

Advanced Course on
QUALITY AND SAFETY ASSESSMENT OF FISH AND FISHERY PRODUCTS
[Derio, Bilbao (Spain), 17-21 October 2011]

3.1.4. Parasites.
5.8. Parasite detection methods.
Thursday 20, 9-10h

Prof. Margarita Tejada. ICTAN-IF (CSIC)

PRINCIPALES PROBLEMAS CAUSADOS POR LOS PARÁSITOS DE PESCADO

Los peces tanto marinos como de agua dulce, se encuentran a menudo infestados por parásitos que pueden afectar a los peces, causándoles enfermedades o malformaciones, al pescado una vez capturado, como el caso de mixosporidios que producen ablandamiento e incluso licuefacción del músculo por la alta tasa de proteasas que liberan, o a los consumidores cuando ingieren pescados parasitados.

Los principales problemas de salud pública en humanos debido a su alta incidencia son las infestaciones causadas por helmintos de las familias Opisthorchiidae y Heterophyidae (Clase Trematodea, subclase Digenea), Diphyllbothridae (Clase Cestoda) y Anisakidae y Gnathostomidae (Phylum Nematoda) siendo los nematodos, fundamentalmente los anisákidos, los que actualmente tienen mayor relevancia. Las enfermedades humanas causadas por consumo de pescado parasitado por helmintos representan hoy en día uno de los mayores problemas sanitarios, ya que algunos de estos parásitos son altamente patógenos (WHO, 2004). La importancia creciente de infestación de los peces y los problemas relacionados con su consumo se puso de manifiesto en el VII International Symposium of Fish Parasites (ISFP VII, 2007) y siguientes (el VIII International Symposium of Fish Parasites (ISFP) se celebrara en 2011 e Viña del Mar, Chile. El documento del Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) de la European Food Safety Authority (EFSA 2010) señala el riesgo de parásitos en productos de la pesca y su importancia creciente viene recogido por la convocatoria de la UE "KBBE.2012.2.4-02: Food safety and quality issues related to parasites in seafood" de 2011 en la que el objetivo es el estudio específico de los problemas sanitarios que causan los parásitos de pescado y que significan un riesgo para la salud.

En general la infestación en humanos se debe a la ingesta de pescado parasitado que se consume crudo o con tratamientos culinarios suaves que no producen la muerte de las larvas, causando las zoonosis parasitarias en los consumidores. Además en los últimos años se han desarrollado métodos diagnósticos más precisos por lo que han incrementado los casos documentados de estas parasitosis.

Otro problema causado por los helmintos es la alergia (hipersensibilidad) causada por sensibilidad a los alérgenos de las larvas fundamentalmente asociados a los productos de secreción/excreción o a proteínas somáticas de las larvas de Anisákidos (Audicana y Kennedy, 2008; EFSA 2010).

- **Principales enfoques de los estudios realizados en *Anisakis***

La infestación de pescado así como los problemas que plantea la ingestión por el consumidor de las larvas L3 se han estudiado desde hace décadas desde distintas perspectivas. Los principales trabajos se han orientado a identificar el ciclo vital, las especies de Anisákidos, la prevalencia, localización e intensidad de las infestaciones en distintas especies de pescado, las zonas geográficas y caladeros de pesca donde existe alta contaminación y los problemas clínicos debidos a la ingestión de las larvas que causan infestación o alergia en el consumidor. La infestación del consumidor por larvas vivas de *Anisakis* está asociada tradicionalmente a zonas geográficas donde es habitual el consumo de pescado crudo o sometido a tratamientos culinarios o industriales en los que no se produce la muerte de las larvas.

- **Problemática en distintos países**

La infestación parasitaria y la alergia a *Anisakis* están relacionadas con los países y regiones en los que se consumen tradicionalmente pescado crudo o preparaciones culinarias en las que las larvas permanecen vivas (sushi, sashimi, ceviche, boquerones en vinagre, ahumados en frío, etc.). En la actualidad el consumo se ha extendido a otros países debido al incremento del turismo con acceso a formas de consumo típicas de determinadas regiones y a un incremento del comercio internacional, que han permitido además el acceso a nuevas especies y a pescados de áreas de pesca distintas a las habituales, cuyas características beneficiosas y perjudiciales son generalmente conocidas por los consumidores de la zona.

Anisákidos

- **Géneros y especies más comunes**

La familia Anisakidae (Nematoda: Rhabditida: Ascaridomorpha) comprende al menos 24 géneros, siendo los más conocidos *Phocananea*, *Contracaecum* y *Anisakis*. Hay descritas al menos diez especies de *Anisakis* (Mattiucci et al., 2002; Delyamure et al., 1964) aunque *Anisakis simplex* s.l. parece ser la principal responsable de los episodios de parasitosis e intoxicaciones alimentarias que se considera un problema emergente en los últimos años (Audicana et al., 2002). Se estima que *Phocananea* (= *Pseudoterranova*) y *Contracaecum* (= *Thynascaris*) son de menor importancia aunque desde el punto de vista epidemiológico es necesario evaluar su incidencia real en la población, especialmente en lo relativo a sensibilización a alérgenos. El esquema clasificatorio del género *Anisakis* es el siguiente (De Ley and Blaxter, 2004):

Clase Chromodorea

Orden Rhabditida
Suborden Rhabditina
Infraorden Ascaridomorpha
Superfamilia Ascaridoidea
Familia Anisakidae
Subfamilia Anisakinae
Género *Anisakis*

- **Tipos de larvas de *Anisakis***

En función de distintas características taxonómicas de la fase L3 de *Anisakis* se dividen en larvas de **tipo I** y larvas de **tipo II** (Berland, 1961). El **tipo I** lo componen *A. simplex* s.s., *A. simplex* C., *A. pegreffii*, *A. typica*, *A. ziphidarum*, *A. schupakovi* y la especie nueva *A. nascettii*, mientras que las larvas del **tipo II** son propias de las especies *A. physeteris*, *A. brevispiculata* y *A. paggiae* (Mattiucci et al., 2002; Mattiucci y Nascetti, 2008)

- **Ciclo biológico**

El ciclo biológico de la familia Anisakidae está constituido por un estadio de huevo, cuatro fases larvarias y adulto con sexos separados. Las fases adultas de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum* se localizan en el estómago de mamíferos marinos y/o aves ictiófagas, mientras que en el género *Hysterothylacium*, los hospedadores definitivos lo constituyen distintas especies de peces. Aunque existen ligeras diferencias en los esquemas del ciclo de *Anisakis* que se presentan en la literatura sobre la ingestión de la larva por los crustáceos, en general se considera que los huevos sin embrionar son excretados con las heces por los mamíferos marinos al medio acuático, donde se desarrolla hasta convertirse en larva. En esta etapa puede permanecer en el huevo (huevos embrionados) o si se rompe, sobrevivir hasta tres meses en el agua donde pueden ser ingeridas por crustáceos (primer hospedador intermediario), que a su vez pueden ser ingeridos por peces y cefalópodos (segundos hospedadores intermediarios), donde la larva L3 se desarrolla y fija en distintas localizaciones. Cuando los hospedadores intermediarios son ingeridos por los mamíferos marinos, las larvas se desarrollan hasta llegar a adultas y se completa el ciclo. Se reconocen 25 especies de cetáceos y 12 de pinnípedos como huéspedes finales. Los humanos se consideran hospedadores paraténicos o accidentales ya que no son necesarios para completar el desarrollo de las larvas.

- **Infestación por *Anisakis* de especies de pescado**

Aunque hace décadas prácticamente solo se consideraban como especies de pescado parasitadas por Anisákidos el bacalao (*Gadus morhua*) parasitado por *Pseudoterranova decipiens*

(gusano del bacalao) y el arenque (*Clupea arengus*) parasitado por *Anisakis* sp (gusano del arenque), hoy en día se sabe que la mayoría de las especies de consumo que llegan a las lonjas pueden estar parasitadas por anisákidos, fundamentalmente por *Anisakis* sp. Se considera que actualmente la mayoría de las especies de consumo están parasitadas, con una prevalencia y tasa de infestación que depende de la especie y del caladero.

La prevalencia y abundancia de larvas L3 de *Anisakis* se ha asociado directamente con la edad y tamaño de los individuos (Abaunza et al, 1995; Carvajal et al 1979, McClelland, et al, 1990; Mladineo, 2003, Valero et al, 2006; Incorvaia y Hernandez, 2006) aunque en bacaladilla capturada en el Atlántico Noroeste se ha descrito un comportamiento inverso (Levsen y Midthun, 2007). La abundancia de mamíferos marinos en los caladeros incrementa la posibilidad de infestación (Young, 1972). También se ha detectado un incremento de parasitación cuando se realizan estudios sistemáticos de determinados caladeros durante periodos largos (Urawa y Fujisaki, 2006). En la actualidad se considera que más de 160 especies de peces y cefalópodos están infestadas con larvas de Anisákidos sobre todo por *A. simplex*.

- **Localización preferente en cefalópodos y peces marinos**

En la mayoría de las especies las localizaciones más frecuentes de las larvas en el pez vivo son en el tracto digestivo, cavidad abdominal y vísceras tales como hígado y gónadas, aunque también

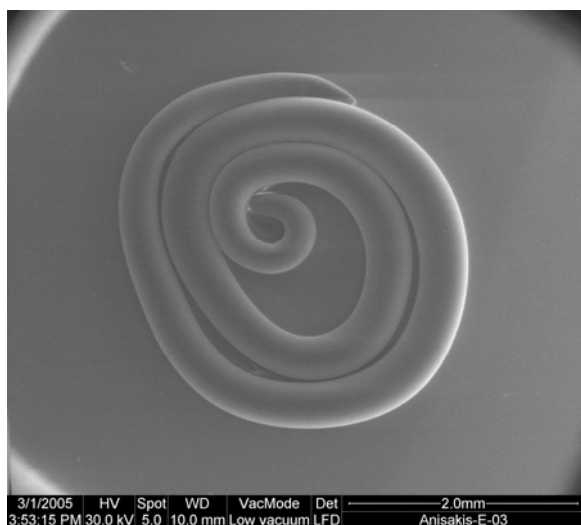


Figura 1: Larva L3 de *A. simplex*

puede estar parasitado el músculo. Se presentan enrolladas en forma de espiral plano bajo el tejido conectivo (Figura 1). La localización preferente de las larvas en los peces y cefalópodos se cree que está ligada a los hábitos alimenticios del hospedador. En los peces que se alimentan principalmente de eufáusidos tales como la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), el arenque y la caballa (*Scomber scombrus*), la mayoría se encuentra en la cavidad abdominal y vísceras, mientras que en peces piscívoros como el abadejo (*Pollachius* sp), bacalao (*Gadus morhua*), merluza (*Merluccius* sp) y merlán (*Merlangius merlangus*) suelen estar también presentes en la musculatura

hipoaxial que rodea la cavidad abdominal (Figura 2). En calamares y potas, las larvas se asientan normalmente en la pared externa del estómago aunque también se encuentran en la musculatura del manto. El número de larvas en la musculatura y su distribución difiere con la especie de pescado y con los caladeros (Smith, 1984; Wharton et al., 1999; Abollo et al., 2001; Valero et al., 2006; U.S FDA, 2001). La distribución de las larvas en el músculo y las vísceras depende de la especie de pescado. En estudios efectuados en especies capturadas en el Atlántico norte, entre el 90 y el 98% de las larvas se localizaban en la cavidad abdominal y vísceras y el resto en la musculatura, sobre todo en la

musculatura ventral (Karl, 2008). Sin embargo en algunas especies de salmón del Pacífico se detecta más abundancia en *Anisakis simplex* sl. en la musculatura (87%), con localización preferente en la



Figura 2. Infestación de musculatura hipoaxial por larvas de *A. simplex*

musculatura abdominal (Deardorff y Kent, 1989, Karl, comunicación personal) En peces capturados en el Adriático se ha estimado que en merluza la localización preferente en las vísceras es el hígado, en caballa (*Scomber scombrus* y *S. japonicus*) y anchoa (*Engraulis encrasicolus*) el intestino y en jurel (*Trachurus trachurus*) las gónadas (Mladineo, 2003). En bacaladilla la víscera con mayor tasa de infestación es el hígado, disminuyendo el porcentaje de larvas con el tamaño del pez. En caballa y arenque se ha estimado que la zona mas infestada es la zona pilórica, en donde se encuentran entre el 57% y el 81% de todas las larvas (Levsen y Midthun, 2007).

RECOMENDACIONES DADAS AL SECTOR

La infestación del pescado con nematodos es un problema real para la industria ya que además de las implicaciones sanitarias, la infestación en zonas visibles causa rechazo al consumidor debido a la apariencia del producto lo que afecta al valor comercial de las capturas.

• Sector extractivo.

Para evitar que se comercialicen pescados con alto grado de infestación, se ha recomendado en la pesca extractiva evitar las capturas en caladeros muy contaminados con *Anisakidos* (Huss, 1993), aunque esta recomendación es difícil de seguir debido a las características de la pesca extractiva. Otras medidas que se están implantando son las dirigidas a prevenir la presencia de larvas en el pescado que se va a comercializar, por lo que se recomienda eviscerar rápidamente a bordo para evitar el posible paso desde las vísceras al músculo, eliminar zonas con parasitación apreciable visualmente, etc. así como la detección de las larvas por distintos métodos con objeto de disminuir la posibilidad de infestación humana e incluso existen aparatos que succionan las vísceras del pescado, con el fin de eliminarlas y disminuir la posibilidad de infestación. Asimismo se recomienda que las partidas muy parasitadas sean retiradas de la comercialización (EFSA, 2010). Para que la eliminación a bordo de vísceras parasitadas sea efectiva a nivel integral, es imprescindible que no se arrojen al mar con larvas vivas, ya que al ser ingeridas por otros peces vuelven a ingresar en la cadena trófica. Por ello es necesario que se produzca la muerte de las larvas antes de devolverlas al mar para evitar recontaminaciones. Desde hace años hay trabajos orientados a tratar a bordo las vísceras para producir la muerte de las larvas, aunque la mayoría no se utilizan actualmente por la flota.

Las directrices dadas por el UE referidas al tratamiento de vísceras se recogen en el Reglamento (CE) nº 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo (2009) por el que se

establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano.

- **Industria procesadora**

Las directrices dadas a la industria procesadora de pescado se basan en la detección de las larvas por distintos métodos, con eliminación de las larvas visibles de la zona infestada. Los problemas de la parasitación de filetes o zonas donde las larvas sean visibles difieren, ya que el perjuicio causado en función de la tasa de infestación y de la localización de las larvas puede ser muy distinto según el valor comercial de la zona parasitada. Los mayores esfuerzos en esta industria se están haciendo en desarrollar métodos y aparatos para facilitar la detección de las larvas en la línea de producción.

- **Acuicultura**

Se considera que en los peces cultivados con pienso seco apenas existe riesgo de parasitación con *Anisakis* debido a las condiciones controladas de cultivo. Se recomienda evitar la presencia de mamíferos marinos y aves ictiófagas, impedir que peces o crustáceos entren en las jaulas así como la alimentación con pescado o subproductos de pescado que tengan larvas vivas. No existen en la actualidad estudios que determinen si existe riesgo de alergia transmitida a través de los piensos.

PROBLEMAS SANITARIOS EN LOS CONSUMIDORES: INFESTACIÓN Y ALERGIA

La ingestión de pescado parasitado con larvas de *Anisakis* puede dar lugar en humanos a infestación y a alergia.

- **INFESTACIÓN**

El primer caso de infestación debido a ingestión del parásito vivo por consumo de arenque fue descrito en 1955 como un síndrome abdominal (Van Thiel et al, 1960). Se emplea el término anisakiasis (o anisakiosis) para referirse a la infestación humana producida por la ingestión de larvas vivas de *Anisakis simplex* s.l. mientras que el término anisakidosis se refiere a la producida por diferentes géneros de la familia Anisakidae (*A. simplex* s.l., *Pseudoterranova decipiens* y *Contracaecum osculatum*). Sin embargo, cada vez más autores utilizan ambos términos para definir las patologías causadas por parasitismo y/o alergia que se presentan al ingerir las larvas, e incluso se denomina “anisakiasis gastroalérgica” cuando se producen al tiempo manifestaciones alérgicas y gástricas causadas por larvas vivas durante su migración a la mucosa del tracto digestivo (Daschner et al, 2000, Moneo y Caballero, 2002). Se considera que *Anisakis simplex* s.l. es la principal responsable de la Anisakiasis (o Anisakiosis), problema que ha alcanzado singular relevancia en los últimos años (Audicana et al., 2002; Quijada et al, 2005; Audicana y Kennedy, 2008).

- **Localización de las larvas en humanos**

La localización preferente de las larvas en humanos inicialmente son en el tracto digestivo (estómago e intestino) pero pueden migrar a otros órganos tales como pulmones, hígado, bazo y páncreas entre otros (Sakanari y McKerrow, 1989). En países como Japón, donde el consumo de pescado crudo es tradicional, desde hace décadas se estima que la ingestión del parásito vivo puede ser una de las causas de la gran incidencia de tumores gástricos detectados en la población japonesa, con aparición de “tumores evanescentes” (vanishing tumors), descritos por primera vez ligados a la presencia de parásitos por Yamazaki et al (1976), así como granulomas asociados a la presencia de larvas de *Anisakis* (Yokogawa y Yoshimura, 1965).

- **Síntomas**

Los síntomas agudos principales son gastrointestinales, causados como resultado de la reacción inflamatoria al penetrar las larvas la mucosa, con aparición de náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, edema, fiebre ligera, escalofríos, etc. que pueden ser de distinta intensidad y presentarse transcurridas 24 a 72 horas desde el consumo de pescado, lo que en algunos casos dificulta el diagnóstico (Gómez Aguado et al, 2003; González Quijada et al, 2005). Aparecen lesiones de distinta importancia en la mucosa gastrointestinal en la zona de penetración de la larva.

Los síntomas crónicos se producen cuando la larva lleva tiempo en la mucosa lesionada produciendo en la mucosa abscesos y granulomas. Se manifiesta como molestias epigástricas que pueden persistir durante meses o incluso años. El dolor puede ir acompañado por anorexia, náuseas y dispepsia.

Para la eliminación de las larvas en el aparato digestivo se aconseja la localización y extracción de la larva por gastroendoscopia.

La sintomatología de la Anisakiasis extra-gastrointestinal o ectópica depende de la zona afectada ya que las larvas pueden atravesar las paredes del estómago o intestino y migrar a otros órganos. Se han descrito casos aislados de poliartritis (Arenal Vera et al, 1991).

- **ALERGIA**

Los primeros casos descritos de alergia a *Anisakis* datan de 1989 (Kasuya et al, 1990) habiéndose detectado en España en 1995 (Audicana et al, 1995). Se manifiesta como una respuesta de hipersensibilidad medida por Inmunoglobulina E (IgE) a distintas proteínas alergénicas del parásito que se asocian a los productos de secreción/excreción o a proteínas somáticas de las larvas de Anisákidos (Moneo et al, 2000). Existe una gran variación individual de la respuesta a los alérgenos pudiendo algunos pacientes ser alérgicos a distintos alérgenos.

Los principales alérgenos de *Anisakis* descritos por el Internacional Union of Immunological Societies (IUIS) Allergen Nomenclature Sub-Committee hasta Julio, 2011 se detallan en la Tabla 1. Algunas de las características de estas proteínas tales como su estructura, punto isoeléctrico, grupos –SH, etc., tienen gran importancia ya que pueden dar estabilidad al alérgeno en los tratamientos dados al pescado para su consumo, por lo que siguen siendo alergénicas después de los tratamientos que producen la muerte de las larvas.

| Tabla 1 | | | | | |
|--|--|-----------------|-----------|--|--|
| IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (Julio 2011) | | | | | |
| Alérgeno | Ubicación | PM (kDa) | PI | Estructura química | Otras características |
| Ani s 1 | Glándula secretora/ excretora | 24 | | | Reconocida por >80% de los individuos alérgicos. Similitud con inhibidores de serin proteasa tipo Kunitz |
| Ani s 2 | | 97 | | | Reconocida por el 88% de los individuos alérgicos. Paramiosina |
| Ani s 3 | | 41 | | | Similitud tropomiosinas. No es un alérgeno importante en la sensibilización al parásito |
| Ani s 4 | Glándula secretora/ excretora y espacio subcuticular | 9 | 5,57 | 2 residuos de Cys (aa 92 y 112) 115 aminoácidos. | Reconocida por 27% pacientes alérgicos. Inhibidor de cistein-proteasas (cistatina) Termorresistente a ebullición por 30 minutos. Resistente a pepsina |
| Ani s 5 | Glándula secretora/ excretora | 15 | | 152 aminoácidos. | Reconocida por 49% de pacientes alérgicos. Termorresistente. Homólogo a proteínas de SXP/RAL-2 de <i>Meloidogyne incognita</i> (parásito de plantas) y la proteína AS16 de <i>A. suum</i> (nematodo de cerdos) |
| Ani s 6 | | 7 | | 10 Cys (posibilidad de 5 enlaces disulfuro). 84 aa | Reconocida por <50% de pacientes alérgicos. Inhibidor de serin-proteasa |
| Ani s 7 | | 137 | | | Reconocida por 100% de pacientes alérgicos. Sin homología con otra proteína o alérgeno descrito |
| Ani s 8 | | 15 | | | Reconocida por 25% de pacientes alérgicos. Termorresistente. Similar a Ani s 5. Familia SXP/RAL-2. Demostradas 8 isoformas |
| Ani s 9 | Glándula secretora/ excretora | 14 | 9,06 | | Reconocida por 13% de pacientes alérgicos. Termorresistente. Familia SXP/RAL-2. 60% similitud con As-14 (alérgeno de <i>Ascaris suum</i>). función desconocida |
| Ani s 10 | | 22 | | | Reconocida por 39% de pacientes alérgicos. Función desconocida |
| Ani s 11 | | 27 | | | Reconocida por aprox. 50% de pacientes alérgicos. Función desconocida |
| Ani s 12 | | 31 | | | Reconocida por aprox. 50% de pacientes alérgicos. Función desconocida |

Se considera que es necesaria una infestación inicial de la mucosa gástrica o intestinal con la larva L3 viva para que se sintetice inmunoglobulina E (IgE) y se originen los síntomas alérgicos (Moneo et al, 2000) ya que las proteasas e inhibidores de proteasas que excreta/secretora la larva para invadir al huésped pueden actuar como alérgenos, pero que una vez que el individuo está sensibilizado, se pueden dar casos de alergia al consumir las proteínas alergénicas del parásito, por lo

que aunque se produzca la muerte de la larva por aplicación de distintos tratamientos que evitarían la infestación en humanos, no se evita la alergia en la población previamente sensibilizada a ciertos alérgenos de *Anisakis* debido a su gran resistencia (Moneo y Caballero, 2002; Moneo et al., 2005; Rodríguez Mahillo, 2006; Audicana y Kennedy, 2008). Sin embargo hay estudios en los que se han realizado pruebas de provocación con larvas liofilizadas en pacientes alérgicos a *A. simplex*, en los que no se produjeron reacciones adversas (Sastre et al, 2000). Por el contrario en ratones se ha desarrollado asma de origen alérgico por sensibilización nasal con antígenos de *Anisakis pegreffii* (Kirstein et al, 2007).

Las reacciones alérgicas asociadas al consumo de pescado parasitado con larvas L3 de *Anisakis spp* constituye con mucho la principal manifestación de la Anisakiasis.

- **Síntomas**

La alergia puede presentarse aislada con síntomas tales como angioedema, urticaria y choque anafiláctico o como un cuadro mixto gastrointestinal y alérgico (Audicana y Kennedy, 2008).

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE ANISAKIS EN PESCADOS Y PRODUCTOS DE LA PESCA

Existen diferentes métodos de detección de larvas con distintas aplicaciones, según se destinen a la utilización por la industria, para lo cual el pescado debe quedar intacto, o para determinar la tasa de prevalencia, intensidad de la infestación, etc. de una determinada zona de pesca, copo o especie en cuyo caso los métodos empleados son destructivos. Asimismo hay que tener en cuenta que la muerte de las larvas evita la infestación del consumidor, pero no evita la posibilidad de que se desarrollen reacciones alérgicas en individuos previamente sensibilizados

- **VIABILIDAD DE LAS LARVAS.**

Se define como la capacidad de sobrevivir a distintos tratamientos físicos o químicos o durante los procesos industriales o culinarios (EFSA, 2010). La importancia de determinar la viabilidad radica en la diferente problemática de ingestión de larvas vivas o muertas. Los métodos empleados más habituales son:

- **Movilidad.**

Una larva se considera viable cuando presenta movimientos espontáneos o estimulados, en el que las larvas se tocan con una aguja o pinzas sin dañarla y se observa si existe reacción.

- **Tinción con colorantes.**

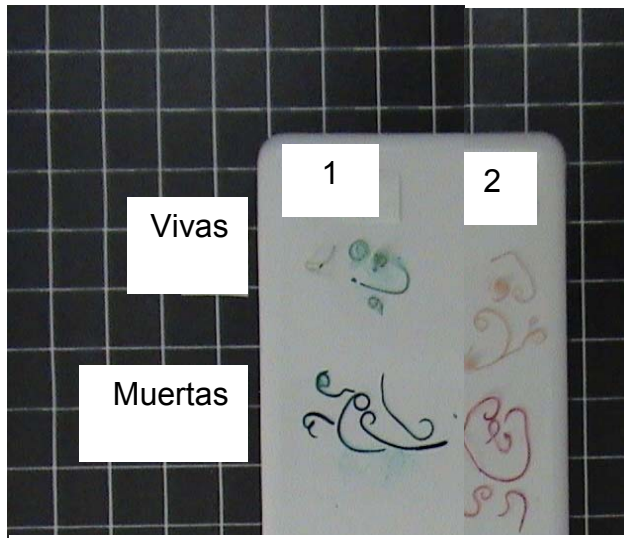


Figura 3: Tinción con verde brillante (1) y safranina (2)

Este método se utiliza para distinguir entre larvas vivas y muertas en pescado parasitado ya que las larvas muertas se tiñen más intensamente (Leinemann y Karl 1988). Los colorantes que han resultado más eficaces han sido safranina y verde brillante (Vidacek et al, 2010) que se utilizan en condiciones de digestión gástrica (pepsina en medio ácido a 37°C, 24 h) (Astwood, et al, 1996). Sin embargo, cuando las larvas se someten a condiciones tales como temperaturas altas (>60°C) que pueden producir alteraciones en la cutícula, se puede modificar la resistencia a la pepsina y detectarse en el medio fragmentos de las larvas e incluso se pueden digerir

completamente no apreciándose visualmente en el medio (Vidacek et al, 2010)

- **DETECCION DE LARVAS**

Los métodos utilizados tradicionalmente para la detección de las larvas en el pescado en la industria han sido la inspección visual y la transiluminación. Los métodos empleados en la industria deben ser no destructivos, eficaces y que puedan ser automatizados para que se puedan aplicar a las líneas de producción en los procesos industriales (40 cm/s en la producción industrial de filetes de bacalao). Se están estudiando distintos métodos que permiten detectar la presencia de las larvas y de sus alérgenos tanto en pescado como en productos procesados. Algunos de los métodos más empleados para la detección de larvas en pescado se aplican actualmente en la industria, sobre todo en la industria fileteadora y otros están en proceso de adaptación a los procesos industriales. Un resumen de los métodos más comunes se recoge en el informe de EFSA (2010). Estos métodos son:

- **Inspección visual.**

Este método localiza las larvas que se encuentran cerca de la superficie, sobre todo en la zona de la cavidad abdominal, que se pueden eliminar fácilmente durante el procesado. No se detectan larvas que situadas en zonas más profundas. Se emplea sobre todo en filetes o en pescados de un tamaño que permite su observación, ya que en piezas grandes, pigmentadas o con piel, la inspección visual da lugar a muchos errores.

- **Transiluminación (candling).**

Se utiliza sobre todo para filetes sin piel que se observan sobre una superficie traslúcida iluminada por la zona inferior con luz blanca (Karl y Leinemann, 1993). Se emplea en la industria procesadora para detectar larvas que pueden estar localizadas en el interior del músculo hasta una profundidad de 5-6 mm. El método es manual y aunque se considera que se pueden observar 300 filetes por hora, en general es inferior debido a la fatiga que se produce en los operarios (Wootten y Cann, 2001). Se estima que la observación manual representa una parte importante de los costes de

producción en la industria fileteadora de bacalao, considerándose un cuello de botella al reducir la velocidad del procesado y retrasar la producción, lo que a veces puede dar lugar a un crecimiento de microorganismos y a una degradación enzimática del producto (Bublitz y Choudhury 1992). La eficacia de la detección depende del grosor del filete, de la presencia de piel y de la coloración de la larva, siendo más eficaz para larvas de *Pseudoterranova* que de *Anisakis* debido a la mayor pigmentación de las primeras. También afecta la intensidad de la luz en la detección de las larvas (Bublitz y Choudhury, 1992). Son más eficaces cuando los filetes se cortan en láminas finas que permiten la visualización de las larvas.

Ambos métodos son no destructivos, no discriminan entre larvas vivas y muertas y se aplican actualmente en la industria procesadora.

- **Detección por luz ultravioleta.**

Este método de detección también se ha recomendado para distinguir entre larvas vivas y muertas. Las larvas de *Anisakis* emiten una fluorescencia azulada cuando se exponen a luz ultravioleta (366 nm) (Pippi, 1970) con una intensidad que varía en función de los tratamientos previos o posteriores dados al pescado. Cuando las larvas se someten a un proceso de congelación, la

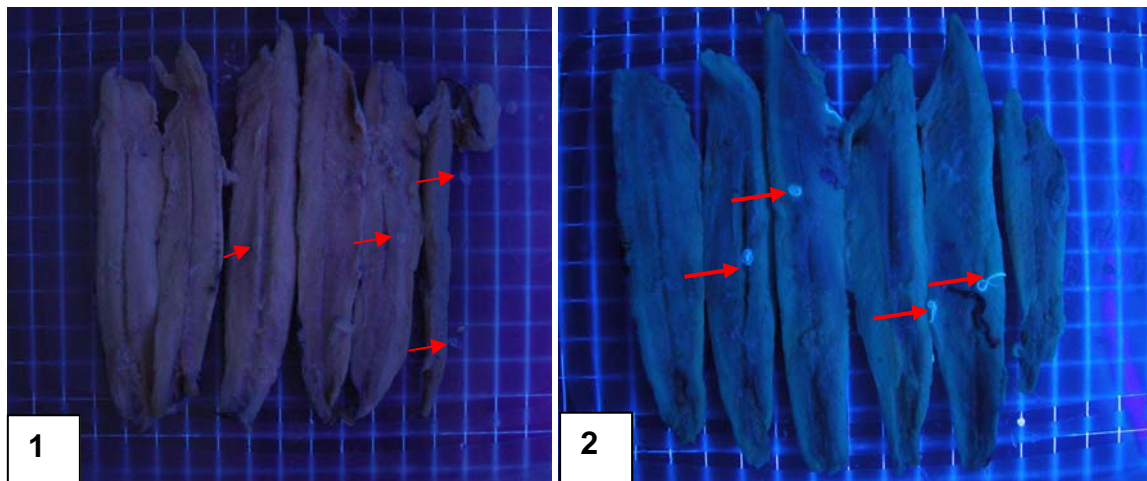


Figura 4: Larvas L3 de *Anisakis* observadas con luz ultravioleta (366 nm) antes (1) y después de congelar (2)

emisión de fluorescencia es intensa mientras que las larvas vivas en general no emiten fluorescencia (Figura 4) a no ser que hayan sufrido tratamientos que puedan generar stress, e incluso puede perderse la fluorescencia inicial cuando se someten las larvas o el pescado parasitado a tratamientos posteriores (Tejada et al., 2006). La muerte de la larva no coincide en muchos casos con la emisión de fluorescencia por lo que consideramos que no es un método apropiado para discriminar entre larvas vivas y muertas (Rodríguez Mahillo et al., 2008, Solas et al, 2009; Vidacek et al. 2009a, b, 2010). Como en los métodos anteriores, a partir de un determinado espesor no se detectan las larvas que están situadas en el interior de los filetes.

- **Método de presión y fluorescencia.**

Este método elimina el problema del grosor de las piezas a evaluar cuando la emisión de fluorescencia se utiliza para detectar nematodos. En este método los filetes a examinar con luz



Figura 5: Preparación de prensado de filetes para la observación con luz ultravioleta (366 nm) de larvas de Anisákidos (método de Karl y Leinemann, 1993)

ultravioleta se someten a una presión previa con el fin de conseguir un espesor de 1-2 mm. Para ello los filetes dorsales y ventrales sin piel, se introducen individualmente en bolsas de plástico transparente, se prensan con una prensa hidráulica, se congelan a una temperatura ≤ -18 °C durante un periodo igual o superior a 12 h y posteriormente se someten a inspección visual bajo una fuente de luz UV a 366 nm (Karl y Leinemann, 1993) (Figura 5). El método es también aplicable a las vísceras. Este método permite además de determinar el número de larvas, conocer la localización en el filete y se usa para cuantificación sistemática de larvas de nematodos en casos específicos (Levsen y Lunestad, 2010). Tiene el inconveniente de que es destructivo y que al hacerse sobre producto congelado no discrimina entre larvas vivas y muertas, ya que se prevé que las larvas estén muertas en las condiciones de trabajo.

Digestión con pepsina en medio ácido.

Se utiliza para separar las larvas del tejido muscular o vísceras en el que se encuentran alojadas. Para ello se trata el tejido parasitado con pepsina en medio ácido hasta producir la digestión del tejido, quedando liberadas las larvas (Smith y Wootten, 1975; Leinemann y Karl, 1988; Codex, 2004; EFSA 2010). La cutícula intacta de las larvas es estable en estas condiciones y el método permite distinguir entre larvas vivas y muertas. Si la cutícula de las larvas está alterada por algún proceso previo, puede dejar de ser estable y las larvas se pueden digerir, por lo que en estudios

realizados con larvas tratadas la recuperación puede ser menor de la esperada. El método es destructivo y se necesita tiempo hasta digerir el tejido, que varía según la especie de pescado que se trate (Solas et al, 2009)

- **Espectroscopía de imagen.**

Se basa en el espectro de la imagen del nematodo, cuantificando el contraste. Este varía en función de la longitud de onda aplicada y se correlaciona con las propiedades de absorción de la larva. Se han identificado componentes de la larva que absorben la luz en la región de 400 a 600 nm (Stormo et al 2004). Su aplicación preferente es filetes sin piel y detecta las larvas hasta una profundidad de 8-9 mm. (Heia et al, 2007). Discrimina entre las larvas y otros objetos tales como espinas, escamas, trozos de peritoneo, zonas hemorrágicas en los filetes, etc. Su precisión depende del nivel de contraste y puede obtenerse información espacial además de la información del espectro (Stormo et al, 2007). No es destructivo, no necesita contacto con el producto y se puede aplicar para trabajar en la línea de producción en tiempo real y tomar decisiones rápidas sobre el procesado posterior en función de la zona infestada. En pruebas efectuadas de detección automática de nematodos en filetes de bacalao en condiciones industriales la tasa de detección es comparable a la manual con mayor tasa de detección si las larvas son pigmentadas.

- **Detección electromagnética.**

El método se basa en la diferencia de conductividad de las larvas y del músculo. Se utiliza un magnetómetro SQUID (Superconducting Quantum Interference Device magnetometer) y se puede determinar la orientación y posición de la larva, presencia de espinas, etc. No se observa señal debido a la presencia de sangre. El campo magnético es independiente de la frecuencia. Se pretende hacer un sistema comercial automatizado que sustituya a la transiluminación (Choudhury et al, 2002).

- **Técnicas genéticas de identificación de *Anisakis*.**

En los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas genéticas para la identificación de *Anisakis* y otros parásitos, sobre todo por reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando distintas técnicas: PCR sequencing, Multiplex PCR, PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR-SSCP (Polymerase chain reaction - single-strand conformation polymorphism), RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA), RT- PCR (Real-time PCR) PCR-SSCP (polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism), ALF (Automated Laser Fluorescence DNA sequencer) (Kijewska et al, 2002; Szostakowska et al, 2002; Abe et al, 2006; Santos et al, 2006; Umehara et al, 2007, Zhang et al, 2007; Zhu et al., 2007, Chen et al., 2008; Espiñeira et al, 2010; Mosali et al, 2010; López y Pardo, 2010; Herrero y Vieites, 2011). Algunos de los métodos descritos no son aplicables a productos procesados. Se considera que el tamaño máximo del fragmento de DNA amplificado en productos enlatados es alrededor de 170 pares de bases (bp) (Quinteiro et al. 1998). En RT-PCR se ha estimado que el límite de detección es de 40ppm de parásito en 25g de muestra para identificar *A. simplex* en pescado y productos de la pesca (Lopez y Pardo, 2010). Estos autores han evaluado el efecto de la matriz utilizando pescado y productos procesados industrialmente como pescado salado, ahumado, surimi, paté, croquetas, enlatado, alimentos infantiles y alimentos preparados listos para comer, si bien las larvas se añadieron a los productos elaborados y no se sometieron al procesado.

- **Detección de alérgenos.**

Este método permite detectar y cuantificar alérgenos de *Anisakis simplex* en músculo de pescado y en productos procesados. Aunque se produzca la muerte de la larva por aplicación de distintos tratamientos que evitarían la infestación en humanos, las proteínas de la larva permanecen, por lo que no se evita que puedan producirse episodios de alergia en la población previamente sensibilizada a ciertos alérgenos de *Anisakis*, debido a su gran resistencia en la mayoría de las condiciones especificadas para producir la muerte de las larvas (Moneo y Caballero, 2002; Moneo et al., 2005; Audicana y Kennedy, 2008). El método detecta en músculo de pescado cantidades inferiores a 1 ppm de antígenos de *A. simplex*, entre ellos Anis 4 que tiene alta estabilidad térmica (100°C durante 30min) y está relacionado con episodios de reacciones anafilácticas. No se han detectado reacciones cruzadas y la tasa de recuperación es de 82.5%. Los antígenos extraídos se detectan por IgG inmunoblot y se cuantifican por dot blot. Las propiedades alergénicas de los extractos se evalúan por IgE inmunoblotting y por el test de activación de basófilos (Rodríguez Mahillo et al, 2010). El método para el que se ha solicitado la patente es eficaz para detectar la posible alergenicidad residual de pescado parasitado sometido a distintos procesos culinarios o tecnológicos o de productos procesados (Tejada et al, 2008, Rodríguez Mahillo et al 2008, 2010; Vidaček et al, 2009a, b, 2010, 2011). También se han detectado los antígenos de *A. simplex* en pescado y productos de la pesca por inmunohistoquímica (Tejada et al, 2007; Solas et al, 2008, 2009)

ESTABILIDAD A TRATAMIENTOS TECNOLÓGICOS Y CULINARIOS DE LARVAS Y ALÉRGENOS

El informe de EFSA (2010) considera que la aplicación de tratamientos de congelación y de calentamiento a *A. simplex* durante un tiempo y temperatura determinados, son suficientes para producir la muerte de las larvas y evitar la parasitación de los consumidores. Sin embargo no hay estudios de las posibles modificaciones que puedan darse a estas condiciones en función de las distintas especies de larvas, temperatura del hábitat o tiempo pasado desde la muerte del pez. En relación con los tratamientos dados a las larvas o al pescado parasitado, en general no existen trabajos sistemáticos por lo que los datos que se citan se corresponden a estudios aislados realizados en condiciones específicas.

- **Congelación.**

Las condiciones recomendadas en Europa para producir la muerte de las larvas y evitar la infestación en pescados que se consumen crudos o con tratamientos que no producen la muerte de las larvas y que son obligatorias para los establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades son una temperatura -20°C en el centro térmico durante un tiempo igual o superior a 24 horas (reglamentos CE nº 853/2004 y CE nº 854/2004; Real Decreto (RD) 1420/2006). Estas recomendaciones difieren de las dadas por la US Food and Drug Administration de EE UU (U.S. FDA, 2011) que especifican que para producir la muerte de los parásitos el pescado o producto de la pesca tiene que congelarse y mantenerse a una temperatura igual a inferior a -20°C durante 7 días, congelarse a una temperatura de -35°C o inferior durante 15 h, o congelar a una temperatura de -35°C

o inferior hasta que se congele y almacenar a una temperatura de -20°C o inferior durante 24 horas. Estas recomendaciones no tienen en cuenta la temperatura alcanzada en el centro térmico por lo que pueden ser excesivas en función de las características fisicoquímicas del pescado o piezas a congelar y representar un perjuicio económico para la industria suministradora.

Aunque se produzca la muerte de las larvas se ha comprobado por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM), que la cutícula de la larva puede alterarse modificando su permeabilidad (Tejada et al, 2006). Esto puede originar la liberación al medio de alérgenos cuando las larvas congeladas se someten a tratamientos culinarios posteriores por lo que las larvas congeladas pueden dar lugar a la aparición de procesos alérgicos en individuos previamente sensibilizados (Rodríguez-Mahillo et al, 2008; Solas et al, 2009; Vidacek et al, 2009b)

- **Calentamiento.**

El cocinado de pescado por calor puede aplicarse por medio de los tratamientos convencionales en los que el calor se propaga por conducción desde la superficie hacia el centro térmico o por microondas, donde el calor se genera en todo el espesor que alcanzan las microondas. El tratamiento mínimo de aplicación de calor recomendado por EFSA (2010) para producir la muerte de las larvas de *Anisakis* es $>60^{\circ}\text{C}$ en el centro térmico durante un tiempo igual o superior a 1 minuto. Sin embargo en estudios realizados en larvas aisladas se ha observado que el tiempo necesario para producir la muerte del 100% de las larvas es superior a 1 min y depende del lote de larvas (Vidacek et al, 2010).

Se considera que cuando se aplica calor en los tratamientos térmicos **convencionales** el tiempo varía en función del grosor de la pieza. Hay que tener en cuenta que las condiciones de tiempo-temperatura necesarias para matar las larvas pueden no darse en zonas donde estas están alojadas, sobre todo en piezas de gran tamaño, ya que el tratamiento térmico que se da al cocinar el pescado es a veces muy ligero (plancha, hervido, etc.) para evitar modificaciones sensoriales no deseadas, por lo que la temperatura que se alcanza en la superficie es muy diferente a la del centro térmico.

En el **calentamiento por microondas** el calor se genera en todo el espesor que alcanzan las microondas (aprox. 1,5 cm desde la superficie en hornos de microondas domésticos) con el inconveniente añadido de que incluso en esta zona la distribución del calor no es uniforme, por lo que se generan zonas recalentadas y zonas frías. Los datos encontrados en la bibliografía son difíciles de comparar debido a la gran cantidad de parámetros que influyen, entre ellos, el tipo de horno utilizado. Algunos informes clínicos publicados consideran que el calentamiento por microondas de pescado parasitado no produce la muerte de las larvas aunque no dan datos sobre las condiciones de las piezas a calentar o el tratamiento dado (Lane et al, 1988), por lo que dependiendo del espesor de la pieza pudiera ser que las zonas donde estaban alojadas las larvas no fuesen calentadas por las microondas. El calentamiento por microondas es más eficaz que el calentamiento convencional cuando las microondas se distribuyen uniformemente y penetran toda la pieza, observándose por microscopía electrónica de barrido (SEM) cambios en las larvas más evidentes que en calentamiento

convencional y ocasionando menos modificaciones indeseadas en las características sensoriales del pescado (Vidacek et al, 2009b, 2011).

Aunque se produzca la muerte de las larvas al tratarlas por calor hemos detectado antígenos termoestables en las condiciones de calentamiento más extremas estudiadas, incluso si las larvas estaban congeladas antes de aplicar el tratamiento de calor (Vidacek et al 2009b, 2010, 2011; Rodríguez-Mahillo et al, 2010)

- **Adición de sal o salmuera.**

Los datos descritos en la bibliografía difieren ya que en la mayoría de los trabajos publicados el efecto de la sal se estudia conjuntamente con una disminución del pH. En arenques salados producidos en condiciones industriales se ha estimado que el tiempo necesario para matar los parásitos es 20 días (CEVPM, 2005). Según datos aportados por AESAN, se estima que cuando la concentración de sal durante un tiempo igual o superior a 6 semanas es del 8-9%, no es necesario congelar para matar las larvas (AESAN, 2007)

- **Efecto del pH.**

La aplicación de pH ácido para prolongar el periodo de conservación de los pescados se da en muchos productos tradicionales tales como boquerones en vinagre, ceviche, lomi-lomi, etc. y en general se aplican juntamente con adición de sal. Se considera que estos tratamientos dados en condiciones domésticas o industriales no son suficientes para producir la muerte de las larvas, por lo que en Europa es obligatorio para los establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades, congelar el pescado que se va a someter a estos tratamientos. El tiempo y las condiciones de marinado para producir la muerte de las larvas depende de la especie de pescado y de la concentración de sal del medio, pudiendo variar entre 35 y 119 días (Karl et al, 1995). Se estima que los “boquerones en vinagre” consumidos en distintos países del área Mediterránea no producen la muerte de las larvas y puede ser una de las fuentes más importantes de Anisakiasis, incluyendo alergia a *Anisakis*, por lo que es obligatorio para las industrias congelar el producto antes o después del procesado. Para producir la muerte de las larvas en condiciones de pH ácido se ha propuesto el tratamiento del pescado parasitado con una alta concentración de ácido acético (10% vol/vol) y sal (12%), seguido de un lavado para disminuir la concentración a niveles sensoriales aceptables por el consumidor (Sánchez-Monsálvez et al, 2005).

En “boquerones en vinagre” se han detectado Anisakis 4 y otros alérgenos de *A. simplex* durante todo el periodo en la fase líquida y en el músculo fresco y congelado, por lo que aunque el tratamiento se de en pescado previamente congelado no se descarta la posibilidad de sufrir reacciones alérgicas en consumidores sensibilizados (Solas et al, 2009)

- **Ahumado.**

Las larvas de *Anisakis* mueren en condiciones de ahumado en caliente (temperaturas superiores a 60°C. Se considera que un ahumado a 70°C-80°C durante un tiempo de 3 a 8 h, produce la muerte de las larvas (U.S. FDA/CFR, 2001; Sainclivier, 1985). Sin embargo el ahumado en frío,

en el que la temperatura del producto se mantiene por debajo de 38°C, incluso durante días, no es suficiente para producir la muerte de las larvas, por lo que es necesario someterlo a congelación (EFSA, 2010)

- **Tratamiento por altas presiones.**

El objetivo principal del tratamiento por altas presiones de pescado parasitado es producir la muerte de las larvas sin causar cambios en el músculo de pescado que alteren la apariencia y características del pescado crudo, necesarias en ciertas presentaciones culinarias. En general la

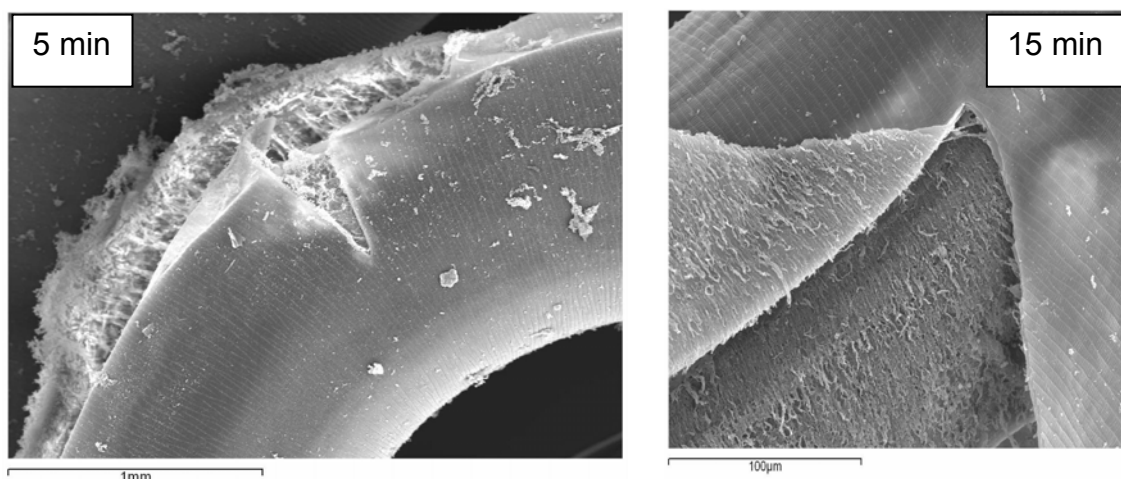


Figura 5: Roturas observadas en la cutícula de larvas L3 de *Anisakis* sometidas a 200 mPa durante 5 y 15 minutos

presión necesaria para matar las larvas de *A. simplex* es menor que la que se utiliza para destruir microorganismos. La aplicación de altas presiones a músculo de pescado produce desnaturalización

de proteínas con modificación de enlaces inter- e intra-proteicos, lo que se ha utilizado en la industria procesadora para mejorar los geles elaborados a partir de surimi (Ohshima et al, 1993; Ashie y Lanier, 1999; Uresti et al, 2006; Hwang et al, 2007). Las condiciones mínimas necesarias para producir la muerte de las larvas difieren según los estudios pero en todos los casos la presión aplicada es igual o superior a 200 MPa (Molina García y Sanz, 2002; Dong et al, 2003; Vidacek et al, 2009c). Se han detectado cambios en músculo de salmón y de merluza en función de la intensidad del tratamiento (Dong et al, 2003, Vidacek et al, 2009c) así como alérgenos de *Anisakis* por inmunoblotting e inmunohistoquímica incluso en las condiciones más extremas de presión y tiempo aplicadas (Vidacek et al, 2009c).

- **Electrocución.**

El procedimiento patentado (Bererciartua, 2005) consiste en la aplicación a pescado recién capturado de una electrocución por inmersión del pescado en recipientes con electrolito donde el ánodo y el cátodo proporcionan una intensidad que puede variar en función del tamaño y características del pescado a electrocutar y del parásito a eliminar. Se aplica de forma individualizada

en pescados grandes o en forma masiva en pescados pequeños. Los autores de la patente consideran que se inactivan las larvas sin que se produzcan cambios sensoriales en el pescado.

- **Irradiación.**

Este tratamiento no se considera adecuado ya que las dosis de irradiación que se han visto que son eficaces para producir la muerte de las larvas son muy superiores a las recomendadas para aplicar a pescados y mariscos (3 kGy) (EFSA, 2010)

- **Adición de extractos vegetales y otros productos.**

Desde hace décadas se está estudiando *in vivo* y *in vitro* extractos vegetales para matar las larvas de *Anisakis simplex*. Los estudios *in vivo* se realizan administrando distintos compuestos (derivados monoterpénicos obtenidos de distintos aceites esenciales principalmente) juntamente con las larvas a ratas, mientras que los estudios *in vitro* tratan de adicionarlos a los alimentos parasitados para disminuir la patogenicidad de la larva (Goto et al., 1990; Valero et al, 2004; Hierro et al, 2004, 2006; Navarro et al, 2008). Se determina el efecto letal sobre la larva cuando se utilizan aislados y la sinergia con otros compuestos en función de la concentración utilizada

Como conclusión puede estimarse que existen tratamientos eficaces para producir la muerte de las larvas y evitar la infestación y la sensibilización del consumidor. Sin embargo las larvas no se destruyen y las proteínas alergénicas de la larva permanecen, siendo algunas muy estables a los tratamientos culinarios, por lo que aunque las larvas estén muertas se pueden producir síntomas alérgicos en individuos previamente sensibilizados a los alérgenos de *Anisakis*.

Referencias

- Abaunza, P., Villamor, B. and J. R. Pérez. 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). *Scientia Marina*, 59(3-4): 223-233.
- 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. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 59(1), 60-62.
- Abollo, E., D'Amelio, S., Pascual, S., 2001, Fitness of the marine parasitic nematode *Anisakis simplex* s. str. in temperate waters of the NE Atlantic. *Dis Aquat Organ* 45, 131-139.
- AESAN, 2007, Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de *Anisakis*
- Arenal-Vera JJ, Marcos Rodríguez JL, Borrego Pintado MH, Bowakin Did W, Castro Lorenzo J, Blanco Álvarez JI. 1991. Anisakiasis como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico: primer caso en la literatura médica. *Rev Esp Enferm Dig*; 79: 355-8
- Ashie INA and Lanier TC, 1999. High pressure effects on gelation of surimi and turkey breast muscle enhanced by microbial transglutaminase. *J Food Sci* 64:704–708

- Astwood, J. D., J. N. Leach, and R. L. Fuchs. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat. Biotechnol.* 14:1269–1273.
- Audicana, MT, Fernandez de Corres, L., Muñoz, D. Fernandez E., Navarro, J.A., Del Pozo, M.D. 1995. Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish. *J. Allergy Clin Immunol.*, 96:558-560.
- Audicana, M.T., Ansotegui, I.J., Fernández de Corres, L., Kennedy, M.W. 2002. *Anisakis simplex*: dangerous - dead and alive?. *Trends Parasitol.*, 18:20-25
- Audicana, M.T., Kennedy, M.W., 2008, *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev* 21, 360-379
- Bererciartua Achaga, J.A. 2005 Patente ES 2 213 486 (B1) Procedimiento para eliminar parásitos en pescado
- Berland, B. 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, 2: 1-50.
- Bublitz CG, Choudhury GS. 1992. Effect of light intensity and color on worker productivity and parasite detection efficiency during candling of cod fillets. *J Aqua Food Prod Technol* 1(2):75–89.
- Carvajal, J., Cattán, P. E., Castillo, C. and P. Schatte. 1979. Larval anisakids and other helminths in the hake *Merluccius gayi* (Guichenot) from Chile. *Journal of Fish Biology*, 15, 671-677.
- CEVPM, 2005, Etude des conditions de destruction des larves d'*Anisakis simplex* dans le hareng salé au sel sec destiné à la fabrication de harengs saurs traditionnels.
- Chen et al., 2008; Chen, Q., Yu, H. Q., et al. (2008). Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodes with zoonotic potential. *Parasitology Research*, 104(1), 79-84
- Choudhury GS, Jenks WG, Wikswo JP, Bublitz CG. 2002. Effects of parasite attributes and injected current parameters on electromagnetic detection of parasites in fish muscle. *J Food Sci* 67(9):3381–3387
- Codex-Alinorm 04/27/18) Determinación de la Viabilidad de los Nematodos (Método modificado con arreglo a la Referencia 1) Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias Comisión del CODEX Alimentarius. 27º Período de sesiones Ginebra, 28 de junio - 3 de julio de 2004. Informe de la 36ª reunión del Comité del CODEX sobre higiene de los Alimentos. Washington D.C., Estados Unidos de América, 29 de marzo - 3 de abril de 2004
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Cabañas, R., Suarez-de-Parga, J., López-Serrano, M., 2000, Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol* 105, 176-181.
- De Ley, P. and Blaxter, M. L. 2004. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. In: (R. C. Cook and D. J. Hunt, Eds) *Nematology Monographs and Perspectives*, 2. Brill, Leiden-Boston. 633-653.
- Deardorff, T.L., Kent, M.L., 1989, Prevalence of larval *Anisakis simplex* in pen-reared and wild-caught salmon (*Salmonidae*) from Puget Sound, Washington. *J Wildl Dis* 25, 416-419.
- Delyamure, S. L., Kurochkin, Y. V. and Skyabin, A. S. 1964. Contributions to the helminth fauna of the Caspian seal (*Phoca caspica* Gm.). *Trudy Astrakhanskogo Zapovednika*, 9: 105-118.

- Dong, F.M., Cook, A.R., Herwig, R.P., 2003, High hydrostatic pressure treatment of finfish to inactivate *Anisakis simplex*. *J Food Prot* 66, 1924-1926.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2010. Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA J.* 8(4):1543:1–91. doi:10.2903/j.efsa.2010.1543. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1543.pdf>. Accessed 28 March 2011
- Espiñeira, M., Herrero, B., Vieites, J. M., and Santaclara, F. J. (2010). Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR-RFLP of ITS-1 region. *Food Control*, 21, 1051-1060.
- Gómez-Aguado, F., Picazo, A., Caballero, M. L., Moneo, I., Asturias, J. A., Corcuera, M. T., Casado, I. and Alonso, M. J. 2003. Ultrastructural localization of An s 1, a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res.*, 89: 379-380
- González Quijada S, González Escudero R, Arias García L, Gil Martín AR, Vicente Serrano J and Corral Fernández E, 2005. Anisakiasis gastrointestinal manifestations: description of 42 cases. *Rev Clin Esp* 205:311–315
- Goto, C., Kasuya, S., Koga, K., Ohtomo, H., Kagei, N., 1990, Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in *Anisakis* larvae in vitro. *Parasitol Res* 76, 653-656.
- Heia, K., Sivertsen, A. H., Stormo, S. K., Elvevoll, E., Wold, J. P., and Nilsen, H. 2007. Detection of nematodes in cod (*Gadus morhua*) fillets by imaging spectroscopy. *Journal of Food Science* 72(1): 11-15
- Herrero y Vieites, 2011 Detection of anisakids in fish and seafood products by real-time PCR *Food Control*, Volume 22, Issue 6, June 2011, Pages 933-939
- Hierro, I., Valero, A., Perez, P., Gonzalez, P., Cabo, M.M., Montilla, M.P., Navarro, M.C., 2004, Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine* 11, 77-82.
- Hierro, I., Valero, A., Navarro, M.C., 2006, In vivo larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomedicine* 13, 527-531.
- Huss, H. H, 1993. Assurance of seafood quality.FAO Fisheries Technical Paper. No. 334. Rome, FAO. 169p
- Hwang, Y.K., Kim, J.S., Lee, J.B., Song, T.J., Joo, K.W., Lee, J.S., Cho, S.W., 2003, Human anisakiasis: Diversity in antibody response profiles to the changing antigens in larval excretions/secretions. *Parasite Immunol* 25, 1-7.
- Incorvaia, IS and Hernández D.R. 2006. Nematodes parásitos como indicadores biológicos de *Macrurus magellanicus* (Parasites nematodes as biological tags of *Macrurus magellanicus*). INIDEP Informe Técnico 61 Diciembre 2006. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, Argentina, 36 pp
- ISFP VII 2007. VII International Symposium of Fish Parasites. Fish Parasitology in the 21st Century: From Biodiversity and Ecosystem to Global Warming, Session 11: *Anisakis* nematodes and anisakidosis, Viterbo, Italy, 24-28 September, 2007. *Parassitologia* 49 (Vol 2): 209–234

- ISFP VIII. 2011. VIII International Symposium of Fish Parasites. Viña del Mar, Chile, del 26 - 30 septiembre 2011) <http://www.8isfp.com/>
- International Union of Immunological Societies. 2011. Allergen nomenclature. Allergen Nomenclature Sub-Committee. Available at: <http://www.allergen.org/Allergen.aspx>. Accessed 14 April 2011.
- Karl, H., Leinemann, M., 1993, A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products. Arch. Lebensmittelhyg 44, 105-128.
- Karl, H., Roepstorff A, Huss HH, Bloemasma B, 1995, Survival of *Anisakis* larvae in marinated herring fillets. Int J Food Sci Technol 29, 661-670
- Karl H, 2008. Nematode larvae in fish on the German market - 20 years of consumer related research. Arch Lebensmittelhyg 59:107-116
- Kijewska, A., Rokicki, J., Sitko, J., and Wegrzyn, G. 2002. Ascaridoidea: a simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. Experimental Parasitology, 101(1), 35-39.
- Kirstein F, Nieuwenhuizen NE, Worsnell G, Brombacher F, Mattiucci S, Lopata A.L. 2007. Different routes of sensitization to *Anisakis pegreffii* in a mouse model of allergic asthma. Parassitologia 49(2) 222.
- Lane CD, Master R N and Tietbohl RH, 1988. If your uneaten food moves, take it to a doctor. *J Am Med Assoc* 260:340–341
- Leinemann, M., and H. Karl. 1988. Untersuchungen zur Differenzierung lebender und toter Nematodenlarven (*Anisakis* sp.) in Heringen und Heringserzeugnissen. Arch. Lebensmittelhyg. 39:133–156.
- Levsen, A., Midthun, E., 2007, Occurrence and spatial distribution of *Anisakis* sp. in three commercially important pelagic fish stocks from the NE Atlantic, with comments on the significance to consumer safety. Parassitologia 2, 402-403.
- Levsen, A., Lunestad, B.T., 2010, *Anisakis* third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh. Vet Parasitol 171(3-4):247-253
- Lopez, I., Pardo, M.A., 2010, Evaluation of a Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay for Detection of *Anisakis simplex* Parasite as a Food-Borne Allergen Source in Seafood Products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 1469-1477.
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Portes Santos, C., Costa, G., Di Benedicto, A. P, Ramos, R., Argyrou, M., Cianchi, R., Bullini, L. 2002. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.*, 51: 159-170.
- Mattiucci S. and 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* 2008:47-148.
- McClelland, G., Misra, R. K. and D. J. Martell. 1990. Larval anisakine nematodes in various fish species from Sable Island Bank and vicinity, p 83-118. In W. D. Bowen (ed.) Population

- biology of sealworm (*Pseudoterranova decipiens*) in relation to its intermediate and seal hosts. Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences, 222.
- Mladineo, I. 2003 *Anisakis simplex* in the Adriatic Sea. *Periodicum Biologorum*, 105(4): 389-392
- Molina-Garcia, A.D., Sanz, P.D., 2002, *Anisakis simplex* larva killed by high-hydrostatic pressure processing. *J Food Prot* 65, 383-388.
- 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*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 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. *Alergol Inmunol Clin*. 17: 210-207,
- Moneo I, Caballero ML, Gonzalez-Muñoz M, Rodriguez-Mahillo AI, Rodriguez-Perez , Silva A. 2005. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol Res*. 96: 285–289.
- Mossali C, Palermo S, Capra E, Piccolo G, Botti S, Bandi C, D'Amelio S, Giuffra E. 2010. Sensitive detection and quantification of anisakid parasite residues in food products. *Foodborne Pathog Dis*. Apr;7(4):391-7.
- Navarro, M.C., Noguera, M.A., Romero, M.C., Montilla, M.P., Gonzalez de Selgas, J.M., Valero, A., 2008, *Anisakis simplex* s.l.: Larvicidal activity of various monoterpene derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo. *Exp Parasitol* 120, 295-299.
- Ohshima T, Ushio H and Koizumi C, 1993. High-pressure processing of fish and fish products. *Trends Food Sci Technol* 4:370–375.
- Pippy, J.H., 1970. Use of ultraviolet light to find parasitic nematodes in situ. . *J. Fish. Res. Bd. Can.* 27, 963-965.
- Quijada J., C.A. Lima dos Santos and N. Avdalov. 2005. Enfermedades parasitarias por consumo de pescado. Incidencia en América Latina. *Infopesca Internacional*. 24: 16-23.
- Quinteiro, J., Sotelo, C. G., Rehbein, H., Pryde, S. E., Medina, I., and Perez-Martin, R. I. 1998. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1662-1669.
- Real Decreto (RD) 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. BOE núm. 302
- Reglamento (CE) No 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de octubre de 2009 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) no 1774/2002 (Reglamento sobre subproductos animales)
- Reglamento (CE) No 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal (DO L 226 de 25.6.2004, p. 22). Corrigendum to Regulation (EC) No 853/2004 of the European

Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. (OJ L 139,30.4.2004) available at: <http://eur-lex.europa.eu/JOHtml.do?uri=OJ:L:2004:226:SOM:EN:HTML> [accessed December 2008].

- 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 (L 139/206 Diario Oficial de la Unión Europea 30.4.2004)
- Rodríguez-Mahillo AI. 2006. Clonación y caracterización de alérgenos recombinantes de *Anisakis simplex*. Valoración de su utilidad en el diagnóstico de la Anisakiasis. Doctoral Thesis. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Spain. pp 131
- Rodríguez-Mahillo, A.I., Gonzalez-Munoz, M., Moneo, I., Solas, M.T., Mendizabal, A., de las Heras, C., Tejada, M., 2008, Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion. J Food Prot 71, 2578-2581.
- 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 Pathogens and Disease, 7(8), 967-973.
- Sainclivier, M., 1985, L'industrie alimentaire halieutique, Vol 2: Des techniques ancestrales à leurs réalisations contemporaines, Ecole nationale supérieure agronomique de Rennes
- Sakanari, J. A., and McKerrow, J. H. 1989. Anisakiasis. Clinical Microbiology Review, 2: 278-284.
- Sanchez-Monsalvez, I., de Armas-Serra, C., Martinez, J., Dorado, M., Sanchez, A., Rodriguez-Caabeiro, F., 2005, A new procedure for marinating fresh anchovies and ensuring the rapid destruction of *Anisakis* larvae. J Food Prot 68, 1066-1072.
- Santos, A. T., Sasal, P., Verneau, O. and Lenfant, P. 2006. A method to detect the parasitic nematodes from the family Anisakidae, in *Sardina pilchardus*, using specific primers of 18 S DNA gene. European Food Research and Technology, 222 (1-2), 71-77.
- Sastre, J., Lluch-Bernal, M., Quirce, S., Arrieta, I., Lahoz, C., Del Amo, A., Fernandez-Caldas, E., Maranon, F., 2000, A double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite, *Anisakis simplex*. Allergy 55, 560-564.
- Smith, J.W., 1984, The abundance of *Anisakis simplex* L3 in the body cavity and flesh of marine teleosts. Int. J. Parasitol 14, 491-495.
- Smith, J.W., Wootten, R., 1975, Experimental studies on the migration of *Anisakis* sp. larvae (Nematoda: ascaridida) into the flesh of herring, *Clupea harengus* L. Int J Parasitol 5, 133-136.
- Solas, M.T., Garcia, M.L., Rodriguez-Mahillo, A.I., Gonzalez-Munoz, M., de las Heras, C., Tejada, M., 2008, *Anisakis* antigens detected in fish muscle infested with *Anisakis simplex* L3. J Food Prot 71, 1273-1276.
- Solas MT, García ML, De las Heras C., Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M., Moneo, I., Mendizábal A. and Tejada M. 2009. *Anisakis simplex* antigens in fresh and frozen-thawed muscle of anchovies in vinegar. Food Sc. Tech. Int. 15; 139-148,

- Stormo SK, Ernstsén A, Nilsén H, Heia K, Sivertsén AH, Elvevoll E. 2004. Compounds of parasitic roundworm absorbing in the visible region: target molecules for detection of roundworm in Atlantic cod. *J Food Prot* 67(7):1522–5
- Stormo, S K., Sivertsén A, Heia K., Nilsén H; And Elvevoll E. 2007. Effects of Single Wavelength Selection for Anisakid Roundworm Larvae Detection through Multispectral Imaging *Journal of Food Protection*, Vol. 70, (8): 1890–1895
- Szostakowska, B., Myjak, P., Kur, J. 2002. Identification of anisakid nematodes from the Southern Baltic Sea using PCR-based methods. *Molecular and Cellular Biomechanics*, 16(2), 111-118.
- Tejada, M., Solas, M.T., Navas, A., Mendizabal, A., 2006, Scanning electron microscopy of *Anisakis* larvae following different treatments. *J Food Prot* 69, 1379-1387.
- Tejada M, Solas MT, De las Heras C, Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, Moneo I, Mendizábal A. 2007. Antigenic activity of *Anisakis* larvae is conserved after food processing and pepsin treatments. *Parassitologia* 49(2) 406
- Tejada Yábar M, Moneo Goiri I, Rodríguez Mahillo AI; González Muñoz M y Solas Alados MT. 2008. Método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en Alimentos destinados al consumo humano o animal. Patente española N° de solicitud: P200803495. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A. 2007. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitology International*, 56(3), 211-215.
- Urawa S, Fujisaki Y. 2006 Heavy infection of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) larvae in the muscle of maturing chum salmon: a preliminary report. *NPAFC Doc.* 993
- Uresti RM, Velazquez G, Vázquez M, Ramírez JA and Torres JA, 2006. Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat induced gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Food Chem* 94:202–209
- U.S. FDA, 2001 FDA/CFSSAN. 2001. Processing Parameters Needed to Control Pathogens in Cold Smoked Fish - Potential Hazards in Cold-Smoked Fish: Parasites. Chapter V. *U. S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition*.
- U.S. FDA, 2011 Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. Fourth Edition. April 2011, Department of Health and Human Services. Public Health Service. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Food Safety. Chapter 5 Parasites pag 91-98. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Seafood/FishandFisheriesProductsHazardsandControlsGuide/UCM252393.pdf>
- Valero A, P. Pérez, P. González, M. M. Cabo, M. P. Montilla and M. C. Navarro. 2004. Action of different monoterpene compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae I. Hierro1, A. *Phytomedicine* 11: 77–82
- Valero, A., M. I. Paniagua, I. Hierro, V. Díaz, M. J. Valderrama, R. Benítez, and F. J. Adroher. 2006. Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the Mediterranean coasts of Andalucía (Southern Spain). *Parasitol. Int.* 55:1–5.

- Van Thiel, P.H., Kuipers, F.C. and Roskam, R.T. 1960. A nematode parasitic to herring causing acute abdominal syndromes in man. *Trop. Geogr. Med.*, 12:97–113.
- Vidacek, S. De las Heras C. Solas MT, Mendizábal, A., Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M. and Tejada M. 2009a, *Anisakis simplex* allergens remain active after conventional or microwave heating and pepsin treatments of frozen L3 larvae. *J Sci Food Agric.* 89:1997-2002.
- Vidaček, S. De las Heras C. Solas MT. Rodríguez Mahillo, AI and Tejada M. 2009b. Effect of high hydrostatic pressure on mortality and allergenicity of *Anisakis simplex* L3 and on muscle properties of infested hake. *J Sci Food Agric* 89: 2228–2235
- Vidaček, S. De las Heras C. and Tejada M. 2009c. Quality of fish muscle infested with *Anisakis simplex*. *Food Sc. Tech. Int.*; 15(3):283-290
- Vidaček, S. De las Heras C. Solas MT, Mendizábal, A., Rodríguez-Mahillo AI, and Tejada M. 2010. Antigenicity and Viability of *Anisakis* larvae heated at different time-temperature conditions. *J Food Prot*; 73(1): 62-68
- Vidaček, S. De las Heras C. Solas MT, García, M.L. Mendizábal, A., and Tejada M. 2011 Viability and Antigenicity of *Anisakis simplex* after Conventional and Microwave Heating at Fixed Temperatures. En prensa. *J Food Prot*
- Wharton D.A., Hassall M.L. and Aalders O. 1999. *Anisakis* (Nematoda) in some New Zealand inshore fish. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 33: 643_648.
- Wootten, R., Cann, D.C., 2001, Round worms in fish Marine Laboratory of the Department of Agriculture and Fisheries for Scotland and the Torry Research Station of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- World_Health_Organization (WHO), 2004, Report of Joint WHO/FAO workshop on food-borne trematode infections in Asia. Ha Noi, Vietnam, 26-28 November, WHO, WPRO, 1-58.
- Yamazaki, M; Hara, K; Hasegawa, T., Vanishing tumor of the stomach?. *Clin. Radiol.* 21: 47- 54, 1976
- Yokogawa, M., and H. Yoshimura. 1965. *Anisakis*-like larvae causing eosinophilic granulomata in the stomach of man. [Am. J. Trop. Med. Hyg.](#) 14: 770-773.
- Young, P., 1972. The relationship between the presence of larval anisakine nematodes in cod and marine mammals in British home waters. *J Appl Ecol* 9, 459-485.
- Zhang, L., Hu, M., Shamsi, S., Li, H., Xu, Z., Li, L., et al. 2007. The specific identification of anisakid larvae from fishes from the Yellow Sea, China, using mutation scanning-coupled sequence analysis of nuclear ribosomal DNA. *Molecular and Cellular Probes*, 21, 386-390.
- Zhu, X. Q., Podolska, M., Liu, J. S., Yu, H. Q., Chen, H. H., Lin, Z. X. 2007. Identification of anisakid nematodes with zoonotic potential from Europe and China by single-strand conformation polymorphism analysis of nuclear ribosomal DNA. *Parasitol. Research*, 101, 1703-1707.