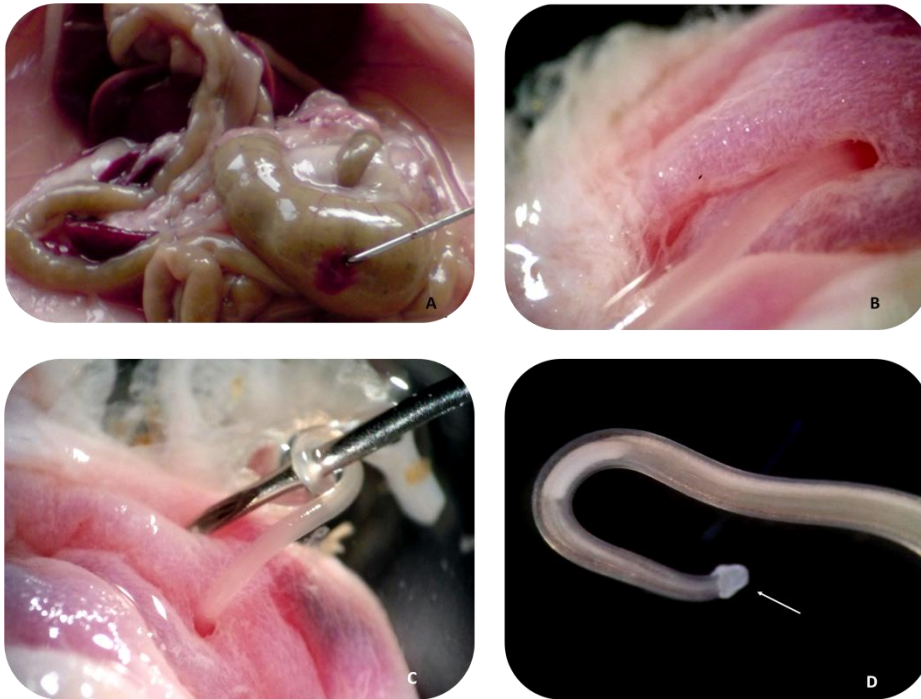


Figura 5. A. Lesión producida por L₃ de *Anisakis* tipo I en estómago de una rata wistar. B y C. Perforación de la pared gástrica producida por una larva. D. Larva de *Anisakis* tipo I con capuchón tras ser extraída de la mucosa gástrica.

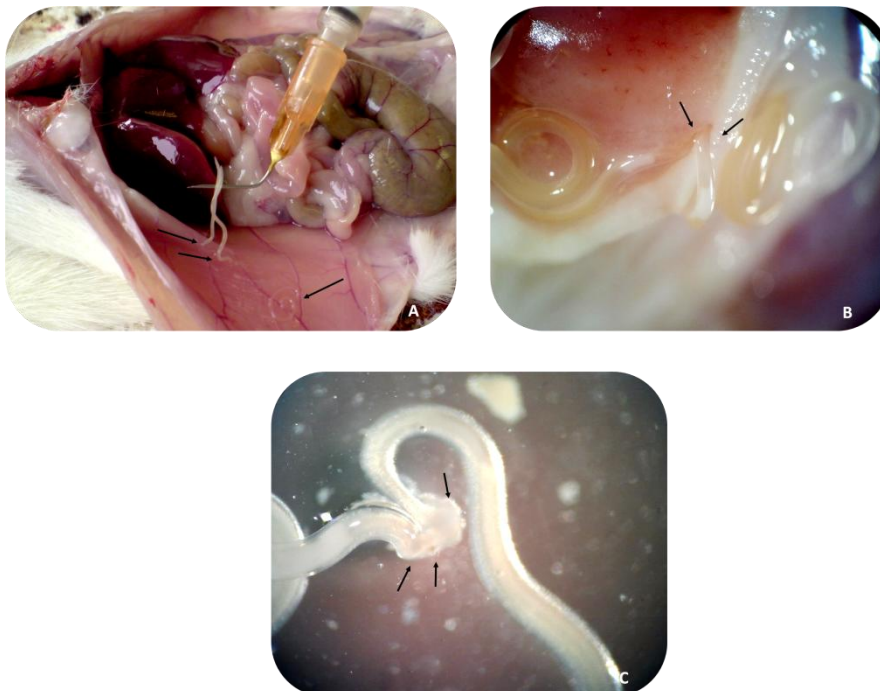


Figura 6. A. Larvas de *Anisakis* tipo I fijadas en la musculatura abdominal tras perforar el estómago del animal de experimentación B. Perforación de la pared gástrica producida por dos larvas. D. Larvas de *Anisakis* tipo I unidas por un capuchón tras ser extraídas de la mucosa gástrica.

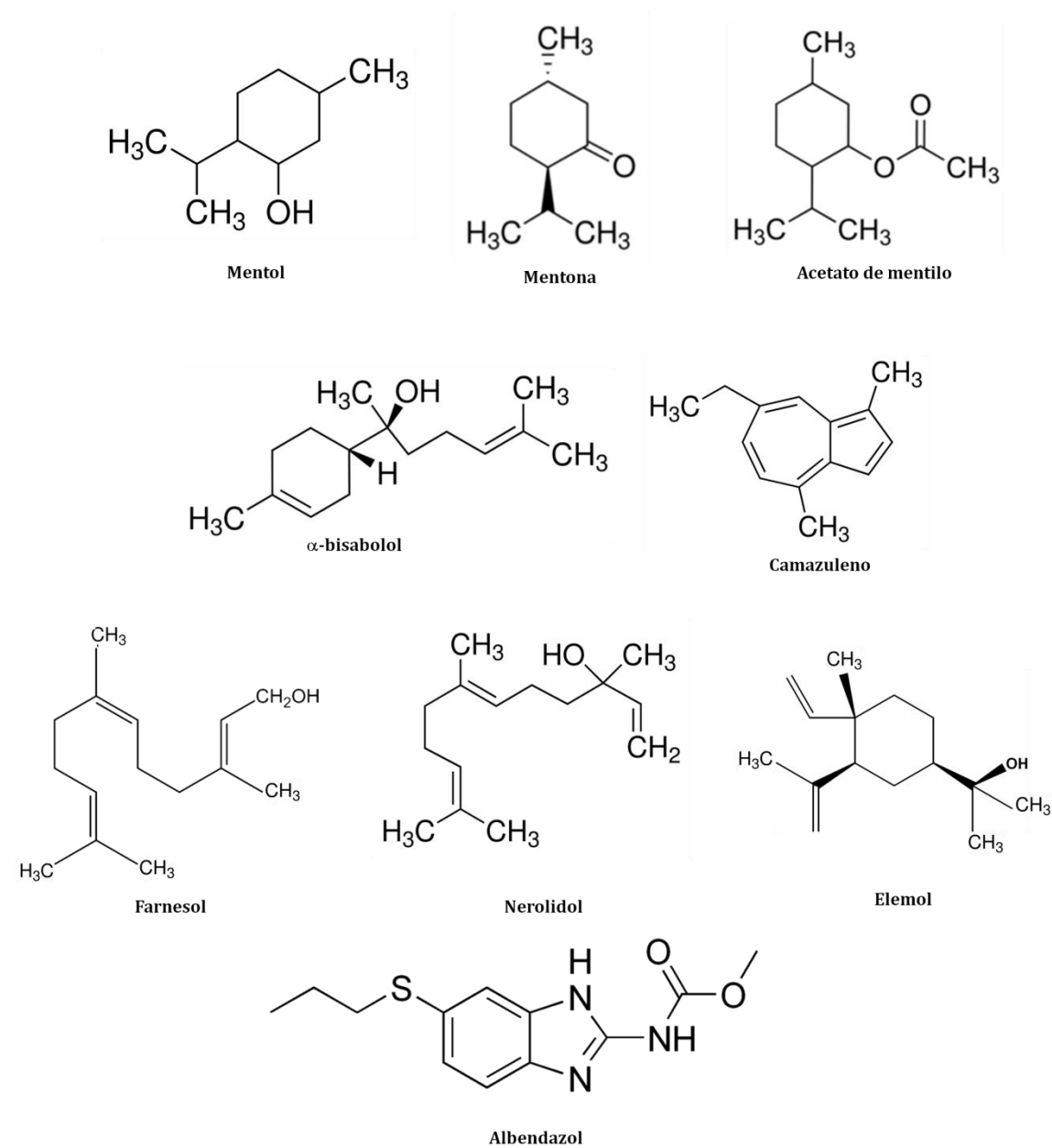


Figura 7. Productos utilizados frente *Anisakis* Tipo I.

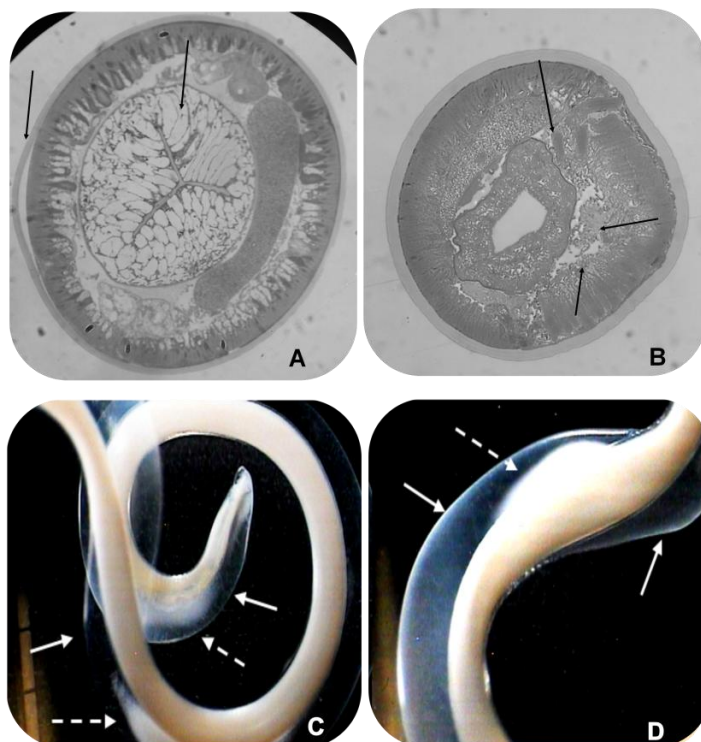


Figura 8. A y B. Cortes histológicos del intestino y de la cutícula de *Anisakis* Tipo I. C y D. Alteraciones en la cutícula tras 24 horas con manzanilla (125 $\mu\text{g/ml}$).

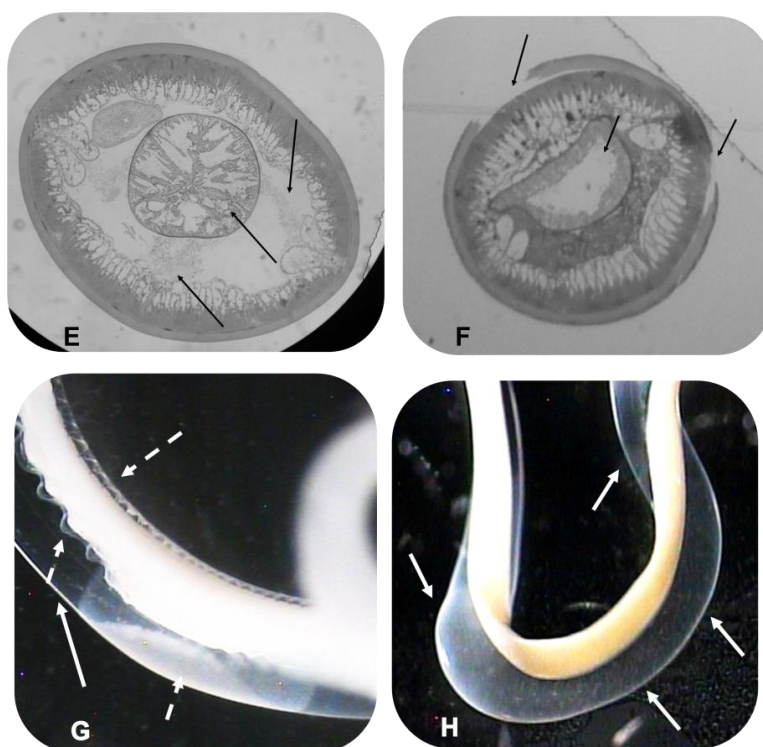


Figura 9. E y F. Material celular en intestino y alteraciones en la cutícula. G y H. Daños en la cutícula producidos por α -bisabolol (125 $\mu\text{g/ml}$).

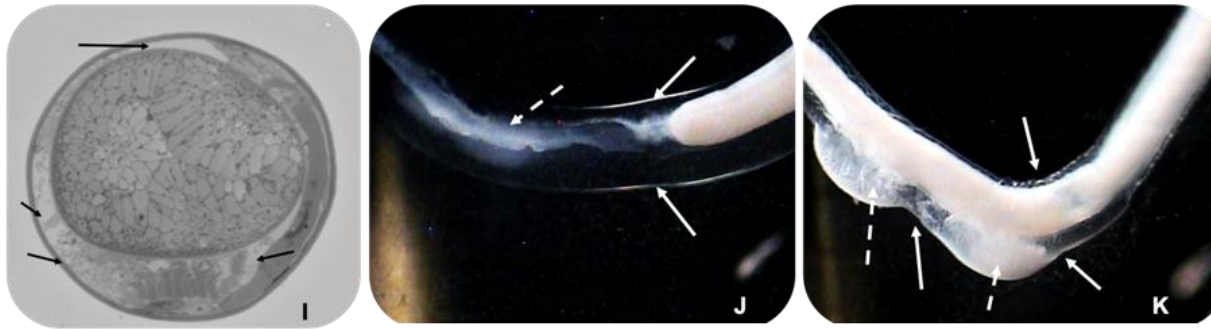


Figura 10. I. Proyecciones hacia el exterior de la cutícula. J y K. Alteraciones de la cutícula y del ventrículo producidas por A.E. menta (250 µg/ml) observables con lupa.

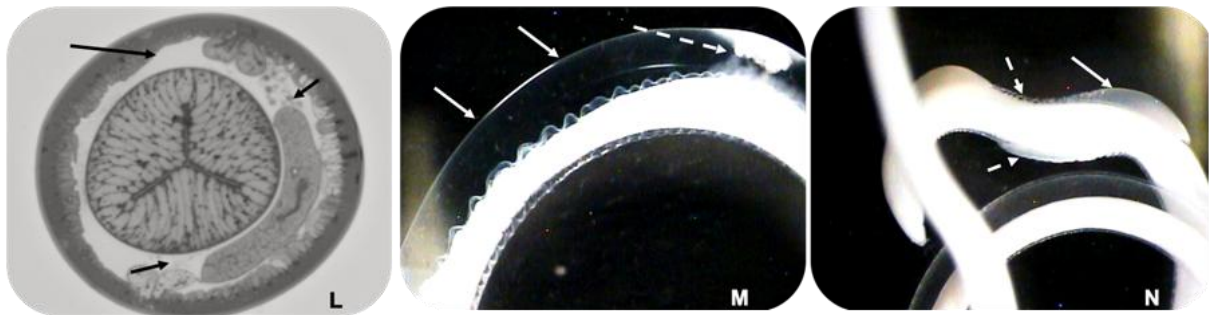


Figura 11. L. Contenido celular alterado alrededor del intestino. M y N. Alteraciones de la cutícula producidas por mentol.

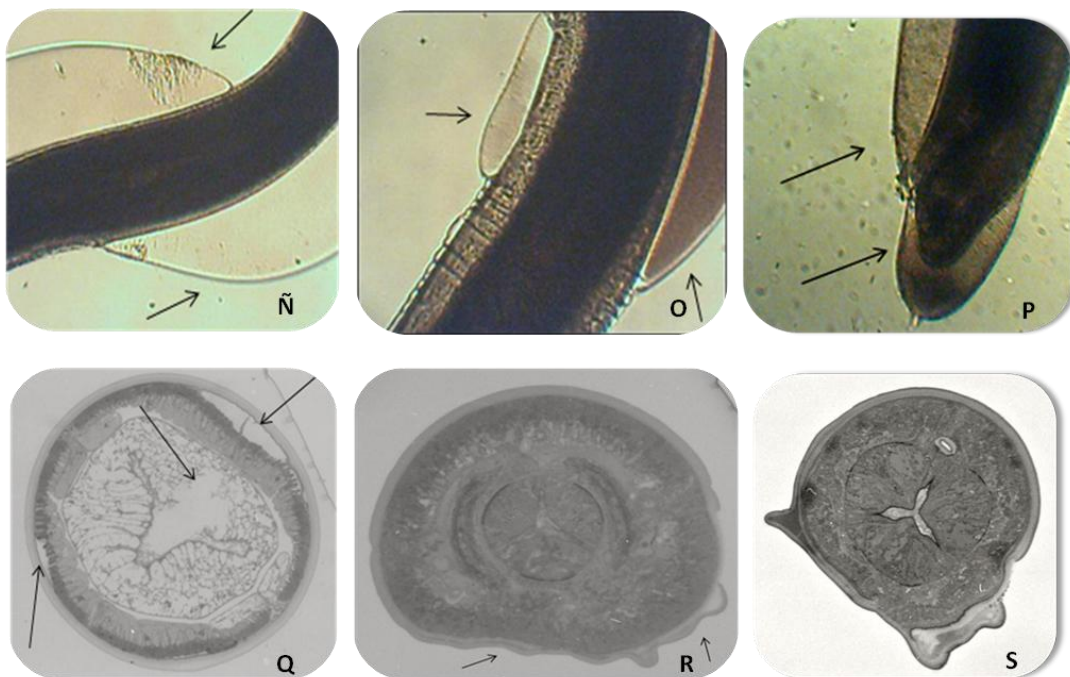


Figura 12. Alteraciones de la cutícula con nerolidol (Ñ), farnesol (O) y elemol (P). Contenido celular alterado alrededor del intestino. Q-S. Alteraciones de la cutícula producidas por nerolidol, farnesol y elemol respectivamente.