

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología



**“Prevalencia y factores de riesgo de  
la anisakiosis en el norte de  
Marruecos”**

Memoria que presenta la licenciada Naima Abattouy  
para aspirar al Grado de Doctor Europeo.

Granada, Enero de 2012.

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Parasitología




**“Prevalence and risk factors of  
anisakiasis in the north of  
Morocco”**

Memoria que presenta la licenciada Naima Abattouy  
para aspirar al Grado de Doctor Europeo.

Granada, Enero de 2012.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Naima Abattouy  
D.L.: GR 1712-2012  
ISBN: 978-84-9028-080-5

Las Dras. Joaquina Martín Sánchez, Adela Valero López y Josefa lozano Maldonado, Profesoras del Departamento de Parasitología, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada,

The seal of the University of Granada is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two eagles with their wings spread. The shield is supported by two columns. The outer ring of the seal contains the Latin text "UNIVERSITATIS GRANATENSIS CAROLVS RO IMP SEMPER AVG HISPAN R EX FVNDA TOR".

*Informan:* que el trabajo de investigación que se expone en la siguiente Tesis Doctoral titulada **“Prevalencia y factores de riesgo de la anisakiosis en el norte de Marruecos”**, ha sido realizado bajo su dirección conjunta por la licenciada en Biología por la Universidad Abdel malek Essaadi, Abattouy Naima, la encuentran conforme para ser presentado y aspirar al grado de doctor Europeo por la Universidad de Granada por el Tribunal correspondiente. Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente a Enero, 2012

*Fdo. Joaquina Martín Sánchez*

*Fdo. Adela Valero López*

*Fdo. Josefa lozano Maldonado*



*Esta memoria de tesis doctoral titulada "Prevalencia y factores de riesgo de la anisakiosis en el norte de Marruecos" ha sido financiada por el proyecto de excelencia P07-CVI-03249 de la junta de Andalucía y los proyectos A/4627/05-A/7211/06 concedidos por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) en el marco de la cooperación internacional entre Marruecos y España.*

*Parte de los resultados de este trabajo se han realizado en otro centro de la Unión Europea: Universidad de Estrasburgo-Francia por el objetivo de aspirar al grado de Doctor Europeo.*

*Prof. Dra. Joaquina Martín Sánchez, Profesora titular de la Universidad de Granada*

*Prof. Dra. Adela Valero López, catedrática de la Universidad de Granada*

*Prof. Dra. Josefa Lozano Maldonado, Profesora titular de la Universidad de Granada*

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

*Fdo. Joaquina Martín Sánchez*

*Fdo. Adela Valero López*

*Fdo. Josefa Lozano Maldonado*

*Granada, Enero de 2012*

*El Dr. Francisco Morillas Márquez, Director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada;*

*AUTORIZA la presentación de la Tesis “Prevalencia y factores de riesgo de la Anisakiosis en el norte de Marruecos”, de la que es autora D<sup>a</sup>. Naima Abattouy, para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Granada.*

*Fdo. Francisco Morillas Márquez*

*Granada, Enero de 2012.*

*A mi familia*



*Hace poco más de cinco años que mi vida cambió por completo.*

*Jamás había tenido la intención, ni la más profunda sensación de vivir sola y lejos de mi gente por tanto tiempo. El hecho de emprender este viaje fuera de mi país y vivir en otra tierra ha marcado mi vida para siempre. A pesar de nacer y crecer en la pequeña ciudad de Tetuán donde la cultura española siempre ha estado presente en todas las calles y rincones. La experiencia que conlleva vivir en un país extranjero siempre ayuda a crecer como personas.*

*Y ahora que estoy acabando la tesis pienso que, a pesar de las carencias que me enfrentaron y los dificultades que me acogieron, no tengo la menor duda de que si vuelve el tiempo atrás volvería a vivir esa aventura de la tesis ... con el paso del tiempo se aprende que la felicidad es gratuita y fiel compañera de todos los días...*

*Al culminar esta tesis quiero expresar mi gratitud primero a Dios por darme fuerza suficiente para afrontarme a los retos que me presenta la vida, una de ellas es mi carrera profesional.*

*Durante este período, son muchas las personas que han participado en este trabajo y a quienes quiero reconocer su apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada.*

*En primer lugar quiero agradecer al Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada por la acogida y el apoyo recibidos de todos sus miembros durante los largos y fructíferos periodos que he desarrollado en ellos mi labor investigadora.*

*Debo un especial reconocimiento a la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) por hacer de ese sueño realidad al concederme una beca predoctoral con la cual fue posible aventurarme en esta travesía. Asimismo agradezco a la MEC por la beca de movilidad concedida.*

*La realización de la presente Tesis es un esfuerzo en el cual han participado en mayor o menor medida, varias ofreciéndome sus conocimientos y experiencia y me han demostrado mucha paciencia y por ello quiero expresar*

*Un sincero agradecimiento a mis Directoras; La Dra. Adela Valero López, quien me recibió por primera vez en su laboratorio, confió en mí y me aguantó en los duros momentos de la corrección de la tesis, sus atinadas y importantes correcciones y su orientación me han ayudado a superar estos duros momentos. la Dra. Joaquina Martín Sánchez que además de orientarme en todo el proceso de la elaboración de la Tesis, siempre me demostró su apoyo y su cariño, y a pasar de sus ocupaciones siempre encuentra un hueco para charlar conmigo y escucharme como una verdadera amiga.*

*Por último pero no menos importante agradezco a la Dra. Josefa Lozano Maldonado por su apoyo y cariño...por los largos días que hemos compartido con la técnica del inmunoblot...Gracias por todo el tiempo que me han dedicado, por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho he sacado y por el respaldo y la amistad que me han ofrecido siempre.*

*Asimismo, recuerdo con gratitud los meses pasados en la facultad de Farmacia de la universidad de Estrasburgo (Francia), bajo la dirección del encantador Pr. Bernard Pesson que, además de recibirme en pleno verano y privarme de sus vacaciones, me acogió con mucho cariño.*

*Me gustaría dedicar esta Tesis a mi familia, mis padres y hermanos... a quienes agradezco de todo corazón por su amor, cariño y apoyo.*

*Para mi padre, por confiar en mí y animarme desde mi infancia a estudiar y ver muy lejos ... A mi madre, mi fuente de alegría y cariño.. que desde el principio de mi carrera hasta el día de hoy continúa dándome ánimo para seguir dando el mejor de mí, sus palabras y su cariño alimentan el vacío de la distancia.. Agradezco a mi hermana Nabila y hermanos por el apoyo que me brindan. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor.*

*Quiero dedicar este trabajo a la memoria de José Antonio, nuestro técnico del departamento, quien me alegraba las mañanas de trabajo, su presencia en el departamento me ayudó a hacerme un hueco en este hogar. Siempre estaba a mi lado, apoyándome y escuchándome durante largas horas, contándole todas mis preocupaciones y siempre me escuchaba con una sonrisa. Alrededor del siempre reinaba un ambiente de humor y simpatía... siempre me acordaré del.*

*Hay otro grupo de personas que a lo largo de estos 5 años han estado siempre ahí, en las duras y en las maduras, por lo que es de ley que figuren en estas líneas por méritos propios ... son mis amigas que, no sé como mi hubiera podido aguantar este período sin ellas..*

*Quiero agradecer muy especialmente a IKram, mi amiga y compañera de piso, que durante bastante tiempo ha tenido la paciencia suficiente para apoyarme profundamente, para darme su comprensión, su cariño y su amor. Gracias por hacer de esos momentos un verdadero vivir.*

*Agradezco también a mi amiga lamiae, por su sincera amistad, compañera infatigable a la que le debo un cachito de esta Tesis, que además de ser mi amiga, me ha acompañado en el día a día, compartíamos sufrimiento de tesis, comida y cafés ... su presencia siempre me daba esperanza.*

*Sin olvidar la sonrisa, el entusiasmo y el apoyo mutuo de Laura, por su amistad y su colaboración a todo momento, que después de las largas jornadas de trabajo siempre pasamos un buen rato contándonos como nos fueran los largos días trabajo.*

*Agradezco igualmente a Loubna, Brahim, Hikmat..y muchos otros más que no se me cabe mencionarlos todos por estar siempre dispuestos a ayudarme, por todos los ratos alegres compartidos juntos y por hacerme el día siempre más alegre con sus compañía.*

*Agradecer también mis compañeros del departamento, Sergio, Manolo, Carmen, Fernando, Gregorio, Rubén, Magdalena, Víctor, Gema .. por la ayuda, la colaboración y por la simpatía y buen ambiente que siempre reinaba por los pasillos del departamento, imprescindible para desarrollar cualquier actividad.*

*Me gustaría resaltar que esta experiencia ha merecido mucho la pena por lo que, por último quiero dar las gracias a todos aquellos que me han devuelto una sonrisa, a todos aquellos que pusieron de su parte para que el trabajo diario sea más llevadero y muy en especial a la vida que, como dijera Violeta Parra, me ha dado tanto.....*

*A todos ellos,*

*Muchas gracias de todo corazón.*

*Summary*

Anisakiasis is an emerging disease with a high number of diagnosed cases worldwide, especially in Japan. The potential severity of its symptoms makes it essential for doctors to increase their awareness of the disease in order to improve diagnostic procedures and for health authorities to develop strategies for its monitoring and control. In Spain, a country which shares some of its Mediterranean and Atlantic waters with Morocco, a high number of cases of gastrointestinal, gastroallergic and allergic anisakiasis have been reported. Yet this is not the case among the Moroccan population, which despite consuming large quantities of fish and having considerable fishing resources, shows little awareness of anisakiasis and underestimates its importance. In view of the lack of bibliographical sources from this country, this doctoral thesis undertakes, as its general objective, **to deepen our knowledge on the principal epidemiological aspects of anisakiasis in northern Morocco.**

To fulfill this general objective, the following specific objectives were pursued:

1. To determine the parameters for parasitization by *Anisakis* in chub mackerel (*Scomber japonicus*) and horse mackerel (*Trachurus trachurus*), two commonly eaten fish in Morocco, and to assess the risk factors associated with the infection of these fish.
2. To investigate the sensitization of the northern Moroccan population to *Anisakis*.
3. To determine and describe the genetic characteristics of *Anisakis* species.

The fish caught in northern Moroccan waters revealed a high prevalence of parasitization by *A. simplex* s.l., mainly of *A. pegreffii*. Although these figures are higher in chub mackerel (62.4%) than horse mackerel (54.9%), in both fish the prevalence in musculature is low, 9.8 and 8.6% respectively, with a very low number of larvae found in this location. Consuming chub mackerel of a lower weight appears to be a good prophylactic measure against anisakiasis, since the greater the weight of the fish, the higher the likelihood that the parasite will have entered the musculature. To minimize the risk of human infection in the case of horse mackerel, however, consuming larger fish should be avoided in summer, as the risk of finding parasite in the muscle is 5 times higher than in other seasons.

There have been no clinical cases of human anisakiasis reported in Morocco. Our investigation into the subclinical sensitization to type I *Anisakis* conducted on the northern Moroccan population allowed us to establish the prevalence at 5.1%, much lower than the figure recorded in Spain.

The genetic identification of the type I *Anisakis* L3 larvae collected throughout this epidemiological trial indicate, as we stated previously, that *A. pegreffii* is the dominant species in northern Moroccan waters, both Mediterranean and Atlantic. At the opposite end of the scale, *A. simplex* s.s. is only weakly represented in Atlantic Moroccan waters.

Using ribosomal DNA markers, we were able to confirm the presence of two unique fixed differences between the two species in the ITS-1 sequence, which is consistent with previous studies. The detection of intermediate genotypes between the two species in these positions can mainly be interpreted as a sign of hybridization between the two species. In Moroccan waters, these hybrid genotypes make up 14.9%, with no significant differences between the Atlantic and Mediterranean ( $p=0.575$ ). *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* are parapatric species and the neighboring coasts of the Iberian Peninsula are areas where they are found in sympatry, sharing hosts. In order to accurately describe the characteristics of these species, larvae from Moroccan waters, Spanish waters and the Little Sole Bank fishing area were included in the study.

The sequences of the mitochondrial *cox2* fragment show 10 fixed differences between *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii*, which would easily allow us to differentiate between the two species through a PCR-RFLP technique, once the appropriate restriction enzymes had been identified. However, mitochondrial markers are limited by the lack of genetic recombination of this DNA, for which reason they can neither confirm nor rule out the existence of hybrids. We were able to highlight one case of mitochondrial introgression in a larva from Little Sole Bank.

In the search for new markers which would allow us to identify these species and study the hybrids, we used isoenzyme electrophoresis with the isoelectric focusing technique, testing 17 enzymatic systems. Four of these

enzymes (PGM, MPI, EST and 6PGD) showed notable polymorphism and were used for studying the genetic structure of populations of the *A. simplex* s.l. complex and drawing up dendrograms.

The results obtained with the three types of genetic markers studied support the presence – in areas such as the coasts of the Iberian Peninsula where *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* are sympatric – of hybridization between the two species, which in our opinion is nothing more than a reflection of the gradual and cumulative process of speciation.

La anisakiosis es una enfermedad emergente con un gran número de casos diagnosticados en todo el mundo, especialmente en Japón. La severidad que puede alcanzar el cuadro clínico hace imprescindible que los médicos la tengan presente para su mejor diagnóstico y que las autoridades sanitarias diseñen estrategias de control y vigilancia. En España, país que comparte con Marruecos parte de las aguas mediterráneas y atlánticas, se han notificado un gran número de casos de anisakiosis gastrointestinal, gastroalérgica y alérgica. No ocurre lo mismo, en la población marroquí, donde a pesar del alto consumo de pescado y de sus importantes recursos pesqueros, la anisakiosis sigue siendo mal conocida y subestimada. Habida cuenta, de la escasez de bibliografía en este país, en la presente tesis doctoral se ha planteado como objetivo general, **profundizar en el conocimiento de los principales aspectos epidemiológicos de la anisakiosis en el norte de Marruecos.**

Para alcanzar este objetivo general, se han perseguido los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar los parámetros de parasitación por *Anisakis* en el estornino (*Scomber japonicus*) y en jurel (*Trachurus trachurus*), dos peces de frecuente consumo en Marruecos, así como evaluar los factores de riesgo asociados a la infección de estos peces.
2. Investigar la sensibilización frente a *Anisakis* de la población en el norte de Marruecos.
3. Determinar y caracterizar genéticamente las especies de *Anisakis*.

Los peces capturados en aguas del norte de Marruecos muestran altas prevalencias de parasitación por *A. simplex* s.l., tratándose fundamentalmente de *A. pegreffii*. Aunque estas cifras son más elevadas en estornino (62.4%) que en jurel (54.9%), en ambos peces, la prevalencia en musculatura es baja, 9.8 y 8.6% respectivamente, con un escaso número de larvas en esta localización. El consumo de estornino de menor peso se presenta como una buena medida profiláctica de la anisakiosis, ya que cuanto mayor es el peso del pescado más alta es la probabilidad de que el parásito esté en la musculatura. En cambio, en el jurel, para minimizar el riesgo de infección humana se debe evitar el consumo de pescados de mayor



tamaño durante el verano, dado que el riesgo de presentar parásitos en el músculo es 5 veces mayor que en el resto de las estaciones.

No se ha notificado ningún caso clínico de anisakiosis humana en Marruecos. La investigación sobre la sensibilización subclínica frente a *Anisakis* tipo I que hemos realizado sobre la población del norte de Marruecos nos ha permitido fijar esta prevalencia en el 5.1%, cifra mucho más baja que la encontrada en España.

La identificación genética de las larvas L3 de *Anisakis* tipo I recogidas a lo largo de este estudio epidemiológico, indica, como antes hemos referido, que *A. pegreffii* es la especie dominante en aguas del norte de Marruecos, tanto en el Mediterráneo como en el Atlántico. Por el contrario *A. simplex* s.s. está débilmente representado en aguas atlánticas marroquíes.

Utilizando marcadores del ADN ribosómico, hemos podido confirmar la existencia en la secuencia del ITS-1, de dos únicas diferencias fijas entre ambas especies, tal como ha sido indicado en otros trabajos. La detección en estas posiciones de genotipos intermedios entre ambas especies se interpreta mayoritariamente como reflejo de hibridación entre ambas especies. En aguas marroquíes estos genotipos híbridos constituyen el 14.9% sin diferencias significativas entre el Atlántico y el Mediterráneo ( $p= 0.575$ ). *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* son 2 especies parapátricas y las vecinas costas de la Península Ibérica representan zonas donde ambas especies se encuentran en simpatria compartiendo hospedadores. Para caracterizar adecuadamente estas especies hemos incluido en el estudio larvas procedentes de aguas marroquíes, españolas y de la zona pesquera de Little Sole Bank.

Las secuencias del fragmento mitocondrial *cox2* nos muestran la existencia de 10 diferencias fijas entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, lo que permitiría fácilmente la diferenciación de ambas especies mediante una técnica de PCR-RFLP, una vez identificadas las enzimas de restricción adecuadas. No obstante, los marcadores mitocondriales tienen la limitación de la falta de recombinación genética de este ADN, por lo que no permiten confirmar o descartar la existencia de híbridos. Sí hemos podido poner de manifiesto la existencia de un caso de introgresión mitocondrial en una larva procedente de Little Sole Bank.

En la búsqueda de nuevos marcadores que permitan la identificación de estas especies y el estudio de los híbridos, hemos utilizado la electroforesis de

isoenzimas con la técnica de isoelectroenfoque ensayando 17 sistemas enzimáticos. Cuatro de estas enzimas (PGM, MPI, EST y 6PGD) han presentado un notable polimorfismo y nos han servido para el estudio de la estructura genética de poblaciones del complejo *A. simplex* s.l. y la construcción de dendrogramas.

Los resultados obtenidos con los tres tipos de marcadores genéticos estudiados, apoyan la existencia en áreas de simpatria de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* como son las costas de la Península Ibérica, de hibridación entre ambas especies, lo cual en nuestra opinión no refleja más que el proceso gradual y acumulativo de la especiación.

*Indice*

## Resumen

<b>I. Introducción</b> .....	1
<b>I.1. Definición de anisakiosis</b> .....	1
<b>I.2. Clasificación</b> .....	1
<b>I.3. Ciclo biológico</b> .....	4
<b>I.4. Características morfológicas de la larva L3</b> .....	6
<b>I.5. Epidemiología</b> .....	8
<b>I.6. Localización del parásito en el pescado. Migración a la musculatura</b> .....	12
<b>I.7. Patología y sintomatología</b> .....	14
I.7.1. Forma clínica no invasiva.....	14
I.7.2. Forma clínica de carácter invasivo.....	14
I.7.3. Alergia a <i>Anisakis</i> .....	17
I.7.3.1. Antígenos de excreción-secreción (ES).....	19
I.7.3.2. Antígenos somáticos.....	19
I.7.3.3. Antígenos de superficie.....	19
I.7.3.4. Alérgenos de <i>A. simplex</i> .....	20
I.7.4. Termoestabilidad de los alérgenos.....	23
<b>I.8. Diagnóstico</b> .....	24
I.8.1. Diagnóstico clínico.....	27
I.8.2. Diagnóstico inmunológico.....	27
I.8.3. Diagnóstico post-operatorio.....	32
<b>I.9. Tratamiento</b> .....	34
<b>I.10. Profilaxis</b> .....	34
I.10.1. Detección de <i>Anisakis</i> en el pescado.....	34
I.10.2. Métodos para prevenir la presencia de <i>Anisakis</i> en el pescado.....	36
I.10.3. Métodos para la inactivación de la larva de <i>Anisakis</i> en el pescado.....	37
I.10.4. Legislación Europea.....	40

I.10.5. Normativa aplicable en España.....	41
<b>I.11. Identificación del parásito.....</b>	<b>42</b>
I.11.1. Identificación morfológica.....	42
I.11.2. Identificación genética.....	45
I.11.2.1. Isoenzimas.....	45
I.11.2.2. Marcadores derivados del ADNr.....	47
I.11.2.3. Otros marcadores genéticos.....	49
I.11.2.4. Sistemática filogenética de anisákidos.....	51
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>53</b>
<b>III.Resultados.....</b>	<b>54</b>
III.1. Capítulo I. Estudio epidemiológico de <i>Anisakis</i> spp. en los peces del norte de Marruecos.....	54
<i>Anisakis simplex</i> s.l. parasitization in mackerel ( <i>Scomber japonicus</i> ) caught in the North of Morocco — Prevalence and analysis of risk factors.....	54
Prevalence and risk factors of infection by <i>Anisakis pegreffii</i> (Nematoda: Anisakidae) in <i>Trachurus trachurus</i> from northern Morocco.....	69
III.2. Capitulo 2. Sensibilización de la población marroquí frente a <i>Anisakis</i> .....	85
Sensitization against <i>Anisakis</i> spp. of the population of Northern Morocco.....	85
III.3. Capítulo 3. Identificación del parásito.....	103
Genetic variation of <i>Anisakis simplex</i> s.s. and <i>A. pegreffii</i> (Nematoda: Anisakidae) in fish from the coasts of Morocco, Spain and Little Sole Bank fishing area.....	103
Estudio genético de poblaciones de <i>Anisakis simplex</i> s.l. usando el análisis de isoenzimas con la técnica de isoelectroenfoco.....	125
<b>IV. Discusión general.....</b>	<b>141</b>
<b>V. Conclusiones.....</b>	<b>149</b>
<b>VI. Bibliografía.....</b>	<b>151</b>

## Anexos

# *Introducción general*

## **I. Introducción**

### **I.1. Definición de anisakiosis**

*Anisakis* spp. es un nematodo parásito de organismos marinos cuyo ciclo biológico heteroxeno tiene lugar mediante cuatro mudas hasta que se forma el adulto. El hombre puede convertirse en hospedador accidental del parásito al ingerirlo con el pescado crudo, poco tratado térmicamente, ahumado, en vinagre, adobado con distintas especias y en otras especialidades gastronómicas.

La primera referencia de un caso humano de anisakiosis fue en el año 1955 en Holanda, cuando se detectó en un paciente la presencia de un nematodo en un flemón eosinofílico intestinal, debido a la ingestión de arenques crudos, ligeramente salados (Van Thiel, 1960). Estos hallazgos no quedaron restringidos a Europa, sino que en Japón en el año 1965, los sanitarios japoneses al hacer una revisión de casos de úlcera gástrica o duodenal, apendicitis aguda y tumor gástrico comprobaron que cientos de ellos se habían diagnosticado erróneamente (Cheng, 1982).

Hasta 1977, se utilizó el término anisakiasis para referirse a la enfermedad en humanos producida por miembros de la familia Anisakidae. Margolis (1977) hizo una revisión e introdujo dos conceptos distintos:

- Anisakiasis inespecífica para la infección humana producida por larvas de la familia Anisakidae.
- Anisakiasis para infección producida por larvas del género *Anisakis*.

Posteriormente, en 1988 el “Executive Committee of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology” (WAAVP) en (Kassai et al., 1988) recomendó utilizar el término anisakidosis para infecciones generadas por integrantes de la familia Anisakidae y anisakiosis para las producidas por miembros del género *Anisakis*.

### **I.2. Clasificación del parásito**

La clasificación de estos parásitos según Anderson (1992) Valentini et al. (2006), Klimpel et al. (2008, 2010), Mattiucci & Nascetti (2008) y Mattiucci et al. (2009) es la siguiente:

Phylum Nematelminthes

Clase Nematoda

Orden Ascaridida

Superfamilia Ascaridoidea

Familia Anisakidae

Subfamilia Anisakinae

Género *Anisakis*

Clado I

*Anisakis typica*

*Anisakis simplex s.s.*

*Anisakis pegreffii*

*Anisakis simplex C*

*Anisakis ziphidarum*

*Anisakis nascetti*

Clado II

*Anisakis physeteris*

*Anisakis brevispiculata*

*Anisakis paggiae*

En un principio, todas las especies del género *Anisakis* estaban englobadas dentro del género *Ascaris*, Linnaeus (1758). En 1845, Dujardin cambió el término por el de *Anisakis*. Desde entonces se han intentado describir, identificar y clasificar las especies pertenecientes a este género.

Davey (1971), tras una revisión de todas las especies descritas hasta el momento, admitió solo tres dentro del género *Anisakis*:

*A. simplex*

*A. typica*

*A. physeteris*

Este autor determina que, para la definitiva clasificación de las restantes especies eran necesarios más datos descriptivos.



Ante la imposibilidad de identificar la mayoría de las larvas, los autores las clasificaron como larvas *Anisakis* tipo I, II, III, IV según los criterios morfológicos de Shiraki (1974) (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de Shiraki (1974)**

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

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*.

Mediante ensayos electroforéticos de isoenzimas, Orecchia et al. (1986) definieron la existencia de dos especies gemelas dentro de *A. simplex*, las cuales tenían diferente localización geográfica: *A. simplex* A en zonas mediterráneas principalmente y *A. simplex* B en el Mar del Norte.

Estas especies son iguales morfológicamente pero isoenzimáticamente diferentes, si bien, en los últimos años se ha comprobado diferencias morfológicas y patológicas (Quiazon et al., 2008; Kirstein et al., 2010). Posterior al trabajo de Orecchia et al. (1986), se substituyó la denominación: *A. simplex* A por *A. pegreffii* (Campana- Rouget & Biocca, 1995) y *A. simplex* B por *A. simplex sensu stricto* (s.s.) y además se notificó *A. simplex* C como nueva especie dentro del complejo *A. simplex sensu lato* (s.l.). Esta nueva especie gemela difiere de las dos anteriores en su estructura genética, ciclo de vida y distribución preferente en el Pacífico Norte y regiones australes (Mattiucci et al., 1997).

Un año más tarde, Paggi et al. (1998) hallan una nueva especie, *A. ziphidarum* en ballenas del mar Mediterráneo y de la costa africana. Esta nueva especie junto a *A. typica*

(Mattiucci et al., 2002), *A. simplex s.s.*, *A. pegreffii* y *A. simplex C* constituyen el morfotipo de la larva de *Anisakis* tipo I, y dentro del morfotipo de la larva de *Anisakis* tipo II se incluye a *A. physeteris* y *A. brevispiculata* (Mattiucci et al., 2001). Posteriormente, Mattiucci et al. (2005), mediante electroforesis de isoenzimas encontraron adultos de la especie *A. paggiae* en el estómago de la ballena *Logia breviceps* de la costa atlántica de Florida, ubicándola dentro del tipo II.

### I.3. Ciclo biológico

Varios autores han descrito el ciclo de vida de *Anisakis* spp. (Grabda, 1976; Klimpel et al., 2004, 2008). El ciclo biológico comienza cuando los adultos copulan en el estómago del hospedador definitivo que son mamíferos marinos pertenecientes al orden Cetácea (ballenas, delfines, orcas, cachalotes, etc.) (Koie et al., 1995). Las hembras adultas, de unos 5 a 10 cm de longitud, en este lugar depositan sus huevos de unos 50 µm de diámetro, pared gruesa y sin desarrollar; dichos huevos llegarán al agua junto a las heces del hospedador, donde embrionarán (Smith, 1983). La viabilidad de estos 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, de L1 a L2 y de L2 a L3 (Koie et al., 1995). En estas condiciones se libera mediante movimientos ondulatorios el tercer estadio larvario aún envuelto por la cutícula de la L2 (Smith, 1971), que le proporciona la resistencia suficiente para sobrevivir libres en el medio marino, hasta 7 semanas a 5-7º C o 3-4 semanas a 13-18º C. La mortalidad aumenta por encima de los 20º C (Van Banning, 1971).

Las larvas permanecerán libres hasta que las ingieran pequeños crustáceos marinos, sobre todo eufáusidos del plancton (géneros *Thysanoessa*, *Euphausia*, *Nyctiphanes*, etc.), que actuarán como hospedadores intermediarios y en ellos la larva L3 se liberará de la cutícula de la larva L2, o indirectamente a través de un copépodo que actúa como un hospedador de transporte del cual se alimentan los crustáceos.

En la naturaleza, los hospedadores definitivos se pueden infectar tanto a partir de crustáceos como de peces parasitados con larvas L3. En el ciclo epidemiológico participan diversas especies de peces teleósteos y cefalópodos infectados con la L3, que forman parte de la dieta del hospedador definitivo. Las larvas liberadas en el tracto digestivo de estos peces y cefalópodos penetran en la pared del mismo y alcanzan la

cavidad corporal, donde no experimentan muda alguna, aunque pueden aumentar de tamaño. Cuando los mamíferos ingieren los peces, el zooplancton o calamares parasitados, las larvas después de dos mudas alcanzan la madurez sexual en el estómago y se cierra el ciclo biológico.

El hombre puede convertirse en hospedador accidental del parásito al ingerirlo con el pescado crudo, poco tratado térmicamente, ahumado, en vinagre, adobado con distintas especias y en otras especialidades gastronómicas.

Son muchas las especies de peces y cefalópodos en las que se han descrito parasitaciones por L3 de *Anisakis*, algunas de un gran interés desde el punto de vista comercial como son: el boquerón (*Engraulis encrasicolus*), arenque (*Clupea harengus*), bacalao (*Gadus morhua*), plegonero (*Merlangius merlangus*), bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), carbonero (*Pollachius virens*), faneca (*Trisopterus luscus*), palo (*Molva dipterygia*), brótola de fango (*Phycis blennoides*), merluza (*Merluccius merluccius*), caballa (*Scomber scombrus*), congrio (*Conger conger*), entre otros, (Sanmartín et al., 1994; Pereira Bueno & Ferre, 1997). En algunos casos, los moluscos y crustáceos se han considerado como posibles transmisores, si bien este hecho no se ha podido confirmar (Aesan, 2005).

El hombre es un hospedador accidental de *Anisakis* ya que la larva no evoluciona a estado adulto y muere a las pocas semanas, si bien, se ha dado algún caso de evolución hasta L4, así como un estado de transición entre el tercer y el cuarto estado larvario (Fujino et al., 1984; Weerasooriya et al., 1986; Kagei & Isogaki, 1992; Clavel et al., 1993; Ishikura et al., 1996). En una ocasión se denunció la presencia de un macho inmaduro en el duodeno de un paciente (Kliks, 1986).



Figura 1. Ciclo biológico de *Anisakis simplex* (tomada de Iglesias & Ubeira, 1998).

#### I.4. Características morfológicas de la larva L3

El tercer estado larvario es filiforme y puntiagudo en sus extremos. Su longitud es variable, desde 7 hasta más de 30 mm con un diámetro de 0,49 a 0,55 mm, que va disminuyendo conforme nos acercamos a los extremos. Una característica morfológica muy relevante es el ventrículo esofágico, situado cerca del extremo anterior y que se asemeja, a simple vista, a una mancha opaca y blanquecina (Granger, 1959; Shiraki, 1974; Huang, 1988; Huang & Bussieras, 1988; Sanmartín et al., 1994).

La cutícula mide 1,50  $\mu\text{m}$  de grosor (Fredericksen & Specian, 1981) y su observación al microscopio óptico muestra estriaciones transversales poco profundas e irregulares más marcadas cerca de los extremos del nematodo (Fukuda et al., 1988).

*Anisakis* spp. al igual que el resto de los miembros de la familia Anisakidae posee un sistema digestivo completo que comprende boca, esófago, intestino y ano (Möller & Anders, 1986). En el extremo anterior se halla el diente, de forma triangular y que el parásito utiliza para la penetración en el hospedador. La boca está rodeada de tres prominencias prelabiales, una dorsal bilobulada y dos subventrales monolobuladas, en cuya base se encuentra el poro excretor (Grabda, 1976). El esófago mide de 2,50 a 3,00 mm de longitud y se encuentra rodeado por el anillo nervioso. De acuerdo a los trabajos de Buzzell & Sommerville (1985), está constituido por tres regiones: una primera región preventricular, la más larga, formada por fibras musculares radiales, a continuación sigue una zona de transición y por último el ventrículo de naturaleza glandular. En la parte dorsal de la zona preventricular se observa una glándula esofágica, que se extiende desde el ventrículo, donde rodea la luz, hasta la región esofágica próxima al anillo nervioso. Existe otra glándula subventral que comienza en la región preventricular justo antes de la zona de transición, rodea el ventrículo y termina al comienzo del intestino. Estos autores han sugerido que las secreciones de la glándula ventral probablemente están implicadas en la digestión intraluminal, mientras que las que produce la glándula dorsal son responsables de una posible absorción de nutrientes a través de la cutícula.

Seguidamente se encuentra el intestino, que para *Anisakis* tipo I (Berland, 1961), la unión con el ventrículo esofágico tiene forma oblicua. El intestino ocupa la mayor parte de la longitud de la larva, su luz es trirradial debido a la distinta longitud de las células que lo forman. El extremo posterior es redondeado, acaba en un mucrón o espina. El recto forma un canal oblicuo que termina en el ano, rodeado de tres glándulas rectales en forma de pera: dos dorsales y una ventral (Grabda, 1976).

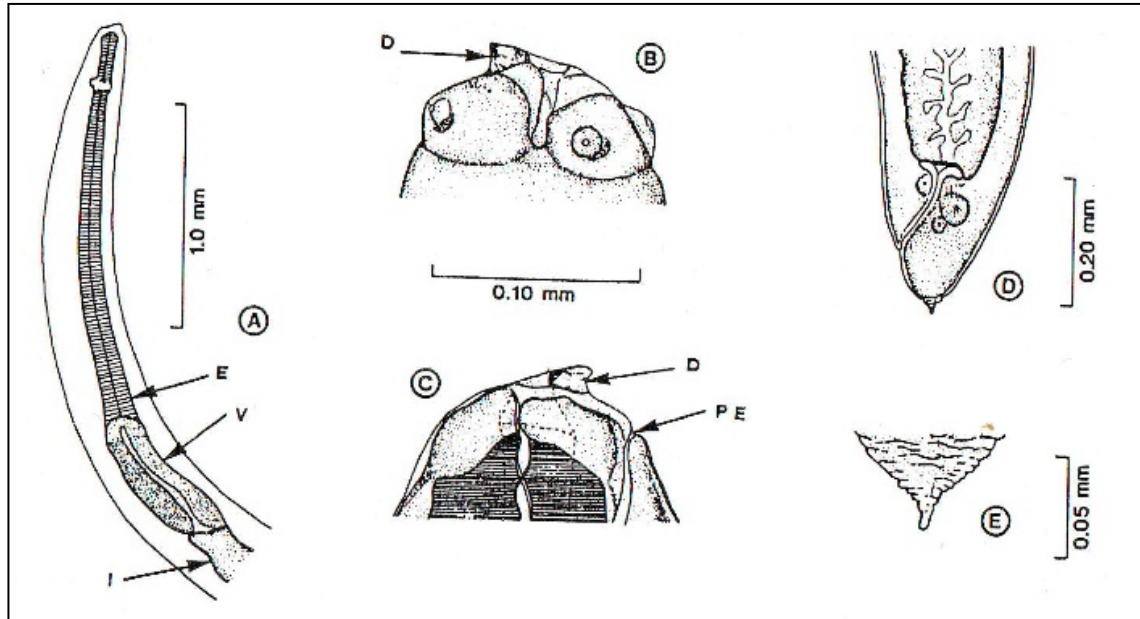


Figura 2. Morfología de *Anisakis* tipo I

A: Extremo anterior: E. Esófago. V. Ventrículo. I. Intestino. B: Diente. C: Extremo anterior.

PE. Poro excretor. D: Extremo posterior. E. Espina o mucrón (tomada de Pereira-Bueno, 1992).

### I.5. Epidemiología

La presencia de larvas de *Anisakis* en el pescado es muy variable, frecuente y mundialmente distribuida. Según Cross et al. (2007), se han notificado en más de 200 especies de peces pelágicos y recientemente se ha comunicado un caso de parasitación por *Anisakis pegreffii* en las tortugas marinas (Santoro et al., 2010). La infección en estos hospedadores varía según la zona.

En Japón, la caballa japonesa (*Scomber japonicus*), uno de los principales peces responsables de la anisakiosis, alcanza un 100% parasitación en determinadas zonas. Igual prevalencia muestra *Myxocephalus polyacanthocephalus* (Ishikura et al., 1996).

En Europa se han encontrado una amplia variedad de especies infectadas, siendo el arenque (*Clupea harengus*) una de ellas (Van Thiel, 1976; Mudry et al., 1986; Verhamme & Ramboer, 1988; Huss & Drewes, 1989) y cuya prevalencia se aproxima al 100%.

Para las distintas especies de bacalao (*Gadus* spp.) la prevalencia varía del 88-100% (Möller & Anders, 1986; Bublitz & Choudhury, 1992). En otros peces, como la

merluza (*Merluccius* spp.) existen diferencias entre las distintas especies y cepas, así en la merluza del Cantábrico de más de 65 cm, la prevalencia es prácticamente del 100% a diferencia de la africana que apenas muestra un 10% en la tasa de infección (Henríquez-Santana et al., 2009). El porcentaje de parasitación del carbonero (*Pollachius virens*) y la gallineta nórdica (*Sebastes marinus*) también son altas, en torno al 99,6% y 97,8%, respectivamente (Strømnes y Andersen, 1998).

En España, Pereira-Bueno (1992) estudia la parasitación por anisákidos en 20 especies de peces del mercado de Bilbao y encuentra prevalencias igual o superiores al 40% en cuatro de ellos: gallineta (*Helicolenus dactylopterus*), brótola de fango, bacaladilla, abadejo (*Pollachius pollachius*). También, Sanmartín et al. (1994) y Abollo et al. (2001) detectan prevalencias superiores al 40% en congrio, rape (*Lophyus piscatorius*), (*Scomber japonicus*), jurel (*Trachurus trachurus*), tintorera (*Prionace glauca*), aguja (*Belone belone*), merluza, escolano azul (*Molva dytergia*), rape, caballa, chopo (*Spondyliosoma cantharus*), gallo (*Lepidorhombus boscii*), cabracho (*Scorpena scrofa*), capturados en las aguas gallegas. Estudios realizados por diversos autores indican que la infección en el jurel, bacaladilla, brótola y merluza del Mediterráneo es menor que en las mismas especies capturadas en zonas del Atlántico. Por ejemplo, el caso de la infección de bacaladilla en la costa granadina de Motril, con una prevalencia del 6,65% (Valero et al., 2000) frente al 63-100% en el Océano Atlántico (Sanmartín et al., 1989; Ruíz-Valero et al., 1992) o para la merluza, la capturada en el Atlántico presenta una prevalencia del 87,97% mientras que la obtenida del Mediterráneo es del 41,27% (Valero et al., 2006).

Con respecto a la anisakiosis humana, Japón es el país donde se ha notificado el mayor número de casos (se presentan 2000 casos/año) (Abe et al., 2005), constituyendo el 95% de los casos mundiales. Los principales peces responsables son la caballa, halibut, bacalao, el jurel japonés (*Trachurus japonicus*), *Sardinops melanostictus*, entre otros. El sushi y el sashimi son los platos tradicionales responsables de la infección humana en este país.

Otros platos tradicionales que conllevan un cierto riesgo son: el alici italiano (anchoas marinadas), el gravlax de los países escandinavos (salmón crudo), en España los boquerones en vinagre, el lomi-lomi de Hawái (salmón crudo), el kinilaw de Filipinas (pescado picado, adobado), el ceviche de América Latina (pescado crudo aderezado con

zumo de limón) y arenques ahumados en Holanda (Daschner et al., 1998; Alonso-Gómez et al., 2004; Moschella et al., 2004; Chai et al., 2005, entre otros).

En Estados Unidos, la mayoría de los casos humanos descritos se han debido al consumo de salmón del Pacífico (*Oncorhynchus nerka*) (Deardorff & Kent, 1989; Deardorff & Overstreet, 1990; Gosting et al., 1990).

En Europa se han descrito con frecuencia infecciones, en países como Dinamarca y Bélgica (Smith & Wooten, 1978), Francia (Pethithory et al., 1986,2007; Mudry et al., 1986; Bouree et al., 1995; Chord-Auger et al., 1995), Alemania (Möller & Schröder, 1987; Lock et al., 2008; Karl et al., 2011), países escandinavos (Pethithory & Marty, 1988). Uno de los países europeos que ha tenido mayor incidencia de anisakidosis ha sido Holanda, donde es frecuente comer pescado crudo, especialmente arenques (Hubert et al., 1989).

En España, se han registrado casos humanos de anisakiosis debidos al consumo de sardinas (*Sardina pilchardus*) (López-Vélez et al., 1992) si bien ésta, no está entre las especies más infectadas. Cabe destacar, que en España la mayoría de los casos producidos se deben a la ingesta de boquerones en vinagre (Daschner et al., 1998; Alonso-Gómez et al., 2004). También, se ha indicado como causa de anisakiosis, el consumo de merluza parasitada insuficientemente cocinada en el microondas (Canut-Blasco et al., 1996) y el jurel marinado (Valero et al., 1992).

En España, los primeros casos de anisakiosis y alergia por *A. simplex* se refirieron en 1991 por Arenal-Vera et al. y en 1995 por Audicana et al., respectivamente.

Arenal-Vera et al. (1991), describieron un caso de oclusión de la luz apendicular del abdomen producida por una larva de *Anisakis*. Por otro lado, se ha señalado que los síntomas agudos producidos en la anisakiosis podrían deberse una reacción de hipersensibilidad de tipo I en la pared gastrointestinal (Suzuki et al., 1970, 1975).

Desde que Kasuya et al. (1990) en Japón, comunicaron que las larvas de tercer estadio (L3) de *Anisakis* pueden actuar como agentes causales de urticaria en pacientes sin sospecha clínica de anisakiosis, se han notificado en España un gran número de casos, tanto de infecciones como de reacciones de hipersensibilidad por el consumo de pescado crudo o poco cocinado (Barros et al., 1992; López Vélez, 1992; Valero et al., 1992;



Cruchaga et al., 1995; Acebes Rey et al., 1996; Canut Blasco, 1996; Moreno-Ancillo et al., 1997; Oliveira et al., 1999; Obispo et al., 2000; entre otros).

La enfermedad se observa entre 20 y 60 años, con un pico en los 30 años, sin que exista diferencias claras entre sexos, aunque suele afectar más los varones (Obispo et al., 2000; López Peñas et al., 2000). La estacionalidad de los casos humanos se puede deber a un mayor consumo de pescado en determinados períodos y a una mayor prevalencia de estas larvas en los hospedadores (Ikeda et al., 1989), si bien, también se ha demostrado que depende de la especie de pescado que se consume (Oshima & Kliks, 1987). En Japón, Los meses con mayor infección humana son los correspondientes a las estaciones de invierno y primavera (Sugimachi et al., 1985), aunque se puede producir en cualquier época del año.

En general, las notificaciones registradas de anisakiosis han aumentado exponencialmente desde 1980, siendo los principales motivos descritos por Sakanari & McKerrow en su revisión de 1989:

- El mejor conocimiento de la distribución de los anisákidos en el mundo.
- El aumento de los mamíferos marinos debido a las políticas de conservación de las especies.
- La inmigración y la globalización con el consiguiente aumento del interés del consumidor en platos exóticos.
- La utilización de sistemas rápidos de cocina como el micro-ondas y la moda creciente de no sobre cocinar los alimentos.
- La difusión de la dieta mediterránea, que en parte se caracteriza por un elevado consumo de pescado para prevenir las enfermedades cardíacas.

En Marruecos, *Anisakis* ha sido poco estudiada a pesar de que *A. simplex* se notificó por primera vez en 1977 en la sardina capturada en las aguas de la zona del Sahara. El grupo internacional para la evaluación de los peces pelágicos lo ha evidenciado a lo largo de las costas de África noroccidental (FAO, 2003a). También, distintos autores han puesto de manifiesto la presencia de *Anisakis*, así, Mattiucci et al. (2001) en merluzas procedentes de la costa atlántica de Marruecos denuncian las especies *A. brevisculata* y *A.*

*physeteris*. Por su parte, Shukhgalter et al. (2002) en zonas de Marruecos y Mauritania detectan *A. simplex* s.l. en jurel, estornino y sardina. MacKenzie et al. (2008), en jureles capturados en la costa atlántica y mediterránea de Marruecos aíslan *A. simplex* y *A. pegreffii*.

Abattouy et al. (2011) realizan uno de los estudios epidemiológicos más completos en este país, estos autores determinan la prevalencia de *A. simplex* s.l. en el estornino capturado a lo largo de las costas mediterráneas y atlánticas del Norte de Marruecos. Estos autores, identifican las especies por técnicas moleculares y calculan estadísticamente el riesgo de infección en la musculatura del pescado. A pesar de las altas prevalencias encontradas en este trabajo, no se ha notificado, hasta el momento, ningún caso de infección humana, lo que significa que esta parasitosis sigue siendo una enfermedad mal diagnosticada y subestimada en este país, aunque el consumo de pescado es elevado, sobre todo por la población del Norte del país (la media por persona se estima entre 9 y 12 kg/año).

#### **I.6. Localización del parásito en el pescado. Migración a la musculatura**

La localización del parásito es importante para el consumidor, especialmente en el caso de la infección de la musculatura, pues ésta es la que se consume. De cualquier modo, la localización del parásito está sujeta a una serie de factores, como son: la especie del pescado, la alimentación (en peces piscívoros las larvas suelen estar presentes en la musculatura que rodea la cavidad corporal, mientras que en no piscívoros se hallan fundamentalmente en las vísceras y en la cavidad corporal), el tamaño, la edad, el grado de infección, son otros factores.

Con respecto a la migración de la larva a la musculatura del pez, existe controversia respecto a si el tiempo de captura del pescado influye en la migración del parásito. Así autores como Smith & Wootten (1978), Roepstorff et al. (1993) sugieren que la migración se ve estimulada por el tiempo que transcurre entre la captura y el procesado, al igual que las temperaturas a las que se expone el pescado cuando se le somete a salazón o a salmuera (Hauck, 1977). Smith (1984) señaló que las larvas migraban post-mortem hacia el músculo en especies grasas, como por ejemplo el

arenque, pero no en pescados no grasos como la bacaladilla; sin embargo esto último tampoco está claro puesto que:

- Huss (1988) observó que el 50% de los arenques capturados ya poseían larvas en el momento de la captura.
- Huss & Drews, (1989) ratificaron que no existía certeza de la migración después de la captura.
- Se han encontrado larvas en la musculatura de numerosos peces no grasos (Ruiz-Valero et al., 1992; Abollo et al., 2001).
- Quiazon et al. (2011) mediante infecciones experimentales en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y en la platija de aceite de oliva (*Paralichthys olivaceus*), observan que la presencia de *Anisakis* en la musculatura de los peces, no sólo obedece al tipo de pescado sino también a la especie de *Anisakis* y al tiempo que transcurre desde que se infecta el pez.



**Figura 3. Larvas en vísceras y musculatura de bacaladilla**

## **I.7. Patología y sintomatología**

Como ya se ha comentado, la infección en el hombre se produce por la ingesta de pescado cocinado en condiciones de poca cocción o crudo, en el cual la larva no completa su ciclo biológico, muriendo la larva a las pocas semanas.

Dependiendo del grado de invasión de las larvas en el tracto digestivo, se diferencian varias formas clínicas:

### **I.7.1. Forma clínica no invasiva**

Se produce cuando las larvas tras la ingestión y leve sintomatología (normalmente digestiva) son expulsadas del organismo, a través de las heces, tos o vómitos (Sapunar et al., 1976; Kliks, 1983; Hubert et al., 1989).

### **I.7.2. Forma clínica de carácter invasivo**

La sintomatología que produce se puede resumir en digestiva, gastro-alérgica, extra-digestiva. En cualquier caso todas son debidas a la patología que ocasiona la larva cuando adhiere la parte anterior, o penetra a través de la mucosa digestiva, no sólo por el diente que posee en el extremo anterior a tal efecto, sino porque es capaz de segregar una serie de enzimas hialuronidasas, que facilitan la penetración a través de los tejidos, además de proteasas, para llevar a cabo la destrucción tisular (Hostez et al., 1994; Suzuki et al., 2010).

El curso clínico de las anisakiosis indicadas se puede presentar variado, desde agudo y autolimitado a subagudo y crónico, aunque en nuestro medio predominan las formas clínicas agudas (Del Rey Moreno, 2003).

### ***Anisakiosis gástrica***

Es la localización más frecuente (Romero-Ramírez et al., 1997; Pérez-Millán et al., 1998; González Quijada et al., 2005; Vallejo Rodríguez et al., 2006).

### ***Anisakiosis gástrica aguda***

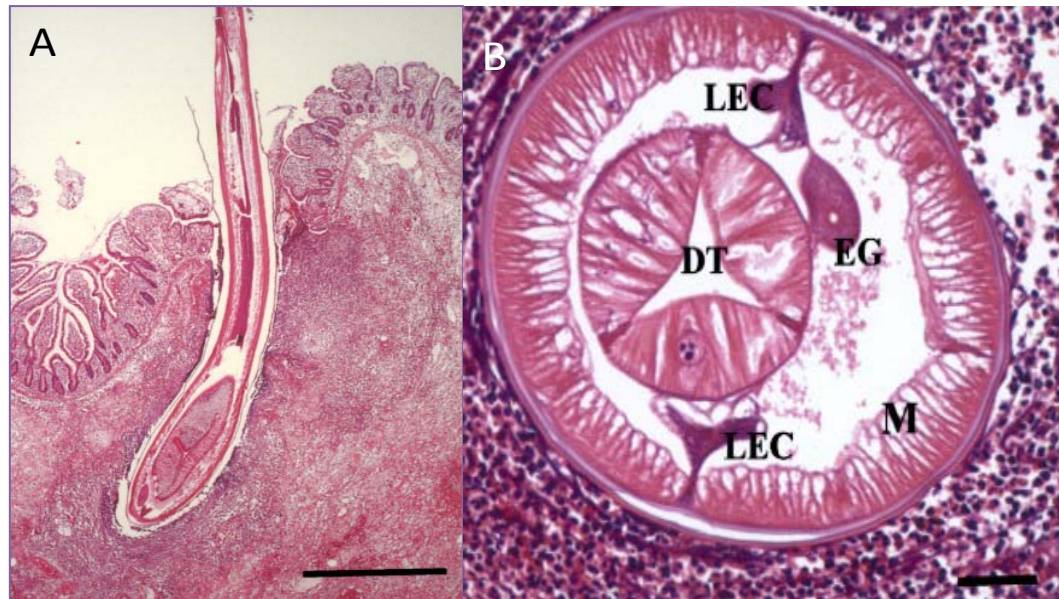
Los síntomas aparecen a las 4 a 6 horas de la ingesta de pescado parasitado, pudiendo oscilar entre 1 y 12 horas. La mucosa generalmente está intacta, con aparición ocasional de ulceración o hemorragia y la larva clavada en la lesión. Se caracteriza por la presencia de dolor epigástrico, síntoma más frecuente (61-93%) que puede ser intenso, pseudoulceroso o vago, y acompañarse de náuseas, vómitos y diarreas (Yokogawa & Yoshimura; 1967; Cocheton et al., 1991; kim, 1994; Bouree et al., 1995; Castán et al., 2002). El dolor también puede ser torácico y la sintomatología recidivante en el 5% de los pacientes (Kakizoe et al., 1995).

### ***Anisakiosis gástrica crónica***

Se caracteriza por la presencia de síntomas inespecíficos y recidivantes, que pueden evolucionar durante meses o años, provocando tumores submucosos (Yokogawa & Yoshimura, 1967; Esteve et al., 2000). Se han publicado casos en los que aparece junto a patología neoplásica, por lo que se ha valorado su papel como factor adyuvante en el origen de la misma (Petithory et al., 1990).

### ***Anisakiosis intestinal***

Se caracteriza por edema marcado, exudado fibroso, necrosis gaseosa, perforación y en fases más avanzadas, formación de granuloma.



**Figura 4. A: Vista del intestino delgado con una larva de *A. simplex*.**

**B: Vista de de una sección transversal de la larva, rodeado por una gruesa banda de células inflamatorias con numerosos eosinófilos**

**(M. capa muscular. LEC. cordón epidérmico lateral. EG. glándula excretora. DT. tracto digestivo (tomada de Takei & Powell, 2007).**

### ***Anisakiosis intestinal aguda***

Las manifestaciones clínicas aparecen desde 6 a 7 días después de la ingesta de pescado infectado, con afectación principalmente del íleon distal (Smith & Wootten, 1978; Cocheton et al., 1991; Petithory et al., 1991; López-Vélez et al., 1992; Clavel et al., 1993; López Peñas et al., 2000). En la anisakiosis intestinal se presenta un cuadro clínico de dolor abdominal de cualquier localización, náuseas, vómitos y heces sanguinolentas; puede afectar al ritmo intestinal (Shirahama et al., 1992; Louredo-Méndez et al., 1997; Repiso-Ortega et al., 2003; González Quijada et al., 2005; Navarro-Cantarero et al., 2005). La pared intestinal está muy engrosada, provocando obstrucción intestinal parcial y distensión proximal, acompañadas de ascitis con alto contenido en eosinófilos, por encima del 30%. En la mucosa puede haber úlceras con focos de hemorragia adyacente. El intestino delgado es el más afectado, simulando una enteritis regional (Yokogawa & Yoshimura, 1967; Bouree et al., 1995; López Peñas et al., 2000). Esta forma se asemeja a un cuadro quirúrgico, como oclusión intestinal, apendicitis aguda, síndrome tumoral en fosa iliaca derecha, entre otros.

### ***Anisakiosis intestinal crónica***

Presenta síntomas inespecíficos, sobre todo, dolor abdominal vago que puede permanecer durante meses o años (Cocheton et al., 1991).

### ***Anisakiosis extra-digestiva***

También llamada ectópica o heteróloga. La o las larvas perforan la pared del tubo digestivo y migran a otras zonas como el pulmón, hígado u otros órganos (Matsuoka et al., 1994); este término se conoce como “síndrome de larva migrans”. La sintomatología va a depender de la localización del parásito. En este tipo de anisakiosis también es frecuente la formación de granulomas con restos de larva en su interior (Yokogawa & Yoshimura, 1967), además de la liberación de antígenos que sensibilizan al paciente ante una futura exposición al parásito (Ishikura et al., 1992).

En la mayoría de las anisakiosis se ha responsabilizado a *Anisakis simplex* s.l. Recientemente, algunos trabajos hacen referencia a casos de parasitación del hombre por *A. pegreffii* (Umehara et al., 2007; Mattiucci et al., 2011). El trabajo de Kirstein et al. (2010) demuestra que cuando a un ratón le introducen intraperitonealmente extractos de *A. pegreffii*, provoca la aparición de reacciones alérgicas que se traducen en la inflamación de las vías respiratorias.

### **I.7.3. Alergia a *Anisakis***

Se pueden distinguir dos cuadros clínicos:

#### **Anisakiosis gastro-alérgica**

Esta forma clínica se caracteriza por un cuadro alérgico agudo mediado por la IgE, acompañado de síntomas digestivos gástricos. El síntoma alérgico más frecuente es la urticaria (73%) y en menor grado el angiodema, la hipotensión arterial y el broncoespasmo. El tiempo de latencia para la sintomatología gastrointestinal es de 3 a 6 horas y para los síntomas alérgicos de 5 horas, pudiendo aparecer muchas horas después de la ingestión del pescado (Alonso et al., 1998; López Serrano et al., 2000 a,b).

### **Alergia e hipersensibilidad a *Anisakis***

Algunos pacientes sin sintomatología digestiva, pueden presentar reacciones alérgicas, es decir, reacciones de hipersensibilidad tipo I (mediada por IgE), con episodios de: urticaria y/o angioedema, anafilaxia, hipotensión y choque anafiláctico (Del Pozo et al., 1997; López Sáez et al., 1999). 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 termoestabilidad de algunos alérgenos de *Anisakis* parece ser la causa de la sensibilidad producida en estos pacientes (Audicana et al., 1997; Caballero & Moneo, 2004).

En España, el primer caso de anafilaxia severa debido a *Anisakis*, tras la ingestión de merluza, lo describen Audicana et al. (1995a). Posteriormente, se han comunicado cientos de casos de alergia, principalmente en el norte del país, relacionados con el consumo de pescado. En otras zonas de España, aunque también hay casos de alergia, es más frecuente la anisakiosis gastrolérgica (Daschner et al., 2000). Estos estudios han derivado en la inclusión de los antígenos de *A. simplex* en las baterías habituales de pruebas para el estudio de alergia alimentaria, anafilaxia e incluso de alergia a los medicamentos (Audicana et al., 1995b). Las características de los pacientes alérgicos a *Anisakis* son: la falta de antecedentes de atopia en su historial y su edad media elevada (entre 40-45 años) (Fernández de Corres et al., 1996; Audicana et al., 2000).

Otro tipo de alergias son las producidas por alérgenos de *A. simplex*, a los que se exponen los profesionales que manipulan productos marinos tanto en la industria como en pescadería o restauración (alergia ocupacional):

- Dermatitis de contacto tras la exposición al pescado parasitado (Carretero Anibarro et al., 1997; Beitia et al., 2002).

- Conjuntivitis profesional y asma alérgica en paciente que trabajan con pescado o con harina del mismo, motivada por alérgenos aéreos (Añibarro & Seoane, 1998; Armentia et al., 1998). Otros autores como Nieuwenhuizen et al. (2006), han notificado dermatitis e hiperactividad bronquial inespecífica en personas relacionadas con la elaboración de productos de pesca en el sur de África.



-Manifestaciones reumáticas en forma de artralgias/artritis, asociadas a manifestaciones alérgicas cutáneas, respiratorias y sintomatología digestiva (Cuende et al., 1998).

La hipersensibilidad frente a *Anisakis* se debe a la unión de diversos antígenos del parásito con la IgE de los pacientes que provocarían síntomas de hipersensibilidad (López-serrano et al., 2000a,b). Desde un punto de vista funcional y estructural se pueden considerar tres grupos de antígenos: de excreción-secreción, somáticos y de superficie.

#### **I.7.3.1. Antígenos de excreción-secreción (ES)**

Son liberados por las larvas vivas cuando invaden la mucosa gastrointestinal del hospedador y causantes del cuadro clínico digestivo. Son sintetizados por dos estructuras: la glándula esofágica dorsal y las células excretoras del tracto digestivo, ambas son productoras de enzimas histolíticos implicados en el daño epitelial digestivo, estas enzimas ayudan al parásito a penetrar y como se liberan al comienzo de la infección, son los primeros antígenos reconocidos por el sistema inmunológico (Akao et al., 1990; Iglesias et al., 1993). Además, estos antígenos ES son capaces de inducir desgranulación mastocitaria en ratones sensibilizados, confirmando la posibilidad de reacciones anafilácticas (Kobayashi et al., 1972).

#### **I.7.3.2. Antígenos somáticos**

Los antígenos somáticos son los más abundantes en los nematodos, solo resultan funcionales después de la muerte y degradación del parásito. Son muy útiles para el diagnóstico, pero los anticuerpos detectados frente a ellos, al contrario de lo que sucede con los antígenos ES, indican una infección pasada, no una infección activa. Se obtienen por homogeneización de las larvas enteras y extracción de todos los antígenos solubles del parásito (Sugane et al., 1982). 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 resultados falsos positivos en el diagnóstico (Iglesias et al., 1995; Lozano Maldonado et al., 2004).

### I.7.3.3. Antígenos de superficie

El tegumento de los nematodos es una mezcla compleja de colágeno, proteínas estructurales y proteínas hidrofóbicas (cutícula) cuya capa más externa (epicutícula) está compuesta por polisacáridos (Kennedy, 2000). Los antígenos de superficie se liberan cuando la larva evoluciona de L3 a L4 (ecdisis), y aunque se cree que tienen menor poder antigénico y son menos específicos que los antígenos ES, parece que están implicados en el desarrollo de patologías crónicas como los granulomas (Baeza et al., 2001).

### I.7.3.4. Alérgenos de *A. simplex*

Con el fin de poder realizar un diagnóstico específico tanto de la anisakiosis como de la alergia a *Anisakis*, desde el año 2000 se vienen realizando estudios sobre el aislamiento molecular y caracterización de los alérgenos de la L3 de *A. simplex*.

Los alérgenos alimentarios se designan de acuerdo a un sistema de nomenclatura taxonómica que consta de cuatro letras y un número. Las tres primeras letras que van juntas, corresponden al género, la cuarta letra a la primera de la especie y el número al orden de identificación del alérgeno dentro de cada especie (Hoffman et al., 1994; King et al., 1994).

De los 12 alérgenos identificados hasta el momento, 7 son antígenos ES, sólo dos de ellos (Ani s 1 y Ani s 7) se conocen como alérgenos ES mayores, ya que son reconocidos por más del 50% de los pacientes alérgicos a *Anisakis* (85% y 100%, respectivamente), ambos son de gran utilidad para el diagnóstico (Moneo et al., 2000; Rodríguez et al., 2008), el resto son alérgenos menores (reconocidos por menos del 50% de los pacientes infectados). Entre éstos, Ani s 4 y Ani s 6 son inhibidores de la cisteína y serina proteasas respectivamente, son las primeras proteasas de nematodos descritas como alergénicas para el hombre (Moneo et al., 2005; Kobayashi et al., 2007a; Rodríguez-Mahillo et al., 2007). Otros alérgenos: Ani s 5, Ani s 8 y Ani s 9 pertenecen a la familia de proteínas SXP/RAL-2 de varias especies de nematodos incluyendo los de plantas, por lo que presentan reactividad cruzada con otros nematodos. Su función es desconocida, pero son proteínas inmunológicamente activas (útiles para el diagnóstico), (Kobayashi et al., 2007b; Caballero et al., 2008; Rodríguez-Pérez et al., 2008). Ani s 2 y Ani s 3, alérgenos somáticos menores de *A. simplex*, son identificados como paramiosina y tropomiosina

respectivamente, similares a las de otras especies (Asturias et al., 2000a,b; Pérez-Pérez et al., 2000), muestran homología con 19 alérgenos conocidos (3 paramiosinas y 16 tropomiosinas), por lo que se ha demostrado que existen reacciones cruzadas entre *Anisakis* y otros invertebrados (crustáceos, insectos y ácaros del polvo) (Johansson et al., 2001; Guarneri et al., 2007). Recientemente, Kobayashi et al. (2011) han definidos 3 nuevos alérgenos de *A. simplex*: Ani s 10, Ani s 11, y Ani s 12, faltan estudios para establecer si se tratan de antígenos somáticos o ES, se caracterizan porque en su estructura molecular se encuentran secuencias repetidas de un número variable de aminoácidos, estos alérgenos parecen ser importantes en el diagnóstico de la alergia frente a este parásito. En la siguiente tabla (tabla 2), se presenta las principales características con el consumo

La tabla 2 presenta las principales características de los diferentes alérgenos de *A. simplex*

Nombre	Tipo de antígeno	Peso molecular	Características	Referencias
Ani s 1	ES	24 kDa	Proteína de la glándula excretora, se caracteriza por una actividad inhibidora adecuada. Alérgeno mayor reconocido por el 85% de los pacientes con <i>Anisakis</i> . 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. (2000a,b)
Ani s 4	ES	9 kDa	Cistatina, inhibidor de cisteína proteasas, se localiza en la glándula excretora y cutícula. Termostable 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. Termostable	Kobayashi et al. (2007a) Caballero et al. (2008)
Ani s 6	ES	Pm desconocido	Inhibidor de serina proteasas con secuencia similar a los inhibidores serina proteasas de otros animales. Termoestable y resistente a la digestión péptica	Kobayashi et al. (2007a)
Ani s 7	ES	139 kDa	Glicoproteína, con secuencias repetidas en tandem. Reconocido por el MA b UA3. Alérgeno principal reconocido por el 100% de los pacientes alérgicos a <i>Anisakis</i> . Marcador de infecciones verdaderas. No reacciones cruzadas	Rodríguez et al. (2008) Anadón et al. (2009)
Ani s 8	ES	15 kDa	Miembro de la familia de proteínas SXP/RAL-2 de varias especies de nematodos. Termoestable. Reacciones cruzadas con Ani s 5	Kobayashi et al. (2007b)
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 a.a. Termoestable	Caballero et al. (2011)
Ani s 11	?	27 kDa	Proteína con función desconocida. Estructura única, 5-6 tipos de secuencias repetidas cortas que comprenden 6-15 a.a.	Kobayashi et al. (2011)
Ani s12	?	31 kDa	Proteína con función desconocida Estructura repetida en tándem de 40-52 a.a, con cuatro residuos Cys	Kobayashi et al. (2011)

#### **I.7.4. Termoestabilidad de los alérgenos**

Como se puede comprobar en la Tabla 2, muchos de los alérgenos de *Anisakis* son resistentes al calor y a la congelación. Esto puede ser el motivo de que haya pacientes con síntomas de alergia después de comer pescado cocinado o enlatado (Caballero & Moneo, 2004). También puede ser la causa de la alta sensibilización frente a *Anisakis* (presencia de IgE específica) en sujetos sanos, es decir, nunca habían presentado síntomas digestivos o alérgicos relacionados con la ingestión de pescado u otra posible fuente de contaminación por este parásito (Fernández de Corres et al., 2001; Del Rey Moreno et al., 2006), aunque no hay que olvidar que la sensibilización también puede provenir de la estimulación por panalérgenos de invertebrados como la tropomiosina o la paramiosina (Weiler, 2007). La presencia de antígenos y alérgenos de *A. simplex* en la musculatura de peces, ha sido demostrada por Rodríguez-Mahillo et al. (2010), quienes detectan y cuantifican estas proteínas de *A. simplex*, en la musculatura de merluzas y anchoas frescas, también en merluza cocinada, congelada (durante 11 meses) y en stock, pero no los encuentran en sardinas, salmonetes y moluscos. Por ello, la ingesta de pescado congelado o cocido, recomendado como prevención de la infección, no garantiza siempre la protección frente a la aparición de manifestaciones alérgicas mediada por IgE. El que estos antígenos conserven su alergenicidad después de ser sometidos a temperaturas extremas, parece que se debe a la existencia de epítomos que abarcan una secuencia de aminoácidos (estructura primaria) más que aquellos que dependen de la conformación de la proteína (Christie et al., 1993; Xia et al., 2000).

#### **I.8. Diagnóstico**

En el hombre el diagnóstico de anisakiosis es difícil debido a la ausencia de síntomas y signos clínicos característicos, y a que los huevos del parásito no se observan en las heces (Aisaishi et al., 1980), por ello, va a depender en gran parte de la anamnesis, del grado de sospecha y de un seguimiento de cerca del enfermo (Verhamme & Ramoer, 1988). El diagnóstico certero se establece al comprobar las características morfológicas de la larva, cuando se expectora o se extrae mediante endoscopia de localizaciones tales como esófago, estómago o colon, sin embargo, es más dificultoso, cuando la larva migra hacia localizaciones intestinales o extraintestinales, obligando en muchos casos a una

intervención quirúrgica (Ido et al., 1998) o cuando la infección se hace crónica y, en consecuencia, la larva es destruida por el sistema inmune (Kim, 1994).

Existe una discrepancia entre la escasa incidencia de la enfermedad y el elevado consumo de pescado y cefalópodos, esto puede deberse al hábito de comerlos fritos o cocidos (Rosales et al., 1999). Otros autores creen que se debe a que, en la mayoría de los casos, no se han diagnosticado o que han curado tras tratamiento sintomático (Gutiérrez Ramos & Tsuji, 1994).

El diagnóstico de la anisakiosis puede realizarse por procedimientos diferentes:

- Diagnóstico clínico
- Diagnóstico inmunológico

### **I.8.1. Diagnóstico clínico**

En primer lugar, se basa en el estudio de los síntomas clínicos complementado con distintas técnicas de diagnóstico. Es muy importante asegurarse de que el paciente había consumido pescado crudo o semicrudo y cuándo fue la última vez, con el fin de descartar una infección por otros nematodos. La eosinofilia no es una característica constante en las infecciones por *A. simplex*, pues al contrario de lo que ocurre en otras helmintiasis, no siempre existe eosinofilia periférica, esto se puede deber al reclutamiento de eosinófilos hacia los tejidos inflamados. Este hecho, unido a que la eosinofilia no aparece hasta después de un tiempo de aproximadamente 10 días, le confiere escaso valor diagnóstico (Moreno Ancillo et al., 1997).

### ***Anamnesis y exploración física***

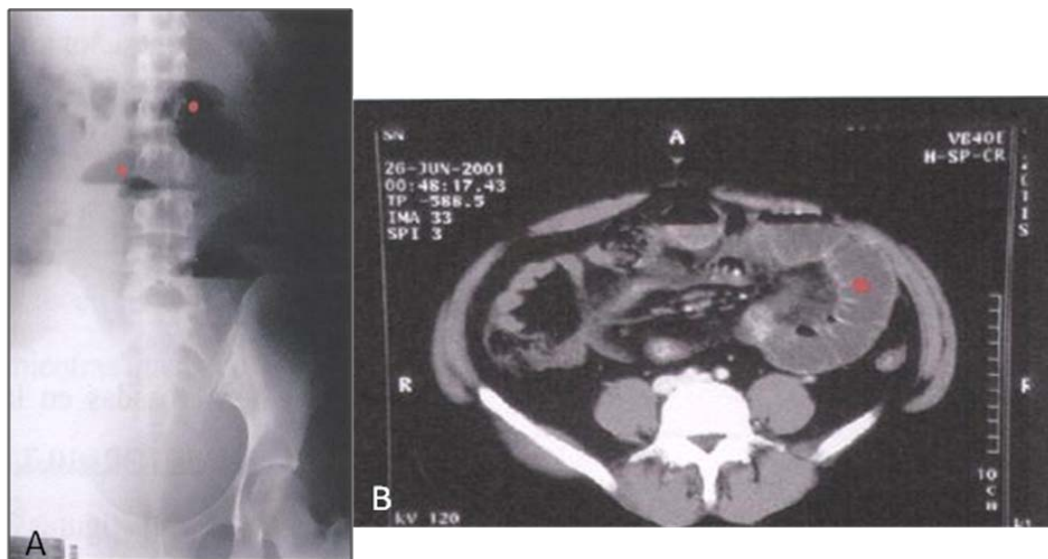
Para llegar al diagnóstico correcto de la enfermedad, es imprescindible una anamnesis adecuada. Es muy orientativo que se pregunte al afectado acerca de la ingesta de cefalópodos o pescado crudo, poco cocinado, en salazón, ahumado, escabechado, en vinagre o inadecuadamente preparado en el microondas, (Domínguez-Ortega & Martínez-Cócera, 2000). También es necesario indagar acerca del tiempo que transcurrió entre la ingesta y la aparición de los síntomas (Alonso-Gómez et al., 2004; Del Rey Moreno, 2003). En el caso de la anisakiosis intestinal la sintomatología aparece tras varios días, lo que hace difícil establecer una relación. La sintomatología del paciente, al no ser específica, no

sirve de gran ayuda, salvo que presente sintomatología digestiva y alérgica de forma concomitante.

### ***Examen radiológico***

Las técnicas de imagen se utilizan como complemento en el diagnóstico y aunque no son específicas pueden ser de gran ayuda.

Se suelen emplear principalmente en los casos intra y extraintestinales. Se observarán signos inespecíficos como el engrosamiento de la pared intestinal, en una longitud que puede oscilar entre 7 y 80 cm, líquido libre, estrechamiento de la luz intestinal y disminución del peristaltismo, que pueden confundirse con otras patologías (obstrucción intestinal, apendicitis, linfoma intestinal maligno, entre otros), pero ayudan al diagnóstico (Domínguez-Ortega & Martínez-Cócera, 2000; Navarro-Cantarero et al., 2005). Estos hallazgos desaparecen en el transcurso de 1-2 semanas (Matsui et al., 1985).



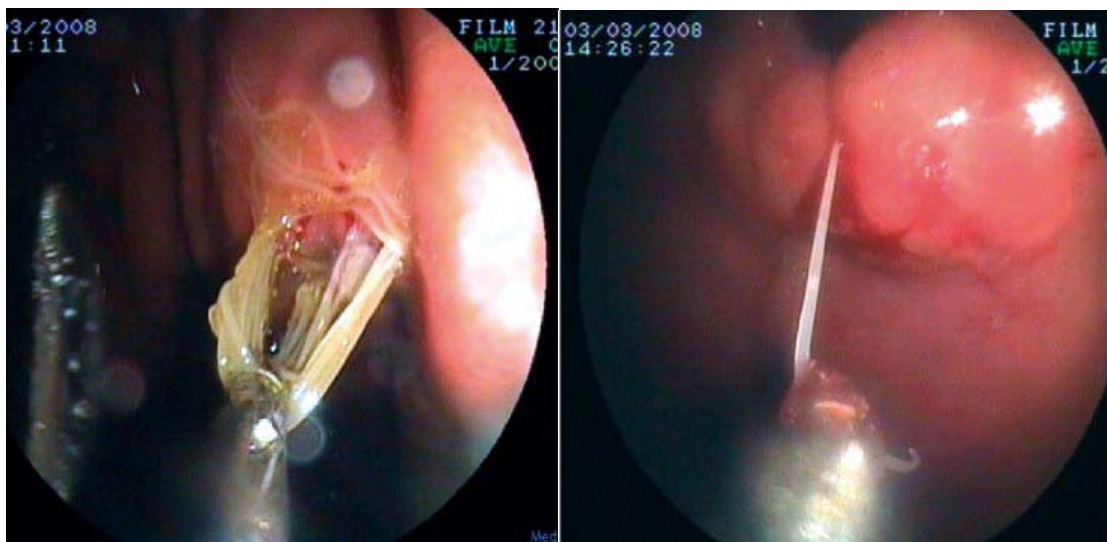
**Figura.5. A: Radiología simple del abdomen en caso de obstrucción intestinal: (.) Niveles hidroaéreos por obstrucción de intestino delgado. B: TAC abdominal donde se aprecia asa intestinal dilatada (tomada de Del Rey Moreno, 2003).**

En la anisakiosis gástrica se observan pliegues engrosados semejantes al carcinoma gástrico y la radiología nos permitirá detectar al helminto en sí, como una forma filiforme además del edema mucoso que provoca (Sugimachi et al., 1985). En

formas crónicas se puede observar una masa semejante a un tumor debido a la formación de un granuloma tras la penetración de la larva (Kim, 1994).

### ***Endoscopia***

En la actualidad, el único diagnóstico de certeza de esta enfermedad, en cualquiera de sus formas (anisakiosis gástrica, duodenal o de colon), es la visualización de la larva en su totalidad o un fragmento de la misma. Un examen endoscópico permite observar la larva al mismo tiempo que se realiza el tratamiento precoz mediante su extracción con pinzas de biopsia, resolviéndose con ello la parasitosis y evitando un acto quirúrgico innecesario (Akasaka et al., 1979; Sugimachi et al., 1985).



**Figura 6. Extracción de larva de *Anisakis simplex* mediante pinza de biopsia.**

**A: Nido de AS en antro. B: AS en región subcardial (tomada de Amo Peláez et al., 2008).**

### **I.8.2. Diagnóstico inmunológico**

El diagnóstico inmunológico se realiza:

- i) cuando la larva no se ha podido observar mediante endoscopia y/o radiología.
- ii) la identificación de la larva es difícil en el material de biopsia.
- iii) se sospecha la existencia de localizaciones ectópicas (Akao et al., 1990).
- iv) la infección se encuentra en estado avanzado y la larva ha sido destruida por el sistema inmune del hospedador (Ito et al., 2007).



Se sabe que el sistema inmunológico juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Asaishi et al., 1980), sin embargo, el diagnóstico inmunológico tropieza con muchas dificultades.

1. Solamente es válido en individuos inmunocompetentes.
2. En una infección primaria los anticuerpos se detectan entre la segunda y tercera semana.
3. Los antígenos de *Anisakis* presentan una marcada reactividad cruzada con los anticuerpos desarrollados frente a otros nematodos parásitos (Iglesias et al., 1996; Lozano Maldonado et al., 2004).
4. En la anisakiosis aguda, el diagnóstico serológico no tiene valor, ya que no transcurre el tiempo suficiente para que aparezca seropositividad.

Al igual que ocurre con otros nematodos parásitos, la transformación de la larva L3 en L4 conlleva cambios en la expresión antigénica (Lustigman, 1990). Este cambio antigénico hay que tenerlo en cuenta a la hora de elegir el antígeno o los antígenos para el diagnóstico serológico (Ubeira & Iglesias, 2000), lo ideal es que los antígenos seleccionados sean inmunodominantes y que estén presentes en ambos estados larvarios. Sin embargo, debido a que el sistema inmune del hombre siempre entra en contacto con la larva L3, y solamente en determinadas ocasiones se desarrolla la L4, son los antígenos de la L3 los de mayor valor diagnóstico (Iglesias et al., 1995).

En general, las infecciones por ascáridos se caracterizan por una buena respuesta de todos los tipos de inmunoglobulinas. El título y el tipo de inmunoglobulina revelados son de gran utilidad para confirmar el estado en el que se encuentra la infección. Los tipos de inmunoglobulinas que se detectan en mayor concentración son la IgM y la IgG1, seguidos de la IgG4, tanto en humanos como en animales de experimentación (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 al mes de la parasitación aguda. (Ubeira & Iglesias, 2000; Daschner et al., 2002). En el diagnóstico tanto de la anisakiosis gastroalérgica como en la intestinal es muy importante, en pacientes sensibilizados, la detección de anticuerpos IgE específicos, que se producen en respuesta a los antígenos ES liberados en

el momento de la penetración de la larva, esta IgE puede mantenerse elevada durante más de 5 años, el hecho se puede deber a nuevos contactos con el parásito sin la aparición de manifestaciones clínicas (Akao et al., 1990; Gómez et al., 1998). Hay que tener en cuenta que al comienzo del cuadro clínico, en pacientes que sufren una primoinfección, los valores de IgE específica son negativos o muy bajos, elevándose considerablemente a la semana del comienzo de los síntomas (Del Rey Moreno, 2003).

Ventura et al. (2008), destacan que *A. simplex* es el causante tanto de reacciones alérgicas inmediatas tipo I (mediadas por IgE) como de reacciones retardadas tipo IV (mediadas por células), en especial en sujetos con exposición laboral al parásito que manifiestan síntomas alérgicos.

El diagnóstico inmunológico se basa principalmente en:

- La prueba cutánea o "Prick-Test", realizada con extracto crudo de la larva de *A. simplex*.
- La determinación de IgE específica frente a *Anisakis*

### ***Prueba cutánea o "Prick-Test"***

Es una prueba inmunológica de tipo cutáneo frente a los antígenos de *A. simplex*. Se utiliza un control positivo, con histamina (10 mg/ml) y otro negativo con solución salina al 0,9%. A los 15 minutos se mide la pápula y si su diámetro es mayor de 3 mm en comparación con el control negativo, se considera la prueba positiva (Dreborg, 1989). Este método, en general, presenta elevada sensibilidad y baja especificidad, pues no distingue entre los verdaderos positivos y las reacciones cruzadas con otros parásitos como *Ascaris* o *Toxocara*, además se pueden producir reacciones anafilácticas durante la ejecución de la misma (Carretero et al., 1998).

En pacientes con anafilaxia tras la ingesta de pescado contaminado, el test cutáneo es positivo en el 87-100% de los pacientes (Lorenzo et al., 2000), también con el extracto calentado (40º C durante 10 minutos o 100º C durante 20 minutos) o congelado lo que confirma la termostabilidad de los alérgenos. Esta técnica realizada en pacientes con anisakiosis gástrica e intestinal fue positiva en el 90-100% de los casos (Domínguez Ortega et al., 2000; López serrano et al., 2000b; Obispo et al., 2000). Existe correlación

entre esta prueba y el valor de IgE específica (Gómez et al., 1998), pero no con el de IgE total ni con la intensidad de las síntomas (Lorenzo et al., 2000).



**Figura.7. Prick test (tomada de la página web de Sociedad de Alergología e Inmunología de Madrid-Castilla La Mancha).**

<http://www.smclm.com/MENU/Alergiaalimentaria/tabid/146/Default.aspx>

### ***Determinación de IgE específica***

Para un diagnóstico certero, la prueba cutánea debe complementarse con la determinación de IgE específica frente a *Anisakis*. El análisis seriado de la IgE específica y total puede ser útil para el diagnóstico de la parasitación aguda. Daschner et al. (1998), midieron ambos parámetros a las 24 h y al mes de la infección, encontrando un aumento del 90,24% de la IgE específica y un 85,36% de la IgE total. Desde hace más de 15 años se han desarrollado varias técnicas de diagnóstico, entre ellas sólo el método ImmunoCAP está comercializado. Las técnicas inmunoenzimáticas (Elisa e inmunoCAP) son las más utilizadas y permiten la detección de IgM, IgG, IgE. Como antígenos se utilizan tanto los somáticos como los ES de *Anisakis*, y aunque los resultados son bastante fiables, se siguen produciendo reacciones cruzadas con otros helmintos (Akao et al., 1990).

El empleo de anticuerpos monoclonales resuelve, en parte, esta dificultad. Así, el anticuerpo monoclonal AN2, que reconoce 2 heterodímeros (40-42 kDa) presentes en los antígenos ES, es muy útil al comienzo de la infección (Takahashi et al., 1986). Posteriormente (Iglesias et al., 1997; Lorenzo et al., 2000), utilizan una ELISA de captura, el antígeno de *Anisakis* O-deglicosilado y el anticuerpo monoclonal UA3, el cual captura dos moléculas de 139 kDa y 154 kDa, detectando anticuerpos tipo IgG e IgE en pacientes

con anisakiosis gastroalérgica y/o alergia, con sensibilidad y especificidad de aproximadamente el 100%. Recientemente Anadón et al. (2010), determinan que la mejor opción para el serodiagnóstico de la anisakiosis humana, en términos de especificidad y sensibilidad, 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.

Por otra parte la técnica de Inmunotransferencia (Inmunoblot) se presenta como el diagnóstico inmunológico más sensible y específico, ya que permite diferenciar los falsos positivos de verdaderas anisakiosis. Se han utilizado tanto antígenos somáticos como de excreción-secreción, aunque la sensibilidad y especificidad aumenta cuando se emplean los antígenos ES (Valls et al., 2002).

Los patrones obtenidos por inmunoblotting, con el suero de pacientes, son muy variados y dependen tanto de factores genéticos como del intervalo entre el contacto con el parásito y la extracción de muestra de sangre (Daschner et al., 2002). En la anisakiosis gástrica, Akao et al. (1990) obtuvieron bandas antigénicas distribuidas entre 50 y 120 kDa, dependiendo de los isotipos estudiados. Estos autores llegan a la conclusión de que la respuesta de anticuerpos de tipo IgA e IgE frente a los productos ES del parásito es más específica que la respuesta IgG. Pascual et al. (1999), detectaron en el suero de 12 pacientes con anisakiosis gástrica bandas de bajo (<20 kDa), medio (37-40 kDa) y alto (>60 kDa) peso molecular, con presencia en todos de IgE, IgG e IgG<sub>4</sub>, aunque el patrón de bandas reconocidas por cada isotipo fue diferente.

En las formas intestinales, Domínguez-Ortega et al. (2000) no observaron un patrón homogéneo en el inmunoblotting, pero todos reconocieron antígenos de bajo (14-18 kDa) y medio (30-50 kDa) peso molecular. Las bandas antigénicas aparecen a las 3 semanas desde el comienzo de la fase aguda, persistiendo más de 6 meses con disminución progresiva del número de bandas (Petithory et al., 1992).

Los individuos alérgicos a *A. simplex* reconocen múltiples bandas antigénicas en el 50-88% de los casos (generalmente bandas de peso molecular bajo y medio), una única banda de 40 kDa en el 8-17% o pueden no mostrar ninguna banda en el 4-8,3% (Del Pozo

et al., 1996; García et al., 1997; Moneo et al., 1997; Montoro et al., 1997). Generalmente existe correspondencia entre el patrón obtenido por inmunoblot y los valores de IgE específica, observándose numerosas bandas cuando la IgE específica es mayor de 20 kU<sub>A</sub>/L (Moneo et al., 2000). Entre las bandas obtenidas por inmunoblot, algunas pueden tener un alto valor diagnóstico ya que parecen ser específicas de *A. simplex*, así una banda de 60 kDa ha sido detectada en pacientes con anisakiosis y pacientes sensibilizados a *Anisakis* (Rodero et al., 2005, 2007; Del Rey Moreno et al., 2006, 2008). Por otra parte, la respuesta inmunológica a antígenos de Pm bajo parecen tener gran importancia, bandas de 14, 17 y 18 kDa han sido reconocidas por el suero de ratones infectados con larvas vivas, por lo que estos antígenos ES son liberados solamente *in vivo* (Iglesias et al., 1993); proteínas de Pm inferior a 20 kDa han demostrado ser menos sensible al calor que las de Pm más elevado, conservando por tanto su poder inmunogénico (Baeza Ochoa & Sanmartín, 2000). Otros autores también han demostrado que la especificidad se encuentra en proteínas de Pm bajo, Hwang et al. (2003), comunicaron un antígeno específico en L3ESP de < 13 kDa reconocido por pacientes con anisakiosis y Lozano Maldonado et al. (2004), revelaron componentes especie-específicos, uno de <7.2 kDa en los antígenos somáticos y ES y otro de 9 kDa en el antígeno ES de *A. simplex*.

### **I.8.3. Diagnóstico post-operatorio**

En 80-100% de los casos intestinales el diagnóstico es post-quirúrgico. Tras el estudio histológico del segmento intestinal resecado, en el que puede observarse engrosamiento transmural, edema, granuloma e incluso el propio nematodo (Domínguez-Ortega et al., 2000; Castán et al., 2002). Sobra decir que este método es el más invasivo de todos, siendo éste su principal inconveniente. Los avances producidos en los métodos de diagnóstico permiten que el tratamiento quirúrgico de la anisakiosis intestinal aguda se realice sólo ocasionalmente.

### **I.9. Tratamiento**

Se ha comprobado que la eliminación de la larva produce la remisión de los síntomas digestivos, por lo tanto su extracción sería el tratamiento de primera elección. Por este motivo, como se ha comentado anteriormente, en las formas gastrointestinales, en los que se pueda realizar una endoscopia diagnóstica (sobre todo en la anisakiosis

gástrica y cólica), ésta puede ser al mismo tiempo terapéutica, es decir, se suele aprovechar para introducir un fórceps y desalojar la larva, produciendo en el paciente una mejoría de la sintomatología en pocas horas (Ikeda et al., 1989; Castán et al., 2002). Cuando la endoscopia no es posible, hay que valorar la gravedad de los síntomas, si no son dramáticos hay autores que recomiendan un tratamiento conservador, que consiste básicamente en una dieta absoluta, fluidoterapia y tratamiento sintomático (Obispo et al., 2000; Del Rey Moreno, 2003), pero si los síntomas se agravan (casos de perforación, peritonitis, determinadas formas oclusivas), o no cesan, se debe recurrir a la cirugía para erradicar la larva, lo que soluciona definitivamente el cuadro (Del Rey Moreno, 2003).

En las formas extradigestivas se ha procedido a intervenir por provocar algún tipo de complicación, generalmente obstrucción intestinal por adherencias al tumor inflamatorio (Takabe et al., 1998).

Para aquellos pacientes que desarrollan reacciones de hipersensibilidad inmediata, el tratamiento a realizar es de emergencia, mediante antihistamínicos y/o corticoides parenterales e incluso adrenalina, de igual modo que se trataría una reacción inflamatoria secundaria o cualquier otra etiología (Moreno-Ancillo et al., 1997; Mendizabal-Basagoiti, 1999; Audicana et al., 2000). Los corticoides sistémicos se utilizan además para disminuir la necesidad de cirugía en el caso de obstrucción intestinal.

Con respecto al tratamiento farmacológico hay que tener en cuenta que son muchos los medicamentos probados, sin embargo, hasta ahora ninguno de ellos ha demostrado una eficacia contrastada.

Aunque no se dispone de evidencia suficiente, para el caso de la epigastralgia producida por la acción local del parásito (inflamación), ayuda la toma de inhibidores de la bomba de protones, ya que se conoce, que el desarrollo de la larva se ve favorecido por la secreción gástrica y también de la observación clínica de que la anisakiosis ha sido muy raramente descrita en pacientes gastrectomizados o mayores de 60 años (Muraoka et al., 1996; Henríquez-Santana et al., 2009).

Algunos autores han propuesto tratamientos antihelmínticos para evitar la cirugía, aunque en muchos casos se obtienen similares resultados con el tratamiento conservador (Lorenzo et al., 2000).

**Tabla 3. Tratamientos probados o citados por algunos autores.**

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
Moore et al. (2002)	Albendazol 400 mg 2 veces al día durante 21 días.
Arias et al., 2006	Albendazol 500 µg/ml

ACTH = hormona adrenocorticotrópica

La necesaria búsqueda de un tratamiento farmacológico como alternativa a la extracción del parásito por endoscopia, ha hecho que se hayan realizado estudios *in vitro* con el 6-shogaol, componente de la raíz de jengibre (*Zingiber officinale*), resultando letal para las larvas de *Anisakis* (Goto et al., 1990). También, el perillaldehído, componente de la *Perilla frutescens* ha mostrado efecto larvicida (Kasuya et al., 1990). Siguiendo esta misma línea, Hierro et al. (2004a,b); y Navarro et al. (2011) han comprobado una alta eficacia con distintos aceites esenciales (lemongrass, geranio, orégano, entre otros) y también con componentes de aceites esenciales (carvacrol, timol, citral, citronelol, nerolidol, farnesol y elemol). Los estudios histológicos indican como probables órganos y estructuras dianas el tracto digestivo y la cutícula del parásito.

Hay que tener en cuenta, que los resultados de los estudios *in vitro* sobre el efecto letal de las larvas, sólo son orientativos, por ello, los resultados más prometedores, son aquellos que se han obtenido *in vivo*. Así, con el terpeno perillaldehído ninguno de los animales sufrió lesiones en el tracto digestivo y hubo una alta mortalidad de las larvas presentes en el tracto digestivo (Hierro et al., 2004a). Esto explica que en las zonas de

China donde se utiliza *perilla frutescens* como condimento del pescado crudo, la prevalencia de la anisakiosis sea menor. También, en animales de experimentación se ha logrado una cierta eficacia con los terpenos farnesol y nerolidol (Navarro et al., 2011).

## **I.10. Profilaxis**

Sin duda la prevención es la mejor manera de evitar la anisakiosis y se debe realizar a lo largo de la cadena que va desde la producción al consumidor.

### **I.10.1. Detección de *Anisakis* en el pescado**

#### ***Examen visual simple***

Es un método fácil que consiste en la búsqueda del parásito en el cuerpo del pez, tanto en las vísceras mediante apertura del pez siguiendo la línea alba, como en la musculatura por cortes de un espesor aproximado de 5 mm. Huang (1990), ha demostrado que el 45-83% de las larvas del músculo del jurel y bacaladilla no se visualizan, además no sería aconsejable para piezas de gran tamaño.

#### ***Transiluminación***

Este método, se lleva a cabo con ayuda de mesas iluminadas. Consiste en proyectar una fuente de luz por la parte inferior del pescado, después de haberlo hecho filetes con un grosor de unos 30 mm. Según Bratney (1988) con esta técnica pasan desapercibidas un 30% de las larvas contenidas en el bacalao.

#### ***Iluminación con luz ultravioleta***

Se utiliza luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm que se hace incidir a una distancia de unos 10 cm sobre la superficie del pescado. Las larvas de *Anisakis* se muestran de color fluorescente azulado. El proceso es fácil, rápido y se pueden extraer las larvas. Nuestra experiencia personal nos confirmó que gran parte de las larvas muertas no emitieron fluorescencia.

#### ***Digestión***

Cosiste en reproducir las condiciones fisico-químicas del estómago de los mamíferos y someter el músculo a una solución de pepsina-clorhídrico a 37<sup>o</sup> C. Con este



método se recuperan la mayoría de las larvas, sin embargo requiere de mucho tiempo, y por tanto desaconsejable para inspecciones industriales.

### ***Diferencia de conductividad***

Se basa en la diferencia existente entre la conductividad del músculo del pescado y las larvas. Este método basado en el uso de magnetómetros, hace que se registre de forma automatizada las diferencias en la conductividad del músculo con respecto a la 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 parasitados tienen actividad ATPasa elevada en las mitocondrias del músculo que es proporcional al número de parásitos por pescado, por lo que se puede utilizar para valorar la infección del hospedador (Boczon & Bier, 1986).

### ***PCR***

Algunos autores proponen la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación secuencias específicas del ADN. Puede ser un método rápido y específico para la detección e identificación de los parásitos del pescado (Matsuura et al., 1992; D'Amelio et al., 2000; Martín-Sánchez et al., 2005; Pontes et al., 2005).

## **I.10.2. Métodos para prevenir la presencia de *Anisakis* en el pescado**

- Se debería evitar faenar en aquellas zonas donde se conozca la existencia de especies muy infectadas con *Anisakis*, si bien esto no es factible.
  
- También es importante controlar el impacto de las actividades humanas en la prevalencia del parásito, como puede ser la práctica de arrojar al mar las vísceras del pescado infectadas, mientras que se ha comprobado que en el pescado de acuicultura alimentado en exclusiva con pienso, la presencia de larvas es casi nula. Por ello, se deben someter las vísceras a algún tratamiento antes de eliminarlas al mar.

- Es importante que el tiempo entre la captura del pescado y su evisceración sea mínimo puesto que la presencia de larvas de *A. simplex* s.l. en el músculo puede que esté influenciado por este factor y se produzca migración post-mortem.
- Si no se ha realizado en el buque, el pescado se tendría que eviscerar y lavar la cavidad abdominal lo más rápido posible y si fuera necesario eliminar la musculatura hipoaxial.
- Se deberá llevar a cabo también un examen visual del pescado eviscerado. En el caso de filetes se debe realizar un examen visual de la superficie y eliminar las larvas con un cuchillo. El trabajo de Llarena-Reino et al. (2012), sobre ejemplares de merluza y caballa, declara la baja eficiencia de la inspección visual de los nematodos como método recomendado.
- Eliminar la ventresca o ijada de las especies que se encuentran más afectadas debido a que en esta zona (musculatura hipoaxial) se da la mayor presencia y número de larvas.
- Las huevas (paquete ovárico) pueden contener larvas vivas pero una vez que se liberan para su posterior elaboración en caviar y se lavan, hay menor posibilidad de que contengan larvas de *Anisakis*.

### **I.10.3. Métodos para la inactivación de la larva de *Anisakis* en el pescado**

Las larvas del parásito no resisten las altas temperaturas, por lo que un pescado bien cocinado no conlleva problemas de infección. Si el pescado se va a consumir crudo es preciso tomar ciertas medidas para destruir las larvas.

#### ***Tratamientos térmicos***

Las larvas que más riesgo presenten son las que se localizan en el tejido muscular. 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.

#### ***a- Congelación***

Se cree que el proceso altera la cutícula del parásito. Este método ofrece buenos resultados. Para que sea efectiva es necesario que la temperatura interna del pescado

alcance al menos  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, no se incluye el tiempo invertido en el proceso de congelación. Es especialmente importante tener en cuenta la interpretación de “a una temperatura  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  al menos durante 24 horas”. Algunos autores como Dong et al. (2000) señalan que para el frigorífico doméstico fueron necesarias, en el caso de halibut del Pacífico (*Atheresthes stomias*), 9,5 h para alcanzar  $-20^{\circ}\text{C}$  y al menos 60 h para la inactivación total del parásito.

La FDA (Food & Drug Administration) especifica congelación y almacenamiento a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  durante 7 días para un congelador convencional  $\leq -35^{\circ}\text{C}$  hasta que congele y mantenerlo a la misma temperatura durante 15 horas.

En el ámbito doméstico, a la hora de hacer recomendaciones al consumidor acerca del tiempo que el pescado debe permanecer congelado antes de escabechar o marinar, ha de tenerse en cuenta la capacidad de congelación de los frigoríficos domésticos. Los de una estrella significa que la temperatura mínima alcanzada es de  $-6^{\circ}\text{C}$ ; los de dos  $-12^{\circ}\text{C}$ ; los de tres,  $-18^{\circ}\text{C}$ ; y los de cuatro,  $-24^{\circ}\text{C}$ .

Según Deardorff & Throm (1988), la ultracongelación utilizada por algunas industrias, asegura una congelación rápida a  $-40^{\circ}$  y es capaz de matar más del 99% de las larvas presentes en el músculo de algunos peces en tan sólo una hora, además tiene la ventaja de no alterar las propiedades culinarias del pez.

La congelación rápida es eficaz para inactivar las larvas pero no destruye la capacidad de sensibilización de todos sus antígenos. A este respecto, algunos autores refieren que hasta un 10% de los pacientes desarrollan síntomas tras la ingesta de pescado congelado (Baeza et al., 2001; Valls et al., 2003; Rodríguez-Mahillo et al., 2010).

### ***b- Altas temperaturas***

Hay que resaltar que las larvas de *Anisakis* son sensibles al calor: en pescado sometido a  $55^{\circ}\text{C}$  se inactivan en 10-60 segundos; a  $60^{\circ}\text{C}$  en un segundo, de ahí que la FDA considere que un tratamiento a  $60^{\circ}\text{C}$  en el centro del producto durante un minuto es suficiente para matar las larvas. Eso significa que los productos cocinados completamente, como hervidos, fritos, ahumados en caliente, pasteurizados y cocinados al vacío son seguros desde el punto de la inactivación del parásito. Sin embargo, productos ahumados en frío o cocinados inadecuadamente a la plancha o en el

microondas no lo son. Para la plancha hay que cerciorarse de que el pescado esté cocinado por dentro, lo cual implica que a pesar de seguir la recomendación de cocinar poco el pescado, previamente deberíamos congelarlo para poder hacerlo de la manera tradicional. En el caso de los microondas, Adams & Devlieger (2000) encontraron que por este procedimiento se requiere una temperatura alta para matar los anisákidos, debido al calentamiento desigual. Lanfranchi & Sardella (2010), indicaron una supervivencia del 10% de las larvas de *Anisakis* a la temperatura interna de 64,05°C durante un minuto en microondas, mientras a una temperatura del 75,56°C, todos los parásitos murieron.

En el caso de los antígenos, se ha notificado que los AS sometidos al calor reducen su antigenicidad, pero incluso a 100° C son capaces de mostrar cierta capacidad para unirse a la IgE. Son generalmente los alérgenos de bajo paso molecular los que resisten más las altas temperaturas.

#### ▪ **Aplicación de alta presión**

La presurización sobre las muestras de pescado favorece la muerte de la larva; además la inclusión de los nematodos en el interior de los tejidos no les proporciona ninguna protección porque la presión hidrostática se extiende de forma homogénea e instantánea. La presión necesaria para matar los parásitos puede ser menor cuando se combina con otros tratamientos parcialmente letales para *Anisakis*, tales como marinados, o ahumados en frío. Este método puede constituir una alternativa para controlar la seguridad en los pescados mínimamente procesados (Molina-García & Sanz, 2002).

#### ▪ **Succión por vacío**

Consiste en introducir una boquilla en la cavidad abdominal del pescado para succionar no sólo los parásitos sino también el resto de las vísceras presentes después de la evisceración. Estos se van acumulando en un tanque en el que se destruyen los parásitos mediante aplicación de agua caliente o vapor, o bien por trituración.

#### ▪ **Electrocución**

Se utiliza en los barcos sobre el pescado recién capturado. A los peces se les somete a una corriente eléctrica para destruir los parásitos. En los ejemplares grandes se hace de forma individualizada. En los pequeños se hace de forma masiva, practicándose

dicha electrocución por inmersión del pescado en grandes recipientes con una disolución electrolítica. El ánodo y cátodo proporcionan una intensidad que 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 (patente ES22134 86A1).

#### ▪ **Otros métodos**

La eficacia del salazón y la acidificación sobre los parásitos depende mucho de la concentración de sus componentes y la cantidad añadida de los mismos. Los anisakidos, son también resistentes a las soluciones de salmuera que habitualmente se utiliza en los hogares. Sin embargo, en una solución salada al 22%, los nematodos mueren en 10 días (Smith et al., 1983). Investigadores de la Universidad de Alcalá de Henares, emplean una concentración aproximada del 12% de cloruro sódico (sal común) y ácido acético del 10% en lugar de vinagre comercial. El tiempo empleado es de 5 días a 4º C (patente ES223194).

#### **I.10.4. Legislación Europea**

- I. Decisión 91/493 CEE: Directiva sanitaria del consejo 22/07/1991; Doce 24/09/1991, establece en el apartado V del capítulo IV los requisitos referentes a los peces.
- II. Decisión 93/140/CEE: Decisión de la Comisión, del 19 de enero de 1993, por la que se establecen las modalidades de 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 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. 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, estableciendo que dichos productos deben someterse a un tratamiento por congelación a una temperatura igual o

inferior a  $-20^{\circ}$  C en el interior del pescado, durante un periodo de, al menos, 24 horas. DO L 226 de 25/06/2004, pp. 83-127.

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. Lo mismo se realizará con aquellos productos ahumados en frío (cuya temperatura en el interior de la pieza no sobrepase  $60^{\circ}$  C) y para aquellos en escabeche o salados cuando el proceso no baste para destruir las larvas.

### **I.10.1. Normativa aplicable en España**

Real Decreto 1437/1992, de 27 de noviembre, por el que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura.

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.

En el primer Decreto citado 1437/1992, de 27 de noviembre, se fijan las directrices relativas a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura. Referente a los parásitos, determina que, tanto los pescados, como los productos derivados del pescado, habrán de 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 de éstos que estén fuertemente parasitados. Finalmente, son los barcos factoría y las industrias dedicadas a la elaboración y preparación de los productos de la pesca los responsables de realizar el control para garantizar el cumplimiento de dicha ley.

Por su parte, el Real Decreto 1420/2006, de 1 de diciembre, se fija la obligatoriedad, para los establecimientos que sirven comida, de someter todos los pescados que se vayan a servir en crudo o casi crudos a un ciclo de congelación de 24 h a una temperatura igual o inferior a  $-20^{\circ}$ C. Esto incluye productos de la pesca que han sido sometidos a un proceso de ahumado en frío en el que la temperatura central del producto no ha sobrepasado los  $60^{\circ}$ C. Igualmente estarán obligados a garantizar la congelación en

las mismas condiciones si se trata de productos de la pesca en escabeche o salados, cuando este proceso no baste para destruir las larvas.

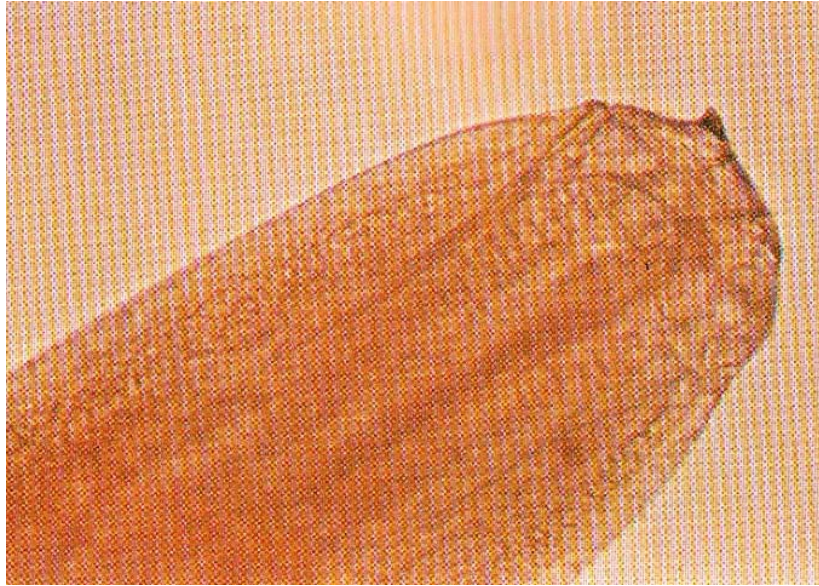
### **I.11. Identificación del parásito**

La correcta identificación de la larva L<sub>3</sub> es de crucial importancia, dada su implicación en la salud humana y también para el diagnóstico de enfermedades de los peces, sin embargo no está exenta de problemas. Mientras que es posible realizar la diferenciación específica de los adultos, especialmente de los machos según sus características morfológicas, no ocurre lo mismo con las larvas donde la diferenciación sigue siendo muy limitada.

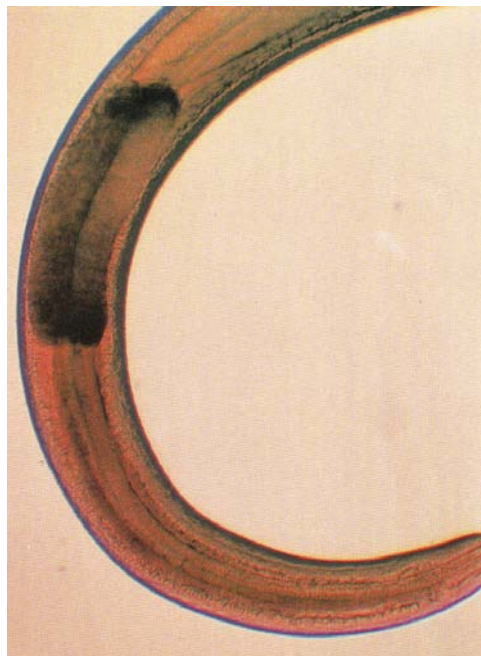
#### **I.11.1. Identificación morfológica**

En la identificación de las larvas de *Anisakis* es útil tener en cuenta las características descritas por Berland (1961); Petter & Maillard (1988) y Koie (1993).

- En la parte anterior de la larva L<sub>3</sub> se observa el diente y un poco más abajo, aproximadamente al final del primer tercio del cuerpo, el ventrículo. La longitud del ventrículo es un criterio en la diferenciación de la larva tipo I y II de *Anisakis*, así mientras que en la primera tiene un ventrículo entre 0,65 y 1,50 mm, la segunda tiene un ventrículo más corto entre 0,52 y 0,75 mm, es decir en la larva tipo I es alargado, delgado y oblicuo en su extremo posterior.



**Figura 8. Extremo anterior de *Anisakis* tipo I (tomada de Pereira Bueno, 1992).**



**Figura 9. Ventrículo de *Anisakis* tipo I (tomada de Pereira Bueno, 1992).**



- Por otro lado, en la parte posterior de la larva tipo I se encuentra una espina o mucrón, mientras que en el morfotipo II el extremo posterior es menos cónico y en algunas sin mucrón (Berland, 1961).



**Figura 10. Extremo posterior de *Anisakis* tipo I**

(tomada de [www.uceasturias.com/ images/fotos/anisakis3.jpg](http://www.uceasturias.com/images/fotos/anisakis3.jpg)).

En la actualidad, el reconocimiento de las distintas larvas L3 mediante el diagnóstico morfológico ofrece dificultad; si bien es fácil, con este método, determinar *Anisakis* tipo I o tipo II, no ocurre lo mismo cuando se trata de hacer una diferenciación precisa de las especies incluidas en cada morfotipo.

Recientes trabajos han demostrado que especies de *Anisakis* pueden ser distinguidos en función de la longitud del ventrículo. En esta dirección Quiazon et al. (2008), han observado que las larvas L3, L4 y el adulto de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* son morfológicamente diferenciables en función de la longitud del ventrículo; así la larva L3 de *A. simplex* s.s. tiene el ventrículo (0,90-1,50 mm), más largo que el de *A. pegreffii* (0.50 a 0.78 mm) (Fig. 11). Según estos autores, la relación esófago/ventrículo, de estas dos especies son distinguibles en las fases L3, L4 y adulto, también los machos de ambas

especies difieren en el modelo de distribución de las papilas caudales. Igualmente, Murata et al. (2011) indican que las especies *A. physeteris*, *A. paggiae* y *A. brevispiculata*, pueden distinguirse fácilmente atendiendo a determinados caracteres morfológicos (longitud del ventrículo, longitud y forma del extremo caudal), datos que han sido confirmados por los marcadores genéticos.

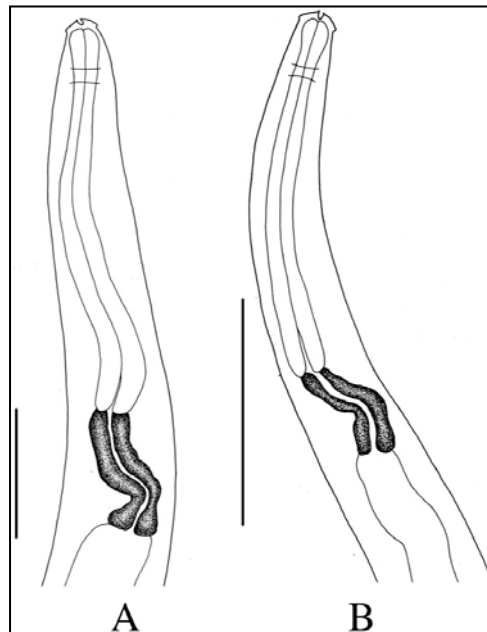


Figura 11. Diferencias morfológicas entre *A. simplex* s.s. (A) y *A. pegreffii* (B) según la longitud del ventrículo (tomada de Quiazon et al., 2008).

### I.11.2. Identificación genética

En los últimos 20 años ha mejorado de forma considerable nuestro conocimiento sobre la sistemática y posición taxonómica de las especies del género *Anisakis*, gracias al empleo de marcadores genéticos que han permitido su correcta identificación en algunas fases de su ciclo biológico. Los progresos realizados están estrechamente ligados al uso de marcadores isoenzimáticos llevado a cabo por el equipo de la Dra Simonetta Mattiucci (Mattiucci et al., 1986; 1997; 1998; 2001; 2002; 2003; 2004; Mattiucci & Nascetti, 2008; Nascetti et al., 1986; 1993) estos estudios han constituido la base de las investigaciones realizadas posteriormente, con otros marcadores genéticos, tales como los generados con la técnica PCR-RFLP del ITS1-5,8S-ITS2 (D'Amelio et al., 2000; Abollo et al., 2003; Martín-Sánchez et al., 2005; Pontes et al., 2005; Marques et al., 2006; Farjallah et al., 2008).

### I.11.2.1. Isoenzimas

Las isoenzimas son proteínas de igual función catalítica pero distinta composición de aminoácidos y por lo tanto distinto peso molecular y/o carga eléctrica, lo que se traduce en una diferente movilidad al someterlas a electroforesis. Estas moléculas podemos encontrarlas en distintos tejidos de un mismo individuo o bien, en distintos individuos, permitiéndonos así su comparación y su uso como marcadores genéticos.

Las enzimas se encuentran cargadas eléctricamente cuando se hallan en solución. Si aplicamos un campo eléctrico se desplazarán hacia el cátodo o ánodo en función de su carga; así recorrerán una determinada distancia en función de las características propias de las proteínas, como peso molecular, carga, asociación con otros compuestos susceptibles de ionizarse, etc., así como de las condiciones experimentales (tiempo durante el que se practique la electroforesis, naturaleza del soporte sobre el que se realiza la electroforesis, etc.)

Tras la migración se procede al revelado aprovechando la capacidad catalítica de las enzimas, obteniendo un conjunto de bandas que se conoce como zimograma. Los fenotipos así obtenidos pueden traducirse en términos de genes y alelos. De este modo, un genotipo homocigoto 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 componen la enzima más uno. Los primeros intentos de estudiar genéticamente poblaciones de anisakidos se llevaron a cabo mediante el uso de la electroforesis de isoenzimas, que incluían el estudio de 19 a 24 loci isoenzimáticos (Mattiucci et al., 1986, 1997, 1998, 2001, 2002, 2003, 2004; Nascetti et al., 1986, 1993; Mattiucci & Nascetti, 2008). Estos trabajos pusieron en evidencia una elevada heterogeneidad genética dentro del grupo, lo que ha permitido la identificación de nuevas especies, detección de especies hermanas y revalidación de especies conocidas. Así, la diversidad de las especies de *Anisakis* se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas (Mattiucci et al., 1997; 1998; 2001; 2002; 2005; Mattiucci & Nascetti, 2006, 2008).

Desde 1986 y gracias a los estudios isoenzimáticos, *A. simplex* se considera un complejo de tres especies hermanas: *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* y *A. simplex* tipo C que difieren en su estructura genética, así como en las características ecológicas, distribución

geográfica y hospedadores (Klimpel et al., 2007; Mattiucci et al., 1997; Mattiucci & Nascetti, 2008). Mediante la técnica electroforética, Nascetti et al. (1986), señalan por primera vez que es posible la identificación de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* en estado de adulto y larva mediante el análisis de tres loci, Sod, Adk-2 y Lap-1, que muestran distintos alelos en ambas especies; un cuarto locus, Got, es diagnóstico en un 95%, mientras que otras enzimas como Sdh, Idh, Pgm-1, ACph-1 y Mpi muestran frecuencias alélicas bien diferenciadas entre ambas especies.

*A. pegreffii* está principalmente distribuido en el mar Mediterráneo y en el hemisferio sur; *A. simplex* s.s. en el Atlántico norte y en el océano Pacífico, mientras que *A. simplex* C lo encontramos en las costas del Pacífico y en el hemisferio sur. Aunque en general se trata de especies alopátricas, *A. simplex* s.s. y *A. simplex* C se encuentran en simpatria en las costas pacíficas de Canadá, mientras que *A. simplex* C y *A. pegreffii* lo están en el Océano Atlántico sur Mattiucci & Nascetti, 2008, las costas de la Península Ibérica y los mares de Japón son zonas de simpatria de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* (Abollo et al., 2003; Martín-Sánchez et al., 2005; Umehara et al., 2006; Marques et al., 2006).

#### I.11.2.2. Marcadores genéticos derivados del ADNr

Aunque la aportación realizada por la técnica de electroforesis de isoenzimas ha sido esencial y ha constituido la base de los estudios realizados posteriormente con marcadores genéticos, su complejidad en la interpretación de los patrones de bandas y la necesidad de gran cantidad de material biológico adecuadamente conservado, hacen muy difícil su utilización. La técnica de PCR-RFLP del ITS1-5,8S-ITS2, basada en las claves aportadas por D'Amelio et al. (2000) y posteriormente implementadas por otros autores como Abollo et al. (2003), Martín-Sánchez et al. (2005); Pontes et al. (2005); Marques et al. (2006); Farjallah et al. (2008), entre otros. La electroforesis de isoenzimas ha demostrado ser una técnica rápida, y fácil de interpretar aunque no está exenta de limitaciones.

Utilizando los cebadores descritos por Zhu et al. (1998) se puede amplificar la región del ADNr que comprende el ITS-1, el gen 5,8S y el ITS-2, más aproximadamente 70 nucleótidos del gen 28S. La longitud del ITS-1 en *A. simplex* s.l. es 392 bp, con un contenido G+C de 46,4%, la del gen 5,8S es 157bp y 51,6% de G+C, mientras que la longitud del ITS2 es de 309 nucleótidos con 42,4% de G+C.

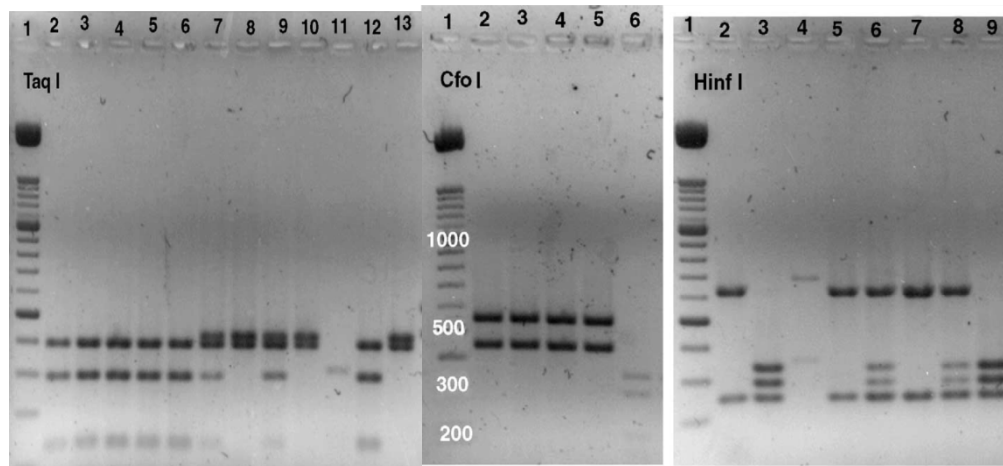
El análisis de las secuencias del fragmento ribosómico ITS1-5,8S-ITS2 confirma la existencia en ITS-1 de dos diferencias fijas entre las especies hermanas *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* en posiciones 255 y 271, tratándose de dos transiciones C/T (Abollo et al., 2003; Abe et al., 2006; Chen et al., 2008; Ceballos Mendiola et al., 2010). Así, mientras que *A. simplex* s.s. posee en ambas posiciones una T, *A. pegreffii* tiene una C. La existencia de estas dos diferencias es lo que permite distinguir *A. simplex* s.s. de *A. pegreffii* mediante digestión con enzimas de restricción tales como TaqI e HinfI, y la posterior comparación de los patrones de bandas generados. La enzima Cfo genera patrones de bandas indiferenciables en estas dos especies pero permite distinguir a *A. simplex* C.

La existencia de genotipos híbridos entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* se ha puesto de manifiesto en larvas L3 procedentes de peces capturados en las costas mediterráneas y atlánticas españolas (Abollo et al., 2003; Martín-Sánchez et al., 2005; Marques et al., 2006), en aguas japonesas (Umehara et al., 2006) y más recientemente en las costas mediterráneas norteafricanas, aunque sólo en *Scomber scombrus*, revelando, según los autores, los movimientos migratorios de este hospedador desde el Atlántico al Mediterráneo (Farjallah et al., 2008). Es Umehara et al. (2006), los que encuentran por primera vez, individuos adultos híbridos de *A. simplex* s.s. / *A. pegreffii* aislados de *Balaenoptera acutorostrata* capturada en aguas japonesas del océano Pacífico noroccidental. Estos individuos híbridos se caracterizan por tener una hebra de ADN característica de *A. simplex* s.s. (por tanto T, T en posiciones 255 y 271) y otra hebra de *A. pegreffii* (C, C) y pueden ser reconocidos por PCR-RFLP.

Mattiucci & Nascetti, (2008) defienden el aislamiento reproductivo de ambas especies, y no son partidarios de interpretar estos hallazgos como indicios de hibridación.

La existencia de estas dos posiciones polimórficas en la secuencia ITS-1 ha sido aprovechada por Umehara et al. (2008) para diseñar un cebador específico de *A. pegreffii*, introduciendo una base *mismatched* en la segunda base del extremo 3'; este cebador junto con NC2 sólo amplifica el ADN de individuos de esta especie originando un fragmento de 672pb. Muy similar es el cebador descrito por Chen et al. (2008), también, para usarlo con NC2. Abe (2008), diseña otro cebador específico de *A. pegreffii* muy similar a los anteriores aunque sin el *mitmatch*, que usado con el cebador AS2 amplifica

un fragmento de 570bp. La utilidad de estos cebadores debe ser adecuadamente confirmada.



**Figuras 12, 13 y 14: Geles de agarosa mostrando los patrones de bandas correspondientes a las especies *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* y genotipos híbridos, obtenidos tras la digestión del fragmento ITS1-5,8S-ITS2 con las enzimas de restricción TaqI, CfoI e HinfI (tomada de Martín-Sánchez et al., 2005).**

### I.11.2.3. Otros marcadores genéticos

Dado que hay aspectos taxonómicos relativos a los anisákidos que todavía siguen sin resolverse, se ha seguido buscando nuevos marcadores genéticos que ayuden al estudio de estos nematodos.

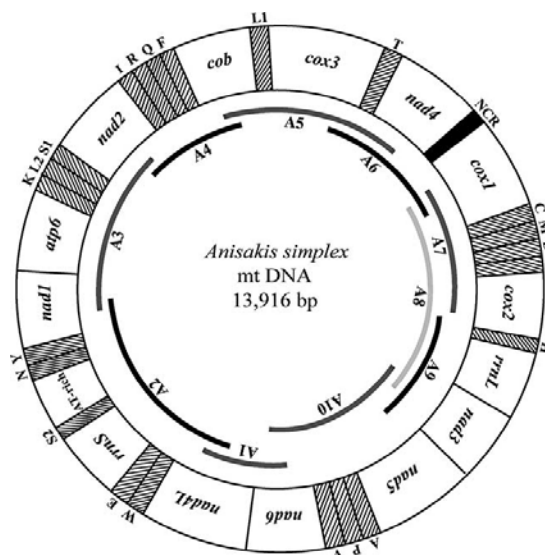
Las secuencias 18S y 28S del ADNr están muy conservadas en *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* por lo que no son útiles para su diferenciación. La técnica de RAPD se caracteriza por mostrar la variabilidad de un gran número de loci anónimos, teóricamente distribuidos a través de todo el genoma del parásito. Esta técnica genera un elevado número de marcadores genéticos, la mayor parte de los cuales son polimórficos, siendo por tanto muy útiles para estudios genéticos de poblaciones (Martín-Sánchez et al., 2005).

También, las secuencias del genoma mitocondrial proporcionan marcadores útiles para estudios de genética de poblaciones y estudios filogenéticos, debido a su estructura relativamente conservada (circular y compuesta por 37 genes) y sus altas

tasas evolutivas en relación con los genes nucleares, tal como se ha podido comprobar en estudios realizados sobre parásitos de varios grupos (Barón et al., 2008).

Además, el ADN mitocondrial tiene herencia materna en la mayoría de los organismos, incluido *Ascaris* (Anderson et al., 1995), por lo que los genes mitocondriales representan loci genéticamente independientes de los genes en el núcleo, y su estudio resulta muy útil en combinación con genes nucleares como los ribosómicos, cuya herencia es parental e implica recombinación genética.

Se ha podido secuenciar de forma completa el ADN mitocondrial de algunos nematodos como *Ascaris suum*, *Trichinella spiralis*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* y así hasta 12 especies (Lavrov et al., 2001; Hu et al., 2002). Recientemente, se ha secuenciado también el de *A. simplex* s.l. (Kim et al., 2006). El genoma mitocondrial de *A. simplex* s.l. es circular y tiene un tamaño de 13.916 pb. Sus características generales coinciden con las del ADN mitocondrial de otros nematodos, tanto en su composición de genes como en su disposición que es idéntica a la de *Ascaris suum* y casi idéntica a la de *A. duodenale* y otros Rabditida, aunque diferente de los Spirurida. Está compuesto de 36 genes de los cuales 12 codifican proteínas, 22 son genes ARNt y dos son genes ARNr, faltando el gen *atp8*, al igual que ocurre en otros nematodos a excepción de *T. spiralis* (Kim et al., 2006).



**Figura.15. Representación circular del genoma mitocondrial de *Anisakis simplex* (tomada de Kim et al., 2006).**

La secuencia mitocondrial completa es rica en A+T (71,2%) de forma similar a otros nematodos. Los 12 genes que codifican proteínas son: nad1-6, atp 6, cox 1-3, citb, nad4L. Además, posee 22 genes ARNt, 2 genes ARN ribosomales y 15 regiones intergénicas no codificantes. La región codificante más larga (515 pb) está situada entre dos genes de transferencia (trnS2 y tren) y posee un alto contenido en A+T (87,2%) y se la denominan región rica A-T, correspondiéndose con la de otros nematodos (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 & Husdspath (2000) se amplifica el 90% de la secuencia codificante del cox2; se trata de cebadores internos que permiten la amplificación en todos los Ascaridida. Como ocurre en otras secuencias mitocondriales de nematodos, el contenido A+T de la secuencia codificante de la citocromo oxidasa II en Ascaridida es externadamente alto, con una 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 & Husdspath, 2000). El análisis de la secuencia del gen cox II se ha utilizado para estudios de estructura genética de poblaciones de *A. simplex* s.l. y reconstrucción filogenética de los anisákidos (Valentini et al., 2006; Kijewska et al., 2009; Baldwin et al., 2011).

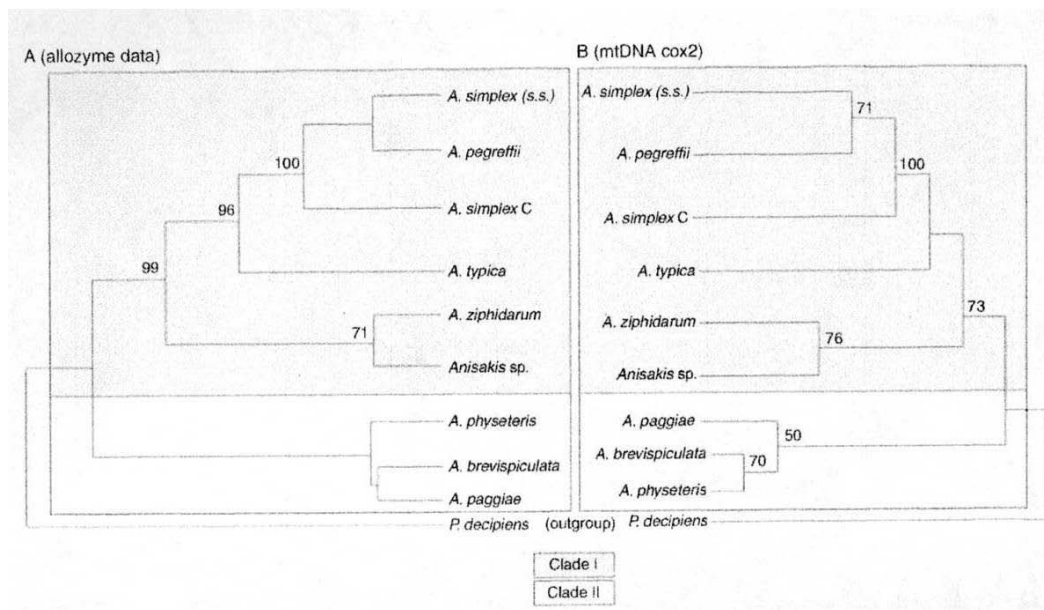
#### **I.11.2.4. Sistemática filogenética de anisákidos**

La electroforesis de isoenzimas, el RAPD y las secuencias de ADN como ITS1-5,8S-ITS2 y cox2 generan caracteres que han usado diversos autores para la construcción de dendrogramas o árboles que en algunos casos tienen implicaciones filogenéticas (Martín-Sánchez et al., 2005; Mattiucci et al., 2005; Nadler et al., 2005; Valentini et al., 2006).

Mattiucci & Nascetti (2008) hacen 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 cox 2, etc.) o diferentes métodos (dendrogramas UPGMA, árboles de consenso NJ, análisis de 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 (Fig. 16). 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. La separación entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* está soportada por el análisis bootstrap, únicamente en el árbol generado con los datos de la secuencia mitocondrial.



**Figura.16. Relaciones genéticas entre *Anisakis* spp. a partir de A: árbol neighbour-joining (NJ) elaborado a partir de distancias genéticas obtenidas de los datos isoenzimáticos. B. árbol NJ deducido a partir de distancias genéticas obtenidas a partir del análisis de las secuencias cox2. Sólo se muestran los valores de bootstrap  $\geq 50\%$ . Como outgroup se ha utilizado *Pseudoterranova ceticola* (tomada de Mattiucci & Nascetti, 2008).**

*Objetivos*

## II. Objetivos

La anisakiosis es una enfermedad emergente con un gran número de casos diagnosticados en todo el mundo, especialmente en Japón. La severidad que puede alcanzar el cuadro clínico hace imprescindible que los médicos la tengan presente para su mejor diagnóstico y que las autoridades sanitarias diseñen estrategias de control y vigilancia. En España, país que comparte con Marruecos parte de las aguas mediterráneas y atlánticas, se han notificado un gran número de casos de anisakiosis gastrointestinal, gastroalérgica y alérgica. No ocurre lo mismo, en la población marroquí, donde a pesar del alto consumo de pescado y de sus importantes recursos pesqueros, la anisakiosis sigue siendo mal conocida y subestimada. Habida cuenta la escasez de bibliografía en este país, en la presente tesis doctoral se ha planteado como objetivo general, **profundizar en el conocimiento de los principales aspectos epidemiológicos de la anisakiosis en el norte de Marruecos.**

Para alcanzar este objetivo general, se han perseguido los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar los parámetros de parasitación por *Anisakis* en el estornino (*Scomber japonicus*) y jurel (*Trachurus trachurus*), dos peces de frecuente consumo en Marruecos, así como evaluar los factores de riesgo asociados a la infección de estos peces.
2. Investigar la sensibilización frente a *Anisakis* de la población en el norte de Marruecos.
3. Determinar y caracterizar genéticamente las especies de *Anisakis*.

*Resultados*

### III. Resultados

#### III.1. Capítulo I. Estudio epidemiológico de *Anisakis* spp. en los peces del norte de Marruecos

##### ***Anisakis simplex* s.l. parasitization in mackerel (*Scomber japonicus*) caught in the North of Morocco — Prevalence and analysis of risk factors**

#### Resumen

El consumo del estornino (*Scomber japonicus*) está muy generalizado entre la población marroquí y su producción constituye un importante pilar económico del país. Hemos investigado los factores de riesgo y la prevalencia de infección por *Anisakis* spp. en estornino capturados en aguas marroquíes. Las prevalencias de infección general son más elevadas en el Atlántico (67.9%) que en el Mediterráneo (57.0%) con similares valores de abundancia e intensidad medias y similares valores de prevalencia en musculatura. *A. pegreffii* es la especie dominante (82.6%) mientras que el 16.3% son genotipos híbridos *A. simplex* s.s./*A. pegreffii*. La presencia de *A. simplex* s.s. sólo ha sido puesta de manifiesto en un ejemplar de *S. japonicus* procedente del Atlántico. La infección del estornino está asociada al peso del pescado y de sus gónadas, así como a la zona de captura y la estación del año. Sin embargo la infección de la musculatura sólo está asociada al peso y carga parasitaria. El consumo de caballas de menor peso se nos presenta como una buena medida profiláctica de la anisakiosis humana entre la población marroquí.

**Palabras clave:** *Scomber japonicus*, *Anisakis* spp., aguas marroquíes, factores de riesgo.

**Abstract**

Consumption of mackerel (*Scomber japonicus*) is very widespread in Morocco, where its production is an important economic pillar. We investigated the prevalence of infection by *Anisakis* spp. in mackerel caught in Moroccan waters, analyzing infection risk factors. The prevalence was generally higher in fish from the Atlantic (67.9%) than from the Mediterranean (57.0%), but they did not differ in the mean abundance, intensity, or prevalence of muscle parasitization. *A. pegreffii* was the predominant species (82.6% of larvae) followed by the hybrid *A. simplex* s.s./*A. pegreffii* (16.3%). Only one L3 of *A. simplex* s.s. was found in a specimen of *S. japonicus* from the Atlantic. Mackerel infection was associated with total fish weight, gonad weight, catch area, and catch season. However, muscle infection was associated solely with total weight and parasite loads.

The consumption of lower-weight mackerel may be a good prophylactic measure against human anisakiasis.

**Keys words:** *Scomber japonicas*, *Anisakis* spp., Moroccan waters, risk factors

## 1. Introduction

Fish and fish products are crucial components of the human diet in many countries. Morocco has two coastlines, totaling 3500 km, and the main protein supply for the population derives from fish (Kamili, 2006). Parasites are widely present in fish and impossible to control, except in fish farms, and some are pathogenic for humans. Species arousing health concerns include *Anisakis* spp., since the ingestion of their larvae can injure different parts of the gastrointestinal tract and other tissues and organs, while allergic symptoms range from urticaria/angioedema to recurrent anaphylaxis (Audicana et al., 2002).

Anisakiasis is considered a worldwide human health problem, especially in populations accustomed to eating raw or under-cooked fish (Audicana and Kennedy, 2008; Umehara et al., 2007). Most reports on cases in humans have been associated with the *Anisakis simplex* complex, although it would be more accurate to say *Anisakis* morphotype type I, given the lack of morphological characters to distinguish between the species included in this group (*A. simplex*, *A. pegreffii*, *A. simplex* C, *A. typica*, *A. ziphydarum*, and *A. nascettii*) and the low numbers of larvae from human cases which have been identified specifically by molecular methods (Mattiucci and Nascetti, 2008; Mattiucci et al., 2009). Umehara et al. (2007) studied 100 larvae isolated from 85 patients in Japan and found *A. simplex* s.s. to be the predominant etiological agent of anisakiasis, with only one patient infected by *A. pegreffii*.

Among the few studies on the presence of these nematodes in fish in Morocco, a high prevalence of *Anisakis* spp. was reported in fish from both Atlantic and Mediterranean waters (Mattiucci et al., 2001; Cissé and Belghyti, 2005a; Farjallah et al., 2008a). Nevertheless, there have been no official reports of human infection. One of the most frequently consumed fish in northern Morocco is mackerel (*Scomber japonicus*).

The annual mean catch of Scombridae (mackerel and tuna) in Morocco is 20,000 ton, second only to sardine production (Cissé and Belghyti, 2005b). With this background, we conducted an epidemiological study to determine the risk factors and prevalence of infection by *Anisakis* spp. in mackerel obtained directly from Moroccan fishing boats

landing at two ports in Northern Morocco. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis was used to identify the parasite species.

## 2. Material and methods

### 2.1. Host

We studied 266 mackerels caught off the Moroccan coast in 2007 and 2008 during the different seasons of the year: 135 specimens (50.8%) from the maritime area of Tetouan (Mediterranean) and directly obtained from fishing craft at M'diq port, and 131 fish (49.2%) from Atlantic waters of Tangier and directly obtained from fishing craft at Tangiers port. The fish were identified following Collette et al. (2001) and were measured and weighed. After dissection, the sex was determined, and the viscera and epaxial and hypaxial muscles were removed, weighed and separately subjected to digestion in pepsin/HCl solution, according to the McGladdery (1986) at pH 2–2.3 and 36 °C for 3 h.

### 2.2. Parasite

Isolated *Anisakis* spp. larvae were washed in 0.9% NaCl solution and rinsed in 70% alcohol and glacial acetic acid for microscopic observation and morphological study following the criteria of Hartwich (1974); Kjøie (1993); Petter and Maillard (1988) and Yoshinaga et al. (1987), mainly:

a) presence of boring tooth at anterior end; and b) oesophageal ventricle in first third of the parasite and posterior end of the larva, which differ between morphotypes I and II. Larvae were then individually preserved in labeled Eppendorf tubes at –20 °C.

### 2.3. Quantitative epidemiology

We calculated the prevalence, mean abundance and intensity of infection as defined by Bush et al. (1997). Differences among prevalence values were evaluated by using the chi-square test or Fisher's test.



Genetic analysis of parasites for species identification 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 A (forward): 5' GTC

GAATTCGTAGGT GAA CCTBGCG GAA GGA TCA 3' and B (reverse): 5' GCC GGA TCCGAA TCC TGG TTA GTT TCT TTT CCT 3', reported by D'Amelio et al. (2000), and NC5 (Forward), 5' GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT 3' and NC2 (Reverse), 5' TTAGTT TCT TTT CCT CCGCT 3' reported by Zhu et al. (1998), followed by digestion with 10 U/ $\mu$ l restriction enzymes Hinf I (Bioron international), Taq I (Bioron international), and Cfo (Roche). The digestion product was subjected to 3% agarose gel electrophoresis for species identification according to the band pattern (D'Amelio et al., 2000; Kijewska et al., 2000; Martin-Sánchez et al., 2005; Pontes et al., 2005; Umehara et al., 2006).

### *2.5. Risk factor analysis*

The following variables were considered as potential risk factors for infection with *A. simplex* s.l.: sex, weight, length, gonad weight, and liver weight of the fish and the catch area and season. Univariate and multivariate logistic regression analyses were performed, considering total parasitization and muscle parasitization as dependent variables and the above factors (and parasitic load) as independent variables.

The multivariate model was constructed by using a stepwise approach, selecting variables according to the statistical significance of their association with parasitization. The goodness of fit of the model was evaluated by using the coefficient of determination  $R^2$  and by graphical representation of the residuals. The possible colinearity of predictor variables was tested by calculating the Pearson correlation coefficient for pairs of variables. We also controlled for possible confounders and for interactions among predictors. SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL) was used for the data analyses.

## **3. Results**

### *3.1. Host*

The length of the 266 mackerels ranged from 14.5 to 36.0 cm (mean of 24.7 cm) and the weight from 25.1 to 392.7 g (mean value 147.8 g); 155 were male (58.3%) and 111

female (41.7%). Among the seasons, 72 (27.1%) were caught in the autumn, 64 (24.1%) in the summer, and 65 (24.4%) each in spring and winter.

### 3.2. Quantitative epidemiology

Out of the 266 specimens, 166 were parasitized (62.4% prevalence), detecting 477 L3 larvae of *Anisakis* type I (none of type II). The number of larvae in each fish ranged from 0 to 13, with a mean abundance of 1.8 and intensity of 2.9. Out of the 477 parasites recovered, 451 were detected in the body cavity (prevalence of 61.7%, mean abundance of 1.7, and intensity of 2.8) and 26 in the muscle of 26 fish (9.8% prevalence and mean abundance of 0.1).

The overall prevalence of infection was 67.9% in fish from the Moroccan Atlantic coast, with mean abundance of 2.0 and intensity of 2.9; the prevalence was lower ( $p=0.067$ ) in fish from the Mediterranean coast (57.0%), but the mean abundance (1.6) and intensity (2.8) were similar. No difference in muscle infection prevalence was found between fish from the two coasts ( $p=0.456$ ).

### 3.3. Identification by PCR-RFLP

PCR was used to amplify the ribosomal fragment ITS1-5.8S-ITS2 in 92 larvae randomly selected from among the 477 larvae morphologically classified as L3 *Anisakis* type I extracted in this study. Table 1 shows the results in accordance with restriction patterns for the three enzymes used.

### 3.4. Risk factor analysis

Parasitization by *A. simplex* s.l. of the whole fish was associated with the total weight, length, liver weight, gonad weight, catch season, and catch area in the univariate analyses ( $p < 0.05$ ), but not with the sex of the fish ( $p=0.23$ ). Length and liver weight were each strongly associated with total weight (Pearson's correlation of 0.73 and 0.86, respectively), and neither entered the multivariate model. Gonad weight was only weakly

correlated with total weight (Pearson's correlation of 0.28), and both of these variables remained in the model (Table 2).

Parasitization by *A. simplex* s.l. of the muscle was associated with the total weight, fish length, liver weight, and total number of parasites in the fish in the univariate analyses (pb0.05). In the multivariate analysis, only total fish weight (OR=1.01; CI=1.01–1.02; pb0.01) and parasite load (OR=1.52; CI=1.27–1.84; pb0.01) remained significantly associated with the presence of L3 larvae in the muscle of these fish.

**Table 1. Genotypes of *Anisakis* identified by using genetic markers in *S. japonicus* caught off the Atlantic and Mediterranean coasts of Morocco. N: number of *Anisakis* identified, % : percentage of larva identified, Hybrid genotypes : Hybrid between *A. pegreffii*/*A. simplex* s.s**

Species	Mediterranean Sea		Atlantic Ocean		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>A. pegreffii</i>	31	81.58	45	83.33	76	82.6
<i>A. simplex</i> s.s	0	0	1	1.85	1	1.1
Hybrid genotypes	7	18.42	8	14.82	15	16.3
Total	38	100	54	100	92	100

**Table 2. Factors associated with the presence of *Anisakis* larvae in mackerel caught in Moroccan waters. OR: odds ratio, P: grado de significación**

Variables (N)	OR (95%CI)	p
Total weight (261)	1.02 [1.01-1.03]	<0.001
Gonad weight	1.28 [1.02-1.61]	0.04
Catch area		
Mediterranean (134) (ref)	-	<0.001
Atlantic (127)	3.25 [1.71 -6.18]	-
Season		0.03
spring ref. (65)	-	-
summer (60)	1.66 [0.69-4.00]	0.26
autumn (71)	2.91[1.27-6.67]	<0.01
winter (65)	2.88 [1.13-7.38]	0.03

#### 4. Discussion

This study reveals an elevated prevalence of infection by *A. simplex* s.l. in *S. japonicus* from Northern Moroccan waters, with a higher prevalence in Atlantic (67.9%) than in Mediterranean (57.0%) waters (p=0.07). Costa et al. (2003) reported a similar prevalence in mackerel from the Atlantic waters off Madeira (69.5%).

By far the most dominant *Anisakis* species in these mackerels was *A. pegreffii*, which represented 82.6% (76/92) of detected larvae, followed by the hybrid *A. pegreffii*-*A. simplex* genotype (16.3%). The proportion of *A. pegreffii* and hybrids did not differ between mackerel from the Mediterranean and Atlantic ( $p=0.21$ ). *A. simplex* s.s. appeared in one specimen from the Atlantic, probably reflecting a migration from higher latitudes, since its southern limit in this part of the Eastern Atlantic, where it is widespread, is considered to be the Strait of Gibraltar, north of our catch area (Mattiucci and Nascetti, 2008). In contrast, the northern limit for *A. pegreffii* in Atlantic waters is the northern Spanish coast, and it is the dominant species in the Mediterranean Sea (Mattiucci and Nascetti, 2008). F1 hybrid individuals are characterized by having one DNA strand characteristic of *A. simplex* s. s. (T, T in positions 255 and 271 of the ribosomal fragment ITS1-5,8SITS2) and another strand of *A. pegreffii* (C, C); only one of these positions showed this hybrid genotype (by PCR-RFLP) in 73.3% of the hybrids, with the other corresponding to *A. pegreffii*, demonstrating the backcrosses of F1 hybrids with this progenitor (unpublished results).

Similar to our findings in Moroccan Mediterranean waters, Farjallah et al. (2008b) detected only *A. pegreffii* in their study of *Anisakis* species in 13 *S. japonicus* specimens from Tunisian Mediterranean waters (Kelibia), while Abollo et al. (2003) reported 83.3% *A. pegreffii* larvae and 16.7% hybrids in mackerel from Spanish Mediterranean waters. However, our results for *A. simplex* s.s. in mackerel from the Moroccan Atlantic differed from findings by Farjallah et al. (2008a) of 15.4% *A. simplex* s.s. larvae and 7.7% hybrids in mackerel from the Atlantic coast off Tangiers.

Only 5.5% (26/477) of the total number of larvae isolated were found in muscle. Suzuki et al. (2010) reported that *A. pegreffii* has a lesser capacity to penetrate fish muscle in comparison to *A. simplex* s.s, which may help to explain this low prevalence.

With regard to the analysis of risk factors, the likelihood that mackerel caught in Moroccan waters were parasitized by *A. simplex* s.l. depended on the weight of the fish and its gonads and the catch area and season, but not on the sex of the fish ( $p=0.37$ ). Cremonte and Sardella (1997) and Silva and Eiras (2003) also found no significant relationship between parasitism by *Anisakis* spp. and the sex of mackerels caught in Argentinean waters. According to our multivariate model, the risk of parasitization

increases by 2% per gram fish weight. The risk also increases gradually with fish length, because the high correlation between fish length and weight means that a model can be constructed with either variable (but not both together). We depict here the model with fish weight, which is more readily evident to the consumer at the time of purchase. The association between length and *Anisakis* parasitization was previously reported. A significant correlation between these variables was found by Cremonte and Sardella (1997) in *S. japonicus* from Argentinean waters and by Gutiérrez-Galindo et al. (2010) in a closely related species (*S. scombrus*) from Spanish Mediterranean waters (Tarragona). An increase in *Anisakis* prevalence with greater length has been reported in various fish species (McGladdery and Burt, 1985; Takao, 1990; Valero et al., 2006).

This relationship can be explained by the accumulation of parasites over the life of the fish, as proposed by Bahar et al. (2007) and Bussmann and Enrich (1979), but differences in prey selection at different sizes may also play a role.

In our multivariate model, the risk of parasitization increased by 28.0% per gram gonad weight. According to Durif et al. (2000), there is an increase in the gonadosomatic index (determined by gonad weight and total weight) when the fish prepares for reproduction. The main proportion of its energy is devoted to this process, to the detriment of other physiological functions, including immune defense, increasing vulnerability to parasitic infections. Liver weight did not enter our multivariate model due to its strong correlation with total weight, which was again selected for the model as the more relevant variable for consumers.

For the same total weight, gonad weight, and catch season, the risk of parasitization by *A. simplex* s.l. was more than threefold greater in Atlantic than in Mediterranean waters, consistent with findings on the prevalence of *Anisakis* in other species (Adroher et al., 1996; Valero et al., 2000, 2006). The parasitization risk also varied with the catch season ( $p=0.03$ ), being threefold higher in winter and autumn than in spring or summer for the same total weight, gonad weight, and catch area. Akmirza (2003) reported that the prevalence of infection by *A. simplex* s.l. was higher in mackerel from two areas of Turkey during the spring (77.3% and 12.5%) than during the summer (9.1% and 4.1%). In contrast, a study in the Spanish Mediterranean by Gutiérrez-Galindo et al. (2010), found a higher prevalence in mackerel during the summer (19.6% and 14.3%) than during the

winter (7.0% and 8.1%), although they observed no correlation between catch month and infection in *S. scombrus*. Seasonal variations may be explained by differences in the prey consumed by the fish at distinct times of the year. Thus, Castro and Santana del Pino (1995) found that the stomach contents of mackerel caught in the Canary Islands were influenced by the season and habitat. Seasonal fluctuations in the quality and quantity of plankton may also play a role (Cognetti, 2001).

The odds of the presence of *A. simplex* s.l. in the muscle of these mackerel rose by 1% per gram of total fish weight and by 52% for every *Anisakis* present in the whole fish. One explanation may be that the increase in weight would be accompanied by an increase in muscle fat, to which more larvae would migrate, since Smith (1983) found that *Anisakis* larvae migrate towards the muscle in fatty species.

The relatively low prevalence of *Anisakis* in the muscle is of major health interest because fish muscle is preferentially consumed, implying that there are less probabilities of human infection. With regard to the choice of fish, although the prevalence of *Anisakis* was higher in mackerel caught in Atlantic than Mediterranean Moroccan waters, the risk of finding the parasite in muscle did not differ between them, which may be due to their similar parasitization intensity and diversity of parasite species. According to our study, a useful prophylactic method against anisakiasis would be to select fish of lower weight.

## Acknowledgments

We are grateful to the “Junta de Andalucía” by the project P07-CVI- 03249.

## 4. References

- Abollo, E., Paggi, L., Pascual, S., D’Amelio, S., 2003.** Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infection, Genetic and Evolution*, 3, 175–81.
- Adroher, F. J., Valero, A., Ruiz-Valero, J., Iglesias, L., 1996.** Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). *Journal of Parasitology Research*, 82, 253–256.

- Akmirza, A., 2003.** Distribution of parasite fauna of chub mackerel in Aegean and Mediterranean Sea. *Journal of Turkish Marine Sciences*, 9, 187–195.
- Audicana, M. T., Ansotegui, I. J., Fernández de Corres, L., Kennedy, M.W., 2002.** *Anisakis simplex* dangerous dead and alive? *Journal of Trends Parasitology*, 18, 20–5.
- Audicana, M. T., Kennedy, M.W., 2008.** *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. *Clinical Microbiological Reviews*, 21, 360–379.
- Bahar, I., Chennubhotla, C., Tobi, D., 2007.** “Intrinsic Enzyme Motions in the Unbound State and Relation to Allosteric Regulation”. *Current Opinion in Structural Biology*, 17, 633–640.
- Bush, A., Kevin, D. L., Lotz, J., Shostak, A., 1997.** Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al., revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575–583.
- Bussmann, B., Ehrich, S., 1979.** Investigations on infestation of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) with larval *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridida). *Archiv für Fischereiwissenschaft*, 29, 155–165.
- Castro, J.J., Santana del Pino, A., 1995.** Feeding preferences of *Scomber japonicus* in the Canary Islands area. *Scientia Marina*, 59, 325–333.
- Cognetti, G., 2001.** Ecological research and conservation of coastal ecosystems. Special issue. Foreword. *Journal of Aquatic Conservation*, 11, 231.
- Costa, G., Pontes, T., Mattiucci, S., D’Amelio, S., 2003.** The occurrence and infection dynamics of *Anisakis* larvae in the black-scabbard fish, *Aphanopus carbo*, chub mackerel, *Scomber japonicus*, and oceanic horse mackerel, *Trachurus picturatus* from Madeira. Portugal. *Journal of Helminthology*, 77, 163–166.
- Cremonte, F., Sardella, N. H., 1997.** The parasito fauna of *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782. (Pisces: Scombridae) in two zones of the Argentine Sea. *Fisheries Research*, 31, 1–9.
- D’Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, C. P., Pugachev, O. N., Webb, S. C., Picanco, M., Paggi, L., 2000.** Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase

- chain reactionbased restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology*, 30, 22–36.
- De Corres, F. L., Audicana, M. T., Del Pozo, M. D., Muñoz, D., Fernandez, E., Navarro, J. A., 1996.** *Anisakis simplex* induces not only anisakiasis: report of 28 cases of allergy caused by this nematode. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 6, 315–319.
- Durif, C., Elie, P., Dufour, S., Marchelidon, J., Vidal, B., 2000.** Analysis of morphological and physiological parameters during the silvering process of the European eel (*Anguilla anguilla*) in the lake of Grand-Lieu (France). *Cybio, International Journal of Ichthyology*, 24, 63–74.
- Farjallah, S., Busi, M., Mahjoub, M. O., Slimane, B. B., Paggi, L., Said, K., D’Amelio, S., 2008 a.** Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of the Moroccan and Mauritanian coasts. *Journal of International Parasitology*, 57, 430–436.
- Farjallah, S., Slimane, B. B., Busi, M., Amor, N., Blel, H., Said, K., D’Amelio, S., 2008 b.** Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from North African coast of Mediterranean Sea. *Parasitology Research*, 102, 371–379.
- Hartwich, G., 1974.** Keys to genera of the Ascaridoidea. Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal, Bucks, U.K., p. 1–15.
- Houttuyn, 1782.** (Pisces: Scombridae) in two zones of the Argentine sea. *Fisheerie Research*, 31, 1–9.
- Gutiérrez-Galindo, J. F., Osanz Mur, A. C., Mora-Ventura, M.T., 2010.** Occurrence and infection dynamics of anisakid larvae in *Scomber scombrus*, *Trachurus trachurus*, *Sardina pilchardus*, and *Engraulis encrasicolus* from Tarragona (NE Spain). *Journal of Food Control*, 21, 1550–1555.
- Kamili, A., 2006.** Bio-economie et gestion de la pecherie des petits pélagiques: Cas de l’Atlantique Marocain. Tesis de doctorado en ciencias en Universidad Autónoma de Barcelona, pp. 91.



- Kijewska, A., Słomińska, M., Węgrzyn, G., Rokicki, J., 2000.** A PCR-RFLP assay for identification of *Anisakis simplex* from different geographical regions. *Journal of Molecular and Cellular Probes*, 14, 349–354.
- Koie, M., 1993.** Nematode parasites in teleosts from 0 to 154 m depth off the Faroe Islands (The North Atlantic). *Journal of Ophelia*, 38, 217–243.
- Lloris, D., Matallanas, J., 2003.** Description of a new species of hake: *Merluccius patagonicus* sp. nov. (Gadiformes, Merlucciidae) from the waters of Argentina. *Scientia Marina*, 67, 323–326.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Cianchi, R., Paggi, L., Arduino, P., Margolis, L., Brattey, J., Webb, S.C., D'Amelio, S., Orecchia, P., Bullini, L., 1997.** Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Journal of Parasitology*, 83, 401–416.
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Abollo, E., Webb, S. C., Pascual, S., Cianchi, R., Bullini, L., 2001.** Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *International Journal for Parasitology*, 31, 9–14.
- 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., Paoletti, M., 2009.** *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationship between congeners ecological data. *Journal of Systematic Parasitology*, 74, 199–217.
- McGladdery, S. E., Burt, M. D. B. 1985.** Potential of parasites for use as biological indicators of migration, feeding, and spawning behaviour of northwestern Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 1957–1968.

- McGladdery, S. E., 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, 1312–1317.
- Martin-Sánchez, J., Artacho-Reinoso, M. E., Diaz-Gavilan, Mi., Valero-Lopez, 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. Journal of Molecular and Biochemical Parasitology, 141, 155–162.
- Meter, A.J., Maillard, C., 1989.** Larves d'ascarides parasites de poissons en Méditerranée occidentale. Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle Paris, 4, 347–69.
- Cisse, M., Belghyti, D., 2005a.** Helminthes parasites of chub mackerel *Scomber japonicus* (Houttuyn, 1782) from the harbour of Mehdiya–Kenitra (Atlantic coast of Morocco). *The Journal of Aquatic Science*, 20, 63–67.
- Cisse, M., Belghyti, D., 2005b.** L'ichtyopathologie pour une amélioration qualitative des statistiques des maquereaux au Maroc. Journal de Biologie & Santé, 5, 225–232.
- Petter, J. A., Maillard, C., 1988.** Larves d'Ascarides parasites de Poissons en Méditerranée Occidentale. Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle, 10, 347–369.
- Pontes, T., D'Amelio, S., Costa, G., 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. Journal of Parasitology, 91, 1430–1434.
- Silva, M. E. R., Eiras, J.C., 2003.** Occurrence of *Anisakis* sp. In fishes off the Portuguese West coast and evaluation of its zoonotic potential. Bulletin of European Association of Fish Pathology, 23, 13–17.
- Smith, J.W. 1983.** *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809), det, (Krabbe, 1978) (Nematoda: Ascaridoidea): morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life history and ecology. Journal of Helminthology, 57, 205–224.
- 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.

- Takao, Y., 1990.** Survey of Anisakidae larvae from marine fish caught in the sea near Kyushu Island. In: Ishikura, H., Kikuchi, K. (Eds.), Intestinal anisakiasis in Japan. Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. Springer-Verlag, Tokyo, pp. 61–72.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Matsui, T., Araki, J., Uchida, A., 2006.** Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitology International*, 55, 267–71.
- 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., Martín-Sánchez, J., Reyes-Muelas, E., 2000.** Larval Anisakids parasitizing the blue whiting *Micromesistius poutassou* from Motril bay in the Mediterranean of Southern Spain. *Journal of Helminthology*, 74, 361–364.
- Valero, A., López-Cuello, M., Benítez, R., Adroher, F. J., 2006.** *Anisakis* spp. in European hake, *Merluccius merluccius* (L.) from the Atlantic off north-west Africa and the Mediterranean off southern Spain. *Acta Parasitology*, 51, 209–12.
- Yoshinaga, T., Ogawa, K., Wakabayashi, H., 1987.** Experimental life cycle of the *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in fresh water. *Journal of Fish Pathology*, 22, 243–51.
- Zhu, X., Gasser, R. B., Podolska, M., Chilton N., 1998.** Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 28, 1911–21.

**Prevalence and risk factors of infection by *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in *Trachurus trachurus* from northern Morocco**

**Resumen**

Se han estudiado los parámetros de infección por *Anisakis* en jureles (*Trachurus trachurus*) de dos áreas del norte de Marruecos (Tetuán y Tánger), obteniendo un 54.9% de prevalencia general. La identificación por la técnica de PCR-RFLP del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 reveló *A. pegreffii* como especie dominante y no se detectó *A. simplex* s.s. La presencia de *A. pegreffii* en los jureles capturados en aguas marroquíes no está influida por el sexo de los peces ( $p=0.46$ ) ni por el área de captura atlántica o mediterránea ( $p=0.52$ ). Por el contrario, actúan como factores de riesgo de infección general del jurel la longitud/peso del mismo, el peso del hígado y el peso de las gónadas como características propias del pez y la estación del año como característica de la captura ( $p<0.05$ ). La baja prevalencia en musculatura (8.6%) e intensidad media (1) detectadas pueden estar relacionadas con el menor poder de penetración en músculo de *A. pegreffii*. Por otro lado, el riesgo de presencia de larvas en músculo es máximo durante la estación más calurosa, el verano, siendo 5 veces mayor que en el resto de las estaciones. Con vistas a minimizar riesgos de infección en personas susceptibles se podría evitar el consumo de jureles de mayor peso durante el verano.

**Palabras clave:** *Anisakis pegreffii*, riesgo de infección, *Trachurus trachurus*, norte de Marruecos

In press in the Parasitology research

## Abstract

The parameters of *Anisakis* infection were studied in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from two areas of northern Morocco (Tetouan and Tangier), obtaining a result of 54.9% general prevalence. Identification via the technique of PCR-RFLP of the ITS1-5.8S-ITS2 fragment revealed *A. pegreffii* as the dominant species and *A. simplex* s.s. was not detected. The presence of *A. pegreffii* in horse mackerel caught in Moroccan waters is not influenced by the sex of the fish ( $p=0.46$ ), nor by the catch area being Atlantic or Mediterranean ( $p=0.52$ ). On the other hand, the following do act as risk factors for the general infection of horse mackerel: as characteristics of the fish itself, fish length/weight, liver weight and gonad weight; and as a characteristic of its capture, the season ( $p<0.05$ ). The low prevalence in musculature (8.6%) and average intensity (1.0) detected may be related to *A. pegreffii* being less able to penetrate muscle. Moreover, the risk of the presence of larvae in muscle is at its highest during the hottest season, summer, when it is 5 times higher than in any other season. With view to minimizing risks of infection in susceptible persons, one could avoid eating horse mackerel of a higher weight during the summer months.

**Keywords:** *Anisakis pegreffii*, risk of infection, *Trachurus trachurus*, northern Morocco

## 1. Introduction

The fishing industry in Morocco has undergone a huge increase in recent years, to the point where its estimated production potential is approximately 1.5 million tons a year, making it the biggest producer of fish in Africa, supplying 1.2% of world production (FAO 2001). However, despite the economic importance of marine produce for this country, until now little attention has been paid to the subject of parasitism, a common phenomenon in aquatic systems which in some cases can constitute economic and health problems. Among the parasites that are causing these problems are the *Anisakis* species, nematodes whose adults are found in marine mammals and whose third stage (L3) larvae are found in crustaceans, squid and a large variety of fish. Man is an accidental host, since the life cycle of this parasite takes place in a marine environment and therefore it has not evolved to pass through human beings. *Anisakis* infection in fish creates aesthetic problems, as its larvae, which are visible to the naked eye, will lead consumers to reject the produce, which results in financial losses. The health problems it poses are no less important, since *Anisakis* larvae can cause not only infection of the human digestive tract, resulting in lesions, but also allergic reactions, through eating parasitized fish and to a lesser degree through contact, inhalation or cross-reactivity with allergens of other organisms. (Daschner et al. 2000; Rodero et al. 2005; Scala et al. 2001; Solas et al. 2009).

Previous studies have highlighted the presence of *Anisakis* spp. in fish from both the Mediterranean and Atlantic coasts of Morocco (Abattouy et al 2011; Cissé and Belghyti, 2005; Farjallah et al. 2008; Kijewska et al. 2009; Mattiucci et al. 2001; Shukhgalter, 2004). Horse mackerel (*Trachurus trachurus*) figures as one of the most commonly eaten fish among the Moroccan population, with a maximum quota of 414,000 tons in 2006 compared to 200,000 tons in 2003 (FAO 2008). For all these reasons, we believe it to be of interest to carry out epidemiological studies on this species of fish with view to determining the factors associated with infection and the genetic identification of the *Anisakis* species involved in the parasitization.

## 2. Material and methods

### *Host*

We studied 257 horse mackerels caught off the Moroccan coast in 2007 and 2008 during the different seasons of the year: 125 specimens (48.6%) from the maritime area of Tetouan (Mediterranean) and directly obtained from fishing craft at M'diq port, and 132 fish (51.4%) from Atlantic waters of Tangier and directly obtained from fishing craft at Tangiers port. The fish were measured and weighed. After dissection, the sex was determined, and the viscera and epaxial and hypaxial muscles were removed, weighed and separately subjected to digestion in pepsin/HCl solution according to the method of McGladdery (1986) at pH 2-2.3 and 36° C for 3 h. The resulting digestion liquid was examined under microscope on Petri dishes to detect and recount the larvae.

### *Parasite*

Isolated *Anisakis* spp. larvae were washed in 0.9% NaCl solution and rinsed in 70% alcohol and glacial acetic acid for microscopic observation and morphological study following the criteria of Hartwich (1974), Kjøie (1993) and Petter and Maillard (1988), mainly: a) Presence of boring tooth at anterior end; b) Oesophageal ventricle in first third of the parasite and posterior end of the larva, which differ between morphotypes I and II. Larvae were then individually preserved in labeled Eppendorf tubes at -20° C.

### *Quantitative epidemiology*

We calculated the prevalence, mean abundance and intensity of infection as defined by Bush et al. (1997). Differences among prevalence values were evaluated by using the chi-square test or Fisher's test. These differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ .

### *Genetic analysis of parasites for species identification*

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 A (forward): 5' GTC GAA TTC GTA GGT GAA CCTBGCG GAA GGA TCA-3' and B (reverse): 5' GCC GGA TCC GAA TCC TGG TTA GTT TCT TTT CCT 3', reported by D'Amelio

et al. (2000), and 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/ $\mu$ l restriction enzymes Hinf I (Bioron international), Taq I (Bioron international), and Cfo (Roche). The digestion product was subjected to 3% agarose gel electrophoresis for species identification according to the band pattern (D'Amelio et al. 2000; Kijewska et al. 2000; Martín-Sánchez et al. 2005; Pontes et al. 2005; Umehara et al. 2006).

#### *Risk factor analysis*

The following variables were considered as potential risk factors for infection with *Anisakis simplex* s.l.: sex, weight, length, gonad weight, and liver weight of the fish and the catch area and season. Univariate and multivariate logistic regression analyses were performed, considering total parasitization and muscle parasitization as dependent variables and the above factors (and parasitic load) as independent variables. The multivariate model was constructed by using a stepwise approach, selecting variables according to the statistical significance of their association with parasitization. The goodness of fit of the model was evaluated by using the coefficient of determination  $R^2$  and by graphical representation of the residuals. The possible collinearity of predictor variables was tested by calculating the Pearson correlation coefficient for pairs of variables. We also controlled for possible confounders and for interactions among predictors. SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL) was used for the data analyses.

### **3. Results**

#### *Host*

The study group consisted of 257 horse mackerel taken from the Moroccan coast, measuring between 14.4 and 30.0 cm in length (average length 21.3 cm) and with weight varying from 24.4 to 231.4 g (average weight 92.2 g). In terms of sex, there were 133 males (51.8%) and 124 females (48.2%). The number of horse mackerel studied in each of the four seasons was 69 (26.8%) in autumn, 65 (25.3%) in summer, 60 (23.3%) in spring and 63 (24.5%) in winter.



### *Quantitative Epidemiology*

*Anisakis* type I larvae were found in 54.9% of the fish studied, with an average intensity and abundance of 3.3 and 1.8 respectively. In musculature, only 22 larvae were detected of the 471 isolated; in this location the parameters of infection were found to be lower: 8.6% prevalence and 0.1 average abundance, whilst average intensity was 1, i.e. one larva for each parasitized horse mackerel. The highest number of parasites was obtained from the abdominal cavity of the hosts, with a prevalence of 45.5% (range 0-26 larvae) and average intensity and abundance of 3.3 and 1.5 respectively.

Furthermore, in the two fish populations from the Moroccan coast which were analysed, the infection parameters were similar ( $p=0.52$ ), thus in those caught in the Atlantic we found a prevalence of 56.8% and an average abundance and intensity of parasitization of 1.9 and 3.3 respectively, and in the horse mackerel from the Mediterranean coast, the prevalence was 52.8% and average abundance and intensity were 1.8 and 3.4 respectively. With regard to the seasons, the highest number of parasitized fish was found in autumn (73.9%) and the lowest in winter (15.9%); however, the highest prevalence in musculature was obtained in summer (18.5%) and the lowest, which was zero, in winter (Tables 1 and 3).

### *Identification by PCR-RFLP*

The parasites collected from the horse mackerel were morphologically classified as *Anisakis* type I L<sub>3</sub> larvae, and were subsequently specifically identified by genetic markers via PCR of the ribosomal ITS1-5,8S-ITS2 fragment. This analysis was performed on 110 larvae selected at random, representing 23.4% of the total number of larvae extracted from horse mackerel (471). In accordance with the results obtained with the two enzymes used and based on the restriction patterns described by D'Amelio et al. (2000) and Martín-Sánchez et al. (2005), we can confirm that of the larvae collected from *T. trachurus* from both sampled areas of the Moroccan coast, 87.3% (96/110) correspond to *A. pegreffii* and the rest (14/110) were hybrid genotypes, of which 85.7% (12/14) were hybrids with only one of the 2 restriction enzymes (Hinf I and Taq I) which allow us to distinguish between *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii*, whilst with the other they are *A. pegreffii*. One of these hybrids found in horse mackerel from the Atlantic was sequenced

and showed a C/T transition in position 251 and a T in position 271, which are the two fixed differences between these two species.

#### *Analysis of risk factors*

In the analysis of the factors associated with the general parasitization of the horse mackerel by *A. pegreffii* we found that the sex of the fish and the catch area are the only independent variables which had already shown their lack of association in the univariate analyses. Association was found, however, with total weight, length, liver weight and gonad weight, as characteristics of the fish itself, and with season, as a characteristic of its capture (Table 1).

The variables of total weight and liver weight are strongly correlated (Pearson correlation 0.6), as are total weight and gonad weight (Pearson correlation 0.6). This circumstance will not permit total weight to coexist with liver weight and gonad weight within the same multivariate model. Tables 2a and 2b show the two multivariate models derived from these correlations, one with fish weight and the other with liver and gonad weight. By the same token, the size and weight of the host are two strongly correlated parameters (Pearson correlation 0.9), and for this reason, one of them is excluded from the model. We preferred to use weight as this is easier for the consumer to determine.

When the presence of *A. pegreffii* in the musculature of horse mackerel is analysed, the univariate analysis shows that sex, liver weight and catch area are not associated. On the other hand, the number of larvae found in the fish, and characteristics of the fish such as length, total weight and gonad weight, along with the season in which they are caught (summer as opposed to other seasons) are associated with the presence of L3 larvae in the musculature of horse mackerel caught in Moroccan waters (Table 3). Some of these lose their significance in the multivariate model, in which only season ( $p < 0.01$ ) and the *Anisakis* parasite load ( $p < 0.01$ ) are associated with the presence of this parasite in the musculature (Table 4).

**Table 1. Univariate logistic regression analysis of factors associated with the presence of *A. pegreffii* larvae in horse mackerel caught in Moroccan waters. Variable dependent: presence/absence of *A. pegreffii*. N: number of host examined; P: prevalence of *A. simplex* s.l; OR: odds ratio, p: degree of signification.**

Variables	N	P	OR	p
Length	257	54.9%	1.03	<0.01
Total weight(g)	257	54.9%	1.02	<0.01
Sex				
Female (ref)	124	57.3%	-	-
Male	133	52.6%	0.83	0.46
Catch area				
Mediterranean (ref)	125	52.8%	-	-
Atlantic	132	56.8%	1.18	0.52
Season				<0.01
Winter (ref)	63	15.9%	-	-
Spring	60	56.7%	6.93	<0.01
Summer	65	70.8%	12.83	<0.01
Autumn	69	73.9%	15.02	<0.01
Liver weight	257	54.9%	3.28	<0.01
Gonad weight	257	54.99%	2.03	<0.01

**Table. 2a. Multivariate logistic regression analysis of factors associated with the presence of *A. pegreffii* larvae in horse mackerel caught in Moroccan waters: multivariate model with liver and gonad weight,  $R^2=0.406$ . Variable dependent: presence/absence of *A. pegreffii* in horse mackerel. N: number of host examined; OR: odds ratio, p: degree of significance**

Variables (N)	N	OR (95%CI)	p
Liver weight (g)	257	2.15 (1.40-3.32)	0.01
Gonad weight (g)	257	1.51 (1.03-2.22)	0.04
Season			<0.01
Winter (ref)	63	-	-
Spring	60	5.52 (2.10-14.52)	<0.01
Summer	65	11.79 (4.48-31.04)	<0.01
Autumn	69	14.99 (5.72-39.33)	<0.01

**Table. 2b. Multivariate logistic regression analysis of factors associated with the presence of *A. pegreffii* larvae in horse mackerel caught in Moroccan waters: multivariate model with fish weight,  $R^2=0.377$ . N: number of host examined; OR: odds ratio, p: degree of significance**

Variables	N	OR (95%CI)	p
Total weight (g)	257	1.02 (1.01-1.03)	<0.01
Season			<0.01
Winter (ref)	63	-	-
Spring	60	6.05 (2.48-14.74)	<0.01
Summer	65	7.93 (3.21-19.57)	<0.01
Autumn	69	11.06 (4.55-26.93)	<0.01

**Table 3. Univariate logistic regression analysis of factors associated with the presence of *A. pegreffii* larvae in muscle of horse mackerel caught in Moroccan waters. Variable dependent: presence/absence of *A. pegreffii* in in the muscle of *T. trachurus*, N: number of host examined; P: prevalence; OR: odds ratio, p: degree of signification.**

Variables	N	P	OR	p
Length	257	8.6%	1.02	0.01
Total weight (g)	257	8.6%	1.01	0.01
Sex				
Female (ref)	124	9.7%	-	-
Male	133	7.5%	0.76	0.54
Catch area				
Mediterranean (ref)	125	9.6%	-	-
Atlantic	132	7.6%	0.77	0.56
Season				0.19
Spring (ref)	60	6.7%	-	-
Summer	65	18.5%	3.17	0.06
Autumn	69	8.7%	1.33	0.67
Winter	63	0%	0.00	1
Liver weight	257	8.6%	1.28	0.25
Gonad weight	257	8.6%	1.39	0.01
Total N of parasites	257	8.6%	1.36	<0.01

**Table 4. Factors associated with the presence of *A. pegreffii* larvae in the muscle of mackerel caught in Moroccan waters,  $R^2=0,293$ . Variable dependent: presence/absence of *A. pegreffii* in the muscle of *T. trachurus*. OR: odds ratio, p: degree of signification**

Variables	N	OR (95%CI)	p
Season			
Spring+Autumn+Winter(ref)	192		
Summer	65	5.17 (1.87-14.25)	0.01
<i>Anisakis</i> total	257	1.38 (1.19-1.59)	<0.01

#### 4. Discussion:

*T. trachurus* is generally a zooplanktivorous fish whose diet mainly consists of pelagic crustaceans (especially euphausiids and mysids) (Santic et al. 2005), organisms which can play a part in the *Anisakis* spp. cycle, thus favouring the infection of horse mackerel. Our results show that *A. pegreffii* is the dominant *Anisakis* species in horse mackerel caught on both the Atlantic and Mediterranean coasts of Morocco, and that no specimens of *A. simplex* s.s. were found.

Indeed, Mattiucci and Nascetti (2008) consider that although *A. simplex* s.s. is widely distributed in the eastern Atlantic, its southern limits in this part of the ocean are the neighbouring waters of the straits of Gibraltar. *A. pegreffii*, on the other hand, has its northern distribution limits in Atlantic waters along the coastline of northern Spain, this being the dominant species in the Mediterranean Sea (Mattiucci and Nascetti 2008). In horse mackerel caught in Tangier waters (Moroccan Atlantic), Farjallah et al. (2008) found larvae percentages of 78.6% *A. pegreffii*, 14.3% *A. simplex* s.s. and 7.1% hybrids, and in horse mackerel caught in Casablanca waters (Moroccan Atlantic) they found 90% *A. pegreffii* and 10% hybrid genotypes, these latter percentages being more similar to our own figures.

The prevalence figures for parasitization by *A. pegreffii* of horse mackerel caught in the Atlantic and Mediterranean waters of Morocco are similar, both when we analyse the total parasitization of the fish and only the musculature. Of the total larvae isolated, only 4.7% (22/471) were found in the musculature. The low number of larvae found in this location could be interpreted as a sign that *A. pegreffii* is less able to enter the

musculature of the fish, as is suggested by Suzuki et al. (2010) and Quiazon et al. (2011), indicating that *A. pegreffii* has less penetrative power in fish musculature than *A. simplex* s.s. This point may be of particular relevance, since in both the Atlantic and Mediterranean waters of Morocco this species is the most prevalent, which would imply a lower risk to human health, given that it is the musculature of the fish which is consumed.

*A. pegreffii* presence in horse mackerel caught in Moroccan waters was not influenced by sex either, thus corroborating the results obtained by other authors for other species of fish (Cremonte and Sardella 1997; Silva and Eiras 2003) and our own results for *Scomber japonicus* (Abattouy et al. 2011). The risk of infection in horse mackerel, however, is twice as high per gram of increase in liver weight and 51% higher per gram of increase in gonad weight (Table 2a). Durif et al. (2000) point out that when the animal is preparing for reproduction there is an increase in the gonadosomatic index (which is defined by both parameters), and that during this period a large part of their energy is channelled into this process at the expense of other parasitic physiological functions; moreover, Jardas et al. (2004) observed that during the reproductive period of the horse mackerel, the intensity of ingestion decreases due to the important physiological changes which take place.

Fish weight is excluded from this model due to the strong correlation between this parameter and liver and gonad weight, although its influence can be seen in Table 2b: where the season is the same, for each gram of increase in fish weight, the risk of it being parasitized increases by 2% (Table 2b). The association between length/weight and parasitization has also been highlighted by other authors, such as Adroher et al. (1996), in horse mackerel caught in Spanish Mediterranean waters, Manfredi et al. 2000, in *T. trachurus* and *T. picturatus* from the Mediterranean and Abaunza et al. (1995), in horse mackerel caught in the Spanish Atlantic. In the case of *T. trachurus*, the association between these two variables does not appear to be attributable to the change in diet undergone by the fish, because although it includes the larvae of teleosts, normally the larval stages are not heavily parasitized, and the most important prey is still euphausiids in all sizes of horse mackerel (Bahar and Tuncay 2009). The association between these two variables could be better explained by the accumulation of parasites in the host over its lifetime (Bussman and Erish, 1979; Valero et al. 2000; Bahar et al. 2007).

*A. pegreffii* prevalence varies according to the catch season ( $p < 0.01$ ); all other variables included in the model being equal, the risk of infection by *A. pegreffii* in horse mackerel is at its highest in autumn and summer, followed by spring, and at its lowest levels in winter (Tables 2a and 2b).

These data agree with those of Manfredi et al. (2000), who recorded higher average prevalence and intensity values in horse mackerel caught in the Ligurian Sea (Mediterranean) in November (autumn) in comparison with other months. According to Smith and Wootten (1978), seasonal variations in levels of infection are probably due to a change in the population of infected euphausiids (intermediate hosts of these nematodes), or rather, it would also make sense to contemplate the relationship that exists between the feeding intensity of horse mackerel and parasitization by *Anisakis*. On this note, one would need to take into account the assertions of Jardas et al. (2004), who highlight that the lower ingestion levels in this fish are recorded at lower temperatures, i.e. in winter and early spring, which is in agreement with our results. On the other hand, the risk of presence of larvae in muscle is highest during the hottest season, summer, when it is 5 times higher than in other seasons. These findings may be related to the effect of temperature, stimulating the migration of the larvae to the muscle, as was detected by Hauck (1977) in the processing of fish via smoking, minimized in this case by the lesser penetrative power of *A. pegreffii*.

In summary, with view to minimizing the risk of infection in susceptible persons, one could avoid eating horse mackerel with higher weights during the summer, given that during this season, not only the risk of infection of the fish is at its highest, but also the risk of parasite presence in the muscle.

### **Acknowledgments**

To AECID (Agencia Española de Cooperación Internacional y Desarrollo) for project A/7211/06 and A.N.'s pre-doctoral grant. To the Junta de Andalucía by the project P07-CVI-03249.

## 5. 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. *Int J Food Microbiol* 150:136–139
- Abaunza P, Villamor B, Pérez JR (1995)** Infestation by larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridata) in horse mackerel, *Trachurus trachurus*, and Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*, in ICES Divisions VIIIb, VIIIc and IXa (N-NW of Spain). *Sci Mar* 59:223–233
- Adroher FJ, Valero A, Ruiz-Valero J, Iglesias L (1996)** Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). *Parasitol Res* 82:253–256
- Bahar I, Chennubhotla C, Tobi D (2007)** Intrinsic dynamics of enzymes in the unbound state and relation to allosteric regulation. *Curr Opin Struct Biol* 17:633–640
- Bahar B, Tuncay MS (2009)** Food and feeding habits of the Atlantic Horse Mackerel, *Trachurus trachurus*, from the Aegean Sea. *Zool Middle East* 46:47–54
- Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW (1997)** Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol* 83:575–583
- Bussmann B, Ehrich S (1979)** Investigations on infestation of blue whiting (*Micromesistius poutassou*) with larval *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridida). *Arch Fischereiwiss* 29:155–165
- Cissé M, Belghyti D (2005)** Helminths parasites of chub mackerel *Scomber japonicus* (Houttuyn, 1782) from the harbour of Mehdiya–Kenitra (Atlantic coast of Morocco). *J Aquat Sci* 20:63–67
- Cremonte F, Sardella NH (1997)** The parasitofauna of *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782 (Pisces: Scombridae) in two zones of the Argentine Sea. *Fish Res* 31:1–9
- 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, Cabañas 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 105:176–181
- Durif C, Élie P, Dufour S, Marchelidon J, Vidal B (2000)** Analysis of morphological and physiological parameters during the silvering process of the European eel (*Anguilla anguilla*) in the lake of Grand-Lieu (France). Cybium, Int J Ichthyol 24:63–74
- FAO (2001)** Report of the working Group on the assessment of small-pelagic fish off northwest Africa. FAO Fish. Rep 657, pp. 133
- FAO (2008)** Report of the working Group on the assessment of small-pelagic fish off northwest Africa. FAO Fish Aquaculture Rep 882, pp 117–118
- Farjallah S, Busi M, Mahjoub MO, Slimane BB, Paggi L, Said K, D'Amelio S (2008)** Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of the Moroccan and Mauritanian coasts. Parasitol Int 57:430–436
- Hartwich G (1974)** Keys to genera of the Ascaridoidea. In: Anderson RC, Chabaud A, Willmott S (eds) CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates. Part II. Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal, Bucks, England, pp. 1–15
- Hauck AK (1977)** Occurrence and survival of the larval nematode *Anisakis* sp- in the flesh of fresh, frozen, brined and smoked pacific herring, *Clupea harengus* Pallasi. J Parasitol 63:515–519
- Jardas I, Santic M, Pallaoro A (2004)** Diet composition and feeding intensity of horse mackerel, *Trachurus trachurus* (Osteichthyes: Carangidae) in the eastern Adriatic. Mar Biol 144:1051–1056
- Kijewska A, Słomińska M, Węgrzyn G, Rokicki J (2000)** A PCR-RFLP assay for identification of *Anisakis simplex* from different geographical regions. Mol Cell Probes 14:349–354
- Kijewska A, Burzyński A, Wenne R (2009)** Anisakid parasites of fishes caught on the African shelf. J. Parasitol 95:639–45

- Koie M (1993)** Nematode parasites in teleosts from 0 to 1540 m depth off the Faroe Islands (the North Atlantic). *Ophelia* 38:217–243
- Manfredi MT, Crosa G, Galli P, Ganduglia S (2000)** Distribution of *Anisakis simplex* in fish caught in the Ligurian Sea. *Parasitol Res* 86:551–553
- Martín-Sánchez J, Artacho-Reinoso ME, Diaz-Gavilan M, Valero-Lopez 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, 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). *Int J Parasitol* 31:9–14
- Mattiucci S, Nascetti G (2008)** Advances and trends in the molecular systematic of anisakid Nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Adv Parasitol* 66:147–148
- McGladdery SE (1986)** *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) infection of the musculature and body cavity of Atlantic herring (*Clupea harengus harengus*). *Can J Fish Aquat Sci* 43:1312–1317
- Petter JA, Maillard C (1988)** Larves d'ascarides parasites de poissons en Méditerranée Occidentale. *Bull Mus Natl Hist Nat Paris* 10:347–369
- Pontes T, D'Amelio S, Costa G, 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. *J Parasitol* 91:1430–1434
- Quiazon KMA, Yoshinaga T, Ogawa K (2011)** Experimental challenge of *Anisakis simplex* sensu strict and *Anisakis pegreffii* (Nematoda : Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitol Int* 60:126–131
- Rodero M, Chivato T, Muro A, Cuellar C (2005)** Enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot antibody determination in sera from patients diagnosed with different helminthic infections with *Anisakis simplex* antigen purified by affinity chromatography. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:293–301

- Santic M, Jardas I, Pallaoro A (2005)** Feeding habits of horse mackerel, *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758), from the central Adriatic Sea. *J Appl Ichthyol* 21:125–130
- Scala E, Giani M, Pirrotta L, Guerra EC, Cadoni S, Girardelli CR, De Pità O, Puddu P (2001)** Occupational generalized urticaria and allergic airborne asthma due to *Anisakis simplex*. *Eur J Dermatol* 11:249–250
- Shukhgalter OA (2004)** Parasite fauna of the chub mackerel (Scombridae: *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782) in the Central-Eastern Atlantic Ocean (The Atlantic coast of the North Africa and the Azores banks), *Parazitologiya* 38:160–170
- Silva MER, Eiras JC (2003)** Occurrence of *Anisakis* sp. in fishes off the Portuguese West coast and evaluation of its zoonotic potential. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 23:13–17
- Smith JW, Wootten R (1978)** *Anisakis* and anisakiasis. *Adv. Parasitol* 16:93–163
- 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. *J. Food Prot* 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. *Int J Food Microbiol* 137:88–93
- Umehara A, Kawakami Y, Matsui T, Araki J, Uchida A (2006)** Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol Int* 55:267–71
- Valero A, Martín-Sánchez J, Reyes-Muelas E (2000)** Larval Anisakids parasitizing the blue whiting *Micromesistius poutassou* from Motril bay in the Mediterranean of Southern Spain. *J Helminthol* 74:361–364
- Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton N (1998)** Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 28:1911–21

### III.2.Capitulo 2. Sensibilización de la población marroquí frente a *Anisakis*

#### Sensitization against *Anisakis* spp. of the population of Northern Morocco

##### Resumen

Con el objetivo de investigar la sensibilización de una población sana del norte de Marruecos frente a *Anisakis*, hemos estudiado los sueros de pacientes de las provincias Tetuán y Tánger, incluyendo una sub-población de pescadores del puerto de Tetuán. La edad de la población estudiada oscilaba entre 6 y 83 años.

Las técnicas ImmunoCAP e immunoblotting fueron empleadas para determinar la IgE específica y total y las pruebas chi-cuadrado y Fisher para analizar las relaciones entre las variables estudiados. Hemos encontrado una seroprevalencia del 5.1%, detectando una proporción elevada de sueros positivos en el intervalo de edad 31-43 años. La sensibilización no ha sido significativamente asociada con ninguno de los siguientes parámetros; el origen, el sexo, la ocupación o la edad de los individuos estudiados. En los sueros positivos a ImmunoCap, se han detectado por la técnica immunoblot numerosas bandas entre 7kDa y >209 kDa, con una predominancia de ~20 kDa – 24kDa. No obstante, ningún caso de anisakiosis humana fue reportado en Marruecos hasta la actualidad, parte de la población sana seleccionada en el norte de Marruecos muestra una sensibilización a las proteínas de *Anisakis*.

**Palabras clave:** *Anisakis*, Marruecos, sensibilización, IgE, alérgenos

Enviado al Journal of Helminthology

**Abstract**

In order to investigate the sensitization against *Anisakis* L3 larvae of a healthy population in Northern Morocco, we studied sera of patients from Tangier and Tetuan, including a sub-population of fishermen from Tetuan port. The age of the study population ranged from 6 to 83 yrs. ImmunoCAP and immunoblotting techniques were used to determine total and specific IgE values and the chi-square and Fisher's tests were applied to analyze relationships among study variables. A seroprevalence of 5.1% was found, detecting a higher percentage of positive sera in the 31-43-yr age group. Sensitization was not significantly associated with the origin, sex, occupation or age of the individuals studied. In sera positive by ImmunoCAP, immunoblotting studies detected numerous bands between 7kDa and >209 kDa, with a predominance of ~20kDa – 24kDa. Although no case of human anisakiasis has been reported in Morocco to date, part of a randomly selected healthy population in Northern Morocco shows sensitization to *Anisakis* proteins.

**Keywords:** *Anisakis*, Morocco, sensitization, IgE, allergens.

## 1. Introduction

Species of the *Anisakis simplex* complex are nematodes whose L3 larvae are parasites of numerous fish and cephalopods that form part of the human diet (Pereira Bueno, 1992, Ishikura et al., 1996). Inadvertent ingestion of the parasite by humans produces more or less severe gastrointestinal symptoms and allergic reactions that range from urticaria to anaphylactic shock (Del Pozo et al., 1997; Daschner et al., 2000). Cutaneous-mucosal exposure in fish-related workers can produce occupational allergies, including contact dermatitis, rhinoconjunctivitis and professional asthma (Armentia et al., 1998; Scala et al., 2001). Some populations may have developed a sensitization against *Anisakis*, given that specific IgE has been detected in individuals with no apparent symptoms. Possible causes of this sensitization include: 1) active infection after consuming raw parasitized fish; 2) consumption of raw, cooked or canned fish with a large amount of thermostable allergens; 3) frequent contact with parasite allergens among people working with fish or derivatives; and 4) cross-reactions with other nematodes that share antigens with *A. simplex* or with arthropods (crustaceans, insects, or mites) (Purello-D'Ambrosio et al., 2000; Fernández de Corres et al., 2001; Johansson et al., 2001; Caballero & Moneo, 2004; Rodero et al., 2005; Del Rey Moreno et al., 2006; Solas et al., 2009).

The few studies on the presence of these nematodes in fish from Morocco report a high *Anisakis* prevalence off its Atlantic and Mediterranean coasts (Mattiucci et al., 2001; Mattiucci et al., 2004; Cissé & Belghyti, 2005; Fajallah et al., 2008). It is widely acknowledged that intake of raw mackerel can lead to anisakiasis, and the consumption of marinated mackerel is one of the main causes of this infection in Japan (Suzuki et al., 2010). Our group found the mean parasitization prevalence in mackerel from Moroccan waters to be 62.4% (Abattouy et al., 2011), and this fish is frequently consumed in marinated form by part of the Moroccan population. The consumption of fresh fish is known to have increased in Morocco since the 1960s, especially in Mediterranean and North Atlantic areas (Hmida Atmani, 2003). However, data are lacking on the prevalence of human anisakiasis. With this background, the objective of the present study was to investigate the sensitization against *Anisakis* of a randomly selected sample of healthy individuals from the North Moroccan provinces of Tetuan and Tangiers.

## 2. Materials and methods

### *Study population*

We analyzed a total of 333 sera, obtained from patients attending public clinical analysis laboratories in Tetuan (n = 236; 132 females, 104 males) and Tangiers (n = 47; 24 females, 23 males) and from 50 males from Tangier in the fishing industry (risk population) provided by the general practitioner at the port. The age of the whole study population ranged from 6 to 83 yrs, with a mean age of 45 yrs for the 236 individuals from Tetuan and 45.9 yrs for the 97 from Tangier.

### *Determination of population sensitization against *Anisakis simplex* s.l.*

The sensitization against *Anisakis* was determined by using two different serum IgE detection methods: ImmunoCAP and an immunoblotting technique.

### *Determination of total and specific IgE against *Anisakis simplex* s.l. by ImmunoCAP*

The ImmunoCAP commercial kit (Phadia AB, Uppsala, Sweden) was used, following manufacturer's instructions, considering total IgE levels <25kU/l to be low and levels >100 kU/l to be high. A specific IgE value >0.35 kU/L was considered positive.

### *Detection of specific IgE by immunoblotting*

### *Larvae identification*

L<sub>3</sub> larvae of *Anisakis* were obtained from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) from the Northeast Atlantic and were subject to immunological study after morphological identification and study in accordance with Hartwich, 1974; Yoshinaga et al. 1987; Peter & Maillard 1988 and Koie, 1993.

### *Preparation of excretion-secretion antigens (ES)*

Live L<sub>3</sub> of *Anisakis* larva Type I were successively washed in phosphate-buffered saline (PBS) and then immersed in an antibiotic solution under sterile conditions for 30 min (Iglesias et al., 1997). Next, a total of 277 larvae/1.4 ml of sterile PBS were placed in a culture flask and maintained for 7 days at 37° C and 5% CO<sub>2</sub>. The supernatant was then

centrifuged at 4000 rpm for 30 min at 4° C and stored at -70° C until use. Its protein content was estimated by the Lowry method (Lowry et al., 1951)

### *Immunoblotting*

Protein electrophoresis (Laemmli, 1970) was conducted in Precise Protein Gels (Pierce Biotechnology Inc.) in gradient (4-20%) following manufacturer's instructions. Excretory-secretory (ES) antigens were mixed 1:1 with dissociation buffer heated at 90° C for 4 min, applying 40 µg/ sample well. The separated proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (0.22 µm pore) for 90 min at 40 V and 4° C using a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). After blocking with 5% w/v fat-free milk powder, membranes were placed in a Mini Protean II Multiscreen apparatus (Bio-Rad) and incubated overnight at 4° C with 600 µl of patient serum (1:5 dilution). After three washes, membranes were incubated with alkaline phosphatase-labelled monoclonal anti-human IgE; (Sigma-Aldrich) at 1:6000 dilution. Finally, the detection was carried out with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (Sigma-Aldrich) for 30 min.

### *Risk factors and statistical analysis*

Univariate and multivariate logistic regression analyses were used to investigate the association of patient characteristics (e.g., sex, age, occupation and origin), as independent variables, with sensitization against *Anisakis*, as dependent variable. Differences in prevalence among the different categories were examined by means of the chi-square ( $\chi^2$ ) or Fisher's exact test.  $P \leq 0.05$  was considered significant. SPSS 15.0 (SPSS, Chicago IL) was used for all data analyses.

## **3. Results**

Table 1 exhibits the characteristics (origin, sex, occupation and age) of the study population.

### *Determination of total and specific IgE by ImmunoCap®*

Positive results were obtained in 17 of the 333 sera tested by ImmunoCAP (5.1% seroprevalence): 13 from Tetuan (8 males and 5 females) and 4 from Tangier (2 males and 2 females; including the fishermen). Sera from the fishermen showed a positivity of



2%. The age of patients with positive sera ranged from 22 to 70 yrs, with a mean age of 38.4 yrs. The highest percentage of positive sera was detected in the 31-43 yr age group (Figure 1).

In these 17 positive sera, specific IgE levels were high in 23.5% (>3.5 to 17.5 kU/L), moderate in 41.2% (>0.7 to 3.5 kU/L) and low in 35.3% (>0.35 to 0.7 kU/L) (Table 2).

All positive sera showed markedly elevated total IgE (>5000 kU/L in some cases). In the *Anisakis*-negative sera, total IgE values were <100 kU/L in 62.4% and >100kU/L in 37.6%.

#### *Immunoblotting*

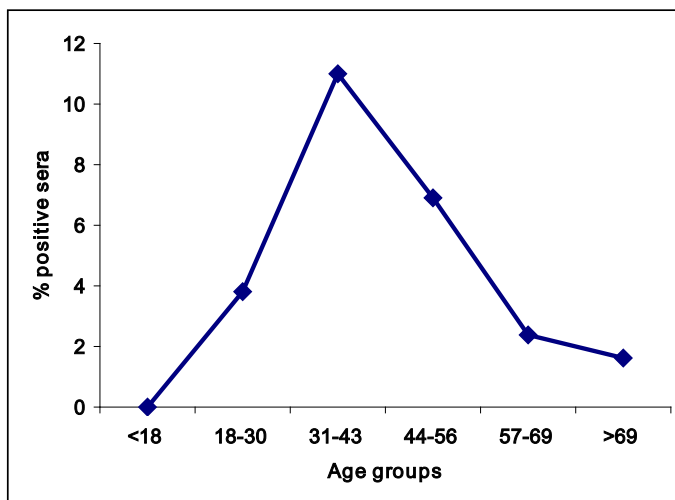
In general terms, a correlation was found between band intensities and ImmunoCAP-determined specific IgE values. In the immunoblotting, 3 of the 17 positive sera were negative, 5 showed around 20 bands, ranging from 7 to >209 kDa, and the remaining 9 showed two groups of bands: a low Mw group of bands (7 to 22 kDa) and a high-Mw group (80 to >209 kDa). Most of the blots showed strong bands between ~20kDa and 24 kDa and two showed a very strong band of ~ 40 kDa (Fig. 2).

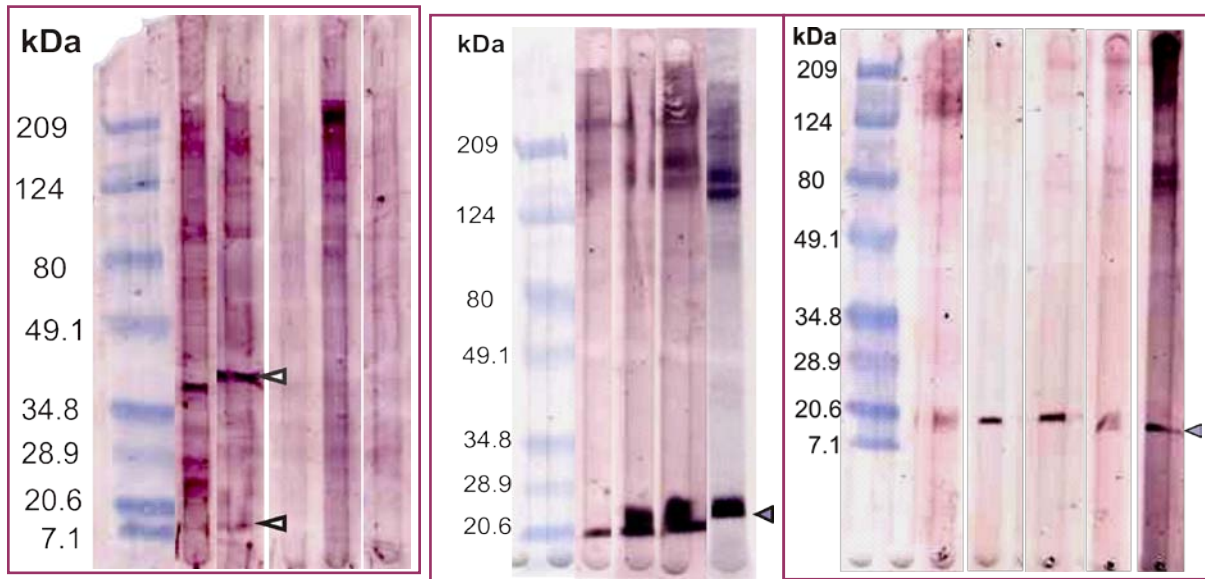
#### *Statistical analysis*

No significant associations were found between sensitization against *Anisakis* and sex (10/169 males, 7/164 females,  $p=0.47$ ), age ( $p=0.32$ ) or occupation ( $p=0.38$ ).

**Table 1. Characteristics of the study population.**

Parameters	No. (%) of patients	No. (%) positive patients	p value
Living area			(p=0.27)
Tangier	97 (29.1)	4 (4.1)	
Tetuan	236 (70.9)	13 (5.5)	
Sex			(p=0.47)
Male	177 (53.2)	10 (5.6)	
Female	156 (46.8)	7 (4.5)	
Occupation			(p=0.38)
Related to fishery	50 (15.0)	1 (2.0)	
Not related to fishery	283 (85.0)	16 (5.7)	
Age			(p=0.32)
<18 years	19	0 (0.0)	
18-30 years	80	3 (3.8)	
31-43 years	73	8 (11.0)	
44-56 years	58	4 (6.9)	
57-69 years	42	1 (2.4)	
>69 years	61	1 (1.6)	
Total	333	17 (5.1)	

**Fig.1. Distribution of positive sera by age group.**



**Fig.2.** Different patterns of IgE immunoblotting against type I *Anisakis simplex* ES antigens. Each lane has been probed with the serum of each patient. A: Blots showing bands between 7 and >209 kDa, 2 blots shows a strong band of ~ 40 kDa. (Arrowshead shows ~40 and ~9 kDa bands). B y C: Blots with two band's groups of high and low Pm. In all blots there is a band of ~ 20 kDa and three strong bands of them between ~20-24 kDa (arrows). The molecular weight markers are indicated on the left.

Table 2: Classes of specific IgE in the healthy population determined by ImmunoCap

Class of specific IgE (figure in kU/L)	Frequency	%
0 (<0.35)	316	94.9%
1 (>0.35 a 0.7 kU/L)	6	1.8%
2 (>0.7 a 3.5 kU/L)	7	2.1%
3 (>3.5 a 17.5 kU/L)	4	1.2%
<b>Total</b>	<b>333</b>	<b>100%</b>

#### 4. Discussion

Human anisakiasis is characterized by the production of IgE against somatic and ES parasite antigens, which can be detected by prick test, ELISA or immunoblotting, among other techniques (Lorenzo et al., 2000; Del Rey Moreno et al., 2008; Anadón et al., 2010). We used ImmunoCAP and immunoblotting to determine subclinical sensitization against Type I *Anisakis* in a randomly selected population from North Morocco aged over 6 years

and with no diagnosis of anisakiasis or allergy to *Anisakis*. A prevalence of 5.1% was detected by InmunoCAP (5.5% in Tetuan and 4.1% in Tangier), lower than values found in most healthy populations studied in neighbouring Spain, which also has Mediterranean and Atlantic coasts, with reports of 15.7%-11.7% in Madrid, central Spain (Fernández de Corres et al., 2001; Puente et al., 2008) and 22.1% in Southern Spain (Del Rey Moreno et al., 2006), although higher than the 0.43% found in Galicia, Northern Spain (Valiñas et al., 2001). This wide variation in results may be due to differences in the sensitivity of the techniques used to detect the specific IgE and to differences in risk factors, such as the fish species consumed, their origin, and the form of preparation, among others. Spain is a country with high fish consumption (85 g inhabitant /day), preferentially cooked, but there is a widespread habit of eating raw anchovies in vinegar (Repiso Ortega et al., 2003; González Quijada et al., 2005). In Morocco, there is also a high consumption of fresh fish usually cooked (Hmida Atmani 2003), but raw mackerel is also a popular dish, seasoned with lemon and spices.

The comparatively low sensitization of the Moroccan population may be related to cooking habits, the specific parasite species and the low prevalence in fish muscle. Our group detected a high prevalence of infection by *A. pegreffii* in mackerel caught in Waters off Northern Morocco (higher in the Atlántico (67.9%) than in the Mediterráneo (57.0%) (Abattouy et al., 2011). Other authors found mackerel from waters off Tangier to be predominantly parasitized by *A. pegreffii* larvae (79.6% vs. 15.4% by *A. simplex* s.s.) (Farjallah et al., 2008), as were mackerel from Spanish Mediterranean waters (16.7% *A. simplex* s.s. vs. 83.3% *A. pegreffii*) (Abollo et al., 2003). Hence, the low sensitization of our Northern Moroccan study population may be in part attributable to the lower pathogenic power of *A. pegreffii*. Suzuki et al., (2010) observed that this *Anisakis* species has a lower power of penetration into fish muscle in comparison to *A. simplex* s.s, which is a highly relevant observation, given that humans preferentially consume the muscle of the fish. Furthermore, this larva has lower capacity of fixation and penetration in the gastrointestinal tract, so that even when humans are infected, there may be a lesser likelihood of sensitization to the ES antigens it releases.

The age of sensitized patients ranged from 22 to 70 yrs, finding the highest proportion of sensitized individuals in the 31-43 yr age range and only a low percentage in those over 57 yrs of age (Fig. 1). Gastric acid secretion is known to decrease with age, which may

reduce the secretion of proteins secreted by the larva after gastric infection by *Anisakis*, (Moneo & Caballero 2002; Toro et al., 2004). It is also possible that continual contacts with *Anisakis* ES products throughout a lifetime may induce a modified Th2 response, leading to the development of IL-10-producing T reg cells. Their function is to modulate the immune response, which in some cases reduces the response to antigens, avoiding over-reactions that can be responsible for allergic or autoimmune symptoms. It has been reported that IL-10 acts on B lymphocytes, leading them to produce less specific IgE and more IgG4 (Maizels & Yazdanbakhsh 2003). A limitation of our investigation is that no data were available on the cooking habits or employment of the study population, precluding examination of the association of these variables with sensitization.

We highlight the low prevalence (2%) in the fishermen from Tangier port, which did not significantly differ from the prevalence in the rest of the series. Although we had considered them to be a risk group due to their continuous occupational contact with fish, they do not eviscerate or fillet specimens, unlike fishmongers and catering workers, who are known to suffer from asthmatic and contact dermatitis due to inhalation of and contact with parasite allergens (Scala et al., 2001; Nieuwenhuizen et al., 2006; Kirstein et al., 2010).

Specific IgE levels were high in only 23.5% of positive sera (>3.5-17.5 kU/L) but total IgE was high in all of them, reaching >5000 kU/L in some cases, while 37.6% of negative sera showed total IgE values >100 kU/L and none values > 5000 kU/L. The slightly elevated levels of total IgE in the negative sera may be due to allergic processes against other allergens or to infection with helminths that are not members of the Anisakidae family, such as *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, and *Ascaris lumbricoides*, among others, which are frequently detected in the Moroccan population (Jiménez Albarrán & Odda 1992; Amahmid & Bouhoum 2000; Habbari et al., 2000; Moubarrad & Assobhei 2007).

Our immunoblotting assays used laboratory-prepared ES antigens of type I *Anisakis simplex* (concentrations of 4.7 µg/µl), because the sensitivity and specificity of the technique were demonstrated to be higher with ES than somatic antigens (Baeza et al., 2004). A varied band profile was obtained, indicating sensitization to different allergens of the parasite (Fig. 2). Besides *A. pegreffii*, the predominant species in mackerel from

Moroccan waters, these individuals may have consumed fish infected with larvae of other anisakids associated with common allergens (Valero et al., 2003; Lozano et al., 2004). Two somatic allergens have been characterized in *Anisakis* spp., Ani s 2 (paramyosin, 97 kDa) (Pérez-Pérez et al., 2000) and Ani s 3 (tropomyosin, 41 kDa) (Asturias et al., 2000), which show significant homology with the proteins of various organisms and are present in helminths, being a cause of cross-reactions (Guarneri et al., 2007). The band of ~ 40 kDa detected in two blots may correspond to Ani s 3, which is a thermostable protein and may be responsible for allergic reactions in sensitized individuals after the consumption of cooked parasitized fish. Most of the blots showed bands between 20 kDa and 24 kDa, and some of these may correspond to the major thermostable allergen Ani s 1 (21 kDa), produced by the excretory gland of *A. simplex* (Moneo et al., 2000; Arrieta et al., 2000), or to the thermostable somatic or cuticular allergen Ani s 10, (22 kDa), (Caballero et al., 2011), these allergens are considered in the differential diagnosis of hypersensitivity reactions because they behave as food allergens in raw, cooked or canned fish (Caballero & Moneo 2002; Shimakura et al., 2004). Some of the present sera recognized low-Mw proteins (7-9kDa) that may correspond to minor ES allergens, i.e., protease inhibitors corresponding to Ani s 4 (9 kDa), which is thermostable, resistant to pepsin digestion and was the first nematode cystatin identified as a producer of human allergies, with a high diagnostic value (Moneo et al., 2005; Rodríguez Mahillo et al., 2007) and Ani s 6 (7 kDa) (Kobayashi et al., 2007; Anadón et al., 2009).

Three sera were positive by immunoCAP but negative by immunoblotting, which likely reflects an inadequate sensitivity of the immunoblotting technique, given that they were all classified as Class 1 by ImmunoCAP.

In conclusion, the present data indicate that anisakiasis is present in Morocco, although a low proportion of our study population showed sensitization against different somatic and cuticular proteins of the parasite and against those derived from their metabolism. The sensitization would be due to contact with the parasite, attributable to the high prevalence of parasitization in some fish species commonly eaten in the north of Morocco. No cases of human anisakiasis have been diagnosed in Morocco to date, which may result from the absence of specific symptoms and signs of the disease, which may produce confusion with other diseases with similar acute gastric or abdominal

symptoms. Moreover, allergic symptoms produced by *Anisakis* allergens can be confused with allergies to fish or other foods.

### Acknowledgements

The English translation was done by Mr. Richard Davies, MA. This survey has been funded by the grant from Junta de Andalucía (Spanish) nº P07-(CVI-03249). We are grateful to Dr. Hanie FASSI-FAHRI in providing serums from Tangier and Tetuan. Moroccan medical ministry has allowed the transfer of the Moroccan patient's sera to Spain.

### 5. References

- Abattouy, N., Valero, A., Benajiba, M.H., 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.
- Abollo, E., Paggi, L., Pascual, S. & 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 & Evolution* 3, 175–181.
- Amahmid, O. & Bouhoum, K. (2000)** Health effect of urban wastewater reuse in a peri-urban area in Morocco. *Environmental Management and Health* 11, 263–269.
- Anadón, A.M., Romarís, F., Escalante, M., Rodríguez, E., Gárate, T., Cuellar, C. & Ubeira, F.M. (2009)** The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clinical and Experimental Immunology* 156, 471-478.
- Anadón, A.M., Rodríguez, E., Gárate, M.T., Cuellar, C., Romarís, F., Chivato, T., Rodero, M., González-Díaz, H.& Ubeira, F.M. (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, 496-502.
- Armentia, A., Lombardero, M., Callejo, A., Martín Santos, J.M., Gil, F.J., Vega, J., Arranz, M.L. & Martínez, C. (1998)** Occupational asthma by *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102, 831-834.

- Arrieta, I., Del Barrio, M., Vidartem L., Del Pozom V., Pastor, C., González-Cabrero, J., Cárda, B., Rojo, M., Minués, A., Cortesano, I., Gallardo, S., Aceituno, E., Palomino, P., Vivanco, F. & Lahoz, C. (2000)** Molecular cloning and characterization of an IgE-reactive protein from *Anisakis simplex*: Ani s 1. **Molecular and Biochemical Parasitology** 107, 263-268.
- Asturias, J.A., Eraso, E., Moneo, I. & Martínez, A. (2000)** Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*?. *Allergy* 55, 898-899.
- Baeza, M.L., Rodríguez, A., Matheu, V., Rubio, M., Tornero, P., de Barrio, M., Herrero, T., Santaolalla, M. & Zubeldia, J.M. (2004)** Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. *Clinical & Experimental Allergy* 34, 296-302.
- Cisse, M. & Belghyti, D. (2005)** Helminths parasites of chub mackerel *Scomber japonicus* (Houttuyn, 1782) from the harbour of Mehdiya-Kenitra (Atlantic coast of Morocco). *Journal of Aquatic Sciences* 20, 63-67.
- Caballero, M.L. & Moneo, I. (2002)** Specific IgE determination to Ani s 1, a major allergen from *Anisakis simplex*, is a useful tool for diagnosis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 89, 74-77.
- Caballero, M.L. & Moneo, I. (2004)** Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitology Research* 93, 248-251.
- Caballero, M.L., Umpierrez, A., Moneo, I. & Rodríguez-Perez, R. (2011)** Ani s 10, a new *Anisakis simplex* allergen: Cloning and heterologous expression. *Parasitology International* 60, 209-212.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Cabañas, R., Suárez 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*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105, 176-181.
- Del Pozo, M.D., Audicana, M., Diez, J.M., Muñoz, D., Ansotegui, I.J., Fernández, E., García, M., Etxenagusia, M., Moneo, I. & Fernández de Corres, L. (1997)** *Anisakis simplex*, a relevant etiologic factor in acute urticaria. *Allergy* 52, 576-579.



- Del Rey Moreno, A., Valero, A., Mayorga, C., Gómez, B., Torres, M.J., Hernández, J., Ortiz, M. & Lozano, J. (2006)** Sensitization to *Anisakis simplex* s.l. in a healthy population. *Acta Tropica* 97, 265-269.
- Del Rey-Moreno, A., Valero-López, A., Gómez-Pozo, B., Mayorga-Mayorga, C., Hernández-Quero, J., Garrido Torres-Puchol, M.L., Torres-Jaén, M.J. & Lozano-Maldonado, J. (2008)** Use of anamnesis and immunological techniques in the diagnosis of anisakidosis in patients with acute abdomen *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 100, 146-152.
- Farjallah, S., Busi, M., Mahjoub, M.O., Slimane, B.B., Paggi, L., Said, K. & D'Amelio, S. (2008)** Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitology International* 7, 430-436.
- Fernández de Corres, L., Del Pozo, M.D., Aizpuru, F. & 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.
- González Quijada, S., González Escudero, R., Arias García, L., Gil Martín, A.R., Vicente Serrano, J. & Corral Fernández, E. (2005)** Manifestaciones digestivas de la anisakiasis: descripción de 42 casos. *Revista Clínica Española* 205, 311-315.
- Guarneri, F., Guarneri, C. & Benvenga, S. (2007)** Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of Ani s 2 and Ani s 3. *International Journal of Dermatology* 46, 146-150.
- Habbari, K., Tifnouti, A., Bitton, G. & Mandil, A. (2000)** Geohelminthic infections associated with raw wastewater in Beni-Mellal, Morocco. *Parasitology International* 4, 249-254.
- Hmida Atmani (2003)** Moroccan fisheries a supply over overview. Report of the expert consultation of international fish trade and food security. *FAO Fisheries Report* n° 708. Casablanca, Morocco, 27-30 January 163-177.
- Hartwich, G. (1974)** Keys to genera of the Ascaridoidea. Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal, Bucks, UK pp 1-15

- 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.
- Ishikura, H., Takahashi, S. & Ishikura, H. (1996)** Anisakidae and anisakidosis in Japan. *Proceed 2<sup>nd</sup> Japan-Korea Parasitologist Seminar (Forum Cheju-do)* 2, 50-63.
- Jiménez Albarrán, M. & Odda, R. (1992)** Parasitismo intestinal humano en Marruecos: Una revisión histórica. Instituto de Ciencias de la Educación, Universidad de Granada. 43 pp.
- Johansson, E., Aponno, M., Lundberg, M. & Van Hage-Hamstem, M. (2001)** Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy* 56, 660-666.
- Kirstein, F., Horsnell, W.G.C., Nieuwenhuizen, N., Ryffel, B., Lobata, A.L. & Brombacher, F. (2010)** *Anisakis pegreffii*-induced airway hyperresponsiveness is mediated by gamma interferon in the absence of interleukin-4 receptor alpha responsiveness. *Infect Immunology* 78, 4077-4086.
- Kobayashi, Y., Ishizaki, S., Shimakura, K., Nagashima, Y. & Shiomi, K. (2007)** Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. *Parasitology Research* 100, 1233-1241.
- Koie, M. (1993)** Nematode parasites in teleosts from 0 to 154 m depth off Faroe Islands (The North Atlantic). *Ophelia* 38, 217-243.
- Laemmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head on bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lorenzo, S., Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F.M., Ansotegui, I., García, M. & Fernández de Corres, L. (2000)** Usefulness of currently available methods for the diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. *Allergy* 55, 627-633.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, AL. & Randall, R.J. (1951)** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry* 193, 265-275.
- Lozano Maldonado, J., Martín Hita, L., Díaz Sáez, V., Mañas Almendros, I., Valero López, A. & Campos Bueno, M. (2004)** Cross-reactivity between antigens of *Anisakis implex* s.l. and other ascarid nematodos. *Parasite* 11, 219-223.

- Maizels, R.M. & Yazdanbakhsh, M. (2003)** Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology* 3, 733-744.
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Abollo, E., Webb, S.C., Pascual, S., Cianchi, R. & Bullini, L. (2001)** Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *International Parasitology* 31, 9-14.
- Mattiucci, S., Abaunzam, P., Ramadori, L. & Nascetti, G. (2004)** Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *Journal of Fish Biology* 65, 495-510.
- Moneo, I., Caballero, M.L., Gómez, F., Ortega, E. & Alonso, M.J. (2000)** Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 106, 177-182.
- Moneo, I. & Caballero, M.L. (2002)** Las larvas de *Anisakis simplex* incubadas en medio ácido diluido liberan alérgenos que pueden tener utilidad en diagnóstico clínico. *Alergología e Inmunología Clínica* 17, 201-207.
- Moneo, I., Caballero, M.L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A.I., Rodríguez-Pérez, R. & Silva, A. (2005)** Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitology Research* 96, 285-289.
- Moubarad, F. & Assobhei, O. (2007)** Health risks of raw sewage with particular reference to *Ascaris* in the discharge zone of El Jadida (Morocco). *Desalination* 215, 120-126.
- Nieuwenhuizen, N., Lobata, A.L., Jeebhay, M.F., Herbert, D.R., Robins, T.G. & Brombacher, F. (2006)** Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117, 1098-1105.
- Pérez-Pérez, J., Fernández -Caldas, E., Marañón, F., Sastre, J., Lluch Bernal, M., Rodríguez, J. & Alonso Bedate, C. (2000)** Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *International Archives of Allergy and Immunology* 123, 120-129.

- Pereira Bueno, J.M. (1992)** Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakidosis. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Junta de Castilla y León, Valladolid 52 pp.
- Petter, A.J. & Maillard, C. (1988)** Larves d'Ascarides parasites de poissons en Méditerranée Occidentale. Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle 10, 347-369.
- Puente, P., Anadón, A.M., Rodero, M., Romaris, F., Ubeira, F.M. & Cuellar, C. (2008)** *Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid (Spain and its relation with fish consumption. Experimental Parasitology 118, 271-274.
- Purello-D'Ambrosio, F., Pastorello, E., Gangemi, S., Lombardo, G., Ricciardi, K.L., Fogliani, O. & Merendino, R.A. (2000)** Incidence of sensitivity to *Anisakis simplex* in a risk population of fisher-men/fishmongers. Annals of Allergy, Asthma & Immunology 84, 439-444.
- Repiso Ortega, A., Alcántara Torres, M., González de Frutos, C., de Artaza Varasa, T., Rodríguez Merlo, R., Valle Muñoz, J. & Martínez Potenciano, J.L. (2003)** Anisakiasis gastrointestinal. Estudio de una serie de 25 pacientes. Gastroenterología y Hepatología 26, 341-346.
- Rodero, M., Chivato, T., Muro, A. & Cuellar, C. (2005)** Enzyme-linked immunosorbent assay Western blot antibody determination in sera from patients diagnosed with different helminthic infections with *Anisakis simplex* antigen purified by affinity chromatography. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 3, 293-301.
- Rodríguez-Mahillo, A.I., Gonzalez-Muñoz, M., Gómez-Aguado, F., Rodríguez-Pérez, R., Corchera, M.T., Caballero, M.L. & Moneo, I. (2007)** Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor., International Journal of Parasitology 37, 907-917.
- Scala, E., Giani, M., Pirota, L., Guerra, E.C., Cadoni, S., Girardelli, C.R., De Pita, O. & Puddu, P. (2001)** Occupational generalised urticaria and allergy airborne asthma due to *Anisakis simplex*. European Journal of Dermatology 11, 249-250.
- Shimakura, K., Miura, H., Ikeda, K., Ishizaki, S., Nagashima, Y., Shirai, T., Kasuya, S. & Shiomi, K. (2004)** Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. Molecular and Biochemical Parasitology 135, 69-75.

- Solas, M.T., García, M.L., de las Heras, C., Rodriguez-Mahillo, A.I., Gonzalez-Muñoz, M., Moneo, I., Mendizábal, A. & Tejada, M. (2009)** *Anisakis simplex* Antigens in Fresh and Frozen-thawed Muscle of Anchovies in Vinegar. *Food Science and Technology International* 15, 139-148.
- 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.
- Toro, C., Caballero, M.L., Baquero, M., García-Samaniego, J., Casado, I., Rubio, M. & 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, 115-118.
- Valero, A., Terrados, S., Díaz, V., Reguera, V. & Lozano, J. (2003)** Determination of IgE in the serum of patients with allergic reactions to four species of fish-parasite anisakids. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 13, 94-98.
- Valiñas, B., Lorenzo, S., Eiras, A., Figueiras, A., Sanmartín, M.L. & Ubeira, F.M. (2001)** Prevalence and risk factors for IgE sensitization to *Anisakis simplex* in a Spanish population. *Allergy* 56, 667-671.
- Yoshinaga, T., Ogawa, K. & Wakabayashi, H. (1987)** Experimental life cycle of the *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in fresh water. *Fish Pathology* 22, 243–251.

### III.3. Capítulo 3. Identificación del parásito

#### Genetic variation of *Anisakis simplex* s.s. and *A. pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in fish from the coasts of Morocco, Spain and Little Sole Bank fishing area

##### Resumen

Se han aislado 623 larvas L3 de *Anisakis* spp de peces capturados en las costas marroquíes, costas españolas y el área pesquera Little Sole Bank. La técnica de PCR-RFLP del fragmento ITS1-5,8S-ITS2 nos ha permitido identificar las larvas extraídas como *Anisakis simplex* s.s., *A. pegreffii* y genotipos híbridos entre las dos especies. El 55.4% (31/56) de los híbridos encontrados solo muestran este genotipo híbrido con una enzima de restricción, mientras que con la otra enzima se observa un patrón de bandas característico de *A. pegreffii*. No hemos encontrado ningún híbrido más parecido a *A. simplex* s.s.. También hemos comparado las secuencias ITS1-5,8S-ITS2 y Cox2 de algunas larvas L3 de ambas especies hermanas. La diversidad genética de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* en ambos tipos de genes, mitocondrial y nuclear es alta, aunque como cabía esperar debido a su mayor tasa de mutación, es mayor en el fragmento mitocondrial. Este fragmento se ha mostrado más útil que el ribosómico para la construcción de árboles filogenéticos, mostrando la separación de ambas especies. Entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* hemos detectado 10 diferencias fijas en el fragmento Cox2, y 2 diferencias en el ITS1. En la *network* ribosómica, un haplotipo de *A. pegreffii* procedente del Atlántico marroquí aparece como el haplotipo más ancestral del que han derivado los otros de *A. pegreffii* y *A. simplex* s.s.

**Palabras clave:** complejo *Anisakis simplex*, genotipos híbridos, diversidad genética, genes nucleares y mitocondriales.

## Abstract

Using the technique of PCR-RFLP of the ITS1-5,8S-ITS2 fragment, 623 L3 larvae isolated from fish caught off Moroccan coasts, the hybrid area comprising Spanish coasts and the Little Sole Bank fishing area were identified as *Anisakis simplex* s.s., *A. pegreffii* and hybrid genotypes. 55.4% (31/56) of the hybrids only display this hybrid genotype with one restriction enzyme, whilst with the other we observed a band pattern which was indistinguishable from *A. pegreffii*. No hybrid was found which was more similar to *A. simplex* s.s. We compared the ITS1-5,8S-ITS2 and Cox2 sequences of some of the previous L3 larvae. The genetic diversity of *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* in both mitochondrial and nuclear genes is high, although it is higher in the mitochondrial fragment, as is to be expected due to its higher mutation rate. We detected 10 fixed differences between *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* in the Cox2 and 2 in the ITS1. In the trees and networks generated from the mitochondrial sequences, we observed the separation of the two species, whilst this does not occur with the ribosomal sequences. In the ribosomal network, an *A. pegreffii* haplotype from the Atlantic waters of Morocco is indicated as the most ancestral one from which the rest of the *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* haplotypes have derived.

**Keywords:** *Anisakis simplex* complex; hybrid genotypes, genetic diversity, mitochondrial and nuclear genes.

## 1. Introduction

Most of the controversy regarding the systematics of anisakids is due to the exclusive use of morphological characteristics of L3 larvae to distinguish between species, especially in cases where the existence of sibling species - biological species which are morphologically identical but are reproductively isolated - is suspected. Applying molecular techniques has resolved this problem and the diversity of anisakid species has increased in the past two decades as new genetic markers have been identified. One of these complex of sibling species is *A. simplex* s.l., which is made up of 3 species which are distinguishable via isoenzymes and PCR-RFLP of the ribosomal DNA (rDNA); these species are *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* and *A. simplex* C, which differ in their genetic structure, life cycle and geographical distribution which is frequently of allopatric type (Mattiucci and Nascetti, 2008). However, this differentiation is not so clear in areas where *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* are sympatric, as occurs along the coasts of the Iberian Peninsula and Japan, where it is possible to find hybrids between this two species (Abollo et al., 2003; Martín-Sánchez et al., 2005). Umehara et al. (2006) were the first to identify hybrid *A. simplex* s.s./*A. pegreffii* (As/Ap) adult specimens isolated from *Balaenoptera acutorostrata* captured in Japanese waters in the northwest Pacific Ocean. The absence of hybrid adults was one of the arguments put forward by Mattiucci and Nascetti, (2008) to defend their theory on the reproductive isolation of the two species.

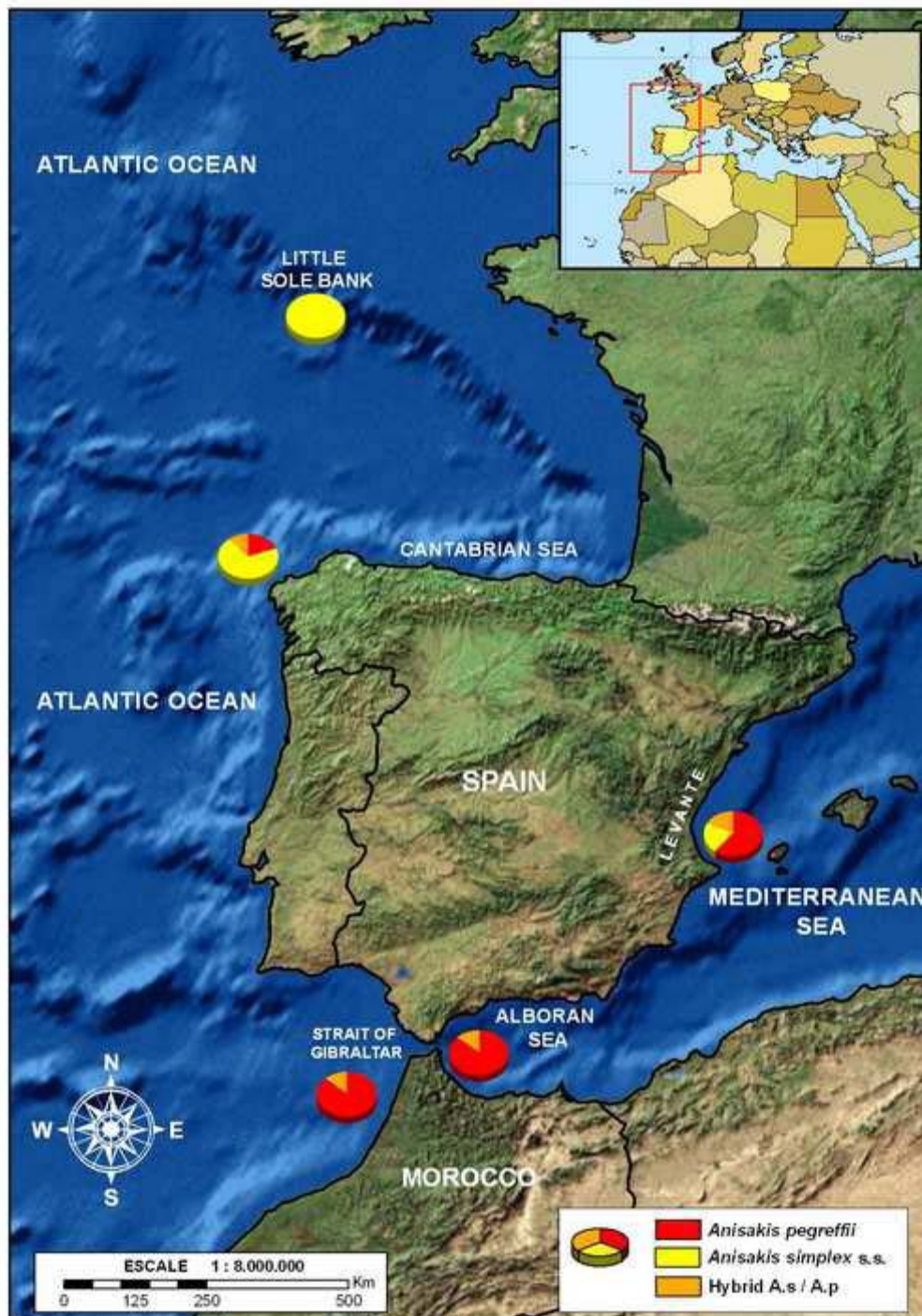
The genetic structure of populations of a species is revealed to us by the distribution of the genetic variation between specimens of that species and is conditioned by the study method chosen. Our objective, achieved through the study of parasites taken from different hosts and various geographical origins where these species are sympatric and parapatric, was to contribute to existing knowledge on the genetic variability of these two *Anisakis* species, *A. simplex* s.s and *A. pegreffii*, and to try to differentiate more accurately between them. In order to do this, we chose to sequence genes with different evolution rates and different types of heredity: nuclear genes ITS1-5,8S-ITS2 and mitochondrial gene Cox2. In both cases, the primers and amplification conditions are described in scientific literature and some sequences can be accessed on nucleotide databases (Cavallero et al., 2011; D'Amelio et al., 2000; Kijewska et al., 2000; Nadler et al., 2000; Valentini et al., 2006).



## 2. Materials and Methods

### 2.1. Parasites, fish and geographical areas

*Anisakis* larvae were collected from mackerel (*Scomber japonicus*), horse mackerel (*Trachurus trachurus*), blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and hake (*Merluccius merluccius*) caught at different points along the Moroccan coastline, off the coasts of the Iberian Peninsula and in the north-east Atlantic (Little Sole Bank fishing ground) (Fig. 1). The larvae isolated from each fish were rinsed in acetic alcohol and were identified morphologically as type I L3 under a stereoscopic microscope. They were subsequently placed individually in appropriately labelled Eppendorf tubes and kept at -20°C to await molecular identification by PCR-RFLP.



**Fig.1.** Map of the area showing the geographical distribution of the different capture locations and the relative proportions of *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* and hybrids.

## 2.2. 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 parasite by mechanical means using a pistil and subjecting it to processes of freezing/thawing in liquid N<sub>2</sub>. The precipitated pellet was resuspended in 20 µl of bidistilled water and kept at -20°C until use.

PCR amplification of the ITS1-5,8S-ITS2 of the rDNA was carried out using A/B primers, as described by D'Amelio et al. (2000) or NC2/NC5 primers as described by Zhu et al. (1998) adhering to the amplification conditions set out by the same authors. Several precautions were taken to avoid cross-contamination between samples, including the use of separate rooms for DNA extraction processes, mixing of reagents for PCR excluding DNA, and development of results; as well as dividing reagents into small aliquots, frequent glove changes and the use of negative controls in about 30% of the DNA extraction processes (a tube containing water) and in all PCR amplification processes (a tube containing no DNA).

Digestion with Hinf I, TaqI and Cfo enzymes was carried out following the manufacturer's recommendations. Following electrophoresis in 3% agarose gel, the band patterns generated with all 3 enzymes allowed us to classify the larva as *A. simplex* s.s, *A. pegreffii* or as a hybrid As/Ap genotype (Martín-Sánchez et al., 2005).

## 2.3. PCR-Sequencing and comparative sequence analysis

PCR amplification of the ribosomal fragment ITS1-5,8S-ITS2 was carried out with the A/B or NC2/NC5 primers, and of the mitochondrial Cox2 with the 210/211 primers and amplification conditions described by Nadler and Hudspeth, 2000. The PCR products were purified using the Real Clean Spin Kit (Real) and then were directly sequenced in both directions using the primers used for DNA amplification. Sequences were edited and aligned to identify haplotypes (= unique sequences) using Clustal-X 1.81 software and manually adjusted, if necessary. When sequence ambiguities were found, we proceeded to repeat the amplification and sequencing process in both directions. For a limited number of larvae with these ambiguities, we also proceeded to sequence random PCR

clones. Phylogenetic analysis was performed using PHYLIP version 3.65 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip>). The ITS1-5,8S-ITS2 and Cox2 sequences of *Anisakis typica* were used as outgroup. Various published sequences for both fragments in *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* have also been included in the study.

We used the bootstrap as a measure of support or stability of the clades; to be considered sufficiently robust the clades had to have a bootstrap percentage greater than or equal to 50%. The phylogenetic analysis was carried out using two different methods, parsimony analysis and analysis based on distance matrices; for the latter 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; in addition to this, where one or both sequences contain at least one of the other ambiguity codons such as Y, R, etc., the program performs a maximum likelihood calculation.

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

### 3. Results

#### 3.1. *Anisakis simplex* s.l. collected and identified by PCR-RFLP

A total of 622 larvae have been identified by PCR-RFLP as *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* or hybrid genotype. On the Spanish Mediterranean coasts, *A. pegreffii* represents 57.5% (23/40) of the L3 isolated from blue whiting, whilst 22.5% (9/40) were identified as *A. simplex* s.s and 20.0% (8/40) belonged to the category of As/Ap hybrid specimens. On the Atlantic coast of Spain, the proportions were 32.8% (41/125), 52.0% (65/125) and 15.2% (19/125), respectively. In the Little Sole Bank fishing ground in the northeast Atlantic, *A. simplex* s.s. (255/255) was the only species identified in hake (Ceballos-Mendiola et al., 2010). On both the Atlantic and Mediterranean coasts of Morocco, *A. pegreffii* was the dominant species in horse mackerel and mackerel (85.1%, 172/202); *A. simplex* s.s. only represented 1.9 % of the anisakids collected from mackerel in the Atlantic (0.5% of the total, 1/202), and the rest (14.4%, 29/202) were hybrid specimens

(Figure 1). 55.4% (31/56) of the hybrids only display this hybrid genotype with one restriction enzyme, whilst with the other we observed a band pattern which was indistinguishable from *A. pegreffii*.

### 3.2. Inter-specific analysis

#### 3.2.1. Comparative analysis of ITS1-5,8S-ITS2 sequences

In the L3 specimens studied (Table 1), PCR amplification of ITS1-5,8S-ITS2 fragment produced a band of approximately 1000 bp in the agarose gel. Having sequenced, compared and deleted the base pairs most closely located to the primers, we worked with a sequence of 860 bp.

Comparative sequence analysis for the identification of haplotypes or unique sequences was only carried out on those larvae for which we had obtained the complete sequence of the fragment, namely on 24 specimens of L3 larvae (Table 1). The number of haplotypes identified was 10 in *A. pegreffii*, and 4 in *A. simplex* s.s (Table 2) which were defined by 14 and 6 polymorphic sites respectively (Table 4). Only two fixed differences were detected between the two sibling species in positions 255 and 271 belonging to the ITS1 sequence (Table 4). We were also able to detect these differences in other specimens not included in tables 2 or 4 for which only a partial sequence of the fragment was obtained. In both positions it was a C/T transition; C in *A. pegreffii* and T in *A. simplex* s.s.. The hybrid specimen wholly sequenced (Table 4) had C/T in 255 and T in 271 like other two not completely sequenced and for this reason not included in tables 2 or 4. All the sequences are available at GenBank under accession numbers x-x. The AT content of the sequences is 53.3% for *A. simplex* s.s. and 53.8% for *A. pegreffii*.

None of the 3 trees generated, using both distance analysis methods (UPGMA and NJ) and MP, show the separation between the two species, so the *A. simplex* s.s and *A. pegreffii* specimens appear intermingled. The bootstrap values supporting the different branches are low, generally below 50% (data not shown).

#### 3.2.2. Comparative analysis of Cox 2 sequences

In the 20 L3 specimens for which the complete Cox2 sequence was obtained, 11 *A. pegreffii*, 8 *A. simplex* s.s and 1 hybrid As/Ap (Table 1), PCR amplification produced a

band of approximately 550bp in the agarose gel. Having sequenced, compared and deleted the base pairs most closely located to the primers, we worked with a sequence of 547 bp.

The comparative sequence analysis allowed us to identify 20 different haplotypes, one per specimen (Table 3). Just as in the case of the rDNA, we did not include specimens for which only partial sequences of under the 547 bp indicated above were obtained. These haplotypes are defined by 59 polymorphic sites, 25 in *A. pegreffii* and 44 in *A. simplex* s.s. (Table 5). We detected the existence of 10 fixed differences between the two species, 9 transitions and one transversion (Table 5).

One of the L3 larvae from the Little Sole Bank fishing ground, identified by PCR-RFLP, and subsequently confirmed by the sequencing of this same fragment as *A. simplex* s.s. (rHS14), revealed a mitochondrial Cox2 gene sequence corresponding to *A. pegreffii* (mtHS19). Furthermore, seven of the mitochondrial haplotypes are not unique sequences, containing instead 2 to 11 ambiguous sites (Table 5).

The AT content of the Cox2 gene sequence was 65.1% for both species, a lower percentage than that indicated by Kim et al. (2006) for the set of *A. simplex* mitochondrial genes (71.2%).

The topology of the trees constructed both by the two distance analysis methods (UPGMA and NJ) and by MP is very similar (Fig. 2). In all three cases, separation into two groups was observed (bootstrap values from 66.2 to 98.8%), one made up of all the haplotypes of *A. simplex* s.s. and the other by all those of *A. pegreffii*. The hybrid specimen wholly sequenced (mtHH20) is grouped together with *A. pegreffii* in the NJ and MP trees, whilst in the UPGMA tree it is independent from this group (bootstrap value of 99.8%), although it remains more closely related to this group than to *A. simplex* s.s.

### 3.3. Intra-specific analysis of *A. simplex* s.s and *A. pegreffii*

The ITS1-5,8S-ITS2 and Cox2 haplotype sequences were independently subjected to genealogy analyses by statistical parsimony. This algorithm sorted the *A. simplex* s.l. haplotypes into one ribosomal network (Fig. 3) and three independent mitochondrial networks (Fig. 4): 1 for *A. simplex* s.s., another for *A. pegreffii* and a third formed by the hybrid specimen. This program collapses sequences into haplotypes and calculates the

frequencies of the haplotypes in the sample; these frequencies are used to estimate haplotype outgroup probabilities, which correlate with haplotype age. In the ribosomal network, rHP9, from the Atlantic coast of Morocco, is the oldest ancestral haplotype (Fig. 3), from which the rest would have been derived by mutation. In the mitochondrial networks, mtHP3 in *A. pegreffii* and mtHS13 in *A. simplex* s.s., both from Atlantic waters, are the oldest ancestral haplotypes (Fig. 4).

**Table 1. Geographical origin and host of the 38 L3 larvae for which a complete sequence of the ITS1-5,8S-ITS2 (ITS) and/or Cox2 fragment was obtained. Every larvae was previously identified by PCR-RFLP as *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* or hybrid genotype; n is the number of L3 identified**

n	Species	Geographical origin	Host species	Markers
5	<i>A. pegreffii</i>	Atlantic coast of Morocco	<i>Scomber japonicus</i>	ITS
1	<i>A. pegreffii</i>	Atlantic coast of Morocco	<i>Scomber japonicus</i>	ITS/cox2
7	<i>A. pegreffii</i>	Atlantic coast of Morocco	<i>Trachurus trachurus</i>	ITS
2	<i>A. pegreffii</i>	Mediterranean coast of Morocco	<i>Trachurus trachurus</i>	ITS
1	<i>A. pegreffii</i>	Mediterranean coast of Morocco	<i>Scomber japonicus</i>	ITS
1	<i>A. pegreffii</i>	Mediterranean coast of Spain	<i>Micromesistius poutassou</i>	ITS/cox2
1	Hybrid genotype	Atlantic coast of Morocco	<i>Trachurus trachurus</i>	ITS
1	<i>A. simplex</i> s.s	Mediterranean coast of Spain	<i>Micromesistius poutassou</i>	ITS
1	<i>A. simplex</i> s.s	Atlantic coast of Spain	<i>Micromesistius poutassou</i>	ITS
1	<i>A. simplex</i> s.s	Atlantic coast of Spain	<i>Micromesistius poutassou</i>	ITS/cox2
3	<i>A. simplex</i> s.s	Northeast Atlantic (Little Sole Bank)	<i>Merluccius merluccius</i>	ITS/cox2
2	<i>A. pegreffii</i>	Atlantic coast of Morocco	<i>Scomber japonicus</i>	cox2
2	<i>A. pegreffii</i>	Atlantic coast of Morocco	<i>Trachurus trachurus</i>	cox2
3	<i>A. pegreffii</i>	Mediterranean coast of Morocco	<i>Trachurus trachurus</i>	cox2
2	<i>A. pegreffii</i>	Mediterranean coast of Morocco	<i>Scomber japonicus</i>	cox2
1	<i>A. simplex</i> s.s	Mediterranean coast of Spain	<i>Micromesistius poutassou</i>	cox2
2	<i>A. simplex</i> s.s	Atlantic coast of Spain	<i>Micromesistius poutassou</i>	cox2
1	<i>A. simplex</i> s.s	Northeast Atlantic (Little Sole Bank)	<i>Micromesistius poutassou</i>	cox2
1	Hybrid genotype	Mediterranean coast of Spain	<i>Micromesistius poutassou</i>	cox2

**Table 2. Geographical distribution of the ribosomal haplotypes (rH) showing the number of specimens from each location belonging to each haplotype. Every larvae was previously identified by PCR-RFLP.**

Sampling locality	Species	Haplotypes (rH)														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Atlantic coast of Morocco	<i>A. pegreffii</i>	1	1		1		1	1	1	8						
Mediterranean coast of Morocco	<i>A. pegreffii</i>			1		1										
Mediterranean coast of Spain	<i>A. pegreffii</i>									1						
Mediterranean coast of Spain	<i>A. simplex s.s</i>										1					
Atlantic coast of Spain	<i>A. simplex s.s</i>											1			1	
Northeast Atlantic (Little Sole Bank)	<i>A. simplex s.s</i>												1	2		
Atlantic coast of Morocco	Hybrid genotype															1

**Table 3. Geographical distribution of the mitochondrial haplotypes (mtH) showing the number of specimens from each location belonging to each haplotype. We did not include specimens for which only partial sequences were obtained. Every larvae was previously identified by PCR-RFLP.**

Sampling locality	Species	Haplotypes (mtH)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Atlantic coast of Morocco	<i>A. pegreffii</i>	1		1	1		1			1											
Mediterranean coast of Morocco	<i>A. pegreffii</i>		1			1		1	1	1											
Mediterranean coast of Spain	<i>A. pegreffii</i>										1										
Atlantic coast of Spain	<i>A. simplex s.s</i>											1	1							1	
Mediterranean coast of Spain	<i>A. simplex s.s</i>														1		1				
Northeast Atlantic (Little Sole Bank)	<i>A. simplex s.s</i>													1	1			1			
Northeast Atlantic (Little Sole Bank)	<i>A. simplex s.s</i>																				1
Mediterranean coast of Spain	Hybrid genotype																				1



**Table 4. Alignment of the polymorphic positions detected in the ribosomal haplotypes identified. According to the PCR-RFLP identification, rHP are haplotypes of *A. pegreffii*, rHS are haplotypes of *A. simplex* s.s., rHH is the hybrid genotype. (-) represents a deletion, Y= C/T, S=C/G**

	Positions																						
	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	4	4	5	6	6	6	7	7	8	8
Haplotypes	0	3	4	6	7	7	5	5	7	9	9	9	0	2	6	7	0	0	4	0	4	0	2
	4	5	3	5	3	4	5	9	1	3	4	9	2	4	2	6	2	3	9	5	1	2	4
rHP1	G	G	G	C	G	C	C	T	C	C	T	G	C	C	G	C	G	T	A	C	T	A	A
rHP2																				S	C		
rHP3	C																T	C			C		
rHP4																						T	
rHP5															A								
rHP6												C										C	
rHP7															G							C	
rHP8			C	T	T	T					G	G										C	
rHP9																						C	
rHP10																						C	
rHS11							T	T															-
rHS12		C					T	T							A				T		C		
rHS13							T	T					A									C	
rHS14							T	T														C	
rHH15							Y	Y	T													C	



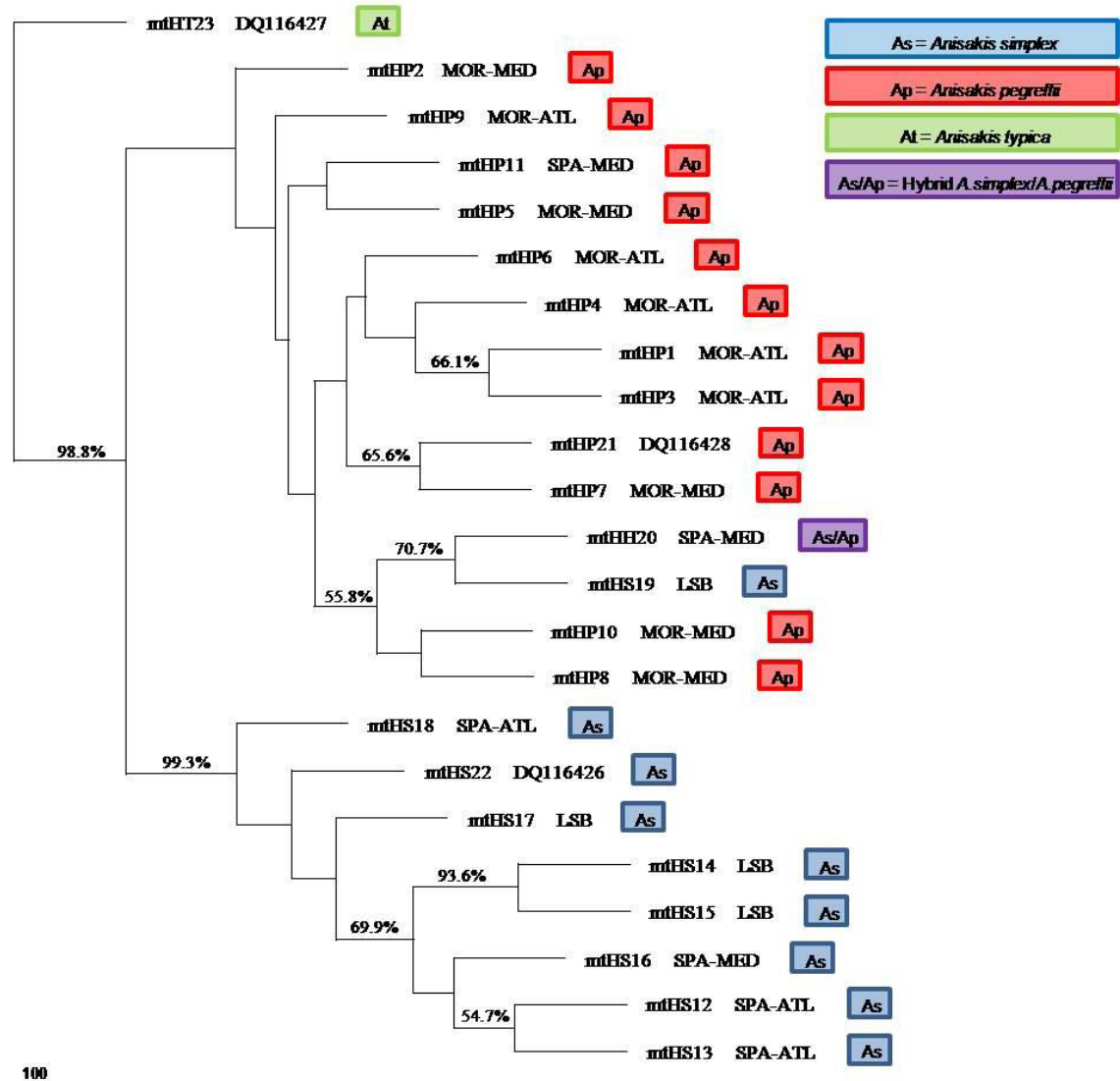


Fig.2. Phylogenetic tree based on mtDNA cox2 sequence data and obtained by distance analysis - F84 model with a neighbour-joining method of clustering. *Anisakis typical* is used as an outgroup. The numbers above the branches are bootstrap percentages (1000 replications) for clades supported above the 50% level.

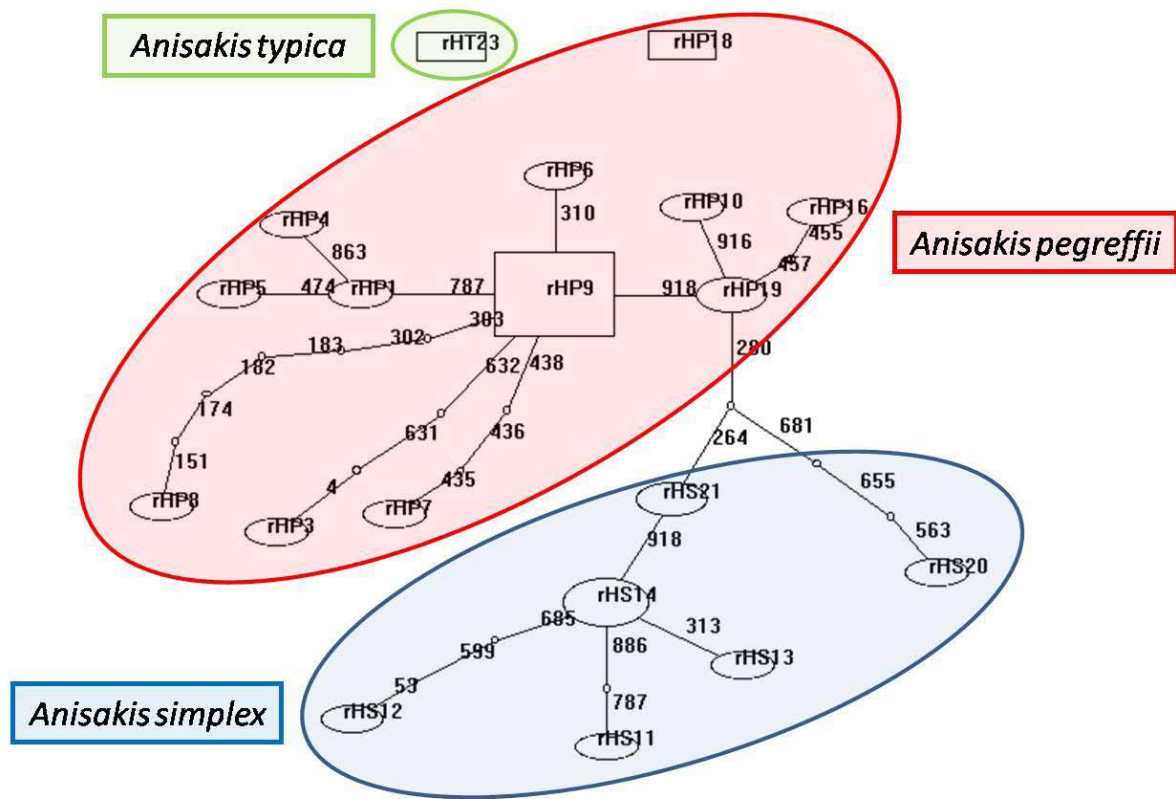


Fig.3. Parsimony network based on rDNA ITS1-5,8S-ITS2 sequence data. The haplotype with the highest outgroup probability is displayed as a square, while other haplotypes are displayed as ovals. The size of the square or oval corresponds to the haplotype frequency. The species were identified by by PCR-RFLP of the ITS1-5,8S-ITS2. GenBank sequences used of *A. pegreffii*: AY826720 (rHP16), AB196671 (rHP17), AY603531 (rHP18) and AY821740 (rHP19). GenBank sequences used of *A. simplex* s.s.: AY826722 (rHS20), AY826723 (rHS21) and AB196672 (rHS22). AY826724 (rHT23) is a GenBank sequence of *A. typica*.

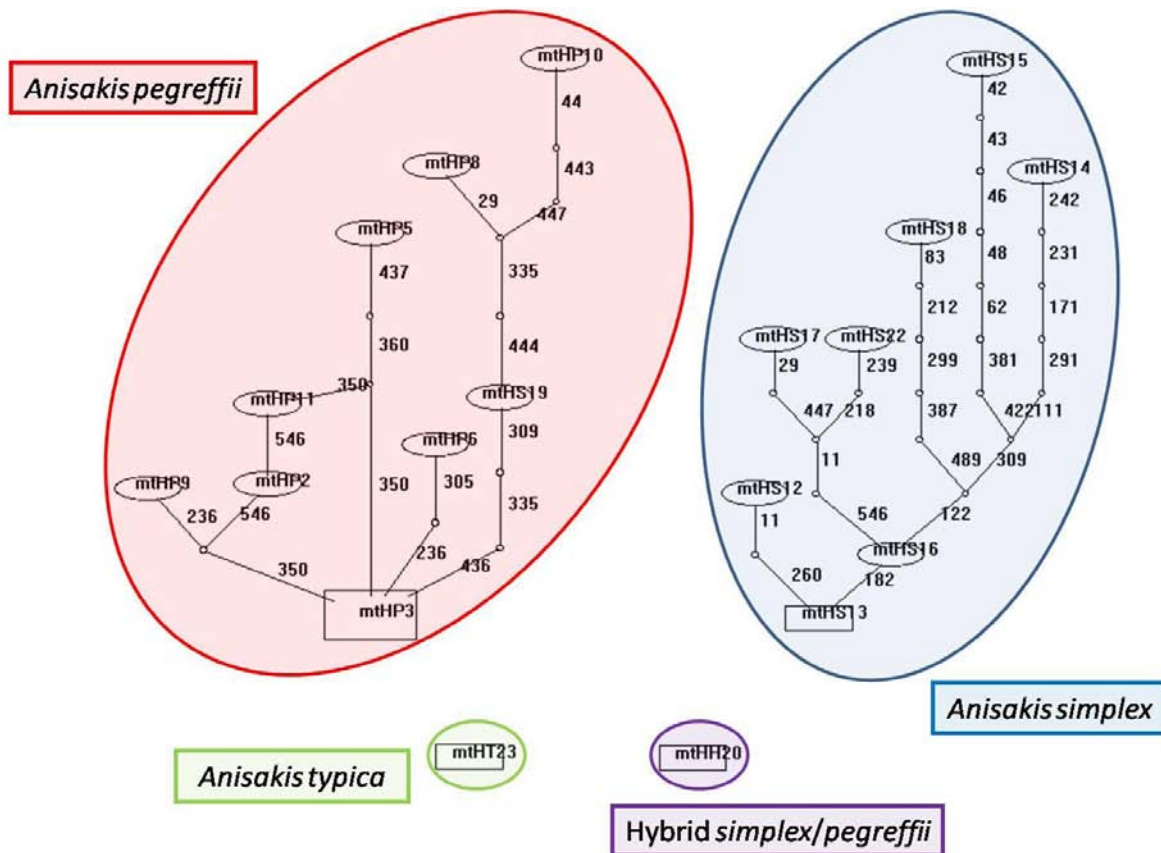


Fig.4. Parsimony network based on mtDNA cox2 sequence data. The haplotype with the highest outgroup probability is displayed as a square, while other haplotypes are displayed as ovals. The size of the square or oval corresponds to the haplotype frequency. The species were identified by PCR-RFLP of the ITS1-5,8S-ITS2. DG116428 is a GenBank sequence of *A. pegreffii*, DQ116426 is a GenBank sequence of *A. simplex* s.s. DQ116427 is a GenBank sequence of *A. typica*.

#### 4. Discussion

According to Mattiucci and Nascetti, (2008), *A. simplex* s.s. is widely distributed in the eastern and western Atlantic and the southerly limits of this species in the northeast Atlantic are the waters of the Straits of Gibraltar. Thus, we have found that *A. simplex* s.s. only represents 0.5% of the larvae isolated from Moroccan coast. It was only found in *S. japonicus* from Atlantic waters revealing the migratory movements of this host from

more northerly latitudes. Although it has been suggested that *A. simplex* s.s. is found occasionally in the western Mediterranean due to the migration of pelagic fish from the Atlantic via the Alboran Sea, on the Spanish Mediterranean coast this species represents 22.5% (Figure 1). We confirm that *A. pegreffii* is the dominant species in the Mediterranean coasts of Spain and Morocco, where we found it in blue whiting, mackerel and horse mackerel. We also confirm that in Atlantic waters, the northern limits of its distribution area are the Iberian coasts (Mattiucci and Nascetti, 2008) hence we have not found it in Little Sole Bank fishery.

*A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* are sympatric on the coasts of the Iberian Peninsula. Hybrid zones are created in areas of contact between two parapatric species, where genetic exchange takes place to form hybrids. We found 16.4% hybrid genotypes in Spanish waters, in similar proportions ( $p=0.475$ ) on the Atlantic (15.2%) and Mediterranean (20.0%) coasts. Further south on the neighbouring coast of Morocco, hybrids constitute 14.9%. This is a similar figure to that found on Spanish coasts ( $p=0.592$ ) and there are no significant differences here either between the Atlantic and the Mediterranean ( $p=0.575$ ). It is worth noting that even with such a low proportion of *A. simplex* s.s., the percentage of hybrids is similar. However, 75.9% (22/29) of the Moroccan hybrids only display this hybrid genotype with one of the two restriction enzymes which permit differentiation between parent species (Taq or Hinf), whilst with the other they display a band pattern which is indistinguishable from *A. pegreffii*. Among Spanish hybrids this occurs in lower proportions ( $p=0.001$ ); to be precise, in 33.3% (9/27). No hybrid was found which was more similar to *A. simplex* s.s. There are only two fixed differences between *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* in the ITS1-5,8S-ITS2 fragment, located specifically in the ITS1, a fact which has already been pointed out by other authors (Ceballos-Mendiola et al., 2010; Abollo et al., 2003; Abe et al., 2005; Chen et al., 2008). The F1 hybrid specimens are distinguished by having a DNA strand which is characteristic of *A. simplex* s.s. (therefore T, T in positions 255 and 271) and another strand characteristic of *A. pegreffii* (C, C) (Abollo et al., 2003). Backcrosses between these hybrids and *A. pegreffii* generate structures such as those seen in the complete (rHH15) or partially sequenced hybrid specimens, which have C/T and T in these positions respectively. The PCR-RFLP band patterns obtained with some hybrid specimens suggest that in other cases there is a T in 255 and C/T in 271. The

identification of 14 ribosomal haplotypes reveals a considerable degree of intra-specific variability both in *A. simplex* s.s. and in *A. pegreffii*.

Mitochondrial genome sequences provide useful markers for genetic population studies and the construction of phylogenies due to their relatively well-conserved structure and their high rates of evolution with respect to nuclear genes, as studies carried out on parasites of all groups, including anisakids, have already shown (Nadler et al., 2000; Valentini et al., 2006; Barón et al., 2008; Franco et al., 2010). Cytochrome oxidase subunit II is a key component of the electron transport chain during aerobic respiration. Moreover, mitochondrial DNA has maternal heredity in the majority of organisms, including *Ascaris* (Anderson et al., 1995), so Cox2 represents a genetically independent locus from the genes in the nucleus and its study proves very useful in combination with nuclear genes such as the ribosomal ones, whose heredity is parental and involves genetic recombination.

As is to be expected due to its higher evolution rate, the genetic variability of the Cox2 gene is greater than that of the ribosomal genes. We detected 25 polymorphic sites in *A. pegreffii* and 44 in *A. simplex* s.s. (Table 5) which allowed us to identify a different haplotype for each specimen. Within *A. simplex* s.s., mtHS13 and mtHS16, both Iberian, are the most similar haplotypes, whilst mtHS15 (Iberian) and mtHS18 (Little Sole Bank) are the most different, with 10 different base-pairs. However, it is within *A. pegreffii* where we observe the greatest differences between haplotypes, a factor which also occurs with the ITS1-5,8S-ITS2 fragment; thus, for example, rHP3 and rHP8 differ in 9 base-pairs.

Seven of the 20 mitochondrial haplotypes have 2-11 ambiguous nucleotides, this could be evidence of heteroplasmy, once the possibility of technical problems has been ruled out repeating the sequencing process. Heteroplasmy has been reported in a great variety of living beings including humans, rats, sheep, insects and also in nematodes (Franco et al., 2010; Kmiec et al., 2006; Tang and Hyman, 2007). The presence of more than one type of mitochondrial DNA occurs more frequently in *A. pegreffii* than in *A. simplex* s.s (Table 5). The topology of the 3 trees based on the Cox2 gene sequences shows us the separation of the two sibling species, whilst the two fixed differences detected in the ITS1 are insufficient to determine this divergence. Within each species,

the haplotypes belong to a single mitochondrial lineage. However, it has already been pointed out that these traditional methods are based on certain assumptions which render them inadequate for intra-specific studies, which would instead be better represented through network approaches (Posada et al., 2001) such as those shown here in the figures 3 and 4. As we can see, the ribosomal sequences fail once again to separate the two species, forming a single network, although the *A. simplex* s.s. specimens are grouped together in one branch (Figure 3). In natural populations, the ancestral haplotypes are expected to persist in the population and to be sampled together with their descendants. In the ribosomal network (Fig. 4), an *A. pegreffii* haplotype from the Atlantic coast of Morocco (rHP9) is indicated as the most ancestral one from which the rest of the *A. pegreffii* and *A. simplex* s.s. haplotypes have derived.

Surprisingly, one of the larvae analyzed from the Little Sole Bank fishery, where only *A. simplex* s.s. was detected (Ceballos-Mendiola et al., 2010), had *A. pegreffii* mitochondrial DNA (Table 5, Fig. 2), which would therefore represent an individual case of mitochondrial introgression, the first to be described in the *Anisakis* genus. These phenomena are described relatively frequently in nature in all groups of living beings and it can even come about that the mitochondrial DNA of one species completely replaces that of the other species leaving no trace of nuclear introgression or morphological change, remaining as ghosts of past hybrids (Ballard et al., 2004). This is not the case with *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii*, since we only detected this phenomenon in 1 of the 20 specimens in which we studied the mitochondrial DNA as well as the nuclear genes. Moreover, if *A. pegreffii* is the ancestor of *A. simplex* s.s. (Figure 3), these findings may simply reflect part of the evolutionary history of these taxa.

## 5. Conclusions

*A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* appear to be two parapatric species that continue to hybridize under natural sympatric conditions, reflecting the gradual and cumulative process of speciation. The Iberian coast would thus represent a bimodal hybrid zone between *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii*, characterized by the coexistence of a low proportion of hybrids (<20%) together with two groups comprising the parental species. The results appear to indicate that backcrosses (crosses between F1 hybrids and one of the ancestors) may be relatively common especially with *A. pegreffii*, and in



this way parental characteristics are recovered. We also reveal the high genetic diversity of *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* in both mitochondrial and nuclear genes. As is to be expected due to its greater mutation rate, diversity is greater in the mitochondrial fragment. This fragment has proved to be more useful than the ribosomal fragment in the construction of phylogenetic trees and networks, permitting the separation of the two species.

Parte de estos resultados han sido publicados por Ceballos-Mendiola et al., (2010).

**Acknowledgements:** To AECID for project A/7211/06 and A.N.'s pre-doctoral grant. To the Junta de Andalucía (Regional Autonomous Government of Andalusia) for Excellence in Research Project P07-CVI-03249.

## 6. References

- Abe, N., Ohya, N., Yanagiguchi, R., 2005.** Molecular characterization of *Anisakis pegreffii* larvae in Pacific cod in Japan. *J. Helminthol.* 79, 303-306.
- Abollo, E., Paggi, L., Pascual, S., D'Amelio, S., 2003.** Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) in an area of sympatry. *Inf. Gen. Evol.* 3, 175-181.
- Anderson, T.J., Komuniecki, R., Komuniecki, P.R., Jaenike, J., 1995.** Are mitochondria inherited paternally in *Ascaris*? *Int. J. Parasitol.* 25, 1001-1004.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C., 2004.** The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.* 13, 729-744
- Barón, S., Martín-Sánchez, J., Gállego, M., Morales-Yuste, M., Boussaa, S., Morillas-Márquez, F., 2008.** Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta Trop.* 107, 159-167.
- Cavallero, S., Nadler, S.A., Paggi, L., Barros, N.B., 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.

- Ceballos-Mendiola, G., Valero, A., Polo-Vico, R., Tejada, M., Abattouy, N., Karl, H., De las Heras, C., 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. *Parasitol. Res.* 107, 1399-1404.
- Chen, Q., Yu, H.Q., Lun, Z.R., Chen, X.G., Song, H.Q., Lin, R.Q., Zhu, X.Q., 2008.** Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodes with zoonotic potencial. *Parasitol. Res.* 104, 79-84.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K., 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9, 1657-1660.
- 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.
- Franco, F.A.L., Morillas-Márquez, F., Barón, S.D., Morales-Yuste, M., Gálvez, R., Díaz, V., Pesson, B., Alves-Pires, C., Depaque, J., Molina, R., Afonso, M.O., 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.
- Kijewska, A., Słomińska, M., Węgrzyn, G., Rokicki, J., 2000.** A PCR-RFLP assay for identification of *Anisakis simplex* from different geographical regions. *Molec. Cell. Probes.* 14, 349-354.
- Kim, K.H., Eom, K.S., Park, J.K., 2006.** The complete mitochondrial genome of *Anisakis simplex* (Ascaridida, Nematoda) and phylogenetic implications. *Int. J. Parasitol.* 36, 319-328.
- Kmieć, B., Wolosynska, M., Banska, H., 2006.** Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Curr. Genet.* 50, 149-159.
- 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., 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. *Adv. Parasitol.* 66, 47-148.
- Nadler, S.A., Hoberg, E.P., Hudspeth, D.S.S., Rickard, L.G., 2000.** Relationships of *Nematodirus* species and *Nematodirus battus* isolates (Nematoda: Trichostrongyloidea) based on nuclear ribosomal DNA sequences. *J. Parasitol.* 86, 588-601.
- Nadler, S.S., Hudspeth, D.S.S., 2000.** Phylogeny of the ascaridoidea (Nematoda, Ascaridida) based on three genes and morphology, hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.* 86, 380-393.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001.** Intraspecific gene genealogies, trees grafting into networks. *Trends. Ecol. Evol.* 16, 37-45.
- Tang, S., Hyman, B.C., 2007.** Mitochondrial Genome haplotype hypervariation within the isopod parasitic nematode *Thaumamermis cosgrovei*. *Genetics.* 176, 1139-1150.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Matsui, T., Araki, J., Uchida, A., 2006.** Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol. Int.* 55, 267-271.
- Valentini, A., Mattiucci, S., Bondanelli, P., Webb, S.C., Mignucci-Giannone, A.A., Colom-Llavina, M.M., 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.
- Zhu, X., Gasser, R.B., Podolska, M., Chilton, N.B., 1998.** Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 28, 1911-1921.

## **Estudio genético de poblaciones de *Anisakis simplex* s.l. usando el análisis de isoenzimas con la técnica de isoelectroenfoque**

### **Resumen**

Utilizando el análisis de isoenzimas con la técnica de isoelectroenfoque, nuestro objetivo ha sido encontrar marcadores y utilizarlos para establecer la estructura genética de poblaciones y la identificación de las especies *Anisakis simplex* s.s y *A. pegreffii*. De los 17 sistemas enzimáticos ensayados sólo 4 (PGM, MPI, 6PGD y EST) se revelaron de forma constante generando fenotipos interpretables que nos han permitido realizar el análisis genético. No hemos encontrado ningún alelo que actúe como marcador específico de alguna de las especies o poblaciones pero sí hay diferencias en las frecuencias alélicas. En el dendrograma basado en las distancias genéticas de Nei, la separación entre *Anisakis pegreffii* y *Anisakis simplex* s.s. sólo se produce con la suficiente robustez (valor de bootstrap del 73%) en aguas atlánticas.

**Palabras clave:** isoenzimas, *Anisakis simplex* s.s., *A. pegreffii*, frecuencias alélicas.

## I. Introducción

En los últimos 20 años, ha mejorado considerable el conocimiento sobre la sistemática y posición taxonómica de las especies del género *Anisakis*; a ello ha contribuido el empleo de marcadores genéticos, que permiten la correcta identificación de los diferentes estados de su ciclo biológico. La fase larvaria 3 (L3) es la más investigada, dada su implicación en la salud humana, pero la escasez de caracteres morfológicos diferenciales limita la utilidad del estudio morfológico sobre la misma. Los progresos realizados en la diferenciación de las especies de *Anisakis*, están estrechamente ligados al uso de marcadores isoenzimáticos llevado a cabo por el equipo de la Dra Simonetta Mattiucci (Mattiucci et al., 1986; 1997; 1998; 2001; 2002; 2003; 2004; Mattiucci and Nascetti, 2008; Nascetti et al., 1986; 1993). Estos estudios ha constituido la base de las investigaciones realizadas posteriormente con otros marcadores genéticos tales como los generados con la técnica PCR-RFLP del ITS1-5,8S-ITS2 (D'Amelio et al., 2000; Abollo et al., 2003; Martín-Sánchez et al., 2005; Pontes et al., 2005; Marques et al., 2006; Farjallah et al., 2008), que palian en parte, los problemas que genera el uso de la electroforesis y que se puede resumir en los siguientes: la complejidad en la interpretación de los patrones de bandas isoenzimáticas y la necesidad de gran cantidad de material biológico adecuadamente conservado. La realización de la electroforesis de isoenzimas en geles de agarosa ultrafinos que llevan incorporados anfolitos con distintos rangos de pH (isoelectroenfoque), permiten una mayor separación de las bandas alélicas y en consecuencia una mejor interpretación de los fenotipos; esta técnica ha sido extensamente utilizada para la identificación específica y genética de poblaciones de flebotomos, insectos caracterizados por su pequeño tamaño (Madulo-Leblond et al., 1991; Boussaa et al., 2008). En este trabajo, y utilizando el análisis de isoenzimas con la técnica de isoelectroenfoque, nos hemos planteado como objetivo encontrar marcadores útiles para establecer la estructura genética de poblaciones y la identificación de las especies *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*.

## 1. Material y Métodos

### 1.1. *Parasito*

Entre julio y agosto de 2009, hemos aislado 282 larvas L3 a partir de diversos hospedadores (*Micromesistius poutassou*, *Scomber japonicus*, *Trachurus trachurus* y *Merluccius merluccius*) capturados en las costas mediterráneas (191 larvas) y atlánticas españolas (91 larvas).

### 1.2. *Identificación morfológica*

Una vez extraídas las larvas de los hospedadores se ha procedido su estudio morfológico para la clasificación en larvas L3 de *Anisakis* tipo I o tipo II; para ello, hemos seguido las características descritas por Berland, (1961), Hartwitch (1974), Yoshinaga et al., (1987), Petter and Maillard (1988) y Køie (1993), tales como: i) la longitud y forma del ventrículo, criterios importantes en la diferenciación de ambos tipos de larvas, así, es más alargado, delgado y oblicuo en su extremo posterior el de la larva I, mientras que el de la larva II es más corto y rechoncho. ii) extremo caudal con una espina o mucrón en la larva tipo I mientras que en el morfotipo II el extremo posterior es menos cónico y a veces carece de mucrón.

Tras su identificación morfológica, las larvas se han dividido en dos trozos, uno más pequeño para extracción del ADN y el otro más grande para el estudio isoenzimático. Los fragmentos se han introducido individualmente dentro de tubos de criopreservación, que adecuadamente etiquetados se han conservado en nitrógeno líquido (-196°C) –los fragmentos destinados al estudio isoenzimático- o a -20°C, los fragmentos destinados al estudio por PCR-RFLP.

### 1.3. *Identificación por PCR*

Se ha llevado a cabo por la técnica de PCR-RFLP del fragmento ITS1-5.8S-ITS2. Para la extracción de ADN hemos utilizado el kit RealPure para extracción de ADN genómico de REAL (Ref RBMEG01). La identificación específica se ha realizado mediante amplificación por PCR de esta región del ADNr usando los cebadores NC2 y NC5, seguida de digestión con las enzimas de restricción HinfI y TaqI; para ello hemos seguido el protocolo descrito por Abattouy et al. (2011).

### 3.3. *Análisis de isoenzimas*

La preparación de los extractos proteicos se ha realizado pulverizando de forma individualizada cada fragmento larvario en 100 a 300 microlitos de agua destilada. La técnica de isoelectroenfoque se realizó en geles de agarosa ultrafinos en gradiente de pH, mediante la incorporación al gel de una solución de anfolitos. Durante la migración, las proteínas se inmovilizan cuando alcanzan su punto isoeléctrico, lo cual confiere a esta técnica un gran poder de resolución. Para la optimización de la técnica adaptada al análisis isoenzimático de estos nematodos, hemos utilizado soluciones de anfolitos que proporcionan 4 rangos de pH distintos: 4-9; 4-6,5; 3-10 y 2-11, de acuerdo con los protocolos descritos por Madulo-Leblond et al. (1991) Benabdennbi (1998) y Boussaa et al. (2008). Hemos ensayado un total de 17 sistemas enzimáticos: Isocitrato deshidrogenasa (ICD, EC 1.1.1.42), Glicerofosfato deshidrogenasa (GPDH, EC 1.1.1.8), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD, EC 1.1.1.44), Hexokinasa (HK, EC 2.7.1.1), Fosfoglucomutasa (PGM, EC 5.4.2.2), Trehalasa (TREH, EC 3.2.1.28), Fumarasa (FUM, EC 4.2.1.2), Aconitasa (ACO, EC 4.2.1.3), Esterasa (EST, EC 3-1.1.1), Peptidasa (PEP, EC 3.4.11), Manosafosfato isomerasa (MPI, EC 5.3.1.8), Fructosa biofosfato aldolasa (FBA, E.C. 4.1.2.13), Malato deshidrogenasa (MDH, EC.2.7.1.1), Fosfoglucosa isomerasa (PGI, EC.5.3.1.9), Mendione reductase (MR, EC 1.6.99.2), Aspartato amino transferasa (AAT, EC 2.6.1.1), y Guanina desaminasa (GDA, EC 3.5.4.3).

Para cada enzima estudiada, hemos probado tanto una migración electroforética anódica como catódica, cargando los extractos proteicos en los pocillos del aplicador cátodo, arriba del gel y en el aplicador ánodo abajo, de acuerdo con el protocolo descrito por Boussaa et al. (2008).

Para poner en evidencia el lugar donde ha migrado la enzima es necesario que uno de los compuestos de la reacción sea coloreado. En la tabla 1 se indican las soluciones empleadas en el revelado de estas actividades enzimáticas. Para la interpretación de los resultados se ha designado los distintos loci y alelos, numerándolos en orden decreciente de movilidad.

### 3.4. *Análisis de los datos*

La variabilidad genética se ha evaluado determinando las frecuencias alélicas, la tasa de polimorfismo, los grados de heterocigosidad ( $H_o$  o heterocigosidad observada y  $H_e$  o heterocigosidad esperada) y el número medio de alelos por locus. Un locus se considera polimórfico cuando el alelo mayoritario tiene una frecuencia inferior al 99%. También se han verificado el equilibrio de Hardy-Weinberg.

La estructura genética de poblaciones se evalúa midiendo el índice de fijación  $F_{st}$ , siguiendo los criterios de Wright (1978) para su interpretación cualitativa, y calculando las distancias genéticas de Nei.

Mediante el uso de las distancias genéticas de Nei y el método de parsimonia, hemos construido un árbol sin raíces usando el método de agregación Neighbor-Joining. La robustez de las ramas se determina con el método bootstrap.

Para la realización de estos análisis hemos usado los paquetes informáticos BIOSYS-2 (Swofford and Selander 1981), GENEPOP versión 3.3 (Raymond y Rousset, 1995) y PHYLIP versión 3.6a2 (Felsenstein 1989).



**Tabla 1. Composición de las soluciones empleadas en el revelado de las distintas actividades enzimáticas. Se indica el nombre completo de la enzima, su abreviatura y el código EC.**

Enzima (Abreviación)	Tampón de reacción	Sustratos y cofactores	Enzimas y colorantes Adicionales en el último minuto
• PHOSPHOISOMERASA (PGI) EC.5.3.1.9	Tampón Tris-HCl 0,03M pH 8 (15ml)	Fructose 6-phosphate (10mg) MgCl <sub>2</sub> 10% 500 ul EDTA 30mg βNADP 1 % 500 ul	G6PDH 3ul PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)
• ISOCITRATE DESHYDROGENASE (ICD) EC 1.1.1.42	Tampón Tris-HCl 0,03M pH 8 (15ml)	β-NADP (500μl) MgCl <sub>2</sub> 10%(300μl) acide D.L.isocitrique (100mg)	PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)
• GLYCEROL-3-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (α GPDH) EC 1.1.1.8	Tampón Tris-HCl 0.03M pH 8 (15ml)	α-D-L-glycérophosphate (20mg), β-NAD 10mg/ml (500μl)	PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)
• GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (6PGD) EC 1.1.1.44	Tampón Tris-HCl 0.03M pH 8 (15ml)	6-phospho-D-gluconate (10mg) MgCl <sub>2</sub> 10 % (200μl) β-NADP 10% (500μl)	PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)
• HEXOKINASE (HK) EC 2.7.1.1	Tampón Tris-HCl 0,03M pH 8 (15ml)	ATP (20mg), D(+)-glucose (25mg) β-NADP 1% (500μl) MgCl <sub>2</sub> 10% (200μl)	Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) (10 unités) 3 μl PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)
•PHOSPHOGLUCOMUTASE (PGM) EC 5.4.2.2	Tampón Tris-HCl 0,03M pH 8 (15ml)	α-D-glucose-1-P (100mg), MgCl <sub>2</sub> 10%(500μl) β-NADP 1% (500μl) ajuster à pH 8,6 avec du tampon Tris-HCl 1M	G6PDH (10 unités) 3 μl PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)
TREHALASE (TREH) EC 3.2.1.28	Tampón Tris-HCl 0,03M pH 7 (15ml)	ATP (10mg), MgCl <sub>2</sub> 10%(300μl), αα tréhalose (50mg), β-NADP 1% (500μl)	MTT 1% (500μl) PMS 1% (500μl) hexokinase 10μl G6PD 4μl
• FUMARASE (FUM) EC 4.2.1.2	Tampón Na/Na <sub>2</sub> 0,05M pH 7 (15ml)	Fructose-6-phosphate (10mg), MgCl <sub>2</sub> 10% (500μl) β-NADP 1% 500μl	G6PDH (10 unidades) 3μl PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)
• ACONITASE (ACO) EC 4.2.1.3	Tampón Tris-HCl 0,03M pH8 (15ml)	Acide cis aconitique (100mg), MgCl <sub>2</sub> 10% (500μl) β-NADP 1% (500μl)	IDH (10μl) PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)
ASPARTATO AMINOTRANSFERA (AAT) EC 2.6.1.1	Tampón Tris-HCl 0,03M pH 8 (15ml)	acido Aspartique (60mg), α cetoglutarique (27mg), ajustar pH fast Garnet GBS (100 mg )	Fast blue B salt (25 mg)
•ESTERASA (EST) EC 3-1.1.1	Tampón Fosfato pH 6 40 ml	naphtyl propionatee (20mg) naphtyl propionatee (20mg) Acetone(2ml)	Mezcla extemporaria Luz Temperatura ambiente
•PEPTIDASAS EC. 3.4.11 (PEP)	Tampón Tris-HCl 0,03M pH7 (15ml)	Di ou tri peptide leu gly gly (15mg), venin de serpent 3mg, peroxydase 120 U (6mg), o. diamisidine (3mg), 0,1M MnCl <sub>2</sub> (300 ul)	NBT 1% 7,5 mg 750 PMS 1% 1,5 mg 150
•GUANINA DESAMINASA (GDA) EC 3.5.4.3	Tampón Tris-HCl 0,03M pH7 (15ml)	Guanine (20mg) A T 37 ° C	Xanthine oxydase PMS 1% (500μl) MTT 1% (500μl)

### 3. Resultados

#### 3.1. Identificación morfológica y por PCR-RFLP

Las 282 larvas extraídas de los diferentes hospedadores, se han identificado morfológicamente como larvas L3 de *Anisakis* tipo I; el 68% de las larvas proceden del Atlántico noroeste mientras que el 32% restante, proceden del Mediterráneo. El 64% tienen patrones de bandas PCR-RFLP que coinciden con los de *A. simplex* s.s. y el 35% con los de *A. pegreffii*; también se identificó *A. typica* en un 2% de las larvas (Tabla 2).

#### 3.2. Análisis de isoenzimas con la técnica de isoelectroenfoque

##### 3.2.1. Optimización del análisis en anisákidos

Con objeto de establecer las condiciones más adecuadas para el análisis de isoenzimas de anisákidos por la técnica de isoelectroenfoque, hemos realizado la migración electroforética de los 17 sistemas enzimáticos en geles con los 4 gradientes de pH, 4-5,6, 4-9, 3-10 y 2-11, obteniendo en todos los casos los mejores resultados con el intervalo 3-10 que ha sido finalmente seleccionado.

El revelado de las enzimas fue diferente dependiendo de cada una de ellas; algunas enzimas no se revelan, como son HK, GDA, PEP y MR, a pesar de concentrar los extractos proteicos y cambiar la gama de anfolitos ensayados. Otras se han revelado de forma inconstante, a veces con bandas débiles, como TREH, FUM, ICD, GPDH, AAT, FBA y ACO. La enzima MDH se reveló intensamente lo que dificultó su lectura.

Otras enzimas como la MPI, 6PGD, TRE se revelaban lentamente, mientras que la PGI lo hace rápidamente y hay que parar la reacción para poder leer el patrón de bandas. Algunas enzimas llamadas catódicas, se revelaban cerca del cátodo (MPI, 6PGD, TRE) y otras son anódicas como la MR, MDH, AAT y ACO; el resto de las enzimas se revelaban igual con migración catódica o anódica.

Con la excepción de la enzima EST que presenta 3 loci, y PGM y GPI con 2, los demás sistemas enzimáticos están caracterizados por un único locus.

Del total de enzimas estudiadas, solo 4 se han revelado de forma constante, generando fenotipos interpretables que permiten el análisis genético, estas enzimas son: PGM, MPI, 6PGD y EST

### 3.3. Variabilidad genética y estructura genética de poblaciones deducida del análisis de las enzimas PGM, PGI, MPI y 6PGD

Las 4 enzimas se han estudiado de forma simultánea sobre cada larva. La PGM es una enzima monomérica que está codificada por dos loci (PGM1 y PGM2), ambos polimórficos (frecuencia del alelo más común inferior al 99%). Las enzimas monoméricas MPI y 6PGD son también polimórficas, y ambas están codificadas por un único locus. De los 3 loci de la enzima dimérica EST, dos son polimórficos (EST 1 y EST 2); el tercero es monomórfico y no se ha incluido en el análisis genético de poblaciones. En la tabla 3 se muestran las frecuencias alélicas observadas en los 6 loci enzimáticos para cada una de las 4 poblaciones consideradas, teniendo en cuenta las dos especies analizadas, *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, y las dos zonas geográficas de las que proceden, Atlántico y Mediterráneo. En las tablas 4 y 5 se completa la evaluación de la variabilidad genética de las 4 poblaciones de *Anisakis* definidas, aportando otros parámetros como las tasas de heterocigosidad observadas y esperadas, los valores del índice de fijación  $F_{st}$  y la distancia genética de Nei. El dendrograma construido utilizando la matriz de distancias de Nei y el método de agregación Neighbour Joining (Fig.1) separa las poblaciones de *A. pegreffii* y *A. simplex* s.s. del Atlántico con un valor de bootstrap del 73%, mientras que el resto de las ramas carecen de robustez.

**Tabla 2. Proporciones relativas de las especies de *Anisakis* identificadas por PCR-RFLP en ambas zonas geográficas**

Especie	Zona geográfica		Total
	Mediterráneo	Atlántico	
<i>A. simplex</i> s.s.	34 %	78%	64%
<i>A. pegreffii</i>	66%	22%	35%
<i>A. typica</i>	0%	3%	2%

**Tabla 3. Frecuencias alélicas observadas en los 4 sistemas enzimáticos analizados para cada una de las 4 poblaciones de *Anisakis simplex* s.l. consideradas, APA: *A. pegreffii* procedente del Atlántico; APM: *A. pegreffii* procedente del Mediterráneo; ASM: *A. simplex* s.s. procedente del Mediterráneo; ASA: *A. simplex* s.s. del Atlántico; p es la probabilidad del test Chi-cuadrado para estimar el equilibrio de Hardy-Weinberg.**

Locus	Poblaciones			
	APA	APM	ASA	ASM
<b>PGM1</b>				
(N)	11	13	26	5
1	.682	1.000	.904	1.000
2	.045	.000	.096	.000
3	.091	.000	.000	.000
4	.182	.000	.000	.000
$\rho$	.015	-	.006	-
<b>PGM2</b>				
(N)	10	13	23	5
1	.200	.346	.478	.200
2	.650	.615	.500	.800
3	.150	.000	.022	.000
4	.000	.038	.000	.000
$\rho$	.458	.256	.402	.0111
<b>MPI</b>				
(N)	10	10	32	8
1	.050	.050	.063	.125
2	.750	.850	.797	.750
3	.100	.100	.031	.000
4	.100	.000	.094	.125
5	.000	.000	.016	.000
$\rho$	.433	1.000	.009	.015
<b>6PGD</b>				
(N)	8	7	24	3
1	.688	.643	.542	.667
2	.313	.214	.333	.167
3	.000	.071	.063	.167
4	.000	.071	.042	.000
5	.000	.000	.021	.000
$\rho$	.077	.105	1.000	1.000
<b>EST1</b>				
(N)	4	5	21	3
1	.250	.500	.357	.667
2	.500	.500	.500	.333
3	.250	.000	.143	.000
$\rho$	.086	.365	.662	1.000
<b>EST2</b>				
(N)	6	11	28	4

1	.833	.909	.964	1.000
2	.167	.091	.036	.000
$\rho$	.091	.048	.018	-

**Tabla 4. Variabilidad genética de cada una las 4 poblaciones de *Anisakis* deducida del análisis de los 6 loci investigados. Se indican los valores medios y entre paréntesis el error estándar.**

Población	Alelo/locus	%of loci polimorficos	Heterocigosidad	
			Ho	He
APA	3 (.4)	100.0	.166 (.059)	.495 (.055)
APM	2.5 (.4)	83.3	.206 (.072)	.350 (.096)
ASA	3.3 (.6)	100.0	.277 (.092)	.320 (.094)
ASM	2.0 (.4)	66.7	.222 (.141)	.320 (.107)

**Tabla 5. Valores del índice de fijación  $F_{st}$  (debajo de la diagonal) y distancias genéticas de Nei (por encima de la diagonal) entre las 4 poblaciones de *Anisakis* consideradas**

Población	APA	APM	ASA	ASM
APA	–	.046	.42	.69
APM	.955	–	.017	.022
ASA	.958	.983	–	.048
ASM	.934	.987	.953	–

**Fig.1. Dendrograma construido utilizando la matriz de distancias de Nei y el método de agregación Neighbor-Joining. El análisis bootstrap se ha realizado con 1000 replicas; solo se muestran los valores de bootstrap superiores al 50%. Se muestra el árbol de consenso.**



### 3. Discusión

La electroforesis de isoenzimas ha sido sin duda, la técnica más utilizada en el siglo pasado para estudiar la diversidad genética de nematodos en general y de anisákidos en particular. En los últimos años ha sido reemplazada por las técnicas basadas en la PCR que son más fáciles de implementar y requieren menos cantidad de material biológico sin tantas exigencias en su forma de conservación. Gracias a la técnica de electroforesis de isoenzimas, y mediante el estudio de un elevado número de loci enzimáticos se pudo constatar que *A. simplex* es un complejo de especies hermanas, integrado por 3 especies crípticas: *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* y *A. simplex* C. (Mattiucci et al., 1986, 1997; Paggi et al., 1998). *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* son 2 especies parapátricas y las costas de la Península Ibérica representan zonas donde ambas especies se encuentran en simpatría. La diferenciación entre ambas especies utilizando marcadores del ADN ribosómico se basa exclusivamente en la existencia de dos únicas diferencias fijas en la secuencia del ITS-1 (Abollo et al., 2003; Abe et al., 2006; Abe, 2008; Chen et al., 2008; Ceballos-Mendiola et al., 2010). La detección en estas posiciones de genotipos intermedios entre ambas especies ha sido interpretado mayoritariamente como reflejo de hibridación entre ambas especies (Abollo et al., 2003; Martín-Sánchez et al., 2005; Marques et al., 2006; Umehara et al., 2006; Farjallah et al., 2008), siendo motivo de controversia para otros. Las secuencias 18S y 28S están muy conservadas en *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* y no son útiles para su diferenciación (Nadler and Hudspeth, 2000; Nadler et al., 2005), pero hasta ahora no se ha estudiado ningún otro gen nuclear. Las secuencias del genoma mitocondrial (mtDNA *cox2* y mtDNA *citb*) también han proporcionado marcadores útiles para la realización de estudios taxonómicos (Valentini et al., 2006) y la identificación de estas especies pero, en este caso, tienen la limitación de la falta de recombinación genética de este ADN, por lo que no permiten confirmar o descartar la existencia de híbridos.

El análisis de los fenotipos o perfiles electroforéticos de diversos sistemas enzimáticos permite precisar la estructura molecular de las enzimas y definir las características genotípicas de las poblaciones estudiadas. El uso del isoelectroenfoque facilita la separación de los patrones de bandas y en consecuencia su interpretación. Las bandas netas, fuertemente coloreadas, reflejan una gran actividad enzimática y representan la posición de enzimas verdaderas. Por el contrario, las bandas más débiles

y de aparición inconstante se deben a la degradación parcial de las isoenzimas y no se deben de tener en cuenta; de ahí que hayamos descartado la mayor parte de los sistemas enzimáticos ensayados quedándonos sólo con 4.

Los 6 loci enzimáticos finalmente seleccionados para el análisis genético de las poblaciones de *A. simplex* s.l son polimórficos, como ya ha sido constatado en anteriores publicaciones (Nascetti et al., 1986; Mattiucci et al., 2004, 2007), si bien nosotros en general, detectamos un mayor número de alelos. No hemos encontrado ningún alelo que actúe como marcador específico de alguna de las especies o poblaciones, pero sí hay diferencias en las frecuencias alélicas.

Los valores de las distancias genéticas de Nei nos indican que, dentro de ambas especies, las dos poblaciones atlántica y mediterránea están ligeramente diferenciadas entre sí, con valores muy similares de distancia entre *A. simplex* s.s. del Atlántico y Mediterráneo por un lado, y *A. pegreffii* del Atlántico y Mediterráneo de otro (Tabla 5). Por el contrario, *A. pegreffii* del Atlántico (APA) se diferencia netamente de *A. simplex* s.s. y muestra valores de distancia genética con las poblaciones atlántica (ASA) y mediterránea (ASM) de esta especie, que caen en el rango observado entre especies distintas. Esto podría estar reflejando la existencia, sobre todo en el Mediterráneo, de hibridación entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, y explicar así, la menor diferenciación entre ambas especies en este área geográfica y el desequilibrio de Hardy-Weinberg detectado. El retrocruce de los híbridos con *A. pegreffii* permitiría la recuperación progresiva de las características de esta especie parental, tal como ponen de manifiesto los resultados de PCR-RFLP del ITS1-5,8S-ITS2 o la propia secuencia de este segmento en otras larvas L3 no incluidas en este estudio. La hibridación entre ambas especies estaría favorecida en el Mediterráneo por la mayor proporción de *A. pegreffii* en este área geográfica con respecto al Atlántico (Tabla 2), y justificaría los resultados del árbol de consenso de la Fig. 1 en el que la separación de ambas especies sólo se produce con suficiente robustez en el área atlántica.

#### 4. Referencias:

**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. *Int J Food Microbiol* 150:136–139
- Abe N, Tominaga K, 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. *Jpn J Infect Dis* 59:60–62
- Abe N (2008).** Application of the PCR-sequence-specific primers for the discrimination among larval *Anisakis simplex* complex. *Parasitol Res* 102:1073–1075
- Abollo E, Paggi L, Pascual S, D'Amelio S (2003).** Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infect, Genet and Evol* 3:175–181
- Benabdennbi I (1998).** Contribution à l'étude de la biodiversité chez les *Larroussius* (Diptera: Psychodidae) du bassin méditerranéen. Apports de l'analyse isoenzymatique. Thèse Université Strasbourg I, France
- Berland B (1961).** Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarcia* 2: 1-50
- Boussaa S, Perroteya S, Boumezzouch R, Harrak S, Hillali, Pesson B (2008).** Isoenzymatic Characterization of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) of the Marrakech Area, Morocco. *J Med Entomol* 3: 370-374
- Ceballos-Mendiola G, Valero A, Polo-Vico R, Tejada M, Abattouy N, Karl H, De las Heras C, 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. *Parasitol Res* 107:1399-1404
- Chen Q, Yu HQ, Lun ZR, Chen XG, Song HQ, Lin RQ, Zhu XQ (2008).** Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodos with zoonotic potencial. *Parasitol Res* 104:79-84
- 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



- Farjallah S, Busi M, Mahjoub MO, Slimane BB, Paggi L, Said K, D'Amelio S (2008).** Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitol Int* 57:430–436
- Felsenstein J (1989).** PHYLIP: phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* 5:164-166
- Hartwich G (1974).** Keys to genera of the Ascaridoidea. In: Anderson RC, Chabaud A, Willmott S (eds) CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates. Part II. Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal, Bucks, England, pp. 1–15
- Koie M (1993).** Nematode parasites in teleosts from 0 to 1540 m depth off the Faroe Islands (the North Atlantic). *Ophelia* 38:217–243
- Madulo-Leblond G, Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Pesson B (1991).** Comparaison entre *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire, 1906 et *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786): étude morphologique et isoenzymatique. *Parassitologia* 33: 387-391
- Marques JF, Cabral HN, Busi M, D'Amelio S (2006).** Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes off the Portuguese coast. *J Helminthol* 80:47–51
- Martín-Sánchez J, Artacho-Reinoso ME, Diaz-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, Nascetti G, Bullini L, Orecchia P, Paggi L (1986).** Genetic structure of *Anisakis physeteris* and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). *Parasitology* 93:383–387
- Mattiucci S, Nascetti G, Cianchi R, Paggi L, Arduino P, Margolis L, Bratney J, Webb SC, D'Amelio S, Orecchia P, Bullini L (1997).** Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J Parasitol* 83:401–416
- Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Ishikura H, Kikuchi K, Sato N, Cianchi R, Bullini L (1998).** Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contraecum* and

*Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). Syst Parasitol 40:81–92

**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). Int J Parasitol 31:9–14

**Mattiucci S, Abaunza P, Ramadori L, Mackenzie K, Nascetti G (2002).** *Anisakis* spp. Larvae (Nematoda: Anisakidae) as biological tags: Genetic Markers and Fish Stocks Implication. Medimond 223-227. 10<sup>th</sup> International Congress of Parasitology. Vancouver (Canada), August 4-9

**Mattiucci S, Cianchi R, Nascetti G, Paggi L, Sardella N, Timi J, Webb SC, Bastida R, Rodriguez D, Bullini L (2003).** Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of Boreal and Austral regions. Syst Parasitol 54:13–23

**Mattiucci S, Abaunza P, Ramadori L, Nascetti G (2004).** Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. J Fish Biol 65:495-510

**Mattiucci S., Paoletti M., Damiano S. and Nascetti G (2007).** Molecular detection of sibling species in anisakid nematodes. Parassitologia 49:147–153

**Mattiucci S, Nascetti G (2008).** Advances and trends in the molecular systematic of anisakid Nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. Adv Parasitol 66:147–148

**Nadler SS, Hudspeth DSS (2000).** Phylogeny of the ascaridoidea (Nematoda, Ascaridida) based on three genes and morphology, hypotheses of structural and sequence evolution. J Parasitol 86:380-393

**Nadler SA, D'Amelio S, Dailey MD, Paggi L, Siu S, Sakanari JA (2005).** Molecular phylogenetics and diagnostic of *Anisakis*, *Pseudoterranova* and *Contracaecum* from northern pacific marine mammals. J Parasitol 6:1413–1429

**Nei M (1972).** Genetic distance between populations. Am. Nat 106: 583-590

- Nascetti G, Paggi L, Orecchia P, Smith JW, Mattiucci S, Bullini L (1986).** Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *Int J Parasitol* 16:633–640
- Nascetti G, Cianchi R, Mattiucci S, D'Amelio S, Orecchia P, Paggi L, Brattey J, Berland B, Smith JW, Bullini L (1993).** Three sibling species within *Contraecum osculatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic-Boreal region: reproductive isolation and host preferences. *Int J Parasitol* 23:105–120
- Paggi L, Nascetti G, Webb S, Mattiucci S, Cianchi R, Bullini L (1998).** A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae) from beaked whales (Ziphiidae). Allozyme and morphological evidence. *Syst Parasitol* 40:161-174
- Petter JA, Maillard C (1988).** Larves d'ascarides parasites de poissons en Méditerranée Occidentale. *Bull Mus Natl Hist Nat Paris* 10:347–369
- Pontes T, D'Amelio S, Costa G, 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. *J Parasitol* 91:1430–1434
- Raymond M and Rousset F (1995).** GENEPOP version 1.2: population genetics software for exact test and ecumenicism. *J Hered* 86:248-249
- Swofford DL, Selander RB (1981).** BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J Hered* 72:281–283
- Felsenstein J (1989).** PHYLIP—Phylogeny Inference Package (version3.2). *Cladistics* 5:164–166
- Umehara A, Kawakami Y, Matsui T, Araki J, Uchida A (2006).** Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol Int* 55:267–71
- 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

**Yoshinaga T, Ogawa K, Wakabayashi H (1987).** Experimental life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in fresh water. *Fish Pathol* 22:243-251

**Wright S (1978).** *Evolution and the Genetics of Populations* vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago, IL.

*Discusión general*

#### IV. Discusión general

Sin duda, uno de los principales factores de riesgo de la sensibilización a *Anisakis* es el consumo de pescado. El tercer estadio larvario de las especies del complejo *Anisakis simplex* se encuentra parasitando gran número de peces y cefalópodos que forman parte de la dieta humana (Pereira Bueno, 1992; Ishikura et al., 1996; Audicana & Kennedy, 2008).

Entre los peces de frecuente consumo por la población marroquí figura el jurel (*Trachurus trachurus*) y la caballa (*Scomber japonicus*). Por ello, hemos considerado de interés realizar estudios epidemiológicos en estas especies de pescado, determinando al mismo tiempo los factores asociados a la infección de estos peces, así como llevar a cabo la identificación genética de la especie de *Anisakis* incriminada. La ingestión accidental del parásito provoca en el hombre cuadros gastrointestinales más o menos severos y reacciones alérgicas cuya sintomatología varía desde urticaria a choque anafiláctico (Del Pozo et al., 1997; Daschner et al., 2000). También, en profesionales que manipulan el pescado, la exposición cutánea mucosa puede producir una alergia ocupacional que oscila entre dermatitis de contacto, rinoconjuntivitis y asma profesional (Armentia et al., 1998; Scala et al., 2001). Además se ha comprobado que puede existir sensibilización frente a *Anisakis* sin que exista una sintomatología aparente (Purello-D'Ambrosio et al., 2000, Fernández de Corres et al., 2001; Johansson et al., 2001; Caballero & Moneo, 2004; Rodero et al., 2005; Del Rey Moreno et al., 2006; Solas et al., 2009).

Es ampliamente reconocido que el hombre puede adquirir la anisakiosis a través del consumo de caballa cruda, como se ha podido constatar en Japón donde es una de las principales causas de infección (Suzuki et al., 2010); en el norte de Marruecos esta práctica es una forma frecuente de consumir este pescado. Por el contrario, la población marroquí suele cocinar el jurel antes de consumirlo por lo que en éste caso sólo podrían estar implicados los alérgenos termoestables. Para completar el análisis, debíamos conocer el grado de sensibilización de la población

marroquí frente a *Anisakis* del que además existía una carencia absoluta de datos en este país.

Como hemos podido comprobar en el presente estudio, los peces capturados en aguas del norte de Marruecos muestran altas prevalencias de parasitación por *A. simplex* s.l., tratándose fundamentalmente de *A. pegreffii*. Aunque estas cifras son más elevadas en caballa (62.4%) que en jurel (54.9%), en ambos peces, la prevalencia en musculatura es baja, 9.8 y 8.6% respectivamente, con muy bajo número de larvas en esta localización. Interpretamos que estos resultados están relacionado con el menor poder de penetración en la musculatura del pez de *A. pegreffii*. Este hallazgo podría ser de interés económico para Marruecos, al permitir ofrecer una buena imagen sanitaria de los peces capturados en aguas de este país.

En Marruecos, la industria pesquera ha experimentado un gran auge en los últimos años, así, se estima que su potencial de producción es de aproximadamente 1.5 millones de toneladas/año, apareciendo como el primer productor de pescado en África con un suministro del 1.2% de la producción mundial (FAO, 2003b). Sin embargo, a pesar de la importancia económica que supone los productos del mar para este país, hasta época reciente no se le había dedicado un interés manifiesto al parasitismo y a los problemas económicos y sanitarios que genera. Entre estos parásitos, los anisákidos ocupan, sin duda, un papel privilegiado en cuanto a su capacidad para provocar problemas estéticos en el pescado y ser origen de problemas sanitarios.

La identificación de las características del pescado que actúan como factores de riesgo de su infección por *Anisakis* puede utilizarse para elaborar un elenco de medidas profilácticas frente a la anisakiosis humana. Hemos podido comprobar que los modelos que definen este riesgo en jurel y caballa son distintos, lo cual está lógicamente relacionado con las diferentes características ecológicas y dietéticas de estas dos especies de peces. Aún así, parece que evitar el consumo de pescado de mayor peso puede ser una buena medida profiláctica de carácter general. En *T. trachurus*, el riesgo de presencia del parásito en músculo es máximo durante el verano, siendo 5 veces mayor que en el resto de las estaciones, por lo que las

personas más susceptibles a la infección por anisákidos podrían evitar el consumo de este pescado durante la estación más calurosa del año.

Hasta la actualidad no se ha notificado ningún caso clínico de anisakiosis humana en Marruecos. La investigación sobre la sensibilización subclínica frente a *Anisakis* tipo I que hemos realizado sobre la población del norte de Marruecos nos ha permitido fijar esta prevalencia en el 5.1%, cifra mucho más baja que la encontrada en España, donde la casi totalidad de los casos se deben al consumo de boquerones en vinagre (Alonso-Gómez et al., 2004; Daschner et al., 1998). La población marroquí no consume boquerones en vinagre pero sí otras especialidades de pescado crudo como la caballa marinada. A nuestro parecer, la baja prevalencia de sensibilización a *Anisakis* de la población del norte de Marruecos, estaría relacionada con las bajas prevalencia e intensidad del parásito en la musculatura de estos peces que representa la parte que se consume, lo que a su vez está relacionado con la especie de *Anisakis* incriminada en la infección, fundamentalmente *A. pegreffii*. Efectivamente, *A. pegreffii* es la principal especie que parasita la caballa y el jurel capturados en el litoral del norte de Marruecos; y ha demostrado un menor poder de penetración en la musculatura de los peces en comparación con *A. simplex* s.s. (Suzuki et al., 2010) por lo que podemos considerarla una especie menos patógena.

Aunque son pocas las larvas procedentes de casos humanos que se han identificado por métodos moleculares, el estudio más importante realizado en Japón por Umehara et al., (2007), señala a *A. simplex* s.s. como el principal agente etiológico de la anisakiosis en este país; sólo uno de los pacientes estaba infestado por *A. pegreffii*. En contraste, en Italia se considera que *A. pegreffii* es el principal agente etiológico de la anisakiosis gástrica, habiéndose identificado por técnicas moleculares las larvas aisladas de 3 casos clínicos (D'Amelio et al., 2000; Fumarola et al., 2009). Es importante señalar que las costas japonesas son áreas de simpatria entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, encontrando también individuos híbridos, mientras que en el Mediterráneo occidental no está presente *A. simplex* s.s., y *A. pegreffii* tiene una amplia representación en todas las especies de peces (Umehara et al., 2006; Mattiucci et al., 2007)



De esta forma, la menor probabilidad de infección de la población marroquí al consumir pescado con tan altos porcentajes de infección como los que hemos puesto de manifiesto, se justificaría, de un lado, porque la prevalencia de infección del músculo es baja, y de otro, porque aunque se produjera la ingestión de la larva, el menor poder de infección de *A. pegreffii* reduciría las probabilidades de sensibilización del individuo frente a este parásito. Tampoco parecen producirse problemas de alergia a *Anisakis*, tales como dermatitis de contacto, entre los pescadores de Tánger, lo cual otros autores han indicado que ocurre en trabajadores que están en contacto directo con el pescado (Barbuzza et al., 2009).

De cualquier forma, no podemos descartar que la ausencia del diagnóstico de casos clínicos, no pueda también estar relacionada con el mal conocimiento por parte de los médicos de la anisakiosis y de la alergia al parásito, y de su confusión con otras enfermedades más conocidas que presentan cuadros clínicos similares.

Otro factor importante a tener en cuenta es la susceptibilidad del hombre a presentar cuadros alérgicos frente a este parásito, la cual se ha sugerido que podría estar determinada genéticamente. Así, se ha indicado la existencia de asociación entre la presencia de determinados alelos HLA clase II y la sensibilización frente a *Anisakis* (Audicana & Kennedy, 2008), de forma similar a la establecida para otras infecciones helmínticas como la hidatidosis, esquistosomosis u oncocercosis (Meyer et al., 1996; Murdoch et al., 1997; Eiermann et al., 1998; Hirayama et al., 1998). Sánchez-Velasco et al., 2000 sugieren que el haplotipo DRB1\*1502-DQB1\*0601 puede considerarse un factor de susceptibilidad para la hipersensitividad a los antígenos de *A. simplex*. En Europa, este haplotipo es relativamente frecuente en escoceses, españoles de raza gitana, rumanos e italianos. Existen diversos estudios que intentan describir la variabilidad genética del alto polimórfico sistema HLA en la población marroquí (Gómez-Casado et al., 2000; Brick et al., 2006). En Marruecos, la frecuencia de los alelos DRB1\*1502 y DQB1\*0601 es baja, con valores del 1.5 y 1%, respectivamente (Gómez-Casado et al., 2000), lo que también podría estar contribuyendo a la ausencia de casos clínicos tal como se ha sugerido que ocurre en Noruega (Sánchez-Velasco et al., 2000).

La identificación genética de las larvas L3 de *Anisakis* tipo I que hemos recogido a lo largo de este estudio epidemiológico, nos indica, como antes hemos referido, que *A. pegreffii* es la especie dominante en aguas del norte de Marruecos, tanto en el Mediterráneo como en el Atlántico. Por el contrario *A. simplex* s.s. está sólo débilmente representado en aguas atlánticas marroquíes. Esto está de acuerdo con lo indicado por Mattiucci & Nascetti, (2008), que sitúan el límite sur de *A. simplex* s.s. dentro del Atlántico noroeste en las aguas del Estrecho de Gibraltar. *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* son 2 especies parapátricas y las costas de la Península Ibérica representan zonas donde ambas especies se encuentran en simpatria, compartiendo tanto hospedadores definitivos como intermediarios/paraténicos. En las costas de la Península ibérica, las prevalencias más altas de parasitación por *A. simplex* s.s. se dan en el norte, descendiendo hasta el sur. Inversamente, *A. pegreffii* muestra las prevalencias más altas en el mar de Alborán y más bajas en las costas cantábricas (Abollo et al., 2003; Martín-Sánchez et al., 2005; Marques et al., 2006).

La diferenciación entre ambas especies utilizando marcadores del ADN ribosómico se basa exclusivamente, en la existencia de dos únicas diferencias fijas en la secuencia del ITS-1, tal como hemos podido confirmar en este estudio. La detección en estas posiciones de genotipos intermedios entre ambas especies es interpretado mayoritariamente como reflejo de hibridación entre ambas especies, posición que nosotros apoyamos (Abollo et al., 2003; Martín-Sánchez et al., 2005; Marques et al., 2006; Umehara et al., 2006; Farjallah et al., 2008), siendo motivo de controversia para otros. Nosotros hemos encontrado un 16.4% de genotipos híbridos en aguas españolas con proporciones similares ( $p=0.475$ ) en las costas atlánticas (15.2%) y en las mediterráneas (20.0%). Más al sur en las vecinas costas de Marruecos, los híbridos constituyen el 14.9%; se trata de una cifra similar a la encontrada en las costas españolas ( $p= 0.592$ ) y tampoco aquí hay diferencias entre el Atlántico y el Mediterráneo ( $p= 0.575$ ).

Llama la atención que con tan baja proporción de *A. simplex* s.s., el porcentaje de híbridos sea similar, sin embargo, el 75.9% (22/29) de los híbridos marroquíes muestran este genotipo híbrido únicamente con una de las dos enzimas de

restricción que permiten diferenciar las especies parentales (Taq o Hinf), mientras que con la otra, muestran un patrón de bandas indiferenciable de *A. pegreffii*. Entre los híbridos españoles esto ocurre en una proporción inferior ( $p= 0.001$ ), concretamente un 33.3% (9/27). Nos resulta también interesante resaltar que no hemos encontrado ningún híbrido que parece más a *A. simplex* s.s.

Ante esta panorámica, sería de gran interés disponer de otros marcadores genéticos que fueran útiles en la identificación de estas especies. Las secuencias 18S y 28S están muy conservadas en *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* no siendo válidas para su diferenciación (Nadler & Hudspeth, 2000; Nadler et al., 2005) y no se ha secuenciado ningún otro gen nuclear. La técnica de RAPD-PCR permite analizar el polimorfismo de gran variedad de genes anónimos repartidos por todo el genoma del parásito, especialmente en las regiones variables del mismo. Martín-Sánchez et al., (2005) analizan con esta técnica, la variación genética del complejo *A. simplex* s.l. en aguas españolas poniendo de manifiesto la existencia de flujo génico entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*.

Las secuencias del genoma mitocondrial (mtDNA *cox2* y mtDNA *citb*), también han proporcionado marcadores útiles para la realización de estudios taxonómicos (Valentini et al., 2006) y la identificación de anisákidos. En el presente trabajo hemos puesto de manifiesto la validez de la secuencia del gen mitocondrial *cox2* para poner de manifiesto la diversidad genética de las dos especies hermanas y para la construcción de árboles filogenéticos en los que ambas especies se muestran separadas. La existencia de 10 diferencias fijas entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* permitiría fácilmente la diferenciación de ambas especies mediante una técnica de PCR-RFLP, una vez identificadas las enzimas de restricción adecuadas. No obstante, los marcadores mitocondriales tienen la limitación de la falta de recombinación genética de este ADN, por lo que no permiten confirmar o descartar la existencia de híbridos. Sí hemos podido poner de manifiesto la existencia de un caso de introgresión mitocondrial, es decir, una larva L3 con ADN nuclear de *A. simplex* s.s. y ADN mitocondrial de *A. pegreffii*.

La presencia de larvas híbridas entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* se han también puesto de manifiesto, también en escaso número, en las costas atlánticas

ibéricas, utilizando marcadores isoenzimáticos (Mattiucci et al., 2004). Estos autores, han establecido un elenco de loci enzimáticos diagnósticos del género *Anisakis*, encontrando diferencias alélicas fijas entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* en los loci Sod-1, Adk-2, Lap-1, Pep B, PepC-1 y PepC-2.

Aunque la técnica de electroforesis de isoenzimas adolece de no pocas limitaciones, especialmente la complejidad en la interpretación de los patrones de bandas isoenzimáticas y la necesidad de gran cantidad de material biológico adecuadamente conservado, no podemos olvidar que, gracias a ella, se han conseguido los principales avances en identificación y sistemática de anisákidos. La realización de la electroforesis de isoenzimas en geles de agarosa ultrafinos que llevan incorporados anfolitos con distintos rangos de pH (isoelectroenfoque), favorecen la separación de las bandas alélicas facilitando la interpretación de los fenotipos y permiten reducir la cantidad de muestra. Cuatro de las enzimas ensayadas (PGM, MPI, EST y 6PGD) han presentado un notable polimorfismo y nos han servido para el estudio de la estructura genética de poblaciones del complejo *A. simplex* y la construcción de un dendrograma basado en distancias genéticas. En el árbol de consenso así construido encontramos que la separación de ambas especies sólo se produce con suficiente robustez en el área atlántica.

Los resultados obtenidos podrían estar reflejando la existencia en áreas de simpatria de ambas especies y especialmente en el Mediterráneo, la hibridación entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*, explicando así la menor diferenciación entre ambas especies en este área geográfica y el desequilibrio de Hardy-Weinberg detectado. En nuestra opinión, la hibridación entre ambas especies estaría favorecida en el Mediterráneo por la mayor proporción de *A. pegreffii* en este área geográfica con respecto al Atlántico. El retrocruce de los híbridos con *A. pegreffii* permitiría la recuperación progresiva de las características de esta especie parental en cuyo proceso se originarían los individuos que sólo manifiestan el carácter híbrido con una enzima en la PCR-RFLP del ITS1-5,8S-ITS2. Pensamos que todo esto, no refleja más que el proceso gradual y acumulativo de la especiación, siendo *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* dos especies parapátricas que, en

mayor o menor proporción, continúan hibridándose en condiciones naturales de simpatria.

*Conclusiones*

#### IV. Conclusiones

1. Los peces de frecuente consumo por la población del norte de Marruecos, tales como el jurel (*Trachurus trachurus*) y el estornino (*Scomber japonicus*) capturados en aguas marroquíes, muestran altas prevalencias por *A. simplex* s.l., aunque en musculatura los parámetros de infección son bajos.
2. El consumo de estornino de menor peso se presenta como una buena medida profiláctica de la anisakiosis, ya que cuanto mayor es el peso del pescado más alta es la probabilidad de que el parásito esté en la musculatura. En cambio, en el jurel, para minimizar el riesgo de infección humana se debe evitar el consumo de pescados de mayor tamaño durante el verano, dado que el riesgo de presentar parásitos en el músculo es 5 veces mayor que en el resto de las estaciones.
3. *A. pegreffii* es la principal especie que parasita el estornino y el jurel capturados en el litoral del norte de Marruecos.
4. Se denuncia por primera vez sensibilización frente a *Anisakis* en la población marroquí, aunque las cifras de prevalencia son bajas (5,1%).
5. Confirmamos que la diferenciación entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* con el fragmento ITS1-5,8S-ITS2 del ADN ribosómico, se basa exclusivamente en la existencia de dos únicas diferencias fijas en la secuencia del ITS-1.
6. Demostramos la validez de la secuencia del gen mitocondrial *cox2* para estudiar la diversidad genética de las dos especies hermanas y para la construcción de árboles filogenéticos en los que ambas especies se muestran separadas. Entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* detectamos diez diferencias fijas.
7. La realización de la electroforesis de isoenzimas con la técnica isoelectroenfoque permite identificar cuatro enzimas (PGM, MPI, EST y 6PGD) polimórficas que sirven para estudiar la estructura genética de poblaciones del complejo *A. simplex* y la construcción de dendrogramas. En el árbol de consenso así construido encontramos que la separación de ambas especies sólo se produce con suficiente robustez en el área atlántica.

8. Los resultados obtenidos con los tres tipos de marcadores genéticos estudiados, apoyan la existencia en áreas de simpatría de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* como son las costas de la Península Ibérica, de hibridación entre ambas especies.



## *Bibliografía*

- 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. *Int. J. Food. Microbiol.* 150:136–139.
- Abe N., Ohya N., Yanagiguchi R. (2005).** Molecular characterization of *Anisakis pegreffii* larvae in Pacific cod in Japan. *J. Helminthol.* 79: 303-306.
- Abe N., Tominaga K., 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. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59:60–62.
- Abe N. (2008).** Application of the PCR-sequence-specific primers for the discrimination among larval *Anisakis simplex* complex. *Parasitol. Res.* 102:1073–1075.
- Abollo E., Gestal C., Pascual S. (2001).** Anisakid infection in the European shag *Phalacrocorax aristotelis aristotelis*. *J. Helminthol.* 75:209-214.
- Abollo E., Paggi L., Pascual S., D'Amelio S. (2003).** Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infect. Genet. Evol.* 3:175–181.
- Acebes Rey JM., Fernández Orcajo P., Díaz González G., Velicia Llamas R., González Hernández JM., Citores González R. (1996).** Dos casos de anisakiasis en el Hospital del Río Hortega. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 88:59-60.
- Adams AM. & Devlieger DD. (2000).** parásitos del mar: la prevención, la inspección y el HACCP En: "Manual de enfermedades transmitidas por alimentos", (Eds. YH Hui, SA Sattar, KD Murrell, Nip WK y PS Stanfield Marcel Dekker) pp: 407-423.
- Aesan (2005).** Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. La alergia por *Anisakis* y medidas de prevención. *Revista del Comité Científico de la AESAN.* 1:19-35.
- Akao N., Ohyama T., 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. *J. Helminthol.* 64:310-318.
- Akasaka Y., Kizu M., Aoike A., Kawai K. (1979).** Endoscopic management of acute gastric anisakiosis. *Endoscopy* 2:158-162.

- Alonso MC., Van Damme J., Vandekerckhove J., Cross RA. (1998).** Proteolytic mapping of kinesin/ncd-microtubule interface: nucleotide-dependent conformational changes in the loops L8 and L12. *EMBO J.* 17:945-951.
- Alonso-Gómez A., Moreno-Ancillo A., López-Serrano CM., Suárez-de-Parga JM., Daschner A., Caballero MT., Barranco P., Cabañas R. (2004).** *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasites the gastrointestinal tract. *Parasitol. Res.* 93:378-384.
- Amo Peláez M., Muñoz Codoceo C., Martínez Montiel P., Sánchez Gómez F., Castellano G., Solís Herruzo JA. (2008).** Anisakiasis múltiple. *Rev. esp. enferm. dig.* 100:581-582.
- Anadón AM., Romarís F., Escalante M., Rodríguez E., Gárate T., Cuellar C., Ubeira FM. (2009).** The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clin. Exp. Immunol.* 156:471-478.
- Anadón AM., Rodríguez E., Gárate T., Cuellar C., Romarís F., Chivato T., Rodero M., González Díaz H., Ubeira FM. (2010).** Diagnosis human anisakiasis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus CAP FEIA (R). *Clin. Vaccine Immunol.* 17:496-502.
- Anderson RC. (1992).** Nematodes parasites of vertebrates. Their development and transmission. CAB International, Wallingford.
- Anderson TJ., Komuniecki R., Komuniecki PR., Jaenike J. (1995).** Are mitochondria inherited paternally in *Ascaris*? *Int. J. Parasitol.* 25: 1001-1004.
- Añibarro B. & Seoane FJ. (1998).** Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102:331-232.
- Arenal-Vera JJ., Marcos-Rodríguez JL., Borrego-Pintado MH., Bowakin-Dib W., Castro-Lorenzo J., Blanco-Álvarez JL. (1991).** Anisakiasis como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico. El primer caso en la literatura médica. *Rev. Esp. Enf. Dig.* 79:355-358.
- Armentia A., Lombardero M., Callejo A., Martín Santos JM., Gil FJ., Vega J., Arranz ML., Martínez C. (1998).** Occupational asthma by *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 5:831-834.

- Asaishi K., Nishino C., Ebata T., Totsuka M., Hayasaka H., Suzuki T. (1980).** Studies on the etiologic mechanism of anisakiasis. 1. Immunological reactions of digestive tract induced by *Anisakis* larva. *Gastroenterol Jpn.* 2:120-127.
- Asturias JA., Eraso E., Martínez A. (2000a).** Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108:263-267.
- Asturias JA., Eraso E., Moneo I., Martínez A. (2000b).** Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*? *Allergy* 9:898-899.
- Audicana MT., Fernández de Corres L., Muñoz D., Fernández E., Navarro JA. Del Pozo MD. (1995a).** Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96:558-560.
- Audicana MT., Fernández de Corres L., Muñoz D., Del Pozo MD., Fernández E., (1995b).** *Anisakis simplex*: una nueva fuente de antígenos alimentarios. Estudio de sensibilización a otros parásitos del orden Ascaridoidae. *Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clin.* 10:326-331. *Ascaridoidae*.
- Audicana L., Audicana MT., Fernández de Corres L., Kennedy MW. (1997).** Cooking and freezing may not protect against allergic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in human. *Vet. Rec.* 140:235.
- Audicana M., García M., Del Pozo MD., Moneo I., Diez J., Muñoz D., Fernández E., Echenagusia M., Fernández de Corres L., Ansotegui IJ. (2000).** Clinical manifestations of allergy to *Anisakis simplex*. *Allergy* 55:28-33.
- Audicana MT. & Kennedy MW. (2008).** *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:360-379.
- Baeza Ochoa ML. & San Martín MS. (2000).** Termoestabilidad de los antígenos de la larva *Anisakis simplex*. *Alergol. Inmunol. Clin.* 15:240-246.
- Baeza ML., Zubeldia JM, Rubio M. (2001).** *Anisakis simplex* allergy. *ACI International.* 13:242-249.
- Baldwin RE., Rew MB., Johansson ML., Banks MA., Jacobson KC. (2011).** Population structure of three species of *Anisakis* nematodes recovered from Pacific sardines

- (*Sardinops sagax*) distributed throughout the California Current system. *J. Parasitol.* 97:545-554.
- Barbuzza O., Guarneri F., Galtieri G., Gangemi S., Vaccaro M. (2009).** Protein contact dermatitis and allergic asthma caused by *Anisakis simplex*. *Contact Dermatitis* 60:239-240.
- Barón S., Martín-Sánchez J., Gállego M., Morales-Yuste M., Boussaa S., Morillas-Márquez F. (2008).** Intraspecific variability (rDNA ITS and mtDNA Cyt b) of *Phlebotomus sergenti* in Spain and Morocco. *Acta Trop.* 107:159-267.
- Barros C., Manzarbeitia F., López-Vélez R., Oñate JM. (1992).** Anisakiasis Humana en España por consumo de sardinas crudas. *Alimentaria* 57-61.
- Beitia JM., Tornero P., Sainz JC., Barranco R., Infante S., Baeza ML., Herrero Gregorio T. (2002).** Contact dermatitis caused by *Anisakis simplex*: a case report. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109:78.
- Berland B. (1961).** Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2:1-50.
- Boczon K. & Bier JW. (1986).** *Anisakis simplex*: uncoupling of oxidative phosphorylation in the muscle mitochondria of infected fish. *Exp. Parasitol.* 61:270-279.
- Bouree P., Paugam A., Petithory JC. (1995).** Anisakiasis: report of 25 cases and review of the literature. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2:75-84.
- Bratney J. (1988).** A simple technique for recovering larval ascaridoid nematodes from the marine fish. *J. Parasitol.* 74:735-737.
- Brick C., Bennani N., Atouf O., Essakalli M. (2006).** HLA-A, -B, -DR and -DQ allele and haplotype frequencies in the Moroccan population: a general population study. *Transfus. Clin. Biol.* 13:346-52.
- Bublitz CG. & Choudhury GS. (1992).** Effect of light intensity and color on worker productivity and parasite detection efficiency during handling of cod fillets. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 1:75-89.
- Buzzell GR. & Sommerville RI. (1985).** The structure of the esophagus in the third-stage ineffective larva of *Anisakis* sp. (Nematoda: Anisakidae). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 104:86-94.
- Caballero ML. & Moneo I. (2004).** Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitol. Res.* 93:248-251.

- Caballero ML, Moneo I, Gómez-Aguado F, Corcuhera MT, Casado I, 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. *Parasitol. Res.* 103:1231-1233.
- Caballero ML, Umpierrez A, Moneo I, Rodríguez-Pérez R. (2011).** Ani s 10, a new *Anisakis simplex* allergen: Cloning and heterologous expression. *Parasitol. Int.* 60:209-212.
- Campana-Rouget Y. & Biocca E. (1995).** Une nouvelle espèce d'*Anisakis* chez une phoque Méditerranéen. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 30:477-480.
- Canut-Blasco A, Labora-Loriz A, De Torre-Ramírez JL, Romero-Ramírez JA. (1996).** Anisakiosis gástrica aguda por cocción insuficiente en horno microondas. *Med. Clin. Barc.* 106:317-318.
- Carretero Aníbarro P, Blanco Carmena J, García González F, Marcos Durantez M, Alonso Gil L, Garcés Sotillos M, Pérez Giménez R, Juste Picton S, Gutiérrez Ortega MC. (1997).** Protein contact dermatitis caused by *Anisakis simplex*. *Contact Dermatitis* 37:247.
- Carretero P, Rivas C, Todo P, Gómez B, Núñez C, Alday E, Moreno I. (1998).** Anafilaxia tras realización de prick-test a *Anisakis simplex*. *Rev. Esp. Alergol. Immunol. Clin.* 13:226-228.
- Castán B, Borda F, Iñarrairaegui M, Pastor G, Vila J, Zozoya M. (2002).** Anisakiasis digestiva: clínica y diagnóstico según localización. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 94:463-467.
- Ceballos-Mendiola G, Valero A, Polo-Vico R, Tejada M, Abattouy N, Karl H, De las Heras C, 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. *Parasitol. Res.* 107:1399-1404.
- Chai W, Shay JW, Wright EW. (2005).** Human telomeres maintain their overhang length at senescence. *Mol. Cell. Biol.* 25:2158-2168.
- Chen Q, Yu HQ, Lun ZR, Chen XG, Song HQ, Lin RQ, Zhu XQ. (2008).** Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodos with zoonotic potencial. *Parasitol. Res.* 104:79-84.

- Cheng TC. (1982).** *Anisakis*. Handbook series in zoonoses: parasitic zoonoses. CRC Press. Florida. 2:37-52.
- Christie JF., Dunbar B., Kennedy MW. (1993).** The ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris suum*: epitope stability, mass spectrometry, and N-terminal sequence comparison with its homologue in *Toxocara canis*. *Clin. Exp. Immunol.* 92:125-32.
- 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.
- Cocheton JJ., Cabou I., Lecomte I. (1991).** Anisakiasis and *Anisakis* infections. *Ann Med. Interne.* 2:121-130.
- Cross MA., Collins C., Campbell N., Watts PC., Chubb JC., Cunningham CO., Hatfield EMC., MacKenzie K. (2007).** Levels of intra-host and temporal sequence variation in large COI sub-units from *Anisakis simplex* sensu stricto (Rudolphi 1809) (Nematoda: Anisakidae): implications for fisheries management. *Mar. Biol.* 151:695-702.
- Cruchaga S., Pascual J., Muñoz F., Guerra A., Ladrón de Guevara C. (1995).** Hallazgo endoscópico de una larva de gusano en el fondo de ulcera gástrica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 13:631-632.
- Cuende E., Almeida V., Portu J., Aldamiz M., Erdozain MA., Vesga JC., Saracibar N. (1998).** Poncet's disease and papulonecrotic tuberculid in a patient infected with the human immunodeficiency virus. *Arthritis Rheum.* 41:1884-1888.
- 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., Barranco JM. Suárez de Parga, MC. López-Serrano MC. (1998).** Gastric anisakiasis: an underestimated cause of acute urticaria and angio-oedema. *Br. J. Dermatol.* 139:822-828.
- Daschner A., Alonso-Gómez A., Cabañas 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.* 105:176-181.

**Daschner A., Cuellar C., Sánchez-Pastor S., Pascual CY., Martín-Esteban M. (2002).** Gastro-allergic anisakiasis as a consequence of simultaneous primary and secondary immune response. *Parasite Immunol.* 24:243-251.

**Davey JT. (1971).** A revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridata). *J. Helminthol.* 45:51-72.

**Deardorff TL. & Throm R. (1988).** Commercial blast-freezing of third-stage *Anisakis simplex* larvae encapsulated in salmon and rockfish. *J. Parasitol.* 90:1047-1450.

**Deardorff TL. & Kent ML. (1989).** Prevalence of larval *Anisakis simplex* in pen-reared and wild-caught salmon (Salmonidae) from Puget Sound, Washington. *J. Wildl. Dis.* 25:416-419.

**Deardorff TL. & Overstreet RM. (1990).** Sea-food transmitted zoonoses in the United States: the fishes, the dishes, and the worms, p. 221-265. In D. R. Ward and C. Hackney (ed.), *Microbiology of marine food products*. Van Nostrand Reinhold, New York, NY.

**Del Pozo MD., Moneo I., Fernández de Corres L., Audicana MT., Muñoz D., Fernández E., Navarro JA., García MÇ. (1996).** Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy. *J. Allergy Clin Immunol.* 97:977-984.

**Del Pozo MD., Audicana M., Díez JM., Muñoz D., Ansotegui IJ., Fernández E., García M., Etxenagusia M., Moneo I., Fernández de Corres L. (1997).** *Anisakis simplex*, a relevant etiologic factor in acute urticaria. *Allergy* 52:576-579.

**Del Rey Moreno A. (2003).** Estudio parasitológico, epidemiológico, y clínico de la anisakidosis en la comarca de Antequera. *Tesis Doctoral. Universidad de Granada, Granada, España.*

**Del Rey Moreno A., Valero A., Mayorga C., Gómez B., Torres MJ., Hernández J., Ortiz M., Lozano Maldonado. (2006).** Sensitization to *Anisakis simplex* s.l. in a healthy population. *Acta Trópica* 97:265-269.

**Del Rey-Moreno A., Valero-López A., Gómez-Pozo B., Mayorga-Mayorga C., Hernández-Quero J., Garrido-Torres-Puchol ML., Torres-Jaén MJ., Lozano-**



- Maldonado J. (2008).** Use of anamnesis and immunological techniques in the diagnosis of anisakidosis in patients with acute abdomen. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 100:146-152.
- Domínguez-Ortega J. & Martínez-Cócera C. (2000).** Guía de actuación en patología producida por *Anisakis*. *Alergol. Inmunol. Clin.* 15:267-272.
- Domínguez-Ortega J., Cimarra M., Sevilla M., Alonso-Llamazares A., Moneo I., Robledo-Echarren T., Martínez-Cocerá C. (2000).** *Anisakis simplex*: una causa de pseudobstrucción intestinal. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 92:132-135.
- Dong FM., Ton MN., Adams AM., MacKenzie AP., Wekell MM. (2000).** Survival of *Anisakis simplex* in freeze-processed Arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). Institute of Food Technologists. *IFT. Annual Meeting, June 10-14, Dallas, TX.*
- Dreborg S.** Skin tests used in type I allergy testing. In Dreborg, S.: (ed.). (1989) Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 44:1-59.
- Dzienkonska-Rynko J., Rokicki J., Jablonowski Z. (2002).** Effects of ivermectin and albendazole against *Anisakis simplex* *in vitro* and guinea pigs. *J. Parasitol.* 88:395-398.
- Eiermann TH., Bettens F., Tiberghien P., Schmitz K., Beurton I., Bresson-Hadni S., Ammann RW., Goldmann SF., Vuitton DA., Gottstein B., Kern P. (1998).** HLA and alveolar echinococcosis. *Tissue Antigens* 52:124-129.
- Esteve C., Resano A., Díaz-Tejeiro P., Fernández-Benitez M. (2000).** Eosinophilic gastritis due to Anisakiasis: a case report. *Allergol. Immunopathol.* 28:21-23.
- FAO. (2003a).** Report of the working Group on the assessment of small-pelagic fish off northwest Africa. Agadir, Morocco. 31 March-10 April 2003. *FAO. Fish Rep.* 723: 152.
- FAO. (2003b).** Rapport sur le secteur des pêches maritimes au Maroc et la réforme fiscale pour la promotion de la croissance et l'aménagement durable. 13-15 Octobre 2003. 15 pp.
- Farjallah S., Busi M., Mahjoub MO., Slimane BB., Paggi L., Said K., D'Amelio S. (2008).** Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitol. Inter.* 57:430-436.
- Fernández de Corres L., Audicana MT., Del Pozo MD., Muñoz D., Fernández E., Navarro JA., García M., Diez J. (1996).** *Anisakis simplex* induces not only anisakiasis:

report n°28 cases of allergy caused by this nematode. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 6:315-319.

**Fernández de Corres L., Del Pozo MD., Aizpuru F., 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*. *Alergol. Inmunol. Clin.* 16:337-346.

**Fredericksen DW. & Specian RD. (1981).** The value of cuticular fine structure in identification of juvenile anisakine nematodes. *J. Parasitol.* 67:647-655.

**Fujino T., Ooiwa T., Ishii Y. (1984).** Clinical, epidemiological and morphological studies on 150 cases of acute gastric anisakiasis in Fukuoka Prefecture. *Jpn. J. Parasitol.* 33:73-92.

**Fukuda T., Aji T., Tonga Y. (1988).** Surface ultrastructure of larval Anisakidae (Nematoda: Ascaridoidea) and its identification by mensuration. *Acta. Med. Okayama* 42:105-116.

**Fumarola L., Monno R., Ierardi 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.

**García M., Moneo I., Audicana MT., Del Pozo MD., Muñoz D., Fernández E., Díez J., Etxenagusia MA., Ansotegui IJ., Fernández de Corres L. (1997).** The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 99:497-501.

**Gómez B., Tabar AI., Larrinaga B., Álvarez MJ., García BE., Olaguibel JM. (1998).** Eosinophilic gastroenteritis and *Anisakis*. *Allergy* 53:1148-1154.

**Gómez-Casado E., Del Moral P., Martínez-Laso J., García-Gómez A., Allende L., Silvera-Redondo C., Longas J., González-Hevilla M., Kandil M., Zamora J., Arnaiz-Villena A. (2000).** HLA genes in Arabic-speaking Moroccans: close relatedness to Berbers and Iberians. *Tissue Antigens* 55:239-249.

**González Quijada S., González Escudero R., Arias García L., Gil Martín AR., Vicente Serrano J., Corral Fernández E. (2005).** Anisakiasis gastrointestinal manifestations: description of 42 cases. *Rev. Clin. Esp.* 205:311-315.

- Gosting DC., Doyle ME., Steinhart CE., Cochrane BA. (eds) (1990).** Food safety (1990). *Tata McGraw-Hill*, 412-418.
- 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* larva *in vitro*. *Parasitol. Res.* 76:653-656.
- Grabda J. (1976).** Studies of the life cycle and morphogenesis of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) (Nematoda: Anisakidae) cultured *in vitro*. *Acta Ichthyol. Piscat. I*: 119-139.
- Granger J. (1959).** The identity of the larval nematodes found in the body muscles of the cod (*Gadus callarias* L.). *Parasitol.* 49:268-273.
- Guarneri F., Guarneri C., Benvenga S. (2007).** Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of Ani s 2 and Ani s 3. *Int. J. Dermatol.* 46:146-150.
- Gutiérrez Ramos R. & Tsuji M. (1994).** Detection of antibodies to *Anisakis simplex* larvae by enzyme-linked immunosorbent assay and immunoelectrophoresis using crude or purified antigens. *J. Helminthol.* 68:305-309.
- Hartwich G. (1974).** Keys to genera of the Ascaridoidea. En: Anderson RC, Chabaud A, Willmott S (eds) CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates. Part II. Commonwealth Agricultural Bureaux. *Farnham Royal, Bucks, England*, pp. 15.
- Hauck AK. (1977).** Occurrences and survival of the larval nematode *Anisakis* sp. in the flesh of fish, frozen, brined, and smoked pacific herring, *Clupea harengus pallasi*. *J. Parasitol.* 63:515-519.
- Henríquez Santana A. & Villafruela Cives M. (2009).** *Anisakis*: pasado, presente y futuro. *Med Clin(Barc)*. 132:400-403.
- Hierro I., Valero A., Pérez P., González P., Cabo M., Montilla MP., Navarro MC. (2004a).** Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomed.* 11:77-82.
- Hierro I, Valero A, González de Selgas JM, Navarro MC. (2004b).** Actividad larvicida del timol frente a *Anisakis simplex* s.l. *Rev. Fitoter.* 4:175-176.
- Hirayama K., Chen H., Kikuchi M., Yin T., Itoh M., Gu X., Zhang S., Yuan H. (1998).** Glycine-valine dimorphism at the 86<sup>th</sup> amino acid of HLA-DRB1 influenced the prognosis of post schistosomal hepatic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 177:1682-1686.

- Hoffman D., Lowenstein H., Marsh D.G., Platts-Mills TAE., Thomas W. (1994).** Allergen nomenclature. *Bulletin of the WHO.* 72:796-806.
- Højgaard DP. (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* 83:21-28.
- Hostez P., Campello M., Hawdon J., Beckers C., Sakanari J. (1994).** Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *J. Infect. Dis.* 170:918-926.
- Huang W. (1988).** Anisakidés et anisakidoses humaines. Deuxième partie: Enquête sur les Anisakidés de poissons commerciaux du marché parisien. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 63:119-132.
- Huang W. & Bussiéras J. (1988).** Anisakidés et anisakidoses humaines. Première partie: Données bibliographiques. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 63:119-132.
- Huang W. (1990).** Méthodes de recherche des larves d'anisakidés dans les poissons marins. Possibilités d'application à l'inspection des poissons commercialisés en région parisienne. *Réc. Méd. Vet.* 166:895-900.
- Hu M., Chilton NB., Gasser RB. (2002).** The mitochondrial genomes of the human hookworms, *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* (Nematoda: Secernentea). *Int. J. Parasitol.* 32:145-158.
- Hubert B., Bacou J., Belveze H. (1989).** Epidemiology of human anisakiasis: incidence and sources in France. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:301-303.
- Huss HH. (1988).** Nematodes in herring and herring products. 18<sup>th</sup>. Annual meeting of the Western European Fish Technologists Association. Tromsø. p.1-10
- Huss HH. & Drews S. (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. Stockholm. p. 333-339.
- Hwang YK., Kim JS., Lee JB., Song TJ., Joo KW., Lee JS., Cho SW. (2003).** Human anisakiasis: diversity in antibody response profiles to the changing antigens in larval excretions/secretions. *Parasite Immunol.* 25:1-7.
- Ido K., Yuasa H., Ide K., Kimura K., Toshimitsu K., Suzuki T. (1998).** Sonographic diagnosis of small intestinal anisakiasis. *J. Clin. Ultrasound* 26:125-130.

- Iglesias R., Leiro J., Ubeira FM., Santamarina MT., Sanmartín ML. (1993).** *Anisakis simplex*: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunol.* 15:243-250.
- Iglesias R., Leiro J., Ubeira FM., Santamarina MT., Sanmartín ML. (1995).** *Anisakis simplex*: stage-specific antigens recognized by mice. *J. Helminthol.* 69:319-324.
- Iglesias R., Leiro J., Ubeira FM., Santamarina MT., Navarrete I., Sanmartín ML. (1996).** Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol. Res.* 82:378-381.
- Iglesias R., Leiro J., Santamarina MT., Sanmartín ML., Ubeira FM. (1997).** Monoclonal antibodies against diagnostic *Anisakis simplex* antigens. *Parasitol. Res.* 83:755-761.
- Iglesias R. & Ubeira FM. (1998).** *La anisakirosis y su diagnóstico.* pp. 144.
- Ikeda K., Kumashiro R. Kifune T. (1989).** Nine cases of acute gastric anisakiosis. *Gastrointest Endosc.* 35:304-308.
- Ito Y., Ikematsu Y., Yuzawa H., Nishiwaki Y., Kida H., Waki S., et al. (2007).** Chronic gastric anisakiasis presenting as pneumoperitoneum. *Asian J Surg.* 30:67-71.
- Ishikura F., Ando Y., Park YD., Tani A., Shirai D., Matsuoka H., Miyatake K. (1996).** Changes of plasma atrial and brain natriuretic peptide levels during hemodialysis. *Ren. Fail. Mar.* 8:261-270.
- Jenks WS., Bublitz CG., Choudhury GS., Ma YP., Wikswow JR. (1996).** Detection of parasites in fish superconducting quantum device magnetometry. *J. Food. Sci.* 61:865-869.
- Johansson E., Aponno M., Lundberg M., Van Hage-Hamstem M. (2001).** Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy* 56:660-666.
- Kagei N. & Isogaki H. (1992).** A case of abdominal syndrome caused by the presence of a large number of *Anisakis* larvae. *Int J. Parasitol.* 22:251-253.
- Kakizoe S., Kakizoe H., Kakizoe K., Kakizoe Y., Maruta M., Kakizoe T., Kakizoe S. (1995).** Endoscopic findings and clinical manifestation of gastric anisakiasis. *Am. J. Gastroenterol.* 90:761-763.

- Kasuya S., Hamano H., Izumi S. (1990).** Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*. *Lancet* 335:665.
- Kassai T., Cordero del Campillo M., Euzeby J., Gaafar S., Hiepe TH., Himonas CA. (1988).** Stanarized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD). *Vet. Parasitol.* 29:299-326.
- Kennedy MW. (2000).** Immune response to *Anisakis simplex* and other ascarid nematodes. *Allergy* 55:7-13.
- Kijewska A., Burzyński A., Wenne R. (2009).** Anisakid parasites of fishes caught on the African shelf. *J. Parasitol.* 95:639–645.
- Kim H. (1994).** Chronic gastric anisakiasis: radiologic and endoscopic features. *Am. J. Roentgenol.* 162:468-469.
- Kim KH., Eom KS., Park JK. (2006).** The complete mitochondrial genome of *Anisakis simplex* (Ascaridida: Nematoda) and phylogenetic implications. *Int. J. Parasitol.* 36:319–328.
- King TP., Hoffman D., Lowenstein H., Marsh DG., Platts-Mills TAE., Thomas W. (1994).** Allergen nomenclature. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 10:224-233.
- Kirstein F., Horsnell WGC., Nieuwenhuizen N., Ryffel B., Lopata AL., Brombacher F. (2010).** *Anisakis pegreffii*-Induced Airway Hyperresponsiveness Is Mediated by Gamma Interferon in the Absence of Interleukin-4 Receptor Alpha Responsiveness. *Infect. Immun.* 78:4077–4086.
- Kliks MM. (1983).** Anisakiasis in the western United States: four new case reports from California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 526-532.
- Kliks MM. (1986).** Human Anisakiasis: an update. *J. Am. Med. Assoc.* 81:536-542.
- Klimpel S., Kellermanns E., Palm HW., Moravec F. (2007).** Zoogeography of fish parasites of the pearlside (*Maurolicus muelleri*), with genetic evidence of *Anisakis simplex* (s.s.) from the Mid-Atlantic Ridge. *Mar Biol.* 152:725–732.
- Klimpel S., Kellermanns E., Palm HW. (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. *Parasitol. Res.* 104:43–53.

- Klimpel S., Busch MW., Kuhn T., Rohde A., Palm HW. (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.
- Kobayashi A, Kumada M, Ishizaki T (1972).** Evaluation of somatic and “ES” antigens causing immunological injury of mast cells in mice infected with *Anisakis* larvae. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 25:335–344.
- Kobayashi Y., Ishizaki S., Shimakura K., Nagashima Y., Shiomi K. (2007a).** Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res.* 100:1233-1241.
- Kobayashi Y., Shimakura K., Ishizaki S., Nagashima Y., Shiomi K., (2007b).** Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 155:138–145.
- Kobayashi Y., Ohsaki K., Ikeda K., Kakemoto S., Ishizaki S., Shimakura K., Nagashima Y., Shiomi K. (2011).** Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitol. Int.* 60:144-150.
- Køie M. (1993).** Nematode parasites in teleosts from 0 to 1540 m depth off the Faroe Islands (The North Atlantic). *Ophelia* 38:217–243.
- Koie M., Berland B., Burt MDB. (1995).** Development to third stage larva occurs in eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 52: 134-139.
- Lanfranchi AI. & Sardella NH. (2010).** Anisakids Survival after Microwaving, Freezing and Salting Fish from Argentina. *Food Sci. Technol. Res.* 16:499-504.
- Llarena-Reino M., González ÁF., Vello C., Outeiriño L., Pascual S. (2012).** The accuracy of visual inspection for preventing risk of *Anisakis* spp. Infection in unprocessed fish. *Food Control* 23:54-58.
- Lavrov DV. & Brown WM. (2001).** *Trichinella spiralis* mtDNA: A Nematode Mitochondrial Genome That Encodes a Putative ATP8 and Normally Structured tRNAs and Has a Gene Arrangement Relatable to Those of Coelomate Metazoans. *Genetics* 157:621-637.

- López Peñas D., Ramírez Ortiz LM., del Rosal Palomeque R., López Rubio F., Fernández-Crehuet Navajas R., Miño Fugarolas G. (2000).** Anisakiasis in Spain: an increasing disease. *Gastroenterol. Hepatol.* 23:307-311.
- López-Sáez MP., Zubeldia JM., Matheu V., García-Bara MT., De Barrio M., Tornero P., Herrero T., Rubio M., Baeza ML. (1999).** Sensibilización en una consulta de alergia hospitalaria de Madrid. *Alergol. Inmunol. Clin.* 14:229-234.
- López-Serrano MC., Alonso-Gómez A., Moreno A., Daschner A., Suárez J. (2000a).** Anisakiasis gastro-alérgica: hipersensibilidad inmediata debida a parasitación por *Anisakis simplex*. *Alergol. Inmunol. Clin.* 15:230-236.
- López-Serrano MC., Gómez AA., Daschner A., Moreno-Ancillo A., de Parga JM., Caballero MT., Barranco P., Cabañas R. (2000b).** Gastroallergic anisakiasis: findings in 22 patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15:503-506.
- López-Vélez R., García A., Barros C., Manzarbeitia F., Oñate JM. (1992).** Anisakiasis en España. Descripción de 3 casos. *Enf. Infecc. Microbiol. Clin.* 10:158-161.
- Lorenzo S., Iglesias R., Leiro J., Ubeira FM. (2000).** Usefulness of currently available methods for the diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. *Allergy* 55:627-633.
- Louredo-Méndez A., Acedo de la Rosa F., Arribas de Paz V., Sanz Ortega E., Bernardo Quirós L., Goyanes Martínez A. (1997).** Anisakidosis del colon como causa de abdomen agudo. *Rev. Esp. Enf. Dig.* 89:403-406.
- Lozano Maldonado J., Martín Hita L., Díaz Sáez V., Mañas Almendros I., Valero López A., Campos Bueno M. (2004).** Cross-reactivity between antigens of *Anisakis simplex* s.l. and other ascarid nematodes. *Parasite* 11:219-223.
- Lustigman S., Huima T., Brotman B., Miller K., Prince AM. (1990).** *Onchocerca volvulus*: biochemical and morphological characteristics of the surface of third- and fourth-stage larvae. *Exp. Parasitol.* 71:489-495.
- MacKenzie, K., Campbell N., Mattiucci S., Ramos S., Pinto P., Abaunza AL (2008).** Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) L. *Fish. Res.* 89:136-145.
- Margolis L. (1977).** Public health aspects of "codworm" infection: a review. *J. Fish. Res. Board. Can.* 34:887-898.



- Marques JF., Cabral HN., Busi M., D'Amelio S. (2006).** Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes of the Portugeses coast. *J. Helminthol.* 80:47–51.
- Martín-Sánchez J., Artacho-Reinoso ME., Diaz-Gavilan 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.
- Matsui T., Iida M., Murakami M., Kimura Y., Fujishima M., Yao Y., Tsuji M. (1985).** Intestinal anisakiasis: clinical and radiologic features. *Radiology* 157:299-302.
- Matsuoka H., Nakama T., Kisanuki H., Uno H., Tachibana N., Tsubouchi H., HORI Y., Nawa Y. (1994).** A case report of serologically diagnosed pulmonary anisakiasis with pleural effusion and multiple lesions. *Am. J Tro.p Med. Hyg.* 51:819-822.
- Matsuura T., Sun S., Sugane K. (1992).** The identity of *Anisakis* type II larvae with *Anisakis physeteris* confirmed by restriction fragment length polymorphism analysis of genomic DNA. *J. Helminthol.* 66:33-7.
- Mattiucci S., Nascetti G., Bullini L., Orecchia P., Paggi L. (1986).** Genetic structure of *Anisakis physeteris* and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). *Parasitol.* 93:383–387.
- Mattiucci S., Nascetti G., Cianchi R., Paggi L., Arduino P., Margolis L., Bratney J., Webb SC., D'Amelio S., Orecchia P., Bullini L. (1997).** Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *J Parasitol.* 83:401–416.
- Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Ishikura H., Kikuchi K., Sato N., Cianchi R., Bullini L. (1998).** Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). *Syst. Parasitol.* 40:81–92.
- 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). *Int. J. Parasitol.* 31:9–14.
- Mattiucci S., Paggi L., Nascetti G., Santos CP., DI Benedetto AP., Ramos R., Costa G., Argyrou M., Cianchi R., Bullini L. (2002).** Genetic markers in *Anisakis typica* (Diesing,

1860): larval identification and genetic relationships with other species of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.* 51:159-170.

**Mattiucci S., Cianchi R., Nascetti G., Paggi L., Sardella N., Timi J., Webb SC., Bastida R., Rodriguez D., Bullini L. (2003).** Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of Boreal and Austral regions. *Syst. Parasitol.* 54:13–23.

**Mattiucci S., Abaunza P., Ramadori L., Nascetti G. (2004).** Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *J. Fish. Biol.* 65:495-510.

**Mattiucci S., Nascetti G., Dailey M., Webb SC., Barros NB., Cianchi R., Bullini L. (2005).** Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.* 3:157-171.

**Mattiucci S. & Nascetti G. (2006).** Molecular systematic, phylogeny and ecology of Anisakid Nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite* 13:99-113.

**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. *Adv. Parasitol.* 66: 47–148.

**Mattiucci S., Paoletti M., Webb SC. (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.

**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.* 31:11–82.

**Mendizabal-Basagoiti L. (1999).** Hypersensitivity to *Anisakis simplex*: a propos of 36 cases. *Allergy Immunol.* 31:15-17.

**Meyer CG., Schnittger L., May J. (1996).** Met-11 of HLA class II DP alpha (1) first domain associated with onchocerciasis. *Exp. Clin. Immunogenet.* 13:12–19.

**Molina-García AD. & Sanz PD. (2002).** *Anisakis simplex* larva killed by high-hydrostatic-pressure processing. *J. Food Prot.* 65:383-388.

- Möller H. & Anders K. (1986).** Diseases and parasites of marine fishes. *Ed. Verlag Möller. Kiel. 165-178.*
- Möller H. & Schoroeder S. (1987).** New aspects of anisakiasis in Germany. *Archiv. Lebensmitt. 38:123-128.*
- Moore D., Girdwood R., Chiodini P. (2002).** Treatment of anisakiasis with albendazole. *The Lancet 360:54.*
- Moneo I., Audicana MT., Alday E., Curiel G., del Pozo MD., García M. (1997).** Periodate treatment of *Anisakis simplex* allergens. *Allergy 52:565-569.*
- Moneo I., Caballero ML., Gómez F., Ortega E., Alonso MJ. (2000).** Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol. 106:177-182.*
- Moneo I., Caballero ML., González-Muñoz M., Rodríguez-Mahillo AI., Rodríguez-Pérez R., Silva A. (2005).** Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res. 96:285-289.*
- Montoro A., Perteguer MJ., Chivato I., Laguna R., Cuellar C. (1997).** Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*. *Allergy 52:985-991.*
- Moreno-Ancillo A., Caballero MT., Cabañas R., Contreras J., Martín Barroso JA., Barranco P., López Serrano MC. (1997).** Allergic reactions to *Anisakis simplex* parasitizing sea food. *Ann. Allergy Asthma Immunol. 79:246-250.*
- Moschella SL., Kay J., Mackool BT., Liu V. (2004).** Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 35-2004. A 68-year-old man with end-stage renal disease and thickening of the skin. *N. Engl. J. Med. 351:2219-2227.*
- Mudry J., Lefebvre P., Dei-Cas E., Vernes A., Poirriez J., Débat M., Marti R., Binot P., Cortot A. (1986).** Human anisakiasis: 5 cases in northern France. *Gastroenterol. Clin. Biol. 10:83-87.*
- Muraoka A., Suehiro I., Fujii M. (1996).** Acute gastric anisakiasis: 28 cases during the last 10 years. *Dig. Dis. Sci. 41:2362-2365.*

- Murata R., Suzuki J., Sadamasu K., Kai A. (2011).** Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitol. Int.* 60:193–198.
- Murdoch ME., Payton A., Abiose A., Thomson W., Panicker VK., Dyer PA., Jones BR., Maizels RM., Ollier WE. (1997).** HLA-DQ alleles associate with coetaneous features of onchocerciasis. The Kaduna-London-Manchester Collaboration for Research on Onchocerciasis. *Hum. Immunol.* 55:46.
- Nadler SS. & Hudspeth DSS. (2000).** Phylogeny of the ascaridoidea (Nematoda, Ascaridida) based on three genes and morphology, hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.* 86:380-393.
- Nadler SA., D'Amelio S., Dailey MD., Paggi L., Siu S., Sakanari JA. (2005).** Molecular phylogenetics and diagnostic of *Anisakis*, *Pseudoterranova* and *Contracaecum* from northern pacific marine mammals. *J. Parasitol.* 6:1413–1429.
- Nascetti G., Paggi L., Orecchia P., Smith JW., Mattiucci S., Bullini L. (1986).** Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *Int. J. Parasitol.* 16:633–640.
- Nascetti G., Cianchi R., Mattiucci S., D'Amelio S., Orecchia P., Paggi L., Bratney J., Berland B., Smith JW., Bullini L. (1993).** Three sibling species within *Contracaecum osculatatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic-Boreal region: reproductive isolation and host preferences. *Int. J. Parasitol.* 23:105–120.
- Navarro-Cantarero E., Carro-Alonso B., Castillo-Lario C., Fernández-Gómez J A. (2005).** Diagnóstico de la infección por *Anisakis*. Experiencia en nuestro medio. *Allergol. Immunopathol.* 33: 27-30.
- 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. *Exp. Parasitol.* 127:405-408.
- Nieuwenhuizen N., Lopata AL., Jeebhay F., Herbert DR., Robins TG., Brombacher F. (2006).** Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117:1098–1105.

- Obispo J., Herrero JJ., Borobia LE., Chivato T., Laguna R., Baquedano J. (2000).** Obstrucción intestinal producida por la larva de *Anisakis*. *Cir. Esp.* 67:368-371.
- Oliveira A., Sánchez-Rancano S., Conde-Gacho P., Moreno A., Martínez A., Comas C. (1999).** Anisakiasis gastrointestinal: siete casos en tres meses. *Rev Esp Enfermed. Diger.* 91:70-72.
- Orecchia P., Paggi L., Mattiucci S., Smith JW., Nascetti G., Bullini L. (1986).** Electrophoretic identification of larvae and adults of *Anisakis* (Ascaridida: Anisakidae). *J. Helminthol.* 60:331-339.
- Oshima T. & Kliks M. (1987).** Effects of marine mammal parasites on human health. *Int J. Parasitol.* 17:415-421.
- Paggi L., Nascetti, G., Webb S., Mattiucci S., Cianchi R., Bullini L. (1998).** A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales (Ziphiidae): allozyme and morphological evidence. *Syst. Parasitol.* 40:161-174.
- Pascual S., González AF., Arias C., Guerra A. (1999).** Larval *Anisakis simplex* B (Nematoda: Ascridoidea) of short-finned squid (Cephalopoda: Ommastrephidae) in north-west Spain. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 79:65-72.
- Pereira Bueno JM. (1992).** Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiosis. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. *Dirección General de Salud Pública.* 64 pp.
- Pereira Bueno JM. & Ferre I. (1997).** Parásitos del Pescado. Junta de Castilla y León, Consejería de Sanidad y Bienestar Social, 46 pp.
- Pérez-Millán A., Martín Lorente JL., Pérez Álvarez, López Morante A., Sáez-Roguela F., Busteros JI. (1998).** Úlcera gástrica secundaria a una infección por *Anisakis*. *Rev. ACAD.* 14:25-27.
- Pérez-Pérez J., Fernández-Caldas E., Marañón F., Sastre J., Bernal ML., Rodríguez J., Bedate CA. (2000).** Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123:120-129.
- Pethitory JC., Lapierre J., Rousseau M., Clique MT. (1986).** Diagnostic sérologique de l'anisakiase (granulome éosinophile digestif) par précipitation en milieu gélifié (Ouchterlony, électrosynérèse, immunoélectrophorèse). *Med. Mal. Infect.* 3:157-162.

- Pethitory JC. & Marty B. (1988).** L'anisakiase en France. *La Let infect.* 3: 96-99.
- Petithory JC., Paugam B., Buyet-Rousset P., Paugam A. (1990).** *Anisakis simplex*, a co-factor of gastric cancer? *Lancet.* 336:1002.
- Petithory JR, Masiarz FR, Kirsch JF, Santi DV, Malcolm BA. (1991).** A rapid method for determination of endoproteinase substrate specificity: specificity of the 3C proteinase from hepatitis A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:11510-11514.
- Petithory JC., Verrier F., Guyet-Rousset P. (1992).** Biological study of a case of colonic anisakiasis. Review of the literature. *Pathol. Biol.* 40:47-51.
- Petter JA. & Maillard C. (1988).** Larves d'ascarides parasites de poissons en Méditerranée Occidentale. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat. Paris.* 10:347-369.
- Ponferrada A., Matilla A., Borrego GM., Beceiro I., Núñez O., Lamónaca MG., Clemente G. (2005).** Hemoperitoneo espontáneo secundario a yeyunoileítis por *Anisakis*. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 97:292.
- Pontes T., D'Amelio S., Costa G., 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. *Parasitol.* 91:1430-1434.
- Purello-D'ambrosio F., Pastorello E., Gangemi S., Lombardo G., Ricciardi L., Fogliani O., Merendino RA. (2000).** Incidence of sensitivity to *A. simplex* in a risk of population of fisherman/fishmongers. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 84:439-444.
- Quiazon KM., Yoshinaga T., Santos MD., Ogawa K. (2008).** Morphological differences between larvae and *in vitro*-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitol. Int.* 57:483-489.
- Quiazon KM., Yoshinaga T., Ogawa K. (2011)** Experimental challenge of *Anisakis simplex* sensu strict 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., 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.
- Rodero M., Chivato T., Muro A., Cuellar C. (2005).** Enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot antibody determination in sera from patients diagnosed with

different helminthic infections with *Anisakis simplex* antigen purified by affinity chromatography. Western blot antibody determination in sera from patients diagnosed with *Anisakis* sensitization with different antigenic fractions of *Anisakis simplex* purified by affinity chromatography. *J. Helminthol.* 81:307-310.

**Rodero M., Cuellar C., Chivato T., Mateos JM., Laguna R. (2007).** Western blot antibody determination in sera from patients diagnosed with *Anisakis* sensitization with different antigenic fractions of *Anisakis simplex* purified by affinity chromatography. *J. Helminthol.* 81:307-310.

**Rodero M., González-Díaz H., Ubeira FM. (2010).** Diagnosing Human Anisakiasis: Recombinant Ani s 1 and Ani s 7 Allergens versus the UniCAP 100 Fluorescence Enzyme Immunoassay. *Clin. Vaccine Immunol.* 17:496-502.

**Rodríguez E., Anadón AM., García-Bodas E., Romaris F., Iglesias R., Garate T., Ubeira FM. (2008).** Novel sequences and epitopes of diagnostic value derived from the *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen. *Allergy* 63:219-225.

**Rodríguez-Mahillo AI., Gonzalez-Muñoz M., Gomez-Aguado F., Rodríguez-Pérez R., Corcuera MT., Caballero M., Moneo I. (2007).** "Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor". *Int. J. Parasitol.* 37:907-917.

**Rodríguez-Mahillo AI., González-Muñoz M., de las Heras C., Tejada M., Moneo I. (2010).** Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle. *Foodborne Pathog. Dis.* 7:967-73.

**Rodríguez-Pérez R., Moneo I., Rodríguez- Mahillo A., Caballero ML. (2008).** Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 159:92-97.

**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.

**Romero-Ramírez JA., Martínez Conde López AE., Olivares Galdeano U., Sancha Pérez A., López de Torre Ramírez de la Piscina J., Barros Ingerto J. (1997).** Anisakiosis gástrica diagnosticada por endoscopia. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 20:306-308.

**Rosales J., Mascaró C., Fernández C., et al. (1999).** Acute intestinal anisakiasis in Spain: a fourth-stage *Anisakis simplex* larva. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94: 823-826.

- Ruíz-Valero J., Valero A., Adroher FJ., Ortega JE. (1992).** Presencia de ascáridos en peces comerciales de frecuente consumo en Granada. Pp. 335-349 en Hernández Rodríguez, S. (ED.) En memoria al profesor Doctor DF. de P. Martín Gómez. Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain.
- Sakanari JA., Loinaz HM., Deardorff TL., Raybourne RB., Mckerrow JH., Frieson JG. (1988).** Intestinal anisakiasis: a case diagnosed by morphologic and immunologic methods. *Am. J. Clin. Pathol.* 90:107-113.
- Sakanari JA. & McKerrow JH. (1989).** Anisakiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:278-284.
- Sánchez-Velasco P., Mendizábal L., Antón EM., Ocejo-Vinyals G., Jerez J., Leyva-Cobián F. (2000).** Association of hypersensitivity to the nematode *Anisakis simplex* with HLA Class II DRB\*1502-DQB1\*0601 haplotype. *Hum. Immunol.* 61:314-319.
- Sanmartín ML., Quinteiro P., Ubeira FM. (1989).** Nematode parasites of commercially important fish in NW Spain. *Dis. Aquatic. Org.* 7:75-77.
- Sanmartín ML., Quinteiro P., Iglesias R., Santamaría MT., Leiro J., Ubeira FM. (1994).** Nematodos parásitos en peces de las costas gallegas. Ed. Díaz Santos, Madrid.
- Santoro M., Mattiucci S., Paoletti M., Liotta A., Degli Uberti B., Galiero G., Nascetti G. (2010).** Molecular identification and pathology of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) infection in the Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Vet. Parasitol.* 174:65-71.
- Sapunar J., Doerr E., Letonia T. (1976).** Anisakiasis humana en Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* 31:79-83.
- Scala E., Giani M., Pirrotta L., Guerra EC., Cadoni S., Girardelli CR., De Pita O., Puddu P. (2001).** Occupational generalised urticaria and allergic airborne asthma due to *Anisakis simplex*. *Eur. J. Dermatol.* 11:249-250.
- Shimakura K., Miura H., Ikeda K., Ishizaki S., Nagashima Y., Shirai T., Kasuya S., Shiomi K. (2004).** Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135:69-75.
- Shirahama M., Koga T., Ishibashi H., Uchida S., Ohta Y., Shimoda Y. (1992).** Intestinal anisakiasis: US in diagnosis. *Radiology* 185:789-793.



- 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 Med. Biol.* 22:57-98.
- Shukhgalter O. (2002).** *Anisakis simplex* (Rud. 1809) (Nematoda: Anisakidae): growth and morphometry of larvae from spring spawning herring (*Clupea harengus membrans* L.) in the Vistula Lagoon and adjacent areas of the Baltic Sea. *Oceanol. Stud.* 31:67-73.
- Smith JW. (1971).** *Thysanoessa inermis* and *T. longicaudata* (Euphausiidae) as first intermediate hosts of *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridata) in the Northern Sea, to the north of Scotland and at Faroe. *Nature* 234:478.
- Smith JW. (1974).** Experimental transfer of *Anisakis* sp. Larvae (Nematoda: Ascaridida) from one fish host to another. *J. Helminthol.* 48: 229-234.
- Smith JW. & Wootten R. (1978).** *Anisakis* and anisakiasis. *Adv. Parasitol.* 16:93-163.
- Smith JW. (1983).** *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea): morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. *J. Helminthol.* 57:205-224.
- Smith JW. (1984).** The abundance of *Anisakis simplex* L<sub>3</sub> in the body-cavity and flesh of marine teleosts. *Int. J. Parasitol.* 14:491-495.
- Solas MT., García ML., Rodríguez-Mahillo AI., Gonzales-Muños M., de las Heras C., Tejada M. (2009).** *Aniskais antigens* detected in fish muscle infested with *Anisakis simplex* L<sub>3</sub>. *J. Food Prot.* 71:1273–1276.
- Strømnes E. & Andersen K. (1998).** Distribution of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematoda, Ascaridoidea) L<sub>3</sub> larvae in three species of marine fish, saithe (*Pollachius virens* (L.)), cod (*Gadus morhua* L.) and redfish (*Sebastes marinus* (L.)) from Norwegian waters. *Parasitol Res.* 84:281–285.
- Sugane K., Shu-Han S., Matsuura T. (1982).** Radiolabelling of the excretory-secretory and somatic antigens of *Anisakis simplex* larvae. *J. Helminthol.* 66:305-309.
- Sugimachi K., Inokuchi K., Ooiwa T., Fujino T., Ishii Y. (1985).** Acute gastric anisakiasis. Analysis of 178 cases. *Jama.* 254:1012-1013.

- Suzuki T., Shiraki T., Sekino S., Otsuru M., Ishikura H. (1970).** Studies on the immunological diagnosis of anisakiasis. III. Intradermal test with purified antigen. *Jpn J. Parasitol.* 19:1-9.
- Suzuki T., Sato Y., Yamashita H., Otsuru M. (1974).** Anisakiasis: preparation of a stable region for indirect fluorescent antibody test. *Exp. Parasitol.* 35:418-424.
- Suzuki T., Hayakawa T., Noda A., Aoki I., Inoue J. (1975).** Pancreatic neoplasms associated with pancreatolithiasis. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 72:1563-1568.
- 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.
- Takabe K., Ohki S., Kunihiro O., Sakashita T., Endo I., Ishikawa Y., Sekido H., Amano T., Nakatani Y., Suzuki K., Shimada H. (1998).** Anisakiosis. A cause of intestinal obstruction from eating sushi. *Am. J. Gastroenterol.* 93:1172-1173.
- Takahashi K., Masuda A., Shimizu H. (1986).** REE abundances and Rb-Sr geochronology of Yamato 791197. *Mem. Natl. Inst. Polar Res. Spec. Iss.* 41:96-105.
- Takei H. & Powell SZ. (2007)** Intestinal anisakidosis (anisakiosis). *Ann. Diagn. Pathol.* 11: 350-352.
- Ubeira FM. & Iglesias R. (2000).** Monoclonal antibodies in the study of *Anisakis simplex*. *Allergy* 59:18-27.
- Umehara A., Kawakami Y., Matsui T., Araki J., Uchida A. (2006).** Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol. Int.* 55:267-271.
- 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., Matsui T., 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., Mira J., Pérez R., Sanz J., Geraldía M., García J., García P., Adroher FJ. (1992).** Descripción de un caso de Anisakiosis humana. IX reunión científica Asociación de parasitólogos españoles, León Spain. 69 p.

**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., 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 Parasitol.* 51:200-212.

**Vallejo Rodríguez MC., Valero Tena E., Charro Calvillo M., Mur Villacampa M. (2006).** Recurrent abdominal pain: gastric and ileal manifestations by anisakis. *An. Med. Interna* 23:556-557.

**Valls A., Pascual CY., Pereira MJ., Belver MT., Daschner A., López Serrano MC., Cuellar C., Martín Esteban M. (2002).** Cross-reactivity of *Anisakis* full body allergen and the relationship with secretor-excretory allergen. *Allergy* 57:104.

**Valls A., Pascual CY., Martín Esteban M. (2003).** *Anisakis* y anisakiosis. *Allergol. Immunopathol.* 31:348-355.

**Van Thiel PH. (1960).** Anisakiasis. *Parasitol.* 52:16-17.

**Van Thiel PH. (1976).** The present state of anisakiasis and its causative worms. *Trop. Geogr. Med.* 28:75-85.

**Van Banning P. (1971).** Some notes of a successful rearing of the herring-worm, *Anisakis marina* L. (Nematoda: Heterocheilidae). *Journal du conseil International pour l'Exploration de la Mer.* 34:84-88.

**Ventura MT., Tummolo RA., di Leo E., D'Ersasmo M., Arsieni A. (2008).** Immediate and cell-mediated reactions in parasitic infection by *Anisakis simplex*. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 18:253-259.

**Verhamme MAM. & Ramboer CHR. (1988).** Anisakiasis caused by Herring in vinegar: a little known medical problem. *Gut.* 29:843-847.

- Weerasooriya MV., Fujino T., Ishii Y., Kagei N. (1986).** The value of external morphology in the identification of larval anisakid nematodes: a scanning electron microscope study. *Parasitol. Res.* 72:765-778.
- Weiler CR. (2007).** *Anisakis simplex* and cross-reacting. *Int. J. Dermatol.* 46:224-225.
- Xia Y., Spence HJ., Moore J., Heaney N., McDermott L., Cooper A., Watson DG., Mei B., Komuniecki R., Kennedy MW. (2000).** The ABA-1 allergen of *Ascaris lumbricoides*: sequence polymorphism, stage and tissue-specific expression, lipid binding function, and protein biophysical properties. *Parasitol.* 120:211-224.
- Yokogawa M. & Yoshimura H. (1967).** Clinicopathologic studies on larval anisakiasis in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16: 723-728.
- Zhu X., Gasser RB., Podolska M., Chilton N. (1998).** Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 28:1911-21.