

**NEMATODOS ANISAKIDOS EN PECES DE CONSUMO Y PREVALENCIA DE
ANTICUERPOS ANTI – *Anisakis* EN UNA POBLACIÓN DE COLOMBIA**

JENNIFFER ALEJANDRA CASTELLANOS GARZÓN
Estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Universidad del Valle
Escuela de Ciencias Básicas
Facultad de Salud
2018

**NEMATODOS ANISAKIDOS EN PECES DE CONSUMO Y PREVALENCIA DE
ANTICUERPOS ANTI – *Anisakis* EN UNA POBLACIÓN DE COLOMBIA**

JENNIFFER ALEJANDRA CASTELLANOS GARZÓN

Tesis presentada como requisito para optar por el título de Doctora en Ciencias
Biomédicas

Directores de tesis

María Carolina Pustovrh Ramos

PhD en Ciencias Biológicas

Yanis Cruz Quintana

PhD en Ciencias Marinas

Asesora

Liliana Salazar

MSc en Ciencias Básicas Médicas

Universidad del Valle
Escuela de Ciencias Básicas
Facultad de Salud
2018

Nota de aceptación

El jurado calificador del trabajo de investigación titulado: “NEMATODOS ANISAKIDOS EN PECES DE CONSUMO Y PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI – *Anisakis* EN UNA POBLACIÓN DE COLOMBIA” considera que está estructurado conforme al rigor académico y normas que para estos fines tiene la Universidad del Valle.

Jurado 1:

Jurado 2:

Jurado 3:

Ciudad y fecha de sustentación _____

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores y asesores, los doctores Carolina Pustovrh, Liliana Salazar y Yanis Cruz por acogerme y guiarme con paciencia y sabiduría durante todo el proyecto.

Al Departamento de Ciencia Tecnología e Innovación de Colombia (COLCIENCIAS), por la beca otorgada para la realizar el doctorado.

En Ecuador, a la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, al proyecto “Biodiversidad y estructura de la comunidad de parásitos metazoarios de peces marinos de importancia económica de Ecuador”, a los investigadores, la Dra. Ana María Santana, el Dr. José Luis Varela, a los Biólogos Víctor Caña y Franklin Solis, a los estudiantes del programa de Biología Pesquera y a los pescadores de los puertos de Manta y Santa Rosa por abrirme las puertas de su país, y por todo el acompañamiento durante la primera fase del proyecto.

A todos los integrantes del grupo de investigación TEBLAMI de la U. del Valle por su apoyo incondicional.

A la empresa E.AT. Asesorías pesqueras del Programa de Observadores Pesqueros de Colombia por el acompañamiento para la adquisición de las muestras en Colombia y a sus integrantes Emiliano Zambrano y Carlos Segura por la identificación de los peces.

Al laboratorio de Histología del Departamento de Morfología de la Universidad del Valle por permitirme realizar la revisión de los peces y la identificación taxonómica para las muestras colectadas en Colombia.

A Yhoiss Muñoz por su ayuda en la revisión de los peces y su apoyo incondicional durante todo el proyecto.

A la agencia de Cooperación Internacional de Chile y la Beca Alianza del Pacífico por financiar la estancia en la Universidad de Chile para llevar los estudios de biología molecular.

A los doctores Rubén Mercado y Sebastián Peña de la Universidad de Chile por su valiosa ayuda para la identificación molecular de los parásitos.

Al Dr. Hiroshi Yamasaki del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Tokyo, Japón por la donación de los controles para biología molecular.

Al Dr. Shozo Ozaki del Virginia Commonwealth University por la asesoría en biología molecular y parasitología.

A la Asociación Iberoamericana de Postgrados (AUIP) por financiar el desplazamiento a la Universidad Complutense de Madrid para realizar los estudios de seroprevalencia.

Al Consejo Profesional de Biología de Colombia (CPBiol) por financiar la toma de muestras para los estudios inmunológicos.

A Marcela Agudelo y Stefania Castellanos por su valiosa ayuda para la toma de muestras y el registro de las encuestas.

A los profesores, funcionarios y estudiantes de la Universidad del Valle que donaron voluntariamente la muestra de sangre para el desarrollo del proyecto.

A la Escuela de Ciencias Básicas de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle por financiar el envío de muestras de Colombia a España, a la Dra. Carolina Pustovrh y la Dra. Liliana Salazar por toda la gestión.

A la Dra. Carmen Cuéllar de la Universidad Complutense de Madrid por su invaluable asesoría, por todo el apoyo y acompañamiento para el desarrollo de las pruebas inmunológicas.

A todo el personal del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia

de la Universidad Complutense de Madrid y en especial al Dr. Juan González por sus enseñanzas.

Al Dr. Álvaro Daschner del Servicio de Alergia del Hospital la Princesa de Madrid por la asesoría en inmunología.

Al Dr. Florencio M. Ubeira de la Universidad Santiago de Compostela por donar el kit Trisakis para el desarrollo del proyecto.

A mis amigos y compañeros del postgrado: Yhoiss, Andrés, Ana María, Diana, Eleonora, Dolly, Lina, Luis y David, por cada sonrisa y hacer este camino mucho más fácil.

A todos los que hicieron de este sueño una realidad.

DEDICATORIA

A mi esposo Mauricio por su apoyo incondicional, a mi hijo Nicolás por darme solo bellos momentos, a mis padres y mi hermanita por creer siempre en mí. Para ellos, con todo mi amor.

A la memoria del Dr. Humberto Carvajal, por toda la confianza que deposito en mí y por sus valiosos consejos para continuar en el postgrado.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ANEXOS	15
RESUMEN	17
1.INTRODUCCIÓN	20
2.JUSTIFICACIÓN	24
3.OBJETIVO GENERAL	28
3.1.OBJETIVOS ESPECIFICOS	28
4.MARCO TEÓRICO	29
4.1.Taxonomía de anisakidos	29
4.2.Identificación de anisakidos	30
4.3.Características morfológicas	31
4.4.Ciclo de vida	35
4.5.Distribución geográfica	38
4.6.Huéspedes	39
4.6.1.Principales especies parasitadas	39
4.6.2.Hospederos de anisakidos registrados en América del Sur	39
4.7.Localización de las larvas	45
4.8.Técnicas de detección de larvas de anisakidos	46
4.8.1.Examen visual	46
4.8.2.Transiluminación	47
4.8.3.Luz ultravioleta	47
4.8.4.Digestión con pepsina	48
4.8.5.Detección electromagnética	48
4.8.6.Tinción	48
4.9.Epidemiología	48

4.10. Anisakidosis humana	50
4.10.1. Anisakidosis gástrica	54
4.10.2. Anisakidosis intestinal	55
4.10.3. Anisakidosis ectópica	55
4.10.4. Anisakiasis alérgica	56
4.10.5. Patogenicidad de <i>Anisakis</i>	56
4.10.6. Casos clínicos de anisakidosis en América del Sur	59
4.11. Antígenos de <i>Anisakis</i>	66
4.11.1. Antígenos somáticos	66
4.11.2. Antígenos de excreción secreción (ES)	66
4.11.3. Antígenos de superficie	67
4.12. Técnicas para la detección de alérgenos de <i>Anisakis</i>	70
4.13. Inmunodetección de anticuerpos	71
4.14. Reactividad cruzada	72
5. CAPITULO 1: Nematodos anisakidos en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador	75
5.1. INTRODUCCIÓN	75
5.2. OBJETIVO GENERAL	77
5.2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS	77
5.3. HIPOTESIS	77
5.4. MATERIALES Y METODOS	78
5.4.1. Área de estudio	78
5.4.2. Muestreos	79
5.4.3. Identificación morfológica de los nematodos	80
5.4.4. Procesamiento histológico	80
5.4.5. Consideraciones éticas	83
5.5. RESULTADOS	84
5.6. DISCUSIÓN	91
5.7. CONCLUSIONES	95

5.8.RECOMENDACIONES.....	95
6.CAPITULO 2: Identificación molecular de las especies de anisakidos aislados de peces de consumo obtenidos en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador	97
6.1.INTRODUCCIÓN	97
6.2.OBJETIVO GENERAL	99
6.3.OBJETIVO ESPECIFICO	99
6.4.MATERIALES Y MÉTODOS	100
6.4.1.Extracción de ADN.....	100
6.4.2.Cebadores.....	100
6.4.3.Identificación por PCR multiplex.....	100
6.5.RESULTADOS.....	102
6.6.DISCUSIÓN	104
6.7.CONCLUSIONES	107
6.8.RECOMENDACIONES.....	107
7.CAPITULO 3: Prevalencia de anticuerpos anti- <i>Anisakis</i> en una población de Colombia y su relación con hábitos de consumo de pescado y marisco	109
7.1.INTRODUCCIÓN	109
7.2.OBJETIVO GENERAL	111
7.3.OBJETIVOS ESPECIFICOS	111
7.4.HIPOTESIS	111
7.5.MATERIALES Y METODOS	112
7.5.1.Diseño del estudio.....	112
7.5.2. Poblacion de estudio	112
7.5.3. Reclutamiento de voluntarios.....	113
7.5.4. Encuesta.....	113
7.5.5. Toma de muestras.....	114
7.5.6. Recolección de datos	115
7.5.7. Almacenamiento de la información.....	115
7.5.8. Consideraciones éticas.....	115

7.5.9. Pruebas de laboratorio.....	117
7.5.10. Análisis estadístico	119
7.6.RESULTADOS.....	120
7.6.1.Hábitos alimentarios y factores de riesgo asociados al consumo de pescado 120	
7.6.2.Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>Anisakis</i>	125
7.6.3.Relación entre los hábitos alimentarios al consumo de pescado y la prevalencia de anticuerpos anti- <i>Anisakis</i>	126
7.6.4.Descripción de los hábitos de consumo de pescado de los 36 voluntarios que presentaron anticuerpos anti- <i>Anisakis</i>	128
7.6.5.Seroprevalencia de anticuerpos anti- <i>Ascaris suum</i> por el método ELISA...133	
7.6.6.Inmuno-reconocimiento por <i>Western Blotting</i> de proteínas del antígeno total de <i>Anisakis</i> con los anticuerpos IgE, IgG e IgG4, en los 36 sueros de voluntarios positivos a <i>Anisakis</i> por el método de ELISA.....	134
7.7.DISCUSIÓN	137
7.8.CONCLUSIONES	142
7.9.RECOMENDACIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	250

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características morfológicas del género <i>Anisakis</i> (Modificado de Shiraki, 1974) (83).....	33
Tabla 2. Lista de especies de peces reportados como hospederos intermediarios de parásitos de la familia Anisakidae en países de América del Sur.	41
Tabla 3. Casos clínicos asociados a nematodos anisákidos en países de América del Sur.....	61
Tabla 4. Batería de deshidratación	81
Tabla 5. Protocolo de coloración de Hematoxilina-Eosina.....	82
Tabla 6. Porcentaje de infección y abundancia media de nematodos anisakidos aislados de peces de consumo de los puertos pesqueros en Colombia y Ecuador.	84
Tabla 7. Localización de las larvas de anisakidos en cada uno de los hospederos parasitados.....	87
Tabla 8. Identificación morfológica de larvas de la Familia Anisakidae y sus hospederos en el Pacífico colombiano y ecuatoriano..	88
Tabla 9. Identificación morfológica y molecular de larvas de la Familia Anisakidae y sus hospederos en el Pacífico colombiano y ecuatoriano.	102
Tabla 10. Flujograma para la determinación de anticuerpos anti- <i>Anisakis</i>	118
Tabla 11. Hábitos alimentarios asociados al consumo de pescado y mariscos en una población de la ciudad de Cali.....	121
Tabla 12. Principales antecedentes clínicos de la población de estudio.....	124
Tabla 13. Resultado del WB frente al antígeno total de <i>Anisakis</i> a nivel de IgE, IgG e IgG4, de los sueros positivos por ELISA frente a los antígenos <i>Ani s 7</i> , <i>Ani s 3</i> y <i>Ani s 13</i> de <i>Anisakis</i>	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de larvas L3 de <i>Anisakis</i>	32
Figura 2. Características morfológicas de larvas L3 de <i>Pseudoterranova decipiens</i>	34
Figura 3. Características morfológicas de larvas L3 de <i>Contracaecum</i> sp.	35
Figura 4. Huéspedes definitivos de <i>Anisakis</i> spp. Mattiucci y Nascetti (2008). ...	37
Figura 5. Ciclo de vida de anisákidos.	37
Figura 6. Mapa de las áreas de distribución de especies de anisakidos presentado por Mattiucci y Nascetti (2008) (66).	38
Figura 7. Distribución de nematodos anisakidos en América del Sur, reportados en peces de consumo humano (Castellanos, JA. 2018).	45
Figura 8. Representación esquemática de la patogenicidad de <i>Anisakis simplex</i> en el tracto alimentario.	58
Figura 9. Localización de los sitios de muestreo en la costa Pacífica de Colombia (Buenaventura y Tumaco) y Ecuador (Manta y Santa Rosa)	78
Figura 10. Muestreos realizados en la costa del Pacífico ecuatoriano en compañía de los estudiantes de Biología Pesquera de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí A. Muestreo en el puerto pesquero de Manta. B. Muestreo de <i>Brotula</i> <i>clarkae</i> (corvina de roca). C. Muestreo de <i>Katsuwonus pelamis</i> (atún, bonito barrilete). D. Muestreo en planta empacadora E. <i>Caranx caballus</i> (caballita).	86
Figura 11. A. Presencia de larvas de nematodos en mesenterio del pez dorado <i>C.</i> <i>hippurus</i> . B. Larvas de nematodos aislados del pez <i>C. hippurus</i>	87
Figura 12. Larva (L3) tipo I de <i>Anisakis</i> sp. A. Extremo anterior, dc: diente cuticular, ld: labio dorsal (40x). B. Parte media, e: esófago, v: ventrículo, i: intestino (20x). C y D. Extremo posterior, m: mucrón, c: cutícula (40x).	89
Figura 13. Larva (L3) tipo II de <i>Anisakis</i> sp. A. Extremo anterior, dc: diente cuticular, ld: labio dorsal (40x). B. Parte media, e: esófago, v: ventrículo (20x). C y D. Extremo posterior, m: mucrón, tc: terminación cónica, pe: poro anal (40x).	89
Figura 14. Secciones de larvas (L3) de nemátodos anisákidos. H.E. A. y B. Cortes transversales – 40X, C. 40X, D. Cortes longitudinales- 10X c. cutícula, h. hipodermis, cm. capa muscular, cn. cordón nervioso.	90
Figura 15. Identificación molecular de nematodos anisákidos por PCR Multiplex. Línea 1; 370 pb, <i>P. decipiens</i> (<i>M. curema</i>). Línea 2: 672 pb, <i>A. pegreffii</i> (<i>M. gayi</i>) y Líneas de la 3 a la 9: 143 pb, <i>A. physeteris</i> (<i>A. rochei</i> , <i>C. armatus</i> , <i>C. hippurus</i> , <i>K.</i>	

<i>pelamis</i> , <i>L. argenteus</i> , <i>M. gayi</i> , <i>M. cephalus</i> y <i>M. curema</i>). Línea L, marcador de peso molecular de 100 pb.	103
Figura 16. Porcentaje de sueros positivos en relación a anticuerpo y antígeno analizado de <i>Anisakis</i> . Extracto total de <i>Anisakis</i> (Ag total); <i>Ani s 3</i> (tropomiosina); <i>Ani s 13</i> (hemoglobina); Test Trisakis: <i>Ani s 1</i> y <i>Ani s 7</i>	126
Figura 17. Análisis descriptivo de los 36 sueros que presentaron anticuerpos anti- <i>Anisakis</i> . El porcentaje de positividad respecto a las preguntas realizadas en la encuesta se indica con el número de la figura correspondiente.....	129
Figura 18. Porcentajes de positividad de los consumidores de pescado, del grupo de los 36 sueros que presentaron anticuerpos anti- <i>Anisakis</i>	130
Figura 19. Porcentajes de positividad en el grupo de los 36 voluntarios positivos a <i>Anisakis</i> según la preparación culinaria preferida para el consumo de pescado.	130
Figura 20. Porcentaje de positividad según el establecimiento para la compra de pescado en el grupo de los 36 individuos positivos a <i>Anisakis</i>	131
Figura 21. Porcentaje de positividad según la forma de almacenar el pescado en el grupo de los 36 individuos positivos a <i>Anisakis</i>	131
Figura 22. Porcentaje de positividad según los antecedentes asociados a consumo de pescado en el grupo de los 36 individuos positivos a <i>Anisakis</i>	132
Figura 23. Porcentajes de positividad según las alergias alimentarias, en el grupo de los 36 individuos positivos a <i>Anisakis</i>	132
Figura 24. Porcentajes de positividad según alergia respiratoria o a ácaros, en el grupo de los 36 individuos positivos a <i>Anisakis</i>	133
Figura 25. Porcentaje de positividad de los 150 sueros en relación a cada anticuerpo frente a los extractos totales de <i>Anisakis</i> (Ak) y <i>A. suum</i> (As).....	134

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado donación de muestras por la empresa E.AT. Asesorías pesqueras.....	144
Anexo 2. Permiso de colecta Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí	145
Anexo 3. POE para la caracterización histológica de parásitos Anisákidos	148
Anexo 4. Aval del Comité de Ética Animal de la Universidad del Valle	174
Anexo 5. Folleto informativo	176
Anexo 6. Permiso para uso de la encuesta diseñada para el estudio de Puentes et al., (2008)	177
Anexo 7. Encuesta para donantes voluntarios del proyecto: Prevalencia de anticuerpos anti- Anisakis en una población de Colombia	178
Anexo 8. Consentimiento informado.....	181
Anexo 9. Aval del Comité de Ética Humana de la Universidad el Valle.....	184
Anexo 10. Autorización de la Universidad del Valle para la toma de las muestras	186
Anexo 11. Autorización del Ministerio de Salud para salida de muestras biológicas de Colombia	187
Anexo 12. Autorización del Ministerio de Sanidad de España para el ingreso de muestras biológicas procedentes de Colombia.....	188
Anexo 13. Flujograma para la toma de muestras	189
Anexo 14. Procedimiento Operativo Estándar para la toma, transporte, almacenamiento y descarte de muestras de sangre	190
Anexo 15. Formato de relación para la toma de muestras	195
Anexo 16. Obtención de Antígenos de <i>Anisakis</i>	196
Anexo 17. Método ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos anti- <i>Anisakis</i> frente antígeno total larvario	200
Anexo 18. Determinación de anticuerpos anti- <i>Ascaris suum</i> frente al antígeno total	205
Anexo 19. Western Blotting para la determinación de las proteínas específicas que son reconocidas por sueros con anticuerpos anti - <i>Anisakis</i>	207
Anexo 20. Valores de D.O. de cada inmunoglobulina frente al antígeno total larvario de <i>Anisakis</i> para cada suero analizado.	208
Anexo 21. Valores de D.O. de IgE frente al antígeno <i>Ani s 3</i> de <i>Anisakis</i> para cada suero analizado	213
Anexo 22. Valores de D.O de IgE e IgG4 frente al antígeno <i>Ani s 13</i> de <i>Anisakis</i> para cada suero analizado	214

Anexo 23. Valores de D.O. de IgE frente a los antígenos <i>Ani s 1</i> y <i>Ani s 7</i> de <i>Anisakis</i> para cada suero analizado (test Trisakis).....	216
Anexo 24. Inmunorreconocimiento por Western Blotting de proteínas del antígeno total de <i>Anisakis</i> y el antígeno total de <i>Ascaris</i> con los anticuerpos IgE, IgG e IgG4, en los 36 sueros de voluntarios positivos a <i>Anisakis</i> por el metodo de Elisa	218
Anexo 25. Analisis descriptivo de la encuesta	236
Anexo 26. Becas y financiación	246
Anexo 27. Premios y Reconocimientos	247
Anexo 28. Divulgación de resultados	248
Anexo 29. Publicaciones científicas	249

RESUMEN

Introducción

Los anisakidos son nematodos parásitos de organismos acuáticos. Sus hospederos definitivos son mamíferos marinos, pero afectan ocasionalmente al hombre cuando consume pescado parasitado crudo o mal cocido, ocasionando la anisakidosis. Esta parasitosis es una enfermedad emergente, con un gran número de casos clínicos en todo el mundo, principalmente en Japón y España, produce cuadros clínicos con urticaria, angioedema, alergia gastrointestinal, y/o anafilaxia, obligando a las autoridades a implementar medidas de vigilancia y control.

En América del Sur, a pesar de contar con abundantes recursos pesqueros, la anisakidosis es poco conocida por el personal de salud y esto ocasiona un sub registro de la enfermedad. Hasta la fecha se han reportado casos de anisakidosis en Perú y Chile. Mientras que, en Argentina, Brasil, Colombia, Ecuador y Venezuela, si bien se presentan registros de peces o mamíferos marinos infestados con larvas de anisakidos, no se han reportado casos de anisakidosis en seres humanos.

Objetivo

Determinar la presencia de nematodos anisakidos en peces de consumo y la prevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis* en una población de Colombia.

Para alcanzar este objetivo general se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la presencia de nematodos anisakidos en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador.
- Identificar las especies de anisakidos presentes en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador.

- Determinar la prevalencia de anticuerpos anti – *Anisakis* en una población sana de Colombia y su asociación con los hábitos de consumo de pescado y mariscos.

Métodos

Se realizaron muestreos de peces en dos puertos pesqueros del Pacífico colombiano: Buenaventura y Tumaco; y en dos puertos pesqueros del Pacífico ecuatoriano: Manta y Santa Rosa.

Se revisó el tracto digestivo de los peces para identificar, separar y contar los nematodos anisakidos. La identificación morfológica se realizó por taxonomía clásica complementada con estudio microscópico mediante técnica histoquímica de Hematoxilina-Eosina. Se calculó el porcentaje de infección y la abundancia media. La confirmación de las especies de anisakidos se realizó por biología molecular utilizando la técnica de la PCR multiplex. Los factores de riesgo asociado al consumo de pescados y mariscos fueron evaluados por medio de una encuesta a 150 voluntarios sanos; a los cuales se les tomó muestra de sangre para determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti- *Anisakis* por medio de las técnicas de ELISA y Western Blot.

Resultados

Se colectaron y analizaron un total de 438 peces de consumo agrupados en veinte especies, de las cuales ocho se encontraron parasitados por nematodos anisakidos, con un porcentaje de infección entre 18 y el 100%, y una abundancia media entre 0.4 y 45.5 nematodos por hospedero. La identificación por PCR múltiplex permitió confirmar las especies *Anisakis physeteris*, *A. pegreffii* y *Pseudoterranova decipiens*. Se encontró que la población de estudio consumía pescado tres veces al mes. De los 150 sueros analizados, el 9.3% presentó anticuerpos IgG4 frente a *Anisakis* y un 4.7% presentó anticuerpos IgE frente a este mismo antígeno, siendo los

mas prevalentes. Frente al antígeno total de *Anisakis* se encontro un 4.7% de sueros positivos para IgG4, un 4% para IgA, el 3.3% para Ig`s y un 0.7% para IgE. Para el antígeno recombinante *Ani s 3* (tropomiosina) la positividad fue de 2.7% y para el antígeno *Ani s 7* del 1.3%.

Conclusiones

La presencia de nematodos anisakidos en peces de consumo, y la evidencia de personas sanas con anticuerpos frente a antígenos de *Anisakis simplex* demuestra que hay un sub registro de la enfermedad, o una posible enfermedad emergente, que, aunque de fácil manejo, merece ser atendida. Por lo anterior, esta investigación sienta las bases para futuros estudios sobre anisakidos y anisakidosis en Colombia.

1. INTRODUCCIÓN

El pescado en general y los productos de la pesca, constituyen una importante fuente proteica de origen animal, siendo de alta digestibilidad, ricos en minerales (principalmente Fe, I y P) y vitaminas (A, D, B1, B2) (1). La región Pacífica de Colombia y Ecuador se caracteriza por tener puertos pesqueros importantes que han permitido el desarrollo de actividad pesquera industrial y artesanal (2,3). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (4), el consumo de pescado en Colombia y Ecuador tiene un promedio per cápita de 4,73 kg y 5,6 kg al año, respectivamente, que comparado con países como España (38 kg/ año), Japón (54 kg/año), y con el promedio de consumo en América Latina (18 kg/año), es bajo. Sin embargo, en los últimos años con la introducción de la dieta mediterránea y las investigaciones que indican los beneficios asociados al consumo de pescado para la prevención de enfermedades cardiovasculares, el consumo de pescado ha ido en aumento (5–8). No obstante, la ingesta de estos productos se ha visto relacionada con diferentes afecciones en el hombre, cuando este consume pescado mínimamente procesado (crudo, semi crudo, en sushi, salazón, marinado) (6). En América Latina, la mayoría de los casos relacionados con estas preparaciones están asociados a la presencia de parásitos en los peces, siendo un fenómeno generalizado y particularmente difícil de eliminar en los productos pesqueros no cultivados (1).

Los nematodos de la familia Anisakidae son los de mayor importancia en salud pública, estos parásitos ocasionan la anisakidosis, una zoonosis causada principalmente por los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova* (9). En el humano la larva puede ocasionar cuadros gástricos, alérgicos o gastroalérgicos, siendo las reacciones alérgicas (hipersensibilidad tipo I) las más comunes, ocasionadas principalmente por el género *Anisakis* (10–12), y las afecciones gástricas asociadas al género *Pseudoterranova*, ocasionando la pseudoterranovosis (13).

La anisakidosis humana se ha reportado en más de veintiséis países en los cinco continentes, incluyendo, Holanda, Italia, Egipto, Nueva Zelanda, Canadá, Estados Unidos, Brasil, Perú, y Chile (14–21). La mayoría de los casos notificados se han producido en España, Japón y otros países asiáticos, donde los estudios epidemiológicos han indicado que la anisakiasis (enfermedad causada por el género *Anisakis*) es la de mayor riesgo y la más frecuente en poblaciones costeras (21,22). Mientras en países como Brasil, Chile y Perú la anisakidosis es considerada una enfermedad emergente (23), en Ecuador y Colombia no se conoce de ningún caso clínico asociado a estos parásitos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la FAO, han establecido reglamentos, recomendaciones y guías para prevenir y minimizar el efecto negativo de los anisakidosis en la salud humana (24). En Europa, existen normas sanitarias específicas para los alimentos de origen animal aplicables a los productos de la pesca en cuanto a la infección por parásitos anisakidos (25) y en Latinoamérica, países como Nicaragua, México y Ecuador (26–29) siguen algunas de estas medidas para la prevención y el control de parasitosis de peces que afectan la salud humana. Sin embargo, Colombia no cuenta con una legislación clara al respecto, ya que estos patógenos no están plenamente identificados (30).

Con la llegada de la globalización se ha introducido el consumo de pescado crudo o poco cocido en la dieta de varios países latinos. Actualmente se ha descrito la presencia de peces parasitados con anisakidos en países como Chile, Perú, Argentina, Brasil y Venezuela (9,31–33). Sin embargo, en Colombia solo se ha reportado la presencia del género *Contracaecum* en peces del Mar Caribe y en peces de aguas continentales (34), mientras que en Ecuador no se conoce ninguna investigación al respecto.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de nematodos anisakidos en peces de consumo y la prevalencia de anticuerpos anti-

Anisakis en una población de Colombia. Para ello el proyecto se desarrolló en tres fases, que se presentan en tres capítulos a lo largo de este documento.

En la primera fase (capítulo 1) se identificó por taxonomía clásica y técnica histoquímica, las larvas de estadio infectivo (L3) de anisakidos presentes en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Ecuador y Colombia. Al finalizar esta primera fase, se confirmó la presencia de nematodos de los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova* con un porcentaje de infección de hasta el 100% en algunas especies de peces, por ende surgió la necesidad de identificar los anisakidos a nivel de especie, con el fin de conocer si las especies de anisakidos que circulan en aguas del Pacífico de Ecuador y Colombia están entre las consideradas patógenas, y pudieran ser un riesgo para la salud pública, como una posible enfermedad emergente. Es importante aclarar que por taxonomía clásica no es posible hacer una identificación a nivel de especie en un estadio larval, la morfología solo permite identificar las especies en el estadio adulto, que en el caso de los anisakidos, solo están presentes en los hospederos definitivos (mamíferos marinos), por lo tanto, se desarrolló una segunda fase (capítulo 2) con el fin de identificar los anisakidos a nivel de especie mediante técnicas de biología molecular, esta fase del proyecto se desarrolló en colaboración con investigadores de la Universidad de Chile, quienes previamente han identificado por biología molecular *P. decipiens* aislados de casos clínicos del mismo país. Para ello se aplicó una PCR multiplex que permitió identificar tres especies de anisakidos en muestras de Colombia y Ecuador, con potencial patogénico, lo que generó nuevas inquietudes en la investigación, esta vez dirigidas hacia la población humana, debido a que en Ecuador y Colombia no se conocen casos de anisakidosis, se diseñó una tercera fase de la investigación (capítulo 3) con el objetivo de conocer si individuos con hábitos de consumo de pescado de mar tenían anticuerpos anti *Anisakis*, es decir, habían estado en contacto con el parásito, y de este modo determinar la seroprevalencia y así sentar las bases epidemiológicas para la investigación de anisakidos en América del Sur. La determinación de anticuerpos se realizó

únicamente para el género *Anisakis*, considerado el de mayor importancia para la salud humana y del cual la ciencia ya conoce los principales antígenos, esta última fase del proyecto se realizó en colaboración con investigadores de la Universidad Complutense de Madrid, la Universidad Santiago de Compostela y el Hospital Universitario la Princesa de Madrid, todos líderes a nivel mundial en conocimiento sobre la respuesta inmune de humanos frente a *Anisakis*.

2. JUSTIFICACIÓN

La anisakidosis es una enfermedad parasitaria en el hombre ocasionada por nematodos de la familia Anisakidae; se produce por la ingestión de pescado crudo o poco cocido parasitado por larvas de estos nematodos (35).

El primer caso de parasitación humana fue notificado por Leucckart en 1876, pero no fue hasta 1955 cuando Van Thiel y col. describieron la enfermedad e identificaron al parásito causal como larva de tercer estadio de *Anisakis*. Fue a partir de ese año y hasta 1967 cuando se diagnosticaron en Holanda 160 casos de anisakidosis (36).

En 1965 se organizó en Japón un grupo de investigación para el estudio intensivo de la enfermedad, y en ese mismo año, se publicó el primer caso de anisakidosis en dicho país (21). Desde entonces se han descrito anualmente muchos casos, reconociéndose la anisakidosis como un problema de salud pública en Japón (37). Es interesante señalar que muchos de estos casos habían sido diagnosticados anteriormente como cáncer gástrico, úlcera gástrica o duodenal, y otras enfermedades gastrointestinales. En Japón se habían notificado hasta 1990, 11.629 casos de anisakidosis gástrica, 567 de anisakidosis intestinal, y 45 de anisakidosis extragastrointestinal (38). En Estados Unidos se describió en 1972 el primer caso de anisakidosis humana debido a una larva de *Phocanema*, pero fue un año después cuando se citó el primer caso debido a una larva de *Anisakis* (39). A partir de entonces, existe notificación de varios casos de anisakidosis humana (31,40–46).

La Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA), decidió estudiar el riesgo potencial para la salud que pueden representar los anisakidos en el pescado y derivados marinos. Hoy en día es una enfermedad de distribución cosmopolita, habiéndose descrito los primeros casos en los años 70 cuando la

enfermedad se dio a conocer. Con el paso de los años los reportes alrededor del mundo han ido en aumento, con presencia en más de veintiséis países en los cinco continentes, incluyendo, Holanda, Italia, Egipto, Nueva Zelanda, Canadá, Estados Unidos, Brasil, Perú, y Chile (14–21). Desde entonces, los reportes de casos de anisakidosis se han incrementado en todo el mundo, especialmente en España y Japón (37), países que han registrado casos clínicos de urticaria, angioedema o anafilaxia que posteriormente fueron relacionados con la hipersensibilidad producida por las proteínas del parásito y que obligaron a tomar medidas de prevención y control que actualmente hacen parte de la legislación de estos países (23).

En América del Sur, son pocos los casos de anisakidosis reportados hasta ahora. En Perú se reportaron ocho casos entre 1993 y 2002, y se tienen registros de *A. simplex*, *A. physeteris* y *Pseudoterranova* sp. parasitando las especies de peces *Scomber japonicus*, *Trachurus murphyi*, *Coryphaena hippurus* y *Sarda chiliensis* (7,17,47), especies que también son comercializadas en Colombia. En Chile, se han descrito mas de treinta casos de anisakidosis asociados principalmente a larvas de *Pseudoterranova* (48) (9). No obstante, en otros países donde no se han reportado casos clínicos, se tienen registros de peces o mamíferos marinos infestados con larvas de estos nematodos, por ejemplo, Venezuela (1), Colombia (34), Argentina (49), Ecuador (50), Brasil (51) y fuera de América del Sur en países como México (52) y Egipto (53).

Estos registros son la evidencia de que estos parásitos se distribuyen alrededor del mundo y que, en países como Colombia y Ecuador, la anisakidosis es una enfermedad subestimada. Sin embargo, la falta de servicios de salud con personal capacitado para diagnosticar la enfermedad, la comercialización y el consumo de especies que han sido reportadas como hospederos de anisakidos, la difusión de la dieta mediterránea y asiática, entre otras, constituyen un riesgo para la salud pública en estos países.

Cabe resaltar que los pocos estudios realizados en Colombia y Ecuador donde se han reportado larvas de anisakidos (34,54–57), la determinación taxonómica solo ha llegado hasta nivel genérico. Esto se debe probablemente a que la identificación a nivel de especie requiere de técnicas especializadas de biología molecular de altos costos y que probablemente no están estandarizadas en estos países, y, por ende, existe un desconocimiento de las especies de anisakidos presentes. A lo que se suman otros aspectos como el desconocimiento de la dinámica de infección de las larvas a los peces para establecer si la anisakidosis puede ser una enfermedad emergente.

En Colombia solo se conocen los estudios realizados por Olivero y Baldiris (2011)(58,55) en peces marinos, donde reportaron la presencia de nematodos de la familia Anisakidae en peces comercializados en la bahía de Cartagena, no obstante, se conocen reportes de anisakidos del género *Contracaecum* en peces de aguas continentales (59,60,54), sin embargo, la identificación taxonómica en estos estudios ha sido a nivel genérico, por lo que es importante determinar las especies de anisakidos presentes en peces de consumo en Colombia y las implicaciones en salud pública. Además, no existen reportes de casos clínicos de anisakidosis en nuestro país, debido probablemente a diagnósticos erróneos, desconocimiento por parte del personal de salud y falta de especialistas en el área.

A pesar de la ausencia de reportes de anisakidosis en Colombia, existen algunas condiciones que podrían favorecer la aparición de esta parasitosis en la población, como las expuestas por Sakanari y McKerrow (1989): La distribución cosmopolita de los anisakidos, la migración de las ballenas (hospederos definitivos) cada año al Pacífico colombiano, la globalización que ha aumentado el interés por el consumo de platos exóticos como el sushi, el uso de sistemas rápidos de cocción como el microondas que no permite la adecuada cocción de los alimentos favoreciendo la supervivencia de las larvas, la difusión de la dieta mediterránea, rica en pescado, para la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Además, en Ecuador y Colombia se comercializan y consumen especies de peces como *Scomber japonicus*, *Trachurus murphyi*, *Coryphaena hippurus*, *Sarda chiliensis*, entre otros, que han sido reportados como hospederos del estadio infectivo de anisakidos (larva L3) en países con costa en el Océano Pacífico como Perú (7) y Chile (61). Por otro lado, para el Océano Atlántico se han reportado hospederos para anisakidos en Venezuela (1), Argentina (49) y Brasil (51,62–64). Sin embargo, en estos estudios solo se hace el reporte de los hospederos y de los anisakidos a nivel de género, sin realizar una evaluación del riesgo que pueden tener para la salud pública.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de nematodos anisakidos en peces de consumo y la prevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis* en una población de Colombia.

3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 3.1.1.** Determinar la presencia de nematodos anisakidos en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador.
- 3.1.2.** Identificar las especies de anisakidos presentes en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador.
- 3.1.3.** Determinar la prevalencia de anticuerpos anti – *Anisakis* en una población sana de Colombia y su asociación con los hábitos de consumo de pescado y mariscos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Taxonomía de anisakidos

Los nematodos “ascarioideos” de la familia Anisakidae (Nematoda) son parásitos de mamíferos marinos que utilizan una gran diversidad de peces como hospederos intermediarios (65). Ocasionalmente parasitan al hombre cuando este ingiere pescado crudo o mal cocido infectado con larvas de tercer estadio (L3) (65). La familia Anisakidae comprende al menos 24 géneros, siendo los más conocidos *Pseudoterranova*, *Contracaecum* y *Anisakis* (66).

En la actualidad hay descritas al menos nueve especies de *Anisakis* (66–69), sin embargo, *A. simplex* es el principal responsable de los episodios de parasitosis y alergias, considerándose como un problema emergente de salud pública en los últimos años (70). Se estima que *Pseudoterranova* (anteriormente *Phocanema*) 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 (71).

Los Anisákidos han sido ampliamente estudiados con respecto a su taxonomía y ciclos de vida. Sin embargo, la clasificación taxonómica del género *Anisakis* es compleja y ha suscitado controversia (66). La clasificación según Smith y Wootten (1978) (22,66) es la siguiente:

Phylum Nemathelminthes

Clase Nematoda

Sub clase Secernentea

Orden Ascaridida

Sub orden Ascaridina

Super familia Ascaridoidea

Familia Anisakidae

Subfamilia Anisakinae

Géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum*

4.2. Identificación de anisakidos

El género *Anisakis* está dividido en dos clados, el Clado I que agrupa las especies: *A. typica*, *A. simplex* s.s, *A. pegreffii*, *A. simplex* C, *A. ziphidarum* y *A. nascetti*, y el Clado II que agrupa a las especies: *A. physeteris*, *A. brevispiculata* y *A. paggine* (72).

La necesidad de identificar las distintas especies de *Anisakis*, es de especial importancia ya que se han visto implicadas como agente causal de la anisakidosis humana. En la actualidad, las distintas especies del género *Anisakis* están incluidas en dos grupos (Tipo I y II) en función de su morfología, los aspectos ecológicos y la distribución geográfica de los hospederos (67) y se han identificado genéticamente nueve especies de nematodos pertenecientes al género *Anisakis*. Estas nuevas especies han sido establecidas mediante análisis de marcadores genéticos (73).

El análisis mediante electroforesis de enzimas multilocus ha permitido redefinir el complejo de *A. simplex*, denominado *sensu lato* (74), demostrando la existencia de tres especies gemelas denominadas *A. pegreffii*, *A. simplex sensu stricto* (s.s.) y *A. simplex* C, que difieren en su estructura genética, así como en las preferencias ecológicas, hospedadores y distribución geográfica (66,75). Si bien es cierto estas especies comparten la misma morfología, son enzimáticamente diferentes e inclusive se han comprobado diferencias importantes en las lesiones que ocasionan.

Los aportes realizados usando la técnica de electroforesis de isoenzimas (66,76) han sido esenciales y han constituido la base de los estudios realizados posteriormente con otros marcadores genéticos tales como el generado con la

técnica de PCR-RFLP del ITS1-5,8-ITS2 (73). Sin embargo, no está exenta de limitaciones debido a su complejidad en la interpretación de los patrones de bandas y la necesidad de gran cantidad de material biológico (72).

La aplicación de la técnica PCR-RFLP del ITS1-5, 8-ITS2 ha permitido comprobar la existencia de genotipos híbridos entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* y se ha puesto de manifiesto en larvas L3 procedentes de peces capturados en las costas españolas del Mediterráneo y Atlántico (77), en aguas japonesas (74) y más recientemente en las costas mediterráneas del norte de África (78)

4.3. Características morfológicas

Los anisakidos tienen un cuerpo vermiforme, no segmentado, y su extremo posterior termina en forma cónica o puntiaguda. Las larvas son de color blanquecino o algo pardas cuando se encuentran enquistadas en el musculo de sus hospederos, tiene una longitud aproximada entre 15 y 30 mm y un diámetro de 0,1 – 0,6 mm (79). Poseen una cutícula de 1,50 μm de grosor (34), en algunas especies esta cutícula presenta estriaciones finas transversales un poco más marcadas hacia la parte posterior del cuerpo (80).

El sistema digestivo es completo, conformado por boca, esófago, intestino y ano. La cavidad bucal es triangular y dispone de varios labios, se caracteriza por tener en su extremo anterior un diente cuticular que utiliza para penetrar el tejido de sus hospederos y en la base de los labios se encuentra el poro excretor. El esófago mide de 2,5 a 3,0 mm, con una porción anterior muscular, el proventrículo y una posterior glandular, el ventrículo (81). Poseen un intestino que ocupa la mayor parte de la longitud de la larva, carece de apéndices esofágicos, su extremo posterior es redondeado y termina en un mucrón o espina. Tiene un anillo nervioso en el tercio anterior de su cuerpo. El sistema excretor está conformado por una glándula y un

conducto que terminan en un poro excretor ubicado en la base de los labios o a nivel del anillo nervioso (78).

El género *Anisakis* se caracteriza morfológicamente por presentar un ventrículo largo con la unión ventrículo-intestinal oblicua y una cola redondeada, corta y con una espina terminal (Figura 1) (34).

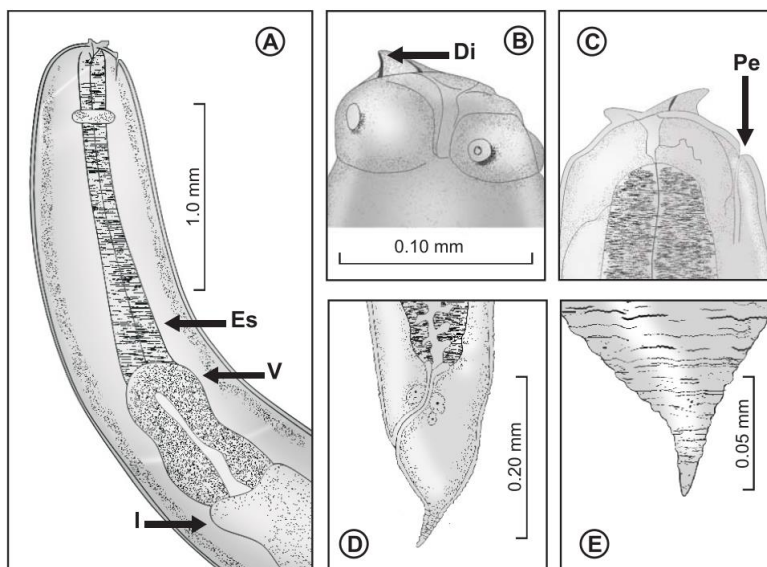


Figura 1. Características morfológicas de larvas L3 de *Anisakis*. (Hurst, 1999; Berland, 1989; Hurst, 1984). A) Parte anterior (lateral). (Es, esófago; V, ventrículo; I, intestino). B) Vista lateral del extremo anterior. (Di, diente cuticular). C) Corte sagital del extremo anterior. (Pe, poro excretor). D) Parte posterior (lateral). E) Extremo de la cola. Fuente (34).

El reconocimiento morfológico de las distintas larvas L3 genera mucha dificultad, y si bien es cierto que es posible distinguir las larvas del genero *Anisakis*, identificar las especies mediante esta metodología es imposible, por lo que algunos autores las han clasificado como larvas de *Anisakis* tipo I, II, III y IV, (Tabla 1) (82)

No obstante, en la actualidad, el reconocimiento morfológico de las distintas larvas L3 genera gran dificultad, aunque es posible determinar *Anisakis* tipo I y II, no ocurre lo mismo cuando se trata de hacer una diferenciación precisa de las especies incluidas en cada morfotipo (83).

Tabla 1. Características morfológicas del género *Anisakis* (Modificado de Shiraki, 1974) (83)

Característica	Larva Tipo I	Larva Tipo II
Ventrículo	Largo	Corto
Unión ventrículo-intestino	Oblicua	Horizontal
Porción terminal	Redondeada	Larga y cónica
Mucrón	Si	No
Diente	Corto	Más largo
Estriaciones en cutícula	Si	No

La identificación de las larvas del género *Pseudoterranova* es sencilla gracias a su gran tamaño, color rojizo y a la presencia del ciego intestinal. Este último aparece bien desarrollado, extendiéndose hacia el extremo anterior, sobrepasando el margen anterior del ventrículo y es reconocido por la ausencia de apéndice esofágico. Presenta una cola post-anal corta y cónica con una espina terminal fina. La cutícula, a lo largo de todo el cuerpo, está finamente estriada por lo que muestra una apariencia lisa. El extremo anterior tiene un diente pequeño y triangular dirigido hacia afuera. El poro excretor aparece situado justo en posición ventral al diente (Figura 2) (Berland, 1989) (34).

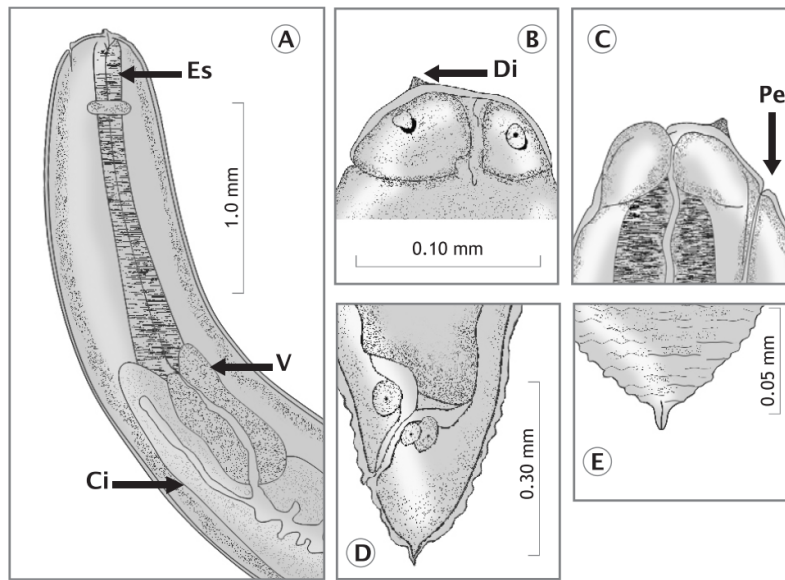


Figura 2. Características morfológicas de larvas L3 de *Pseudoterranova decipiens* (Hurst, 1999; Berland, 1989). A) Parte anterior (lateral) (Es, esófago; V, ventrículo; Ci, ciego intestinal). B) Vista lateral del extremo anterior (Di, diente cuticular). C) Corte sagital del extremo anterior (Pe, poro excretor). D) Parte posterior (lateral). E) Extremo de la cola. Fuente (34).

En el género *Contracaecum* sp., la larva L3 por lo general mide entre 4 y 16 mm. En el extremo anterior son observados tres labios, un diente cuticular cónico y ligeramente romo. El poro excretor abre inmediatamente posterior al diente. En el tubo digestivo pueden destacarse: el ventrículo pequeño y esférico, el apéndice ventricular posterior, el intestino que expone un ciego anterior más pequeño que el apéndice ventricular, dependiendo esta morfología de la especie. El extremo posterior es cónico, la cola post-anal larga y no presenta espina terminal. La cutícula de esta larva es gruesa con las estriaciones transversales muy marcadas (Figura 3) (Berland, 1989) (34).

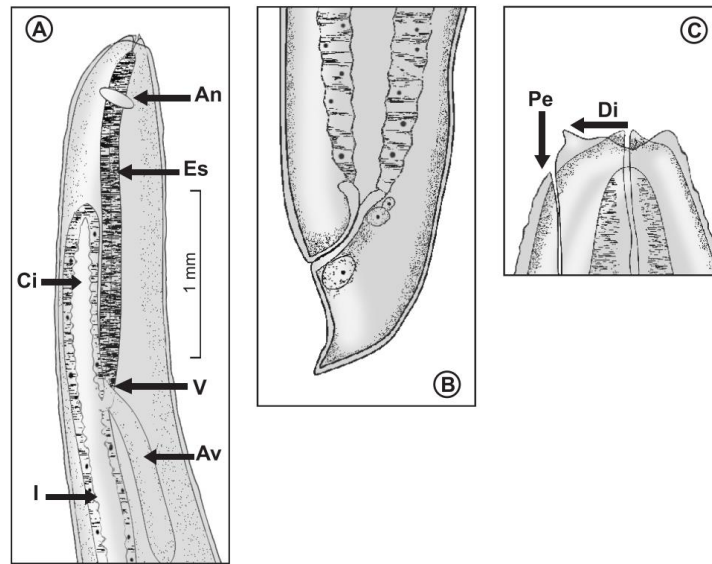


Figura 3. Características morfológicas de larvas L3 de *Contracaecum* sp. (Hurst, 1999; Moravec, 1997; Berland, 1989). A) Parte anterior (lateral) (An, anillo nervioso; Es, esófago; Ci, ciego intestinal; V, ventrículo; Av, apéndice ventricular; I, intestino). B) Vista lateral del extremo anterior. C) Corte lateral del extremo anterior. (Di, Diente cuticular; Pe, poro excretor) Fuente (34).

4.4. Ciclo de vida

Los anisakidos tienen un ciclo de vida muy complejo y en algunos casos no está bien definido; sin embargo, se conoce que tienen un estadio de huevo, cuatro estadios larvales y el estadio adulto (39). Estos parásitos tienen como hospederos definitivos a mamíferos acuáticos bien identificados; en el caso de *A. simplex*, los adultos se encuentran en el tracto gastrointestinal de los cetáceos (ballenas, delfines, marsopas); los adultos de *Pseudoterranova* spp. se encuentran en pinnípedos (leones marinos, morsas, focas). Por su parte, *Contracaecum* puede llegar a estadio adulto en pinnípedo o en las aves que se alimentan de peces como pelicanos y garzas. Sin embargo, el rango definitivo de hospedadores de algunas especies de anisákidos es desconocido (84). En la figura 4 se muestran los huéspedes definitivos presentados por Mattiucci y Nascetti (2008) (66) y en figura 5

el ciclo biológico de los anisakidos esquematizado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC.

El ciclo de vida inicia cuando las hembras adultas depositan sus huevos en el estómago de sus hospederos definitivos. Los huevos son liberados al mar con las heces, donde después de un periodo de incubación la larva sufre dos mudas (L1 y L2) y eclosiona del huevo como L2 (79). Las larvas L2 permanecen libres hasta que son ingeridas por pequeños crustáceos marinos del plancton (Euphasidae), que actúan como hospedadores intermediarios y en ellos la larva L3 se libera de la cutícula de la larva L2. Estos crustáceos infectados pueden ser devorados por un pez o cefalópodo (calamar, pulpo) y el nematodo se aloja en la pared del intestino de este segundo hospedador. La larva L3 es conocida como el estadio de larva infectiva, la cual es capaz de parasitar distintas especies de peces, anfípodos y decápodos entre otros, penetran la pared del tracto digestivo y pueden alcanzar la cavidad corporal. Finalmente, cuando los mamíferos marinos se alimentan de estos peces o los cefalópodos parasitados, se produce el cambio de muda a estadio larvario L4 y nematodo adulto (65).

El ser humano puede actuar como hospedero accidental cuando consume pescados o cefalópodos, crudos o poco cocidos, parasitados con larvas L3. La ingestión de estas larvas (que no completan su ciclo de vida) produce en los humanos una enfermedad zoonótica conocida como anisakidosis (65,70).

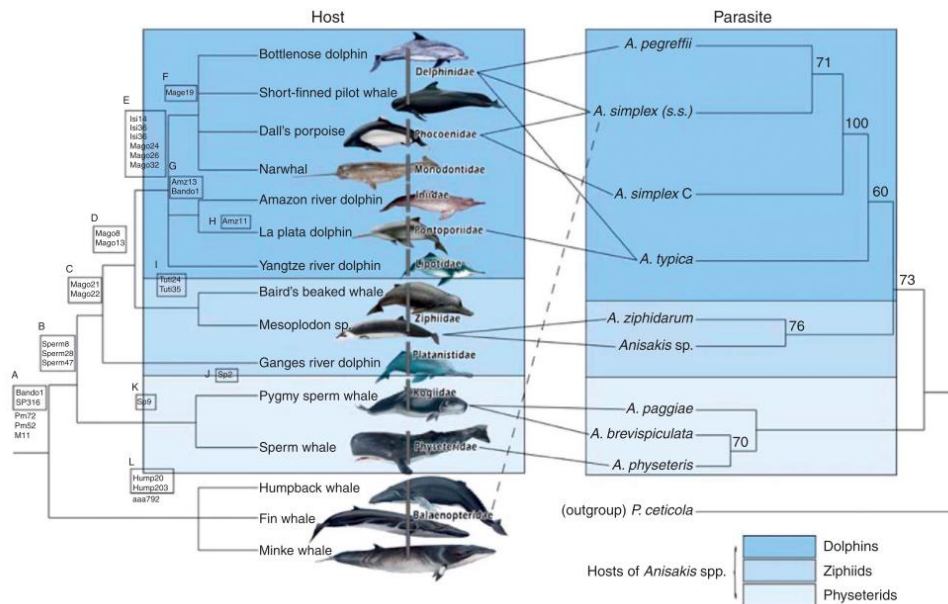


Figura 4. Huéspedes definitivos de *Anisakis* spp. Mattiucci y Nascetti (2008) (66).

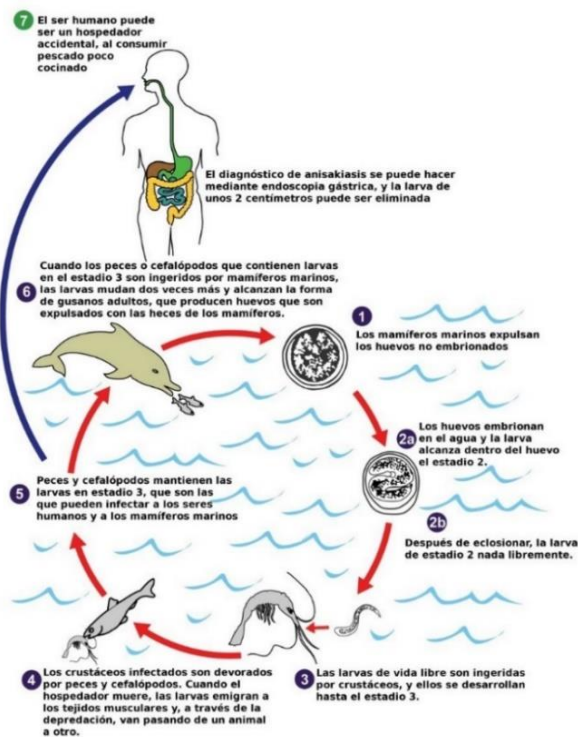


Figura 5. Ciclo de vida de anisakidos, Fuente: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades –CDC, Estados Unidos.

4.5. Distribución geográfica

Las especies de la familia Anisakidae, tienen distribución cosmopolita con diferencias en su distribución geográfica y los hospederos definitivos según el grupo al cual pertenezcan (Figura 6) (66,85).

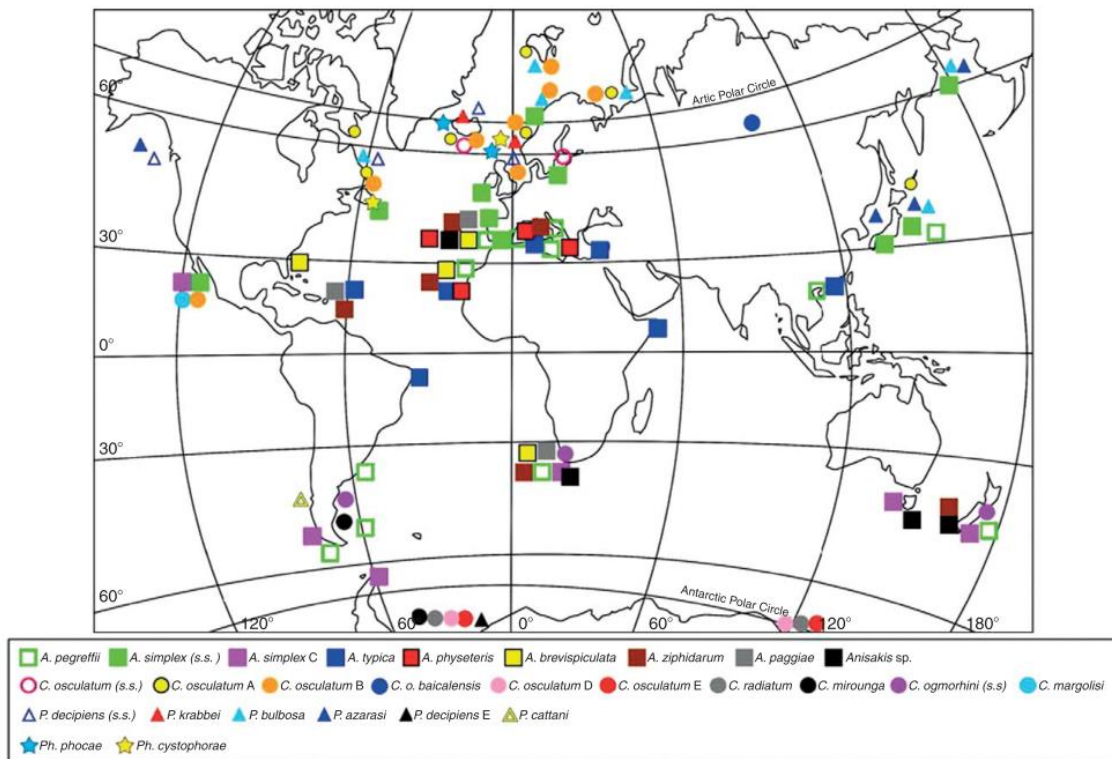


Figura 6. Mapa de las áreas de distribución de especies de anisakidos presentado por Mattiucci y Nascetti (2008) (66).

Las especies del género *Anisakis* agrupadas en el complejo *A. simplex* (*A. pegreffii*, *A. simplex* s.s. y *A. simplex* C) se han encontrado parasitando como hospederos intermediarios a peces pelágicos, mesopelagicos y demersales. Las especies del complejo *A. physeteris* se encuentran en calamares de aguas profundas como hospederos intermediarios (66). Por su parte, *A. pegreffii* se encuentra principalmente 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 se encuentra en las costas del Pacífico y en el hemisferio sur (85,86). Aunque en general se trata de especies alopátricas, *A. simplex* s.s. y *A. simplex* C se encuentran en simpatría en la costa del Pacífico de Canadá, mientras que *A. simplex* C y *A. pegreffii* lo están en el Océano Atlántico Sur (87). Las costas de la península Ibérica y los mares de Japón son zonas de simpatría de *A. simplex* y *A. pegreffii* (74,77,87).

4.6. Huéspedes

4.6.1. Principales especies parasitadas

Actualmente se ha reportado que la mayoría de especies de peces de consumo en los países en donde se ha estudiado, pueden estar parasitados con larvas de anisakidos. Se conocen alrededor de 160 especies que en su mayoría son infestadas por *A. simplex* (88). La prevalencia de estos nematodos varía dependiendo de la especie de pez parasitado, del área geográfica y de las características particulares de cada especie (89). Sin embargo, varios autores plantean que la prevalencia de las larvas de estadio infectivo (L3) puede estar asociada con la edad y el tamaño de los peces (69,90).

En general, las especies con más número de estudios y de porcentajes altos de parasitación son la merluza (*Merluccius* sp.), la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) y el jurel (*Trachurus trachurus*) (81,91–93)

4.6.2. Hospederos de anisakidos registrados en América del Sur

Los nematodos anisakidos se han reportado en la vida marina de los principales océanos y mares, tanto en mamíferos marinos como en diferentes especies de peces de consumo humano (39). En América del Sur, se han identificado peces

parasitados en Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (14,33,34,63,94–96,57). En la tabla 2 se presenta la lista de hospederos reportados para parásitos de la familia Anisakidae en América del Sur y en la figura 7 la distribución.

En Argentina se ha identificado el género *Contracaecum* sp. en seis especies de peces de consumo, todas con una prevalencia cercana al 100% (94). En Brasil, se han reportado ocho hospederos intermediarios parasitados por *A. typica*, *A. physeteris*, *P. azarasi*, *Contracaecum* sp., *Anisakis* sp. y *Pseudoterranova* sp., mientras en Chile con once hospederos identificados, solo se reportan los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova*. Por su parte, Colombia cuenta con el mayor número de hospederos, once especies entre peces de agua marítima y continental, sin embargo, en su mayoría la identificación taxonómica solo se ha llegado hasta familia, y el pez *Mugil incilis* se ha identificado como hospedero del género *Pseudoterranova*.

En esta revisión solo se encontró para Ecuador la tesis de Lourdes Ulloa (2008) quien reporto la presencia de *Contracaecum* sp. en los peces *Mugil cephalus* (lisa), *Hoplias microlepis* (guanchiche), *Hexanematichthys* sp. (bagre pintado) y *Oreochromis niloticus* (tilapia).

En Perú, uno de los países de América con reportes de casos clínicos de anisakidosis, se conoce la existencia de ocho hospederos de anisakidos reportados en dos trabajos de investigación donde se identificaron los nematodos *A. physeteris*, *P. decipiens*, *A. simplex* e *Hysterothylacium* sp. Finalmente, se encontró en Venezuela el reporte de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*, parasitando principalmente peces de la familia de los Mugilidos. En la figura 7 se presenta la distribución de los nematodos anisakidos reportados en países de América del Sur.

Tabla 2. Lista de especies de peces reportados como hospederos intermediarios de parásitos de la familia Anisakidae en países de América del Sur. *SD: Sin datos

No	País	Hospedero		Nematodo identificado	n (peces revisados)	Prevalencia (%)	Ref
		Nombre científico	Nombre común				
1	Argentina	<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	SD	<i>Contracaecum</i> sp.	SD	100	(94)
2	Argentina	<i>Oligosarcus jenynsii</i>	SD	<i>Contracaecum</i> sp.	SD	54	(94)
3	Argentina	<i>Odontesthes bonariensis</i>	SD	<i>Contracaecum</i> sp.	SD	5	(94)
4	Argentina	<i>Hoplias malabaricus</i>	SD	<i>Contracaecum</i> sp.	SD	100	(94)
5	Argentina	<i>Pimelodus albicans</i>	SD	<i>Contracaecum</i> sp.	SD	100	(94)
6	Argentina	<i>Rhamdia quelen</i>	SD	<i>Contracaecum</i> sp.	SD	100	(94)
7	Brasil	<i>Thunnus thynnus</i>	SD	<i>Anisakis typica</i>	SD	SD	(67)
8	Brasil	<i>Auxis trazard</i>	SD	<i>Anisakis typica</i>	SD	SD	(67)
9	Brasil	<i>Trichiurus lepturus</i>	Pez sable	<i>Anisakis typica</i>	64	57	(62)
10	Brasil	<i>Gadus</i> sp.	Bacalao	<i>Pseudoterranova azarasi</i>	SD	SD	(97)
11	Brasil	<i>Cynoscion</i> spp.	SD	<i>Contracaecum</i> sp.	52	67.3	(98)
12	Brasil	<i>Cynoscion</i> spp.	SD	<i>Anisakis</i> sp.	52	30.76	(98)
13	Brasil	<i>Cynoscion</i> spp.	SD	<i>Pseudoterranova</i> sp.	52	3.84	(98)
14	Brasil	<i>Kogia breviceps</i>	Cachalote pigmeo	<i>Anisakis physeteris</i>	SD	SD	(95)
15	Brasil	<i>Kogia breviceps</i>	Cachalote pigmeo	<i>Pseudoterranova</i> sp.	SD	SD	(95)
16	Brasil	<i>Plagioscion squamosissimus</i>	Corvina de plata	<i>Anisakis</i> sp.	44	23	(99)
17	Chile	<i>Merluccius merluccius</i>	Merluza	Familia Anisakidae	5	SD	(100)
18	Chile	<i>Thyrstites atun</i>	Atun	<i>Anisakis</i> sp.	SD	SD	(100)
19	Chile	<i>Merluccius australis</i>	SD	<i>Pseudoterranova</i> spp.	104	4.8	(101)
20	Chile	<i>Merluccius australis</i>	SD	<i>Anisakis</i> sp. Tipo I	104	8.7	(101)
21	Chile	<i>Genypterus blacodes</i>	SD	<i>Pseudoterranova</i> spp.	81	53.1	(101)
22	Chile	<i>Genypterus blacodes</i>	SD	<i>Anisakis</i> sp. Tipo I	81	7.4	(101)
23	Chile	<i>Genypterus blacodes</i>	SD	<i>Anisakis</i> sp. Tipo II	81	4.9	(101)
24	Chile	<i>Thyrstites atun</i>	Atun	<i>Pseudoterranova</i> spp.	95	5.3	(101)

25	Chile	<i>Thyrstites atun</i>	Atun	<i>Anisakis</i> sp. Tipo I	95	7.4	(101)
26	Chile	<i>Merluccius gayi</i>	SD	<i>Anisakis simplex</i>	17	5.9	(101)
27	Chile	<i>Merluccius gayi</i>	SD	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	17	23.5	(101)
28	Chile	<i>Macrouronus magellanicus</i>	SD	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	4	25	(101)
29	Chile	<i>Macrouronus magellanicus</i>	SD	<i>Hysterothylacium</i> sp.	4	1	(101)
30	Chile	<i>Genypterus chilensis</i>	SD	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	18	50	(101)
31	Chile	<i>Paralichthys microps</i>	SD	<i>Anisakis simplex</i>	10	10	(101)
32	Chile	<i>Paralichthys microps</i>	SD	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	10	70	(101)
33	Chile	<i>Trachurus murphyi</i>	SD	<i>Anisakis simplex</i>	16	12.5	(101)
34	Chile	<i>Trachurus murphyi</i>	SD	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	16	31.3	(101)
35	Chile	<i>Merluccius australis</i>	Merluza	<i>Pseudoterranova</i> sp.	78	21.8	(102)
36	Colombia	<i>Hoplias malabaricus</i>	Moncholo	<i>Contracaecum</i> sp.	227	100	(34)
37	Colombia	<i>Mugil incilis</i>	Lisa	Familia Anisakidae	386	70	(34,103)
38	Colombia	<i>Merluccius goyi</i>	Merluza	Familia Anisakidae	SD	70	(34)
39	Colombia	<i>Mugil cephalus</i>	Lebranche	Familia Anisakidae	19	100	(34)
40	Colombia	<i>Mugil incilis</i>	Lisa	Familia Anisakidae	355	83.9	(34)
41	Colombia	<i>Mugil spp</i>	Mugil	Familia Anisakidae	5	100	(34)
42	Colombia	<i>Sciades herzbergii</i>	Barbulchiro	Familia Anisakidae	64	1.6	(34)
43	Colombia	<i>Caranx hippos</i>	Jurel	Familia Anisakidae	12	8.5	(34)
44	Colombia	<i>Centropomus undecimalis</i>	SD	Familia Anisakidae	23	4.3	(34)
45	Colombia	<i>Mugil cephalus</i>	Lisa	<i>Anisakis</i> sp.	15	33	(104)
46	Colombia	<i>Hoplias malabaricus</i>	Moncholo	<i>Contracaecum</i> spp.	45	100	(60)
47	Colombia	<i>Mugil incilis</i>	Lisa	<i>Contracaecum</i> sp.	378	100	(105)
48	Colombia	<i>Mugil incilis</i>	Lisa	<i>Pseudoterranova</i> sp.	378	80.5	(105)
49	Colombia	<i>Sorubim cuspicaudus</i>	Blanquillo	<i>Contracaecum</i> sp.	60	100	(59)
50	Colombia	<i>Hoplias malabaricus</i>	Moncholo	<i>Contracaecum</i> sp.	60	93.33	(59)
51	Colombia	<i>Caquetaia kraussii</i>	Mojarra amarilla	<i>Contracaecum</i> sp.	60	95	(59)
52	Colombia	<i>Pseudoplatystoma magdaleniatum</i>	Bagre pintado	<i>Contracaecum</i> sp.	60	95	(59)

53	Colombia	<i>Plagioscion magdalenae</i>	Pacora	<i>Contracaecum</i> sp.	60	46.7	(59)
54	Colombia	<i>Ageneiosus caucanus</i>	Doncella	<i>Contracaecum</i> sp.	60	23.3	(59)
55	Colombia	<i>Salminus affinis</i>	Rubio	<i>Contracaecum</i> sp.	45	95	(60)
56	Ecuador	<i>Mugil cephalus</i>	Lisa	<i>Contracaecum</i> sp.	64	14	(57)
57	Ecuador	<i>Hoplias microlepis</i>	Guanchiche	<i>Contracaecum</i> sp.	64	25	(57)
58	Ecuador	<i>Hexanemachthys</i> sp.	Bagre pintado	<i>Contracaecum</i> sp.	64	12.5	(57)
59	Ecuador	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia	<i>Contracaecum</i> sp.	64	14.06	(57)
60	Perú	<i>Coryphaena hipporus</i>	Dorado	<i>Anisakis physeteris</i>	SD	SD	(7)
61	Perú	<i>Scomber japonicus</i>	Caballa	<i>Anisakis physeteris</i>	SD	SD	(7)
62	Perú	<i>T. murphy</i>	Jurel	<i>Anisakis physeteris</i>	SD	SD	(7)
63	Perú	<i>S. sardachilensis</i>	Bonito	<i>Anisakis physeteris</i>	SD	SD	(7)
64	Perú	<i>Coryphaena hipporus</i>	Dorado	<i>Anisakis physeteris</i>	SD	SD	(7)
65	Perú	<i>Trachurus murphy</i>	Jurel	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	SD	SD	(7)
66	Perú	<i>Scomber japonicus</i>	Bonito	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	SD	SD	(7)
67	Perú	<i>Trachurus murphy</i>	Jurel	<i>Anisakis simplex</i>	SD	SD	(7)
68	Perú	<i>Sciaena deliciosa</i>	Lorna	<i>Anisakis simplex</i>	SD	SD	(7)
69	Perú	<i>Pralonchurus peruanus</i>	Coco	<i>Anisakis simplex</i>	SD	SD	(7)
70	Perú	<i>Scomber japonicus</i>	Caballa	<i>Anisakis simplex</i>	SD	SD	(7)
71	Perú	<i>Mugil cephalus</i>	Lisa	<i>Anisakis simplex</i>	SD	SD	(7)
72	Perú	<i>Coryphaena hipporus</i>	Dorado	<i>Anisakis physeteris</i>	12	7	(31)
73	Perú	<i>Coryphaena hipporus</i>	Dorado	<i>Hysterothylacium</i> sp.	12	4	(31)
74	Venezuela	<i>Mugil curema</i>	Lisa	<i>Contracaecum</i> spp.	90	97	(106)
75	Venezuela	<i>Mugil liza</i>	Lebranche	<i>Contracaecum</i> spp.	90	97	¿?
76	Venezuela	<i>Eugerres plumieri</i>	Mojarra	<i>Contracaecum</i> spp.	90	97	¿?
77	Venezuela	<i>Mugil curema</i>	Lisa	<i>Pseudoterranova</i> spp.	90	3	(106)
78	Venezuela	<i>Mugil liza</i>	Lebranche	<i>Pseudoterranova</i> spp.	90	3	(106)
79	Venezuela	<i>Eugerres plumieri</i>	Mojarra	<i>Pseudoterranova</i> spp.	90	3	(106)
80	Venezuela	<i>Mugil liza</i>	Lebranche	<i>Contracaecum</i> spp.	65	84.39	(33)

81	Venezuela	<i>Mugil liza</i>	Lebranche	<i>Pseudoterranova</i> spp.	65	10	(33)
82	Venezuela	<i>Mugil liza</i>	Lebranche	<i>Anisakis</i> spp.	65	5.61	(33)
83	Venezuela	<i>Mugil curema</i>	Lisa	<i>Contracaecum</i> spp.	143	12.74	(33)
84	Venezuela	<i>Mugil curema</i>	Lisa	<i>Pseudoterranova</i> spp.	143	40.1	(33)
85	Venezuela	<i>Mugil curema</i>	Lisa	<i>Anisakis</i> spp.	143	47.16	(33)

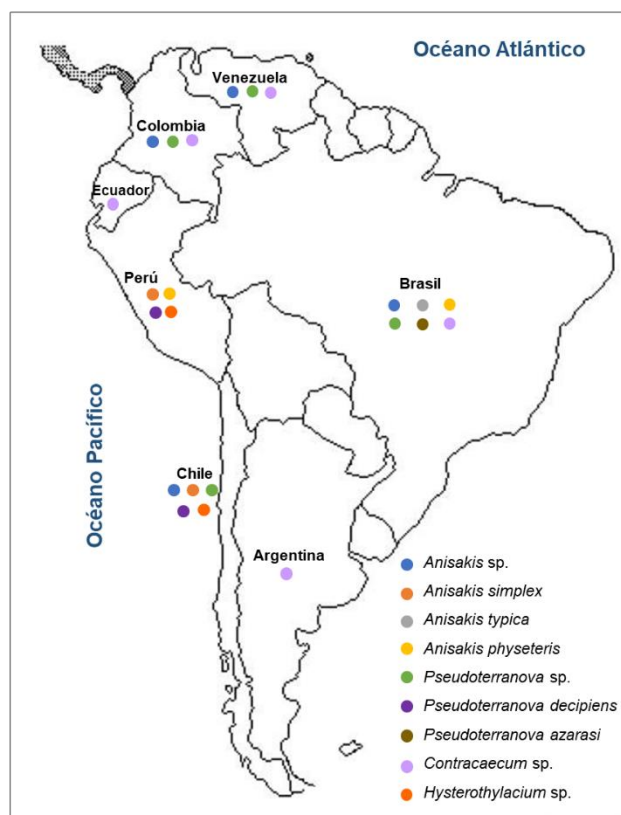


Figura 7. Distribución de nematodos anisakidos en América del Sur, reportados en peces de consumo humano (Castellanos, JA. 2018).

4.7. Localización de las larvas

La ubicación de las larvas en la cavidad abdominal de los peces es variable, se pueden encontrar en la superficie del hígado, en mesenterio, gónadas, en intestino, o en la submucosa del tubo digestivo, donde se encuentran principalmente encapsulada y en la mayoría de los casos se observan enrolladas en espiral y comúnmente se observan rodeadas por una capsula transparente (81). Además, está sujeta a los hábitos alimenticios de sus hospederos, en los peces que se alimentan principalmente de crustáceos, como son la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), el arenque (*Clupea harengus*) o la caballa (*Scomber japonicus*), las larvas se encuentran en la cavidad abdominal y las vísceras (90); mientras que en

los peces piscívoros como la merluza (*Merluccius* sp.) o el bacalo (*Gadus morhua*) se encuentran en la musculatura que rodea la cavidad abdominal (107). Mientras en los moluscos cefalópodos, es común encontrarlas en las vísceras y libres en el interior del manto (108).

Respecto al número de larvas y su distribución en el músculo y en vísceras va a depender de la especie de hospedero, en especies de salmón del Pacífico se reporta mayor abundancia de *A. simplex* en músculo abdominal (87%) (85), y en especies de calamar gigante capturados en la costa del Pacífico del Perú, se han encontrado en un 57% larvas de *Anisakis* sp. en la musculatura del manto.

4.8. Técnicas de detección de larvas de anisakidos

Existen varios métodos para determinar la presencia de *Anisakis* sp. en músculo y vísceras de pescado, la mayoría de estas técnicas llevan a la destrucción de los parásitos, sin embargo, aunque la muerte de las larvas evita la infestación a los humanos, no evita la posibilidad de que se produzcan reacciones alérgicas en individuos sensibilizados (109).

La manera habitual para detectar la presencia de larvas es por inspección visual y transiluminación, sin embargo, estos métodos son de baja eficiencia para la industria debido a que muchos parásitos se encuentran alojados en el interior del músculo de los peces y no es fácil su observación.

4.8.1. Examen visual

Es un método sencillo y económico para la detección de larvas de anisakidos. La inspección se realiza en la superficie de las vísceras y en músculo sin llegar a ser un método destructivo para los productos de industria pesquera, permite la

detección entre el 45 y el 83% de las larvas localizadas en músculo, no discrimina entre las larvas vivas y muertas y es recomendado para filetes y pescados pequeños (81).

4.8.2. Transiluminación

Este método se utiliza en filetes sin piel para la detección de larvas de anisakidos localizados en el interior del músculo, para ello los filetes se ubican en una superficie traslúcida iluminada con luz blanca desde la parte inferior. Se usa para detectar larvas ubicadas en una profundidad hasta de 6 mm, a partir de 1 cm de profundidad solo es posible visualizar las larvas de *Pseudoterranova* por su gran tamaño y su color rojizo (81). Es un método que permite la revisión de hasta 300 filetes por hora, sin embargo, ocasiona cansancio ocular por parte de los operarios lo que disminuye la eficacia y retrasa la producción. Este método detecta entre el 7 y 10% de las larvas presentes en los filetes (81).

4.8.3. Luz ultravioleta

Este método utiliza luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm unos 10 cm sobre la superficie del pescado. Permite la diferenciación de larvas de los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova* que se observan de color azul fluorescente y las *Contracaecum* de color amarillo. Es un método rápido y no destructivo, sin embargo, requiere de larvas muertas para la emisión de fluorescencia, y para ello los filetes deben ser sometidos a procesos de congelación y descongelación (109). No obstante, en algunos estudios las larvas muertas no coinciden con la emisión de fluorescencia por lo que se considera un método inadecuado para la inspección (107).

4.8.4. Digestión con pepsina

Es un método destructivo que consiste en someter el músculo del pescado a una solución de pepsina y ácido clorhídrico a 37°C para separar las larvas del tejido, la cutícula de las larvas es estable en estas condiciones de digestión por lo que se utiliza para estudios de prevalencia y abundancia. Sin embargo, si la cutícula se encuentra deteriorada por algún proceso anterior las larvas pueden ser digeridas por la pepsina (107).

4.8.5. Detección electromagnética

El método se basa en la diferencia de la conductividad entre el músculo del pescado y las larvas. Para la detección se utiliza un magnetómetro SQUID (Super conducting Quantum Interference Device magneto meter), que registra de forma automatizada las perturbaciones en el campo magnético y transfiere una señal que luego es amplificada y almacenada en formato digital. Con este método se puede determinar la orientación y posición de las larvas o la presencia de espinas. A partir de este método se pretende construir un sistema comercial automatizado que sustituya la transiluminación (91).

4.8.6. Tinción

Este método se usa únicamente para diferenciar las larvas vivas y muertas, las larvas muertas se tiñen más intensamente, los colorantes más usados son la safranina y el verde brillante (110).

4.9. Epidemiología

La presencia de larvas de *Anisakis* en pescado es muy variable, se han reportado más de 200 especies de peces pelágicos como hospederos de estos nematodos. En Japón, la caballa japonesa (*Scomber japonicus*) es uno de los principales peces

responsables de la anisakidosis, con prevalencias de hasta el 100% en algunas regiones (111). En Europa es el arenque (*Clupea harengus*) en el que se han reportado prevalencias de hasta el 100%, otras especies no menos importantes como *Engraulis encrasicolus*, *Sardina pilchardus*, *Merluccius merluccius*, *Merlangius merlangus*, *Thunnus thynnus* tienen prevalencias entre el 23.3 % y el 81.7% (75,112).

Con respecto a la anisakidosis humana, Japón es el país con mayor número de reportes en todo el mundo con más de 2000 casos al año, seguido de los países europeos con alrededor de 1000 casos al año y Corea del Sur con 500 (113). La comida tradicional como el sushi y el sashimi en Japón y los boquerones en vinagre en España, son los principales responsables de la infección en estos países (114–116).

La enfermedad se diagnostica en pacientes entre los 20 y 60 años, afectando más a hombres que mujeres (117). Los autores reportan estacionalidad en los casos humanos debido al mayor consumo de pescado en algunas épocas del año y a una mayor prevalencia de parásitos en los hospederos; por ejemplo, en Japón los meses con más casos reportados corresponden al invierno y la primavera aunque se tienen reportes durante todo el año (112).

4.10. Anisakidosis humana

La anisakidosis es una zoonosis producida por la infección de larvas L3 y/o L4 de nematodos de la familia Anisakidae en los humanos cuando este consume pescado o mariscos parasitados (42). El término se introdujo en 1960 por Straub y el primer reporte fue hecho en 1960 por Van Thiel et al (5). Es una enfermedad endémica en Japón (siendo el país con mayor número de casos reportados) (17), y España (88), con reportes en Canadá y Estados Unidos (118); también ha sido descrita en países como Chile y Perú donde actualmente se considera como una enfermedad emergente, lo que se explica dado el aumento de los hábitos de consumo de pescado crudo y cambios en la distribución de las especies hospederas (7,119). Se presenta con mayor frecuencia en adultos que en niños (5). La infección se suele dar por una larva única, aunque hay reportes de infestaciones múltiples (120).

La infección por parásitos del género *Anisakis* se denomina anisakiasis, siendo este el principal agente causal. La pseudoterranovosis, infección por *Pseudoterranova*, también es frecuente, principalmente en el continente americano, donde la mayoría de casos han sido reportados en Chile (5,36,48,121). Existe, un reporte de infección por *Contracaecum osculatum* en Japón y cuatro reportes de infección por *Hysterothylacium aduncum*, dos en Corea del Sur y dos en Japón (38).

En el humano la larva puede generar múltiples síntomas, aunque la mayoría de casos son asintomáticos (64). La sintomatología se explica por dos mecanismos fisiopatológicos, una reacción de hipersensibilidad inmediata y una reacción inflamatoria (120). Con lo anterior tenemos que el cuadro clínico va variar entre una reacción alérgica y una afección del tracto gastrointestinal. El género al que pertenezca la larva va estar relacionado con el mecanismo fisiopatológico, siendo más comunes las alergias con parásitos del género *Anisakis* y los cuadros inflamatorios con *Pseudoterranova* (13,122).

La presentación gastrointestinal va a depender del lugar donde se ubique la larva a lo largo del tracto digestivo. Comprenden una localización esofágica en 0.8% de los casos (61); una gástrica, con la mayoría de casos, del 70 – 95 % (5,120) y una intestinal con un 4% de los casos (5) con una variante íleal terminal y una colónica rara 0.1 – 0.9% (43). Existen además reportes donde la larva se llegó a ubicar en laringe y lengua (122). La larva puede también migrar a otros órganos, atravesando distintas capas celulares, llegando a penetrar el hígado, bazo, páncreas, pulmones, ovarios y ganglios linfáticos (5,122), dando una presentación extra-intestinal de la infección. El tiempo de permanencia de larva en la cavidad determina el tipo de reacción inmunológica de la presentación, pudiendo ser aguda o crónica (7). El tipo agudo se caracteriza por eritema e hiperemia en la mucosa (42), acompañado de edema que puede comprometer la submucosa (123). Al aumentar la permanencia de la larva, a varios días, ésta puede llegar a migrar hasta la submucosa y generar alteraciones de tipo crónico, como infiltración eosinófila, induración y engrosamiento de la mucosa (19), que terminan en la formación de abscesos y granulomas, por una reacción de hipersensibilidad tipo IV (13,122). La larva muere transcurridas 8 a 24 semanas después de ser ingerida (5,122).

Los cuadros gastrointestinales van a variar en su sintomatología de acuerdo con la presentación y la evolución cronológica de cada caso, sin embargo la mayoría de cuadros son autolimitados (120). Cuando la afección es más proximal, los síntomas inician tempranamente, 6 a 12 horas después de la ingestión, la larva puede desencadenar el reflejo tusígeno que permite la expulsión del parásito con remoción manual(121), también pueden presentarse dolor faríngeo, prurito nasal, náusea y vómito (13,122). En los cuadros gástricos la larva se suele ubicar en los pliegues de la curvatura mayor del estómago, donde puede pasar desapercibida en el examen endoscópico (123), los pacientes cursan con dolor epigástrico (pirosis) intenso y repentino que inicia 12 a 72 horas post-ingestión y no mejora con analgésicos (5,120), asimismo pueden experimentar dolor torácico de tipo anginoso (124), cólico abdominal, náuseas, sensación de estómago vacío (42), febrícula y distensión

abdominal por ascitis (123). Cuando se ve comprometido el intestino, los síntomas aparecen tardíamente, incluso de semanas después de la infección, siendo la obstrucción intestinal el más prevalente, seguido por perforación intestinal que se puede complicar en una peritonitis, sangrado de vías digestivas altas (heces melénicas), diarrea, dilatación proximal del intestino delgado (122,123) e intususcepción (43). Ocasionalmente la larva puede ser eliminada en las deposiciones y hay reportes de salida de la larva por el ano (5,48). En general todos los pacientes suele cursar con una leucocitosis marcada, inicialmente por neutrofilia, con aparición tardía de eosinofilia (120).

Por otra parte, la infección también se ha asociado a respuestas alérgicas agudas, abarcando urticarias, angioedema y shock anafiláctico, que suelen aparecer 4 a 24 horas después de la ingesta (5). El sistema inmune reconoce los antígenos excretados/secretados de la larva viva y los de la cutícula en la larva muerta (13). Se han identificado trece alérgenos, siendo los de mayor relevancia el *Ani s 1* y *Ani s 7* (11,125). Los alérgenos desencadenan una reacción de hipersensibilidad tipo I, mediada por IgE típica de un perfil linfocítico Th2 (123), la cual requiere de una sensibilización previa de las células del sistema inmune, que se cree está asociada a un cuadro intestinal asintomático anterior (64,126). Cabe aclarar que ambas presentaciones pueden ocurrir en conjunto como un cuadro gastro-alérgico (124). Existen también casos de reacciones alérgicas crónicas, principalmente urticaria. La exposición constante al parásito se ha visto asociada a asma ocupacional e infantil, rinitis, dermatitis y conjuntivitis (5,7,107,122).

En el diagnóstico de anisakidasis se deben tener en cuenta dos aspectos: 1) presentación clínica del paciente y 2) antecedente de consumo de pescado o mariscos crudos o semicrudos. El diagnóstico de un cuadro gastrointestinal exige la detección e identificación de la larva, ya sea in vivo en el caso de la endoscopia o in situ en una biopsia. La endoscopia temprana es la prueba de referencia para el diagnóstico de estos cuadros (120). Por la similitud en la presentación clínica, se

debe hacer un diagnóstico diferencial de los cuadros gastrointestinales con gastritis, apendicitis aguda, pseudo-obstrucción intestinal, otras infecciones parasitarias, infecciones bacterianas, enfermedad de Crohn y neoplasias, principalmente en los casos crónicos con formación de granulomas que simulan tumores (13,17,120,122). Para los cuadros alérgicos no es indispensable la observación directa de la larva, los síntomas se atribuyen principalmente a la respuesta inmune del hospedero, por ello las pruebas serológicas son las más utilizadas. La detección de anticuerpos, IgM, IgG e IgE, específicos contra el parásito es un método sensible (64). Las reacciones cutáneas de sensibilidad, test de Prick, nos indican un contacto previo con el anisakido, por lo que se suelen usar en investigación (11).

En los casos en los que el mecanismo fisiopatológico depende de la larva viva, el tratamiento consiste en extracción de la misma por endoscopia con fórceps, cuidando de realizar una extracción completa del nematodo, lo que permite la posterior identificación del género al cual pertenece el anisakido. Los síntomas suelen desaparecer pocas horas después de la extracción (42). En los casos en que existan granulomas u obstrucciones intestinales, se debe hacer una resección de los segmentos afectados (122). También se han propuesto tratamientos empíricos con antiparasitarios como albendazol y mebendazol, que buscan matar la larva, aunque no se conoce su efectividad (123,126). Algunos autores recomiendan el uso de antiácidos, debido a que las larvas buscando evitar el pH ácido gástrico suelen adherirse más temprano al epitelio y ocasionar un daño en menor tiempo (122). El uso de analgésicos para el tratamiento del dolor, pueden ser prescritos. En las reacciones alérgicas el tratamiento inmediato abarca antihistamínicos, broncodilatadores y vasoconstrictores en los casos más graves (126). Cabe añadir que debido a la naturaleza termoestable de antígenos como *Ani s 4* de *A. simplex*, se pueden presentar reacciones alérgicas aun cuando el consumo de peces sea bien cocido, lo que constituye un problema para el 27% de los individuos sensibilizados (101,107).

La prevención de la anisakiasis involucra todos los procesos incluidos en el manejo de pescados y mariscos. La evisceración temprana post-captura evita la migración de la larva al músculo (7). La congelación a -20 ° C es indispensable para imposibilitar la viabilidad de las larvas (61), temperaturas mayores resultan inefectivas debido a que el parásito secreta un agente criopreservante. En cuanto al consumo para humanos, los peces deben permanecer al menos 10 minutos a 60 °C o alcanzar una temperatura de 77° C en el microondas (5,7). La instauración de legislaciones en el manejo y procesamiento de peces y desechos de pesca probablemente contaminados es indispensable para un control en el número de casos (101).

4.10.1. Anisakidosis gástrica

Esta forma de la enfermedad ocurre cuando las larvas de los anisakidos penetran en la pared gástrica, principalmente en la mucosa o submucosa. El curso clínico agudo se caracteriza por dolor epigástrico agudo, náuseas y vómitos, todos apareciendo unas horas después de la ingestión del pescado contaminado. Con menos frecuencia, también pueden aparecer inflamación abdominal, diarrea, pirexia, hematemesis y otros síntomas inespecíficos (127). Los estudios endoscópicos han revelado que las lesiones y las larvas asociadas generalmente se distribuyen en el cuerpo del estómago, a lo largo de la curvatura mayor (128). Los hallazgos típicos incluyen la presencia de larvas intactas incrustadas en la submucosa edematosa y rodeadas por neutrófilos y eosinófilos. La pared gástrica muestra un marcado engrosamiento, con edema e infiltración eosinofílica masiva (127).

Algunos pacientes pueden desarrollar una forma subaguda o crónica, caracterizada por manifestaciones clínicas tales como dolor epigástrico relativamente grave que más tarde se torna opaco, y dispepsia, vómitos y anorexia, que pueden persistir durante meses o incluso años (129). Los exámenes endoscópicos en casos

crónicos pueden mostrar erosión o úlcera con edema en la superficie de una induración tipo tumor o nódulo que imita el cáncer de estómago o la úlcera (38).

4.10.2. Anisakidosis intestinal

En casos agudos o fulminantes, el dolor abdominal agudo que generalmente aparece 24-48 horas después de la ingestión de las larvas puede estar acompañado de náuseas, vómitos, abultamiento abdominal, induración y desviación del ritmo intestinal establecido con estreñimiento o diarrea (38). Cuando aparece fiebre de más de 38 °C, esto puede indicar infección secundaria con bacterias (127). Hallazgos de laboratorio a menudo muestran leucocitosis, pero generalmente no se observa eosinofilia, se puede presentar síndromes obstructivos y artralgias (16,129).

Al igual que en la forma gástrica, los cambios inflamatorios (incluido el edema local grave que puede provocar obstrucción y dilatación proximal) son estrictamente localizado. Además se puede observar edema, petequias, hiperemia e hinchazón turbia de la serosa y el mesenterio (127). El examen microscópico generalmente muestra la larva intacta incrustada en la submucosa, con edema intenso y marcada infiltración celular a través de la capa serosa. Estos cambios conducen a un engrosamiento de tres a cinco veces de la pared intestinal. La lesión flemática es histopatológicamente similar a la que ocurre en la forma gástrica aguda, pero más severa (127).

4.10.3. Anisakidosis ectópica

En algunos casos, las larvas pueden perforar completamente la pared gastrointestinal, llegando a la cavidad abdominal y migrando a órganos y tejidos como el mesenterio (39,130), el pulmón (131)(63,64) o el hígado. En la mayoría de estos casos, las manifestaciones clínicas son leves, pero pueden aparecer síntomas

intestinales de mayor gravedad como resultado de la respuesta provocada por la larva durante su penetración en la pared intestinal (132)(5,62). En otros casos, se han encontrado larvas en la orofaringe, provocando el llamado "síndrome de la garganta hormigueante", que puede llevar a la expulsión de la larva al toser, estos casos se han descrito en Estados Unidos y se asocian a *Pseudoterranova* (127).

4.10.4. Anisakiasis alérgica

La urticaria se ha reportado en infecciones gastrointestinales con *Anisakis simplex* (133), siendo esta especie identificada como una causa importante de reacciones alérgicas mediadas por anticuerpos IgE (134).

Se han observado reacciones alérgicas a *A. simplex* sin síntomas gástricos ni intestinales en pacientes sensibilizados, después de la ingestión de mariscos contaminados (peces o cefalópodos) (127). Los primeros síntomas aparecen muy temprano, dentro de las primeras horas, y muy frecuentemente incluso en los primeros 60 minutos (127). El curso clínico sigue el patrón general para las reacciones alérgicas de tipo I (hipersensibilidad a alimentos), y su gravedad varía desde urticaria simple o angioedema hasta shock anafiláctico. Entre el 20-60% de los casos clínicos son graves, afectando a varios órganos, incluyendo la piel, el aparato respiratorio, el sistema digestivo y el sistema cardiovascular (10). Se considera que los pacientes con alergia a *A. simplex* en su mayoría son adultos con una edad promedio de 50 años, a pesar de que las alergias relacionadas con los alimentos suelen ser más comunes en niños y adultos jóvenes (10). Esto puede deberse a que los adultos comen con mayor frecuencia mariscos crudos o poco cocinados (127).

4.10.5. Patogenicidad de *Anisakis*

Las infecciones con helmintos parásitos se caracterizan por el desarrollo de respuestas tanto alérgicas como inmunomoduladoras. Aunque las reacciones

alérgicas fulminantes a las infecciones son raras, pueden ser importantes en la liberación accidental de antígenos del parásito en la circulación general durante, por ejemplo, en una cirugía para eliminar los quistes hidatídicos. Las respuestas protectoras a los nematodos intestinales están asociadas con la producción de citoquinas Th2, los mastocitos y la respuesta IgE, todas ellas típicas de las reacciones alérgicas y las respuestas inmunes a los helmintos parásitos de los tejidos (70). Los elementos de estas respuestas están asociados con la expulsión de parásitos, pero los mastocitos, por ejemplo, parecen estar involucrados en promover las respuestas Th2.

La mayoría de las infecciones por helmintos induce enfermedades crónicas más que agudas, incluso en casos de niveles muy altos de parásitos, los helmintos han desarrollado mecanismos para superar y evadir las respuestas inmunitarias del huésped para asegurar su supervivencia.

La anisakidosis humana es peculiar porque este parásito no está adaptado para vivir en humanos y la infección es transitoria. Además, más del 90% de los casos descritos son causados por una sola larva. Por tanto, pueden esperarse diferencias entre la patogénesis de *A. simplex* y la causada por otros helmintos en seres humanos. Un ejemplo de esto es la filariasis, en la que existe una carga alta y persistente de parásitos, y se ha argumentado que los parásitos y los huéspedes han evolucionado conjuntamente para optimizar su supervivencia mutua (70). Las reacciones de hipersensibilidad son raras a menos que sean provocadas por la muerte natural o inducida por fármacos de parásitos que residen en tejidos.

Las alteraciones patológicas que ocurren en el tracto gastrointestinal durante la infección con *A. simplex* son el resultado combinado de la acción directa de la larva durante la invasión de tejido y de la compleja interacción entre el sistema inmune del huésped y las sustancias liberadas o contenida dentro del parásito. En la figura 8 se presenta un esquema que ilustra la patogénesis de la respuesta inmune innata y adaptativa al parásito.

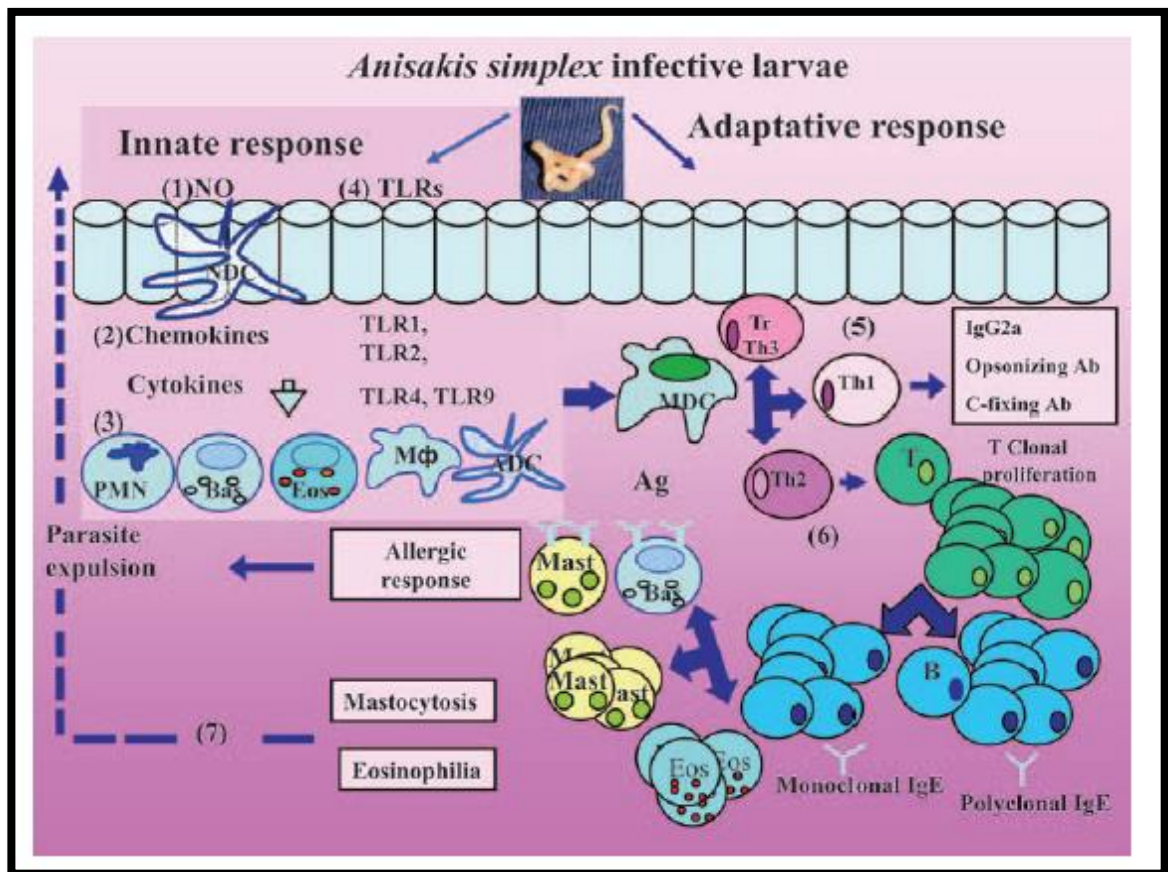


Figura 8. Representación esquemática de la patogenicidad de *Anisakis simplex* en el tracto alimentario. El humano puede ser expuesto a los antígenos de *A. simplex* de varias fuentes: por antígenos de excreción secreción (ES) de las larvas, antígenos somáticos o antígenos cuticulares que se presentan en los alimentos por las larvas vivas o por las larvas muertas (desintegradas). Las células epiteliales pueden secretar moléculas citotóxicas (1), así como las quimiocinas y citoquinas (2), que atraen células polimorfonucleares (PMN), macrófagos tisulares (M), células dendríticas inmaduras (NDC), basófilos (BAS) y eosinófilos (Eos) (3). La respuesta innata también puede implicar receptores tipo toll TLRs (4) de las células epiteliales y las células dendríticas activadas (ADC). En la respuesta adaptativa, la presentación de antígenos por las células dendríticas maduras (MDC) estimula una respuesta de Th1 (5) y Th2 (6). Otras células T pueden ser reclutadas como células T-reguladoras y Th3. Las citoquinas Th1 (IFN, factor de necrosis tumoral, IL-2 e IL-3 (5) inducen IgG2a, opsonización y anticuerpos de fijación del complemento, la activación de macrófagos, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Las citoquinas de las células Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13) promueven la producción de IgG1 e IgA (6). Las mastocitosis y la eosinofilia son inducidos por una respuesta Th2 y citoquinas quimioatrayentes y pueden ser responsables para la expulsión del parásito (7). Los basófilos son cruciales para el inicio de una respuesta

Th2. La eosinofilia puede ser debido a la liberación de numerosos factores quimiotácticos por células epiteliales, linfocitos T, mastocitos, basófilos y factores derivados directamente de los parásitos. Tomado de Audicana y Kennedy (2015).

4.10.6. Casos clínicos de anisakidosis en América del Sur

En América del Sur la anisakidosis es una parasitosis poco conocida y presenta una baja prevalencia, por lo que puede existir un subregistro de la enfermedad, sin embargo, existen reportes en distintos países de la región. En la revisión bibliográfica realizada se encontraron 35 casos en Chile (5,42,48,61,121,135–137) y 8 en Perú (7,31,138–140), donde el consumo de pescado crudo en forma de cebiche es algo habitual en las zonas costeras (7). Adicionalmente, se encontraron reportes de seroprevalencia, en Venezuela y Brasil (64,141). En la tabla 3 se presenta un resumen de los casos clínicos asociados a parásitos anisakidos en América del Sur.

Los reportes en Latinoamérica de anisakidosis en humanos se iniciaron en 1997 con el primer caso en Chile (5) y con un aumento en el registro entre 1997 y 2005, hasta los últimos entre 2012 y 2014 (135). Se presentaron casos sintomáticos, donde el tratamiento fue encaminado hacia la extracción del nematodo por endoscopia de vías alta, la forma más usada, aunque también se reportan tratamientos con antihelmínticos como mebendazol y metronidazol (5,42,138).

Se encontraron dos reportes de anisakidosis gastroalérgica en Chile en 1998 y 2003 (48,121), en pacientes de sexo femenino, que presentaron sintomatología alérgica con prurito nasal, expectoración, aumento de las secreciones orofaríngeas, dolor faríngeo persistente y asfixia, donde se identificaron larvas del género *Pseudoterranova* como agentes causales, luego de ser expulsadas por las pacientes e identificadas mediante taxonomía. La forma más prevalente encontrada es la anisakidosis gastrointestinal, con un total de 42 reportes (5,7,31,42,48,61,121,135–140), presentándose en sus formas orofaríngea, gástrica, intestinal y gastrointestinal, siendo la forma orofaríngea la presentada en 29 casos.

Se han reportado cuatro casos asintomáticos con expulsión de larva por cavidad oral, y pacientes sintomáticos, con cuadros clínicos que variaron de acuerdo con la porción del tracto gastrointestinal que se veía afectada por la larva, siendo los más prevalentes la tos, el dolor u hormigueo faríngeo, el dolor epigástrico agudo (pirosis), las náuseas y los cólicos abdominales. La evolución de los pacientes estuvo entre 36 horas hasta 15 días postingesta. En 38 reportes de caso, se encontró una infección por una única larva, la cual fue identificada como *P. decipiens* en sus estadíos larvarios L3 y L4, las cuales fueron extraídas por endoscopia y observadas luego de un proceso de aclaramiento/diafanización para su identificación taxonómica; sin embargo, se conoce el diagnóstico molecular por DNeas y Blood and Tissue Kit, realizado por Weitzel *et al.*, quienes identificaron entre el 2012 y 2014 a *Pseudoterrava cattani* como agente causal de anisakidosis gastrointestinal, en su forma orofaríngea, en cinco pacientes provenientes de Chile (135).

Existen además dos estudios en los que se reportó la respuesta alérgica a alérgenos de *A. simplex* (64,141), en 114 niños venezolanos entre seis y doce años, escolarizados, procedentes de una región en la que reportó infestación de peces de consumo humano por anisákidos, se encontró una positividad frente a una prueba cutánea con extractos de *A. simplex* (ALK-BELLO) en el 45% de los niños, de los cuales el 97% presentaba antecedentes de enfermedad alérgica respiratoria, como rinitis, o diagnóstico de asma por espirometría, siendo esto estadísticamente significativo respecto a los niños cuya prueba cutánea no fue positiva. Por otro lado, en Brasil, en un grupo de 67 adultos procedentes de una región costera, entre los 21 y 57 años se reportó una presencia de síntomas alérgicos en el 56.9%, de los cuales lo más representativos eran los de carácter gastrointestinal o respiratorio; de los pacientes con síntomas alérgicos 13.4% fueron seropositivos para anticuerpos IgE contra alérgenos somáticos y de excreción secreción (ES) de *A. simplex*, hallándose una asociación entre la seropositividad y la mayor frecuencia de consumo de pescado.

Tabla 3. Casos clínicos asociados a nematodos anisákidos en países de América del Sur.

No	Año	País	Paciente	Alimento ingerido previamente	Motivo de consulta	Anisakido identificado	Cuadro clínico	Método diagnóstico	Evolución	Ref
1	1976	Chile	Sin descripción	No registra	Síntomas gastrointestinales por ingesta de cebiche- Primer caso en Chile.	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Gastrointestinal	Observación de las larvas expulsadas	Expulsión de la larva por la boca. Tratamiento antiparasitario	(5)
2	1980	Chile	Sin descripción	No registra	Síntomas gastrointestinales postconsumo de jurel	<i>Anisakis</i> sp.	Gastrointestinal	Endoscopia gástrica	No registrada	(5)
3	1980	Chile	Mujer - 35 años	No registra	Dolor esofágico. Espectoración	<i>Anisakis</i> sp.	Gastrointestinal	Observación de la larva expulsada	Espectoración de una larva. Mebendazol, con eliminación de una larva en heces	(23)
4	1985	Chile - Belgica	Hombre - 62 años	Salmón crudo	Cólicos abdominales ocho horas post ingesta. Obstrucción del intestino delgado evidenciado en radiografía. Tránsito intestinal lento, observado cinco días después con medio de contraste, con área de pliegues edematosos, transición de un yeyuno ligeramente dilatado a un íleo normal. Tres semanas más tarde era completamente normal al examen radiológico con bario	Desconocido	Intestinal	Radiografía	El tratamiento conservador redujo los calambres abdominales y los signos radiológicos de obstrucción intestinal desaparecieron	(136)
5	1993	Perú	Hombres de edad desconocida	No registra	Dolor orofaríngeo. Dos primeros casos en Perú	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	Orofaringea	Observación de la larva obtenida de cavidad oral	No registrada	(139)
6	1995	Paraguay Chile	Hombre	Cebiche	Presencia de Tos	<i>Anisakis</i> sp.	Orofaringea	Identificación de la larva expulsada	Expulsión de la larva con un golpe de tos	(48)
7	1997	Chile	Hombre de 45 años	Pescado ahumado	Dolor epigástrico agudo y sensación de estómago vacío durante tres días	Larva L4 de <i>Pseudoterranova decipiens</i>	Gástrico	Endoscopia gástrica	El nematodo fijado a la mucosa gástrica ligeramente hiperémica en la región posterior, se extrajo directamente con una cortadora de biopsia gastroendoscópica	(67)
8	1997	Perú	Mujer de 42 años	No registra	No registra	<i>Anisakis simplex</i>	Orofaringea	Observación de la larva	No registrada	(7)

9	1997	Perú	Hombre de 22 años	Cebiche de <i>C. hippurus</i> - Perico	Dolor abdominal post ingesta de cebiche, que disminuye progresivamente y desaparece espontáneamente a los dos días	<i>Anisakis physeteris</i>	Gastrointestinal	Antecedente epidemiológico	No registrada	(31)
10	1997	Chile	Niño de 10 años	No registra	Presencia de tos	LarvaL4 de <i>Pseudoterranova decipiens</i>	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(121)
11	1997	Chile	Mujer de 51 años	No registra	Presencia de tos	LarvaL4 de <i>Pseudoterranova decipiens</i>	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral, mediante tos	(121)
12	1998	Chile	Mujer de 30 años	No registra	Presencia de tos	LarvaL4 de <i>Pseudoterranova decipiens</i>	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral, mediante tos	(121)
13	1998	Chile	Mujer de 22 años	Merluza chilena ligeramente frita	Nauseas, prurito nasal, expectoración y dolor faríngeo que persistió una semana después de la expulsión de larva, se asoció a una reacción alérgica local	LarvaL4 de <i>Pseudoterranova decipiens</i>	Gastroalérgico	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral, mediante tos, 36 h postingesta de pescado semicrudo	(121)
14	1998	Perú	Hombre de 36 años	Cebiche de <i>C. hippurus</i> - Perico	Molestia abdominal ocho horas postingesta de cebiche que progresa a un dolor epigástrico de intensidad creciente durante las primeras 24 h, acompañado de sensación de náuseas. A las 72 h los síntomas cesaron espontáneamente	<i>Anisakis physeteris</i>	Gástrico	Antecedente epidemiológico	No registrada	(31)
15	1998	Perú	Mujer de 38 años	No registra	Cuadro de una semana de evolución consistente en sensación de quemazón retroesternal y dolor tipo cólico esporádico en fosa ilíaca derecha	<i>Anisakis</i> spp.	Gástrico	Observación directa de la larva extraída por endoscopia	Extracción del parásito móvil y adherido a la mucosa gástrica, por endoscopia digestiva superior, realizada posterior a hallazgos normales en pruebas de laboratorio de rutina	(140)
16	1999	Chile	Mujer de 55 años	Sushi de congrio	Presencia de tos	Larva L4 de <i>Pseudoterranova decipiens</i>	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral, mediante tos, siete días por ingesta de sushi	(121)

17	1999	Chile	Hombre de 37 años	Cebiche	Nauseas y dolor faríngeo	LarvaL4 de <i>Pseudoterranova decipiens</i>	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral dos días postingesta	(121)
18	1999	Chile	Mujer de 26 años	No registra	Expectoración y tos	LarvaL4 de <i>Pseudoterranova decipiens</i>	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral, mediante tos	(121)
19	2000	Chile	Hombre de 38 años	Mariscal (mariscos y pescados crudos)	Cuadro de dolor epigástrico, persistente, incapacitante, que no cede al uso de analgésicos y que se presente postingesta de pescado crudo. El cuadro evoluciona hacia regurgitación del contenido gástrico, donde se encuentra larva, por lo que 12 horas más tarde el paciente consulta. El dolor epigástrico persiste, con evidencia de gastritis leve en la endoscopia de vías digestivas altas, sin úlceras o presencia de otras larvas. El dolor disminuye de intensidad con el tiempo, hasta resolver a los 15 días	<i>Anisakis</i> sp.	Gástrico	Observación de la larva obtenida de cavidad oral	Analgésicos y antihistamínicos	(137)
20	2001		Hombre de 40 años	Cebiche de pomfret	Sensación de cuerpo extraño en los dientes. Descubrió la larva al cepillarse los dientes	Nematodo anisakidos	Orofaringea	Identificación de la larva posterior a proceso de aclaramiento con lactofenol	Expulsión de la larva	(48)
21	2001	Perú	Mujer de 42 años	No registra	Desconocidos	<i>Pseudoterranova decipiens</i> L4	Orofaringea	Observación de larva extraída de cavidad bucal, inicialmente clasificada como <i>Toxocara</i> sp.	No registrada	(7)
22	2002	Perú	Mujer de 17 años	Cebiche de <i>Trachurus murphyi</i> (Jurel), <i>sarda chiliensis</i> (Bonito) y <i>Thunnus</i> sp. (Atún)	Náuseas y dolor epigástrico, acompañados de malestar general, cuatro horas post ingesta de cebiche. Una hora después presentó náuseas de mayor intensidad, con escozor en la garganta y vómito de contenido alimentario	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	Gástrico	Procesamiento de la larva expulsada en el vómito	Infusión de hierbas antes primeros síntomas. Metronidazol 500 mg/ día por tres días, ante sospecha de parasitosis intestinal	(17)
23	2002	Chile	Mujer de 54 años	Cebiche	Tos y hormigueo en la faringe, con expulsión de la larva después de anestesia general	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)

24	2002	Chile	Mujer de 19 años	Cebiche de Merluza	Eliminación de la larva posingesta de cebiche	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
25	2002	Chile	Mujer de 43 años	Pescado frito	Hormigueo faringeo, con eliminación de dos larvas por cavidad oral	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
26	2002	Chile	Hombre de 50 años	Cebiche de Merluza	Tos y hormigueo en la faringe	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
27	2002	Chile	Mujer de 33 años	Cebiche de Merluza	Eliminación pasiva de la larva, por cavidad oral, posingesta de cebiche	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
28	2003	Chile	Niño de 15 años	Cebiche de jurel	Tos fuerte, con posterior eliminación de larva por cavidad oral, postingesta de pescado frito	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
29	2003	Chile	Mujer de 26 años	Merluza chilena frita	Pirosis y vómito, con presencia de la larva	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Gástrico	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
30	2003	Chile	Mujer de 47 años	Pomfret frito	Sensación de asfixia. Aumento en la producción de secreciones orofaríngeas post eliminación de la larva	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Gastroalérgico	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
31	2003	Chile	Hombre de 6 años	Cebiche de Merluza	Hormigueo faringeo, con eliminación de dos larvas por cavidad oral	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
32	2004	Chile	Mujer de 24 años	Cebiche de Merluza	Tos fuerte, con posterior eliminación de larva por cavidad oral, postingesta de cebiche	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
33	2004	Chile	Hombre	Cebiche de Merluza	Eliminación de la larva posingesta de cebiche	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
34	2004	Chile	Mujer	Cebiche de Merluza	Eliminación de dos larvas posingesta de cebiche	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
35	2005	Chile	Nina de 1 año	No registra	Diarrea intensa, pérdida del apetito y eliminación de la larva por ano	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Instestinal	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)
36	2005	Chile	Hombre	Cebiche de corvina	Sensación de cuerpo en cavidad oral, hormigueo laríngeo y tos fuerte antes de eliminar la larva, postingesta de cebiche. Encontró la larva al cepillarse los dientes	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(48)

37	2006	Chile	Mujer de 60 años	Cebiche	Consultó a gastroenterólogo por cuadro de cinco días de evolución que inició horas después de la ingestión de cebiche, y que consistía en pirosis, malestar general, náusea persistente, distensión abdominal y flatulencia	<i>Pseudoterranova</i> sp.	Gastrointestinal	Identificación morfológica de la larva	Expulsión de la larva por cavidad oral	(142)
38	2007	Chile	Mujer de 30 años	Sushi de salmón crudo	Tos y estornudos un día después de ingerir sushi, con expulsión de la larva	<i>Pseudoterranova decipiens</i>	Orofaringea	Identificación morfológica de la larva	Desconocida	(5)
39	2012-2014	Chile	Dos mujeres y tres hombres entre los 22 y 59 años	Cebiche	Tres pacientes regurgitaron la larva después de haber consumido cebiche, sin otra sintomatología asociada. Uno de ellos, manifestó haber presentado sensación de hormigueo, náuseas y tos, antes de expulsar la larva	<i>Pseudoterranova cattani</i>	Orofaringea	Identificación morfológica y molecular (extracción del DNA con DNeasy Blood and Tissue Kit) de las larvas expulsadas	Expulsión espontánea de la larva	(135)
40										(135)
41										(135)
42										(135)

4.11. Antígenos de *Anisakis*

Un antígeno es una sustancia proteínica con la capacidad de producir la formación de anticuerpos causando una respuesta inmune mientras que un alérgeno es un antígeno capaz de producir una reacción clínica, que se traduce en una respuesta de hipersensibilidad. Los alérgenos se asocian con anticuerpos, principalmente con Inmunoglobulina E (IgE), que se encuentran previamente fijados en la superficie de mastocitos o basófilos, liberando tras la unión antígeno-anticuerpo sustancias mediadoras de la inflamación, apareciendo así los síntomas alérgicos (143). De los nematodos anisakidos, *A. simplex* ha sido identificado como la especie capaz de producir una respuesta inmunológica durante la infestación en el ser humano. Los antígenos responsables se dividen en tres categorías: antígenos de excreción secreción, antígenos somáticos y antígeno de superficie (144).

4.11.1. Antígenos somáticos

Los antígenos somáticos son las proteínas más abundantes en los nematodos, estas proteínas tienen un peso molecular entre 13 y 150 kDa (145), pueden inducir una reactividad cruzada con otros nematodos ocasionando errores de diagnóstico con falsos positivos (72). Estos antígenos se obtienen a partir del macerado de larvas del parásito completo y por tanto tiene todas las proteínas solubles. Estas proteínas participan en la vía de la gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos (145).

4.11.2. Antígenos de excreción secreción (ES)

Los antígenos de excreción secreción (ES) son sintetizados por la glándula esofágica y las células secretoras del sistema digestivo de los nematodos en el momento de la infección, ayudando a los nematodos a penetrar el tejido de sus

hospederos (35). Los anticuerpos contra estos antígenos son los primeros en ser producidos por las células del sistema inmune del hospedero. De estos antígenos se conoce que cumplen varias funciones enzimáticas, entre ellas la actividad proteolítica (78).

4.11.3. Antígenos de superficie

Estos antígenos derivan de la cutícula de los nematodos, la cual posee proteínas hidrofóbicas con alto potencial antigénico (107). Estos antígenos de superficies se expresan cuando ocurre el cambio de muda entre las larvas L3 a L4, cambio conocido como ecdisis, y pueden ser menos específicos que los antígenos somáticos o los de excreción secreción (145). Sin embargo, son considerados importantes en la respuesta inmune a largo plazo al producir un estímulo crónico, por ejemplo, en los granulomas eosinofílicos que rodean los restos cuticulares del nematodo al morir la larva tras penetrar en la pared del tracto digestivo (146).

Como respuesta a las distintas proteínas alergénicas del parásito se produce una respuesta de hipersensibilidad mediada por IgE, asociada a los productos de secreción excreción y las proteínas somáticas (78,147). Actualmente, se ha realizado el aislamiento molecular y la caracterización genética de los alérgenos de la larva L3 de *Anisakis* lo que permite tener un mejor diagnóstico de la alergia causada por este parásito (71).

Hasta la fecha se han identificado trece alérgenos de *Anisakis*, que se resumen a continuación:

Ani s 1: Es el alérgeno principal de *Anisakis*, se encuentra en la glándula secretora del nematodo y es reconocido por el 85% de sueros de pacientes con IgE específica.

Tiene 18 residuos de cisteína (Cys) que podrían formar hasta nueve enlaces disulfuro (146).

Ani s 2: Es una proteína reconocida por el 88% de los pacientes con IgE específica frente *A. simplex*, tiene un peso molecular de 97 kDa, con más del 85% de identidad con las paramiosinas de *Caenorhabditis elegans* y *Onchocerca volvulus* y más de un 30% de identidad con las paramiosinas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, y del trematodo como *Schistosoma japonicum* (148).

Ani s 3: Es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 41 kDa con un alto grado de homología con las tropomiosinas de otros nematodos como *Trichostrongylus columbriformis* (93%), *Caenorhabditis elegans* (92%), filarias como *Onchocerca volvulus* (91%), crustáceos (70%), insectos (69%) y moluscos (63-56%) (65).

Ani s 4: Es una proteína con un peso molecular aproximado de 9 kDa, se caracteriza por ser termorresistente y mantener su capacidad alergénica en condiciones extremas de calor como las utilizadas para cocinar el pescado. Estudios han demostrado que después de someter a *Ani s 4* a ebullición por más de 30 minutos o ser tratada con pepsina, conserva su capacidad alergénica. Sin embargo, es un alérgeno minoritario de *A. simplex* que es reconocido por el 27% de los pacientes con alergia, no obstante, se ha relacionado con episodios de anafilaxia y es considerado de gran importancia en el diagnóstico de anisakidosis (149).

Ani s 5: Es una proteína que se encuentra en la glándula de secreción, el ventrículo y la superficie del epitelio intestinal de los anisakidos, es termorresistente, con un peso molecular aproximado de 15 kDa. A pesar de ser reconocida por el 25% de los pacientes, es considerado un alérgeno secundario con función desconocida (150). La secuencia amino terminal de 152 aminoácidos, es homóloga a las proteínas AS16 de *Ascaris suum* y de la proteína SXP/RAL2 de *Meloidogyne incogita*.

Ani s 6: Se considera un alérgeno secundario de *A. simplex*, de bajo peso molecular (9,7 kDa), es reconocido por el 18% de los pacientes y su función es desconocida.

Ani s 7: Esta proteína es considerada el alérgeno más importante de *A. simplex*, tiene un peso molecular de 139 kDa. Es reconocido por el 100% de pacientes alérgicos, su función es desconocida y no tiene homología con alguna otra proteína descrita (151).

Ani s 8: Es un alérgeno secundario de *A. simplex*, es termorresistente con un peso aproximado de 15 kDa. Es reconocido por el 25% de los pacientes. Al igual que *Ani s 5*, pertenece a las proteínas de la familia SXP/RAL-2 y guarda homología con las proteínas AS16 y AS14 de *Ascaris suum* (152).

Ani s 9: Es un alérgeno secundario de *A. simplex*, es termo resistente con un peso de 14 kDa. Es reconocido por el 13% de los pacientes. Al igual que *Ani s 5* y *Ani s 8*, posee un 60% similitud con la proteína AS14 de *A. suum*, formando parte de la familia de proteínas de SXP/RAL-2. Su función todavía no ha sido descrita (153).

Ani s 10: Este alérgeno no presenta homología con alguna proteína descrita, tiene una secuencia de siete repeticiones casi idénticas de 29 aminoácidos cada una y su secuencia se compone de siete repeticiones casi idénticas de 29 aminoácidos cada una. Es reconocida por un total de 39% de los pacientes alérgicos a *Anisakis* (152).

Ani s 11: Es una proteína de 307 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 27 kDa. Es reconocida por el 50% de los pacientes, tiene un 45% de similitud con *Ani s 10* y su secuencia se compone de cinco a seis repeticiones cortas de 5 a 16 aminoácidos. Su función es desconocida (152).

Ani s 12: Es una proteína con una secuencia de 295 aminoácidos y peso molecular aproximado de 31 kDa. Es reconocida por el 57% de los pacientes con alergia. Su estructura está compuesta por cinco repeticiones en tándem. Reconocida por el 57% de los pacientes alérgicos. Su función es desconocida (152).

Ani s 13: Es un alérgeno mayor, siendo reconocido por un gran número (64,3%) de pacientes sensibilizados y hasta un 80,9% en pacientes con anisakiasis gastroalérgica. Su peso molecular es 37 kDa. No presenta reacción cruzada entre los epitopes de hemoglobina de *Ascaris*. La ausencia de reactividad de IgE a la hemoglobina de *Áscaris* en pacientes de *Anisakis* hace que la hemoglobina *Anisakis* (*Ani s 13*) sea una potencial candidata para desarrollar herramientas de diagnóstico más específicas (154).

4.12. Técnicas para la detección de alérgenos de *Anisakis*

La detección de alérgenos en los alimentos ha recibido mayor atención por parte de la industria y los organismos legislativos en los últimos años. Esta preocupación se ha visto traducida en la mejora de las medidas destinadas a la protección de los consumidores alérgicos.

Las actividades de vigilancia y control se basan en la disponibilidad de métodos capaces de detectar trazas de ingredientes alergénicos. El desarrollo de estos métodos se enfrenta a una multitud de retos analíticos y son diversos los enfoques técnicos que han sido diseñados para detectar la presencia de proteínas alergénicas en los productos alimenticios. La mayoría de los métodos se dirigen hacia un marcador que permita determinar la presencia del alimento responsable de la alergia. Los métodos basados en proteínas por lo general implican técnicas inmunológicas basadas en anticuerpos; mientras que los métodos basados en el ADN amplifican los fragmentos específicos de ADN mediante la reacción en cadena

de la polimerasa (PCR) en el que la especificidad se logra mediante el uso de cebadores que facilitan la amplificación de ADN procedente del alimento (66).

Se ha establecido que uno de los factores limitantes en la detección de alérgenos en alimentos en general, es la matriz alimentaria. Sin embargo, el procesamiento del alimento, las propiedades bioquímicas e inmunológicas del alérgeno y la sensibilidad del paciente son factores que también deben tenerse en cuenta.

Entre las técnicas de inmunodetección para estudios de alérgenos en alimentos, se destaca la inmunohistoquímica, la cual ha permitido la detección de *Ani s 4* en larvas y músculo de pescado sometidos a diversos tratamientos (107,110). Al tratarse de un método de detección *in situ*, permite la detección de los alérgenos inclusive cuando la estructura del músculo se encuentra modificada, tal como ocurre durante el calentamiento o la congelación prolongada (110).

4.13. Inmunodetección de anticuerpos

El *Western-blot* es una técnica utilizada para separar proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida para después ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa, donde son detectadas con anticuerpos que reconocen los antígenos que hay en ellas. La inmunodetección se puede realizar mediante anticuerpos monoclonales o policlónales (155).

Consta de tres fases, en la primera fase se separan las proteínas extraídas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, de esta manera los antígenos proteicos que se quieren utilizar para posteriormente detectarlos con anticuerpos, son separados electroforéticamente en un gel según su peso molecular. En una segunda fase, denominada *immunoblotting* o inmunotransferencia, se transfieren las proteínas que han quedado separadas en el gel de poliacrilamida a una membrana

de nitrocelulosa mediante una nueva de electroforesis. En la tercera y última fase se utiliza la membrana de nitrocelulosa para identificar los anticuerpos dirigidos contra las proteínas transferidas (122).

La inmunodetección con IgE específica ha sido propuesta como un método muy útil para la determinación de IgE específica frente a *Anisakis* (127), sin embargo, aún no se ha incorporado en la rutina de los laboratorios de alergia. Esto puede deberse a que, aunque este tipo de ensayo tiene una ventaja evidente, que es la información que aporta sobre el tipo de antígenos que reconoce cada paciente, también tiene dos limitaciones importantes, que son la disponibilidad de L3 de *A. simplex* necesarias para obtener cantidades suficientes de antígeno de excreción-secreción y los tiempos de desarrollo de la técnica (122).

4.14. Reactividad cruzada

La tropomiosina existente en *A. simplex* se ha relacionado con la reactividad cruzada que presenta este parásito con otros artrópodos como la *Blatella germanica* y el *Chironomus* spp. mediante estudios de inhibición de CAP e inhibición de inmunotransferencia. También se ha relacionado con los ácaros, en mayor medida con *Acaris siro* y *Tyrophagus putrescentiae*, con la cucaracha y las gambas (35).

En investigaciones en las que se utilizó la técnica de ELISA y la de inmunotransferencia, se ha considerado que los antígenos somáticos son los responsables de la existencia de reactividad cruzada entre el *A. simplex* y otros nematodos, como el *Ascaris suum*, *Toxocara canis*, *Hysterothylacium aduncum*, *Trichinella spiralis* y *Trichuris muris* (35).

Además, se piensa que los carbohidratos del extracto de *A. simplex* utilizado para el diagnóstico pueden ser los responsables de los falsos positivos de las pruebas

diagnósticas (35). La reactividad cruzada existente entre el antígeno de cuerpo entero del *A. simplex* con otros alérgenos, hace que sea necesaria la utilización de otros antígenos para la realización de las pruebas cutáneas y la determinación de IgE específica, con el objetivo de disminuir el número de falsos positivos (35). El tratamiento previo con periodato (sustancia que destruye las estructuras carbohidratadas) hace desaparecer una banda de peso molecular medio reconocida en inmunotransferencia de sujetos asintomáticos. Otros autores han usado anticuerpos monoclonales obteniendo los mismos resultados. Al eliminar los epítomos o-glicanos del anticuerpo monoclonal UA3, anticuerpo que reconoce dos proteínas de peso molecular de 139 y 154 kDa de *Anisakis simplex*, el problema de la reactividad cruzada desaparece en gran medida (35).

CAPITULO I

Nematodos anisakidos en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador

5. CAPITULO 1: Nematodos anisakidos en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador

5.1. INTRODUCCIÓN

La Anisakidosis es una parasitosis causada por estadios larvarios de nemátodos de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*, pertenecientes a la familia Anisakidae (Phylum: Nematoda, Clase: Chromadorea, Orden: Ascaridida, Familia: Anisakidae) (156). Aunque la diferenciación entre especies sólo puede hacerse por técnicas de biología molecular, es posible hacer distinción entre géneros mediante taxonomía clásica; para el género *Anisakis* resulta de especial utilidad la clasificación morfológica de las larvas en Tipo I o Tipo II de acuerdo a los criterios desarrollados por Shiraki en 1974 (73).

Los nematodos de la familia Anisakidae, tienen como hospederos definitivos a mamíferos marinos los cuales dispersan los huevos a través de las heces (22). En el agua se desarrollan hasta el segundo estadio larval (L2) que nada libremente y es consumido por crustáceos donde la larva muda al estadio infectivo (L3), a su vez los crustáceos pueden ser consumidos por una gran variedad de peces, cuando estos peces parasitados son ingeridos por mamíferos marinos, los anisakidos mudan hasta su forma adulta, se reproducen y comienza un nuevo ciclo (22,34,157). El hombre actúa como un hospedero accidental al consumir peces parasitados con larvas L3. La biogeografía de los hospederos intermediarios y definitivos de los anisakidos, y sus patrones de migración hacen que estos parásitos se distribuyan alrededor de todo el mundo, siendo un problema de salud pública en Europa y Japón, y una enfermedad emergente en varios países de América Latina (22), donde se conocen casos clínicos en Perú y Chile, y se cuenta con reportes de peces parasitados por anisakidos en Venezuela, Brasil, Perú, Chile y Argentina (14,16,17,20,42,101,117,130).

Si bien, en Colombia y Ecuador, no se conocen casos de anisakidosis en seres humanos, se ha reportado la presencia de larvas de anisakidos parasitando peces de la bahía de Cartagena en Colombia y larvas del género *Contracaecum* parasitando peces de aguas continentales (55,54,103).

Por lo anterior, el objetivo de este capítulo fue determinar la presencia de nematodos anisakidos en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador, realizando la identificación por taxonómica clásica complementada por técnica histoquímica, y calcular el porcentaje de infección.

5.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de nematodos anisakidos en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador

5.2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

5.2.2. Identificar nematodos anisakidos en peces de consumo adquiridos en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador

5.2.3. Conocer el porcentaje de infeccion de los anisakidos presentes en los hospederos seleccionados

5.3. HIPOTESIS

Los parásitos anisakidos están presentes en peces de consumo del Pacífico colombiano – ecuatoriano

5.4. MATERIALES Y METODOS

5.4.1. Área de estudio

Durante los meses de marzo y diciembre del 2015, se colectaron las especies de peces de importancia económica y comercial en los siguientes puertos pesqueros (Figura 9):

Pacífico ecuatoriano: Manta ($0^{\circ}57'00''\text{S } 80^{\circ}42'58''\text{O}$) y Santa Rosa ($3^{\circ}27'08''\text{S } 79^{\circ}57'42''\text{O}$). Estos puertos concentran una captura de 23.000 toneladas de pesca al año.

Pacífico colombiano: Buenaventura ($3^{\circ}52'38''\text{N } 77^{\circ}01'36''\text{O}$) y Tumaco ($1^{\circ}48'24''\text{N } 78^{\circ}45'53''\text{O}$), principales puertos del Litoral Pacífico donde el 53.89% de las capturas proviene de la pesca artesanal y el 46.11% de pesca industrial, las cuales aportaron entre 1998 y 2013, 1.099.568 toneladas de pesca (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2014)



Figura 9. Localización de los sitios de muestreo en la costa Pacífica de Colombia (Buenaventura y Tumaco) y Ecuador (Manta y Santa Rosa)

5.4.2. Muestreos

Las muestras fueron colectadas en centros de acopio, puntos de venta o suministradas por pescadores de la región según la disponibilidad e importancia económica. En Colombia, se contó con el apoyo de E.AT. (Asesorías pesqueras del Programa de Observadores Pesqueros de Colombia) (Anexo 1).

Es importante recordar que las localidades de muestreo en Ecuador fueron incluidas por las siguientes razones: El puerto de Buenaventura en el Pacífico colombiano, a pesar de ser el más importante en el país, carece de industrias pesqueras, emparadoras y comercializadoras, por lo que la mayoría de las embarcaciones que pescan en zonas marítimas de Colombia realizan el desembarco de sus capturas en diferentes puertos del Ecuador. Tanto en Tumaco como en Buenaventura, los problemas de orden público fueron una gran limitante para realizar los muestreos, por lo que la cercanía con las localidades seleccionadas en Ecuador brindó la información necesaria para cumplir los objetivos, sobre todo si se tiene en cuenta que una parte de la captura desembarcada en estas localidades ecuatorianas prodece y se exporta a Colombia.

Las muestras fueron almacenadas en bolsas individuales, etiquetadas y conservadas en una nevera con hielo hasta su transporte al laboratorio. Para la revisión parasitológica las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Recursos Marinos del Departamento Central de Investigaciones de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí en Manta, Ecuador (Anexo 2: Permiso de colecta de la ULEAM), y al Laboratorio de Histología en la Facultad de Salud de la Universidad del Valle en Cali, Colombia.

En muchos casos no se tuvo acceso a la musculatura de las muestras, por su valor económico, y por tanto el estudio se centró en la identificación de anisakidos en vísceras. Los órganos, se colocaron en cajas de Petri con agua destilada. Los nematodos fueron fijados en formalina caliente al 4% (v/v) e inmediatamente

transferidos a alcohol 70% (v/v) hasta su identificación por taxonomía. Una submuestra fue almacenada directamente en alcohol 95% (v/v) para la posterior identificación por biología molecular (Capítulo 2).

5.4.3. Identificación morfológica de los nematodos

En el laboratorio los órganos se revisaron con ayuda de un microscopio estereoscopio, previa disección con ayuda de tijeras y pinzas y colocándolos en cajas de Petri con solución salina 0.9% para visualizar la presencia de larvas de anisakidos.

Los nematodos fueron aclarados en soluciones graduales de glicerina (108). La observación de las estructuras internas se realizó bajo un microscopio óptico con cámara clara incorporada (Leica DM750). Se identificaron los nematodos de la Familia Anisakidae hasta nivel genérico, teniendo en cuenta las características descritas por Shiraki (1974), se tomaron imágenes en aumentos de 40x, 100x y 400x (Application Suite LAS v 3.8).

Las larvas observadas en los órganos de los peces, fueron colectadas en su totalidad y preservadas en tubos eppendorf con etanol 70% hasta su identificación por características morfológicas, algunos ejemplares fueron preservados en etanol 96% para su identificación por técnicas de biología molecular.

5.4.4. Procesamiento histológico

Muestra: Nematodos aislados de peces, fijados en formalina caliente al 4% (cuando el parásito estaba vivo) y almacenados en alcohol 70%. A los parásitos muertos no se les realizó el paso por formalina caliente.

Los nemátodos anisakidos fueron cortados en secciones transversales e incluidos en parafina siguiendo el protocolo de Rodríguez (158), (Tabla 4). La inclusión se realizó en parafina en un molde metálico, para iniciar el proceso, la muestra fue

colocada en el tanque de tejido a una temperatura de 56°C. Los bloques fueron perfilados formando un trapecio, con la parte más angosta hacia la zona biselada del bloque. El baño María se preparo una hora antes de iniciar el proceso de corte. El agua se calentó a aproximadamente 80°C y se le adicionaron 2g de gelatina, la solución fue homogenizada, la temperatura de trabajo fue 55°C. Para realizar los cortes, la cuchilla del micrótopo fue limpiada con xilol y posteriormente con alcohol al 70%. Antes del corte, los bloques se colocaron en frio para que el tejido se cortara con mayor facilidad. Se realizaron cortes a 5 µm de grosor utilizando un micrótopo Leica RM 2245, se colocaron al baño María (55°C) para estirar la muestra y posteriormente sobre un portaobjeto, se retiraron lentamente del agua, se secaron y rotularon. Los portaobjetos fueron puestos en canastillas metálicas y llevadas al horno a 37 °C por un mínimo de 24 horas para fijar los cortes al portaobjetos antes de la coloración (Anexo 3: POE Procesamiento histológico).

Las muestras fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina (Tabla 5) y se montaron con Consult Mount (Shandon) soluble en xilol para su posterior caracterización.

Tabla 4. Batería de deshidratación

Reactivo	Tiempo
1. Alcohol 70% I	30 minutos
2. Alcohol 80% I	30 minutos
3. Alcohol 80% II	30 minutos
4. Alcohol 95% I	30 minutos
5. Alcohol 95% II	30 minutos
6. Alcohol absoluto I	1 hora
7. Alcohol absoluto II	1 hora
8. Xilol I	1 hora
9. Xilol II	1 hora
10. Parafina líquida en estufa 57°C	Overnigh

Fuente: Protocolo de Rodrigues (2010) (158)

Tabla 5. Protocolo de coloración de Hematoxilina-Eosina

Reactivo	Tiempo
1. Xilol I	5 minutos
2. Xilol II	5 minutos
3. Alcohol 95%	2 minutos
4. Alcohol 80%	2 minutos
5. Alcohol 70%	1 minutos
6. Agua corriente	1 tip
7. Hematoxilina	30 segundos
8. Agua corriente	15 minutos
9. Alcohol acido	1 tip
10. Agua	3 min
11. Carbonato de litio	1 tip
12. Agua	3 min
13. Eosina	1 minutos
14. Alcohol 70%	1 tip
15. Alcohol 80%	1 minuto
16. Alcohol 90%	1 minuto
17. Alcohol absoluto I	5 minutos
18. Alcohol absoluto II	5 minutos
19. Xilol I	5 minutos
20. Xilol II	5 minutos

Fuente: Protocolo modificado de Rodrigues (2010) (158). El término “tip” se refiere a sumergir y sacar de manera inmediata la muestra de la solución.

Los cortes permanecieron sumergidos en xilol hasta que se realizó el montaje con el cubreobjetos.

Posteriormente, se cálculo el porcentaje de infección de nematodos anisakidos por cada especie de pez parasitado, y la abundancia media: Número total de individuos de una especie particular de parásito dividido entre el número total de hospederos examinados de una determinada especie (infectados y no infectados).

La identificación morfológica de las larvas tipo I y II del género *Anisakis* (Tabla 1), se realizó teniendo en cuenta las características descritas por Shiraki (1974)(82).

5.4.5. Consideraciones éticas

En Colombia, este estudio se llevó a cabo en plena conformidad del permiso marco de recolección de especímenes de especies silvestres de diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial otorgado por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible mediante resolución 1070 del 28 de agosto de 2015 a la Universidad del Valle. Además, de la aprobación (Código #004-015) del Comité Institucional de Revisión de Ética Animal, Facultad de Salud, Universidad del Valle (Anexo 4).

En Ecuador, el muestreo se realizó con el apoyo de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí y el proyecto “Biodiversidad y estructura de la comunidad de parásitos metazoarios de peces marinos de importancia económica de Ecuador” con autorización científica # 011 JMC-DPAM-MAE (Anexo 2). Para las empresas de pesca industrial (planta empacadora) que permitieron realizar el muestreo, se reserva el nombre de la institución, bajo el principio de confidencialidad el cual impone la más estricta reserva de la información.

5.5. RESULTADOS

Se colectaron un total de 438 peces de consumo agrupados en veinte especies, de las cuales ocho se encontraron parasitadas por nematodos anisakidos, *Auxis rochei* (Auxis), *Centropomus armatus* (Gualajo), *Coryphaena hippurus* (Dorado), *Katsuwonus pelamis* (Atún, bonito barrilete), *Larimus argenteus* (Cajero), *Merluccius gayi* (Merluza), *Mugil cephalus* (Lisa) y *Mugil curema* (Lisa), con un porcentaje de infección entre el 18 y el 100%, y una abundancia media entre 0.4 y 45.5 como se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de infección y abundancia media de nematodos anisakidos aislados de peces de consumo de los puertos pesqueros en Colombia y Ecuador. *Planta empacadora, se reserva el nombre la institución bajo el principio de confidencialidad.

No	Nombre científico	Nombre común	País	Localidad	n	Porcentaje de infección (%)	Abundancia
		Botella	Ecuador	Manta	6	50	0,5
1	<i>Auxis rochei</i>		Ecuador	Santa Rosa	29	28	0,4
2	<i>Bagre pinnimaculatus</i>	Alguacil	Colombia	Buenaventura	6	0	0,0
3	<i>Brotula clarkae</i>	Corvina de roca	Ecuador	Manta	5	0	0,0
4	<i>Caranx caballus</i>	Caballita	Ecuador	Manta	7	0	0,0
5	<i>Centropomus armatus</i>	Gualajo	Colombia	Buenaventura	12	42	2,8
6	<i>Centropomus medius</i>	Robalo machetajo	Colombia	Buenaventura	4	0	0,0
7	<i>Coryphaena hippurus</i>	Dorado	Ecuador	Manta	69	30	5,6
8	<i>Cynoscion phoxocephalus</i>	Pelada blanca	Colombia	Buenaventura	9	0	0,0
9	<i>Cynoscion sp.</i>	Corvina	Ecuador	Manta	3	0	0,0
10	<i>Diplectrum maximun</i>	Camotillo	Ecuador	Manta	8	0	0,0
11	<i>Epinephelu sacanthistius</i>	Colorado	Ecuador	Manta	1	0	0,0
12	<i>Fistularia corneta</i>	Guaba	Ecuador	Manta	8	0	0,0
13	<i>Katsuwonus pelamis</i>	Atún - Bonito barrilete	Ecuador	Manta	2	50	4,0

				Manta (empresa			
			Ecuador	empacadora	98	31	0,7
				anónima)			
14	<i>Larimus argenteus</i>	Cajero	Colombia	Buenaventura	2	100	45,5
15	<i>Lutjanus guttatus</i>	Pargo lunarejo	Colombia	Buenaventura	3	0	0,0
16	<i>Macrodon mordax</i>	Pelada amarilla	Colombia	Buenaventura	7	0	0,0
		Merluza	Ecuador	Manta	62	92	9,1
17	<i>Merluccius gayi</i>		Ecuador	Santa Rosa	11	18	0,2
18	<i>Mugil cephalus</i>	Lisa	Colombia	Buenaventura	12	33	0,4
19	<i>Mugil curema</i>	Lisa	Colombia	Tumaco	16	94	21,8
		Atún - Aleta amarilla	Ecuador	Manta	7	0	0,0
20	<i>Thunnus albacares</i>		Ecuador	*Planta empacadora	51	0	0,0
				Total	438		



Figura 10. Muestreos realizados en la costa del Pacífico ecuatoriano en compañía de los estudiantes de Biología Pesquera de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí **A.** Muestreo en el puerto pesquero de Manta. **B.** Muestreo de *Brotula clarkae* (corvina de roca). **C.** Muestreo de *Katsuwonus pelamis* (atún, bonito barrilete). **D.** Muestreo en planta empacadora **E.** *Caranx caballus* (caballita).

Los nematodos fueron aislados principalmente de intestino (Figura 11) las características morfológicas permitieron la identificación de los géneros *Anisakis* y *Contracaecum*, ambos de la Familia Anisakidae, siendo el género *Anisakis* con un 90% el más representativo, en la tabla 7 se presenta la localización de las larvas de

anisakidos en cada uno de los hospederos parasitados y en la tabla 8 la identificación morfológica de larvas de la Familia Anisakidae con los hospederos identificados para el Pacífico colombiano y ecuatoriano.

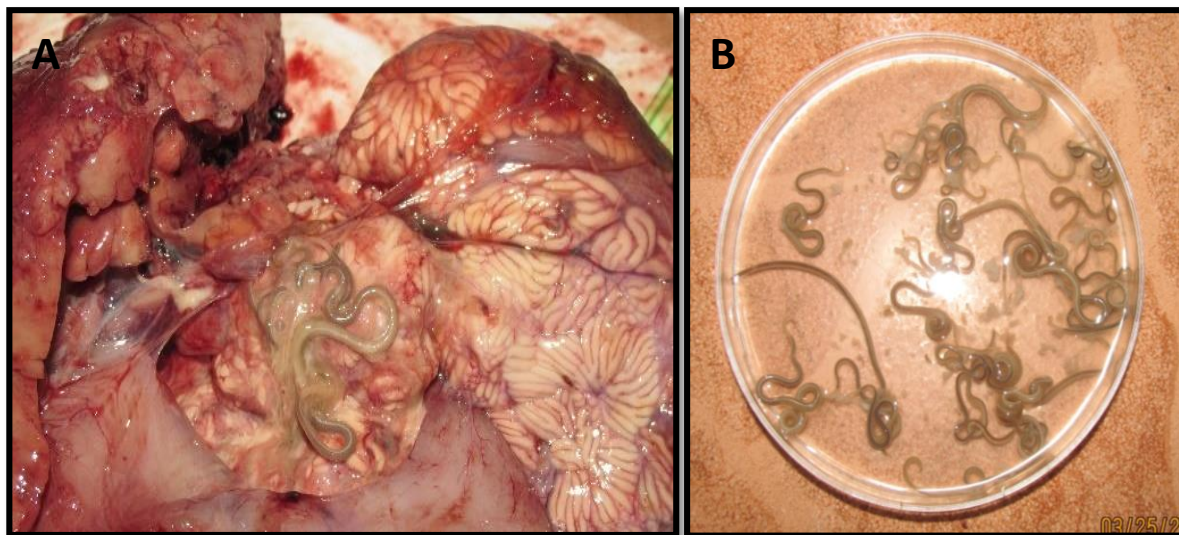


Figura 11. A. Presencia de larvas de nematodos en mesenterio del pez dorado *C. hippurus*. B. Larvas de nematodos aislados del pez *C. hippurus*.

Tabla 7. Localización de las larvas de anisakidos en cada uno de los hospederos parasitados

No	Hospedero	Localización de las larvas (%)			
		Mesenterio	Estómago	Intestino	Hígado
1	<i>Auxis rochei</i>	45	27	27	27
2	<i>Centropomus armatus</i>	0	0	100	0
3	<i>Coryphaena hippurus</i>	14	67	19	5
4	<i>Katsuwonus Pelamis</i>	16	71	19	0
5	<i>Larimus argenteus</i>	0	0	100	0
6	<i>Merluccius gayi</i>	32	54	29	31
7	<i>Mugil cephalus</i>	25	0	75	0
8	<i>Mugil curema</i>	21	7	86	7

Tabla 8. Identificación morfológica de larvas de la Familia Anisakidae y sus hospederos en el Pacífico colombiano y ecuatoriano. *Planta empacadora, se reserva el nombre la institución bajo el principio de confidencialidad.

Hospedero	Procedencia		Identificación Morfológica
Nombre científico	País	Localidad	
<i>Auxis rochei</i>	Ecuador	Santa Rosa	<i>Anisakis</i> spp.
<i>Centropomus armatus</i>	Colombia	Buenaventura	Familia Anisakidae
<i>Coryphaena hippurus</i>	Ecuador	Manta	<i>Anisakis</i> spp.
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Ecuador	*Manta - (planta empacadora)	<i>Anisakis</i> spp.
<i>Larimus argenteus</i>	Colombia	Buenaventura	Familia Anisakidae
<i>Merluccius gayi</i>	Ecuador	Manta	Familia Anisakidae
<i>Mugil cephalus</i>	Colombia	Buenaventura	<i>Anisakis</i> spp.
<i>Mugil curema</i>	Colombia	Tumaco	<i>Contracaecum</i> sp.

Al microscopio óptico se lograron identificar las larvas tipo I (Figura 12) y tipo II (Figura 13) del género *Anisakis*. Las larvas tipo I caracterizadas por un extremo posterior redondeado y con presencia de un mucrón (Figura 12c y 12d), mientras las larvas tipo II mostraron una terminación cónica con ausencia de mucrón (Figura 13c y 13d).

Las larvas presentaron características propias del género *Anisakis*, como el color blanquecino, con estrías transversales cuticulares a lo largo de todo el cuerpo, siendo más pronunciadas en el extremo posterior (Figura 12b, 13c y 13d), con una boca bien formada, compuesta por tres labios rodeando el diente cuticular (Figura 12a y 13a), el ventrículo se observó alargado con una unión directa al intestino y organización recta a lo largo del eje longitudinal del nematodo (Figura 12b y 13b).

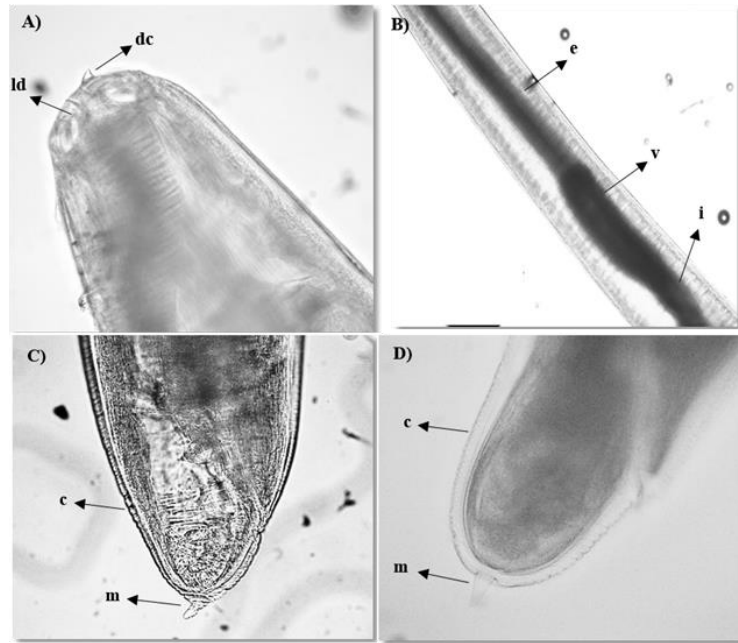


Figura 12. Larva (L3) tipo I de *Anisakis* sp. **A.** Extremo anterior, dc: diente cuticular, ld: labio dorsal (40x). **B.** Parte media, e: esófago, v: ventrículo, i: intestino (20x). **C y D.** Extremo posterior, m: mucrón, c: cutícula (40x).

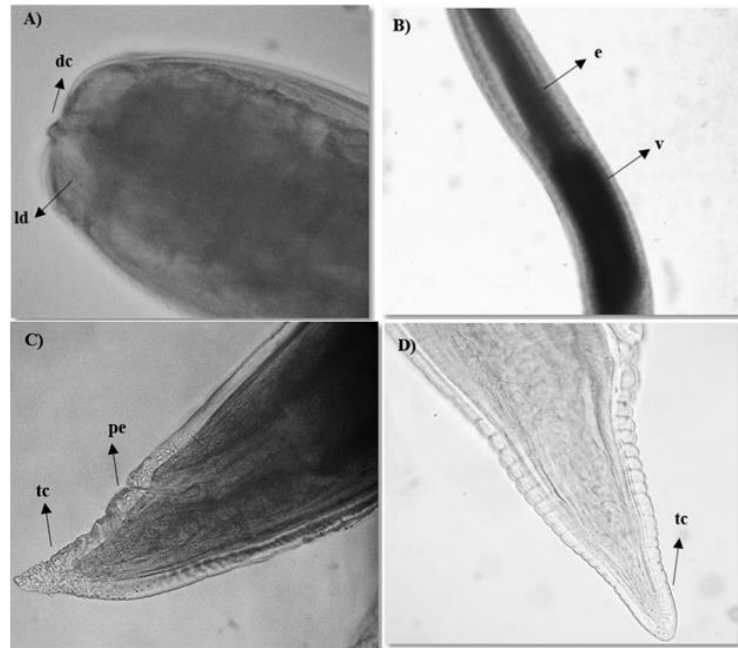


Figura 13. Larva (L3) tipo II de *Anisakis* sp. **A.** Extremo anterior, dc: diente cuticular, ld: labio dorsal (40x). **B.** Parte media, e: esófago, v: ventrículo (20x). **C y D.** Extremo posterior, m: mucrón, tc: terminación cónica, pe: poro anal (40x).

Identificación histoquímica para la diferenciación de estructuras anatómicas

Los cortes realizados a nivel de intestino, permitieron observar la simetría bilateral, lumen intestinal en forma de ranura (Figura 14a), y la organización estructural de la cutícula, la hipodermis y la capa muscular. En el corte longitudinal se observó la cutícula, característica principal de los nematodos, y el intestino (Figura 14c y 14d).

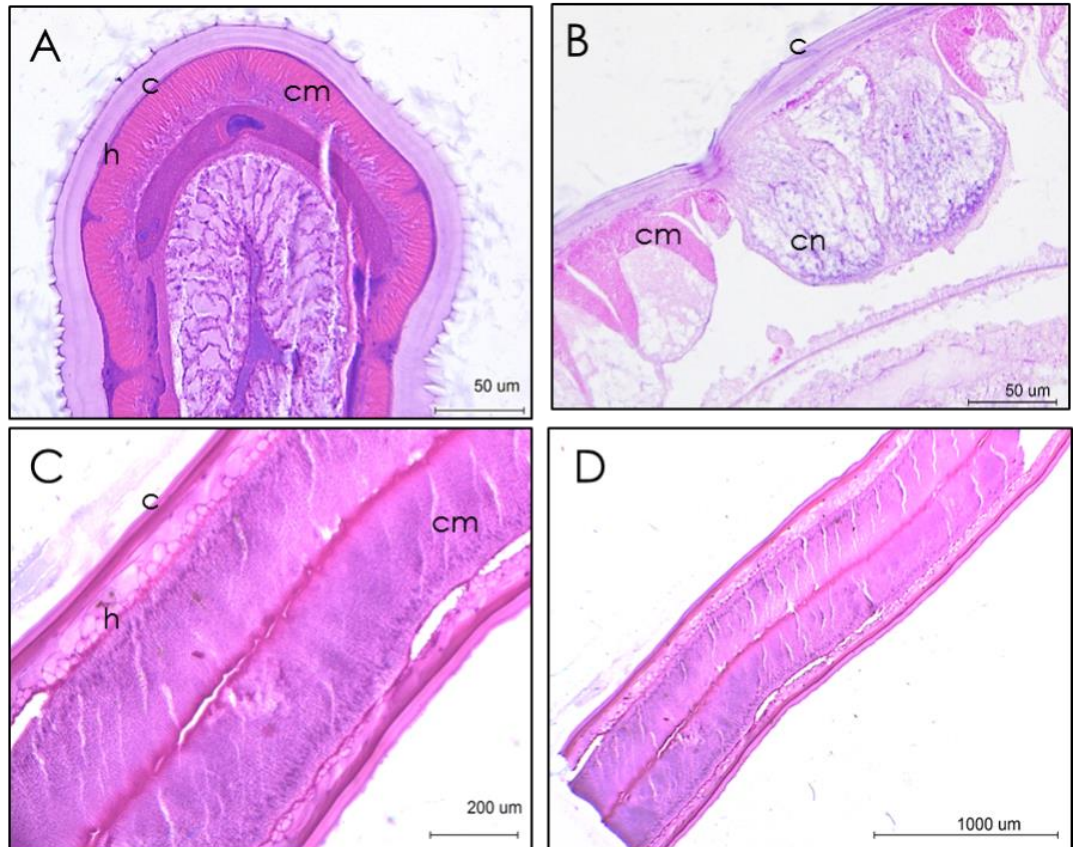


Figura 14. Secciones de larvas (L3) de nemátodos anisákidos. H.E. **A.** y **B.** Cortes transversales – 40X, **C.** 40X, **D.** Cortes longitudinales- 10X c. cutícula, h. hipodermis, cm. capa muscular, cn. cordón nervioso.

5.6. DISCUSIÓN

Este estudio comprueba la presencia de nematodos anisakidos en peces de consumo humano que habitan en aguas del Océano Pacífico ecuatoriano y colombiano; los peces presentaron un alto porcentaje de parasitación por el género *Anisakis* spp., el principal agente causal de la anisakidosis alérgica (38,70), estos resultados coinciden con algunos reportes para países de América del Sur como Brasil y Chile, y difieren de las investigaciones realizadas en Argentina, donde los reportes corresponden principalmente al género *Contracaecum* sp., al igual que en Venezuela, donde además se ha registrado el género *Pseudoterranova* parasitando principalmente peces de la familia de los Mugilidos (1), mientras tanto, en Colombia se ha reportado *Contracaecum* en peces del Mar Caribe y aguas continentales (34), y en Ecuador, Lourdes Ulloa (2008), reportó este mismo género en los peces *Mugil cephalus* (lisa), *Hoplias microlepis* (guanchiche), *Hexanematichthys* sp. (bagre pintado) y *Oreochromis niloticus* (tilapia) (57).

La identificación de las larvas de tercer estadio (L3) se realizó basado en las características estructurales del ventrículo y la forma de la porción terminal de las larvas (82), lo que permitió identificar larvas tipo I y tipo II de *Anisakis*. En la actualidad, las distintas especies del género *Anisakis* están incluidas en estos dos grupos (Tipo I y II) en función de su morfología, los aspectos ecológicos, la distribución geográfica de los hospederos y el potencial patogénico (67), por lo que el hallazgo de estos dos morfotipos en una misma área geográfica aporta información importante sobre la distribución de estas especies. Del género *Anisakis* se conocen nueve especies (73), agrupadas en dos clados, el clado I que agrupa las especies: *A. typica*, *A. simplex* s.s, *A. pegreffi*, *A. simplex* C, *A. ziphidarum* y *A. nascetti*, y el clado II que agrupa a las especies: *A. physeteris*, *A. brevispiculata* y *A. paggine* (72), siendo las especies agrupadas en el clado I (morfotipo I) las que se han visto involucradas en casos de anisakidosis alérgica; este estudio identificó los dos morfotipos de *Anisakis*, por lo tanto estos resultados son de gran importancia

para la salud pública, como indicador de una posible enfermedad emergente en Colombia y Ecuador.

Respecto a los hospederos identificados, como la merluza (*M. gayi*), el gualajo (*C. armatus*) y la lisa (*Mugil* sp.) se puede establecer que la parasitación está relacionada con las características ecológicas y alimentarias de estas especies, las cuales tienen una amplia distribución geográfica que se extiende en el Océano Pacífico desde la costa de California en los Estados Unidos hasta el sur de Chile; la infección con anisakidos podría estar relacionada con los hábitos alimentarios. Estas especies habitan en aguas costeras y estuarinas, y según su tipo de alimentación varios autores las han clasificado en detritívoros, iliófagos, vegetarianos, omnívoros, fitófagos y zoopláctofagos (159), comportamientos alimentarios que favorecen las infecciones parasitarias (1).

En los últimos años estas especies han registrado altos índices de captura por pesca artesanal y constituyen una de las principales bases de fuente proteica (160), siendo especies de importancia económica en la costa Pacífica (55). La identificación de estas especies de peces parasitados por *Anisakis* se puede utilizar para elaborar medidas de control y prevención frente a la anisakidosis humana en Ecuador y Colombia donde se puede catalogar como una posible enfermedad emergente, que, aunque de fácil manejo debe ser atendida.

Se reporta la localización de las larvas parasitando el mesenterio, el estómago, el intestino y el hígado, interpretando que estos resultados están relacionados con el tiempo transcurrido entre la captura de los peces y la revisión parasitológica, la mayoría de los peces fueron revisados en fresco y aquellos procedentes de pesca industrial fueron congelados poco tiempo después de la captura, y se sabe que las larvas de los anisakidos requieren de un tiempo mínimo de treinta minutos para migrar del sistema digestivo del pez hacia el músculo (87), estos datos son similares a estudios realizados en países europeos, donde la merluza tiene un alto valor

comercial y donde se han identificado varias especies de *Anisakis* en vísceras y músculo (87). Estos hallazgos pueden ser de interés económico en Ecuador y Colombia, ya que permite conocer una posible ubicación de las larvas para su eliminación y así ofrecer una mejor imagen sanitaria de los peces capturados en aguas marítimas de estos países.

Utilizar técnica histoquímica básica con tinción de Hematoxilina- Eosina permitió complementar el reconocimiento de los parásitos por medio del análisis de las estructuras internas, tales como cordones nerviosos, capa muscular con su porción contráctil y no contráctil y el intestino; ya autores como Mercado, Zuloaga, Zullo y colaboradores reportaron la identificación del intestino de manera similar a este estudio (161–163). De igual manera, Olivero y col., lograron describir a partir de esta misma técnica, nematodos anisákidos ocasionando lesiones histopatológicas y reacción inflamatoria en el tejido hepático del pez lisa capturado en la ciénaga del Totumo, en el Caribe colombiano (17).

Aunque el diagnóstico de anisakidosis suele realizarse mediante endoscopia, en ocasiones se requiere la identificación morfológica del parásito por histoquímica, pues éste puede estar enquistado en intestino y la infección crónica puede complicarse con granulomas los cuales algunas veces se confunden con neoplasias, por otro lado, *A. simplex* es capaz de penetrar la pared intestinal y entrar a cavidad abdominal por lo se aloja en cualquiera de los órganos que la ocupan, como hígado, páncreas, ovario, e inclusive cavidad pleural; autores como Chopra et al. en 2016 reportaron el caso de un paciente de once años con clínica similar a apendicitis causada por peritonitis focal, en el cual el diagnóstico se realizó mediante la identificación del nematodo en corte transversal de un granuloma eosinofílico omental (164). Amir y col., en 2016 reportaron el caso de un paciente con disentería debida a lesión de la mucosa del colon por *Anisakis* sp. Los médicos identificaron el nemátodo mediante taxonomía clásica y confirmaron el diagnóstico de anisakiasis mediante histoquímica al observar la estructura de los cordones nerviosos laterales característica del género (113). En el estudio realizado por Couture y col en 2003

(15) de anisakiosis intestinal asociado al consumo de salmón crudo del Océano Pacífico, la evaluación de un segmento de yeyuno permitió observar edema mucoso y un absceso submucoso con marcada respuesta eosinofílica alrededor de un parásito en tercera etapa larval de *Anisakis* sp. Las características morfológicas diagnósticas correspondieron a una glándula excretora (célula de renette), cuerdas epidérmicas laterales en forma de “Y”, ausencia de un sistema reproductor aparente y un ventrículo (esófago glandular), características que coinciden con la descripción del presente trabajo. Además, es importante mencionar que en nuestro entorno la parasitación por el nematodo *Ascaris lumbricoide*, es común, este nematodo pertenece al mismo orden taxonómico de *Anisakis*, por lo que comparten algunas características morfológicas que pueden confundirlos y generar un mal diagnóstico cuando el personal de salud no está bien entrenado. Por lo tanto, tener en cuenta la descripción histológica realizada en este trabajo y la ausencia de ala lateral a lo largo del parásito, puede ayudar a diferenciar la infección de *Anisakis* de *Ascaris*, de ahí que la identificación por histoquímica contribuye de manera significativa al diagnóstico diferencial.

5.7. CONCLUSIONES

Se confirma la presencia de nematodos de los géneros *Anisakis* y *Pseudoteranova* en peces de consumo del Pacífico de Ecuador y Colombia. Siendo el primer registro para estos países, ampliando así el rango de distribución de estos parásitos.

Los peces muestreados presentaron porcentajes de infección hasta del 100%, por lo tanto, esta investigación entrega resultados importantes que pueden ser usados para orientar políticas públicas del sector pesquero, de seguridad alimentaria y de salud, frente a una posible enfermedad zoonótica emergente.

5.8. RECOMENDACIONES

Ampliar el estudio de anisakidos a otras especies de consumo, así mismo establecer un método de muestreo que permita ampliar la muestra poblacional y de esta forma establecer con más certeza la prevalencia de estos parásitos en peces de consumo.

Se requiere de manera urgente establecer protocolos que orienten al personal de salud y los sectores sociales involucrados sobre la anisakidosis, sus consecuencias y formas de diagnóstico y prevención.

CAPITULO 2

Identificación molecular de las especies de anisakidos aislados de peces de consumo obtenidos en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador

6. CAPITULO 2: Identificación molecular de las especies de anisakidos aislados de peces de consumo obtenidos en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador

6.1. INTRODUCCIÓN

De las especies que conforman la familia Anisakidae, *A. simplex* es la especie que cuenta con el mayor número de registros de anisakiasis humana, causando cuadros digestivos y alérgicos (151). Actualmente, varias investigaciones han reportado que *A. simplex* no es una sola especie, sino un complejo de tres especies hermanas, *A. simplex* sensu stricto, *A. simplex* C y *A. pegreffii*, sin diferencias morfológicas, por lo que es necesario para su identificación un diagnóstico diferencial de ADN. Siendo, *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* las que más se extienden en área geográfica y número de hospederos (87).

Las larvas de anisákidos que se obtienen de pacientes, son identificadas con base a su morfología. Sin embargo, es muy difícil identificar a los nematodos que han sido parcialmente destruidos o carecen de características morfológicas necesarias para la identificación. No obstante, la identificación morfológica solo permite el reconocimiento de las larvas a nivel genérico, dejando en duda la especie que ocasiona la anisakidosis. Por lo tanto, el diagnóstico diferencial y la identificación a nivel de especies solo se realiza utilizando técnicas de biología molecular, la cual es necesaria para la identificación definitiva de los anisakidos obtenidos en la clínica.

Las especies de anisakidos asociadas a casos humanos, son con mayor frecuencia *A. simplex* asociado a cuadros grástricos y alérgicos, y *P. decipiens*, causando afecciones gastrointestinales.

En el primer capítulo de esta tesis, la caracterización morfológica permitió la identificación de los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova*, parasitando peces de consumo que habitan en aguas del Pacífico en Ecuador y Colombia, zonas geográficas sin reportes de estos parásitos hasta la fecha. Este segundo capítulo, se diseñó con el objetivo de identificar a nivel de especie los nematodos anisakidos.

Para la identificación de las especies de anisakidos, se han desarrollado varios métodos tales como PCR-RFLP, la secuencia del gen rRNA o ADN mitocondrial. Además, del uso de la técnica de RFLP de las ITS y la subunidad 5.8 del gen rRNA, se ha utilizado con éxito para la identificación de especies hermanas de *A. simplex*. No obstante, estas técnicas requieren de equipo altamente especializado y de materiales y reactivos de alto costo. Por lo tanto, para alcanzar el objetivo se implementó la PCR multiplex propuesta por Umehara et al., (2008)(165) para el diagnóstico diferencial de los nematodos anisakidos como una alternativa a los métodos convencionales.

6.2. OBJETIVO GENERAL

Identificar las especies de anisakidos presentes en peces de consumo comercializados en puertos pesqueros de Colombia y Ecuador

6.3. OBJETIVO ESPECIFICO

- 6.3.1.** Identificar a nivel de especie los anisakidos aislados de peces de consumo
- 6.3.2.** Comparar los resultados de identificación obtenidos por taxonomía clásica y biología molecular

6.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la identificación a nivel de especie de las larvas de anisakidos previamente identificadas por morfología en el primer capítulo de la presente investigación, se realizó el protocolo descrito por Umehara et al. (2008)(165).

El protocolo fue desarrollado en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, con la asesoría del parasitólogo, el Dr. Rubén Mercado.

6.4.1. Extracción de ADN

Se procesaron 38 nematodos anisakidos en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Las larvas fueron cortadas en tres piezas y se realizó la extracción individual de cada parte media de los nematodos utilizando el un kit para extracción de ADN genómico (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se eluyó en tampón de elución y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

6.4.2. Cebadores

Se utilizaron cebadores específicos para seis especies de anisakidos: *Anisakis physeteris* (Baylis, 1923), *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe,1878), *Anisakis simplex* sensu stricto (Rudolphi, 1809), *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802), *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) y *Anisakis pegreffii* (Campana-Rouget & Biocca,1955) (Integrated DNA Technologies) diseñados por Umehara y col. (165).

6.4.3. Identificación por PCR multiplex

Se realizó una PCR multiplex, utilizando seis cebadores específicos y un cebador universal siguiendo la metodología descrita por Umehara y col. (165). Siendo el volumen final de reacción 25ul: agua (9,38 ul) buffer 10x (2,5 ul) (HotMaster™ Taq),

0,63 μ ldNTP (0.2 mM), 1 μ l por cada cebador específico, 1 μ l cebador universal, HotmasterTaq ADN Polimerasa (0,5 μ l) (5PRIME) y 5 μ l de ADN genómico.

El programa de termociclador (Applied biosystems 2720) consistió en 30 de ciclos de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 52 °C durante 30s, extensión a 72 °C durante 45s, y una extensión final a 72 °C durante 7 min. Todos los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v). Como control positivo se utilizó ADN genómico de larvas L3 de *A. simplex*, *A. pegreffii* y *P. decipiens*, suministradas por el Dr. Hiroshi Yamasaki del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Tokyo, Japón.

6.5. RESULTADOS

La identificación por PCR múltiplex permitió la confirmación a nivel de especie de 26 de las 38 larvas analizadas. Se identificaron las especies *A. physeteris* en ocho hospederos y *P. decipiens* y *A. pegreffii*, cada una en un hospedero. *A. physeteris* también fue reportado en los hospederos parasitados por *P. decipiens* y *A. pegreffii* (Tabla 9).

Tabla 9. Identificación morfológica y molecular de larvas de la Familia Anisakidae y sus hospederos en el Pacífico colombiano y ecuatoriano.

Hospedero	Procedencia		Identificación Morfológica	Identificación - PCR Multiplex
Nombre científico	País	Localidad		
<i>Auxis rochei</i>	Ecuador	Santa Rosa	<i>Anisakis</i> spp.	<i>Anisakis physeteris</i>
<i>Centropomus armatus</i>	Colombia	Buenaventura	Familia Anisakidae	<i>Anisakis physeteris</i>
<i>Coryphaena hippurus</i>	Ecuador	Manta	<i>Anisakis</i> spp.	<i>Anisakis physeteris</i>
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Ecuador	Manta -	<i>Anisakis</i> spp.	<i>Anisakis physeteris</i>
<i>Larimus argenteus</i>	Colombia	Buenaventura	Familia Anisakidae	<i>Anisakis physeteris</i>
<i>Merluccius gayi</i>	Ecuador	Manta	Familia Anisakidae	<i>Anisakis pegreffii</i> y <i>Anisakis physeteris</i>
<i>Mugil cephalus</i>	Colombia	Buenaventura	<i>Anisakis</i> spp.	<i>Anisakis physeteris</i>
<i>Mugil curema</i>	Colombia	Tumaco	<i>Pseudoterranova</i> sp.	<i>Pseudoterranova decipiens</i> y <i>Anisakis physeteris</i>

Los partidores específicos fueron capaces de detectar *P. decipiens* con un producto de amplificación de peso esperado 370 pb, aislado de *M. curema* (Lisa), *A. pegreffii* con 672 pb, aislado de *M. gayi* (Merluza) y *A. physeteris* con 143 pb, aislado de *A. rochei* (Botellita), *C. armatus* (Gualajo), *C. hippurus* (Dorado), *K. pelamis* (Atún, Bonito barrilete), *L. argenteus* (Cajero), *M. gayi* (Merluza), *M. cephalus* (Lisa) y *M. curema* (Lisa). (Figura 15)

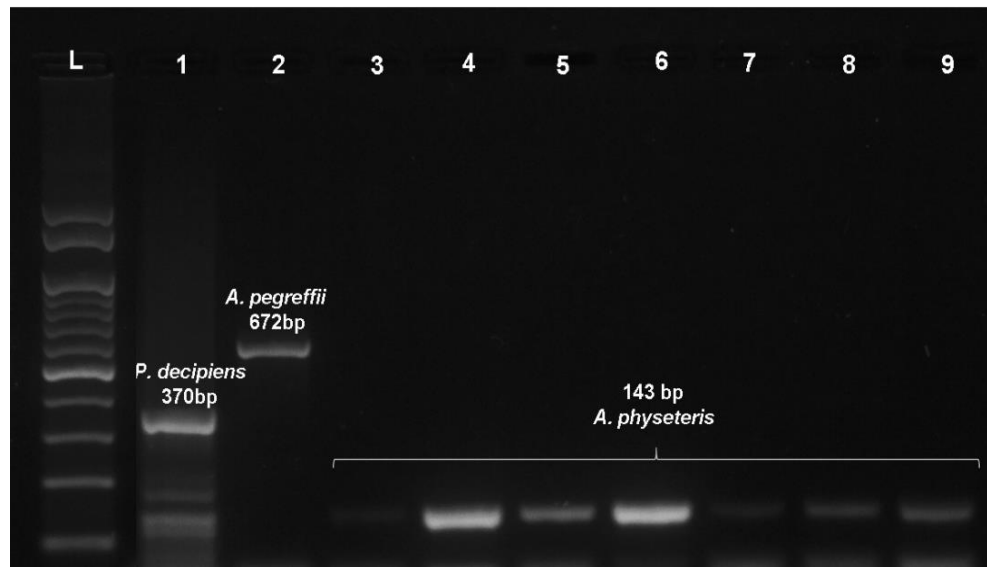


Figura 15. Identificación molecular de nematodos anisakidos por PCR Multiplex. Línea 1; 370 pb, *P. decipiens* (*M. curema*). Línea 2: 672 pb, *A. pegreffii* (*M. gayi*) y Líneas de la 3 a la 9: 143 pb, *A. physeteris* (*A. rochei*, *C. armatus*, *C. hippurus*, *K. pelamis*, *L. argenteus*, *M. gayi*, *M. cephalus* y *M. curema*). Línea L, marcador de peso molecular de 100 pb.

6.6. DISCUSIÓN

La caracterización molecular por PCR multiplex permitió identificar a nivel de especie, 26 de las 38 larvas analizadas. Los resultados de biología molecular coinciden con la identificación realizada por taxonomía clásica en el capítulo 1, lo que indica que un correcto análisis morfológico permite la identificación a nivel de género de los nematodos anisakidos. De lo anterior, se puede interpretar que las 12 larvas que no fueron identificadas por PCR multiplex, posiblemente no correspondan a ninguna de las seis especies que permitía identificar esta técnica, y no a un error en la identificación morfológica.

Los cebadores de las seis especies utilizados en la PCR corresponden a las especies de anisakidos de mayor distribución e importancia a nivel sanitario. Además, se debe tener en cuenta que solo el género *Anisakis*, es un complejo de nueve especies (87), de las cuales se podían identificar tres de ellas con la PCR y que para los géneros *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, e *Hysterothylacium*, la técnica utilizada permitía identificar una sola especie para cada uno, no obstante, el género *Contracaecum* registra más de 25 especies, y *Pseudoterranova* es considerada por alguno autores un complejo de tres especies e *Hysterothylacium* tiene todavía su taxonomía en debate (66,76,81). Aun así, se logro identificar la especie en el 68% de las larvas analizadas.

La PCR multiplex permitió identificar la especie *A. physeteris* parasitando los peces *A. rochei*, *C. armatus*, *C. hippurus*, *K. pelamis*, *L. argenteus*, *M. gayi* y *M. cephalus*. Además, se encontró *A. pegreffii* en el pez *M. gayi* y *P. decipiens* en el pez *M. curema*, lo que confirma la presencia de anisakidos en las ocho especies de peces identificadas como hospederas de anisakidos en el capítulo 1. No obstante, se debe tener en cuenta que el uso de otros métodos moleculares como la secuenciación puede confirmar o variar estos resultados, ya que estos parásitos son un complejo de especies y su taxonomía cambia constantemente.

Estos resultados coinciden con los estudios de investigadores peruanos que han reportado *A. physeteris* parasitando el pez dorado (*C. hippurus*), con una prevalencia del 33.33% (7,31,166). Además, coinciden con los registros del pez *Mugil* sp. realizados en Chile, donde los informes reportan *P. decipiens* como la especie de anisakido predominante en la región y el cual está asociado a los casos de infección gástrica en ese país (9,42). No obstante, estudios realizados en Indonesia, difieren de esta investigación, y han reportado *A. typica* parasitando algunos de los mismos hospederos de este estudio, como son, *A. rochei* y *K. pelamis* (167,168), al igual que las investigaciones realizadas en el pez *C. hippurus* de la costa del Océano Indico (66,67).

Por su parte, la merluza (*Merluccius* sp.) es considerada por varios autores como hospedadora de todas las especies de *Anisakis* (167), este estudio permitió identificar a *A. pegreffii* y *A. physeteris* para esta especie de pez en el Pacífico, mientras que en Chile se registra parasitada por *P. decipiens* y se asocia a casos de pseudoterranovosis (9,14,42,48,121,169,170), y en Colombia se cuenta con el reporte del género *Contracaecum* sp. parasitando la merluza que habita aguas del Mar Caribe (34).

Adicionalmente, se sabe que los mugilidos, constituyen la familia de peces con mayor número de reportes de anisakidos, esta investigación reporta *P. decipiens* en lisa (*M. curema*), resultados que coinciden con los realizados en Chile, Venezuela y Perú, donde se ha identificado como el agente causal de varios casos de anisakidosis (1,7,42,171), además, otros autores, reportan la lisa como hospedera de *Contracaecum* sp. en Colombia (34,55,60,159,172) y de *A. pegreffii* en el Mar Amarillo y en el Mar Mediterráneo (69,167). Sin embargo, en la búsqueda bibliográfica no se encontraron reportes de anisakidos para los peces gualajo (*C. armatus*) y cajero (*L. argenteus*), por lo que este estudio puede ser el primer reporte de parasitación en estas especies por *A. physeteris*. Así mismo, no se encontraron reportes de anisakidos a nivel de especie en Ecuador.

Aunque la mayoría de los casos humanos de anisakidosis donde se ha realizado biología molecular se ha identificado a *A. simplex* s.s. como el principal agente etiológico (173), en Italia *A. pegreffii* es reconocido como el principal causante de la anisakiosis gástrica habiéndose identificado por técnicas moleculares las larvas aisladas de tres casos clínicos (73,174). Es importante señalar que, en Japón, donde está ampliamente estudiado, se reconoce que existen áreas marítimas 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 (74), por lo que es importante realizar más estudios en peces del Pacífico que permitan conocer si existen peces parasitados por *A. simplex*, ya que este estudio confirma la presencia de *A. pegreffii*. Por lo tanto, son una preocupación emergente para la seguridad alimentaria, ya que no sólo produce síntomas digestivos o extraintestinales asociados con los hábitos de comida de pescado crudo, si no también causa fenómenos alérgicos (175). Por ende, el interés en este parásito se ha extendido a varias disciplinas, no sólo en el campo de la pesca, parasitología, seguridad alimentaria, sino también en varias especialidades en medicina, con un nuevo interés en alergia e inmunología (175).

Ademas, no se puede descartar que la ausencia del diagnóstico de casos clínicos en Ecuador y Colombia, pueda estar relacionada con el desconocimiento por parte de los médicos de la anisakidosis y de la alergia al parásito, y de su confusión con otras enfermedades más conocidas que presentan cuadros clínicos similares.

Respecto a la distribución geográfica de los anisakidos, esta, está bien documentada, el género *Anisakis* es el más reportado en el Mediterráneo, mientras *Pseudoterranova* se registra en el Atlántico nororiental, sin embargo, no se conocen reportes de distribución de estos nematodos en esta región del Océano Pacífico como se reporta en la presente investigación (66,77,85), por lo tanto, estos resultados constituyen el primer reporte de las especies *A. pegreffii*, *A. physeteris* y

P. decipiens en Colombia y Ecuador, lo que complementa los estudios de distribución de estas especies.

6.7. CONCLUSIONES

Se confirma por medio de técnica de biología molecular las especies de anisákidos, *A. physeteris*, *A. pegreffii* y *P. decipiens* en peces de consumo humano en aguas del Pacífico colombiano y ecuatoriano, lo que constituye un riesgo de salud pública, como una posible enfermedad zoonótica emergente.

Los resultados de biología molecular coinciden con la identificación realizada por taxonomía clásica en el capítulo 1, lo que indica que un correcto análisis morfológico permite la identificación a nivel de género de los nematodos anisakidos

La PCR multiplex es una herramienta adecuada para el diagnóstico diferencial de especies de anisakidos, la cual se puede realizar en un corto tiempo y a un bajo costo en comparación a las técnicas de biología molecular convencionales usadas para la identificación de nematodos anisakidos.

6.8. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios moleculares que permitan identificar otras posibles especies de anisakidos que circulan en aguas del Océano Pacífico y determinar la prevalencia de los anisakidos como parte de un programa de vigilancia epidemiológica para Salud Pública.

CAPITULO 3

Prevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis* en una población de Colombia y su relación con hábitos de consumo de pescado y marisco

7. CAPITULO 3: Prevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis* en una población de Colombia y su relación con hábitos de consumo de pescado y marisco

7.1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los dos primeros capítulos de esta tesis, permitió confirmar la presencia de los nematodos anisakidos, *A. physeteris*, *A. pegreffii* y *P. decipiens* parasitando peces de consumo que se comercializan en Ecuador y Colombia. Sin embargo, en ninguno de estos países se cuenta con reportes de caso de anisakiosis (infección por *Anisakis*) o pseudoterranovosis (infección por *Pseudoterranova*), por ser parasitosis desconocidas y por lo tanto no diagnosticadas, no obstante, los registros de peces infestados por párasitos anisakidos en Suramérica ha ido en aumento (31,48).

Estas enfermedades son transmitidas al ser humano a través del consumo de pescado; están asociadas a factores socioculturales que favorecen la aparición de la enfermedad, especialmente por el consumo de pescado crudo como el ceviche y el sushi, o pescado poco cocido, ahumado, marinado o en salazón (6,8,176).

En los últimos años, el interés en salud pública sobre estas enfermedades ha aumentado junto con el atractivo de la población por comer productos ictícolas crudos o mínimamente procesados. Sin embargo, no está claro, si en Colombia existen casos de anisakidosis o si hay un subregistro de la enfermedad. Para resolver esta inquietud, el objetivo de la tercera fase de la investigación (capítulo III) fue determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti *Anisakis* en una población de Colombia, y así tener un primer acercamiento a dicha enfermedad al establecer si existen personas que hayan estado en contacto con el parásito. Para ello se determinaron los anticuerpos anti-*Anisakis* frente al antígeno total larvario y frente a otros cuatro antígenos específicos, *Ani s 13* (hemoglobina) por ser considerado un alérgeno principal de *Anisakis*, el alérgeno *Ani s 3* (tropomiosina) un antígeno

somático importante para la detección de reacción cruzada con la tropomiosina de otros vertebrados; *Ani s 1*, un alérgeno principal que es reconocido por pacientes con infección activa a *Anisakis* y *Ani s 7*, alérgeno reconocido por el 100% de personas que han estado en contacto con el parásito.

Además, dado que la anisakiosis se debe invariablemente al consumo de pescado crudo o poco cocinado, se estudiaron los hábitos de consumo de pescado para posteriormente compararlos con los resultados de los sujetos seropositivos.

7.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis* en una población sana de Colombia y su asociación con los hábitos de consumo de pescado y mariscos

7.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 7.3.1.** Determinar los hábitos alimentarios asociados al consumo de pescado y los factores de riesgo asociados a adquirir una anisakidosis en una población de Colombia
- 7.3.2.** Conocer la prevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis* en una población de Colombia
- 7.3.3.** Relacionar la seropositividad con los hábitos de consumo de pescado y mariscos

7.4. HIPOTESIS

La población de Colombia presenta anticuerpos anti-*Anisakis* por la ingestión de pescados parasitado con nematodos de la familia Anisakidae

7.5. MATERIALES Y METODOS

7.5.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio de tipo transversal descriptivo, en la Universidad del Valle, sede San Fernando en Cali–Colombia.

La muestra se calculó de acuerdo al objetivo del estudio, para determinar la prevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis* en una población sana de Colombia y su asociación con los hábitos de consumo de pescado y mariscos, por lo tanto, se realizó el cálculo con base a la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 pq}{d^2}$$

Donde:

$Z_{\alpha/2}^2$: Valor correspondiente a la tabla de la distribución normal, asociado al 95% de confianza= 1,96

p : Prevalencia de la variable, en este caso desconocida y por lo tanto se opta por el valor que arroja la máxima probabilidad, 0.5

q : $1-p=1-0,5=0,5$

d^2 : Error muestral = 0,05 Determinado por la investigadora

La muestra calculada fue de **150** personas en la Universidad del Valle–Sede San Fernando.

7.5.2. Poblacion de estudio

Voluntarios sanos, que pertenecían a la población docente estudiantil de la Universidad del Valle, sede San Fernando, en Cali, Colombia.

7.5.3. Reclutamiento de voluntarios

El reclutamiento de los voluntarios se realizó en la Universidad del Valle–Sede San Fernando, para lo cual en diferentes espacios académicos se realizó una presentación de tres minutos invitando a la población universitaria a participar, adicionalmente se les entregó un folleto informativo (Anexo 5).

7.5.4. Encuesta

Todos los voluntarios fueron encuestados sobre sus hábitos alimentarios en relación al consumo de pescados y mariscos, y los principales antecedentes clínicos, siguiendo el protocolo propuesto por Puente y col. en el 2008 (177) que fue diseñado bajo la dirección de la Dra. Carmen Cuéllar de la Universidad Complutense de Madrid, quien otorgó el permiso (Anexo 6) para uso de la encuesta.

La encuesta se constituyó de veintiocho preguntas (Anexo 7), seis preguntas de información general, quince preguntas sobre hábitos alimentarios asociados al consumo de pescado/mariscos con opción de respuesta múltiple y siete preguntas abiertas acerca de antecedentes clínicos.

Las preguntas fueron elaboradas para conocer la frecuencia de consumo de pescados y mariscos al mes, lugar de consumo (restaurantes/hogar), forma de consumo y/o de preparación (enlatado, crudo, en salazón), especies de peces que se consumen y antecedentes clínicos.

La encuesta se validó previamente por medio de una prueba piloto a 44 voluntarios de la misma población de estudio.

Cada participante fue debidamente informado sobre las características del estudio y entrenado en el diligenciamiento de la encuesta, previa firma del consentimiento informado (Anexo 8). El proyecto fue avalado y aprobado por el Comité Institucional

de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle mediante acta No. 015-015 (Anexo 9).

7.5.5. Toma de muestras

La toma de la muestra sanguínea se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo y Citogenética, ubicado en el Departamento de Morfología, de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. El permiso para la toma de muestras fue otorgado por el Jefe del Departamento (Anexo 10), todos los voluntarios recibieron explicación amplia del estudio, sus beneficios y riesgos potenciales, y firmaron el consentimiento informado de forma libre y voluntaria, previamente revisado y aprobado por el comité de ética.

La muestra se recolectó en tubo seco (tapa roja), obteniendo un total de 10 ml de sangre por voluntario mediante venopunción con tubo vacutainer. La sangre fue fraccionada en suero y células por centrifugación; las células fueron descartadas y el suero fue fraccionado en tubos Eppendorf debidamente identificados. Las alícuotas de suero fueron preservadas a -20°C para su posterior procesamiento para las pruebas de ELISA. Las muestras fueron almacenadas en el Laboratorio de Histología, de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle hasta su envío al Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (España) donde se realizaron las pruebas de laboratorio. Para el envío y transporte de las muestras se contó con todos los permisos para manejo de muestras de riesgo biológico otorgado por el Ministerio de Salud de Colombia (Anexo 11) y por el Ministerio Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad de España (Anexo 12).

Las muestras fueron manejadas como material biológico potencialmente peligroso (Flujograma para la toma de las muestras; Anexo 13) y todo el personal involucrado en su manipulación realizó estrictamente los procedimientos de bioseguridad

(Decreto nacional 2676 DE 2000 y el Manual de Bioseguridad de laboratorios del GICUV–U. del Valle).

7.5.6. Recolección de datos

El equipo de trabajo estuvo conformado por el investigador principal y un profesional en bacteriología debidamente capacitado en el protocolo para la toma de muestras y la recolección de los datos. El profesional en bacteriología recibió toda la información sobre el proyecto antes de iniciar la toma de muestras, y se le entregó un POE (Procedimiento Operativo Estándar), con indicaciones claras sobre la toma de muestras, registro, almacenamiento y transporte de las mismas. (Anexo 14).

Los datos de las muestras fueron registrados en un formato elaborado para el proyecto (Anexo 15).

7.5.7. Almacenamiento de la información

Los datos de las muestras, encuestas y formatos fueron guardados en carpetas en un gabinete asignado para el proyecto en el Departamento de Morfología de la Universidad del Valle. Adicional, los registros se transcribieron a medio electrónico; el acceso al archivo digital estuvo restringido al personal autorizado por el proyecto. La información fue utilizada posteriormente para el análisis y confrontación con las pruebas de laboratorio.

7.5.8. Consideraciones éticas

Este estudio se llevó a cabo en plena conformidad con las guías y la revisión actual de la Declaración de Helsinki y la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Además, contó con la aprobación (Código #015-015) del Comité Institucional de Revisión de Ética Humana, Facultad de Salud, Universidad del Valle (Anexo 9).

Criterios de inclusión y exclusión: Para que los individuos pudieran participar en el estudio, tenían que cumplir con todos los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión: (a) ser mayor de edad, (b) consumir pescado o mariscos, (c) disposición para proporcionar la muestra solicitada, (d) capacidad de proveer un consentimiento informado escrito, ya fuera por la firma o en el caso de analfabetismo la huella digital, y (e) capacidad y disposición para responder la encuesta.

Criterios de exclusión: (a) Que la muestra fuera insuficiente o presentara hemólisis.

Riesgos potenciales: Este estudio fue considerado de riesgo mínimo. Los riesgos potenciales fueron asociados a la extracción de sangre incluyendo posibles molestias, hinchazón o dolor e infección en el sitio de la extracción de sangre y sensación de mareo o desmayo.

La punción fue realizada por un profesional en bacteriología, se llevó a cabo con la técnica estándar para extracción de sangre, utilizando material desechable estéril, cumpliendo con los protocolos estandarizados en las instituciones de salud de Colombia y aprobados por el Ministerio de Salud.

Beneficios: Los sujetos recibieron información sobre la anisakidosis y los agradecimientos por la participación voluntaria al proyecto de investigación. Los participantes no pagaron dinero por su participación en el estudio ni recibieron remuneración alguna.

Identificación de las muestras: A cada voluntario se le asignó un código único con el cual se identificó la muestra, la encuesta, el consentimiento informado y las alícuotas de suero. El primer número para identificar la ciudad de estudio (Cali: 1); el segundo número a la institución participante (Universidad del Valle: 1), y un tercer número de tres dígitos consecutivos que corresponderá al número del participante. De esta manera un voluntario de Cali, captado en la Universidad del Valle, su consentimiento, encuesta y la muestra llevara el código 1-1-001, adicional los tubos

de las muestras fueron marcados con la fecha de recolección. Esta codificación fue establecida proyectando que en un futuro la metodología puede ser replicada en otra población y se conserve el sistema de codificación.

Confidencialidad: Los datos obtenidos fueron manejados bajo el principio de confidencialidad.

Uso futuro de las muestras: Todos los sueros sobrantes luego de las pruebas de laboratorio se guardaron congelados para investigación futuras con el previo consentimiento del participante. En caso de requerirse para futuros estudios, se enviará la respectiva solicitud al Comité de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. El suero de los participantes que no autorizaron el uso posterior de la muestra, fue descartado de acuerdo al protocolo establecido (Anexo 14).

Declaración de Helsinki: Este estudio se llevó a cabo en plena conformidad con las guías y la revisión actual de la Declaración de Helsinki lo que brinda una mayor protección a los participantes del estudio.

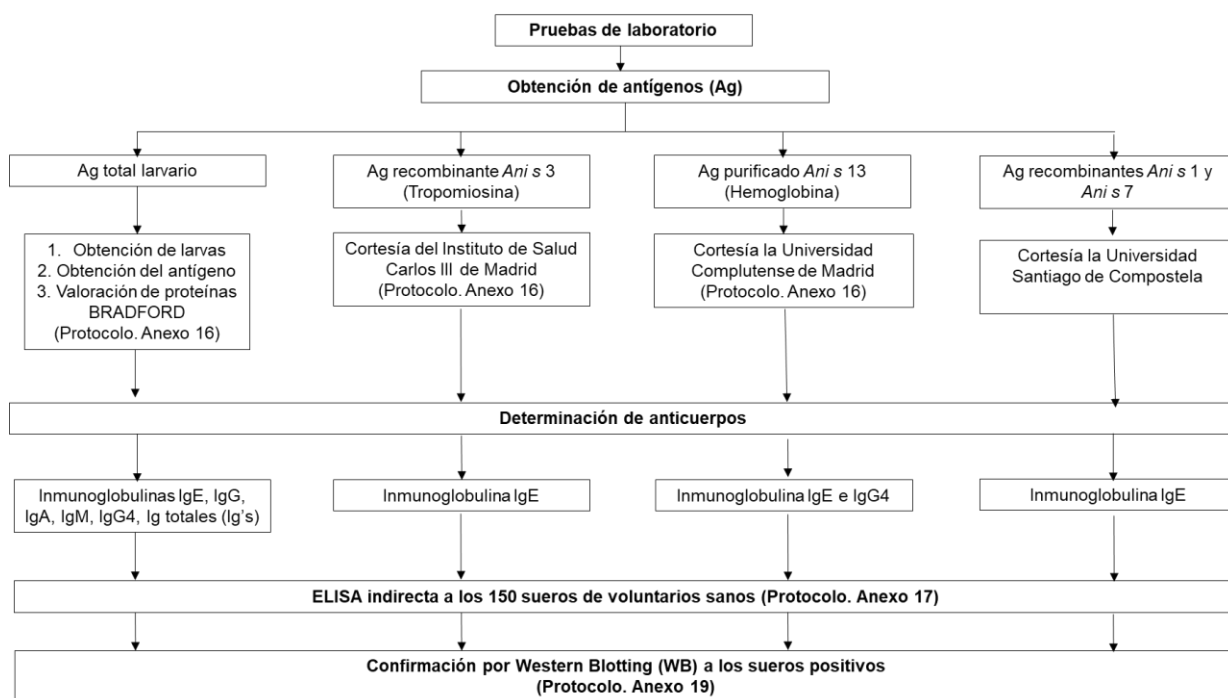
Reporte de resultados a voluntarios: A todos los voluntarios se les informó mediante mensaje de texto sobre el resultado de la investigación y fueron invitados a recibir un reporte de los mismos en la oficina de los estudiantes de postgrado del Departamento de Morfología.

7.5.9. Pruebas de laboratorio

Se determinaron los anticuerpos anti- *Anisakis*, para el antígeno total larvario, y para los alérgenos *Ani s 13*, *Ani s 3*, *Ani s 1* y *Ani s 7*. La obtención de los antígenos se presenta en el anexo 16.

Para la determinación de anticuerpos anti – *Anisakis* frente al antígeno total de *Anisakis* y los alérgenos *Ani* s 13 (hemoglobina), y *Ani* s 3 (tropomiosina) se utilizó la metodología desarrollada por el grupo de parasitología de la Universidad Complutense de Madrid. Para la determinación de anticuerpos frente a los alérgenos *Ani* s 1 y *Ani* s 7 se utilizó el kit Trisakis 170, cortesía del grupo de investigación del Dr. Florencio Martínez Ubeira de la Universidad Santiago de Compostela, España. Todos los protocolos fueron desarrollados en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid en España, con la asesoría de la Dra. Carmen Cuéllar del Hoyo (anexo 17). La metodología de las pruebas de laboratorio se resume en la tabla 10.

Tabla 10. Flujograma para la determinación de anticuerpos anti-*Anisakis*



Como las pruebas de inmunodiagnóstico pueden presentar reacción cruzada con otros parásitos, se realizó la determinación de anticuerpos anti-*Ascaris* frente al antígeno total en los 150 sueros del estudio (Anexo 18).

Ascaris fue el parásito seleccionado debido a que es el nematodo intestinal patógeno más frecuente en la población colombiana.

Finalmente, se realizó un western blotting (WB) a los sueros que presentaron por ELISA anticuerpos anti-*Anisakis* frente a alguno de los antígenos analizados, con el fin de conocer el peso molecular de las proteínas específicas detectadas en el suero del voluntario (seropositivo). Se hizo WB para todos los sueros positivos frente a los antígenos totales de *Anisakis* y frente al antígeno total de *A. suum* para descartar una reacción cruzada. El procedimiento se presenta en el anexo 19.

7.5.10. Análisis estadístico

Encuesta: Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS, se realizó un análisis descriptivo para establecer frecuencias y promedio. Posteriormente, se aplicó el test de Kolmogoroff Smirnov, para conocer la distribución de los datos. Las variables numéricas estudiadas fueron: frecuencia de ingesta de pescado, pescado enlatado, pescado crudo, pescado en salazón, consumo de mariscos y consumo de pescado en restaurante. Estos se relacionaron con los antecedentes clínicos asociados a alergias. Para cada variable se calculó la mediana y rango intercuartil y se compararon mediante el test de Mann-Whitney. Se consideraron significativas las variables con valor de $P \leq 0.05$.

Pruebas de laboratorio: El tratamiento estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 6. Las variables cualitativas se describen en forma de frecuencia/total y en porcentajes, y las variables cuantitativas como media $\pm$ desviación estándar. La comparación entre datos cuantitativos entre dos grupos, se realizaron con la t de Student o la U de Mann Whitney según la distribución de los datos. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

7.6. RESULTADOS

7.6.1. Hábitos alimentarios y factores de riesgo asociados al consumo de pescado

Se realizó un estudio de tipo transversal, se encuestaron 150 individuos en la Universidad del Valle en Cali-Colombia con el fin de evaluar los hábitos de consumo de pescado y mariscos y los posibles riesgos asociados a adquirir una parasitosis.

De los 150 participantes, 84 eran mujeres (56%) y 66 hombres (44%), con edades entre los 18 y 67 años. Los principales hábitos alimentarios asociados al consumo de pescado se presentan en la tabla 11 y los antecedentes clínicos en la tabla 12.

Consumo de pescado: La mediana de consumo de pescado fue de tres veces al mes (Rango intercuartil 2-5). La mediana de consumo de pescado enlatado (atún y sardinas) fue de dos veces al mes (RIC 1-3). El consumo de pescado crudo o en salazón/marinado y el consumo de mariscos presentó una mediana de una vez al mes (RIC 0-1,25).

El 87% de los participantes manifestaron consumir pescado crudo. El 19% de los voluntarios preferían consumir pescado crudo en restaurantes. Mientras en el hogar la forma preferida de consumo fue pescado frito (70%) y solo un 7% lo prefería crudo, marinado o en salazón.

Especies de mayor consumo: Las cinco especies de peces de preferencia para el consumo fueron tilapia (*Oreochromis* sp.) con un 31%, el atún (*Thunnus* sp.) con el 26%, salmón (*Salmo* sp.) con el 17%, trucha (*Oncorhynchus mykiss*) con un 10 % y pargo (*Lutjanus* sp.) con el 3%. Respecto a los mariscos, los participantes preferían consumir camarón en un 55% y langostino en un 4%.

Sitio de compra: El 53% de los individuos compraban el pescado en almacenes de

cadena y un 11% lo hacían en plazas de mercado o galerías.

Tabla 11. Hábitos alimentarios asociados al consumo de pescado y mariscos en una población de la ciudad de Cali

Hábitos alimentarios	%	Frecuencia al mes
Consumo en restaurantes		
Pescado y mariscos	73	2
Forma de preparación preferida en el hogar (Los participantes podían escoger varias opciones)		
Frito	70	-
Sudado	57	-
Apanado	29	-
Al horno	17	-
Al vapor	15	-
Crudo	7	-
Integrantes de la familia que consumen pescado		
Todos	47	-
Adultos	32	-
Adolescentes	3	-
Niños	2	-
No sabe/No responde	16	-
Lugar de compra de pescado/mariscos		
Almacenes de cadena	53	-
Plaza de mercado o galería	11	-
Ambos (Almacén de cadena y Plaza de mercado)	29	-
No compra	5	-
Otro (pesca artesanal)	2	-

Tiempo que transcurre del sitio de compra al hogar		
Menos de 1 hora	67	-
Entre 1 y 2 horas	21	-
Medio día o un día	1	-
Más de un día	2	-
No sabe/No responde	9	-
Forma de almacenamiento		
Congelado	87	-
Refrigerado	13	-
Peces de consumo		
Tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.)	31	-
Atún (<i>Thunnus</i> sp.)	26	-
Salmon (<i>Salmo</i> sp.)	17	-
Trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	10	-
Pargo (<i>Lutjanus</i> sp.)	3	-
Bocachico (<i>Prochilodus magdalenae</i>)	2	-
Bagre de mar (<i>Tachysurus barbus</i>)	1	-
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	1	-
Robalo (<i>Centropomus</i> sp.)	1	-
Basa (<i>Pangasius hypophthalmus</i>)	1	-
Cachama (<i>Colossoma</i> sp.)	1	-
Merlón (<i>Labrus merula</i>)	1	-
Merluza (<i>Merluccius</i> sp.)	1	-
Pelada (<i>Macrodon</i> sp.)	1	-
No sabe/No responde	3	-
Mariscos de consumo		
Camarón	55	-

Langostino	4	-
Calamar	1	-
Pulpo	1	-
Cangrejo	1	-
Langosta	1	-
Piangua	1	-
No sabe/No responde	1	-
No consume	35	

Antecedentes clínicos: De los 150 voluntarios sanos, el 11% manifestó haber presentado alguna vez síntomas digestivos asociados al consumo de pescado o mariscos y el 12% manifestaciones de tipo alérgico. Del total de los voluntarios, tres participantes (2%) manifestaron haber presentado síntomas tanto alérgicos como digestivos.

Con respecto a las alergias de tipo alimentarias, el 11% manifestaron ser alérgicos a algún tipo de alimento. Un 4% del total de los encuestados afirmaron ser alérgicos a los mariscos. Un participante afirmó ser alérgico a los mariscos y enlatados, y un segundo voluntario manifestó ser alérgico a los mariscos, el maracuyá y la carne de cerdo. El 27% de los encuestados afirmaron padecer alguna alergia respiratoria, mientras un 47% de los encuestados afirmaban ser alérgicos a los ácaros del polvo. En la tabla 12 se presentan los antecedentes clínicos.

Tabla 12. Principales antecedentes clínicos de la población de estudio

Antecedentes clínicos	%
Manifestaciones clínicas asociados al consumo de pescado	
Digestivas	11
Alérgicas	12
Digestivas y alérgicas	2
Ninguna	77
Alergias de tipo alimentario	
Mariscos	4
Lácteos	1,3
Gluten	1
Enlatados	1
Atún	1
Aceitunas	1
Maracuyá	1
Carne de cerdo	1
Canela	1
Maíz enlatado	1
No específica	1
Alergias respiratoria	
Alergia respiratoria	27
Alergia a los ácaros del polvo	47

El estudio comparativo de las variables analizadas mostró que, los participantes que consumen los pescados en salazón tienen una mayor probabilidad de padecer urticaria ($p<0,03$), de ser alérgicos a los ácaros ($p<0,02$) y de presentar alergia a

algún tipo de alimento ($p < 0,04$); en cuanto al consumo de mariscos, se observó una asociación positiva con la probabilidad de presentar urticaria ($p < 0,04$). Además, en relación con la frecuencia de consumo de pescado al mes, el análisis determinó que a mayor ingesta mayor probabilidad de padecer urticaria ($p < 0,001$) y una tendencia a la significancia respecto a presentar alergia a los ácaros ($p = 0,063$).

7.6.2. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis*

Frente al antígeno total larvario de *Anisakis*, se encontró que el 4.7% de los sueros analizados presentaron niveles de inmunoglobulina (Ig) IgG4, el 4% niveles de IgA, un 3.3% de inmunoglobulinas totales (Ig's) y el 0.7% de IgE. No se detectaron niveles de IgG e IgM en los sueros estudiados frente al antígeno total.

En un 2.7% de los sueros analizados se detectaron niveles de IgE utilizando el alérgeno recombinante *Ani s 3* (tropomiosina). Para el alérgeno purificado *Ani s 13* (hemoglobina) se encontró que el 4.7% de los sueros detectaron niveles de anticuerpos IgE y un 9.3% para IgG4.

Utilizando el kit Trisakis, se encontró que el 1.3% de los sueros estudiados mostraron niveles positivos de anticuerpos IgE frente al antígeno *tAni s 7*. Mientras que todos los sueros fueron negativos para el antígeno *rAni s 1*.

En la figura 16 se muestran los porcentajes de positividad para cada anticuerpo y antígeno analizado de *Anisakis* en los 150 sueros de individuos de Colombia.

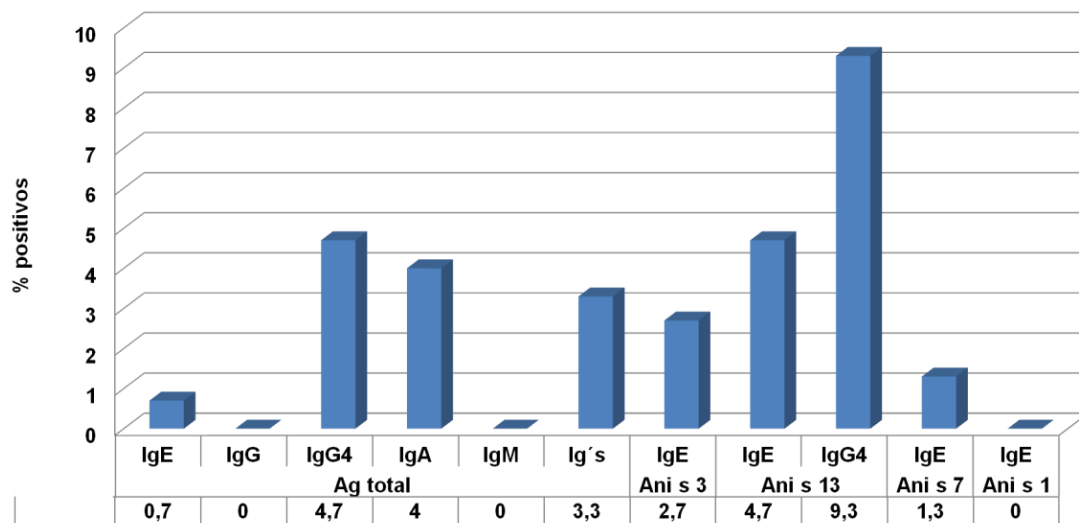


Figura 16. Porcentaje de sueros positivos en relación a anticuerpo y antígeno analizado de *Anisakis*. Extracto total de *Anisakis* (Ag total); *Ani s 3* (tropomiosina); *Ani s 13* (hemoglobina); Test Trisakis: *Ani s 1* y *Ani s 7*.

Los valores de D.O. obtenidos para cada suero se presentan en los anexos del 20 al 23. El punto de corte se obtuvo a partir de la media del grupo control más tres veces la desviación estándar, para el kit Trisakis el punto de corte fue el indicado por las instrucciones del fabricante (anexo 18).

En resumen, un total de 36 sueros reaccionaron frente a alguno de los antígenos estudiados, mostrando niveles de positividad en una o varias inmunoglobulinas.

7.6.3. Relación entre los hábitos alimentarios al consumo de pescado y la prevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis*

Con el fin de establecer una asociación entre los hábitos alimentarios asociados al consumo de pescado y la prevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis* en una población de Colombia, se determinó la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre los individuos con respuesta afirmativa (sí) y negativa (no) a cada una de las preguntas de la encuesta (ej: consumo de pescado crudo, si o no), en

relación a los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis*. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Consumo de pescado enlatado: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de inmunoglobulina IgE frente al antígeno *Ani s 3* ($p=0,0328$), siendo la media más alta en el grupo de personas que no consumen pescado enlatado.

Consumo de pescado crudo: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de inmunoglobulinas totales (Ig`s) frente al antígeno total ($p=0,00095$) con una media más alta para el grupo de personas de no comen sushi ni ceviche.

Lugar de compra de pescado y mariscos: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de anticuerpos IgE ($p=0.0185$) frente a *Ani s 13* con una media más alta para el grupo de personas que compraban en supermercados.

Alergia a los ácaros del polvo: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de anticuerpos IgG ($p=0,045$) frente al antígeno total de *Anisakis*, siendo la media más alta en el grupo de personas que no eran alérgicas a los ácaros del polvo. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas para valores de anticuerpos IgE ($p=0,0041$) frente al antígeno *Ani s 3*, donde la media más alta fue en el grupo que sí presentaba la alergia.

Antecedentes de diagnóstico con alguna parasitosis: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de anticuerpos IgG ($p=0,0187$) e IgE ($p=0.0301$) frente al antígeno total de *Anisakis*. La media fue más alta en el grupo que sí había sido diagnosticado con alguna parasitosis en el transcurso de la vida.

Las otras variables analizadas no presentaron diferencias significativas en los valores de D.O. de las inmunoglobulinas frente al antígeno total, ni para los antígenos *Ani s 13*, *Ani s 3*, *Ani s 1* y *Ani s 7*.

Debido a que el alérgeno *Ani s 7* de *Anisakis*, es el antígeno que es reconocido por el 100% de las personas que han estado en contacto con el parásito, a continuación, se describen las características asociadas al consumo de pescado que presentaron las dos personas con anticuerpos IgE para *Ani s 7*:

Los dos voluntarios positivos para *Ani s 7* consumían pescado enlatado (atún) entre tres y ocho veces al mes, ambas preferían comer el pescado frito, sudado, al horno o apanado, solo una de ellas manifestó que consumía pescado crudo, en sushi, ceviche, marinado, en salazón, o ahumado, cuatro veces al mes. Las dos personas con anticuerpos IgE frente *Ani s 7* tardaban menos de una hora entre el sitio de compra del pescado a sus respectivos hogares. Los dos voluntarios manifestaron que nunca habían tenido síntomas asociados al consumo de pescado o mariscos. Ninguna de las dos personas con anticuerpos IgE frente *Ani s 7* sufría de algún tipo de alergia alimentaria, de alergia respiratoria, o había sido diagnosticada con alguna parasitosis.

7.6.4. Descripción de los hábitos de consumo de pescado de los 36 voluntarios que presentaron anticuerpos anti-*Anisakis*

De los 150 sueros analizados, 36 de ellos presentaron niveles de anticuerpos frente a alguno de los antígenos estudiados, 12 (33%) eran hombres y 24 (67%) mujeres entre los 18 y 48 años de edad. Ninguna de las personas encuestadas con edades entre los 49 y 67 años presentó anticuerpos.

En la figura 17, se presenta un esquema que resume las características asociadas al consumo de pescado y mariscos de los 36 voluntarios con anticuerpos anti-*Anisakis*.

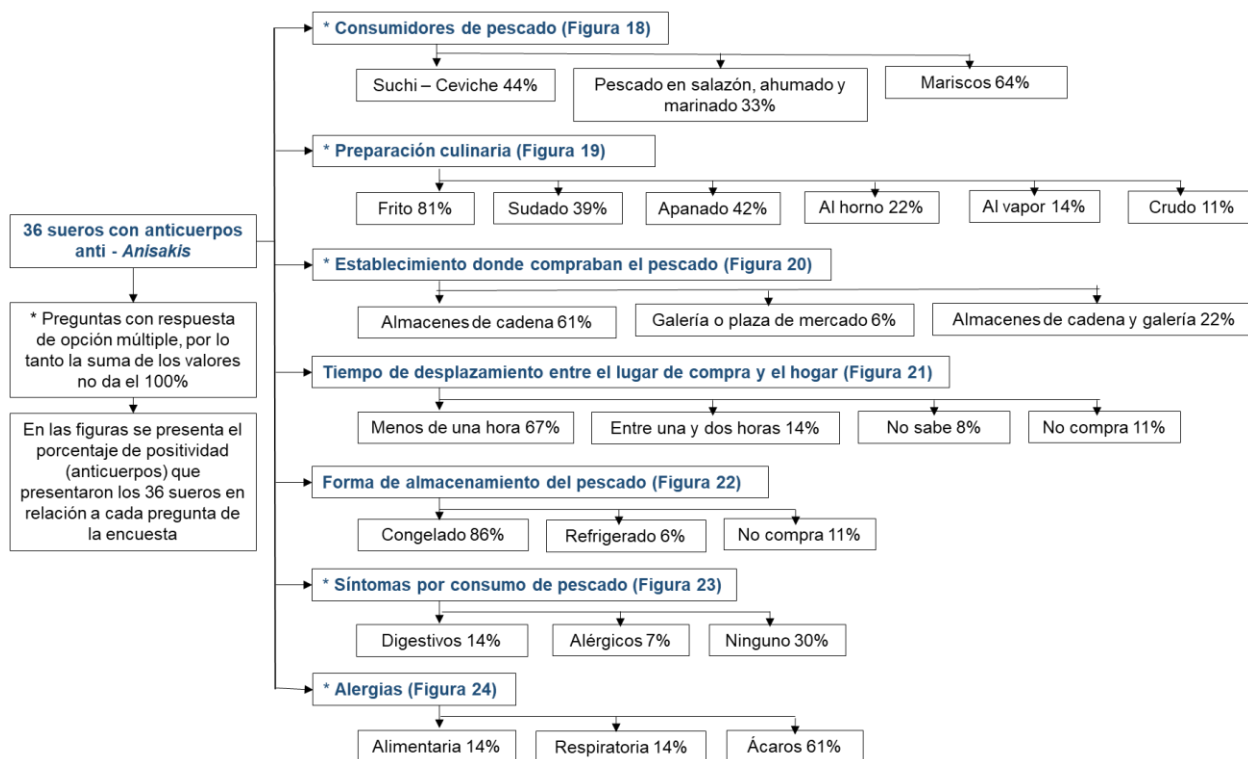


Figura 17. Análisis descriptivo de los 36 sueros que presentaron anticuerpos anti-*Anisakis*. El porcentaje de positividad respecto a las preguntas realizadas en la encuesta se indica con el número de la figura correspondiente.

De los 36 voluntarios con anticuerpos anti *Anisakis*, se observó que aquellos que consumían pescado con mayor frecuencia, fueron los que presentaron un mayor porcentaje de positividad (Figura 18).

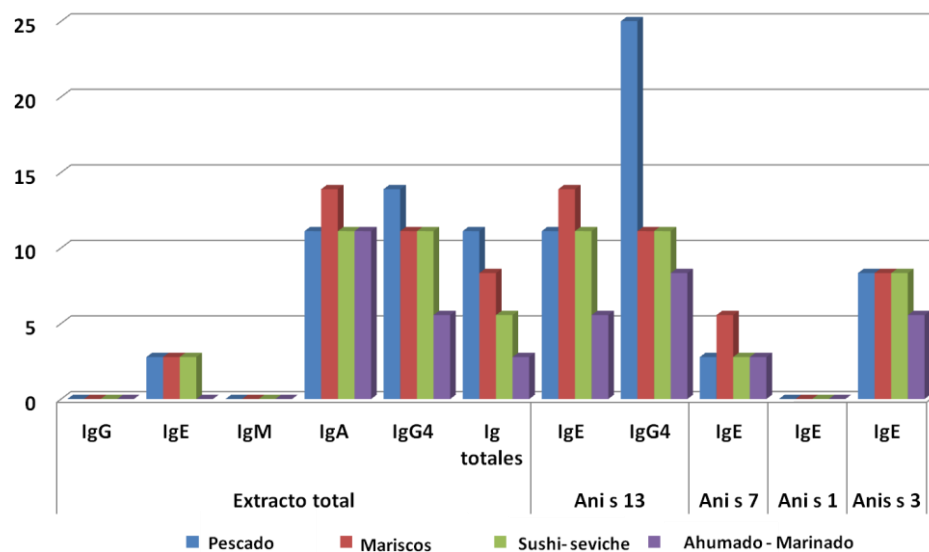


Figura 18. Porcentajes de positividad de los consumidores de pescado, del grupo de los 36 sueros que presentaron anticuerpos anti-*Anisakis*.

Cuando se relacionaron los niveles de anticuerpos de los voluntarios positivos en comparación con la forma preferida para el consumo de pescado, se encontró que el porcentaje mas alto de anticuerpos estaba entre aquellos que consumían el pescado frito, seguido de los que consumían pescado apanado (Figura 19).

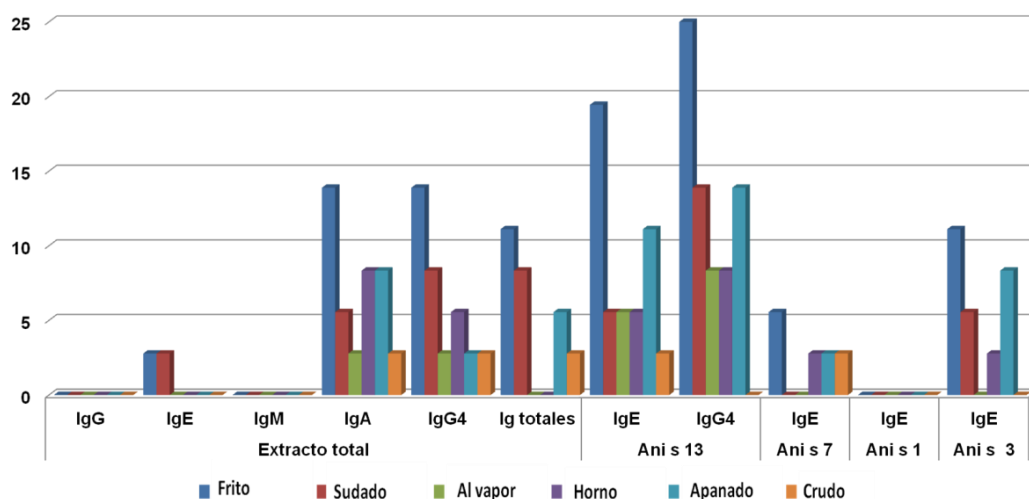


Figura 19. Porcentajes de positividad en el grupo de los 36 voluntarios positivos a *Anisakis* según la preparación culinaria preferida para el consumo de pescado.

Respecto al lugar donde compraban el pescado los individuos positivos a *Anisakis*, se registro que aquellos que compraban en almacenes de cadena presentaron un mayor porcentaje de positividad (figura 20).

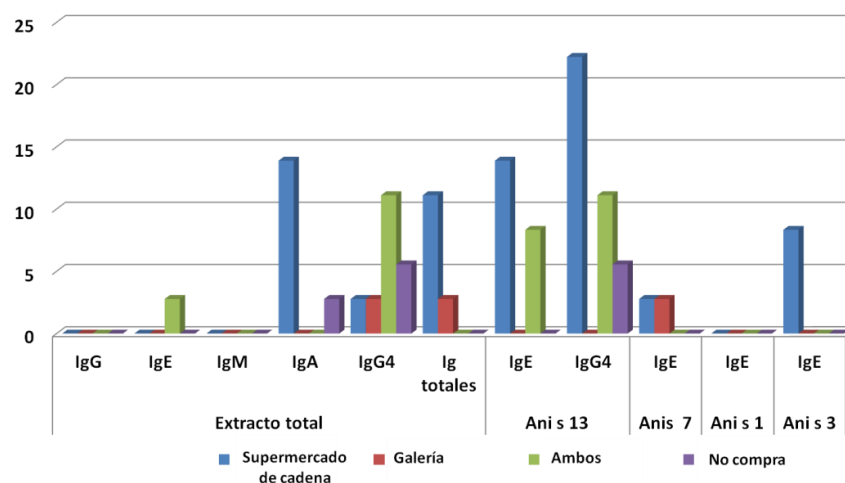


Figura 20. Porcentaje de positividad según el establecimiento para la compra de pescado en el grupo de los 36 individuos positivos a *Anisakis*.

De los 36 voluntarios con anticuerpos, aquellos que utilizaban la congelación como método de preservación del pescado y los mariscos, fueron los que presentaron un porcentaje de positividad mas alto, en comparación con aquellos que solo lo refrigeraban (figura 21).

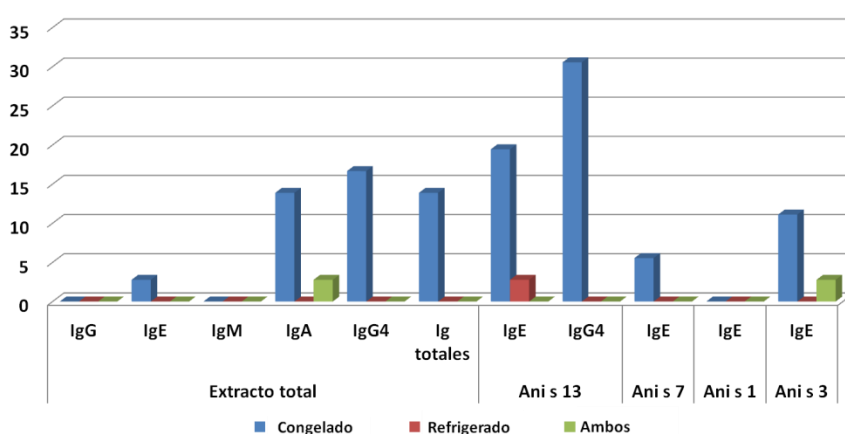


Figura 21. Porcentaje de positividad según la forma de almacenar el pescado en el grupo de los 36 individuos positivos a *Anisakis*.

Respecto a los individuos con antecedentes clínicos relacionados al consumo de pescado, se encontró que aquellos que presentaron síntomas alérgicos fueron los más seropositivos (figura 22).

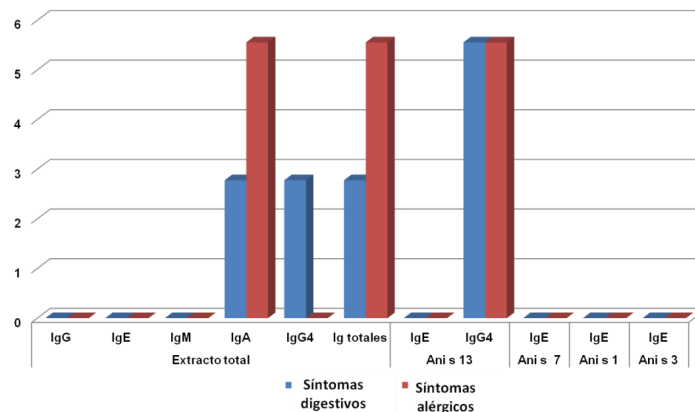


Figura 22. Porcentaje de positividad según los antecedentes asociados a consumo de pescado en el grupo de los 36 individuos positivos a *Anisakis*.

Cuando se compararon los resultados de seropositividad con los antecedentes a alergias alimentarias, se observó que los individuos con alergia a los mariscos presentaron anticuerpos frente a todos los antígenos estudiados, excepto a *Ani s 1* y *Ani s 7*(figura 23).

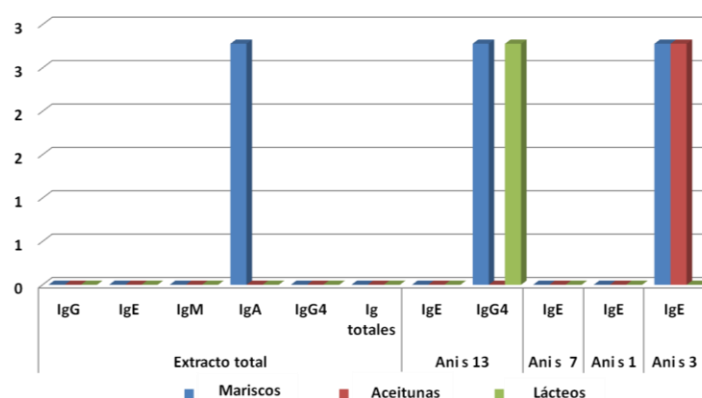


Figura 23. Porcentajes de positividad según las alergias alimentarias, en el grupo de los 36 individuos positivos a *Anisakis*.

Finalmente, se observó que de los 36 voluntarios con anticuerpos anti *Anisakis*, aquellos con antecedentes alérgicos asociados a los ácaros del polvo, presentaron una mayor seropositividad en comparación a aquellos con antecedentes a otras alergias respiratorias (figura 24).

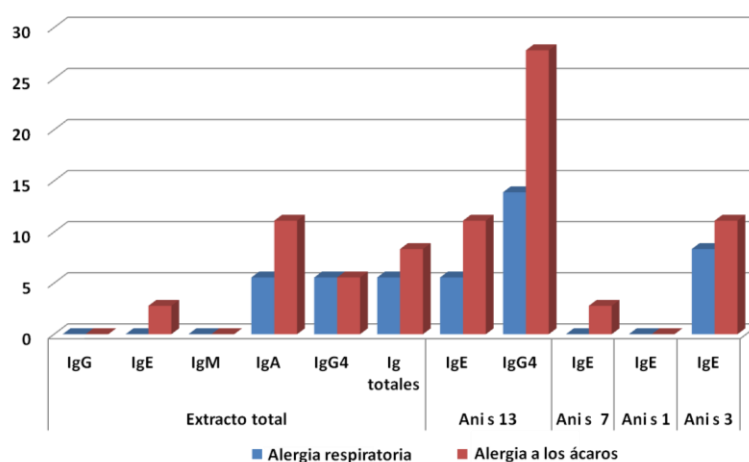


Figura 24. Porcentajes de positividad según alergia respiratoria o a ácaros, en el grupo de los 36 individuos positivos a *Anisakis*.

7.6.5. Seroprevalencia de anticuerpos anti- *Ascaris suum* por el método ELISA

Con el fin de determinar una posible reacción cruzada entre los nematodos *Anisakis* y *A. suum* en los sueros analizados, se realizó un estudio de seroprevalencia para *A. suum* por medio de ELISA indirecto utilizando el antígeno total procedente de helmintos adultos. Los resultados se expresan como valores de densidades ópticas D.O una vez restada su correspondiente fijación inespecífica a la BSA utilizada en el postapizado. Se consideraron positivos los valores superiores a la media de D.O del grupo control obtenida por cada inmunoglobulina, mas tres veces la desviación estándar.

De los 150 sueros analizados el 92.6% fueron positivos para *Ascaris*, en un 68,7% se detectaron niveles de anticuerpos IgM, en un 61,3% se detectaron niveles de IgG, en el 26,7% IgE, en un 6% IgG4, en el 16% niveles de IgA y, finalmente, en un 12% inmunoglobulinas totales (Ig's) (figura 25).

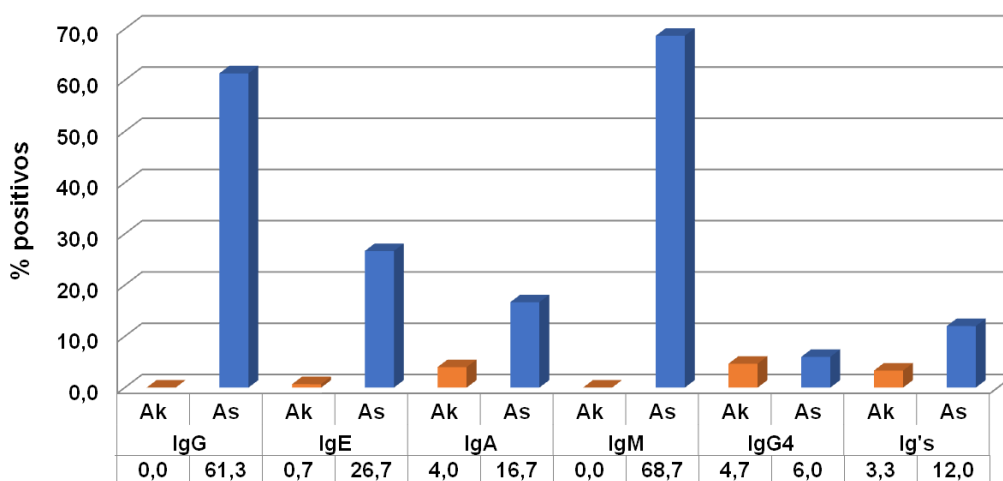


Figura 25. Porcentaje de positividad de los 150 sueros en relación a cada anticuerpo frente a los extractos totales de *Anisakis* (Ak) y *A. suum* (As).

7.6.6. Inmunorreconocimiento por *Western Blotting* de proteínas del antígeno total de *Anisakis* con los anticuerpos IgE, IgG e IgG4, en los 36 sueros de voluntarios positivos a *Anisakis* por el método de ELISA

Se realizó un western blotting confirmatorio (WB) a los sueros que presentaron por ELISA niveles de anticuerpos anti-*Anisakis* frente a alguno de los antígenos analizados (antígeno total, *Ani s 7*, *Ani s 3* o *Ani s 13*). Los WB se realizaron con los antígenos totales de *Anisakis* y *A. suum* con las inmunoglobulinas IgE, IgG e IgG4.

Es importante recordar para el análisis de los WB, que el alérgeno *Ani s 3* es una proteína con un peso molecular de 41 kDa con un alto grado de homología con las tropomiosinas de otros nematodos. *Ani s 7* es considerado el alérgeno más importante de *A. simplex*, tiene un peso molecular de 139 kDa y es reconocida por

el 100% de pacientes alérgicos y no presenta reacción cruzada, y *Ani s 13* que es también un alérgeno mayor, tiene un peso molecular de 37 kDa siendo reconocido por 65% de pacientes sensibilizados y hasta un 80% en pacientes con anisakiosis gastroalérgica, no existiendo reacción cruzada entre los epitopos de la hemoglobina de *Ascaris*. Respecto a *Ani s 1*, es el alérgeno reconocido por individuos con infección activa, en este estudio ningún individuo presentó anticuerpos por ELISA frente a este antígeno, por lo tanto, no se realizó WB confirmatorio.

Al comparar los resultados de los ELISAS de los sueros positivos frente a los alérgenos *Ani s 7* (2/150), *Ani s 3* (4/150) y *Ani s 13* (18/150) de *Anisakis* con las proteínas que reconocieron por WB frente al antígeno total del mismo parásito a nivel de los anticuerpos IgE, IgG e IgG4, se encontró que los dos sueros positivos a *Ani s 7* no reconocen proteínas a nivel de IgE para *Anisakis* a nivel de IgG ambos sueros reconocen proteínas con pesos moleculares de 50 kDa, 150 kDa y 250 kDa, y solo uno de los sueros reaccionó frente a una proteína de alto peso molecular de 250 kDa a nivel de IgG4 (Tabla 13).

De los cuatro sueros positivos por ELISA para *Ani s 3*, se observó que solo uno reconoce una proteína de alto peso molecular de 250 kDa a nivel de IgE, al estudiar los anticuerpos IgG, dos sueros reconocen proteínas de 50 kDa y todos reconocieron proteínas de 150 kDa y 250 kDa, mientras para IgG4 el inmunorreconocimiento fue hacia proteínas de alto peso molecular, dos sueros reconocieron proteínas de 150 kDa y todos reconocieron a 250 kDa (Tabla 13).

Respecto a los sueros positivos por ELISA frente al alérgeno *Ani s 13* de *Anisakis*, solo tres sueros reconocieron proteínas a nivel de IgE, uno reconoció una proteína de 150 kDa y los otros tres reconocieron proteínas de 250 kDa. Al estudiar los anticuerpos de la clase IgG se observa que todos los sueros reconocen alguna proteína entre los 37 kDa y los 250 kDa. Finalmente, a nivel de IgG4, los sueros reconocieron proteínas con pesos moleculares entre 50 kDa y 250 kDa, reconociendo en su mayoría proteínas de alto peso molecular (Tabla 13).

Tabla 13. Resultado del WB frente al antígeno total de *Anisakis* a nivel de IgE, IgG e IgG4, de los sueros positivos por ELISA frente a los antígenos *Ani s 7*, *Ani s 3* y *Ani s 13* de *Anisakis*.

Positivos por ELISA	ID	Western blotting <i>Anisakis</i>																				
		IgE							IgG							IgG4						
		25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250
<i>Ani s 7</i> (139 kDa)	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
	121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
<i>Ani s 3</i> (41 kDa)	2	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
	114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
	116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
<i>Ani s 13</i> (37 kDa)	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
	56	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-
	68	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	x	x
	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x
	78	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
	85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	x
	95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
	101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	x
	119	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	x
	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	x	-	x	x	x
	146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
	149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x

Reacción cruzada entre *Anisakis* y *Ascaris*: A Los 36 sueros con anticuerpos anti - *Anisakis* se le realizó WB a nivel de anticuerpos IgE, IgG e IgG4.

Todos los sueros reconocieron proteínas del antígeno de *Ascaris* y *Anisakis*, siendo la reacción más intensa frente a *Ascaris* en los anticuerpos IgE e IgG, y más intensa

para *Anisakis* en IgG4. El resultado no evidenció reacción cruzada entre *Anisakis* y *Ascaris*.

Todos los resultados descriptivos del WB para *Anisakis* y *Ascaris*, así como los patrones de inmuno reconocimiento se presentan en el anexo 24.

7.7. DISCUSIÓN

Este estudio se realizó en la ciudad de Cali, ubicada a 122 km de Buenaventura, el principal puerto pesquero de Colombia en el Océano Pacífico y de donde se distribuye el producto de la pesca hacia el interior del país (160,178,179). Sin embargo, se sabe que existe un manejo precario del producto pesquero en las etapas de extracción y comercialización, con un nivel mínimo de procesamiento en cubierta, lo que constituye uno de los principales problemas que enfrenta el subsector para su desarrollo, la carencia de servicios de muelle, procesamiento y frío, se ve reflejado en una inadecuada manipulación del pescado fresco y congelado (179), lo que favorece la supervivencia de agentes causantes de enfermedades parasitarias como los nematodos anisákidos, parásitos que requieren de organismos acuáticos para llevar a cabo su ciclo de vida, donde el humano puede actuar como hospedero accidental al consumir las formas infectivas a través de los peces (180). Por lo tanto, la presencia de peces capturados en Buenaventura parasitados con nematodos anisákidos, como se afirmó en el segundo capítulo de esta tesis, es una preocupación emergente para la seguridad alimentaria, ya que estos parásitos no sólo producen síntomas digestivos o extraintestinales asociados con los hábitos de consumo de pescado crudo, si no también causan cuadros alérgicos (175).

En este estudio, se indagó sobre los principales hábitos alimentarios asociados con el riesgo de anisakidosis (consumo de pescado crudo o poco cocido) en una población sana, se encontró, que el 87% de los participantes consumen pescado

crudo o semi crudo (sushi, marinado o en salazón). Este porcentaje de consumo de pescado es más alto que el presentado por estudiantes universitarios de Bucaramanga con un 74,2% (181), posiblemente, por que en la región Pacífica culturalmente hay un mayor consumo de pescado, y por ende puede ser una población mas expuesta a la anisakidosis. Además, se encontró que la población entre 26 a 45 años de edad aumenta la frecuencia de consumo de pescado crudo (tipos sushi) hasta cinco veces al mes, lo que pone en evidencia la acogida que ha tenido la dieta japonesa y mediterránea en la población más joven, esto abre la posibilidad de ocurrencia de anisakidosis en Colombia y la necesidad de investigar al respecto para conocer su situación real.

No obstante, la Unidad de Acuicultura y Pesca de Colombia en el 2017 para atender la demanda interna de Colombia, importó 180 millones de toneladas de pescado de origen asiático, donde como se mencionó anteriormente, las enfermedades parasitarias son endémicas y constituyen un problema de salud pública, por ende, la importación de estos peces hacia Colombia puede favorecer la aparición de casos de anisakidosis, por lo anterior, es interesante mencionar que el 53% de los participantes de este estudio compraban el pescado en almacenes de cadena y solo el 11% en galería o plazas de mercado, lo que favorece el consumo de peces importados, principalmente de origen asiático, siendo este un producto más económico para la población.

Adicionalmente, en el estudio de seroprevalencia se encontró un mayor porcentaje de positividad en el grupo de personas que habitualmente consumían pescado y que compraba el pescado en almacenes de cadena, principalmente para el antígeno *Ani s 13* que corresponde a la hemoglobina parasitaria, considerada uno de los alérgenos mayores de *A. simplex* y que no presenta reacción cruzada con otros nematodos (154). Además, llama la atención que ocurre igual en el grupo que prefería consumir el pescado frito y que utilizaba la congelación como medio de preservación, estos resultados hacen sospechar de una posible sensibilización al

alérgeno *Ani s 4*, este alérgeno no fue medido en este estudio, sin embargo, es una proteína que se caracteriza por ser termo resistente y por conservar su capacidad alergénica, en este sentido, consumir pescado adecuadamente cocinado o congelado pero contaminado con alérgenos de *Anisakis* representa un riesgo para la salud en algunos pacientes sensibilizados (110,149,182), sin embargo, esa afirmación es cuestionada por varios autores y se encuentra actualmente en debate.

Cuando se indagó sobre las especies de peces de mayor consumo, se registró una preferencia por la tilapia (*Oreochromis* sp.), el atún (*Thunnus* sp.), el salmón (*Salmo* sp.), la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y el pargo (*Lutjanus* sp.), aunque estas preferencias coinciden con investigaciones realizadas en la población de Medellín y Bucaramanga (181)(183), no se puede hacer una asociación entre estas especies y la anisakidosis, debido a que varias de las especies son de agua dulce y solo el pargo (*Lutjanus* sp.) se encuentra entre las especies muestreadas en el capítulo 1 de esta investigación, el cual se encontró negativo para nematodos anisákidos en este estudio. Cabe resaltar que, dado que se trata de una encuesta, no se puede descartar un sesgo en el conocimiento sobre las especies de consumo por parte del voluntario.

Respecto a los antecedentes clínicos de la población, el 11% manifestó haber presentado síntomas digestivos asociados al consumo de pescado, un 12% síntomas alérgicos por la misma causa y un 2% síntomas tanto digestivos como alérgicos, estos porcentajes son más altos que los reportados en la población de la Universidad de Bucaramanga donde el 9,6% eran alérgicos al pescado (181). Aunque no se puede afirmar que estos síntomas son ocasionados por nematodos anisákidos, se sabe que en Europa y Asia muchos casos de urticaria de pacientes que consumen con frecuencia pescado poco cocido, han sido diagnosticados con anisakidosis alérgica o gastroalérgica (184,185). Además, cuando se analizaron las variables de los participantes que consumen los pescados en salazón y los consumidores de mariscos, se encontró que tenían una mayor probabilidad de padecer urticaria y que a mayor ingesta de pescado esta probabilidad aumentaba.

En este sentido, la urticaria se ha visto presente como un síntoma en el contexto de la Anisakiósis Gastro-alérgica (AGA), donde la respuesta inmunológica contra este nematodo se parece a la inducida por otros helmintos, pero los síntomas alérgicos son mucho más frecuentes en GAA. Esto podría deberse a la falta de relación co-evolutiva entre el hospedador y el parásito (186). En GAA, las complicaciones abdominales inducidas por el parásito no existen y la urticaria en GAA se considera un mecanismo para expulsar rápidamente la larva de *A. simplex*, donde los mastocitos sensibilizados no solo están presentes en la piel, sino también en la mucosa gastrointestinal (186).

Otro de los objetivos de este capítulo fue obtener la seroprevalencia específica a *A. simplex* en una población de Cali, se observó que 36 de los 150 voluntarios fueron positivos, para una prevalencia general del 24%, un porcentaje alto para una población de voluntarios sanos. Adicionalmente, al compararla con los resultados de estudios realizados en España, donde la anisakiosis (infección con *Anisakis simplex*) es una de las nematodosis más prevalentes, con una seroprevalencia variable entre regiones de ese país, oscilando entre 0,43% en Galicia a 15,7% y 22,1% en las regiones del interior y meridionales, respectivamente (177). Sin embargo, no está claro si estas diferencias pueden ser debido, a los métodos utilizados, los cuales pueden tener diferentes grados de especificidad (177), al igual que la prevalencia del 12.4% reportada para Madrid, donde el método empleado al igual que en Galicia, fue la técnica ELISA basada en el anticuerpo monoclonal UA3, que parece permitir el diagnóstico de casos de anisakiosis sin ningún resultado falso positivo y que reconoce dos proteínas de peso molecular de 139 y 154 kDa de *A. simplex*, como el alérgeno *Ani s 7* (177).

En este estudio se descartó la posibilidad de reacción cruzada con el nematodo *Ascaris*. El hecho de que los sueros presentaran una seropositividad del 92,6% a *Ascaris* frente al 24% de *Anisakis*, no hace sospechar que algún resultado positivo a *Anisakis* sea un falso positivo, sin embargo, no se exploró la posibilidad de

reactividad cruzada con alérgenos no parasitarios. No obstante, si el 24% de la seroprevalencia puede estar aumentado por la reactividad cruzada con alérgenos no parasitarios, la prevalencia del 1,3% encontrada para el antígeno *Ani s 7*, sigue siendo alta, en comparación con España, además, el alérgeno *Ani s 7* se conoce como una proteína que no tiene homología con ninguna otra y que es reconocida por el 100% de las personas que han estado en contacto con el parásito (151). Como ya se ha mencionado anteriormente, este alérgeno es reconocido por el anticuerpo monoclonal UA3 que ha demostrado presentar una especificidad del 100% mediante la técnica ELISA captura (176).

Respecto a los resultados frente al alérgeno *Ani s 1*, se encontró que ningún voluntario fue positivo. Estos resultados son acordes a la literatura (187), teniendo en cuenta que la respuesta de IgE a *Ani s 1* se asocia principalmente con anisakidosis gástrica, entendiendo esta como una infección activa por larvas de *Anisakis* y que los voluntarios de este estudio estaban todos sanos y no presentaban ninguna molestia digestiva en el momento de la toma de la muestra de sangre.

Cuando se analizan los resultados de prevalencia frente a *Ani s 3*, se observa una mayor positividad en el grupo de voluntarios con antecedentes alérgicos, esto se debe a que es una proteína termoestable que puede ser responsable de reacciones alérgicas en individuos sensibilizados y que puede generar una reacción cruzada con la tropomiosina de otros invertebrados (72). Además, es conocida como un alérgeno de peces, principalmente de la Tilapia (188), y del 2,7% de voluntarios que presentaron anticuerpos frente a *Ani s 3*, todos afirmaron consumir Tilapia como su primera opción de consumo.

Sin embargo, aunque en Colombia no existen reportes de anisakiosis humana a pesar de presentar una seroprevalencia tan alta, como la aquí presentada, hace pensar que la diferencia con los casos reportados en España se puede deber a otras razones y que para explicarlas, se deben realizar estudios que permitan conocer el

estado inmunológico de la población colombiana en cada uno de los posibles cuadros clínicos de *Anisakis*, y compararla con una población con alergias confirmadas a acaros y a otros alimentos, para descartar con certeza la reacción cruzada.

No obstante, la medida de prevención para el control de la anisakidosis es relativamente sencilla, en Europa donde está plenamente identificada, la legislación señala que el pescado que vaya a consumirse crudo o poco cocinado debe congelarse a -20°C en la totalidad del producto por mínimo 24 horas (Reglamento (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004) (25). En Colombia, estos patógenos no están identificados y por ende no son diagnosticados, por lo que no existe una legislación clara al respecto. No obstante, el Ministerio de Salud en el decreto número 561 del 8 de marzo de 1984 (189) reglamento en cuanto a la captura, procesamiento, transporte y expendio de los productos de la pesca, indica que el proceso de eviscerado de los peces puede realizarse en cubierta, dependiendo de la disponibilidad de agua para el lavado, o cuando el producto llegue al muelle, esta última opción facilita que parásitos como los anisakidos puedan desplazarse de las vísceras a la musculatura del pez, antes del eviscerado, lo que pone en riesgo al consumidor final.

7.8. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio sugieren que el consumo de pescado crudo o poco cocido en Colombia puede ser un factor de riesgo para la población en la adquisición de larvas de anisakidos.

La técnica de ELISA frente al antígeno *Ani s 7*, no presenta reactividad cruzada con otros antígenos, por lo tanto, se puede afirmar que la seroprevalencia a *A. simplex* en una población de Cali es de 1,3%.

A pesar que en el capítulo uno y dos de esta tesis no se confirmó la presencia de la especie *A. simplex*, el estudio inmunológico mostró que sujetos consumidores habituales de pescado en la ciudad de Cali son seropositivos a *A. simplex*, por lo que es importante realizar estudios que permitan la identificación de larvas de *A. simplex* en los peces que se consumen habitualmente en esta población asociados con estudios inmunológicos que permitan conocer la presencia de homología entre las proteínas de *A. simplex* y las especies *A. pegreffi* o *A. physeteris* que si fueron identificadas en esta investigación.

7.9. RECOMENDACIONES

Se comienda estudiar la posible reacción cruzada con alérgenos no parasitarios, especialmente las tropomiosinas de otros organismos previamente identificadas como alérgenos.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado donación de muestras por la empresa E.AT. Asesorías pesqueras

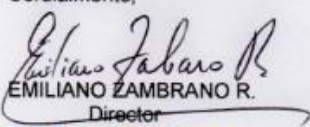
**EMPRESA ASOCIATIVA DE TRABAJO ASESORIAS PESQUERAS**
NIT 835000405 – 9

Buenaventura, 9 de diciembre del 2015

A QUIEN CORRESPONDA

Por medio de la presente, certificamos que la empresa **E.A.T Asesorías pesqueras**, realiza monitoreo mensual de las especies de peces capturadas en pesca artesanal en la Bahía de Buenaventura, actividad realizada en desarrollo del Programa de Observadores Pesqueros Colombia que se ejecuta en el marco de la Alianza Estratégica suscrita entre la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca de Colombia – AUNAP – Conservación Internacional Colombia y la E. A. T. Asesorías Pesqueras, las muestras colectadas son donadas para el desarrollo del proyecto titulado **“Identificación de anisakidos en peces de consumo del Pacífico Colombiano – Ecuatoriano y evaluación de la seroprevalencia en una población de Colombia”**, a cargo de la estudiante del programa de doctorado en ciencias biomédicas, **JENNIFFER ALEJANDRA CASTELLANOS**, de la Universidad del Valle.

Cordialmente,


EMILIANO ZAMBRANO R.
Director
E. A. T. Asesorías Pesqueras

Calle 5 Nº 53 A – 24 Barrio La Transformación
Tel. 2432642 - Cel. 3216168517 Buenaventura – Valle.
CORREO ELECTRONICO: emiliano.zambrano@gmail.com
eataspes@gmail.com

Anexo 2. Permiso de colecta Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí



Avenida 4 y calle 12 Edif. Pinoargotto
PBX: (593) 05 2611410
P.O. BOX: 1305 163
<http://subpesca.gob.ec>
Manta - Ecuador

Oficio Nro. MAGAP-SRP-2015-0714-0F

Manta, 06 de abril de 2015

Asunto: SOLICITA EMITIR UN PERMISO DE PESCA PROVISIONAL PARA LA EJECUCIÓN DE PROYECTOS CON PESQUERIA DE ARRASTRE EN LA ORILLA DE MAR CON CHICHORRO DE PLAYA. SR. YANIS CRUZ QUINTANA-COORDINADOR DE PROYECTOS.

Señor
Dr. Yanis Cruz Quintana
Coordinador de Proyectos
UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABI
En su Despacho

De mi consideración:

En Respuesta a oficio en el cual el Dr. Yanis Cruz Quintana, PhD. Coordinador de Proyectos del Dpto. Central de Investigación de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, solicita al Viceministerio de Acuicultura y Pesca se le extienda permisos provisional para realizar colectar muestras como se detalla a continuación:

Nombre del Proyecto	Método de colección de muestras	Muestra especies Objetivos
Edad y crecimiento de los batoideos en el Pacífico ecuatoriano	Arrastre en la orilla de mar con chinchorro de playa	Batoideos
Diversidad y aspectos biológicos de los batoideos del Pacífico ecuatoriano	Arrastre en la orilla de mar con chinchorro de playa	Batoideos
Variación espacio temporal de la biología reproductiva y bioacumulación de metales en <i>Panulirus gracilis</i>	Red de enmalle	Langosta <i>Panulirus gracilis</i>
Biodiversidad y estructura de la comunidad de parásitos metazoarios en peces marinos de importancia económica en Ecuador	Arrastre en la orilla de mar con chinchorro de playa y en puertos pesqueros	Peces marinos de importancia económica en Ecuador

Se concluye:

Oficio Nro. MAGAP-SRP-201 5-0714-0F

Manta, 06 de abril de 2015

La Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí es una persona Jurídica, con domicilio en la ciudad de Manta, provincia de Manabí, es una institución que mantiene carreras de formación profesional en las áreas de Ciencias del Mar, Ciencias de la Educación, Turismo, Trabajo Social, Economía, Agropecuaria, Medicina, entre otras.

Entre sus fines principales consta la investigación científica, la formación técnica y profesional, la creación, difusión y desarrollo de la cultura nacional, con objetivos claros entre los que se encuentran el estudio y planeamiento de soluciones para problemas de la región como también el mejoramiento de la producción de bienes y servicios en pro del desarrollo sustentable de la provincia y del país en general.

Las Facultades tienen la responsabilidad de desarrollar investigación científica, la conservación y manejo de recursos naturales mediante la capacitación del personal académico, preparación de profesionales y difusión de los resultados hacia la comunidad; a través de las carreras profesionales que puedan aportar con el desarrollo del sector Pesquero.

Es necesario que el Viceministerio de Acuicultura y Pesca desarrolle temas urgentes y de mediano plazo, como es la investigación de campo, planes de fomento y desarrollo pesquero, programas de capacitación, asistencia técnica en planificación y ejecución de proyectos, actualización de base de datos; por lo que se hace necesario contar con personal con nivel académico que coadyuve a complementar la labor de la Subsecretaría de Recursos Pesqueros en diferentes áreas que no cuente con Talento Humano especializado.

Toda vez que el Viceministerio de Acuicultura y Pesca y la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí poseen un convenio, el cual ha sido renovado por varias ocasiones y, en apoyo a la cooperación interinstitucional para el manejo de los recursos pesqueros, es procedente brindar la AUTORIZACIÓN para coleccionar las muestras solicitadas bajo el siguiente esquema:

Método de colección de muestras	Muestra especies Objetivos	Lugar
Arrastre en la orilla de mar con chinchorro de playa	Batoideos	Costas de Manabí
Arrastre en la orilla de mar con chinchorro de playa	Batoideos	Costas de Manabí
Red de enmalle	Langosta <i>Panulirus gracilis</i>	Costas de Manabí
Arrastre en la orilla de mar con chinchorro de playa y en puertos pesqueros	Peces marinos de importancia económica en Ecuador	Costas de Manabí (Incluye Jaramijó, Jamas, Manta y Pto. López)

Oficio Nro. MAGAP-SRP-2015-0714-0F

Manta, 06 de abril de 2015

Para lo cual deberán cumplir:

1. Informar cuando se lleven a cabo la recolección de las muestras, con la finalidad de que un servidor público del Viceministerio de Acuacultura y Pesca acompañe en las mismas.
2. Las muestras por ningún motivo deberán recolectarse dentro de las áreas protegidas del SNAP.

La vigencia de la AUTORIZACIÓN para la colecta de muestras será hasta diciembre del 2016, fecha en la cual terminan los proyectos de investigación.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Blgo. Víctor Ezequiel Alcivar Rosado
SUBSECRETARIO DE RECURSOS PESQUEROS. ENCARGADO

Referencias:

- MAGAP-SRP-2015-I 570-E

Anexos:

- SOLICITUD

Copia:

Señor Biólogo
Molke Miguel Mendoza Ávila
Director de Control Pesquero

ev

Anexo 3. POE para la caracterización histológica de parásitos Anisákidos

	PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR PARA LA CARACTERIZACION HISTOLOGICA DE PARASITOS ANISAKIDOS (NEMATODA)	CÓDIGO:
		VERSIÓN: 01
		FECHA DE VIGENCIA
Laboratorio de Histología		PÁGINAS: 1 DE 26
Elaboró Jenniffer A. Castellanos	Revisó Prof. Liliana Salazar	Aprobó Prof. Liliana Salazar
Fecha 10-julio-2015	Fecha 11-julio-2015	Fecha 13-julio-2015

Introducción

La primera descripción de larvas de anisakidos en peces fue a finales del siglo XIX, y a mitad del siglo XX se dio a conocer como un problema de salud pública al ser identificado como el agente etiológico de la zoonosis denominada anisakidosis. El riesgo para la salud pública lo ocasionan las larvas de tercer estadio (L₃) que se encuentran en el tejido muscular o vísceras de los peces. Por tanto, el hombre adquiere la infección, mediante el consumo de pescado crudo o insuficientemente cocinado.

El cuerpo de los nematodos anisakidos es cilíndrico, alargado, sin segmentación. La cutícula está marcada por estriaciones finas transversales. El sistema digestivo es completo, dispone de boca, esófago, intestino y ano. La apertura bucal dispone de varios labios y un diente cuticular. El esófago tiene dos porciones, una anterior muscular llamada proventrículo y otra posterior glandular denominada ventrículo. Poseen un sistema nervioso rudimentario con un anillo nervioso situado en el tercio anterior del parásito, el sistema excretor se sitúa debajo de la apertura bucal o a nivel del anillo nervioso según el género.

1. **Objetivo:** Dar una guía para el procedimiento histoquímico de parásitos anisakidos (Nematoda)

Alcance: Facilitar a todo el personal del Laboratorio de Histología de la Universidad de Valle un protocolo de Procedimiento Operativo Estándar (POE) para el procesamiento histológico de parásitos anisakidos (Nematoda).

2. **Autoridad y Responsabilidad:** El coordinador del laboratorio es la autoridad del documento. La responsabilidad es de cada persona que desarrolla este POE

3. **Muestra:** Nematodos aislados de peces, fijados en formalina caliente al 4% (parásitos vivos) y almacenados en alcohol 70%. Los parásitos muertos no se les realizan el paso por formalina caliente.

4. Elementos de protección

- a. Gorro
- b. Gafas de protección
- c. Tapabocas
- d. Bata de manga larga
- e. Guantes de Nitrilo
- f. Zapatos cerrados

5. Equipos, materiales y reactivos

5.1 . Materiales para la deshidratación:

Equipo procesador de tejidos Leica TP1020



Alcohol1 70% (1000 ml)

Alcohol1 80% (1000 ml)

Alcohol2 80% (1000 ml)

Alcohol1 95% (1000 ml)
Alcohol2 95% (1000 ml)
Alcohol absoluto 1 (1000 ml)
Alcohol absoluto 2 (1000 ml)
Xilol1 100% (1000 ml)
Xilol2 100% (1000 ml)
Parafina 1 Histoplast PE (1000 ml)
Canastillas para tejido

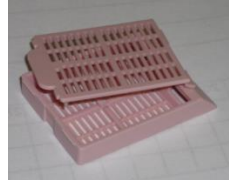


Tabla para seccionar el tejido
Cuchillas para seccionar el tejido
Lápiz para rotular canastilla

5.2 . Materiales para la inclusión en parafina

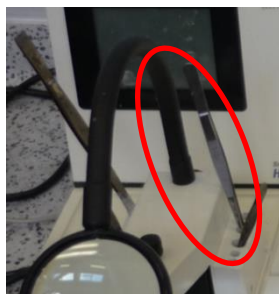
Equipo de inclusión Thermo Scientific Shandon Histocentre 3 (Integra tanque de parafina, tanque de tejido, y zona de enfriamiento)



Parafina Histoplast. (Hasta 5000 ml en el tanque)
Molde metálico para inclusión



Pinzas metálicas para manipulación de tejido



5.3 Materiales para corte en micrótomó

Micrótomó Leica RM2135



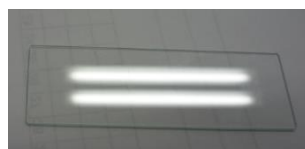
Baño maría Boekel Philadelphia PA



Cuchilla biplana para micrótomó de rotación



Portaobjetos



Cajilla metálica portamuestras



Horno a 37 °C Thelco



2 Pinceles

Lápiz de punta de diamante

Agua destilada

Gelatina

Se debe contar con buena iluminación en el sitio donde se realizan los cortes.

5.4 . Materiales para la coloración de Hematoxilina y Eosina

Campana de extracción de gases



Cronómetro temporizador



Canastilla metálica portamuestras



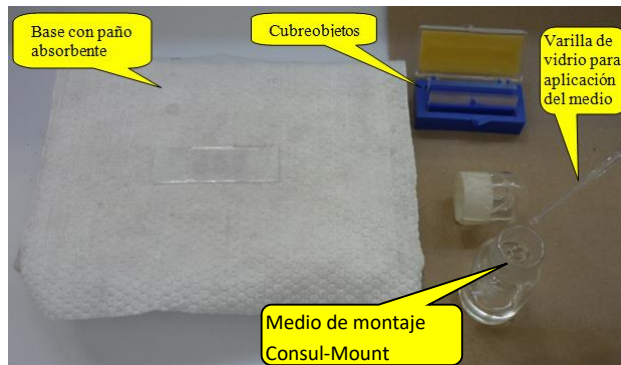
1 coplin
 80 ml de xilol
 80 ml de alcohol 100%
 80 ml de alcohol 95%
 80 ml de alcohol 80%
 80 ml de alcohol 70%
 Agua (fluyendo en contenedor de agua)
 80 ml de hematoxilina de Harris filtrada
 Contenedor grande (1500 ml para enjuague de tejidos con agua)
 Agua (fluyendo en contenedor de agua)
 80 ml de eosina
 Agua (fluyendo en contenedor de agua)
 80ml de alcohol 100%
 80 ml de alcohol 100%
 80 ml de xilol
 80 ml de xilol



Contenedor para residuos de hematoxilina.

5.5 . Materiales para el montaje final

Base con paño absorbente para realizar proceso
Varilla de vidrio para la aplicación del medio de montaje



Medio para montaje Consul-Mount



Placas con cortes inmersas en el último Xilol de la coloración realizada.
Cubreobjetos
Cuchilla para limpiar exceso de medio de montaje (cuando esté seco)

6. Procedimientos

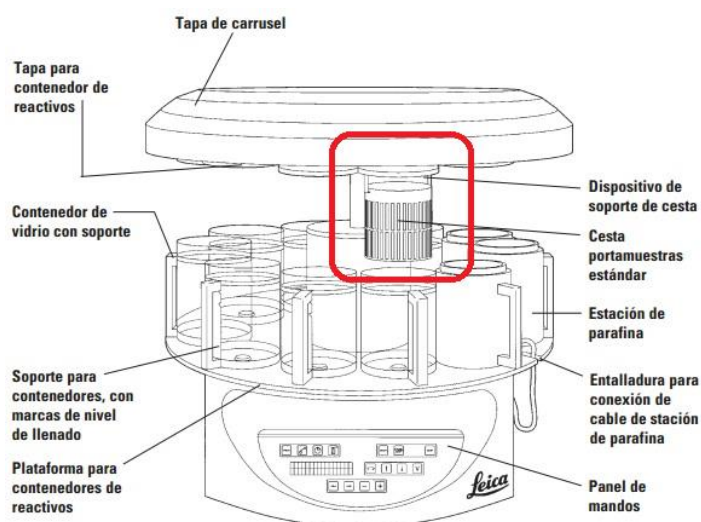
En todos los casos se debe usar la indumentaria y equipos de bioseguridad adecuada. **Para todos los procedimientos se debe solicitar instrucción a las encargadas del laboratorio Nhora Holguín o Martha Ceballos acerca del uso, encendido y apagado de cada uno de los equipos.**

6.1. Procedimiento para la deshidratación:

Se debe tener en cuenta evitar dejar la tapa del carrusel arriba mucho tiempo destapados para que no se liberen vapores en el laboratorio.



La muestra (parásitos nematodos) se deben colocar en canastillas y estas en la cesta portamuestra del procesador de tejidos. Esta cesta portamuestra debe descender en el vaso 1 (alcohol 70%).



Se programa los tiempos en que la muestra está en cada vaso

VASO	TIEMPO (Min)	VASO	TIEMPO (Min)
1- Alcohol 70%	30	8- Xilol 1	60
2- Alcohol 80%	30		

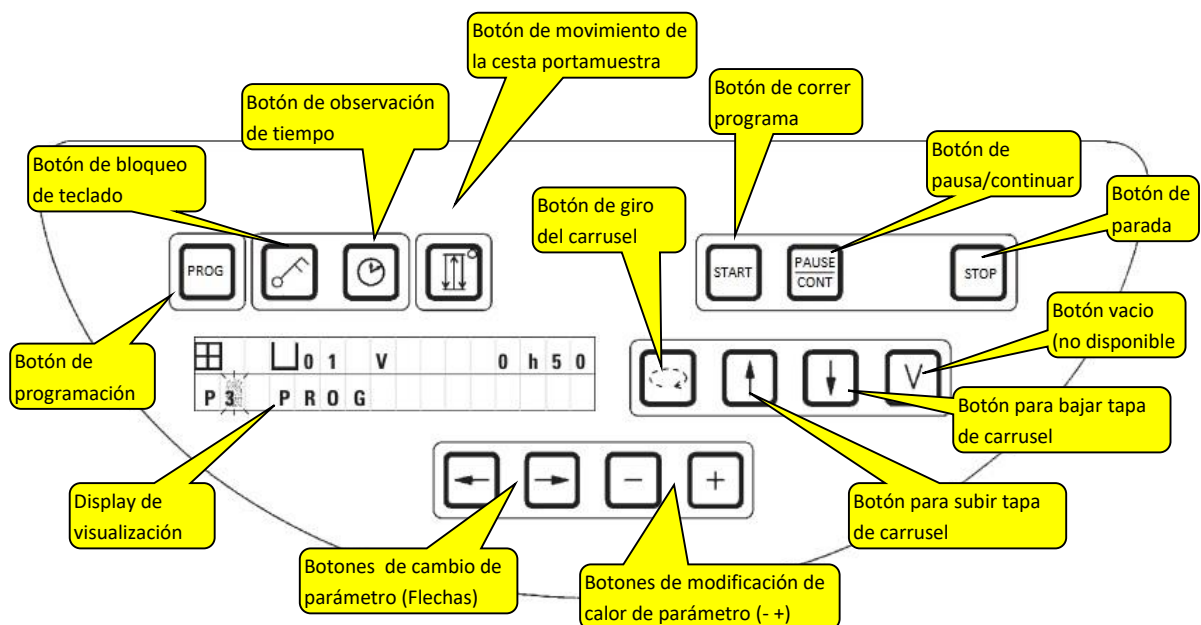
3- Alcohol 80%	30	9- Xilol 2	60
4- Alcohol 95%	30	10- Parafina	overnight
5- Alcohol 95%	30		
6- Alcohol 100%	60		
7- Alcohol 100%	60		

La programación del tiempo en el Vaso 1, se puede realizar de tal manera que la muestra salga a inclusión en horas laborales o a una hora deseada.

NOTA: Para tiempos cortos de deshidratación-aclaramiento-infiltración, el procesador se debe activar con anterioridad para que la parafina se caliente y derrita.

PROGRAMACIÓN DE LOS TIEMPOS EN EL PROCESADOR DE TEJIDOS LEICA TP1020

Para poner en marcha el procesador de tejidos, se programa el tiempo que estará la muestra en cada uno de los vasos desde el panel de control.



Se presiona el botón  para que la tapa del carrusel ascienda y se puedan introducir las canastillas con las muestras en el vaso 1 y evitar que se sequen.

- Cuando las muestras estén en el vaso 1, presionar el botón  para que la tapa del carrusel descienda.

- Se presiona  para que se active la función de programación. El display se activa el número de programa. . Con las teclas   se escoge el número del programa. Para efectos del desarrollo de este POE se escoge el numero 3.

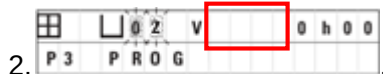
- Con las teclas   se salta de un parámetro a otro en el display. Presionar  para que el cursor del display salte a la línea superior. .

- Presionar la  para que el cursor se posicione en el display en el parámetro Vaso #. .

- Presionar  hasta que el cursor este en el tiempo indicando las horas . Los tiempos que se pueden programar varían entre **00h 05** hasta **99h 59**. Si se desea que la hora en que termine el proceso sea por ejemplo al otro día en horas hábiles, entonces se programa el tiempo en el vaso 1 para que la muestra quede en ese vaso el tiempo necesario y la terminación del proceso de infiltración en la parafina coincida con la hora deseada.

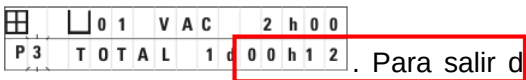
- Se presiona las teclas   para modificar el valor del número de horas en el vaso 1. Se presiona de nuevo  para que el cursor permita modificar los minutos en el vaso 1.

- Con la tecla  se regresa al numero del vaso. Se presiona  para pasar al vaso



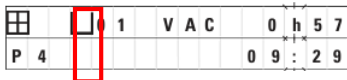
- Presionar  hasta que el cursor este en el tiempo indicando las horas . Se modifica este tiempo y lo mismo se realiza con los minutos.

- Estos pasos se realizan para cada uno de los vasos (en total 12) en el procesador de tejidos. Si se desea saltar un Vaso, colocar tiempo **00h 00**.

- Cuando todos los vasos han sido programados, se presiona  para visualizar el tiempo total de duración del proceso . Para salir de este parámetro se presiona de nuevo el mismo boton .

- Para terminar el proceso de programación, se presiona .

- Para poner en marcha un programa, se presiona  y con los botones   se escoge el programa deseado. Luego se presiona de nuevo  para que inicie el proceso de deshidratación-aclaramiento-infiltración.

- En el display se debe observar titilar de manera simultánea la letra “h” y “:” en los tiempos programado y hora local . La línea superior indica el tiempo restante de la muestra en el vaso mostrado, y la línea inferior muestra la hora local.

- Finalmente se presiona  para bloquear el programa que se esta corriendo y evitar cambios si se presiona cualquier otro botón por accidente. Para desbloquear botones, presionar de nuevo .

Cuando se termine el tiempo de infiltración de la parafina, el procesador hace sonar una alarma.

NOTA: Estar atento a la hora de finalización del proceso de deshidratación e infiltración del tejido en parafina. Si se deja éste mucho tiempo después de terminar, el tejido se quema y se pierde.

Inmediatamente termine la infiltración, se retiran los tejidos de la cesta portamuestra y se colocan en el tanque de tejidos del centro de inclusión.

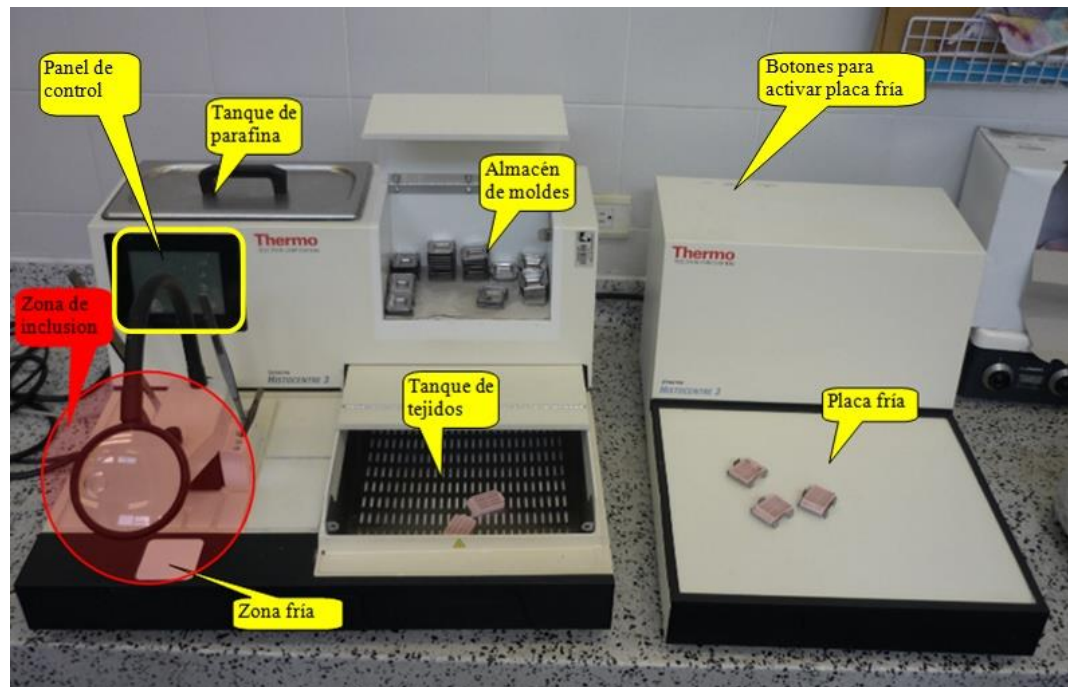
Al final, la cesta portamuestra se lava con agua caliente y detergente en polvo para eliminar residuos de parafina.

6.2. Procedimiento para la inclusión en parafina

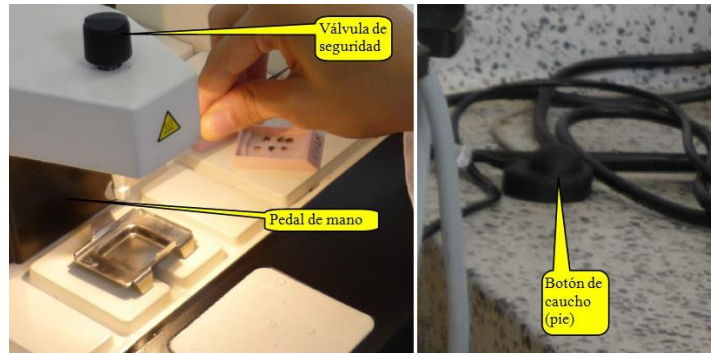
En el proceso de inclusión, la muestra se embebe en parafina en un molde metálico. En este proceso se hace uso de la central de inclusión.

Para iniciar el proceso, la muestra debe estar en el tanque de tejido a una temperatura de 56°C, para que la parafina se adhiera bien al tejido y no se formen dos fases por estar el tejido frío y endurecido. De igual forma, los moldes deben estar a 56°C. Además, es **OBLIGATORIO** que el tanque de parafina se active a una temperatura de 56°C 24 horas antes de iniciar el proceso. Adicionalmente, las pinzas deben estar en la zona caliente (56°C) para que al manipular la muestra no se solidifique la parafina en la zona de agarre.

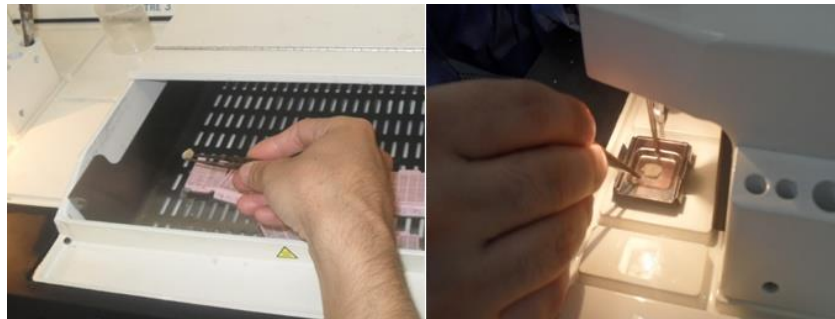
También se requiere que la placa fría se active desde el panel de control y se active presionando un botón en la parte trasera del dispositivo



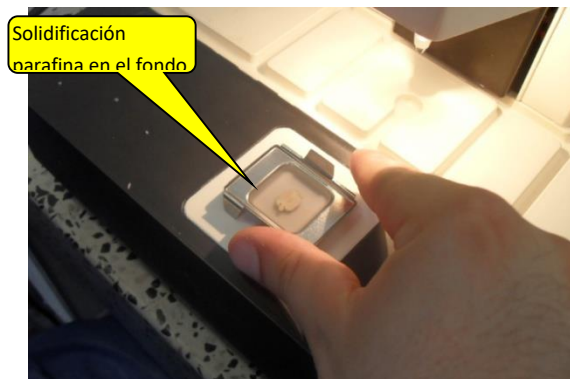
Se toma molde del almacén de moldes y se coloca en la zona de inclusión bajo el dispensador de parafina. Se abre la válvula de seguridad del dispensador de parafina, y se presiona el pedal situado en frente del molde, o se presiona el botón de caucho con el pie para que se deposite una capa delgada de parafina en el molde.



Se toma el tejido del tanque de tejido y se traslada al molde con una pinza que esta a una temperatura de 60°C para que no se solidifique el espécimen en contacto con ésta.



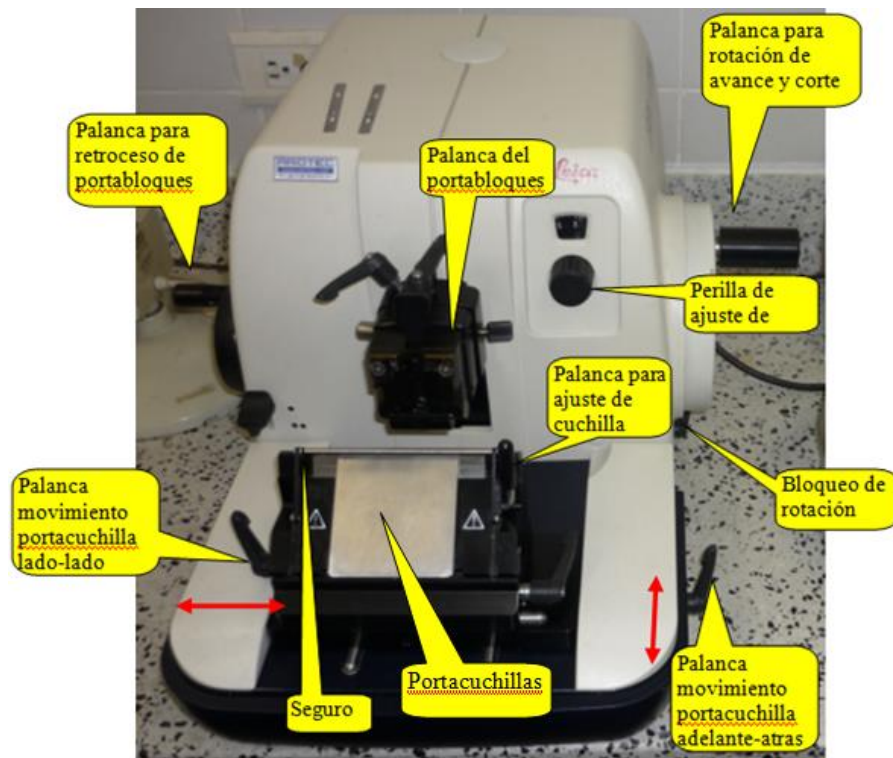
El espécimen se deposita en el molde con la capa de parafina. Se agrega parafina hasta que sobrepase el tejido y se acomoda en la posición deseada. Este molde con el espécimen se coloca en la zona fría para que solidifique la parafina y mantenga en posición el tejido. Luego se llena con parafina hasta el borde.



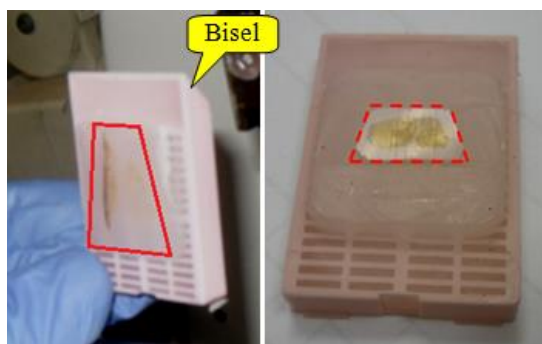
El proceso de corte se realiza en el micrótomoto de rotación



Cuidado en la manipulación de la cuchilla, puede sufrir corte en los dedos; No dejarlas tiradas sin protección.



Antes de iniciar el proceso de corte, a los bloques se perfilan formando un trapecio, con la parte más angosta hacia la zona biselada del bloque.

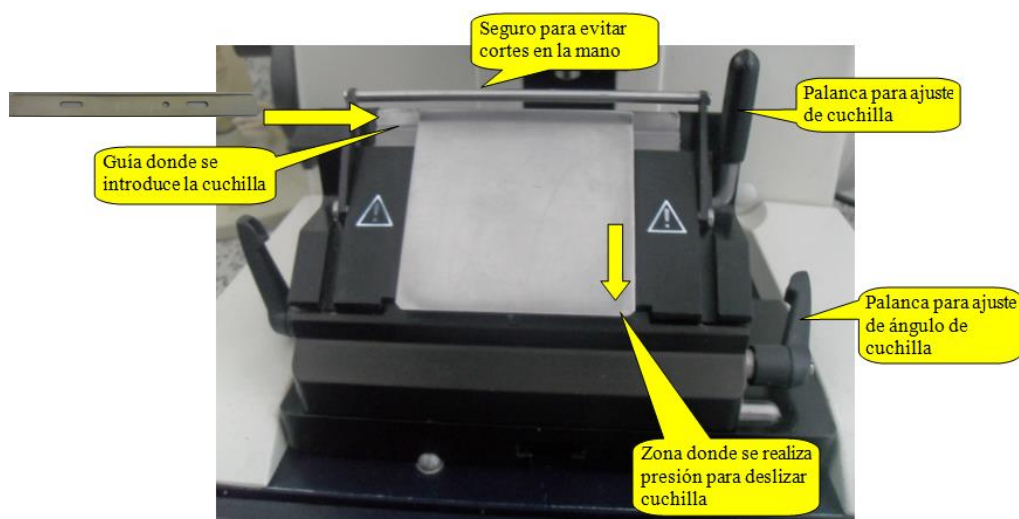


Al baño María se le agrega agua y se enciende con 1 hora de anterioridad al inicio del proceso de corte. Se deja calentar el agua a aproximadamente 80 °C y se le agregan 2 gr de gelatina. Se homogeniza la solución. Cuando este homogénea, la temperatura se baja aproximadamente a 55°C.

Se prepara la cuchilla para micrótopo: se limpia con xilol para eliminar restos de parafina y luego con alcohol al 70%. Se debe procurar utilizar la misma cuchilla para los mismos tipos de tejidos. **No usar cuchillas utilizadas para cortes de muestras vegetales o muestras muy duras en cortes de muestras animales o blandas**



Se afloja la palanca de ajuste de cuchilla, se presiona la placa de aluminio y se desliza la cuchilla hacia el centro y se aprieta de nuevo la palanca de ajuste de cuchilla. **Se coloca el seguro para evitar cortes en la mano.**



Antes de realizar el corte, los bloques se colocan en frío para que el tejido se corte con mayor facilidad.



La palanca del portabloques, se presiona con fuerza y se coloca el bloque con el lado con bisel hacia arriba.



Mediante la perilla de ajuste, se selecciona el espesor que tendrá los cortes. Este puede variarse en el proceso de corte. Por ejemplo, para realizar tinción con Hematoxilina–Eosina el grosor del corte se realizará a 4 μm , mientras que para Nissl se realizará a 8 μm .



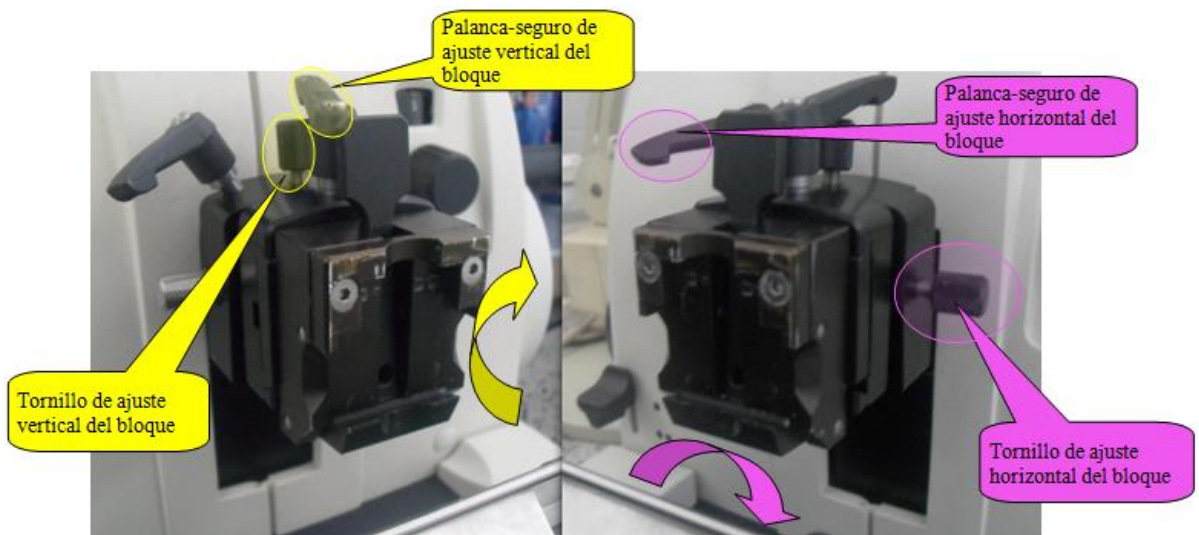
Se verifica que el ángulo de corte este entre 0 y 10. Si no, colocarlo en entre estos valores. Esto evita que la cuchilla se incruste en el bloque por estar demasiado inclinada, o que, por el contrario, no corte debido a un ángulo de inclinación muy pequeño, estando la cuchilla muy paralela a la cara del bloque (García del Moral 1993).



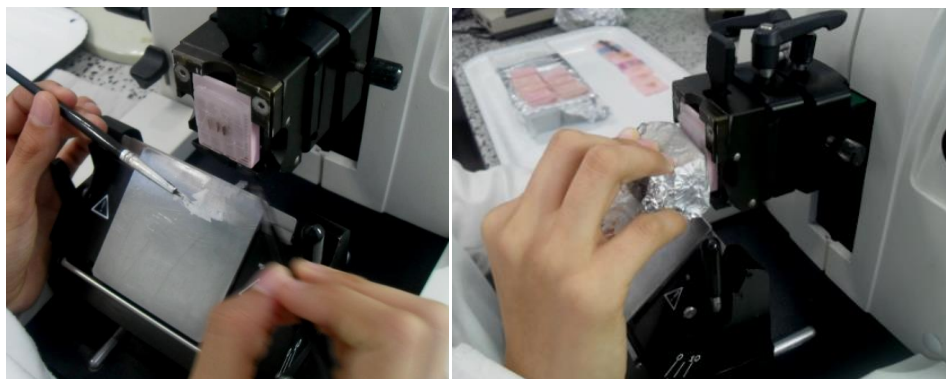
Antes de iniciar, se retira el seguro de rotación del micrótom. Luego, se desbasta el bloque haciendo girar en sentido de las manecillas del reloj la palanca de avance y corte.



Si se requiere colocar la muestra de manera frontal, se aflojan levemente las palancas de ajuste vertical y horizontal del portabloques y los tornillos que giran hasta la posición deseada. **Tener cuidado con cortarse los dedos. Coloque el seguro para evitar cortes en la mano**



Se realizan los cortes y se toman con un pincel cuyas cerdas estén húmedas para mayor adherencia, y con otro se suelta del filo de la cuchilla previa activación del bloqueo de rotación. **Tener cuidado con cortarse los dedos.** Entre serie de cortes se puede aplicar frio al bloque para que el corte sea más fácil de realizar



Los cortes realizados se colocan en baño María (temperatura aproximada 55°C) para que estiren.



Posteriormente se toma el portaobjeto (cromoaluminados o no), se sumerge en el baño, y se coloca cuidadosamente sobre este sacando el portaobjeto lentamente del agua.



Las placas ubicadas verticalmente se colocan en un paño para que absorba exceso de agua. Posteriormente el portaobjeto se rotula con el lápiz de punta de diamante y se coloca en canastilla metálica portamuestra.



Cuando se cambia de muestra para la realización de cortes, el portabloques se mueve hacia atrás mediante la palanca de retroceso, y se inicia de nuevo el proceso de corte de la nueva muestra.



Al terminar los cortes, la canastilla se lleva a horno a 37°C y se deja mínimo 24 horas para que los cortes se adhieran al portaobjeto.



NOTA: Al finalizar el proceso de corte, se debe limpiar el micrótopo, retirar la cuchilla, apagar el baño María y dejar todo en orden.

Problemas en el proceso de corte



Dificultades que provienen de mala fijación

- Por fijación incompleta, los bloques blandos al cortarse pueden quebrarse.
- Las líneas en los cortes pueden deberse a la dureza en el tejido, por lo que se debe cambiar la zona de la cuchilla con la que se corta y revisar el bloque.
- Cortes alternativamente gruesos y finos. Esto por fijación prolongada en fijadores como Zenker o Bouin.



Dificultades que provienen de defectuosa deshidratación, aclaración o inclusión

- Si el tejido ha sido insuficientemente deshidratado, el aclarador se vuelve lechoso. El aclaramiento y la impregnación con parafina no puede completarse, resultando un bloque blando. Si esto ocurre se puede remediar volviendo a tratar el tejido con alcohol absoluto.
- El aclaramiento insuficiente hace que el tejido aparezca opaco o nebuloso, haciendo muy difícil el corte. Si el tejido ya ha sido incluido en bloques, estos deben ser regresados al baño de parafina hasta que se fundan completamente y pueda regresarse al aclarador para continuar el proceso.
- La impregnación insuficiente puede producir un bloque "húmedo" que tiende a desmoronarse. La impregnación prolongada endurece demasiado el tejido y lo encoge más.



Dificultades que provienen del tejido

- Para tejidos grasos es mejor hacer cortes más delgados con el bisturí (2 mm).
- Hay ciertos tejidos que suelen endurecerse mucho como el cervix. Se obtienen mejores resultados si se reemplaza los agentes deshidratantes y aclaradores por tetrahidrofurano.



Dificultades que provienen de la cuchilla

- Si la cuchilla no se fija bien al micrótopo, puede saltar, especialmente al cortar tejidos duros.
- Si la cuchilla se ladea demasiado, se raspa más de lo que se corta y puede ser imposible obtener un corte.
- Se producen cortes de grosor irregular por mal ajuste del sujetador del bloque.
- Una cuchilla roma no puede producir buenos cortes. Las dentaciones o pequeñas melladuras en el filo de la cuchilla rayan o raspan los cortes en la dirección del movimiento. Si la cuchilla no está bien afilada puede ser difícil obtener "cintas" de tejido.
- Un borde romo produce distorsión y compresión del corte y aumenta cualquier tendencia a formación de pliegues.



Dificultades que provienen de las condiciones en el corte

- Si las cortes salen muy arrugadas, es porque la parafina está muy blanda para el grosor seleccionado, entonces se debe bajar la temperatura ambiental o el bloque se debe enfriar.

6.4 Procedimiento para la coloración de H&E



Para realizar el proceso de coloración, es indispensable contar con todos los elementos de bioseguridad personal, y tener cuidado en la manipulación de la batería debido a la alta toxicidad de algunas de sus soluciones, especialmente la solución de hematoxilina. También se requiere que el proceso se realice en campana de extracción de gases.

En cada paso de la coloración, las placas deben permanecer un tiempo determinado en cada una de los líquidos indicados. Ser riguroso con estos tiempos.

PASO	TIEMPO	PASO	TIEMPO
1- Xilol (1)	5 min	11- Carbonato de litio	1 tip
2- Xilol (2)	5 min	12- Agua	1 x 3 min
3- Alcohol 95%	2 min	13- Eosina	1 min
4- Alcohol 80%	2 min	14- Alcohol 70%	1 tip

5- Alcohol 70%	1 min	15- Alcohol 80%	1 min
6- Agua corriente	1 tip	16- Alcohol 90%	1 min
7- Hematoxilina	30 segundos (continua en paso 12) 1 min 1.5 min	17- Alcohol absoluto 1	5 min
8- Agua (corriente)	15 min	18- Alcohol absoluto 2	5 min
9- Alcohol acido	1 tip	19- Xilol 1	5 min
10- Agua	1 x 3 min	20- Xilol 2	5 min

El término “tip” se refiere a sumergir y sacar de manera inmediata las muestras de la solución.

Entre paso y paso del procedimiento, se debe absorber el exceso de solución del contenedor del que ha salido con papel absorbente para evitar al máximo la contaminación del líquido del siguiente paso.

En el paso 8, en que se sumergen las muestras en agua corriente; el agua con residuos de hematoxilina se deposita en contenedor de residuos de hematoxilina, por ser esta una solución muy contaminante.

Los cortes deben permanecer sumergidos en Xilol hasta que se realice el montaje con cubreobjeto.

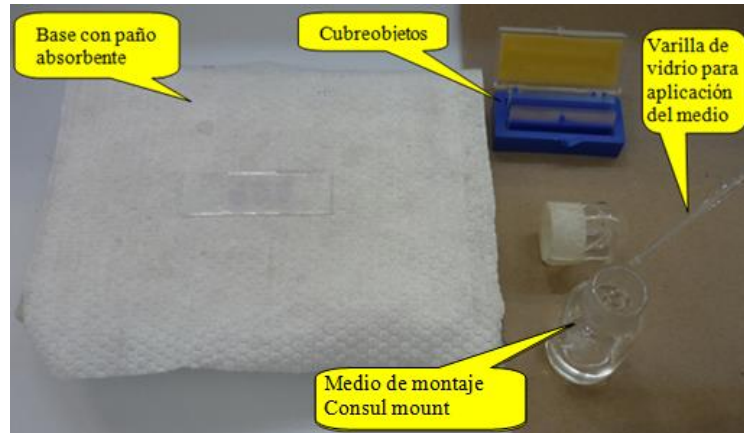
Al terminar el proceso, cada una de las soluciones se debe devolver a su contenedor de vidrio con ayuda de embudo, evitando al máximo el derrame de los mismos.

NOTA: Después de realizar la coloración, lavar con agua y jabón todos los contenedores metálicos, dejar todo en orden (en su respectivo sitio) y apagar campana de extracción de gases.

6.5 Procedimiento para el montaje final

Se debe usar la indumentaria y equipos de bioseguridad adecuada, teniendo en cuenta que el medio de montaje se diluye con xilol. Evitar exposición prolongada a estos vapores. Sacar una placa por vez del xilol, y cerrar el contenedor hasta la próxima placa.

Los cortes sumergidos en xilol, se extraen uno por uno para realizar el montaje del cubreobjetos. Primero se prepara la base con toalla absorbente, los cubreobjetos, el medio de montaje Consul mount.



Se colocan uno o dos cubreobjetos en la base dependiendo del área que abarca en el portaobjetos. Con la varilla de vidrio donde está contenido el medio de montaje, se agrega una gota a un lado del cubreobjetos formando una línea. Se debe colocar la varilla de vidrio dentro del frasco y taparlo, para evitar que seque el Consul-Mount. Si Hay medio de montaje muy espeso en la varilla, diluir con un poco de xilol.



Se extrae el portaobjetos con corte, y el exceso de xilol se le agrega al medio de montaje del cubreobjetos. El lado más largo se alinea con el lado en que se agregó el medio de montaje en el cubreobjetos y lentamente se va inclinando hasta que el cubreobjetos se adhirera al portaobjetos.



Se voltea la lámina porta objeto para que el cubre objeto o laminilla quede en la parte superior, y se realiza presión firme y suavemente para extraer excesos de medio de montaje.

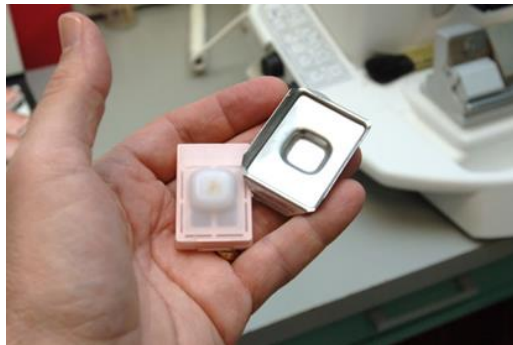
Cada placa se deja secar al aire libre al menos 24 horas para que el Consul-Mount solidifique completamente. Cuando la placa está seca, se limpia con cuchilla para eliminar excesos del medio de montaje.

Posteriormente se limpia con papel servilleta y se observa al microscopio.

7. Resultados

Después de terminado el tiempo en la infiltración, se tienen las muestras cubiertas de parafina. Se recomienda realizar de manera seguida el proceso de inclusión. Si no, dejar enfriar y calentar de nuevo a la temperatura de fusión de la parafina (aproximadamente 60°C) cuando se vaya a incluir.

Al final del proceso de inclusión se obtiene un bloque de parafina con la muestra que tiene como soporte la canastilla usada en el proceso de deshidratación e infiltración, la cual posteriormente se coloca en el micrótopo para realizarlos respectivos cortes.



El resultado de este procedimiento son los cortes montados en la placa portaobjetos y que pasados 24 horas están listos para realizar algún proceso de tinción deseado.



La hematoxilina tiñe azul violeta los núcleos y partes del citoplasma con abundancia de retículo endoplasmático rugoso. La eosina tiñe el citoplasma y colágeno color rosa.

8. Referencias bibliográficas

Cediel J. F., Cárdenas M. H., García A., Chuaire L., Payan C., Villegas V., Sánchez C. 2009. Manual de Histología. Tejidos Fundamentales. Facultad de Medicina. Editorial Universidad del Rosario. Bogotá. 366 pp.

Escarabajal M. D., Vargas J. P., López J. C., Portabella M., Carrasco M. 2006. Fundamentos de Psicobiología. Libro de práctica I. Primera Edición. Delta Publicaciones. España. 101 pp.

García del Moral, R. 1993. Laboratorio de anatomía patológica, editorial interamericana MacGraw-Hill.

García M., Belso E., Salas-Roda M., Gomez D., Arteaga D., Garcia L., Castilla M., Ruiberriz A., Ania J., Ochoa O., Caras J., Puertas E., Vilches A. 2006. Técnico Especialista en Anatomía Patológica del Servicio Gallego de Salud. Editorial MAD. España. 341 pp.

Molist, P. Pombal, M. & Megias, M. 2011. Atlas de histología vegetal y animal, técnicas histológicas: Capítulo 3. Universidad de Vigo. Pág. 5-21.

Montalvo, C. 2010. Técnica Histológica. En línea: http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/Doc/Repaso_I/Apuntes%20bloque%20I/3_tecnica_histologica.pdf

Ross M. H., Pawlina W. 2008. Histología: Texto y atlas a color con biología celular y molecular. 5 edición. Editorial Médica Panamericana. 992 pp.

Sandoval Z. E. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la Anatomía Vegetal. Instituto de Biología. UNAM. 277 pp.

Sass, J. 1958. Botanical microtechnique. Tercera edición. The Iowa State University Press. 224 p.

Thermo Electron Corporation. Ficha técnica Shandon Consul-Mount. Disponible en: https://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Various/File_23540.pdf

Torres F. 2002. Manual de técnicas en histología y anatomía patológicas. Barcelona: Editorial Ariel.S.A. pág 45-52.

Anexo 4. Aval del Comité de Ética Animal de la Universidad del Valle




Al contestar por favor cite estos datos:
Radicado No.: 2015413300190921
Fecha: 07-12-2015
TRD: 4133.0.5.2.205.019092
Rad. Padre: 2015413300116062

Doctor
FERNANDO CASTRO
Comité de Ética Humana y Animal
Facultad de Salud
Universidad del Valle (Sede San Fernando)
Calle 4 B # 36-00 Edificio 100 - primer piso del Decanato oficina 117
Tel: 5185670 / 77
Cali



Asunto: Respuesta a Radicado No. 2015-41330-011606-2

En respuesta a su solicitud de evaluación del proyecto de investigación titulado **"IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIDOS EN PECES DE CONSUMO DEL PACÍFICO COLOMBIANO – ECUATORIANO Y EVALUACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA EN UNA POBLACIÓN DE COLOMBIA"** (035-015), presentado por la investigadora JENNIFFER ALEJANDRA CASTELLANOS GARZÓN para su proyecto de tesis doctoral en la Escuela de Ciencias Básicas de la Universidad del Valle.

Una vez revisado el procedimiento a llevarse a cabo para obtener las muestras y determinar la presencia de larvas de nematodos de la familia Anisakidae en peces de consumo del Pacífico Colombiano – Ecuatoriano, y de anticuerpos anti-anisakidos en una población de Colombia, el uso de especímenes de la fauna silvestre acuática marina que serán usados no requiere de permiso para recolección, ya que éstos serán obtenidos en las plazas de mercado en cada sitio de muestreo.

Este proyecto de investigación solo realizará la revisión parasitológica de los peces obtenidos, por lo tanto, no se aplica ningún protocolo de sacrificio, ni requiere de permiso de recolección de especímenes por parte de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales.

Como parte del proyecto de investigación involucra seres humanos, el comité de ética en humanos se encargará específicamente de evaluar esta parte, y adjuntará su concepto.

Edificio Fuente de Versalles Avenida 5A Norte N° 20N-08
Conmutador: 5 24 05 80
www.cali.gov.co



ALCALDÍA DE
SANTIAGO DE CALI
DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO
DE GESTIÓN MEDIO AMBIENTE

El proyecto contiene un procedimiento experimental adecuado en lo relacionado con especímenes, por lo tanto, cuenta con el concepto favorable del Departamento Administrativo de Gestión del Medio Ambiente - DAGMA.

Atentamente,

DIEGO CARVAJAL TRUJILLO
Director (E.) DAGMA

Copia a: Expediente.

Elaboró: Zoot. Javier Cañas Ángel- Flora y Fauna Silvestre – Contratista profesional – DAGMA.

Revisó: Biol. Maribel Castillo Chantre – Flora y Fauna Silvestre – Contratista Profesional – DAGMA

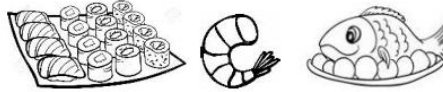
Aprobó: Ing. Janeth P. Alegría C. – Profesional Universitario – Control y Calidad Ambiental – DAGMA.

Edificio Fuente de Versalles Avenida 5A Norte N° 20N-08
Conmutador: 5 24 05 80
www.cali.gov.co

Anexo 5. Folleto informativo

¿Eres consumidor habitual de comida de mar?

Sushi – Salmon – Seviche – Camarones – Pargo – Atún – Cazuela



¿Sabías que estos alimentos pueden estar contaminados con parásitos?....

¿NO?

Uno de estos parásitos pueden ser Anisakidos y te pueden enfermar, causando:
alergia – urticaria - dolor abdominal, entre otros.



¿Quieres conocer sobre estos parásitos y si has estado en contacto con ellos?

Te invitamos a hacer parte de una investigación !!!

Te esperamos en la secretaria del Departamento de Morfología (1er piso del edificio 116, Univalle – San Fernando), o comunícate con Jenniffer Castellanos 3168233891
yeyecalca@hotmail.com

Te daremos toda la información y si quieres puedes ser voluntario!!!

Anexo 6. Permiso para uso de la encuesta diseñada para el estudio de Puentes et al., (2008)



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Departamento de Parasitología

Facultad de Farmacia

María del Carmen Cuéllar del Hoyo, Catedrática de Parasitología de la Universidad Complutense de Madrid, autoriza la utilización del cuestionario para la recogida de datos que abajo figura con el fin de su inclusión en el proyecto de investigación que se presenta. "Identificación de anisakidos en peces de consumo del Pacífico Colombiano – Ecuatoriano y evaluación de la seroprevalencia en una población de Colombia"

Madrid a 1 de septiembre de 2015

Los datos a recoger de donantes o de una muestra de la población son:

Edad, sexo,

Alergia alimentaria o respiratoria conocida. En caso de SI, detallar

Alergia a ácaros del polvo?

Otra enfermedad:

Parasitosis previa (en especial nematodos?):

Enfermedad infecciosa crónica:

Historia de urticaria aguda o crónica.

Cuestionario ingesta de pescado:

Alguna vez síntomas con pescado o con marisco? Digestivos? Cutáneos (alérgicos)?

Raciones de pescado por semana (o por mes)

Qué tipo de pescado, azul? blanco?

Forma de cocinado? Frito, hervido, empanado? vapor? horno?

Come pescado enlatado (conserva)? Con qué frecuencia?

Come pescado crudo? En salazón, ahumado? alguna especialidad local? Con qué frecuencia?

Pescado crudo en restaurante japonés? Con qué frecuencia?

Especies de pescado más frecuentemente consumido:

Frecuencia de ingesta de marisco

Que marisco come con más frecuencia?

Fdo. María del Carmen Cuéllar del Hoyo

Anexo 7. Encuesta para donantes voluntarios del proyecto: Prevalencia de anticuerpos anti- Anisakis en una población de Colombia

ENCUESTA PARA DONANTES VOLUNTARIOS

IDENTIFICACIÓN

1. Fecha (dd/mm/aa) ____ / ____ / ____
2. Teléfono fijo o celular: ____|____|____|____|____|____|____|____|____|____|
3. La persona entrevistada es: 1) Hombre ____| 2) Mujer ____|
4. Nacionalidad: 1) Colombiana ____ 2) Otra ____, Cual? _____
5. Fecha de nacimiento (dd/mm/aa): ____ / ____ / ____
6. Edad: _____

Cuestionario ingesta de pescado:

7. ¿Cuántas veces consume usted pescado al mes?

8. ¿Come usted pescado enlatado?
Si ____ No ____ ¿Con qué frecuencia (al mes)? _____ Qué tipo de pescado?

9. ¿Come pescado en restaurantes?
Si ____ No ____ ¿Con qué frecuencia (al mes)? _____
10. ¿En el restaurante como prefiere comerlo? (*Varias opciones*)
1) Frito ____ 2) Sudado ____ 3) Al vapor ____ 4) Al horno ____
5) Apanado ____ 6) Crudo ____ 7) Otro ____ Cual? _____
11. ¿Come usted pescado crudo por ej: en sushi, o seviche?
Si ____ No ____ ¿Con qué frecuencia (al mes)? _____
12. ¿Come usted pescado en salazón, ahumado, marinado?
Si ____ No ____ ¿Con qué frecuencia (al mes)? _____

13. ¿Qué especies de pescado consume con más frecuencia? (menciones 3)

1) _____ 2) _____ 3) _____

14. ¿Come usted alguna especie de marisco?

Si ____ No ____ ¿Con qué frecuencia (al mes)? _____

15. ¿Qué especies de mariscos consume con más frecuencia? (menciones 3)

1) _____ 2) _____ 3) _____

16. ¿Usted o en su casa, de qué forma prepara el pescado? (Varias opciones)

1) Frito ____ 2) Sudado ____ 3) Al vapor ____ 4) Al horno ____
5) Apanado ____ 6) No lo cocina ____ 7) Otro ____ Cual? _____

17. ¿En su familia que miembros prefieren comer el pescado?

1) Niños ____ 2) Adolescentes ____ 3) Hombres ____ 4) Mujeres ____
5) Adultos ____ 6) Todos ____

18. ¿En dónde compra pescado o mariscos?

1) Almacenes de cadena ____ 2) Plaza de mercado o galería ____ 3) Ambos ____
4) No compra ____ (Si no compra, pase a la pregunta 21)

19. ¿Cuándo compra pescada, en dónde lo guarda? (Varias opciones)

1) Congelador ____ ¿Por cuánto tiempo? _____
2) Refrigerador ____ ¿Por cuánto tiempo? _____
3) Recipientes ____
4) No lo almacena ____
5) Otra ____ ¿Cuál? _____

20. ¿Cuánto tiempo se demora para llegar a su casa desde el sitio donde compra el pescado? (una sola opción)

1) Menos de una hora ____
2) Entre 1 y 2 horas ____
3) Medio día o un día ____
4) Más de un día ____
5) No sabe/No responde ____

21. ¿Alguna vez ha presentado síntomas por consumo de pescado o mariscos?

Sí ____ No ____ Si la respuesta, es Si, mencione cuales:

1) Digestivos ____ 2) Cutáneos ____ 3) Alérgicos ____ 4) Otro ____, ¿cuál? ____
Cuestionario general:

22. ¿Es usted alérgico a algún alimento?

Si ____ No ____ Cual? _____

23. ¿Sufre usted de alguna alergia respiratoria?

Si ____ No ____ Cual? _____

24. ¿Es usted alérgico a ácaros del polvo?

Sí ____ No ____

25. ¿Sufre usted de otra enfermedad?

Si ____ No ____ Cual? _____

26. ¿Ha sido usted diagnosticado con alguna parasitosis (en especial nematodos)?

Si ____ No ____ Cual? _____ Hace cuánto tiempo? _____

No sabe o no responde _____

27. ¿Sufre usted de alguna enfermedad infecciosa crónica?

Si ____ No ____ Cual? _____ No sabe o no responde _____

28. ¿Ha sido diagnosticado con urticaria aguda o crónica?

Sí ____ No ____ No sabe o no responde _____

Si la respuesta, es **Si**, mencione:

Aguda ____ Crónica ____

Nombre del encuestador: _____

Anexo 8. Consentimiento informado



Título del proyecto: IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIDOS EN PECES DE CONSUMO DEL PACÍFICO COLOMBIANO – ECUATORIANO Y EVALUACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA EN UNA POBLACIÓN DE COLOMBIA. VR.1.0

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Introducción:

Los anisakidos son nematodos parásitos de organismos acuáticos. Sus hospederos definitivos son mamíferos marinos, pero afectan ocasionalmente al hombre, cuando consume pescado parasitado crudo o mal cocido ocasionando la anisakidosis. Esta parasitosis puede producir urticaria, angioedema (acumulación de líquido en piel y mucosas), anisakidosis gastrointestinal, alergias, y/o anafilaxia. Esta investigación tiene como objetivo: Determinar la presencia de larvas de nematodos de la familia Anisakidae en peces de consumo del Pacífico Colombiano – Ecuatoriano, y de anticuerpos anti-anisakidos en una población de Colombia y es el primer estudio propuesto en anisakidos para nuestra región.

Procedimientos: Usted ha sido invitado a participar en esta investigación, se espera que participen un total de 150 individuos. Si usted decide participar en este estudio, se le solicitará que responda unas preguntas sobre su historia médica y hábitos alimenticios y se le tomarán 10 ml de sangre. La recolección de la muestra la realizará una persona calificada y autorizada. Responder la encuesta y la toma de la muestra, no le tomará más de 20 minutos.

La muestra de sangre será utilizada para realizar pruebas de investigación en un laboratorio para determinar si está o ha estado en contacto con parásitos anisakidos.

Si decide participar, debe tener en cuenta la siguiente información:

Riesgos:

- La toma de las muestras de sangre en el antebrazo pueden causar dolor, y en casos raros desmayo o infección en el sitio de la punción. El riesgo de infección será minimizado con el uso de alcohol antiséptico, jeringas estériles y técnicas de recolección de muestras de forma estéril.
- Durante el sangrado es posible que se filtre la sangre en la piel o se forme un hematoma (moretón) debido a posibles dificultades en encontrarla vena. La toma de la muestra será suspendida inmediatamente y el riesgo de dolor será minimizado aplicando presión en el sitio del sangrado por unos pocos minutos después de la recolección de la muestra.



Título del proyecto: IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIDOS EN PECES DE CONSUMO DEL PACIFICO COLOMBIANO – ECUATORIANO Y EVALUACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA EN UNA POBLACIÓN DE COLOMBIA. VR.1.0

Beneficios: Usted será informado de los resultados obtenidos y en caso de ser positivo será orientado para que proceda a control con su servicio de salud. Los resultados de esta investigación serán de beneficio general para la sociedad.

Participación voluntaria: No existirá ningún tipo de penalidad si usted decide no participar en el estudio. Usted puede retirarse del estudio cuando crea conveniente, y esta decisión no le causará ningún tipo de penalidad. Para su participación no debe pagar dinero alguno, ni recibirá remuneración alguna.

Confidencialidad: Toda la información suministrada por usted será guardada bajo los principios de confidencialidad y solo tendrán acceso a ella personal autorizado por el proyecto

Información de contacto: Si tiene cualquier pregunta o duda por favor comuníquese con Jenniffer Alejandra Castellanos al teléfono móvil 316 823 3891, Carolina Pustovrh al 5185622 o Liliana Salazar al 5185622. Para contactar miembros del Comité de Ética puede comunicarse al teléfono 5185677 en la Universidad del Valle en Cali.

La investigadora, Jenniffer Alejandra Castellanos y/o alguien que ella asigne en su lugar tratará de contestar todas sus preguntas. Si usted tiene alguna pregunta o duda en cualquier momento, o si usted necesita reportar al daño relacionado con la investigación, usted puede comunicarse de inmediato al Comité de Ética.

Almacenamiento de Muestras de Sangre: Su muestra no será vendida o usada directamente para la elaboración de productos comerciales. Tampoco para pruebas genéticas humanas.

Después que todas las pruebas se hayan realizado, solicitamos su autorización para guardar cualquier sobrante de suero para ser usado en estudios de investigación futura. Usted puede cambiar su decisión en cualquier momento y notificarla al personal del estudio. Su decisión acerca del uso de su muestra no afectará su participación en otros estudios.

Por favor indique su decisión acerca del permiso de uso futuro de sus muestras en investigación aquí abajo:



Título del proyecto: IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIDOS EN PECES DE CONSUMO DEL PACIFICO COLOMBIANO – ECUATORIANO Y EVALUACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA EN UNA POBLACIÓN DE COLOMBIA. VR.1.0

_____ Si acepto que se guarde mi sangre restante identificada, por un periodo indefinido de tiempo para estudios futuros como se describe arriba*

_____ No acepto que se use mi muestra restante de sangre para estudios futuros de investigación. Destruya la muestra que no vaya a usar al final de este estudio.

*Aun en el caso de aceptar el uso de su sangre para investigaciones futuras no relacionadas con este estudio, requerirá de la aprobación de un nuevo protocolo por parte del Comité de Etica.

Con su firma Usted certifica que ha leído o alguien le ha leído el presente formato de consentimiento informado; que le han sido resueltas todas sus preguntas satisfactoriamente y que acepta voluntariamente participar en el estudio titulado: **Identificación de anisakidos en peces de consumo del Pacifico Colombiano – Ecuatoriano y evaluación de la seroprevalencia en una población de Colombia**

Nota: Si lo desea, usted puede solicitar copia del presente consentimiento informado.

Lugar y fecha

Nombre del voluntario

Firma o huella digital

Nombre del testigo I

Firma

Nombre del testigo II

Firma

Anexo 9. Aval del Comité de Ética Humana de la Universidad el Valle

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana
Facultad de Salud



ACTA DE APROBACIÓN N° 015 - 015

Proyecto: **"IDENTIFICACIÓN DE ANISAKIDOS EN PECES DE CONSUMO DEL PACÍFICO COLOMBIANO – ECUATORIANO Y EVALUACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA EN UNA POBLACIÓN DE COLOMBIA"**

Sometido por: **YANIS CRUZ QUINTANA / JENNIFFER ALEJANDRA CASTELLANOS**

Código Interno: **153 - 015** Fecha en que fue sometido: **13** **10** **2015**

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002; y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

Este Comité **certifica** que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- | | |
|---|---|
| ☒ Resumen del proyecto | ☒ Protocolo de investigación |
| ☒ Formato de consentimiento informado | ☒ Instrumento de recolección de datos |
| ☐ Folleto del investigador (si aplica) | ☒ Cartas de las instituciones participantes |
| ☐ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica) | |

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité:

3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo**:

☐ SIN RIESGO ☒ RIESGO MÍNIMO ☐ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO

4. Que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.
5. La forma de obtener el **consentimiento** informado de los participantes en el estudio es adecuada.
6. Este proyecto será **revisado nuevamente** en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.
7. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:
 - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
 - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
8. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:
 - a. Lesiones a sujetos humanos.

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana
Facultad de Salud



- Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que no haya sido revisado y aprobado por el Comité.
9. El presente proyecto ha sido **aprobado** por un periodo de 1 año a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
10. El **investigador principal** deberá informar al Comité:
- a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - c. Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente (Anexo 1).
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - e. cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - g. El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Firma:  Fecha: 26 11 2015
Nombre: **MARIA FLORENCIA VELASCO DE MARTINEZ**
Capacidad representativa: **PRESIDENTA** Teléfono: 5185677

CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle aprueba el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial, de la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y de la reglamentación vigente en investigación de la Universidad del Valle.

Firma:  Fecha: 26 11 2015
Nombre: **HERNAN J. PIMIENTO**
Capacidad representativa: **VICEDECANO DE LA FACULTAD DE SALUD** Teléfono: 5185680

Anexo 10. Autorización de la Universidad del Valle para la toma de las muestras


Facultad de Salud
Departamento de Morfología
200.0263 075-2015
Santiago de Cali 15 de septiembre de 2015

Señores
Comité Institucional de Revisión de Ética Humana
Facultad de Salud
Universidad del Valle

Cordial saludo,

En respuesta a la solicitud hecha por la profesora María Carolina Pustovrh, me informar que el Departamento de Morfología autoriza el uso del espacio para toma de muestras del Laboratorio de Citogenética con el fin de llevar a cabo la toma de muestras de sangre humana del proyecto de tesis **"Identificación de anisakidos en peces de consumo del pacífico Colombiano - Ecuatoriano y evaluación de la seroprevalencia en una población de Colombia "** a cargo de la estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas Jenniffer Alejandra Castellanos y la profesional en Bacteriología Yhoiss Muñoz , bajo la codirección de la profesora María Carolina Pustovrh, adscritas al grupo de investigación Teblami. Para dicho procedimiento se deberá tener en cuenta todas las normas de bioseguridad y el aval del Comité de Ética.

Atentamente,


EFRAÍN BURITICA RAMÍREZ
Jefe Departamento de Morfología

Universidad del Valle
San Fernando
Calle 58 No. 36-6D
Contactador: (57) (1) 5185626
Fax: (57) (1) 5185684
<http://salud.uovalle.edu.co>
Cali-Colombia

Anexo 11. Autorización del Ministerio de Salud para salida de muestras biológicas de Colombia



Al contestar por favor cite estos datos:

Radicado No.: 201624000292261

Fecha: 26-02-2016

Página 1 de 1

Bogotá D.C.,

Doctor
EDGAR VARELA BARRIOS
Rector y Representante Legal
UNIVERSIDAD DEL VALLE
CALLE 4B N° 36-00 Departamento de Morfología
Cali/ Valle del Cauca

ASUNTO: Solicitud autorización salida de muestras biológicas con fines de investigación Radicado **201642300208692**

Respetado Doctor Varela,

En atención al radicado del asunto, en el cual solicita autorización para la salida del País de muestras biológicas (suero) para detección de anticuerpos anti anisakidos por ELISA en el marco del proyecto de investigación: "IDENTIFICACION DE ANISAKIDOS EN PECES DE CONSUMO DEL PACIFICO COLOMBIANO –ECUATORIANO Y EVALUACION DE SEROPREVALENCIA EN UNA POBLACION DE COLOMBIA", me permito informarle lo siguiente:

Una vez revisada la información suministrada, se encuentra que el Grupo de Tejidos Blandos y Mineralizados (Código: COL0074759), se encuentra registrado en la base ScienTI, y CUMPLE a cabalidad con los lineamientos trazados por este Ministerio para el proceso de autorización.

Por lo anterior y teniendo en cuenta el cumplimiento de los requisitos definidos en la Resolución 8430 de 1993 y el artículo 5 de la Resolución 3823 de 1997, se expide AUTORIZACION PARA LA SALIDA DE MUESTRAS BIOLOGICAS DE ORIGEN HUMANO, hacia:

- Facultad de Farmacia- Dpto de Parasitología –Universidad Complutense de Madrid
Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040
Madrid, España

Cordialmente,

FERNANDO RAMIREZ CAMPOS
Director de Medicamentos y Tecnologías en Salud (A)

Elaboró: **scortesm AC**

Ruta electrónica: C:\Users\scortesm\Documents\TRAMITES\MUESTRAS BIOLOGICAS\INVESTIGACION\UNIVERSIDAD DEL VALLE\tramite 2016\ febrero 2016\concepto de factibilidad.docx

Carrera 13 No.32-76 - Código Postal 110311, Bogotá D.C

Teléfono: (57-1)3305000 - Línea gratuita: 018000952525 Fax: (57-1)3305050 - www.minsalud.gov.co

Anexo 12. Autorización del Ministerio de Sanidad de España para el ingreso de muestras biológicas procedentes de Colombia



MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD

SECRETARÍA GENERAL DE
SANIDAD Y CONSUMO
DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD
PÚBLICA, CALIDAD E INNOVACIÓN



MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS
SOCIALES E IGUALDAD
REGISTRO GENERAL
SALIDA
N. de Registro: 523 / RG 2734
Fecha: 27/01/2016 14:02:32

Vista la solicitud de **FACULTAD DE FARMACIA-DPTO DE PARASITOLOGÍA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**, con domicilio en Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, España.

Considerando que el contenido del paquete es material biológico **"2 PAQUETES CONTENIENDO 150 UNIDADES DE SUERO HUMANO"** con origen Universidad del Valle, Sede San Fernando, Cali, **COLOMBIA**. Está bien empaquetado y no hay riesgo de derrame. No es corrosivo ni radiactivo. Las muestras serán utilizados exclusivamente con la finalidad de investigación en biomedicina y que al finalizar la investigación, dicho material será destruido.

Esta Dirección General de Salud Pública Calidad e innovaci,

RESUELVE:

Autorizar la ENTRADA en España de la citada muestra para el fin declarado comprometiéndose el solicitante a la destrucción, una vez finalizado su uso, de manera segura y conforme a lo dispuesto en la legislación vigente.

De esta Resolución, que se traslada a la persona solicitante, se da también conocimiento a los Servicios Periféricos del Aeropuerto de **MADRID** para su aplicación.

Madrid, a 27 de enero de 2016

LA DIRECTORA GENERAL DE SALUD PÚBLICA, CALIDAD E INNOVACIÓN,
PDF EL SUBDIRECTOR GENERAL DE SANIDAD EXTERIOR



Fernando Carreras Vaquer

SUBDIRECCIÓN GENERAL
DE SANIDAD EXTERIOR

www.msssi.es
dgsp@msssi.es

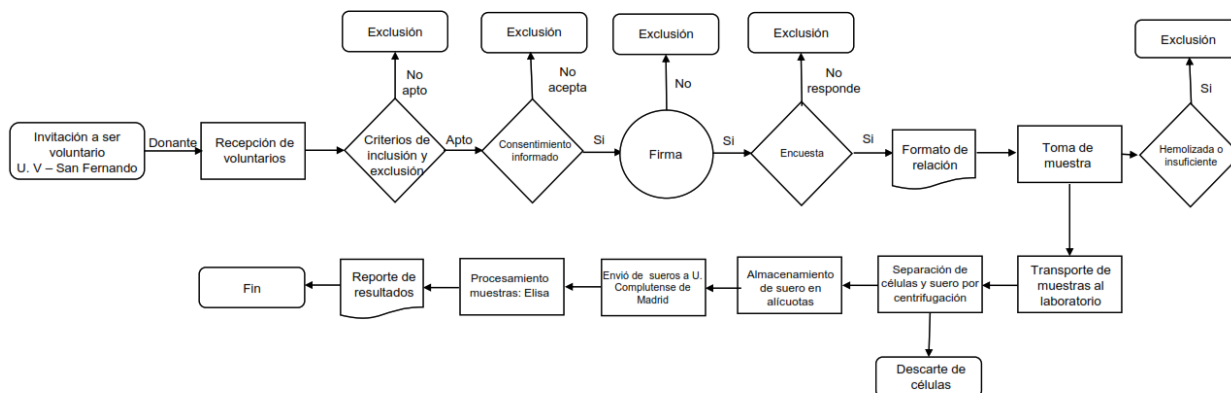
PYPRADO, 18, 7º
28071 MADRID
TEL: 91 5963952
FAX: 91 5964109

Anexo 13. Flujograma para la toma de muestras

Diagrama de flujo: Toma de muestras

Proyecto: Identificación de anisakidos en peces de consumo del Pacífico Colombiano – Ecuatoriano y evaluación de la seroprevalencia en una población de Colombia

Objetivo 3: Determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgE anti-anisakidos en una población de Colombia



Anexo 14. Procedimiento Operativo Estándar para la toma, transporte, almacenamiento y descarte de muestras de sangre

	PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA, TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO Y DESCARTE DE MUESTRAS DE SANGRE	CODIGO INTERNO: 153-015
		VERSIÓN: 01
Proyecto: Identificación de anisakidos en peces de consumo del Pacífico colombiano – ecuatoriano y evaluación de la seroprevalencia en una población de Colombia		PÁGINAS: 1 DE 5
Elaboró Jenniffer Alejandra Castellanos	Revisó Carolina Pustovrh, PhD	Aprobó Comité de Ética Humana – U. del Valle
Fecha 03-ago 2015	Fecha 10- ago- 2015	Fecha 13-Oct-15

Introducción

Para un adecuado proceso de las actividades de investigación, se deben establecer protocolos que permitan la adecuada ejecución de los mismos. La elaboración de un protocolo para la toma, manipulación, transporte y descarte de las muestras de sangre permite que el personal involucrado realice un debido procedimiento, optimizando el tiempo, los recursos y garantizando la bioseguridad del personal de trabajo y de los sujetos voluntarios.

- 1. Objetivo:** Dar una guía completa para la toma, transporte, almacenamiento y descarte de muestras de sangre
- 2. Alcance.** Facilitar al personal involucrado en la toma de muestras del proyecto de anisakidos un protocolo para la debida colecta y manipulación de muestras de sangre humana.
- 3. Autoridad y Responsabilidad:** Los coordinadores del proyecto y del laboratorio son la autoridad del documento. La responsabilidad es de cada persona que desarrolla este POE.

4. Muestra: Cualquier muestra de sangre humana que ingrese al proyecto.

5. Elementos de protección

- g. Gorro
- h. Gafas de protección
- i. Tapabocas
- j. Bata de manga larga
- k. Guantes de Nitrilo.
- l. Zapatos cerrados

6. Insumos, materiales y equipos:

Insumos:

Algodón

Alcohol

Guardián 1.5 litros

Curas redondas

Guantes latex

Bolsas rojas

Materiales:

Tubo seco vacutainer (tapa roja)

Aguja vacutainer

Torniquete

Gradilla

Nevera plástica para transporte de muestras

Caja para almacenar viales

Tubos eppendorf

Puntas para micropipetas

Equipos:

Centrífuga

Congelador -20°C

Micropipetas

7. Procedimiento

7.1 Toma de la muestra

La toma de la muestra debe ser realizada por una persona debidamente capacitada y autorizada, la persona encargada de la toma de las muestras debe contar con todos los elementos de protección personal (guantes, tapabocas, bata manga larga)

Todas las muestras deben estar debidamente marcadas, identificadas y relacionadas en el formato de registro y control.

Preparación del área y material para toma de muestras

1. Verificar que el área de toma de muestra esté limpia, ordenada y con buena iluminación.
2. Se debe disponer de una silla con respaldo para toma de muestras.
3. Contar con materiales para la toma de muestra de sangre (ver punto 6 de este documento)

Toma de datos del voluntario

1. Presentarse ante el voluntario de manera amable y tranquila.
2. Indicar en caso necesario que se sienta en la silla de toma de muestra, para recibir información sobre el proyecto, lectura y firma del consentimiento informado.
3. Aplicar la encuesta general para los voluntarios que participen en el estudio
4. Una vez se completen los documentos anteriormente mencionados proceda a la toma de la muestra

Obtención de las Muestras

1. Verifique la identidad del voluntario. Preguntar su nombre.
2. Explique en qué consiste el procedimiento
3. Verifique la condición del voluntario, que no esté en ayuno. Si el paciente está en ayuno, solicítele que consuma algún alimento y regrese para la toma de la muestra.
4. Asegúrese de tener todo el material para la toma de muestras al alcance, verificando las condiciones y fechas de vencimiento.
5. Hacer las anotaciones que sean necesarias en el espacio "Observaciones" del formato de relación.
6. Seleccione y rotule el tubo para la toma de la muestra
7. Ubique al voluntario en el sitio adecuado para la toma de la muestra
8. Lavase las manos antes de tomar la muestra (puede hacerlo al inicio del procedimiento).
9. Realizar la toma de la muestra por venopunción.

- Observe la vena de ambos brazos del voluntario y seleccione la más apropiada para la venopunción por visualización y palpación
- Colóquese los guantes
- Coloque el torniquete por encima del sitio que se va a punzar para favorecer la visualización de la vena
- Desinfecte el área de para la toma de muestra con algodón y alcohol
- Localice la vena por inspección y pídale al voluntario que abra y cierre la mano
- Ubique la aguja
- Punzar la vena en dirección contraria al flujo sanguíneo
- Retire el torniquete cuando la sangre empiece a brotar y coloque el tubo vacutainer
- Retire el tubo cuando esté lleno
- Retire la aguja y deséchela en el guardián
- Coloque un algodón seco en el lugar de la punción y presione suavemente
- Coloque la cura
- Retírese los guantes, deseche el material usado y lávese las manos

10. Identifique si se presentan alguna molestia o complicación asociadas con la toma de la muestra y siga el procedimiento.
11. Revise que la muestra está completa y la posibilidad de obtener nueva muestra en caso necesario.
12. Después de obtener la muestra, verifique que el voluntario haya tenido un procedimiento satisfactorio, que no exista riesgo asociado a la toma de la muestra como sangrado o desmayo.
13. Finalmente agradezca al voluntario su participación en el estudio, hágale entrega del refrigerio y acompáñelo al sitio de salida

7.2 Transporte de la muestra

Por ser muestras de sangre, estas serán manipuladas como muestras de riesgo biológico y se deben tener en cuenta las siguientes indicaciones:

- Revise que el recipiente que contiene la muestra esté bien cerrado y rotulado con el código asignado.
- Todos los tubos se deben colocar se forma vertical en gradillas
- Los tubos deben ser transportados al laboratorio en un contenedor plástico (nevera hermética). Este contenedor debe ser identificado como “infeccioso” e indicar el lugar de destino (Laboratorio de histología de la Universidad del Valle).
- Identifique las personas involucradas en el manejo y transporte de las muestras para garantizar una entrega segura.

7.3 Separación y almacenamiento de la muestra

Los tubos tapa roja (suero), se deben centrifugar 10 minutos a 2000 r.p.m, y separar el suero lo antes posible del paquete de células. Se debe conservar a -20°C. Se deben guardar 3 viales de suero por voluntarios, de 1.5 ml cada uno, en tubos eppendorf, cada vial se guarda debidamente etiquetado en la caja correspondiente y se registra la ubicación de la caja en la bitácora del proyecto.

Las muestras serán guardadas en el laboratorio asignado en el Departamento de Morfología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle hasta su traslado por una empresa autorizada a la Universidad Complutense de Madrid para su procesamiento.

7.4 Descarte

- Los restos de sangre serán tratados durante 30 min con hipoclorito de sodio al 0,5% y luego eliminados en bolsas de residuos patógenos en recipientes cerrados que no se derramen. Los tubos deben conservar su tapa hermética. Las bolsas serán entregadas a la ruta hospitalaria que pasa por el laboratorio de histología de la U. del Valle.
- Las agujas vacutainer se deben descartar en guardianes, estos se deben llenar como máximo al 80% de su capacidad y ser eliminados en bolsas de residuos patógenos luego de su desinfección. Finalmente, serán entregados a la ruta hospitalaria
- Las muestras de suero para determinaciones basadas en la técnica de ELISA, pueden ser inactivadas con concentraciones finales de 0,2% de Sodio Dodecil Sulfato (SDS) / 0,1% de Tween 20 y tratamiento por calor a 60o C 15 min.

8. Referencias bibliográficas

- Manual de Toma Manejo y Envío de Muestras, El Salvador, edición 2006.
- Manual de bioseguridad. Universidad del Valle, 2015.
- Manual de procedimiento para la toma de muestras biológicas. Organización Panamericana de la Salud. PAHO 2006.
- Recomendaciones para la toma segura y manipulación apropiada de muestras potencialmente infecciosas con agentes altamente patógenos. OPS/OMS, 2014

Anexo 15. Formato de relación para la toma de muestras

FORMATO DE RELACION											
Proyecto: Identificación de anisakidos en peces de consumo del Pacifico Colombiano – Ecuatoriano y evaluación de la seroprevalencia en una población de Colombia											
Objetivo 3: Determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgE anti-anisakidos en una población de Colombia											
No.	Fecha (dd/mm/aa)	Codigo del voluntario	Consentimiento		Encuesta		Muestra		Observaciones	Entrega	Recibe
			Si	No	Si	No	Si	No			

Anexo 16. Obtención de Antígenos de *Anisakis*

Obtención de Antígeno total larvario

Obtención de larvas de *Anisakis*: Las larvas (L3) de *Anisakis*, fueron extraídas a partir de músculo y vísceras de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*) (Figura 1). Se identificaron bajo microscopio, fueron lavadas tres veces con solución salina estéril y almacenadas a -20°C hasta su uso (Figura 2).

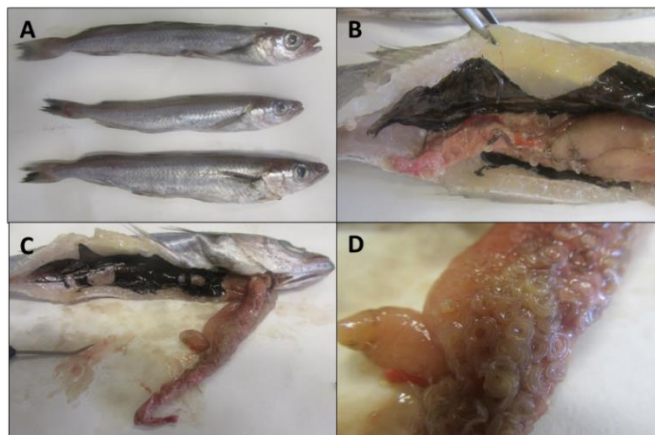


Figura 1. Obtención de larvas de *Anisakis*. **A.** Bacaladilla (*Micromesistius poutassou*). **B y C.** Larvas de nematodos anisakidos en viscera de *M. poutassou*. **D.** Larvas de anisakidos en hígado de *M. poutassou*.

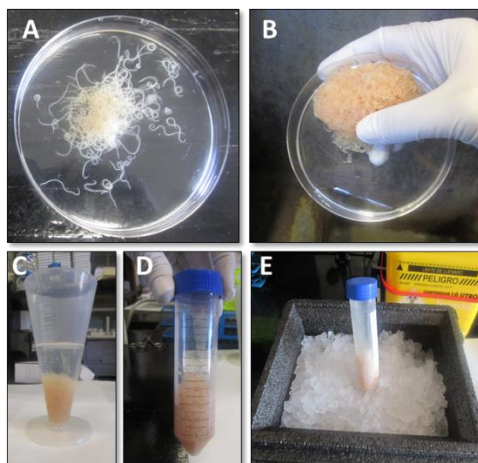


Figura 2. Larvas de *Anisakis*. **A.** Larvas de *Anisakis* obtenidas del pez Bacaladilla (*M. poutassou*). **B y C.** Limpieza de larvas en solución salina estéril. **D y E.** Almacenamiento de larvas.

Obtención del antígeno total larvario de *Anisakis*: Las larvas fueron lavadas con solución salina estéril y homogenizadas manualmente, posteriormente fueron sonicadas (10s/pulso) 6 pulsos a 70% de potencia. El homogenizado se dejó para extracción en PBS durante toda una noche a 4°C. El homogenizado se dispuso en 7 volúmenes de PBS y 3 volúmenes de n-hexano para delipidar mediante agitación energética y decantación de la fase superior, se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C y en sobrenadante fue recogido como antígeno crudo. Se realizó el dializado con PBS en membrana de diálisis (Medicell International). Posteriormente se realizó la valoración de las proteínas, se guardaron en alícuotas y congeladas hasta su uso (Figura 3 y 4).

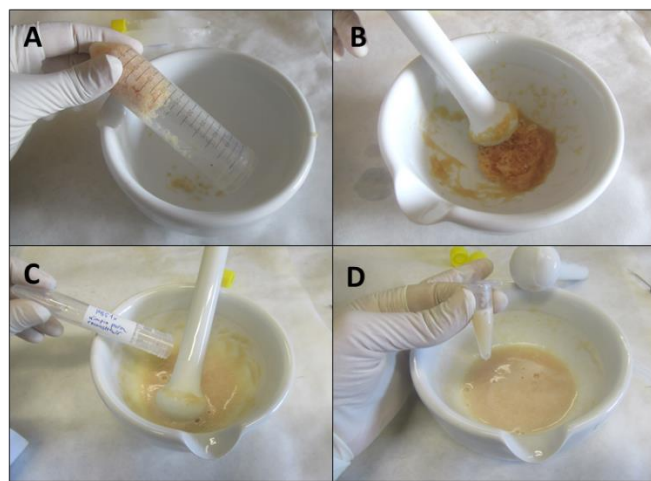


Figura 3. Obtención de antígeno total larvario **A.** Larvas de *Anisakis* obtenidas del pez Bacaladilla (*M. poutassou*). **B y C.** Macerado manual con solución salina estéril. **D.** Almacenamiento de antígeno crudo.

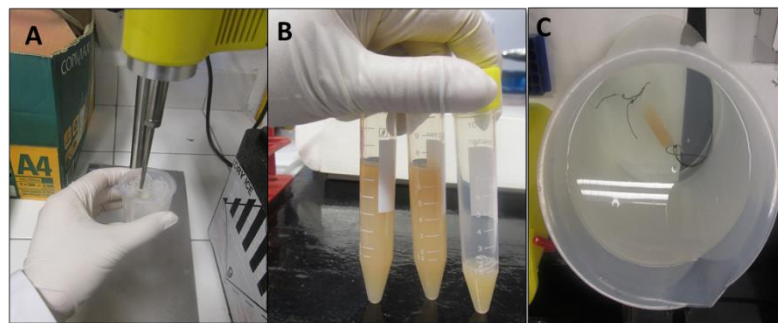


Figura 4. Obtención de antígeno total larvario **A.** Sonicación de larvas de *Anisakis*. **B.** Homogenizado de larvas y **C.** Dializado con PBS en membrana de diálisis para obtención de proteínas.

Valoración de proteínas por el método de BRADFORD: Se preparó una curva patrón de BSA en PBS a partir de una concentración de 1mg/ml mediante diluciones de la misma. Se añadió 200 µl de reactivo de Bradford (BIO-RAD Cat.500-0006) por cada 800µl de muestra (patrones y problema), como se indica en la tabla 1, y se dejó actuar por 5 minutos a temperatura ambiente. La lectura se realizó a 595 nm de absorbancia. Finalmente se interpoló la concentración de los problemas con la curva patrón. Las muestras se procesaron por duplicado.

Tabla 1. Diluciones de la curva patrón para la valoración de proteínas del antígeno total de *Anisakis* por el método Bradford.

Número de cubeta	1	2	3	4	5	6	Blanco	Extracto proteico a valorar
BSA en PBS (Solución Patrón)	2µl	4 µl	8 µl	12 µl	16 µl	20 µl	0 µl	5 µl de Ag
PBS	798 µl	796 µl	792 µl	788 µl	784 µl	780 µl	800 µl	795 µl
Reactivo Bradford	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Obtención del antígeno recombinante *Ani s 3* (tropomiosina)

Cortesía del Servicio de Parasitología. Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Microbiología. Madrid. España.

Se amplificó el gen correspondiente a la proteína tropomiosina de *A. simplex* utilizando los cDNAs y los cebadores 5 RACE TROPOM AS 63.3°C (ATGGATGCTATCAAGAAAAAGATGCAGGC) y 3 RACE TROPOM AS 63.9°C (TCAATATCCGGAAAGTTCTTGGAAGGTTTG). Para la secuenciación se usaron los cebadores D y SP6. La subclonación del gen se llevó a cabo en el vector pGEXT4T3 utilizando como molde la secuencia TROPO-2-27 y los cebadores 5 BamH1 T (GAGAGAGAGGATCCATGGATGCTATCAAGAAAAAGATGCA) y 3 Salt I TROPO.

La secuenciación del inserto TROPO-2/27-1 se realizó a una concentración de 2.49 ng/ul en el vector pGEXT4T3 utilizando los primers pGEXT F y pGEXT R, se confirmó la secuencia en el Genbank y se hizo la transferencia a células BL21. Posteriormente, se realizó la inducción de la proteína TROPO-2/27-1 pGEXT4T3 con 0.1mM de IPTG a 16°C. La purificación de la proteína se hizo por BCA y la valoración de la concentración de la proteína purificada se hizo por BCA: 15 µg/ml.

Obtención de antígeno purificado *Ani* s 13 (Hemoglobina)

A partir de bacaladillas (*M. poutassou*) parasitadas se obtuvieron larvas (L3) de *A. simplex* en una cantidad de aproximadamente 1 g, se lavaron y se trituraron con mortero en 15 ml de PBS a 4°C. Tras una centrifugación de 15 min a 6700 g a 4 °C, el sobrenadante se esterilizó mediante un filtro de 0,22 µm. Al día siguiente se centrifugó a 175000 g durante 6 h. Se descartó el sobrenadante y el precipitado rojo se empacó en 15 ml de agua apirógena toda la noche. Al día siguiente se realizó una centrifugación a 63000 g durante 30 min y se recogió el sobrenadante rosado descartando el precipitado blanco. Ese sobrenadante rosado fue centrifugado a 175000 g durante 6 h y el precipitado rojo se resuspendió en tampón de carga (Tris 25mM, NaCl 50mM, pH 7,5). Esta solución se introdujo en una columna BioRadâPolyPrep cargada con DEAE-Sephacel (GE healthcare). En la cromatografía de intercambio iónico se recogió la fracción que absorbía a 415 nm eluida con el tampón (Tris 25mM, NaCl 150mM, pH 7,5). Se repitió la ultracentrifugación a 175000 g durante 6 h y se resuspendió con 1 ml de tampón (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). A continuación, se valoró por el método de Bradford obteniendo 2,2 mg de hemoglobina.

Anexo 17. Método ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos anti-*Anisakis* frente antígeno total larvario

Mediante esta técnica se determinó en los sueros de los voluntarios la presencia de anticuerpos específicos tipo IgE, IgG, IgA, IgM, IgG4 e Ig totales (Ig`s) anti- *Anisakis*.

Para la determinación de anticuerpos por el método Elisa de toda la investigación, se utilizó como control y registro un formato de mapa (Figura 1). Las placas fueron tapizadas la mitad con el antígeno de interés y la otra mitad fueron controles (Figura 2).

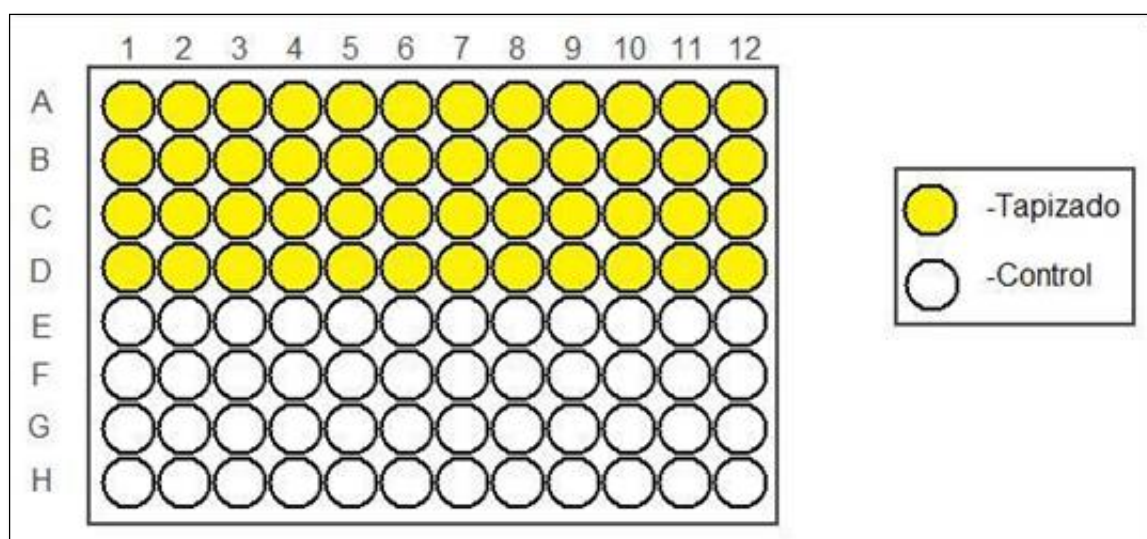


Figura 1. Tapizado de placas de ELISA para determinación de anticuerpos frente a antígenos de *Anisakis*.

Formato de mapa para la prueba de ELISA

Proyecto: Identificación de anisakidos en peces del Pacífico colombiano ecuatoriano y evaluación de la seroprevalencia en una población de Colombia

MAPA PARA LA PRUEBA DE ELISA

Fecha: _____ Placa No: _____

Antígeno: _____

Muestras: _____ Dilución: _____

Realizado por: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Las placas de 96 pocillos (Corning incorporated- Costar 9017. EIA/RIA plate polystyrene) se sensibilizaron mediante la adición de 100 µl/pocillo de antígeno total de *Anisakis* diluido en tampón carbonato 0,1M a pH 9,6 a una concentración de 10 µg/ml. Tras incubación toda la noche a 4°C, se lavaron los pocillos tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05% (PBS-Tween) y posteriormente se bloquearon mediante la adición de 200 µl/pocillo de BSA al 0,1% en PBS, durante 1 h a 37°C. Tras lavar tres veces con PBS-Tween, se añadieron 100 µl por duplicado de las muestras de sueros humanos a una dilución 1/100 en PBS-Tween con BSA al 0,1% (PBSTween-BSA) para la determinación de IgG, IgA, IgM, IgG4 e Ig totales. Se incubaron 2 h a 37°C. Una vez lavadas las placas, se incubaron 1 h a 37°C con 100 µl/pocillo de inmunoglobulinas anti-Ig's, IgG, IgM, IgA (Goat anti- human. HRP Conjugate. Biosource Internacional) o IgG4 (Mouse anti-human. Fc-HRP. SouthernBiotech) a la dilución 1/10.000, 1/8.000, 1/8.000, 1/3.000 y 1/1000 respectivamente en PBS-Tween-BSA. Después de añadir el sustrato (tampón citrato fosfato 0,1 M a pH 5 con H2O2 al 0,04% y Ofenileno diamina al 0,04%) la reacción se paró con 50 µl/pocillo

de ácido sulfúrico 3N y las placas se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Biotek ELx808). En el caso de la IgE, los sueros se incubaron toda la noche a 4°C, se probaron a la dilución 1/2, revelándose mediante la incubación durante 2 h de AcMc de ratón específicos para IgE humana (Hibridoma E21A11. Ingenasa) seguida de 1 h de incubación con anti-IgG1 de ratón marcada con peroxidasa (Life technologies). Los resultados se expresaron como valores de densidad óptica (D.O.) de los sueros problemas una vez restada su correspondiente fijación inespecífica a la BSA utilizada en el postapizado. Se consideraron positivos los valores superiores a la D.O. media del grupo control para cada inmunoglobulina más tres veces la desviación estándar. El grupo control estaba conformado por sueros de pacientes negativos a *Anisakis* y sin diagnóstico de urticaria.

Método ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos IgE anti-*Anisakis* frente antígeno recombinante Ani s 3 (Tropomiosina)

Las placas de 96 pocillos (Corning incorporated-Costar 9017. EIA/RIA plate polystyrene) se sensibilizaron mediante la adición de 100 µl/pocillo de antígeno *Ani s 3* diluido en tampón carbonato 0,1M a pH 9,6 a una concentración de 5 µg/ml. Tras incubación de toda la noche a 4°C, se lavaron los pocillos tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05% (PBS-Tween) y se bloquearon mediante la adición de 200 µl/pocillo de BSA al 0,1% en PBS, durante 1 h a 37°C. Tras lavar tres veces con PBS-Tween, se añadieron 100 µl por duplicado de las muestras de sueros humanos a una dilución 1/2 en PBS-Tween con BSA al 0,1% (PBS Tween- BSA) para la determinación de IgE. Se incubaron toda la noche a 4°C, tras lavar las placas, se incubaron durante 2 h con AcMc de ratón específicos para IgE humana (Hibridoma E21A11. Ingenasa) seguida de 1 h de incubación con anti-IgG1 de ratón marcada con peroxidasa (Life technologies) a una dilución 1/1000 en PBS-Tween-BSA. Después de añadir el sustrato (tampón citrato fosfato 0,1 M a pH 5 con H₂O₂ al 0,04% y Ofenileno diamina al 0,04%) la reacción se paró con 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 3N y las placas se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Biotek ELx808). Los resultados se expresaron como valores de D.O. de los sueros problemas una vez restada su correspondiente fijación inespecífica a la BSA utilizada en el postapizado. Se consideraron positivos los valores superiores a la D.O. media del grupo control más tres veces la desviación estándar. El grupo control estaba conformado por sueros de pacientes negativos a *Anisakis* y sin diagnóstico de urticaria.

Método ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos IgE e IgG4 frente antígeno recombinante *Ani s 13* (Hemoglobina)

Las placas de 96 pocillos (Corning incorporated- Costar 9017. EIA/RIA plate polystyrene) se sensibilizaron mediante la adición de 100 µl/pocillo de antígeno *Ani s 13* diluido en tampón carbonato 0,1M a pH 9,6 a una concentración de 5 µg/ml. Tras incubación de toda la noche a 4°C, se lavaron los pocillos tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05% (PBS-Tween) y los pocillos se bloquearon mediante la adición de 200 µl/pocillo de BSA al 0,1% en PBS, durante 1 h a 37°C. Tras lavar tres veces con PBS-Tween, se añadieron 100 µl por duplicado de las muestras de sueros humanos a una dilución 1/100 en PBS-Tween con BSA al 0,1% (PBS Tween- BSA) para la determinación de IgG4. Se incubaron 2 h a 37°C. Una vez lavadas las placas, se incubaron 1 h a 37°C con 100 µl/pocillo de inmunoglobulinas anti- IgG4 (Mouse anti-human. Fc-HRP. SouthernBiotech) a la dilución 1/1000 en PBS-Tween-BSA. Después de añadir el sustrato (tampón citrato fosfato 0,1 M a pH 5 con H₂O₂ al 0,04% y Ofenileno diamina al 0,04%) la reacción se paró con 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 3N y las placas se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Biotek ELx808). En el caso de la IgE, los sueros se probaron a la dilución 1/2, se incubaron toda la noche a 4°C, tras los lavados, se revelaron mediante la incubación durante 2 h de AcMc de ratón específicos para IgE humana seguida de 1 h de incubación con anti-IgG1 de ratón marcada con peroxidasa (Life technologies). Los resultados se expresaron como valores de D.O. de los sueros problemas una vez restada su correspondiente fijación inespecífica a la BSA utilizada en el postapizado. Se consideraron positivos los valores superiores a la D.O. media del grupo control para cada inmunoglobulina más tres veces la desviación estándar. El grupo control estaba conformado por sueros de pacientes negativos a *Anisakis* y sin diagnóstico de urticaria.

Método de Elisa para la determinación de anticuerpos IgE con el test Trisakis 170 para los alérgenos recombinantes *rAni s 1* O *t-Ani s 7*

Se utilizó el kit Trisakis 170, cortesía del grupo de investigación del Dr. Florencio Ubeira de la Universidad Santiago de Compostela, España.

El test es un ELISA indirecto de doble anticuerpo en fase sólida para la determinación cualitativa de anticuerpos de tipo IgE contra *Anisakis* en sueros

humanos. Se usaron placas de micro titulación de 96 pocillos tapizados con los alérgenos recombinantes *rAni s 1* o *t-Ani s 7* para unir anticuerpos IgE anti- *Anisakis* específicos. *Ani s 7* es actualmente el alérgeno de excreción - secreción más importante de *Anisakis* y es el único reconocido por el 100% de los pacientes. El test se realizó en tres pasos principales: 1) los sueros fueron incubados sin diluir, cada muestra se colocó en 3 pocillos consecutivos tapizados con *rAni s 1*, *t-Ani s 7* y el control negativo, 2) se incubó con un conjugado monoclonal (primer anticuerpo) anti-IgE humano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FICT), y 3) se incubó con un conjugado policlonal (segundo anticuerpo) anti-FICT marcado con peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, se añadió el cromógeno o-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) para revelar los anticuerpos IgE unidos. La intensidad del color de dicho producto (amarillo/naranja) fue proporcional a la cantidad de anticuerpos IgE específicos contra *Anisakis* presentes en suero. Los resultados se expresaron en valores de O.D, la lectura se realizó en un lector de placas (Biotek ELx808) a 490 nm.

Para considerar el ensayo válido, las absorbancias del control positivo tenían que cumplir con los siguientes criterios: en el pocillo del *rAni s 1* absorbancia menor que 0,2 y en el pocillo del *t-Ani s 7* absorbancia igual o mayor que 1,3 y en el pocillo del control negativo una absorbancia menor que 0,1.

Los resultados de cada suero se calcularon restando el valor de su respectivo control negativo a las densidades ópticas obtenidas para el alérgeno *rAni s 1* y *t-Ani s 7*. Las muestras fueron consideradas positivas cuando la absorbancia calculada fue mayor que los puntos de corte del *rAni s 1* y *t-Ani s 7*, siendo 0,09 y 0,05 respectivamente (146,151,190).

Anexo 18. Determinación de anticuerpos anti- *Ascaris suum* frente al antígeno total

Obtención del antígeno total de *Ascaris*:

Se obtuvo *A. suum* a partir de cerdos de matadero. Los nematodos fueron lavados con solución salina estéril y homogenizadas manualmente, posteriormente se sónico (10s/pulso) 6 pulsos a 70% de potencia. El homogenizado se dejó para extracción en PBS durante toda una noche a 4°C.

El homogenizado se dispuso en 7 volúmenes de PBS y 3 volúmenes de n-hexano para delipidar mediante agitación energética y decantación de la fase superior, se centrifugo a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C y en sobrenadante fue recogido como antígeno crudo. Se realizó el dializado con PBS en membrana de diálisis (Medicell International). Posteriormente se realizó la valoración de las proteínas por el método de Bradford. Las muestras se guardaron en alícuotas y fueron congeladas hasta su uso.

Método ELISA indirecto para la determinación de anticuerpos anti- *Ascaris suum* frente antígeno total larvario:

Las placas de 96 pocillos (Corning incorporated- Costar 9017. EIA/RIA plate polystyrene) se sensibilizaron mediante la adición de 100 µl/pocillo de antígeno total de *A. suum* diluido en tampón carbonato 0,1M a pH 9,6 a una concentración de 10 µg/ml. Tras incubación de toda la noche a 4°C, se lavaron los pocillos tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05% (PBS-Tween) y los pocillos se bloquearon mediante la adición de 200 µl/pocillo de BSA al 0,1% en PBS, durante 1 h a 37°C. Tras lavar tres veces con PBS-Tween, se añadieron 100 µl por duplicado de las muestras de sueros humanos a una dilución 1/100 en PBS-Tween con BSA al 0,1% (PBSTween-BSA) para la determinación de IgG, IgA, IgM, IgG4 e Ig totales. Se incubaron 2 h a 37°C.

Una vez lavadas las placas, se incubaron 1 h a 37°C con 100 µl/pocillo de inmunoglobulinas anti-Ig's, IgG, IgM, IgA (Goat anti- human. HRP Conjugate. Biosource Internacional) o IgG4 (Mouse anti-human. Fc-HRP. SouthernBiotech) a la dilución 1/10.000, 1/8.000, 1/8.000, 1/3.000 y 1/1000 respectivamente en PBS-Tween-BSA. Después de añadir el sustrato (tampón citrato fosfato 0,1 M a pH 5 con H₂O₂ al 0,04% y Ofenileno diamina al 0,04%) la reacción se paró con 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 3N y las placas se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Biotek

ELx808). En el caso de la IgE, los sueros se incubaron toda la noche a 4°C, se probaron a la dilución 1/2, revelándose mediante la incubación durante 2 h de AcMc de ratón específicos para IgE humana (Hibridoma E21A11. Ingenasa) seguida de 1 h de incubación con anti-IgG1 de ratón marcada con peroxidasa (Life technologies). Los resultados se expresaron como valores de densidad óptica (D.O.) de los sueros problemas una vez restada su correspondiente fijación inespecífica a la BSA utilizada en el postapizado. Se consideraron positivos los valores superiores a la D.O. media del grupo control para cada inmunoglobulina más tres veces la desviación estándar.

Anexo 19. Western Blotting para la determinación de las proteínas específicas que son reconocidas por sueros con anticuerpos anti –*Anisakis*

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12.5% y se cargó el gel con antígeno total en pocillo único con 400ug, el gel se corrió a 100V hasta visualizar la salida del antígeno en la base de los cristales. Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a nitrocelulosa durante 1h a 100V. Se bloqueó con leche descremada 5% en PBS (1X) durante una noche a 4°C, seguido se lavó y cortó la nitrocelulosa en tiras. Se aplicó el suero en cada surco 800ul de suero diluido 1:25 para IgG e IgG4 y dilución 1:10 para IgE y se incubaron a 4°C toda la noche. Una vez lavadas las tiras se aplicó el conjugado IgG en dilución 1:4000 durante 2h o IgG4 1:500 por 2h o IgE 1:500 durante 3h mas 2h con IgG1 de ratón en dilución 1:500, la incubación se realizó en agitación y a temperatura ambiente. Se reveló con la adición de DAB (3.3-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate en 50ml de PBS y 5ul de H₂O₂) (Sigma D5637-5G), protegido de la luz durante 20 min. Se frenó la reacción eliminando la solución de revelado y adicionando agua destilada.

Anexo 20. Valores de D.O. de cada inmunoglobulina frente al antígeno total larvario de *Anisakis* para cada suero analizado.

Se marcan en negrilla los sueros positivos según el punto de corte.

No. Suero	IgG	IgE	IgA	IgM	Ig's	IgG4
1	0,389	0,022	1,523	1,304	0,252	0,008
2	0,460	0,023	0,662	0,736	0,201	0,024
3	0,381	0,007	0,652	1,690	0,335	0,007
4	0,320	0,018	0,542	1,455	0,230	0,011
5	0,273	0,013	0,458	1,606	0,154	0,003
6	0,303	0,019	0,504	1,355	0,227	0,029
7	0,241	0,011	0,268	0,663	0,094	0,029
8	0,405	0,009	0,427	1,685	0,370	0,000
9	0,392	0,000	0,328	0,951	0,232	0,007
10	0,336	0,006	0,361	1,172	0,207	0,022
11	0,144	0,000	0,280	0,805	0,148	0,007
12	0,275	0,016	1,041	1,248	0,260	0,017
13	0,263	0,004	0,453	1,134	0,214	0,006
14	0,208	0,014	0,809	1,146	0,257	0,010
15	0,243	0,020	0,411	0,873	0,189	0,027
16	0,167	0,016	0,735	1,888	0,400	0,034
17	0,698	0,022	0,500	0,603	0,231	0,028
18	0,950	0,027	1,095	1,839	0,577	0,028
19	0,259	0,014	0,512	0,911	0,191	0,009
20	0,187	0,016	0,492	1,315	0,222	0,018
21	0,188	0,026	0,203	0,638	0,162	0,040
22	0,230	0,036	0,413	0,609	0,149	0,015
23	0,353	0,038	0,338	1,012	0,115	0,015
24	0,689	0,020	1,027	1,221	0,379	0,016
25	0,439	0,000	1,309	1,675	0,289	0,004
26	0,499	0,017	0,712	0,930	0,226	0,006
27	0,653	0,007	0,630	1,094	0,266	0,014
28	0,275	0,011	0,414	0,926	0,131	0,025
29	0,232	0,012	0,728	1,298	0,237	0,013
30	0,694	0,022	0,629	0,434	0,224	0,031

31	0,354	0,000	0,389	1,292	0,213	0,029
32	0,382	0,011	1,023	1,813	0,350	0,027
33	0,152	0,000	0,396	1,244	0,216	0,038
34	0,720	0,024	0,986	1,794	0,452	0,021
35	0,940	0,031	0,672	1,267	0,490	0,023
36	0,502	0,032	0,521	1,475	0,376	0,020
37	0,109	0,012	0,520	1,034	0,229	0,028
38	0,271	0,037	0,689	1,156	0,254	0,005
39	0,249	0,028	0,416	1,171	0,237	0,013
40	0,225	0,024	0,609	1,278	0,276	0,012
41	0,208	0,018	0,627	1,401	0,317	0,014
42	0,416	0,013	0,446	0,814	0,266	0,010
43	0,511	0,018	0,643	1,040	0,336	0,032
44	0,483	0,021	0,582	0,536	0,195	0,016
45	0,195	0,006	0,456	1,116	0,185	0,000
46	0,274	0,034	0,599	1,478	0,344	0,019
47	0,212	0,013	0,660	1,594	0,330	0,079
48	0,214	0,032	0,637	1,330	0,287	0,019
49	0,212	0,011	0,682	0,932	0,206	0,050
50	0,506	0,008	1,467	1,142	0,261	0,029
51	0,135	0,000	0,545	0,928	0,322	0,029
52	0,176	0,000	0,642	0,977	0,258	0,023
53	0,278	0,006	0,694	0,016	0,402	0,013
54	0,416	0,007	1,008	1,157	0,244	0,048
55	0,237	0,031	0,567	1,289	0,294	0,052
56	0,292	0,016	0,825	0,936	0,236	0,094
57	0,295	0,000	0,548	2,087	0,530	0,000
58	0,227	0,037	0,342	0,395	0,217	0,019
59	0,380	0,011	1,201	0,665	0,269	0,000
60	0,156	0,018	0,481	1,103	0,264	0,000
61	0,638	0,020	1,581	1,058	0,225	0,000
62	0,206	0,023	0,531	0,922	0,277	0,001
63	0,092	0,037	0,277	0,911	0,270	0,003
64	0,514	0,010	1,014	1,268	0,386	0,001
65	0,298	0,018	1,045	1,222	0,259	0,004
66	0,067	0,038	0,260	0,687	0,448	0,031
67	0,276	0,012	1,100	0,867	0,411	0,017

68	0,202	0,037	0,839	0,704	0,294	0,000
69	0,120	0,006	0,448	0,798	0,325	0,000
70	0,704	0,024	1,994	1,555	0,520	0,034
71	0,312	0,014	1,135	0,520	0,389	0,014
72	0,078	0,009	0,462	0,493	0,373	0,003
73	0,183	0,013	0,678	1,070	0,427	0,012
74	0,236	0,009	0,782	1,105	0,530	0,010
75	0,301	0,009	0,931	1,691	0,617	0,006
76	0,136	0,000	0,611	0,844	0,333	0,018
77	0,292	0,015	1,387	0,403	0,521	0,016
78	0,443	0,005	1,613	1,352	0,573	0,000
79	0,164	0,043	0,658	0,674	0,580	0,000
80	0,303	0,015	1,117	1,366	0,466	0,002
81	0,211	0,084	0,857	0,510	0,250	0,000
82	0,103	0,010	0,237	0,965	0,208	0,014
83	0,129	0,033	0,509	0,444	0,149	0,018
84	0,118	0,035	0,590	1,100	0,325	0,010
85	0,218	0,026	0,718	1,204	0,457	0,012
86	0,137	0,030	0,351	0,762	0,327	0,000
87	0,128	0,022	0,732	0,723	0,270	0,008
88	0,203	0,010	0,802	1,481	0,589	0,014
89	0,241	0,004	0,728	0,582	0,217	0,018
90	0,185	0,000	0,457	1,687	0,671	0,016
91	0,156	0,013	0,489	1,200	0,454	0,017
92	0,177	0,021	0,464	0,759	0,249	0,029
93	0,165	0,000	0,426	0,843	0,462	0,001
94	0,188	0,000	0,517	0,823	0,332	0,013
95	0,134	0,057	0,383	1,061	0,388	0,011
96	0,291	0,006	0,878	1,295	0,495	0,021
97	0,097	0,010	0,402	1,179	0,520	0,028
98	0,184	0,023	0,467	0,557	0,304	0,004
99	0,162	0,011	0,547	0,820	0,253	0,000
100	0,132	0,028	0,408	0,967	0,434	0,008
101	0,142	0,053	0,349	0,871	0,325	0,022
102	0,154	0,007	0,584	0,779	0,289	0,020
103	0,167	0,014	0,557	1,020	0,486	0,000
104	0,169	0,027	0,442	1,330	0,666	0,010

105	0,103	0,018	0,197	0,915	0,385	0,015
106	0,195	0,045	0,485	0,483	0,745	0,005
107	0,278	0,068	0,965	1,303	0,510	0,012
108	0,320	0,047	0,813	1,169	0,636	0,014
109	0,317	0,002	1,017	0,933	0,431	0,004
110	0,136	0,003	0,462	1,083	0,457	0,018
111	0,498	0,000	1,105	0,552	0,379	0,014
112	0,140	0,000	0,381	0,835	0,357	0,028
113	0,084	0,010	0,206	0,744	0,068	0,019
114	0,386	0,010	0,981	0,764	0,266	0,023
115	0,244	0,047	0,304	0,779	0,371	0,011
116	0,264	0,003	0,714	1,130	0,375	0,016
117	0,234	0,018	0,481	0,149	0,368	0,012
118	0,245	0,014	0,519	1,183	0,375	0,011
119	0,308	0,151	0,983	1,178	0,433	0,014
120	0,172	0,000	0,491	0,704	0,227	0,107
121	0,286	0,010	0,741	1,388	0,597	0,016
122	0,301	0,011	0,914	1,425	0,564	0,016
123	0,669	0,013	1,598	1,678	1,039	0,019
124	0,276	0,012	0,714	1,079	0,647	0,016
125	0,146	0,004	0,389	0,672	0,286	0,015
126	0,169	0,015	0,377	0,784	0,346	0,009
127	0,238	0,073	0,567	0,710	0,382	0,048
128	0,141	0,047	0,414	0,801	0,276	0,020
129	0,353	0,026	0,882	1,393	0,717	0,021
130	0,166	0,021	0,432	0,471	0,190	0,017
131	0,272	0,037	0,651	0,929	0,323	0,010
132	0,214	0,017	0,576	1,071	0,405	0,009
133	0,277	0,000	0,549	1,601	0,466	0,020
134	0,064	0,012	0,103	0,653	0,254	0,026
135	0,383	0,000	0,796	1,443	0,929	0,068
136	0,353	0,000	0,929	0,889	0,300	0,000
137	0,230	0,000	0,505	1,613	0,517	0,000
138	0,197	0,001	0,381	1,502	0,516	0,010
139	0,144	0,000	0,267	0,744	0,193	0,026
140	0,192	0,016	0,395	1,302	0,479	0,000
141	0,397	0,004	0,952	1,104	0,318	0,000

142	0,264	0,004	0,625	1,016	0,374	0,000
143	0,258	0,002	0,621	1,222	0,408	0,001
144	0,311	0,005	0,809	0,962	0,338	0,013
145	0,236	0,016	0,569	1,380	0,508	0,037
146	0,121	0,018	0,271	1,152	0,388	0,066
147	0,459	0,028	0,998	1,556	0,746	0,033
148	0,235	0,016	0,512	0,962	0,489	0,019
149	0,121	0,000	0,309	1,100	0,338	0,020
150	0,298	0,044	0,751	1,559	0,780	0,017

Anexo 21. Valores de D.O. de IgE frente al antígeno *Ani s 3* de *Anisakis* para cada suero analizado

Se marcan en negrilla los sueros positivos según el punto de corte.

No	IgE – <i>Ani s 3</i>	No	IgE – <i>Ani s 3</i>	No	IgE – <i>Ani s 3</i>	No	IgE – <i>Ani s 3</i>	No	IgE – <i>Ani s 3</i>
1	0,006	31	0,004	61	0,000	91	0,000	121	0,021
2	0,453	32	0,000	62	0,000	92	0,013	122	0,016
3	0,000	33	0,007	63	0,000	93	0,005	123	0,013
4	0,000	34	0,000	64	0,007	94	0,000	124	0,000
5	0,075	35	0,000	65	0,000	95	0,000	125	0,000
6	0,000	36	0,000	66	0,000	96	0,000	126	0,003
7	0,014	37	0,000	67	0,000	97	0,000	127	0,006
8	0,009	38	0,000	68	0,017	98	0,000	128	0,000
9	0,03	39	0,000	69	0,02	99	0,000	129	0,001
10	0,038	40	0,000	70	0,108	100	0,000	130	0,01
11	0,012	41	0,000	71	0,012	101	0,061	131	0,000
12	0,048	42	0,000	72	0,015	102	0,005	132	0,000
13	0,000	43	0,000	73	0,000	103	0,000	133	0,000
14	0,000	44	0,000	74	0,000	104	0,000	134	0,000
15	0,000	45	0,015	75	0,008	105	0,000	135	0,007
16	0,001	46	0,033	76	0,000	106	0,000	136	0,000
17	0,023	47	0,013	77	0,000	107	0,005	137	0,000
18	0,000	48	0,000	78	0,006	108	0,006	138	0,003
19	0,000	49	0,000	79	0,022	109	0,000	139	0,005
20	0,001	50	0,008	80	0,000	110	0,013	140	0,000
21	0,004	51	0,000	81	0,033	111	0,000	141	0,000
22	0,000	52	0,001	82	0,000	112	0,004	142	0,000
23	0,024	53	0,000	83	0,011	113	0,000	143	0,000
24	0,000	54	0,000	84	0,037	114	0,189	144	0,000
25	0,000	55	0,012	85	0,032	115	0,000	145	0,000
26	0,003	56	0,017	86	0,007	116	0,116	146	0,008
27	0,012	57	0,000	87	0,051	117	0,000	147	0,013
28	0,000	58	0,000	88	0,059	118	0,000	148	0,000
29	0,000	59	0,000	89	0,000	119	0,005	149	0,000
30	0,003	60	0,000	90	0,000	120	0,019	150	0,000

Anexo 22. Valores de D.O de IgE e IgG4 frente al antígeno *Ani s 13* de *Anisakis* para cada suero analizado

Se marcan en negrilla los sueros positivos según el punto de corte.

No	<i>Ani s 13</i> IgE	<i>Ani s 13</i> IgG4	No	<i>Ani s 13</i> IgE	<i>Ani s 13</i> IgG4	No	<i>Ani s 13</i> IgE	<i>Ani s 13</i> IgG4
1	0,001	0,030	51	0,006	0,035	101	0,001	0,091
2	0,000	0,025	52	0,000	0,014	102	0,021	0,022
3	0,000	0,039	53	0,004	0,027	103	0,000	0,011
4	0,000	0,020	54	0,000	0,022	104	0,013	0,018
5	0,004	0,024	55	0,000	0,017	105	0,000	0,010
6	0,008	0,016	56	0,000	0,041	106	0,001	0,011
7	0,011	0,032	57	0,011	0,020	107	0,000	0,012
8	0,006	0,019	58	0,000	0,014	108	0,000	0,006
9	0,000	0,023	59	0,022	0,011	109	0,000	0,011
10	0,000	0,013	60	0,011	0,005	110	0,000	0,024
11	0,006	0,023	61	0,010	0,017	111	0,016	0,019
12	0,016	0,043	62	0,007	0,023	112	0,000	0,020
13	0,006	0,010	63	0,023	0,003	113	0,061	0,017
14	0,009	0,011	64	0,027	0,012	114	0,011	0,014
15	0,008	0,010	65	0,020	0,022	115	0,007	0,008
16	0,000	0,012	66	0,033	0,022	116	0,004	0,017
17	0,001	0,017	67	0,000	0,039	117	0,001	0,007
18	0,004	0,019	68	0,113	0,046	118	0,002	0,014
19	0,000	0,015	69	0,011	0,036	119	0,327	0,019
20	0,000	0,016	70	0,002	0,021	120	0,000	0,045
21	0,023	0,042	71	0,010	0,029	121	0,005	0,009
22	0,005	0,018	72	0,004	0,000	122	0,002	0,002
23	0,040	0,056	73	0,000	0,041	123	0,000	0,025
24	0,019	0,018	74	0,000	0,003	124	0,022	0,007
25	0,008	0,010	75	0,000	0,014	125	0,001	0,000
26	0,007	0,024	76	0,009	0,031	126	0,000	0,006
27	0,000	0,022	77	0,004	0,007	127	0,002	0,010
28	0,000	0,021	78	0,002	0,100	128	0,006	0,000
29	0,002	0,021	79	0,026	0,032	129	0,011	0,000
30	0,017	0,022	80	0,006	0,024	130	0,003	0,005
31	0,008	0,014	81	0,008	0,019	131	0,003	0,003

32	0,000	0,034	82	0,012	0,007	132	0,001	0,004
33	0,000	0,020	83	0,003	0,032	133	0,000	0,000
34	0,004	0,030	84	0,010	0,018	134	0,010	0,014
35	0,020	0,016	85	0,010	0,052	135	0,000	0,014
36	0,039	0,019	86	0,006	0,026	136	0,025	0,007
37	0,027	0,015	87	0,002	0,017	137	0,010	0,013
38	0,025	0,006	88	0,004	0,017	138	0,000	0,003
39	0,000	0,004	89	0,035	0,009	139	0,013	0,000
40	0,004	0,016	90	0,000	0,010	140	0,001	0,000
41	0,024	0,018	91	0,004	0,003	141	0,000	0,004
42	0,014	0,013	92	0,007	0,015	142	0,001	0,000
43	0,033	0,027	93	0,005	0,013	143	0,002	0,034
44	0,003	0,018	94	0,003	0,009	144	0,011	0,017
45	0,000	0,011	95	0,088	0,023	145	0,010	0,006
46	0,000	0,019	96	0,001	0,012	146	0,065	0,016
47	0,000	0,028	97	0,024	0,001	147	0,018	0,016
48	0,009	0,013	98	0,028	0,006	148	0,008	0,006
49	0,009	0,042	99	0,014	0,023	149	0,010	0,041
50	0,018	0,012	100	0,004	0,025	150	0,021	0,030

Anexo 23. Valores de D.O. de IgE frente a los antígenos *Ani s 1* y *Ani s 7* de *Anisakis* para cada suero analizado (test Trisakis)

Se marcan en negrilla los sueros positivos según el punto de corte.

No	<i>Ani s 1</i>	<i>Ani s 7</i>	No	<i>Ani s 1</i>	<i>Ani s 7</i>	No	<i>Ani s 1</i>	<i>Ani s 7</i>
1	0,000	0,000	51	0,000	0,000	101	0,000	0,000
2	0,000	0,000	52	0,000	0,000	102	0,005	0,000
3	0,000	0,000	53	0,000	0,000	103	0,000	0,000
4	0,000	0,000	54	0,000	0,064	104	0,000	0,000
5	0,002	0,000	55	0,000	0,000	105	0,000	0,002
6	0,000	0,000	56	0,000	0,000	106	0,000	0,000
7	0,002	0,000	57	0,000	0,000	107	0,000	0,000
8	0,000	0,000	58	0,000	0,014	108	0,000	0,000
9	0,000	0,000	59	0,000	0,000	109	0,000	0,000
10	0,000	0,000	60	0,000	0,000	110	0,000	0,000
11	0,007	0,021	61	0,000	0,000	111	0,000	0,000
12	0,003	0,002	62	0,000	0,000	112	0,000	0,000
13	0,020	0,037	63	0,007	0,000	113	0,000	0,000
14	0,000	0,000	64	0,008	0,000	114	0,005	0,000
15	0,000	0,000	65	0,000	0,000	115	0,000	0,000
16	0,000	0,000	66	0,000	0,000	116	0,001	0,000
17	0,000	0,000	67	0,000	0,000	117	0,000	0,000
18	0,000	0,000	68	0,000	0,000	118	0,000	0,001
19	0,000	0,000	69	0,002	0,003	119	0,003	0,000
20	0,007	0,000	70	0,000	0,000	120	0,000	0,000
21	0,035	0,040	71	0,000	0,000	121	0,045	0,055
22	0,000	0,000	72	0,000	0,000	122	0,000	0,043
23	0,003	0,000	73	0,004	0,001	123	0,000	0,000
24	0,000	0,000	74	0,000	0,006	124	0,000	0,000
25	0,003	0,001	75	0,000	0,000	125	0,000	0,000
26	0,000	0,000	76	0,002	0,000	126	0,000	0,000
27	0,000	0,001	77	0,009	0,000	127	0,000	0,000
28	0,000	0,000	78	0,000	0,000	128	0,002	0,000
29	0,001	0,002	79	0,036	0,000	129	0,001	0,008
30	0,002	0,001	80	0,000	0,000	130	0,000	0,000

31	0,001	0,000	81	0,000	0,000	131	0,000	0,000
32	0,000	0,002	82	0,000	0,000	132	0,000	0,000
33	0,000	0,000	83	0,001	0,001	133	0,000	0,000
34	0,000	0,000	84	0,002	0,000	134	0,000	0,000
35	0,008	0,008	85	0,000	0,001	135	0,001	0,000
36	0,000	0,000	86	0,000	0,000	136	0,000	0,000
37	0,000	0,000	87	0,012	0,000	137	0,000	0,000
38	0,002	0,001	88	0,001	0,002	138	0,002	0,000
39	0,000	0,000	89	0,003	0,003	139	0,006	0,005
40	0,000	0,002	90	0,000	0,000	140	0,000	0,000
41	0,006	0,004	91	0,001	0,000	141	0,000	0,000
42	0,001	0,000	92	0,000	0,000	142	0,002	0,000
43	0,002	0,000	93	0,000	0,000	143	0,002	0,001
44	0,000	0,000	94	0,000	0,000	144	0,000	0,000
45	0,000	0,000	95	0,027	0,010	145	0,000	0,000
46	0,004	0,001	96	0,000	0,000	146	0,017	0,000
47	0,000	0,000	97	0,000	0,000	147	0,000	0,000
48	0,000	0,000	98	0,000	0,000	148	0,000	0,000
49	0,000	0,000	99	0,000	0,000	149	0,010	0,007
50	0,000	0,005	100	0,000	0,000	150	0,000	0,000

Anexo 24. Inmunorreconocimiento por Western Blotting de proteínas del antígeno total de *Anisakis* y el antígeno total de *Ascaris* con los anticuerpos IgE, IgG e IgG4, en los 36 sueros de voluntarios positivos a *Anisakis* por el método de Elisa

Se realizó western blotting (WB) a los sueros que presentaron por ELISA niveles de anticuerpos anti-*Anisakis* frente a alguno de los antígenos analizados (antígeno total, *Ani s 7*, *Ani s 3* o *Ani s 13*) con el fin de conocer las proteínas específicas contra las cuales el suero del voluntario presentaba anticuerpos, es decir era seropositivo. Los WB se realizaron con los antígenos totales de *Anisakis* y *A. suum* con las inmunoglobulinas IgE, IgG e IgG4.

- **REACCION CON ANTIGENO DE *Anisakis***

En el 3% (1/36) de los sueros ensayados hubo inmunorreconocimiento de proteínas de bajo peso molecular de 50 kDa, mientras un 6% (2/36) y 11% (4/36) reconocieron proteínas de alto peso molecular entre 150 kDa y 250 kDa, respectivamente, a nivel de IgE. Con la IgG, los sueros reconocieron proteínas de bajo peso molecular de 37 kDa, 50 kDa y 75 kDa, con porcentajes de 8% (3/36), 58% (21/36) y 11% (4/36) respectivamente, mientras que el 22% (8/36), reconocieron proteínas de alto peso molecular de 100 kDa y un 61% (22/36) proteínas de 150 kDa y 250 kDa.

Al investigar la reacción de la IgG4, un 6% (2/36) y 3% (1/36) reconocieron proteínas de 50 kDa y 75 kDa, tan solo el 3% (1/36) reconoció proteínas con un peso de 100 kDa y hubo un aumento en el inmunorreconocimiento del 25% (9/36) y 67% (24/36) para proteínas de alto peso molecular de 150 kDa y 250 kDa, respectivamente.

En la figura 1 se presentan los porcentajes de inmunorreconocimiento de IgE, IgG e IgG4 frente al antígeno total de *Anisakis* y en la tabla 1 el peso molecular de las bandas que fueron reconocidas por cada uno de los sueros.

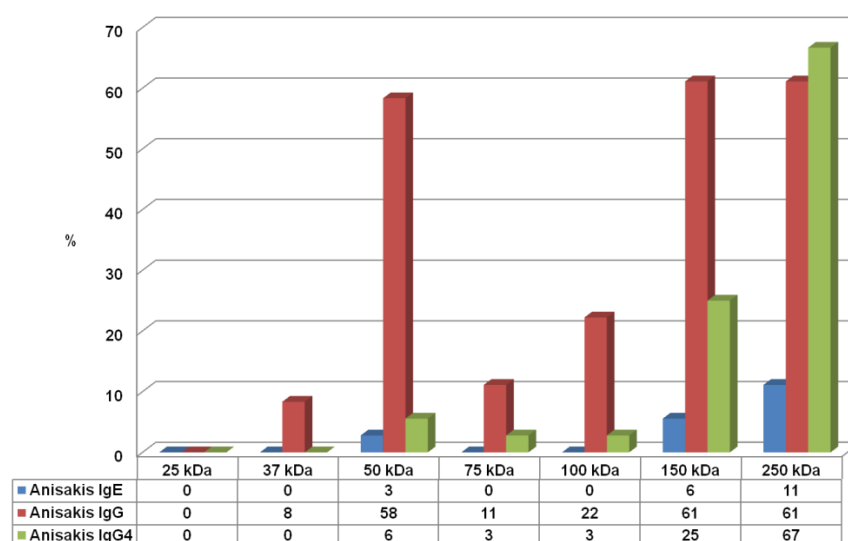


Figura 1. Porcentajes de inmunorreconocimiento de proteínas de bajo y alto peso molecular a nivel de IgE, IgG e IgG4 frente al antígeno total de *Anisakis*, en los 36 sueros positivos a *Anisakis* por el método de ELISA.

Tabla 1. Peso molecular de las proteínas que fueron reconocidas por cada uno de los sueros a nivel de IgE, IgG e IgG4 frente al antígeno total de *Anisakis*.

ID	Western blotting <i>Anisakis</i>																				
	IgE							IgG							IgG4						
	25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250
1	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x
2	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-

68	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	x	x
70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x
78	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	x
95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	x
106	-	-	x	-	-	-	-	-	x	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
119	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	x
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	x	-	x	x	x
121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
123	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
135	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	x
146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
147	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
150	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	x

Al comparar los sueros con anticuerpos anti – *Anisakis* con el resultado de WB, se encontró que los dos sueros positivos a *Ani* s 7 no reconocen proteínas a nivel de IgE para *Anisakis*, a nivel de IgG ambos sueros reconocen proteínas con pesos moleculares de 50 kDa, 150 kDa y 250 kDa, y solo uno de los sueros reacciona frente a una proteína de alto peso molecular de 250 kDa a nivel de IgG4 (Tabla 2).

De los cuatro sueros positivos por ELISA para *Ani* s 3, se observó que solo uno reconoce una proteína de alto peso molecular de 250 kDa a nivel de IgE, al estudiar los anticuerpos IgG, dos sueros reconocen proteínas de 50 kDa y todos reconocieron proteínas 150 kDa y 250 kDa, mientras para IgG4 el inmunorreconocimiento fue hacia proteínas de alto peso molecular, dos sueros reconocieron proteínas de 150 kDa y todos los sueros reconocieron una banda a 250 kDa (Tabla 2).

Respecto a los sueros positivos por ELISA frente al alérgeno *Ani s 13* de *Anisakis*, solo tres sueros reconocieron proteínas a nivel de IgE, uno reconoció una proteína de 150 kDa y los otros tres reconocieron proteínas de 250 kDa. Al estudiar los anticuerpos de la clase IgG se observa que todos los sueros reconocen alguna proteína entre los 37 kDa y los 250 kDa. Finalmente, a nivel de IgG4, los sueros reconocieron proteínas con pesos moleculares entre 50 kDa y 250 kDa, reconociendo en su mayoría proteínas de alto peso molecular (Tabla 2).

Tabla 2. Resultado del WB frente al antígeno total de *Anisakis* a nivel de IgE, IgG e IgG4, de los sueros positivos por ELISA frente a los antígenos *Ani s 7*, *Ani s 3* y *Ani s 13* de *Anisakis*.

Positivos por ELISA	ID	Western blotting <i>Anisakis</i>																				
		IgE							IgG							IgG4						
		25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250
<i>Ani s 7</i> (139 kDa)	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
	121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
<i>Ani s 3</i> (41 kDa)	2	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
	114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
	116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
<i>Ani s 13</i> (37 kDa)	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
	56	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-
	68	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	x	x
	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x
	78	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x
	85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	x
	95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
	101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	x
	119	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	x
	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	-	-	x	-	x	x	x

	146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x
	149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	x

- **REACCION CON ANTIGENO DE *Ascaris***

En el 6% (2/36) de los sueros ensayados hubo inmunorreconocimiento de proteínas de bajo peso molecular de 37 kDa y un 3% (1/36) reconoció proteínas de 50 kDa, mientras el 39% (14/36) y 44% (16/36) reconocieron proteínas de alto peso molecular entre 150 kDa y 250 kDa, respectivamente para IgE. Para IgG, los sueros reconocieron proteínas de bajo peso molecular de 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa y 75 kDa, con porcentajes de 14% (5/36), 78% (28/36), 50% (18/36) y 50% (18/36) respectivamente. Mientras que el 53% (19/36), reconocieron proteínas de alto peso molecular de 100 kDa, un 50% (18/36) proteínas de 150 kDa y el 58% (21/36) proteínas de 250 kDa.

Al investigar la reacción de la IgG4, pocos sueros reaccionaron, el 3% (1/36) reconocieron proteínas de bajo peso molecular de 37 kDa y el 6% (2/36) reconoció proteínas de alto peso molecular de 250 kDa. En la figura 2 se presentan los porcentajes de inmunorreconocimiento de IgE, IgG e IgG4 frente al antígeno total de *Áscaris* y en la tabla 3 el peso molecular de las proteínas que fueron reconocidas por cada uno de los sueros.

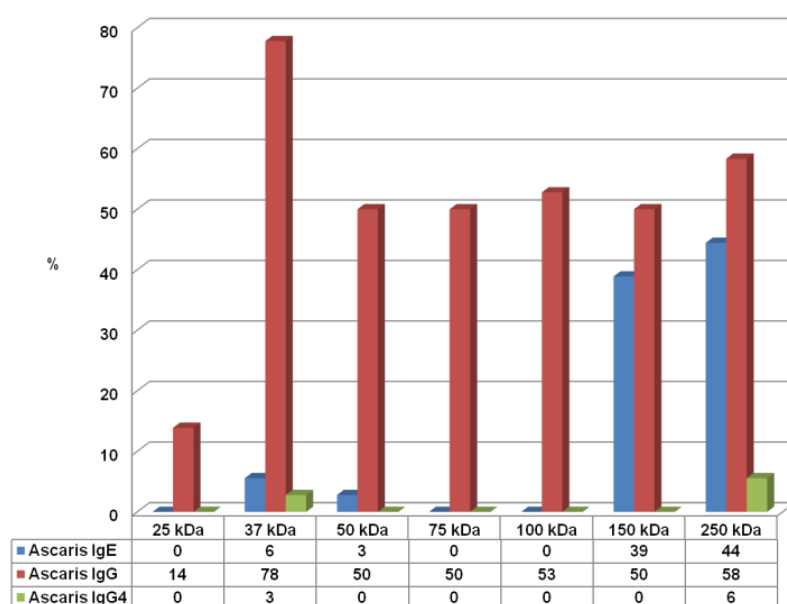


Figura 2. Porcentajes de inmunorreconocimiento de proteínas de bajo y alto peso molecular a nivel de IgE, IgG e IgG4 frente al antígeno total de *Áscaris*, en los 36 sueros positivos a *Anisakis* por el método de ELISA.

Tabla 3. Peso molecular de las proteínas que fueron reconocidas por cada uno de los sueros a nivel de IgE, IgG e IgG4 frente al antígeno total de *Áscaris*.

ID	Western blotting <i>Áscaris</i>																				
	IgE							IgG							IgG4						
	25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250
1	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-
2	-	x	-	-	-	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	x	-	x	x	x	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	x	x	-	x	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	x	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-

55	-	-	-	-	-	-	x	-	x	x	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
61	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
68	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	x	-	x	x	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
73	-	-	-	-	-	x	x	-	x	-	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	x	-	x	x	x	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-
95	-	-	-	-	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-
101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
106	-	-	-	-	-	-	x	x	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-
114	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	x	x	-	-	x	-	-	-	-	-
116	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
119	-	-	-	-	-	x	x	x	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	x
121	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123	-	-	-	-	-	x	x	-	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x
135	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
146	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
147	-	x	x	-	-	x	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
149	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	-	-	-	-	-	x	x	-	x	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- **REACCION CRUZADA ENTRE *Anisakis* y *Áscaris***

Los 36 sueros positivos a *Anisakis* por ELISA frente a alguno de los antígenos estudiados (antígeno total, *Ani s 7*, *Ani s 3* o *Ani s 13*) se enfrentaron a los antígenos totales de *Anisakis* y *Áscaris* en WB para el inmunorreconocimiento de proteínas a nivel de anticuerpos IgE, IgG e IgG4.

Todos los sueros reconocieron proteínas del antígeno de *Áscaris* y *Anisakis*, siendo la reacción más intensa frente a *Áscaris* en los anticuerpos IgE e IgG, y más intensa para *Anisakis* en IgG4.

DETERMINACION DE IgE: Cuando se enfrentan los 36 sueros de voluntarios positivos a *Anisakis* por ELISA al antígeno total de *Anisakis* en WB, observamos que el 19% (7/36) de los sueros reconocen alguna proteína a nivel de IgE, de los siete sueros uno fue positivo por ELISA frente a *Ani s 3*, cuatro sueros fueron positivos a *Ani s 13* y dos sueros reaccionaron frente al antígeno total.

El suero positivo por ELISA frente a *Ani s 3* reconoció una proteína de 250 kDa, siendo el único suero de los cuatro positivos por ELISA a *Ani s 3* que reconoce alguna proteína de *Anisakis* a nivel de IgE. De los cuatro sueros que fueron positivos por ELISA frente a *Ani s 13*, tres de ellos reconocieron una proteína a 250 kDa y un solo suero una proteína a 150 kDa. Ninguno de los sueros positivos por ELISA a *Ani s 7* produjo inmunorreconocimiento de proteínas. Tabla 4.

Frente al antígeno total de *Áscaris*, el número de sueros en los que hubo inmunorreconocimiento a nivel de IgE fue mayor. De los cuatro sueros positivos por ELISA frente *Ani s 3*, todos reconocieron alguna proteína de *Áscaris*, uno de ellos reconoció una proteína de 37 kDa y los otros tres reconocieron proteínas de alto peso molecular, uno reconoció una proteína a 150 kDa y tres sueros reconocieron proteínas a 250 kDa. Con respecto a los sueros positivos por ELISA a *Ani s 13*, todos los sueros reconocieron alguna proteína de *Áscaris* de alto peso molecular entre 150 kDa y 250 kDa. Ninguno de los sueros positivos por ELISA a *Ani s 7* produjo inmunorreconocimiento de proteínas de *Áscaris*. Tabla 4.

Tabla 4. Inmunorreconocimiento a nivel de IgE frente a los antígenos totales de *Anisakis* y *Áscaris* por WB, de los sueros que fueron positivos a los alérgenos *Ani s 3* y *Ani s 13* de *Anisakis* por el método de ELISA.

Positivos por ELISA	ID	Western blotting													
		<i>Anisakis</i> - IgE							<i>Áscaris</i> - IgE						
		25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250
<i>Ani s 3</i> (41 kDa)	2	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	x
	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
	114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x

	116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-
Ani s 13 (37 kDa)	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-
	36	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	x	-
	56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
	68	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	x
	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x
	78	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	x
	95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x
	119	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	x
	146	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-
	149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-

DETERMINACION DE IgG: Todos los sueros que fueron positivos por ELISA frente a los antígenos *Ani s 7* (2/150), *Ani s 3* (4/150) y *Ani s 13* (18/150) de *Anisakis*, reconocieron proteínas de *Anisakis* y *Áscaris* a nivel de IgG.

Cuando se enfrentaron los 36 sueros de voluntarios positivos a *Anisakis* por ELISA al antígeno total de *Anisakis* en WB, observamos que el 3% (1/36) reconoció una proteína de 37 kDa, en el 44% (16/36) de los sueros se produjo inmunorreconocimiento de proteínas de 50 kDa, un 14% (5/36) reconoció proteínas entre los 75 y 10 kDa, mientras el 52% (19/36) de los sueros reconocieron proteínas de alto peso molecular entre 150 kDa y 250 kDa. Tabla 5.

Frente al antígeno total de *Áscaris*, el número de sueros en los que hubo inmunorreconocimiento fue mayor. El 5% (2/36) de los sueros reconocieron proteínas de 25 kDa, un 50% (18/36) reconoció proteínas de 37 kDa, y la mayoría de los sueros mostro bandas entre los 50 kDa y los 250 kDa. Tabla 5.

Tabla 5. Inmunorreconocimiento a nivel de IgG frente a los antígenos totales de *Anisakis* y *Áscaris* por WB, de los sueros que fueron positivos a los alérgenos *Ani s 7*, *Ani s 3* y *Ani s 13* de *Anisakis* por el método de ELISA.

Positivos por ELISA	ID	Western blotting														
		<i>Anisakis</i> - IgG							<i>Áscaris</i> - IgG							
		25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250	250

Ani s 7 (139 kDa)	54	-	-	x	-	-	x	x	x	x	-	x	-	x	x
	121	-	-	x	-	-	x	x	-	x	x	-	x	-	-
Ani s 3 (41 kDa)	2	-	-	x	-	-	x	x	-	x	x	-	x	x	x
	70	-	-	x	-	-	x	x	-	x	x	x	-	x	x
	114	-	-	-	-	-	x	x	-	x	-	-	x	x	-
	116	-	-	-	-	-	x	x	-	x	-	x	-	x	x
Ani s 13 (37 kDa)	3	-	-	-	-	x	x	-	-	x	x	x	x	x	x
	12	-	-	x	-	-	-	-	-	x	x	x	-	x	-
	21	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	x	-	x	-
	23	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	x
	36	-	-	x	-	-	-	-	x	x	x	x	-	x	x
	49	-	-	x	x	x	x	-	-	x	x	-	-	x	x
	56	-	x	x	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	x
	67	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	x	x
	68	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	x
	73	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	x	x	x
	78	-	-	x	-	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x
	85	-	-	x	-	-	x	-	-	x	-	-	x	-	x
	95	-	-	x	-	-	x	x	-	x	x	x	x	-	x
	101	-	-	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	x
	119	-	-	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x	-	-
	120	-	-	x	-	-	x	x	-	-	-	-	-	x	-
	146	-	-	-	-	-	x	x	-	x	-	x	x	-	-
	149	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	x	-	-

DETERMINACION DE IgG4: Se observó un mayor inmunorreconocimiento de proteínas a nivel de IgG4 para *Anisakis* que para *Áscaris* donde solo el 5% (2/36) de los sueros reconocieron alguna proteína. Tabla 6.

Cuando se enfrentan los 36 sueros de voluntarios positivos a *Anisakis* por ELISA al antígeno total de *Anisakis* en WB, observamos que el 44% (16/36) de los sueros reconocen proteínas de 250 kDa, el 19% (7/36) reconocieron proteínas con peso molecular de 150 kDa y el 5% (2/36) reconoció proteínas de bajo peso molecular entre 50 kDa y 75 kDa. Los cuatro sueros positivos por ELISA frente *Ani s 3* reconocieron proteínas de alto peso molecular de 250 kDa y dos de ellas adicionalmente reconocieron proteínas de 150 kDa. De los 18 sueros positivos por

ELISA frente a *Ani s 13*, doce de ellos reconocieron proteínas de *Anisakis*, todos reconocieron proteínas de alto peso molecular de 250 kDa, adicionalmente, uno de los sueros reconoció dos bandas de 50 kDa y 75 kDa, otro suero reconoció bandas de 50 kDa, 100 kDa y 150 kDa, y tres sueros mas reconocieron proteínas de 150 kDa.

Frente al antígeno total de *Áscaris*, el número de sueros en los que hubo inmunorreconocimiento fue menor, en solo en 5% (2/36) de los sueros hubo inmunorreconocimiento, un suero reconoció una proteína de bajo peso molecular de 37 kDa, suero que a su vez fue positivo por ELISA frente a *Ani s 3*, el segundo suero reconoció una proteína de 250 kDa, este suero fue positivo por ELISA frente a *Ani s 13*. Tabla 6.

Tabla 6. Inmunorreconocimiento a nivel de IgG4 frente a los antígenos totales de *Anisakis* y *Áscaris* por WB, de los sueros que fueron positivos a los alérgenos *Ani s 3* y *Ani s 13* de *Anisakis* por el método de ELISA.

Positivos por ELISA	ID	Western blotting													
		<i>Anisakis</i> - IgG4							<i>Áscaris</i> IgG4						
		25	37	50	75	100	150	250	25	37	50	75	100	150	250
<i>Ani s 3</i> (41 kDa)	2	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
	70	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
	114	-	-	-	-	-	x	x	-	x	-	-	-	-	-
	116	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ani s 13</i> (37 kDa)	12	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
	68	-	-	x	x	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
	73	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
	78	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
	85	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-
	95	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
	101	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
	119	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
	120	-	-	x	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	x
	146	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
	149	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-

PATRONES DE INMUNORRECONOCIMIENTO

- **PATRONES DE INMUNORRECONOCIMIENTO A NIVEL DE IgE, IgG e IgG4 FRENTE AL ANTIGENO DE *Anisakis*, DE LOS 36 SUEROS POSITIVOS *Anisakis* POR EL METODO DE ELISA.**

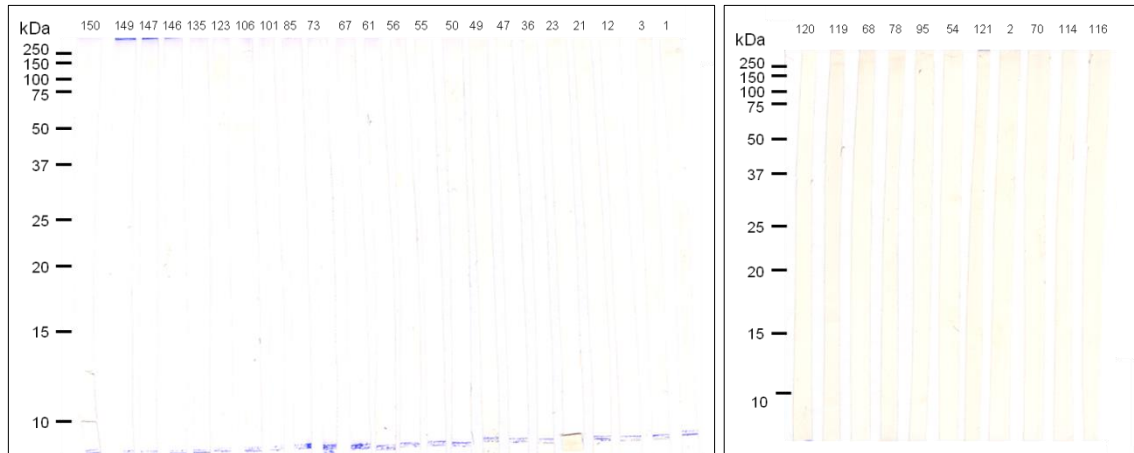


Figura 3. Patrones de reconocimiento a nivel de IgE frente al antígeno total de *Anisakis*, de los sueros positivos a *Anisakis* por ELISA.

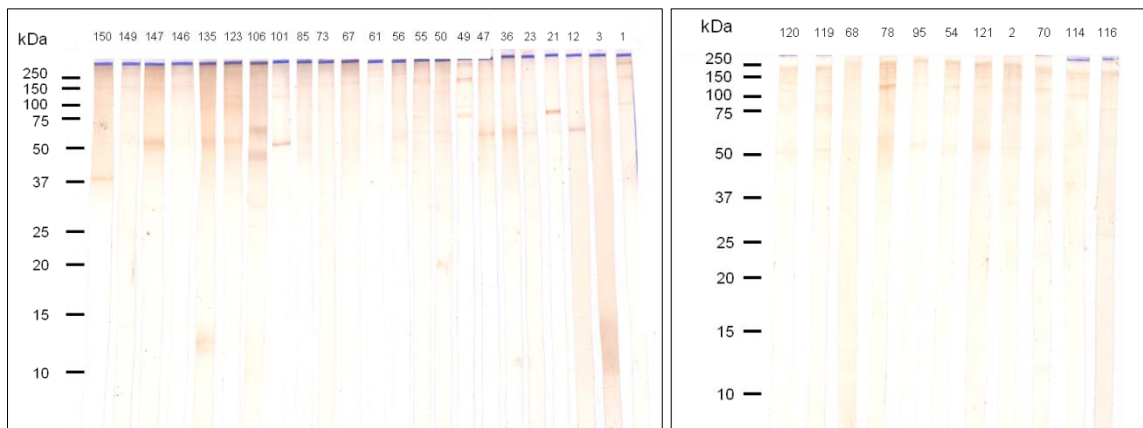


Figura 4. Patrones de reconocimiento a nivel de IgG frente al antígeno total de *Anisakis*, de los sueros positivos a *Anisakis* por ELISA.

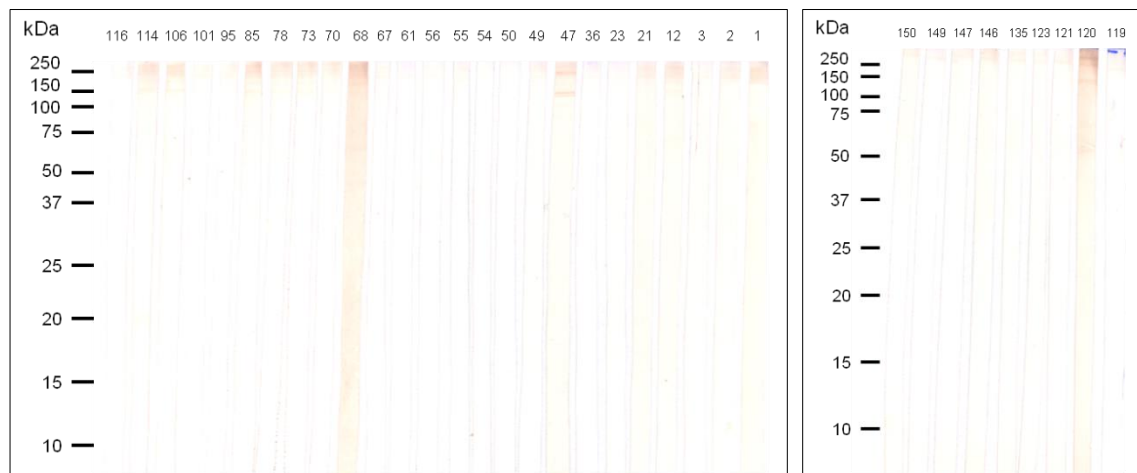


Figura 5. Patrones de reconocimiento a nivel de IgG4 frente al antígeno total de *Anisakis*, de los sueros positivos a *Anisakis* por ELISA.

- **PATRONES DE INMUNORRECONOCIMIENTO A NIVEL DE IgE, IgG e IgG4 FRENTE AL ANTIGENO DE *Ascaris*, DE LOS 36 SUEROS POSITIVOS A *Anisakis* POR EL METODO ELISA**

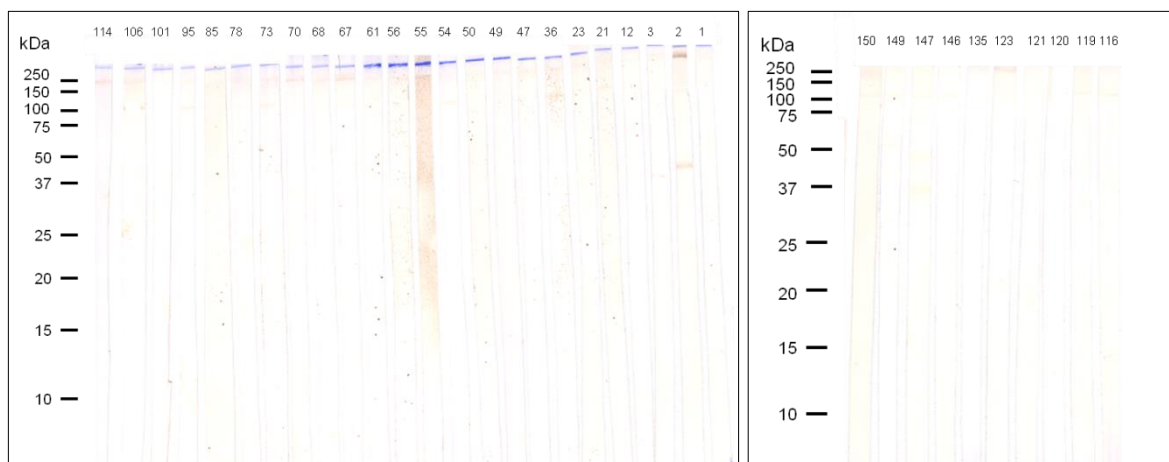


Figura 6. Patrones de reconocimiento a nivel de IgE frente al antígeno total de *Ascaris*, de los sueros positivos a *Anisakis* por ELISA.

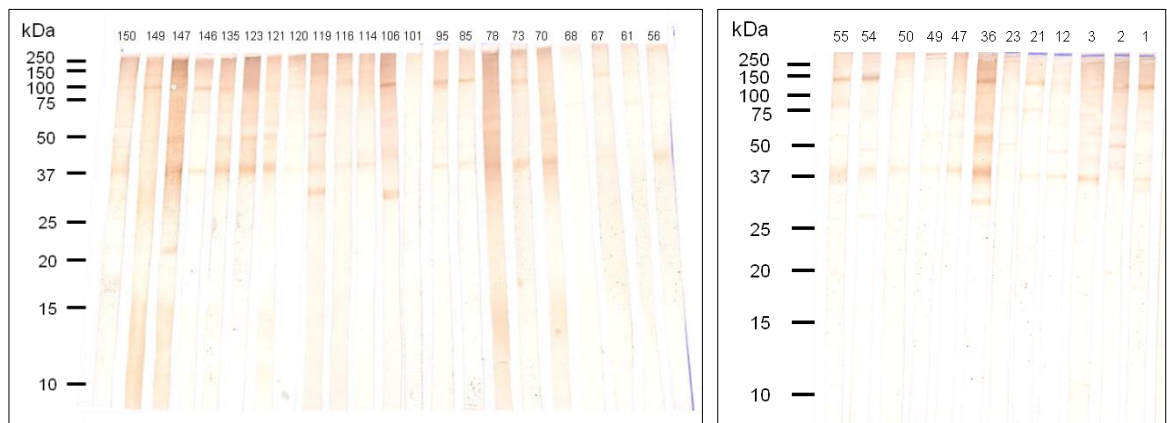


Figura 7. Patrones de reconocimiento a nivel de IgG frente al antígeno total de *Áscaris*, de los sueros positivos a *Anisakis* por ELISA.

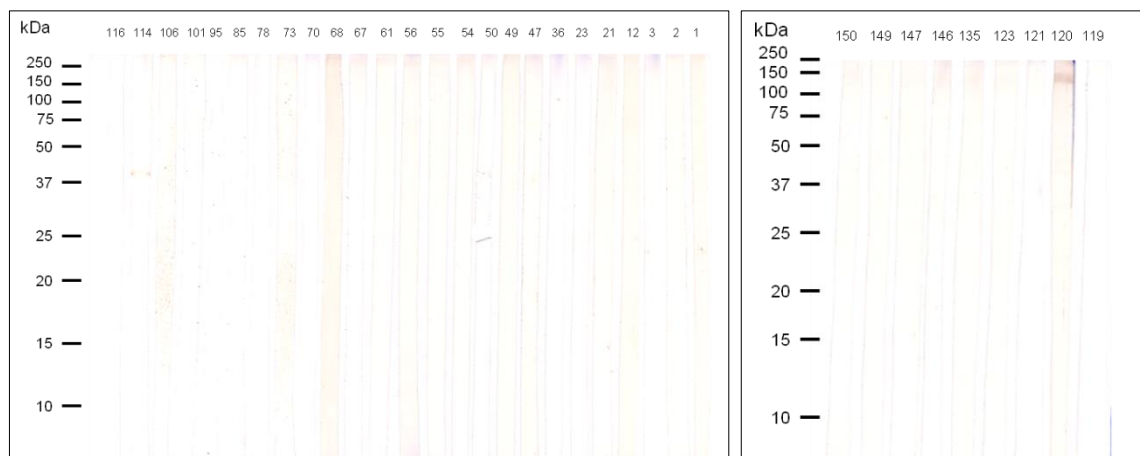


Figura 8. Patrones de reconocimiento a nivel de IgG4 frente al antígeno total de *Áscaris*, de los sueros positivos a *Anisakis* por ELISA.

- **PATRONES DE INMUNORRECONOCIMIENTO A NIVEL DE IgE, IgG e IgG4 FRENTE A LOS ANTIGENOS AK: *Anisakis* y AS: *Ascaris* DE LOS SUEROS POSITIVOS A *Ani* s 3 (TROPOMIOSINA) POR EL METODO DE ELISA.**

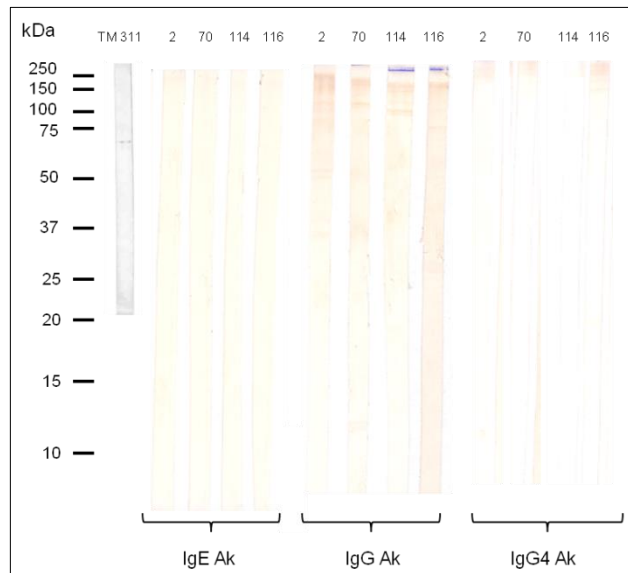


Figura 9. Patrones de reconocimiento a nivel de IgE, IgG e IgG4 frente al antígeno total de *Anisakis* (Ak), de los sueros positivos por ELISA frente a *Ani* s 3. Marcador TM311 anti-tropomiosina

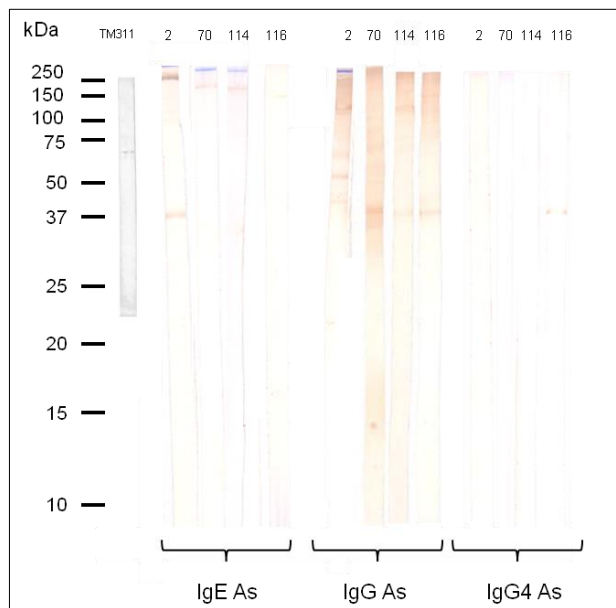


Figura 10. Patrones de reconocimiento a nivel de IgE, IgG e IgG4 frente al antígeno total de *Ascaris* (As), de los sueros positivos por ELISA frente a *Ani* s 3. Marcador TM311 anti-tropomiosina

- **PATRONES DE INMUNORRECONOCIMIENTO A NIVEL DE IgE, IgG e IgG4 FRENTE AL ANTIGENO TOTAL DE *Anisakis*, DE LOS SUEROS POSITIVOS A *Ani* s 13 (HEMOGLOBINA) POR EL METODO DE ELISA.**

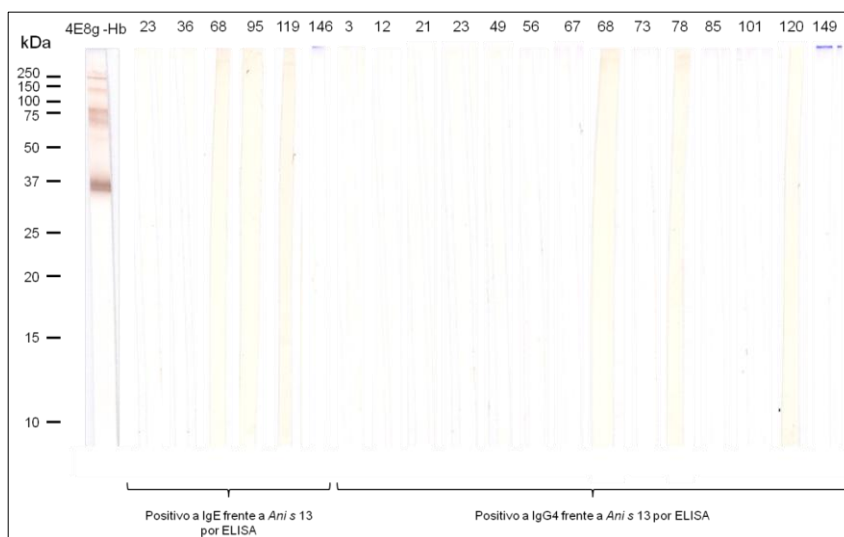


Figura 11. Patrones de reconocimiento a nivel de IgE frente al antígeno total de *Anisakis*, de los sueros positivos a IgE o IgG4 por ELISA frente a *Ani* s 13. Marcador AcMc 4E8g de hemoglobina.

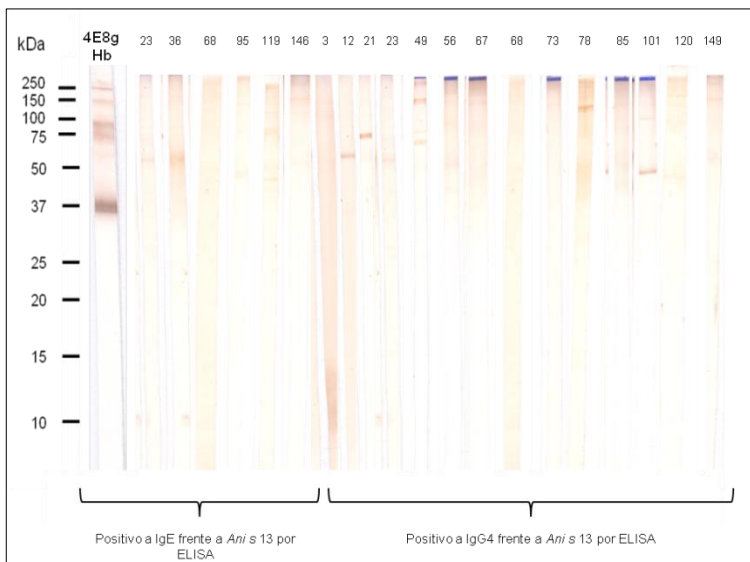


Figura 12. Patrones de reconocimiento a nivel de IgG frente al antígeno total de *Anisakis*, de los sueros positivos por ELISA frente a *Ani* s 13. Marcador AcMc 4E8g de hemoglobina.

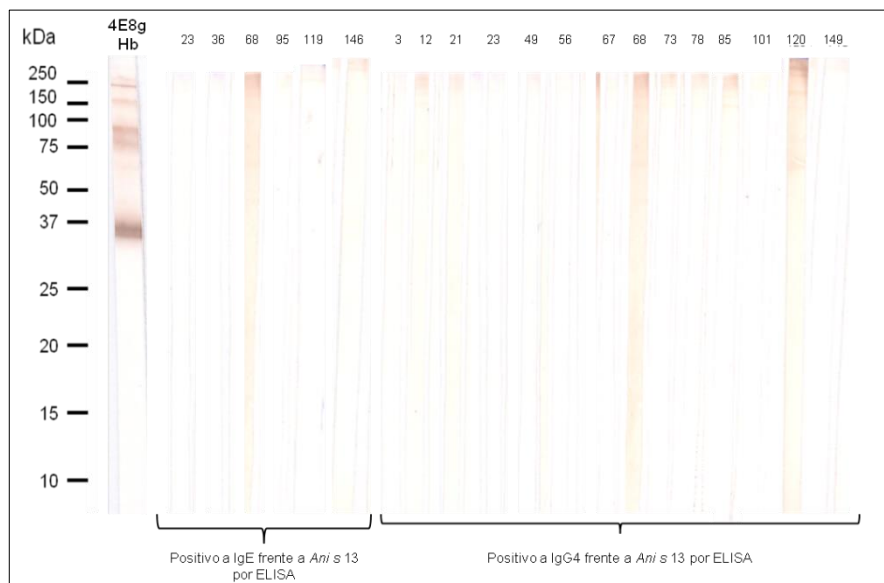


Figura 13. Patrones de reconocimiento a nivel de IgG4 frente al antígeno total de *Anisakis*, de los sueros positivos por ELISA frente a *Ani* s 13. Marcador AcMc 4E8g de hemoglobina.

- **PATRONES DE INMUNORRECONOCIMIENTO A NIVEL DE IgE, IgG e IgG4 FRENTE AL ANTIGENO TOTAL DE *Ascaris*, DE LOS SUEROS POSITIVOS A *Ani* s 13 (HEMOGLOBINA) POR EL METODO DE ELISA.**

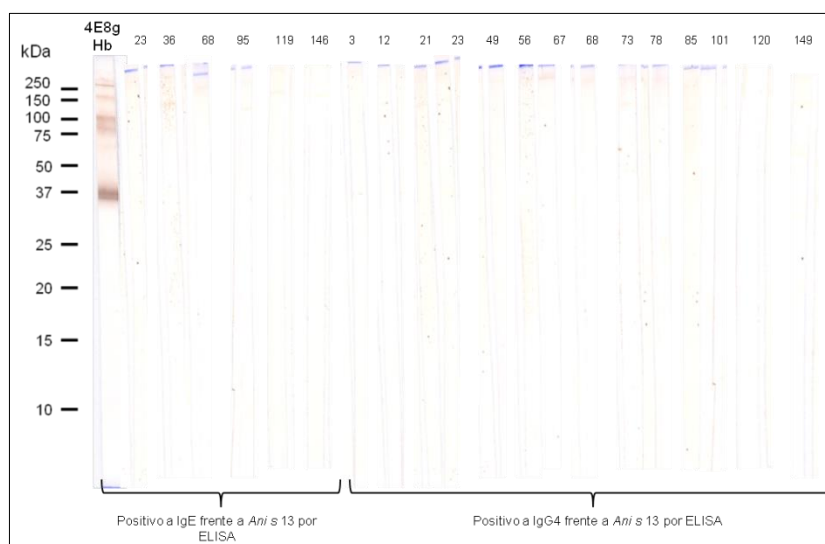


Figura 14. Patrones de reconocimiento a nivel de IgE frente al antígeno total de *Áscaris*, de los sueros positivos a IgE o IgG4 por ELISA frente a *Ani* s 13. Marcador AcMc 4E8g de hemoglobina.

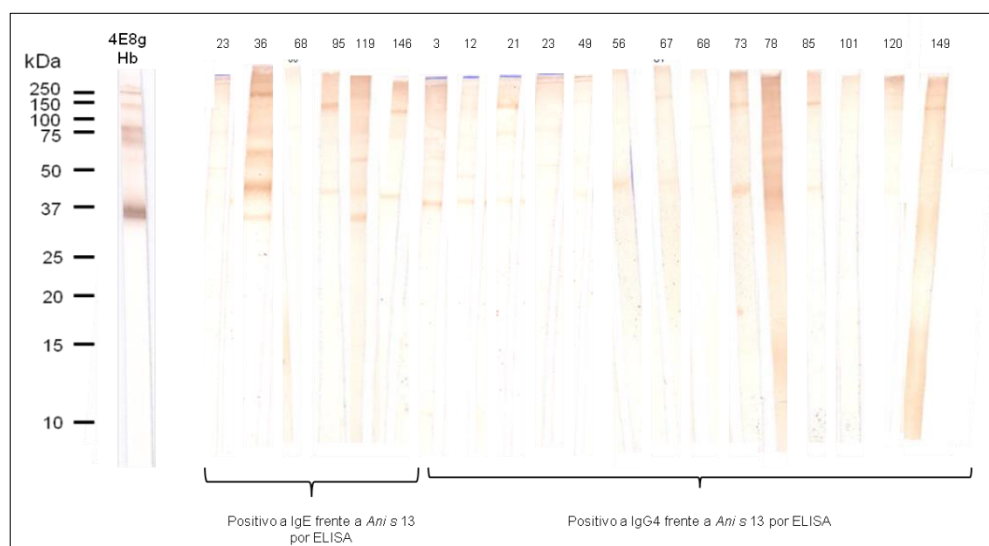


Figura 15. Patrones de reconocimiento a nivel de IgG frente al antígeno total de *Áscaris*, de los sueros positivos a IgE o IgG4 por ELISA frente a *Ani* s 13. Marcador AcMc 4E8g de hemoglobina.

Anexo 25. Analisis descriptivo de la encuesta

De los 150 participantes, 84 eran mujeres (M) (56%) y 66 hombres (H) (44%), con edades entre los 18 y 67 años, y 18 y 61, respectivamente.

Consumo de pescado mensual

	n (%)	Rango de edad	X Consumo pescado al mes
Mujeres	84 (56)	18 - 67	4
Hombres	66 (44)	18 - 61	4
Total	150		4

Consumo de pescado (Hombre y mujeres)			
Edad	n	%	Promedio mensual de consumo de pescado
De 18 a 25	102	68	4
26 a 35	26	17	5
36 a 45	5	3	5
46 a 55	12	8	4
56 a 67	5	3	4
Total	150	100	4

Mujeres consumidoras de pescado			
Edad	n	%	Promedio mensual de consumo
De 18 a 25	57	68	4
26 a 35	14	17	4
36 a 45	4	5	5
46 a 55	5	6	3
56 a 67	4	5	4
Total	84	100	4

Hombres consumidores de pescado			
Edad	n	%	Promedio mensual de consumo
De 18 a 25	45	68	4
26 a 45	13	20	5
46 a 67	8	12	4
Total	66	100	4

Consumo de pescado enlatado

Consumo de pescado enlatado						
Encuestados	n	%	X al mes	Atún (%)	Sardinas (%)	Atún y sardinas (%)
H (66)	58	88	3	78	0	22
M (84)	72	86	3	67	6	28
Total (150)	130	87	3	62	3	22

Mujeres que consumen pescado enlatado, por rango de edad.

Mujeres (n=72)	n	%	X al mes	Atún (%)	Sardinas (%)	Atún y sardinas (%)
De 18 a 25	49	68	2	65	4	31
26 a 35	13	18	3	54	15	31
36 a 45	4	6	3	75	0	25
46 a 55	4	6	3	100	0	0
56 a 67	2	3	2	100	0	0

Hombres que consumen pescado enlatado, por rango de edad.

Hombres (n=58)	n	%	X al mes	Atún (%)	Sardinas (%)	Atún y sardinas (%)
De 18 a 25	40	69	3	73	0	28
26 a 45	11	19	3	91	0	9
46 a 67	7	12	15	86	0	14

Consumo de pescado en restaurante

Consumo de pescado en restaurante			
Encuestados	n	%	X= mes
H (n=66)	43	65	1

M (n=84)	67	80	2
150	110	73	2

Forma de consumo preferida en restaurante

Preparación preferida en restaurantes (%)	
n=110	
Frito	65
Sudado	37
Al vapor	16
Al horno	24
Apanado	36
Crudo	19
Otro	3

Forma de consumo preferida en restaurante por hombres y mujeres

Preparación preferida en restaurantes (%)	
Hombres n= 43	
Frito	60
Sudado	37
Al vapor	16
Al horno	19
Apanado	35
Crudo	21
Otro	0

Preparación preferida en restaurantes (%)	
Mujeres n= 67	
Frito	67
Sudado	37
Al vapor	16
Al horno	27
Apanado	37
Crudo	18
Otro	4

Forma de consumo preferida en restaurante distribuido por rango de edad

Preparación de preferencia en restaurante (%)			
Forma de preparacion	18 a 25	26 a 45	46 a 67
Frito	42	14	9
Sudado	18	11	9
Al vapor	11	2	4
Al horno	17	4	3
Apanado	28	7	1

Crudo	8	10	7
Otro	2	1	0

Forma de preparación	Hombres			Mujeres		
	18 a 25	26 a 45	46 a 67	18 a 25	26 a 45	46 a 67
Frito (%)	30	14	16	49	13	4
Sudado (%)	16	12	12	19	10	7
Al vapor (%)	12	0	5	10	3	3
Al horno (%)	14	2	2	19	4	3
Apanado (%)	26	7	2	30	7	0
Crudo (%)	9	9	19	7	10	0
Otro (%)	0	0	0	3	1	0
Hombres n=43; Mujeres n=67						

Consumo de sushi, salazon y marinado: De 150 participantes, 133 (87%) consumían pescado crudo

Consumo pescado crudo	n	%	X consumo mes	No consumen (%)
Sushi y seviche	79	53	1	71
Salazón, ahumado, marinado	55	37	2	95

Consumo de pescado crudo

Consumo pescado crudo	Hombres (66)				Mujeres (84)			
	n	%	X consumo mes	No consumen	n	%	X consumo mes	No consumen
Sushi y seviche	33	50	1	33	46	55	1	38
Salazón, ahumado, marinado	22	15	2	44	33	39	1	51

Consumo de pescado crudo por rango de edad.

Consumo pescado crudo	Hombres (%)			Mujeres (%)		
	18 a 25	26 a 45	46 a 67	18 a 25	26 a 45	46 a 67

Sushi y seviche (H, n=33; M, n=55)	67	24	9	61	26	13
Salazón, ahumado, marinado (H, n=22; M, n=33)	59	18	23	76	24	0

Especies de pescado que se consumen con frecuencia

Las cinco especies de peces de preferencia para el consumo fueron tilapia (*Oreochromis* sp.) con un 31%, el atún (*Thunnus* sp.) con el 26%, salmón (*Salmo* sp.) con el 17%, trucha (*Oncorhynchus mykiss*) con un 10 % y pargo (*Lutjanus* sp.) con el 3%.

Consumo de mariscos

Respecto a los mariscos, los participantes preferían consumir camarón en un 55% y langostino en un 4%.

Consumo de mariscos			
Encuestados	n	%	Consumo X= mes
150	102	68	2
No consumen	48	32	

Consumo de mariscos		
Edad	Hombres (%)	Mujeres (%)
18 a 25	70	64
26 a 45	15	18
46 a 67	15	18

Consumo de mariscos			
Encuestados	n	%	Consumo X= mes
H (66)	46	70	2
M (84)	56	67	2
150	102	68	

Forma de preparación preferida en el hogar

En la opción otro, las respuestas fueron sancocho y asado

Preparación preferida en casa		
150 encuestados	n	%
Frito	105	70
Sudado	85	57
Apanado	44	29
Al horno	26	17
Al vapor	23	15
Crudo	10	7
Otro	11	7

Preparación preferida en casa		
Hombres n= 66	n	%
Frito	45	68
Sudado	38	58
Apanado	19	29
Al vapor	13	20
Al horno	10	15
Crudo	7	11
Otro	6	9

Preparación preferida en casa		
Mujeres n= 84	n	%
Frito	60	71
Sudado	47	56
Apanado	25	30
Al horno	16	19
Al vapor	10	12
Crudo	3	4
Otro	5	6

Preparación de preferencia en casa H y M (%)			
	18 a 25	26 a 45	46 a 67
Frito	49	13	7
Sudado	39	15	2
Al vapor	12	2	1
Al horno	12	2	3
Apanado	22	5	2
Crudo	5	1	1
Otro	3	3	2

Integrantes de la familia que consumen pescado	
De 150 encuestados (%)	
Todos	47
Adultos	32

Mujeres	17
Hombres	13
Adolescentes	3
Niños	2

Lugar de compra, tiempo de desplazamiento, almacenamiento

Lugar donde compra el pescado	
150 encuestados (%)	
Almacenes de cadena	53
Plaza de mercado o galería	11
Ambos	29
No compra	5
Otro (pesca)	4

Tiempo que demora del lugar de compra a la casa	
150 encuestados (%)	
Menos de 1 hora	67
Entre 1 y 2 horas	21
Medio día o un día	1
Más de 1 día	2
No sabe/No responde	5

Almacenamiento	
150 encuestados (%)	
Congelador	89
Refrigerador	13
No lo almacena	2

Tiempo de almacenamiento en congelación	
1 - 5 días	22
1 -3 semanas	39
1 - 5 meses	14
No sabe/ No responde	25

Tiempo de almacenamiento en refrigeración	
Horas	11
2 -3 días	47
4 -5 días	11
1 y 2 semanas	26
No sabe/ No responde	5

Antecedentes clínicos

Personas que han presentado alguna sintomatología asociada al consumo de pescado o mariscos

Síntomas asociados al consumo de pescado o mariscos	
n=150 (%)	
Digestivos	11
Cutáneos	7
Alérgicos	5
Otros	0

Síntomas asociados al consumo de pescado o mariscos		
H (66) M(84)		%
Digestivos	H	9
	M	12
Cutáneos	H	5
	M	10

Ninguno	83
---------	----

Alérgicos	H	2
	M	8
Ninguno	H	88
	M	79

Personas encuestadas con antecedentes alérgicos a algún tipo de alimento (n =150)

Alergia a algún alimento (%)	
Si	11
No	89

Alimento	n	%
Mariscos	7	44
Lácteos	2	13
Gluten	1	6
Aceituna	1	6
Maracuyá	1	6
Carne cerdo	1	6
Enlatados	1	6
Canela	1	6
Atún	1	6
Maíz enlatado	1	6
No especifica	1	6

Personas encuestadas con antecedentes de alergia respiratoria (n =150)

Alergia respiratoria (%)	
Si	27
No	73

Alergia a ácaros (%)	
Si	47
No	53

Si: Asma - Rinitis

Personas encuestas con antecedentes de otra enfermedad (n=150)

Otra enfermedad (%)	
Si	16
No	84

Alergia al sol
Anemia
Dermatitis
Desorden hormonal

Escoliosis
Falla cardíaca
Fibroadenoides
Gastritis
Hipoglicemia
Migraña
Tumor benigno de parotida
Xeroftalmia

Persona encuestada que habian sido diagnosticadas (Dx) con alguna parasitosis (n=150)

Dx parasitosis (%)		Diagnostico	Hace cuánto tiempo
Si	9	Amebas	2 años
No	78	Amebas	8 meses
No sabe/ No responde	13	Amebas	1 año
		Amebas	20 años
		<i>Ascaris</i>	20 años
		<i>Ascaris</i>	40 años
		<i>Blastocystis hominis</i>	3 meses
		No recuerda	8 años
		No recuerda	1 año
		No recuerda	No recuerda
		No recuerda	No recuerda
		No recuerda	No recuerda
		No recuerda	2 años
		No recuerda	4 años

Personas encuestadas con diagnóstico (Dx) de alguna enfermedad crónica o de urticaria (n=150)

Dx enfermedad infecciosa crónica (%)	
Si	2
No	96

Dx de urticaria (%)	
Si	4
No	93

No sabe/ No responde	2
----------------------	---

Si: Faringitis
Virus de Epstein-Barr
Tuberculosis

No sabe/ No responde	3
----------------------	---

Si: Aguda

Anexo 26. Becas y financiación

- Beca Colciencias para Doctorados en Colombia (Convocatoria 567), Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias – Diciembre del 2012
- Beca académica, para asistir al II Taller de Epidemiología Molecular de Parásitos y Dengue. Federación Latino América de Parasitología. Otorgada por el Instituto Nacional de Salud de Pública del Ecuador y el comité organizador del FLAP, octubre 2013
- Beca Alianza del Pacífico para estancia en la Universidad Austral de Chile, 2014
- Beca de Movilidad de la Asociación Iberoamericana de Postgrado, AUIP, para realizar una estancia académica en la Unidad de Parasitología de la Universidad Complutense de Madrid, 2015
- Beca académica, Convocatoria CPBiol. Consejo Profesional de Biología de Colombia 2015
- Beca Alianza del Pacífico y de la Agencia de Cooperación Internacional del Chile, para realizar Pasantía Doctoral en la Unidad de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Enero 2016

Anexo 27. Premios y Reconocimientos

- Reconocimiento en calidad de destacada ex becaria colombiana del Programa de Formación y Becas de la Agencia de Cooperación Internacional de Chile AGCI, Embajada de Chile, 2017



Anexo 28. Divulgación de resultados

- XX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología y XV Meeting del European Veterinary Parasitology College. Tenerife, España. 2017. Póster: **Castellanos JA.**, Ubeira FM., Pustovrh C., Cruz-Quintana Y., Daschner A., Cuellar C. Sensitisation of IgE to *Anisakis simplex* parasite in a healthy population in Colombia.
- XXVIII Congreso Colombiano de Investigación Médica (CECIM) Neurología e Infectología. Villa de Leyva, 2017. Ponencia: Tangua AR., **Castellanos JA.**, Salazar L. Primer reporte de *Anisakis* sp. en el pez róbalo (*Centropomus armatus*) capturado y comercializado en Buenaventura, Colombia. Este trabajo fue presentado por el estudiante del semillero de investigación y obtuvo el sexto puesto en la categoría trabajo de investigación.
- XXVIII Congreso Colombiano de Investigación Médica (CECIM) Neurología e Infectología. Villa de Leyva, 2017. Propuesta de investigación: Falla-Zuñiga LF., **Castellanos JA.**, Pustovrh C. Alérgeno termoestable *Ani* s 4 en peces de consumo humano. Este trabajo fue presentado por el estudiante del semillero de investigación.
- XVII Simposio de Investigación en Salud: Autocuidado y Cuidado Humano, Universidad del Valle. 2015. Ponencia: **Castellanos JA.**, Tangua AR., Salazar L. Identificación morfológica de parásitos anisakidos aislados de peces de consumo.

Anexo 29. Publicaciones científicas

Castellanos JA., Santana-Piñeros AM., Mercado R., Peña S., Pustovrh C., Cruz-Quintana Y. Presence of anisakid larvae in commercial fishes landed in the Pacific coast of Ecuador and Colombia Revista de la Asociación Colombiana de Infectología – Infectio. In press 2018. (Artículo publicado en revista categoría B pubindex; Q3 Scimago).

Castellanos JA., Tangua AR., Salazar L. First reporting of *Anisakis* sp. in the armed snook fish (*Centropomus armatus*) caught and commercialized in Buenaventura, Colombia. Revista de la Asociación Colombiana de Infectología – Infectio 2018; 22(3): 136-140. (Artículo publicado en revista categoría B pubindex; Q3 Scimago).

Castellanos JA., Tangua AR., Salazar L. Anisakidae nematodes isolated from the flathead grey mullet fish (*Mugil cephalus*) of Buenaventura, Colombia. 2017. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 6:265–70. (Artículo publicado en revista categoría A1 pubindex; Q1 Scimago).

Rodríguez-Pérez EG, Escandón-Vargas K, **Castellanos JA.** An unusual imported case of diphyllbothriosis in Mexico. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2017; 21 (3) 355-6. (Artículo publicado en revista categoría A2 pubindex; Q2 Scimago).

BIBLIOGRAFÍA

1. Maniscalchi Badaoui MT, Lemus-Espinoza D, Marcano Y, Nounou E, Zacarías M, Narváez N. Larvas Anisakidae en peces del género Mugil comercializados en mercados de la región costera nor-oriental e insular de Venezuela. *Saber, Univ Oriente, Venez.* 2015;27(1):30–8.
2. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Colombia Pesca en Cifras [Internet]. Bogotá; 2014. 18 p. Available from: http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/05/Pesca_en_cifras.pdf
3. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura [Internet]. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 2016. 224 p. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
4. FAO. Estado mundial de la pesca y la acuicultura. El Estado Mund La Pesca Y Acuic 2014 [Internet]. 2014;(parte 1):3–45. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i3720s/i3720s01.pdf>
5. Jofré L, Neira P, Noemí I, Cerva JL. Pseudoterranovosis and sushi. *Rev Chilena Infectol* [Internet]. 2008;25(3):200–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18580998>
6. Tuemmers C, Willgert K, Serri M. Anisakiasis y Difilobotriasis . Ictiozoonosis de riesgo para la salud pública asociada al consumo del pescado crudo en Chile Zoonoses , a Public Health Risk Associated with. 2014;27–39.
7. Cabrera R, Trillo-Altamirano MP. Anisakidosis: ¿Una zoonosis parasitaria marina desconocida o emergente en el Perú? *Rev Gastroenterol del Perú.* 2004;24:335–42.
8. Cabello FC. Acuicultura y salud pública. La expansión de la difilobotriasis en Chile y el mundo. *Rev Med Chil.* 2007;135(8):1064–71.
9. Torres P, Moya R, Lamilla J. Nematodos anisákidos de interés en salud pública en peces comercializados en Valdivia, Chile. *Arch Med Vet* [Internet]. 2000 [cited 2015 Sep 21]; Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2000000100014&script=sci_arttext
10. Gómez B, Lasa E, Arroabarren E, Garrido S, Anda M, Tabar AI. Allergy to Anisakis simplex. *An Sist Sanit Navar.* 2003;26(Suppl 2):25–30.
11. Prester L. Seafood Allergy, Toxicity, and Intolerance: A Review. *J Am Coll Nutr.* 2016;35(3):271–83.
12. Buendía E. Anisakis, anisakidosis, and allergy to Anisakis. *Allergy.* 1997;52(5):481–2.
13. Terán-angel G, Rojas J. Anisakidosis , inflamación e hipersensibilidad (Anisakidosis , inflammation and hypersensitivity) Resumen. *Av en Biomed.* 2012;1(1):30–7.
14. Torres-Frenzel P, Torres P. Anisakid Parasites in Commercial Hake Ceviche in Southern Chile. *J Food Prot* [Internet]. 2014;77(7):1237–40. Available from: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-13-538>
15. Couture C, Measures L, Gagnon J, Desbiens C. Human Intestinal Anisakiosis Due to Consumption of Raw Salmon. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(8):1167–72.
16. Valle J, Lopera E, Sánchez ME, Lerma R, Ruiz JL. Spontaneous splenic rupture and Anisakis appendicitis presenting as abdominal pain: a case report. *J Med Case Rep* [Internet]. 2012;6(1):114. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3355033&tool=pmcentrez&render_type=abstract
17. Cabrera R, Luna-Pineda MA, Suárez-Ognio L. Nuevo caso de infección humana por una larva de Pseudoterranova decipiens (Nematoda, Anisakidae) en el Perú. *Rev Gastroenterol del Perú.* 2003;23:217–20.
18. Mercado R, Torres P, Muñoz V, Apt W. Human infection by Pseudoterranova decipiens (Nematoda, Anisakidae) in Chile: report of seven cases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(5):653–5.
19. Bouree P, Paugam A, Petithory J. Anisakidosis: Report of 25 cases and review of the literature. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1995;18(2):75–84.
20. Colombo F, Cattaneo P, Castelletti M, Bernardi C. Prevalence and Mean Intensity of

- Anisakidae Parasite in Seafood Caught in Mediterranean Sea Focusing on Fish Species at Risk of Being Raw-consumed. A Meta Analysis and Systematic Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2015;8398(June 2015):00–00. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2012.755947>
21. Audicana MT, Ansotegui IJ, Fernández de Corres L, Kennedy MW. Anisakis simplex: dangerous--dead and alive? *Trends Parasitol*. 2002;18(1):20–5.
 22. Klimpel S, Palm HW. Anisakid Nematode (Ascaridoidea) Life Cycles and Distribution : Increasing Zoonotic Potential in the Time of Climate Change ? 2011;201–22.
 23. D'amico P, Malandra R, Costanzo F, Castiglione L, Guidi A, Gianfaldoni D, et al. Evolution of the Anisakis risk management in the European and Italian context. *Food Res Int* [Internet]. 2014;64:348–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.038>
 24. WHO/FAO/OIE. Report of the WHO/FAO/OIE joint consultation on emerging zoonotic diseases. *Who/Cds/Cpe/Zfk/20049* [Internet]. 2004;(May):72. Available from: http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_ZFK_2004.9.pdf
 25. Parlamento Europeo. Reglamento (CE) N° 854 [Internet]. 2004 p. 115. Available from: https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/controlesSanitarios/instaAlmacen/pdf/Reg_854_2004_HA.pdf
 26. INP. Plan Nacional de Control. *Control*. 2015. 1-61 p.
 27. INP. REGISTRO OFICIAL No. 302 (junio 29 de 2006). 2006;302(302):29–32.
 28. OPS. Guía de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control - HACCP [Internet]. 2013. 4 p. Available from: <http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/05/GuiaHACCP.pdf>
 29. Nicaragua NJ de. Ley No. 291 de Salud Animal y Vegetal. 1999.
 30. Ministerio de la Proteccion Social de la Republica de Colombia. Resolucion 776 de 2008 [Internet]. Colombia; 2008 p. 9. Available from: https://www.invima.gov.co/images/stories/resoluciones/resolucion_776_2008.pdf
 31. Cabrera R, Suárez-Ognio L. Probable emergencia de anisakiosis por larvas de Anisakis physeteris durante el fenómeno El Niño 1997-98 en la costa peruana. *Parasitol Latinoam*. 2002;57:1–7.
 32. Lima dos Santos CA. Enfermedades transmitidas por pescado ¿Que pasa en el sur? *Infopesca Internacional*. 2012;51:11–5.
 33. Maniscalchi-Badaoui MT, Lemus-Espinoza D, Marcano Y, Nounou E, Zacarias M, Narvaez N. Larvas Anisakidae en peces del genero Mugil comercializados en mercados de la region costera nor-oriental e insular de Venezuela. *Saber, Univ Oriente, Venez*. 2015;27(1):30–8.
 34. Olivero Verbel J, Baldiris Avila R. Parásitos en peces colombianos: Están enfermando nuestros ecosistemas? Editorial U. Cartagena; 2008. 120 p.
 35. Valls A, Pascual CY, Martín Esteban M. Anisakis y anisakiosis. *Allergol Immunopathol (Madr)* [Internet]. 2003;31(6):348–55. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301054603792118>
 36. Hochberg NS, Hamer DH. Anisakidosis : Perils of the Deep. 2010;51.
 37. Pravettoni V, Primavesi L, Piantanida M. Anisakis simplex: current knowledge. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2012;44:150–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092000>
 38. Takahashi, S; Ishikura, H; Kikuchi K. Anisakidosis: Global Point of View. In: Ishikura H, editor. *Host Response to International Parasitic Zoonoses*. First. Springer; 1998. p. 112.
 39. Hochberg NS, Hamer DH. Anisakidosis: Perils of the Deep. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010;51(7):806–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20804423>
 40. Kim SH, Park CW, Kim SK, Won S, Park WK, Kim HR, et al. A case of anisakiasis invading the stomach and the colon at the same time after eating anchovies. *Clin Endosc*. 2013;46(3):293–6.
 41. Sohn W-M, Na B-K, Kim TH, Park T-J. Anisakiasis: Report of 15 Gastric Cases Caused by Anisakis Type I Larvae and a Brief Review of Korean Anisakiasis Cases. *Korean J Parasitol* [Internet]. 2015 Aug [cited 2016 May 23];53(4):465–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4566497&tool=pmcentrez&render>

- type=abstract
42. Mercado R, Torres P, Maira J. Human case of gastric infection by a fourth larval stage of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae). *Rev Saude Publica*. 1997;31(2):178–81.
 43. Yorimitsu N, Hiraoka a, Utsunomiya H, Imai Y, Tatsukawa H, Tazuya N, et al. Colonic intussusception caused by anisakiasis: A case report and review of the literature. *Intern Med* [Internet]. 2013;52(2):223–6. Available from: http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L368124160%5Cnhttps://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/52/2/52_52.8629/_pdf%5Cnhttp://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.52.8629%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBAS
 44. Shimamura Y, Ishii N, Ego M, Nakano K, Ikeya T, Nakamura K, et al. Multiple Acute Infection by Anisakis: A Case Series. *Intern Med* [Internet]. 2016 Jan [cited 2016 May 23];55(8):907–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27086803>
 45. Mineta S, Shimanuki K, Sugiyama A, Tsuchiya Y, Kaneko M, Sugiyama Y, et al. Chronic anisakiasis of the ascending colon associated with carcinoma. *J Nihon Med Sch = Nihon Ika Daigaku zasshi*. 2006;73(3):169–74.
 46. Ghimire R, Urban C, Gervacio B, Tong J, Kim S, Senegal-Maurer S. Gastrointestinal: Upper gastrointestinal bleeding due to an unusual parasite. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016;31(8):1383. Available from: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118533731/toc%0Ahttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed18b&NEWS=N&AN=611937006>
 47. Cabrera R. Anisakiasis outbreak by anisakis simplex larvae associated to Peruvian food in Spain. *Rev Esp Enfermedades Dig*. 2010;102(10):610–1.
 48. Torres P, Jercic MI, Weitz JC, Dobrew EK, Mercado RA, Lalle M, et al. Human Pseudoterranovosis, an Emerging Infection in Chile A Novel *Giardia duodenalis* Assemblage A Subtype in Fallow Deer. 93(2):440–3.
 49. Sanchez J, Kuba L, Beron-Vera B, Dans SL, Crespo EA, Van Bresse MF, et al. Uterine adenocarcinoma with generalised metastasis in a bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* from northern Patagonia, Argentina. *Dis Aquat Organ*. 2002;48(2):155–9.
 50. Kuchta R, Serrano-Martínez ME, Scholz T. Pacific broad tapeworm *Adenocephalus pacificus* as a causative agent of globally reemerging *Diphyllobothriosis*. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1697–703.
 51. Di Azevedo MIN, Carvalho VL, Iñiguez AM. First record of the anisakid nematode *Anisakis nascettii* in the Gervais' beaked whale *Mesoplodon europaeus* from Brazil. *J Helminthol* [Internet]. 2016;90:48–53. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022149X14000765
 52. Alejo-Plata MC, Cerdan-Ladrón de Guevara G, González-Medina G. Larvas de *Anisakis* sp (Nematoda: Anisakidae), presentes en el pez dorado (*Corhyphaena hippurus*), en las costas de Oaxaca, México. *Cienc y Mar*. 2000;7(20):45–9.
 53. Kleinert S, Hermosilla C, Ziltener A, Kreicker S, Hirzmann J, Abdel-Ghaffar F, et al. Gastrointestinal parasites of free-living Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) in the Northern Red Sea, Egypt. *Parasitol Res*. 2014;113(4):1405–15.
 54. Olivero-Verbel J, Baldiris-Ávila R, Güette-Fernández J, Benavides-Alvarez A, Mercado-Camargo J, Arroyo-Salgado B. *Contracaecum* sp. infection in *Hoplias malabaricus* (moncholo) from rivers and marshes of Colombia. *Vet Parasitol*. 2006;140(1–2):90–7.
 55. Olivero V J, Arroyo S B, Manjarrez P G. Parasites and hepatic histopathological lesions in *lisa* (*mugil incilis*) from totumo mash, north of colombia. *Rev MVZ Cordoba*. 2013;18(1):3288–94.
 56. Olivero VJ, Caballero-Gallardo K, Arroyo-Salgado B. Nematode infection in fish from Cartagena Bay, North of Colombia. *Vet Parasitol*. 2011;177(1–2):119–26.
 57. Ulloa Ulloa LA. Determinacion de parásitos en pescados mas comercializados en los mercados 10 de noviembre y 24 de mayo (Bellavista), ubicado en el canton Guaranda, provincia Bolivar. Universidad Eestatal de Bolivar; 2008.
 58. Olivero Verbel J, Caballero-Gallardo K, Arroyo-Salgado B. Nematode infection in fish from

- Cartagena Bay, North of Colombia. *Vet Parasitol.* 2011;177(1–2):119–26.
59. Wadnipar Cano LM. Evaluación de la infección parasitaria por nemátodos anisákidos en peces de interés comercial en el municipio de San Marcos (Sucre). Universidad de Manizales; 2013.
60. Pardo S, Mejía P K, Navarro V Y, Atencio G V. Prevalencia y abundancia de *Contracaecum* sp. en rubio (*Salminus affinis*) en el río Sinú y San Jorge: Descripción morfológica. *Rev MVZ Córdoba.* 2007;12(1):887–96.
61. Mercado P R, Torres H P, Gil L LC, Goldin G L. Anisakiasis en un paciente portadora de una pequeña hernia hiatal. Caso clínico. *Rev Med Chil.* 2006;134(12):1562–4.
62. Borges JN, Cunha LFG, Santos HLC, Monteiro-Neto C, Santos CP. Morphological and molecular diagnosis of anisakid nematode larvae from cutlassfish (*trichiurus lepturus*) off the coast of Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2012;7(7):1–14.
63. Iñiguez AM, Santos CP, Vicente ACP. Genetic characterization of *Anisakis typica* and *Anisakis physeteris* from marine mammals and fish from the Atlantic Ocean off Brazil. *Vet Parasitol.* 2009;165(3–4):350–6.
64. Figueiredo Jr I, Vericimo MA, Cardoso LR, São Clemente SC, do Nascimento ER, Teixeira GAPB. Cross-sectional study of serum reactivity to *Anisakis simplex* in healthy adults in Niterói, Brazil. *Acta Parasitol.* 2013;58(3):399–404.
65. Pravettoni V, Primavesi L, Piantanida M. *Anisakis simplex*: current knowledge. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2012;44(4):150–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092000>
66. Mattiucci S, Nascetti G. Chapter 2 Advances and Trends in the Molecular Systematics of Anisakid Nematodes, with Implications for their Evolutionary Ecology and Host-Parasite Co-evolutionary Processes. *Adv Parasitol.* 2008;66(8):47–148.
67. Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Portes Santos C, Costa G, Di Benedetto AP, et al. 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.* 2002;51(3):159–70.
68. Mattiucci S, Paggi L, Nascetti G, Abollo E, Webb SC, Pascual S, et al. Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae)s. *Int J Parasitol.* 2001;31(1):9–14.
69. Mattiucci S, Cimmaruta R, Cipriani P, Abaunza P, Bellisario B, Nascetti G. Integrating *Anisakis* spp. parasites data and host genetic structure in the frame of a holistic approach for stock identification of selected Mediterranean Sea fish species. *Parasitology* [Internet]. 2015;142:90–108. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182014001103
70. Audicana MT, Kennedy MW. *Anisakis simplex*: From obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(2):360–79.
71. Fitzsimmons CM, Falcone FH, Dunne DW. Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity. *Front Immunol.* 2014;5(FEB):1–12.
72. Abattouy N, Valero A, Martín-Sánchez J, Peñalver MC, Lozano J. Sensitization to *Anisakis simplex* species in the population of Northern Morocco. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2012;22(7):514–9.
73. D'Amelio S, Mathiopoulou KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanço M, et al. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol.* 2000;30:223–6.
74. Umehara A, Kawakami Y, Matsui T, Araki J, Uchida A. Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol Int.* 2006;55(4):267–71.
75. Mladineo I, Poljak V. Ecology and genetic structure of zoonotic *Anisakis* spp. from adriatic commercial fish species. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(4):1281–90.
76. Nadler SS a, D'Amelio S, Dailey MD, Paggi L, Siu S, Sakanari J a. Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from northern Pacific

- marine mammals. J Parasitol [Internet]. 2005;91(6):1413–29. Available from: <http://www.journalofparasitology.org/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1645%2FGE-522R.1>
77. Kuhn T, García-Márquez J, Klimpel S. Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: A zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. PLoS One. 2011;6(12).
 78. Baird FJ, Gasser RB, Jabbar A, Lopata AL. Foodborne anisakiasis and allergy. Mol Cell Probes [Internet]. 2014;28(4):167–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2014.02.003>
 79. Smith JW, Wootten R. Anisakis and Anisakiasis. Adv Parasitol. 1978;16(C):93–163.
 80. Fukuda T, Aji T, Tonga Y. Surface ultrastructure of larval Anisakidae (Nematoda: Ascaridoidea) and its identification by mensuration. Acta Med Okayama. 1988;42(105–16).
 81. Osanz Mur AC. Presencia de larvas de anisákidos (Nematoda: Ascaridoidea) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona [Internet]. Universidad Autonoma de Barcelona; 2002 [cited 2015 Sep 21]. Available from: <http://ddd.uab.cat/record/36959>
 82. Murata R, Suzuki J, Sadamasu K, Kai A. Morphological and molecular characterization of Anisakis larvae (Nematoda: Anisakidae) in Beryx splendens from Japanese waters. Parasitol Int [Internet]. 2011;60(2):193–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.02.008>
 83. Abattouy N. Prevalencia y factores de riesgo de la anisakiosis en el norte de Marruecos. Universidad de Granada; 2012.
 84. Koinari M, Karl S, Elliot A, Ryan U, Lymbery AJ. Identification of Anisakis species (Nematoda: Anisakidae) in marine fish hosts from Papua New Guinea. Vet Parasitol [Internet]. 2013;193(1–3):126–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.008>
 85. Quiazon KMA, Yoshinaga T, Ogawa K. Distribution of Anisakis species larvae from fishes of the Japanese waters. Parasitol Int [Internet]. 2011;60(2):223–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.03.002>
 86. Mattiucci S, Paoletti M, Olivero-Verbel J, Baldiris R, Arroyo-Salgado B, Garbin L, et al. Contracaecum bioccai n. sp. from the brown pelican Pelecanus occidentalis (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): morphology, molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds. Syst Parasitol. 2008;69(2):101–21.
 87. Cipriani P, Smaldone G, Acerra V, D'Angelo L, Anastasio A, Bellisario B, et al. Genetic identification and distribution of the parasitic larvae of Anisakis pegreffii and Anisakis simplex (s. s.) in European hake Merluccius merluccius from the Tyrrhenian Sea and Spanish Atlantic coast: Implications for food safety. Int J Food Microbiol [Internet]. 2015;198:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2014.11.019>
 88. Quijada SG, Escudero RG, García LA, Martín ARG. Manifestaciones digestivas de la anisakiasis : descripción de 42 casos. Rev clínica española. 2005;205(7):311–5.
 89. Olivares Ponce FO. Efecto sobre los alérgenos de las larvas L3 de Anisakis al aplicar tratamientos selectivos en pescado parasitado. Universidad Complutense de Madrid; 2013.
 90. Valero A, Diaz V, Adroher F. Anisákidos parásitos de peces comerciales del Mediterráneo andaluz. Rev Col Ofic Biol Andal [Internet]. 2004 [cited 2015 Sep 21]; Available from: http://www.researchgate.net/profile/Francisco_Javier_Adroher/publication/235709253_Aniskidos_parsitos_de_peces_comerciales_del_Mediterraneo_andaluz/links/02bfe512dfcf06abcb00000.pdf
 91. Llarena-Reino M, Gonzalez AF, Vello C, Outeiriño L, Pascual S. The accuracy of visual inspection for preventing risk of Anisakis spp. infection in unprocessed fish. Food Control [Internet]. 2012;23(1):54–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.010>
 92. Abou-Rahma Y, Abdel-Gaber R, Kamal Ahmed A. First Record of Anisakis simplex Third-Stage Larvae (Nematoda, Anisakidae) in European Hake Merluccius merluccius lessepsianus in Egyptian Water. J Parasitol Res [Internet]. 2016 Jan [cited 2016 May 23];2016:9609752. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4746349&tool=pmcentrez&render type=abstract>

93. Kassem HH, Bowashi SM. PREVALENCE OF ANISAKID NEMATODE LARVAE INFECTING SOME MARINE FISHES FROM THE LIBYAN COAST. J Egypt Soc Parasitol [Internet]. 2015 Dec [cited 2016 May 23];45(3):609–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26939239>
94. Mancini MA, Biole FG, Salinas VH, Guagliardo SE, Tanzola RD, Morra G. Prevalence, Intensity and ecological aspects of *Contracaecum* sp. (Nematode:Anisakidae) in freshwater of Argentina. Neotrop Helminthol. 2014;8(1):111–22.
95. Santos-Portes C, Lodi L. Occurrence of *Anisakis physeteris* Baylis, 1923 and *Pseudoterranova* sp. (Nematoda) in pygmy sperm whale *Kogia breviceps* (De Blainville, 1838) (Physeteridae) in northeastern coast of Brazil. Memorias do Inst Oswaldo. 1998;93(2):187–8.
96. Torres P, Moya R, Lamilla J. Nematodos anisakidos de interes en salud publica en peces comercializados en Valdivia, Chile. Arch Med Vet. 2000;3(5):1–6.
97. Marigo J, Taniwaki SA, Pinto PLS, Soares RM, Catao-Dias JL. Molecular Identification of *Pseudoterranova azarasi* Larvae in Cod (*Gadus* sp.) sold for human consumption in Brazil. Rev do Inst Med Trop Sao Paulo. 2015;57(6):537–9.
98. Rodrigues MV. Presenca do parasita anisakideo em pescada (*Cynoscion* spp.) como ponto critico de controle na cadeia productiva do pescado comercializado na Baixada Santista. Instituto Biologico Sao Paulo; 2010.
99. Fontenelle G, Knoff M, Nunes-Felizardo N, Lopes-Torres EJ, Rodrigues-Matos E, Correa-Gomes D, et al. Anisakid larva parasitizing *Plagioscion squamosissimus* in Marajó Bay and Tapajós River, state of Pará, Brazil. BrazJVetParasitol. 2016;25(4):492–6.
100. Peña-Rehbein P, Ríos-Escalante PD. Use of negative binomial distribution to describe the presence of *Anisakis* in *Thyrssites atun*. Rev Bras Parasitol Veterinária. 2012;21:78–80.
101. Torres P, Puga S, Castillo L, Lamilla J, Miranda JC. Helminths, myxozoans and microsporidians in muscles of commercialised fresh fish and their importance as potential risk for human health in the city of Valdivia, Chile. Arch Med Vet. 2014;46(1):83–92.
102. Torres-Frenzel P. Parasitos anisakidos en cebiche de merluza, comercializado en las localidades de Valdivia y Niebla, Chile. Universidad Austral de Chile; 2013.
103. Olivero-Verbel J, Baldiris-Avila R, Arroyo-Salgado B. Nematode infection in *Mugil incilis* (Lisa) from Cartagena Bay and Totumo Marsh, north of Colombia. J Parasitol [Internet]. 2005;91(5):1109–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16419755>
104. Castellanos JA, Tangua AR, Salazar L. Anisakidae nematodes isolated from the flathead grey mullet fish (*Mugil cephalus*) of Buenaventura, Colombia. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2017;6:265–70.
105. Ruiz L, Vallejo A. Parametros de infeccion por nematodos de la familia Anisakidae que parasitan la Lisa (*Mugil incilis*) en la bahia de Cartagena (Caribe Colombiano). Rev Intropica. 2013;8:53–60.
106. Bracho-Espinoza H, Molina JD, Pirona M, Milagro C. Nematodos de la Familia Anisakidae en productos de la pesa, faja contera medano blanco, estado Falcon, Venezuela. Rev Cient FCV-LUZ. 2013;23(2):163–7.
107. Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, Moneo I, Solas MT, Mendizábal A, de las Heras C, et al. Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion. J Food Prot. 2008;71(12):2578–81.
108. Moravec F, Scholz T. Methods of investigating metazoan parasites. Training course of fish parasites. Institute. 1992.
109. Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, de las Heras C, Tejada M, Moneo I. Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(8):967–73.
110. Vidaček S, De las Heras C, Solas MT, García ML, Mendizábal Á, Tejada M. Viability and antigenicity of *Anisakis simplex* after conventional and microwave heating at fixed temperatures. J Food Prot. 2011;74(12):2119–26.
111. Mladineo I, Poljak V, Martić S, Sernić V, Ubeira FM. Anti-*Anisakis* IgE Seroprevalence in the Healthy Croatian Coastal Population and Associated Risk Factors.

- PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(2).
112. Cavallero S, Magnabosco C, Civettini M, Boffo L, Mingarelli G, Buratti P, et al. Survey of *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. in sardines and anchovies from the North Adriatic Sea. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2015;200:18–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.017>
 113. Amir A, Ngui R, Wan Ismail WH, Wong KT, Ong JSK, Lim YAL, et al. Case report: Anisakiasis causing acute dysentery in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(2):410–2.
 114. Craig N. Fish tapeworm and sushi. *Can Fam Physician*. 2012;58(6):654–8.
 115. Jofre L, Neira P, Noemi I, Cerva J. Pseudoterranovosis y sushi. *Parasitología*. 2008;25(3):200–6.
 116. Nawa Y, Hatz C, Blum J. Sushi Delights and Parasites: The Risk of Fishborne and Foodborne Parasitic Zoonoses in Asia. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2005;41(9):1297–303. Available from: <http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/496920>
 117. Bouree P, Paugam A, Petithory JC. Anisakidosis: Report of 25 Cases and review of the Literature. *Comp Immun Microbiol infect Dis*. 1995;18(2):75–84.
 118. Shimamura Y, Muwanwella N, Chandran S, Kandel G, Marcon N. Common Symptoms from an Uncommon Infection: Gastrointestinal Anisakiasis. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2016;2016.
 119. Field-Cortazares J, Calderón-Campos R. Intoxicación por *Anisakis*. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*. 2009;26(1):43–7.
 120. Peláez MA, Codoceo CM, Montiel PM, Gómez FS, Castellano G, Herruzo JAS. Anisakiasis múltiple. *Rev Esp Enfermedades Dig*. 2008;100(9):581–2.
 121. Mercado R, Torres P, Muñoz V, Apt W. Human infection by *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) in Chile Report of seven cases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(5):653–5.
 122. Nieuwenhuizen N. *Anisakis* - Immunology of a food-borne parasitosis. *Parasite Immunol*. 2016;
 123. Shimamura Y, Muwanwella N, Chandran S, Kandel G, Marcon N, Shimamura Y, et al. Common Symptoms from an Uncommon Infection: Gastrointestinal Anisakiasis. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2016;2016:1–7.
 124. García JM, Romero Arauzo MJ. Dolor torácico anginoso como manifestación inicial de anisakiasis gástrica. 2004;21:185–6.
 125. Cuéllar C, Daschner A, Valls A, De Frutos C, Fernández-Fígares V, Anadón AM, et al. *Ani s* 1 and *Ani s* 7 recombinant allergens are able to differentiate distinct *Anisakis simplex*-associated allergic clinical disorders. *Arch Dermatol Res*. 2012;304(4):283–8.
 126. Martínez E. Anisakiosis. 2009;7:18–22.
 127. Audicana MT, Del Pozo MD, Iglesias R, Ubeira FM. *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens*. In: *International Handbook of Foodborne Pathogens*. 2003. p. 613–36.
 128. Shibata E, Ueda T, Akaike G, Saida Y. CT findings of gastric and intestinal anisakiasis. *Abdom Imaging*. 2014;39(2):257–61.
 129. Kim LS, Lee YH, Kim S, Park HR, Cho SY. A case of anisakiasis causing intestinal obstruction. Vol. 29, *Korean Journal of Parasitology*. 1991. p. 93–6.
 130. Couture C, Measures L, Gagnon J, Desbiens C. Human intestinal anisakiosis due to consumption of raw salmon. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(8):1167–72.
 131. Mladineo I, Popović M, Drmić-Hofman I, Poljak V. A case report of *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) identified from archival paraffin sections of a Croatian patient. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016 Jan [cited 2016 May 23];16:42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4736626&tool=pmcentrez&render type=abstract>
 132. Takano Y, Gomi K, Endo T, Suzuki R, Hayashi M, Nakanishi T, et al. Small intestinal obstruction caused by anisakiasis. *Case Rep Infect Dis* [Internet]. 2013;2013:401937. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3888701&tool=pmcentrez&render type=abstract>

133. Alonso A, Moreno-Ancillo A, Daschner A, López-Serrano M. Dietary assessment in five cases of allergic reactions due to gastroallergic anisakiasis. *Allergy*. 1999;54(517–520).
134. Hoshino C, Narita M. Anisakis simplex-induced anaphylaxis. *J Infect Chemother*. 2011;17(4):544–6.
135. Weitzel T, Sugiyama H, Yamasaki H, Ramirez C, Rosas R, Mercado R. Human infections with pseudoterranova cattani nematodes, Chile. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1874–5.
136. Maria K. Anisakiasis caused by herring in vinegar : a little known medical problem. 1988;843–7.
137. Torres, M; Canales, M; Concha, M; Cofre, X; Tellez P. Un caso de anisakiosis en un adulto. *Parasitol al Día* 0716-0720. 2000;24:1–4.
138. Cabrera, Rufino; Luna-Pineda, Miguel Angel; Suárez-Ognio L. Nuevo caso de infección humana por una larva de Pseudoterranova decipiens (Nematoda, Anisakidae) en el Perú. *Rev Gastroenterol Perú*. 2003;23:217–20.
139. Tanteleán, M; Huiza A. Larva de nemátodos con importancia médica hallados en peces del mar de Perú y dos primeros casos de infección humana. *Rev Peru Med Trop*. 1993;7(1):61–5.
140. Barriga J, Salazar F BE. Anisakiasis: Presentación de un caso y revisión de la literatura. *Rev Gastroenterol del Peru*. 1999;19(4):317–23.
141. Puccio F, Cifarelli D, Blanco F, López E, Sarmiento L, Ordaz R, et al. Reactividad alérgica a Anisakis simplex y su asociación con asma bronquial en niños escolares del estado Nueva Esparta , Venezuela. 2008;XLVIII.
142. Mercado P R, Torres H P, Gil L LC, Goldin G L. Anisakiasis en un paciente portadora de una pequeña hernia hiatal. Caso clínico. *Rev Med Chil*. 2006;134(12):1562–4.
143. Taylor SL, Baumert JL. Worldwide food allergy labeling and detection of allergens in processed foods. *Chem Immunol Allergy*. 2015;101:227–34.
144. Minciullo PL, Cascio A, David A, Pernice LM, Calapai G, Gangemi S. Anaphylaxis caused by helminths: review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16(11):1513–8.
145. Valls A, Pascual CY, Martín Esteban M. Anisakis allergy: An update. Vol. 45, *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 2005. p. 108–13.
146. Anadon AM, Rodriguez E, Ga, Rate MT, Cuellar C, Romar??s F, et al. Diagnosing human anisakiasis: Recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(4):496–502.
147. Moneo I, Caballero ML, Rodriguez-Perez R, Rodriguez-Mahillo AI, Gonzalez-Muñoz M. Sensitization to the fish parasite Anisakis simplex: Clinical and laboratory aspects. *Parasitol Res*. 2007;101(4):1051–5.
148. Quiazon KMA, Zenke K, Yoshinaga T. Molecular characterization and comparison of four anisakis allergens between anisakis simplex sensu stricto and anisakis pegreffii from Japan. *Mol Biochem Parasitol*. 2013;190(1):23–6.
149. Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, Moneo I, Solas MT, Mendizábal A, de las Heras C, et al. Allergenic properties and cuticle microstructure of Anisakis simplex L3 after freezing and pepsin digestion. *J Food Prot*. 2008;71(12):2578–81.
150. Garcia-Mayoral MF, Treviño MA, Perez-Pi??ar T, Caballero ML, Knaute T, Umpierrez A, et al. Relationships between IgE/IgG4 epitopes, structure and function in Anisakis simplex Ani s 5, a member of the SXP/RAL-2 protein family. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(3).
151. Anadon AM, Romaris F, Escalante M, Rodriguez E, Garate T, Cuellar C, et al. The Anisakis simplex Ani s 7 major allergen as an indicator of true Anisakis infections. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(3):471–8.
152. Kobayashi Y, Ohsaki K, Ikeda K, Kakemoto S, Ishizaki S, Shimakura K, et al. Identification of novel three allergens from Anisakis simplex by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitol Int [Internet]*. 2011;60(2):144–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.01.004>
153. Quiazon KMA, Zenke K, Yoshinaga T. Molecular characterization and comparison of four anisakis allergens between anisakis simplex sensu stricto and anisakis pegreffii from Japan. *Mol Biochem Parasitol [Internet]*. 2013;190(1):23–6. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.05.006>
154. Gonzalez-Fernandez J, Daschner A, Nieuwenhuizen NE, Lopata AL, Frutos C De, Valls A, et al. Haemoglobin, a new major allergen of *Anisakis simplex*. *Int J Parasitol*. 2015;45(6):399–407.
 155. Arcos SC, Ciordia S, Roberston L, Zapico I, Jiménez-Ruiz Y, Gonzalez-Muñoz M, et al. Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex sensu stricto* and *A. pegreffii*. *Proteomics [Internet]*. 2014;14(12):1547–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.201300529>
 156. Acha P, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: Volume III: Parasitoses. 3rd ed. Washington, D.C: Pan American Health Organization.;
 157. Chai JY, Murrell KD, Lymbery AJ. Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. *Int J Parasitol*. 2005;35(11–12):1233–54.
 158. Rodrigues MV. Presença do parasita anisquídeo em pescada (*Cynoscion spp.*) como ponto crítico de controle na cadeia produtiva do pescado comercializado na Baixada Santista. São Paulo, Brasil. 2010.
 159. Ruiz L, Vallejo A. Parámetros de infección por nematodos de la familia Anisakidae que parasitan la lisa (*Mugil incilis*) en la Bahía de Cartagena (Caribe colombiano). *Intropica*. 2013;8(53):53–60.
 160. Castaño Díaz F. Caracterización de la pesca artesanal en el consejo comunitario de La plata, Bahía Málaga, Buenaventura, Pacífico Colombiano. Pontificia Universidad Javeriana; 2012.
 161. Mercado R, Torres P, Maira J. Human case of gastric infection by a fourth larval stage of *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae). *Rev Saude Publica*. 1997;31:178–81.
 162. Zuloaga J, Arias J, Balibrea J. Anisakiasis digestiva. Aspectos de interés para el cirujano. *Cir Esp*. 2004;75(1):9–13.
 163. Zullo A, Hassan C, Scaccianoce G, Lorenzetti R, Campo SM a, Morini S. Gastric anisakiasis: Do not forget the clinical history! *J Gastrointest Liver Dis*. 2010;19(4):359.
 164. Chopra N, Chen CK, Carlson I, Jackson CC, Mavrogiorgos N. An 11-Year-Old Boy with Sudden-Onset Abdominal Pain. *Clin Infect Dis*. 2016;63(6):844–5.
 165. Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitol Int*. 2008;57(1):49–53.
 166. Cabrera R, Suarez-Ognio L, Martinez R, Leiva R, Gambirazio C, Ruiz J. Larvas de *Anisakis physeteris* y otros helmintos en *Coryphaena hippurus* “Perico” comercializados en el mercado pesquero de Ventanilla, Callao, Perú. *Rev Peru Biol*. 2002;9(1):23–8.
 167. Kuhn T, Hailer F, Palm HW, Klimpel S. Global assessment of molecularly identified *Anisakis dujardin*, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts. *Folia Parasitol (Praha)*. 2013;60(2):123–34.
 168. Anshary H, Sriwulan, Freeman MA, Ogawa K. Occurrence and molecular identification of *Anisakis Dujardin*, 1845 from marine fish in southern Makassar Strait, Indonesia. *Korean J Parasitol*. 2014;52(1):9–19.
 169. Pekmezci GZ. Occurrence of *Anisakis simplex sensu stricto* in imported Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) represents a risk for Turkish consumers. *Int J Food Microbiol [Internet]*. 2014;185:64–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.018>
 170. Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Volume III Parasitoses. PAHO Sci Tech Publ. 2003;2(580):408.
 171. Marsella C, Sofia C; Naime V MC. Analisis de la seroprevalencia de anisakiasis en habitantes de la localidad Aldea de Pescadotes, Puerto la Cruz, Estado Anzoategui. Universidad de Oriente; 2010.
 172. Bustos-Montes D, Santafé-Muñoz A, Grijalba-Bendeck M, Jáuregui A, Franco-Herrera A, Sanjuan-Muñoz A. Bioecología de la lisa (*Mugil incilis* Hancock) en la bahía de Cispatá, Caribe colombiano. *Bol Invest Mar Cost*. 2012;41(2):447–61.
 173. Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol Int*. 2007;56(3):211–5.

174. Fumarola L, Monno R, Ierardi E, Rizzo G, Giannelli G, Lalle M, et al. Anisakis pegreffii Etiological Agent of Gastric Infections in Two Italian Women. *Foodborne Pathog Dis* [Internet]. 2009;6(9):1157–9. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/fpd.2009.0325>
175. Daschner A. Fish and Fish Oil In Health and Disease Prevention. In: Raatz SK, Bibus DM, editors. *Fish and Fish Oil in Health and Disease Prevention* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016. p. 341–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802844-5.00031-2>
176. Scholz T, Garcia HH, Kuchta R, Wicht B. Update on the human broad tapeworm (genus *diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):146–60.
177. Puente P, Anadon AM, Rodero M, Romar??s F, Ubeira FM, Cu??llar C. Anisakis simplex: The high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. *Exp Parasitol*. 2008;118(2):271–4.
178. ASEPES. Caracterización del Sector Pesquero Artesanal Zona Norte del Distrito de Buenaventura. Buenaventura; 2010.
179. Rodríguez Salcedo J, Hleap Zapata JI, Estrada F, Clavijo Salinas JC, Perea Velasco N. Agroindustria Pesquera en el Pacífico Colombiano: Gestión de Residuos Pecuarios en Sistema de Producción más Limpia. Palmira; 2011.
180. Quijada J, Lima dos Santos CA, Avdalov N. Enfermedades parasitarias por consumo de pescado. Incidencia en América Latina. *Infopesca Int*. 2005;24:16–23.
181. Gamboa Delgado EM, Lopez Barbosa N, Gomez Almeyda E, Torres Alarcon N, Castillo Morales JD. Determinacion del consumo de pescado en estudiantes universitarios de Bucaramanga, Colombia. *Rev Salud Publica y Nutr*. 2010;11(2).
182. Carballeda-Sangiao N, Olivares F, Rodriguez-Mahillo AI, Careche M, Tejada M, Moneo I, et al. Identification of Autoclave-Resistant Anisakis simplex Allergens. *J Food Prot* [Internet]. 2014;77(4):605–9. Available from: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-13-278>
183. Restrepo-Betancurt LF, Rodriguez-Espinosa H, Valencia D. Caracterización del consumo de pescado y mariscos en población universitaria de la ciudad de Medellín - Colombia. *Rev Univ y Salud*. 2016;18(2):257–65.
184. Daschner A, Rodero M, De Frutos C, Valls A, Cuéllar C. Chronic urticaria is associated with a differential helminth-arthropod-related atopy phenotype. *J Dermatol*. 2010;37(December 2009):780–5.
185. Daschner Á, Fernández-Figares V, Valls a., de Frutos C, Rodero M, Ubeira FM, et al. Different fish-eating habits and cytokine production in chronic urticaria with and without sensitization against the fish-parasite Anisakis simplex. *Allergol Int* [Internet]. 2013;62(September 2012):191–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23435560>
186. Daschner A, Cuellar C. The hidden sense of symptoms: Urticaria can be beneficial. *Med Hypotheses* [Internet]. 2010;75(6):623–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2010.07.050>
187. Cuellar C, Daschner A, Valls A, De Frutos C, Fernandez-Figares V, Anadon AM, et al. Ani s 1 and Ani s 7 recombinant allergens are able to differentiate distinct Anisakis simplex-associated allergic clinical disorders. *Arch Dermatol Res*. 2012;304(4):283–8.
188. Gonzalez-Fernandez J, Veleiro B, Daschner A, Cuellar C. Are fish tropomyosins allergens? *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 2015;116.
189. Ministerio de Salud de la Republica de Colombia. Decreto numero 561 (8 marzo de 1984) [Internet]. 1984 p. 17. Available from: https://www.invima.gov.co/images/stories/aliementos/decreto_561_1984.pdf
190. Anadon AM, Rodriguez E, Garate MT, Cuellar C, Romaris F, Chivato T, et al. Diagnosing human anisakiasis: Recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(4):496–502.