



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

**Evaluación del potencial zoonótico de  
*Contracaecum* spp. (Nematoda: Anisakidae) e  
*Hysterothylacium* spp. (Nematoda:  
Raphidascarididae) como agentes de anisakidosis  
humana**

Noelia Adelina Galeano

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2017

## PREFACIO:

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el laboratorio de Patología de organismos acuáticos de interés comercial, dependiente del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el julio 2009 y el 9 de septiembre de 2016, bajo la dirección de Dr. Rubén Daniel Tanzola, Profesor adjunto, de Patología de organismos acuáticos de interés comercial / Parasitología.

Firma:



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .... / .... / ..... , mereciendo  
la calificación de .....(.....)

*A Federico, Juan Pablo y Gustavo.*

## AGRADECIMIENTOS

El haber llegado hasta aquí amerita lo suficiente para emplear las palabras que necesito con el fin de expresar mi sincera gratitud a las muchas personas que colaboraron para que este trabajo pudiese llegar a su finalización.

Comienzo los agradecimientos por mi director de tesis, el Dr. Daniel Tanzola, por haberme dado la oportunidad de trabajar con él y en su laboratorio, por haberme escuchado cuando estaba un poco perdida, por haber entendido mis tiempos en el final de este trabajo y por haber compartido su conocimiento, experiencia y su lugar de trabajo. Por su actitud positiva, por su tranquilidad y colaboración en todo momento, por haberme guiado y acompañado en las distintas etapas de este trabajo, transmitiéndome en todo momento su gran entusiasmo y su apoyo, quizás en momentos donde más lo necesitaba. Infinitas gracias!!!

A la Universidad Nacional del Sur (UNS) por la formación, el espacio laboral y el equipamiento puesto a mi disposición.

Al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia por brindarme un lugar de trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca tipo II.

Al personal del Bioterio, Médico Veterinario Guillermo Lemus, a Rolando Olave y especialmente a Walter Correa, sin la ayuda de ellos mi trabajo no hubiese sido posible.

A la Dra. Silvia Guagliardo, por su apoyo y palabras de aliento, por compartir su experiencia, por transmitir sus conocimientos, gracias Sil!!

A Dra. Carla Schwerdt, por su apoyo constante, por darme aliento cuando estaba desanimada, por acompañarme y ayudarme en las tareas de muestreo, por lo mates, las charlas....

Al Dr. Marcelo Schwerdt por enviarme material desde las lagunas.

A Dra. Pilar Alda, por el envío de los ratones desde la Plata.

Al Licenciado Román Uibrig por la donación de pescado desde la base de Puerto Belgrano.

A la pescadería Costas Argentinas por su generosa colaboración y disposición incondicional en proporcionar el material necesario para este estudio.

A los directivos de IACA laboratorios y especialmente al bioquímico Edgardo Streitenberger y bióloga Estefanía Tittarelli por su gran ayuda en la determinación de las larvas, por ayudarme en el universo de la Biología molecular.

A mis compañeros de laboratorio licenciados Acebal Flor, Mass Javier, Paolillo Melisa, Sartuqui Javier.

A mis amigos y compañeros: Maiko, Erica y Koki por sus charlas y el apoyo constante.

A mis amigas de toda la vida, Ana Paula, Belén, Carola, Katia, Pupi por su apoyo a través de la distancia. Las adoro!

A toda mi familia: gracias por su apoyo y cariño, y muy especialmente a mi mamá Susana y mis hermanos Mariano, Jorgelina y Melina.

A mis hijos y mi marido: Federico, Juan Pablo y Gustavo por la paciencia que me tienen y me han tenido, los quiero con todo mi corazón!!

A mi viejo siempre conmigo....

Somos en mayor o menor medida obra de un montón de ayuda que nos permite estar y ser lo que somos, reconociendo un camino donde muchos me enseñaron, me ayudaron, me dieron afecto y estímulo....

Gracias a todos!!!!

---

## ÍNDICE

---

	Pág.
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	4
<b>Introducción general</b>	8
La Anisakidosis	9
Antecedentes históricos	9
Sintomatología	13
Agentes causales	15
Objetivos	17
<b>Capítulo I</b>	
<b>Los géneros <i>Contracaecum</i> e <i>Hysterothylacium</i> como agentes zoonóticos</b>	18
Antecedentes del estudio de los nematodos anisákidos en Argentina	19
<i>Contracaecum</i> spp., <i>Hysterothylacium</i> spp. Morfología. Ciclos de vida	24
Objetivos	28
<b>Materiales y métodos</b>	29
Toma de muestras y procesamiento de los hospedadores	29
Técnicas moleculares	30
<b>Resultados</b>	35
Características generales de las larvas de <i>Contracaecum</i> sp. en <i>Cynoscion guatucupa</i>	35
Características histológicas de las larvas	39
Características generales de las larvas de <i>Contracaecum</i> sp. en <i>Odontesthes argentinensis</i>	40
Características generales de las larvas de <i>Contracaecum</i> sp. en <i>Odontesthes bonariensis</i>	44
Características histológicas de las larvas	47

Características generales de las larvas de <i>Hysterothylacium</i> sp. en <i>Cynoscion guatucupa</i>	51
Características histológicas de las larvas	55
Identificación Molecular	58
<b>Discusión</b>	66
<b>Capítulo II</b>	
<b>Interacción parásito-hospedador intermediario</b>	79
Introducción	80
Características biológicas de los hospedadores	80
Caracterización del área de estudio	84
Localización de las larvas en los hospedadores	89
Métodos de detección en el pescado	93
Objetivos	97
<b>Materiales y métodos</b>	99
<b>Resultados</b>	104
<b>Discusión</b>	108
<b>Capítulo III</b>	
<b>Infestación experimental en modelo murino</b>	114
Introducción	115
Antecedentes de infestación	116
Objetivos	118
<b>Materiales y métodos</b>	119
<b>Resultados</b>	122
<b>Discusión</b>	134
<b>Conclusiones</b>	141
<b>Referencias Bibliográficas</b>	143

---

## RESUMEN

---

El presente trabajo de tesis doctoral pretende indagar las siguientes hipótesis de trabajo: los estadios larvales de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. experimentan migración hacia la musculatura estriada en las especies de peces estudiadas; los estadios larvales de *Contracaecum* spp. obtenidas de peces naturalmente infectados provocan lesiones en el tracto digestivo de mamíferos, provocando una respuesta inmune humoral y celular que puede caracterizarse según criterios hematológicos e histopatológicos. Para poner a prueba estas hipótesis se planteó como objetivo general determinar el rol que cumplen las larvas de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. presentes en recursos pesqueros del sudoeste bonaerense, en el desarrollo de la anisakidosis humana. Los objetivos específicos del trabajo fueron: determinar el rango de hospedadores naturales de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. en peces marinos y continentales, precisar el status sistemático de estos estadios, evaluar la capacidad miotrópica de los mismos en peces destinados al consumo humano y tipificar el daño tisular de los estadios larvales invasores determinando el poder infectivo en mamíferos, mediante el empleo de un modelo murino y analizando el efecto de esta parasitosis sobre los parámetros hemáticos en el mismo.

Para el estudio se tomaron especies de peces de importancia comercial en la región: *Cynoscion guatucupa*, *Odontesthes argentinensis* y *Odontesthes bonariensis*. De un total de 316 ejemplares de peces examinados entre los años 2009-2011, 111

correspondieron a la especie *C. guatucupa*, 105 correspondieron a *O. argentinensis* y 100 a *O. bonariensis*. Se recolectaron larvas de *Contracaecum* sp. e *Hysterothylacium* sp. de la cavidad celómica de dichas especies. Las mismas fueron estudiadas histológica y morfológicamente. Se realizaron estudios moleculares de las larvas halladas en *C. guatucupa*, en los cuales se evidenció una asociación con especies de *Contracaecum* que parasitan mamíferos.

Se tomaron muestras de filete de cada especie de pez, 3.316,85 g de *C. guatucupa*, 1.754,9 g de *O. bonariensis* y 1.327,1 g. de *O. argentinensis*, que fueron analizados mediante digestión enzimática. En el total de filetes analizados solo se encontraron 4 nematodos en *O. bonariensis*.

Para tipificar el daño tisular de los estadios larvales encontrados y determinar el poder infestivo en los mamíferos se inocularon, siguiendo un protocolo de infestación, ratones de cepa Balb/cAnN de 30 g. de peso promedio.

Se utilizaron técnicas histológicas de rutina y coloración de hematoxilina-eosina. Los resultados mostraron dos infestaciones positivas con larvas L3 pertenecientes a *C. guatucupa*. La histopatología evidenció la larva fijada al tubo digestivo, principalmente en la región fúndica del estómago, la cual penetró el epitelio de la mucosa gástrica llegando hasta la capa muscular. Se observó una compresión total del epitelio, con pérdida de la estructura glandular y adoptando un aspecto aplanado entorno a la larva. Un infiltrado leucocitario con presencia de monocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, rodeó los tejidos próximos al sitio de penetración de la larva. En uno de los casos positivos de infestación se observó variación en la composición leucocitaria de la sangre de los ratones. Parte del

material infestado fue fijado en glutaraldehído 2,5%, para la observación mediante microscopia electrónica de barrido. La identificación a nivel específico empleando técnicas moleculares se realizó solo para las larvas de *Contracaecum* sp. provenientes de la pescadilla, *C. guatucupa*, debido a que fue la única especie de parásito de las ensayadas que produjo resultados positivos de infestación. Los análisis de las secuencias genómicas indican que éstas larvas se ubicaron en el mismo cluster junto a *C. margolisi* y *C. ogmorhini*, ambos parásitos de mamíferos marinos. Hasta tanto se disponga de mayor información a nivel genético del género *Contracaecum* se concluye que las larvas que produjeron lesión en la mucosa de ratones BALB /cAnN pertenecen al complejo *Contracaecum ogmorhini* s.l.

De acuerdo con los resultados alcanzados hasta el momento, las larvas de *Contracaecum ogmorhini* s.l. infestivas para el modelo murino utilizado, potencialmente inducirían lesión en otros mamíferos, incluido el hombre. No obstante la exigua prevalencia e intensidad larval registrada en la carne de los pescados estudiados, sumado al hábito de cocción completa de los platos a base de filetes, permiten considerar de bajo riesgo epidemiológico a las especies estudiadas.

---

## ABSTRACT

---

The aim of the present work is to test the following hypotheses: the larval stage of *Contracaecum* spp. and *Hysterothylacium* spp. migrate towards the musculature in the hosts fishes; the larval stage of *Contracaecum* spp. and *Hysterothylacium* spp. obtained of infected fishes caused injuries in the digestive tract of mammals, provoking humoral and cellular immune responses that can be characterized according to hematological and histopathological criteria. To test these hypotheses it was considered as a general objective to determine the role of *Contracaecum* spp. and *Hysterothylacium* spp. present in the southwest of Buenos Aires fishery resources in the development of human anisakidosis.

The following specific purposes were added: to determine the range of natural hosts of *Contracaecum* spp. and *Hysterothylacium* spp. in marine and continental fishes, to confirm the systematic status of these stages, to evaluate the myotropic behavior of the helminths in fish used as human food and to assess the tissue damage of the larval stages invading the mucosa of the digestive tract and to analyzes the effect of this parasitosis on hematological parameters.

Some fish species of commercial importance in the region *Cynoscion guatucupa*, *Odontesthes argentinensis* and *Odontesthes bonariensis* were considered to the study.

A total of 316 fish individuals were analyzed between 2009 and 2011, 111 corresponded to *C. guatucupa*, 105 specimens to *O. argentinensis* and 100 to *O.*

*bonariensis*, *Contracaecum* spp. and *Hysterothylacium* spp. larvae were collected from the visceral cavity of these fishes. They were studied histologically and morphologically. Fillet samples of each host were prepared and 3.316,85 grs were taken from *C. guatucupa*, 1.754,9 grs. From *O. bonariensis* and 1.327,1 grs from *O. argentinensis*, further analyzed by enzymatic digestion. Only four larval nematodes were found from all of the flesh examined.

To assess the tissue damage and determine the infective power of the larval nematodes, they were inoculated *per os* in mammals, following a protocol of infestation, using a strain of BALB / cAnN mice about 30 grs. in mean weight. There were performed histological sections stained with hematoxylin-eosin. The results showed two positive infestations with *Contracaecum* sp. L3 from *C. guatucupa*. Histopathology showed the larvae attached to the gastrointestinal tract, mainly in the fundic region of the stomach, penetrating the gastric mucosal epithelium and reaching the muscle layer. A total compression of the epithelium was observed, with loss of glandular structure and adopting a flattened appearance around the larva. A leukocyte infiltration with monocytes, neutrophils, eosinophils and lymphocytes surrounding the penetration site next larval tissues was observed. In the positive cases it was noted a variation in the blood leukocyte counts. Part of the infected material, fixed in glutaraldehyde 2,5 %, was prepared for the observation under scanning electron microscopy. The identification at the specific level employing molecular technics was performed only on larvae of *Contracaecum* sp. proceeding from the striped weakfish, *Cynoscion guatucupa*, because of these were the only that brought positive results in the experimental infections. The comparative analysis of

the genomic sequences shows that these parasites cluster near the marine mammals parasites *C. margolisi* and *C. ogmorhini*. Until more information to the genetic composition of *Contracaecum* could be available, the larvae which provoking injuries in the mucosal tissue of BALB /cAnN mice belong to the taxonomical complex *Contracaecum ogmorhini s.l.*

According to the results reached up to the moment using a murine model, the infective *C. ogmorhini s.l.* L3, could potentially induce damage to other mammals, including man. Nevertheless the exiguous prevalence and larval intensity found in the flesh, along with the habit of well done cooking food based on filet, allow consideras low epidemiological risk the anisakid species studied.

**Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados**

Firma del director:

---

## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

En muchos países del mundo, el pescado y en general los productos de la pesca, ocupan un lugar primordial en la alimentación humana como aporte de proteína animal.

El bajo contenido de grasas de muchas especies de peces demersales y los efectos beneficiosos sobre afecciones cardiovasculares de los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las especies de peces grasos pelágicos, constituyen dos aspectos importantes para convertirlos en un alimento de elección como aporte de proteínas saludables. Además, es un alimento insustituible en la nutrición humana. Sin embargo, las malas prácticas de higiene de los alimentos suponen un riesgo de contraer enfermedades. La presencia de parásitos en el pescado es un fenómeno generalizado e imposible de eliminar de las poblaciones de peces silvestres, porque los factores ecológicos que determinan las infecciones parasitarias escapan del control humano.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen un importante problema de salud a nivel mundial. Son provocadas por el consumo de agua o de alimentos contaminados con microorganismos o parásitos, o bien por las sustancias tóxicas que aquellos producen. La preparación y manipulación de los alimentos son factores clave en el desarrollo de las ETA, por lo que la actitud de los consumidores resulta muy importante para prevenirlas.

Por otra parte, la Subsecretaría de Control Sanitario (Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires) considera que las alergias alimentarias son patologías emergentes. Se estima que un 40 a 60% de los shocks anafilácticos son causados por alimentos y de ellos, el 30% se relaciona con el consumo de pescado.

La anisakidosis humana es una enfermedad producida por larvas de nematodos de la familia Anisakidae, que se localizan en la cavidad corporal o en el sistema muscular de peces teleósteos y/o moluscos cefalópodos. Son ingeridos accidentalmente por el hombre cuando consume pescado infectado crudo o poco cocido (de la Torre Molina et al., 2000, Rello et al.. 2009).

El primer caso de anisakidosis humana se describió en Holanda (Straub, 1955) publicado detalladamente más tarde por Van Thiel (1962). Desde entonces se documentaron casos en todo el mundo. En Japón, donde se diagnostican más 2.000 casos anuales de anisakidosis (Lymbery & Cheah, 2007), se encontraron larvas de estos parásitos en más de 100 especies de peces que los japoneses acostumbran comer crudos. El consumo de pescado por persona por día en ese país es de 239 gramos (Audicana et al., 2002). La cocina tradicional nipona incluye platos como el sashimi y sushi, cuyo consumo popularizado mantiene moderados valores de incidencia de la infección. Otros platos con alto riesgo de contraer la infección son el bagoong filipino; en Alemania, el arenque salado o ahumado; el graviax escandinavo, el lomi-lomi Hawaiano; el ceviche en pueblos del Pacífico de América del Sur, así como en España el boquerón en vinagre (Sakanari & McKerrow, 1989, Audicana & Kennedy, 2008).

Desde entonces, los registros de casos de anisakidosis humana son muy numerosos en países como China y Corea. En Europa se presentaron numerosos casos en Holanda, España, Francia, Reino Unido, Alemania e Italia (Van Thiel, 1962, Watt et al., 1979, Bouree et al., 1995, Rosales et al., 1999, Plath et al., 2001, Pelegrini et al., 2005, Audicana & Kennedy, 2008, Na et al., 2013)

En España, Arenal-Vera et al., (1991) publicaron el primer caso de esta enfermedad, en tanto López Peñas et al., (2000) describieron 13 casos más. Actualmente se registraron 66 casos de parasitación por *Anisakis* sp. sin sintomatología alérgica (EFSA, 2010). Sin embargo, el número de casos referidos en este país es menor que el esperado en un país que se posiciona en el segundo lugar de mayor consumo de pescado por habitante del mundo (Domínguez Ortega et al., 2000). En la región Vasca, el consumo de pescado por persona por día es de 90 g. y en el resto de España es de 85 g. (Audicana et al., 2002). En Portugal el consumo de pescado por día por persona es similar a España (90 g.) pero hasta el año 2003 no se habían registrado casos de infestación humana por *Anisakis* sp. El motivo principal de la falta de casos se debe a que en este país no es común el consumo de pescado crudo (Silva & Eiras, 2003).

El primer caso de anisakidosis en Francia ocurrió en el año 1969, pero en 1995 Bouree et al., reportaron 25 casos clínicos con dolor abdominal agudo y casos crónicos con diagnóstico serológico positivo. Las larvas estuvieron localizadas en el estómago e intestino.

Plath et al., (2001) citaron en Alemania que en el año 1988 se reportaron 8 casos de anisakidosis en los que las larvas de *Anisakis* fueron encontradas y extraídas de la mucosa gástrica.

Shamsi & Butcher (2011) confirmaron el primer caso de anisakidosis en Australia producido por una larva de *Contracaecum* sp. en una mujer de 41 años. En su informe se relata que la paciente ingresó a la guardia hospitalaria por un dolor intenso gastrointestinal, vómitos y diarrea. Luego de tres semanas, con síntomas cada vez más severos, liberó una larva con la materia fecal y así los síntomas desaparecieron.

Hasta el presente, se considera una afección endémica en España al igual que en países americanos como Canadá, Alaska, México y EEUU. En EEUU los primeros casos ocurrieron en la década del '70. Si bien no todos los casos han sido publicados, se estima que han habido más de 50 casos confirmados (Deardorff et al., 1986, Sakanari & McKerrow, 1989, Deardorff et al., 1991, Audicana et al., 2002, Jofre Morales et al., 2008).

Una revisión realizada en el año 1993 reveló 11.629 casos de anisakidosis en América Latina (Quijada et al., 2005, Rosa da Cruz et al., 2010). La infección humana por esos nematodos fue descrita en Perú, Brasil y Chile. En Perú se considera una enfermedad emergente con 9 casos reportados (Cabrera & Trillo-Altamirano, 2004). En Brasil se demostró la presencia de estos nematodos y existen 5 casos documentados hasta 2010 (Rosa da Cruz et al., 2010). En Chile se describieron casos desde 1976 (Sapunar et al., 1976) y hasta el momento se reportaron 28 registros clínicos de anisakidosis, 4 de ellos en pacientes pediátricos, la mayoría de ellos

provocados por *Pseudoterranova decipiens*, afectando la mucosa gástrica (Jofre Morales et al., 2008).

En Argentina, a pesar de que existen numerosos recursos pesqueros que albergan representantes de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium*, *Contracaecum* y *Terranova*, ha sido registrados un caso de anisakidosis humana hasta el año 2012 (Abuin et al., 2012). El consumo relativamente bajo de carne de pescado (9 Kg. cápita<sup>-1</sup>. año<sup>-1</sup> vs 56 kg. cápita<sup>-1</sup>. año<sup>-1</sup> de carne vacuna) y los hábitos de su cocción completa, explican en parte los pocos casos clínicos en Argentina (Tanzola, 2009, 2011). Un paciente coreano de 27 años, tripulante de un barco pesquero extranjero con diagnóstico de abdomen agudo por síndrome de obstrucción del tubo digestivo fue atendido en el Centro Médico de Mar del Plata. El examen histopatológico reveló en el corte transversal un verme identificado como *Anisakis* sp. (Jörg, 2000). Más tarde, Abuin et al. (2012) presentaron el primer caso clínico de anisakidosis autóctona en la Argentina, de una mujer de 46 años consumidora frecuente de sushi, sashimi y mariscos. El motivo de consulta fue pirosis, reflujo gastroesofágico, astenia y adinamia. Al realizarle una videoendoscopia digestiva alta, se observó un pequeño parásito alargado penetrando la pared gástrica, de color blanquecino, de aproximadamente 1 cm de extensión y que se identificó tentativamente como *Anisakis* sp.

En 2011, Menghi et al., registraron en la provincia de Buenos Aires un caso de una niña de 9 años que eliminó en sus heces una larva. Procedieron a la consulta a través de fotografías que enviaron a "The Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) de Atlanta EEUU, quienes determinaron que pertenecía al

complejo *Anisakis-Contracaecum* (sic). Tal hallazgo amerita una revisión debido a la forma de determinación del ejemplar y a la conclusión de pertenencia de un complejo *Anisakis-Contracaecum* que no tiene sustento taxonómico (ambos géneros pertenecen a dos clados evolutivos distantes).

Las manifestaciones clínicas de la anisakidosis dependen de la localización de la larva y de las lesiones histopatológicas que la misma ocasiona. En la forma no invasiva, las larvas permanecen en el tracto digestivo sin penetrar la pared de la mucosa, ni causar síntomas específicos de infección y son descubiertas cuando son expulsadas por tos, vómitos o diarrea. En la anisakidosis invasiva, las larvas penetran el tracto digestivo y afectan en distinto grado a los diferentes órganos. En éste caso, el nematode perfora la mucosa con enzimas hidrolíticas que degradan el ácido hialurónico. Éste componente de la matriz intersticial del tejido conectivo se encuentra localizado en la lámina propia del tracto gastrointestinal (Hotez et al., 1994). En los casos de anisakiasis oro-faríngea, la larvas penetran las mucosas bucal y faríngea y están asociadas con ligero dolor o sensación de ardor, así como con dificultad para deglutir (Bouree et al., 1995, Smith, 1999, Lymbery & Cheah, 2007, Audicana & Kennedy, 2008, Dorny et al., 2009).

Las formas más prevalentes de anisakidosis son la penetración de la mucosa gástrica o intestinal. Los síntomas, en el primero de los casos, aparecen entre 1 y 12 horas después del consumo de peces parasitados e incluyen dolor repentino de estómago, náuseas y vómitos. Los casos agudos pueden convertirse en tumores gástricos, gastritis aguda, ileitis y colecistitis (Overstreet & Meyer, 1981, Acha &

Szyfres, 1987, Deardorff et al., 1991, Bouree et al., 1995, Rosales et al., 1999, Hiramatsu et al., 2004, Audicana & Kennedy, 2008).

La anisakidosis intestinal ocurre de 5 a 7 días después del consumo de pescado. Los síntomas clínicos incluyen náuseas, vómitos, fiebre, diarrea con sangre, intenso dolor abdominal similar a una obstrucción intestinal, apendicitis o peritonitis. En este tipo de anisakidosis suelen observarse las larvas en la mucosa rodeadas de un denso granuloma eosinofílico (Sakanari et al., 1988, Deardorff et al., 1991, Bouree et al., 1995, Rosales et al., 1999, Noh et al., 2003, Lymbery & Cheah, 2007, Audicana & Kennedy, 2008, Dorny et al., 2009).

En relación con lo mencionado en párrafos anteriores se observó una localización diferencial de la enfermedad de acuerdo con el país en donde se contrajo la infestación. En países de Europa se producen más casos de anisakidosis intestinal, en cambio la anisakidosis gástrica se registró con mayor frecuencia en Japón (Pellegrini et al., 2005).

En los años recientes, la anisakidosis fue asociada a respuestas alérgicas con síntomas clínicos que van desde inflamaciones aisladas a urticaria, llegando hasta un shock anafiláctico mortal. Los primeros signos de alergia ocurren entre las 2 primeras horas después de ingerir pescado infestado pudiendo tardar hasta 6 horas (Lymbery & Cheah, 2007, Audicana & Kennedy, 2008).

Autores como Audicana et al., (1995), Del Pozo et al., (1996) y Audicana et al., (1997) describieron estos procesos alérgicos y lo atribuyeron a una hipersensibilidad inmediata a la larva después del consumo de pescado, comprobada con pruebas intradérmicas positivas, con detección de Inmunoglobulinas E en suero y liberación

de histaminas. Las pruebas intradérmicas fueron comprobadas por Purello et al., (2000) utilizando extracto de larvas de *Anisakis* sp. y de pescado.

Se presentó un solo caso de conjuntivitis ocupacional causado por *Anisakis simplex* en un paciente que había estado expuesto durante su trabajo. Se sugirió que los antígenos habían alcanzado los ojos mediante transmisión aérea ya que el paciente toleró la ingesta de pescado (Anibarro & Seoane, 1998)

De los 14.000 a 15.000 casos reportados de anisakidosis humana en todo el mundo, más del 90% corresponden a la infección producida con *A. simplex* (sensu lato) y en menor porcentaje a *P. decipiens* (sensu lato) (Limbery & Cheah, 2007, Audicana et al., 2008, Dorny et al., 2009, Na et al., 2013).

Además, la especie *Anisakis physeteris* y los representantes de los géneros *Contracaecum* e *Hysterothylacium*, fueron registrados como agentes etiológicos de anisakidosis, pero en menor proporción (Yagi et al., 1996, Rosales et al., 1999, Smith, 1999, Limbery & Cheah, 2007, Audicana et al., 2008, Dorny et al., 2009, Shamsi & Butcher, 2011). Cheng (1976), Mudry et al., (1982), Pereira Bueno, (1993), Beldsoe & Oria, (2001), así como la División de Enfermedades Parasitarias del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (DPD-USCDC) quienes consideran a *Contracaecum* spp. como potencial agente de anisakidosis humana.

Norris & Overstreet (1976), Overstreet & Meyer (1981), Beldsoe & Oria (2001), sobre una base experimental en modelos murino y primate, alertaron sobre los riesgos que representan las larvas pertenecientes al género *Hysterothylacium*. En Japón, Yagi et al., (1996), relataron un caso de anisakidosis humana con

sintomatología de dolor abdominal y diarrea durante un mes que se resolvió con la eliminación por las heces de una hembra de *Hysterothylacium aduncum*.

La tendencia naturista de la población durante los últimos años de consumir los alimentos insuficientemente cocidos, y, en especial la introducción de ciertos platos elaborados con pescado crudo hacen que el riesgo de padecer anisakidosis se haya visto incrementado en nuestro país y en otros.

La epidemiología de la anisakidosis es difícil de estudiar, fundamentalmente por lo complicado que es realizar muestreos adecuados en las diferentes poblaciones de hospedadores. Algunos trabajos demuestran que la prevalencia e intensidad de las infecciones por larvas de anisákidos pueden variar en una misma zona y en la misma especie hospedadora a lo largo del tiempo (Szidat, 1955, MacKenzie & Longshaw, 1995, Tanzola et al., 1997, Navone et al., 1998, De la Torre Molina et al., 2000, Tanzola & Guagliardo, 2004, Tanzola et al., 2009, Timi & Lanfranchi, 2009).

Frente a tal situación, se consideró relevante iniciar estudios biopatológicos tendientes a demostrar experimentalmente la potencialidad zoonótica de las larvas de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. presentes en especies ícticas de consumo humano, como la pescadilla y pejerreyes de mar y de laguna.

Este trabajo de tesis indaga sobre las siguientes hipótesis de trabajo:

- Los estadios larvales de *Contracaecum* spp. experimentan migración hacia la musculatura estriada en la pescadilla y en los pejerreyes de mar y de laguna.
- Los estadios larvales de *Hysterothylacium* spp. experimentan migración hacia la musculatura estriada en la pescadilla y en los pejerreyes de mar y de laguna.

- Las larvas de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. obtenidas de peces infestados provocan lesiones en el tracto digestivo del modelo experimental murino
- Las larvas de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. provocan una respuesta inmune humoral y celular en el modelo experimental murino que puede caracterizarse según criterios hematológicos e histopatológicos

Para testear estas hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

General:

- Determinar el rol que cumplen las larvas de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. presentes en recursos pesqueros del sudoeste bonaerense, en el desarrollo de anisakidosis humana.

Específicos:

- Determinar el rango de hospedadores naturales de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. en peces marinos y continentales.
- Precisar el status sistemático de los estadios larvales.
- Evaluar la capacidad miotrópica de los estadios larvales (L3) en peces destinados al consumo humano.
- Tipificar el daño tisular de los estadios larvales invasores.
- Determinar el poder infestivo en mamíferos empleando un modelo murino
- Analizar el efecto de la parasitosis sobre parámetros hemáticos en modelo murino.

## CAPITULO I

### Los géneros *Contracaecum* e *Hysterothylacium* como agentes zoonóticos

---

## INTRODUCCIÓN

---

**Antecedentes del estudio de los géneros *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 e *Hysterothylacium* Ward & Magath, 1916 en Argentina (Tabla I).**

La mayor parte del conocimiento de los géneros *Contracaecum* e *Hysterothylacium* en Argentina consiste en citas de estadios larvales integrantes de ensambles parasitarios de peces. En nuestro país sólo unas pocas especies fueron propuestas como nuevas para la ciencia y sólo de una se conocen aspectos del ciclo biológico en la Naturaleza.

Tabla I: Antecedentes del estudio de los géneros *Contracaecum* e *Hysterothylacium* en Argentina, ordenados según su cronología de publicación.

Espece	Estado del desarrollo	Hospedador/res	Procedencia geográfica	Autor/es
<i>Contracaecum</i> sp.	Larvas	Pejerrey	Laguna de Cochicó, Provincia de Buenos Aires	Mac Donagh (1928)
<i>Contracaecum</i> <i>C. travassosi</i>	-	<i>Phalacrocorax albiventer</i>	Patagonia	Gutiérrez (1943)
<i>C. macronectidis</i>	Larva	<i>Macronectes giganteus</i>	Punta Arena.	Schuurmans-Stekhoven (1950)
<i>Contracaecum</i> sp.	Larva	<i>Odonthestes</i>	Río Limay, Provincia de Neuquén	Szidat (1961)
<i>C. aduncum</i> (= <i>Hysterothylacium aduncum</i> )	Adulto	<i>Merluccius hubbsi</i>	Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires	Szidat (1955)
<i>Contracaecum</i> sp.	Larva	<i>Merluccius hubbsi</i>	Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires.	Szidat (1955)
<i>Contracaecum</i> sp.	Larva	<i>Xystreuris rasile</i> <i>Paralichthys patagonicus</i> <i>Parona signata</i>	Quequén, Provincia de Buenos Aires.	Szidat (1969)
<i>C. spheniscus</i>		<i>Spheniscus magellanicus</i>	Zoológico de La Plata	Boero & Led

				(1970)
<i>C. microcephalum</i>	Adulto	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Provincia de Buenos Aires.	Boero & Led (1971)
<i>C. aduncum</i>		<i>Epinephelus alexandrinus</i> , <i>Paralichthys patagonicus</i> <i>Scomber colias</i> <i>Merluccius hubbsi</i>	Plataforma Patagónica.	Evdokimova (1973)
<i>Contracaecum</i> sp.		<i>Austroatherina incisa</i> <i>Stromateus maculatus</i> <i>Cheilodactylus bergi</i>	Plataforma Patagónica.	Evdokimova (1973)
<i>C. osculatum</i> <i>Contracaecum</i> <i>H. aduncum</i>	Larva Larva Larva	<i>Dissostichus eleginoides</i>	-s/d	Gaevskaya (1990)
<i>H. nototheniae</i> <i>H. aduncum</i>	Adulto Adulto			
<i>Contracaecum</i> sp. I <i>Porrocaecum</i> sp. I <i>Hysterothylacium</i> sp. I	Larvas	<i>Illex argentinus</i>	Plataforma continental Argentina.	Nigmatullin & Shukhgálder (1990)
<i>Contracaecum</i> sp.  <i>Hysterothylacium</i>	Adulto	Salmoniformes Perciformes Atheriniformes Siluriformes <i>Patagonina Hatcheri</i> <i>Percichthys trucha</i>	-s/d	Ortubay et al., (1994)
<i>H. rhamdiae</i>	Adulto	<i>Rhamdia sapo</i>	Sierra de la ventana, Provincia de Buenos Aires.	Brizzola & Tanzola (1995)
<i>Contracaecum</i> spp. <i>Hysterothylacium</i> spp.  <i>H. aduncum</i>	Larva Larva  Adulto	<i>Merluccius hubbsi</i> <i>M. australis</i>	Islas Malvinas.	MacKenzie & Longshaw (1995)
<i>C. philomultipapillatum</i>		<i>Egretta alba</i>	s/d	Labriola & Suriano (1996)
<i>Contracaecum</i> sp.		<i>Porichthys porosissimus</i> <i>Conger orbignyanus</i>	Estuario de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires.	Tanzola et al., (1997) Tanzola et al., (1998) Tanzola & Guagliardo (2000)
<i>Hysterothylacium</i> sp. <i>Hysterothylacium</i> sp.  <i>Contracaecum</i> sp.	Adulto Larva  Larva	<i>Scomber japonicus</i>	Mar Argentino	Cremonte & Sardella (1997)

<i>H. patagonense</i>	Adulto Larvas	<i>Percichthys trucha</i>	Lago Aluminé, Provincia de Neuquén.	Moravec et al.(1997)
<i>Contracaecum</i> sp. <i>H. aduncum</i>	Larva Larva Adulto	<i>Genypterus blacodes</i> <i>G. brasiliensis</i>	Plataforma continental Argentina.	Sardella et al. (1998)
<i>H. aduncum</i>	Larva  Adulto	<i>Themisto gaudichaudii</i> <i>Engraulis anchoíta</i> <i>Merluccius hubbsi</i> <i>Scomber japonicus</i>  <i>G. blacodes</i> <i>G. brasiliensis</i> <i>Merluccius hubbsi</i> <i>S. japonicus</i>	Mar Argentino.	Navone et al. (1998)
<i>Contracaecum</i> sp. Tipo A y B <i>Hysterothylacium</i> sp.	Larva  Larva	<i>Raphidascaris</i> sp.  <i>P. patagonicus</i> <i>P. orbignyianus</i>	Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires.	Incorvaia & Díaz de Astarloa (1998)
<i>Contracaecum</i> sp.	Larva	<i>Serrasalmus spilopleura</i>	Cuenca del Riachuelo, Provincia de Corrientes.	Hamann (1999)
<i>Contracaecum</i> sp.	Larva	<i>Galaxias maculatus</i>	Lago Nahuel Huapi, Provincia de Río Negro.	Revenga & Scheinert (1999)
<i>Hysterothylacium</i> sp.	Larva	<i>Illex argentinus</i>	Golfo San Matías, Provincia de Río Negro.	González & Kroeck (2000)
<i>C. multipapillatum</i>	Adulto	<i>Egretta alba</i>	Laguna Mar Chiquita, Provincia de Buenos Aires.	Navone et al. (2000)
<i>Contracaecum</i> sp.	Larva	<i>E. anchoíta</i>	Costas argentinas y uruguayas.	Timi et al. (2001)
<i>Contracaecum</i> sp. <i>C. pelagicum</i>	Larva  Adulto	<i>S. magellanicus</i>	Península Valdés, Provincia de Chubut	Pazos et al. (2003)
<i>Contracaecum</i> sp. <i>H. aduncum</i>	Larva Adultos	<i>E. anchoita</i>	Norte bonaerense, sur bonaerense y Patagonia	Timi (2003), Timi & Poulin (2003).
<i>H. aduncum</i>	Adultos Larva	<i>Merluccius hubbsi</i>	Zona Común de pesca Argentino - Uruguay, Golfo San Matías, Golfo San Jorge, Plataforma	Sardella & Timi (2004)

<i>Contracaecum</i> sp.	Larva	<i>M. hubbsi</i>	Patagónica Zona Común de pesca Argentino - Uruguay, Golfo San Matías, Golfo San Jorge, Plataforma Patagónica.	Sardella & Timi (2004)
<i>Contracaecum</i> sp.	Larva	<i>C. guatucupa</i> <i>M. furnieri</i>	Estuario de Bahía Blanca. Provincia de Buenos Aires.	Tanzola & Guagliardo (2004)
<i>Contracaecum</i> spp.	Larva	<i>O. bonariensis</i>	Lagunas del sur de la provincia de Córdoba.	Mancini et al. (2005)
<i>H. aduncum</i> <i>Hysterothylacium</i> sp. <i>Contracaecum</i> sp.	Larva	<i>C. guatucupa</i>	Argentina, Brasil y Uruguay.	Timi et al. (2005)
<i>C. pelagicum</i> <i>Contracaecum</i> sp.	Adultos Larvas	<i>S. magellanicus</i>	Península Valdés, Provincia de Chubut. Mar del Plata, Provincia de Buenos Aires.	Garbin et al. (2007)
<i>Contracaecum</i> sp. <i>Hysterothylacium</i> sp. <i>H. aduncum</i>	Larvas	<i>Percophis brasiliensis</i>	Zona Común de pesca Argentino - Uruguay, Golfo San Matías, zona El Rincón.	Braicovich & Timi (2008)
<i>C. chubutensis</i>	Adulto Larva	<i>Phalacrocorax atriceps</i>	Bahía Bustamante y Puerto Madryn	Garbin et al. (2008)
<i>Contracaecum</i> spp.	Larva	<i>O. bonariensis</i>	La Viña (Córdoba)	Mancini et al. (2008)
<i>Hysterothylacium</i> sp. <i>H. aduncum</i>	Larva Adulto	<i>Pinguipes brasilianus</i>	Costas de la provincia de Buenos Aires, Golfo San Matías, Golfo Nuevo.	Timi et al. (2008) Timi et al. (2009)
<i>Hysterothylacium</i> sp. <i>Contracaecum</i> sp.  <i>H. rhamdiae</i>	Larva	<i>Oligosarcus jenynsii</i>  <i>O. bonariensis,</i> <i>Jenynsia multidentata</i>  <i>Rhamdia quelen,</i>	Sudoeste de la provincia de Buenos Aires.	Tanzola et al., (2009)
<i>Hysterothylacium</i> sp. <i>Contracaecum</i> sp.	Larva.	<i>Brevoortia aurea,</i> <i>P. orbignyianus</i>	Laguna Mar Chiquita.	Alarcos & Etchegoin (2010)
<i>Hysterothylacium</i> sp.	Larva.	<i>Micropogonias furnieri.</i>		
<i>H. spirale</i>	Adultos	<i>Zenopsis conchife</i>	Costas Argentinas	Rossin et al.

				(2011)
<i>C. australe</i>	Larva. Adultos	<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Lago urbano Villa Dacar, Río Cuarto, Córdoba.	Biolo et al. (2012)
<i>Contracaecum</i> sp.	Larva.	<i>Pimelodus albicans</i> <i>O. jenynsii</i> <i>R. quelen</i> <i>O. bonariensis</i>	Río Cuarto  Lagunas pampeanas	Biolo et al. (2012)
<i>C. ovale</i>	Adulto.	<i>Rollandia rolland</i>	Laguna Mar Chiquita y Laguna Chascomus.	Galeano & Tanzola (2012)
<i>C. pelagicum</i>	Larva.	<i>E. anchoíta</i>	Bahía Engaño, Chubut	Garbin et al. (2013)
<i>C. australe</i>	Adulto.	<i>P. gaimardi</i>	Puerto Deseado, Provincia de Santa Cruz.	Garbin (2014)

Garbin (2009) en su trabajo de tesis doctoral identificó cinco especies del género *Contracaecum*. Tres de ellas fueron ser nuevas, una fue mencionada anteriormente (Garbin et al., 2008). Además redescubrió a *Contracaecum pelagicum* y *C. mirounga* que parasita a *S. magellanicus*, mencionándolo como hallazgo raro, tratándose de una especie habitualmente encontrada en mamíferos. También en *S. magellanicus* identificó una especie a la que provisoriamente denominó *Contracaecum* n. sp. 2 y que probablemente representaría un nuevo taxón del género (Garbin (2015) com. pers.).

## **Morfología y Ciclos de vida de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp.**

Los anisákidos están asociados ecológicamente con vertebrados acuáticos, peces, mamíferos y aves piscívoras. La transmisión de las especies en esta familia depende del medio hídrico y usualmente involucra invertebrados acuáticos y peces como hospedadores intermediarios o paraténicos (Anderson, 2000).

En este trabajo, las investigaciones se centraron específicamente en la biología en dos géneros: *Contracaecum* e *Hysterothylacium*.

### ***Contracaecum*:**

El género *Contracaecum* según Fagerholm (1989) se componía de 50 especies nominales; sin embargo Shamsi et al., (2009) citaron la presencia de aproximadamente 100 especies de distribución cosmopolita. Esta variación se debe al uso de las nuevas técnicas de genética molecular.

La clasificación actual se basa en rasgos morfológicos observados al microscopio óptico, como estructuras cefálicas, bucales y faríngeas, sistema reproductor y extremo posterior masculino (Fagerholm, 1990).

Los hospedadores definitivos de este género son aves piscívoras y mamíferos asociados con agua dulce, salobre y de mar (cormoranes, pelícanos, focas) (Fagerholm, 1990). En el agua se encuentran los huevos embrionados con el primer estadio de Larva I. Esta larva se desarrolla y muda al segundo estadio de Larva II, posee un diente ventral a la abertura oral y un delicado apéndice ventricular (Anderson, 2000). Este estadio es ingerido por un hospedador invertebrado,

especialmente un copépodo, actuando como un hospedador de transporte. Posteriormente es transmitido a un pez (hospedador intermediario) donde tiene desarrollo la Larva III luego de encapsularse en el mesenterio. Este estadio posee labios rudimentarios pero no tiene aún interlabios. Se encuentran bien desarrollados el apéndice ventricular y el ciego intestinal (Anderson, 2000). El ciclo se completa cuando el ave hospedadora o un pinnípedo ingiere el pescado infestado y la larva se libera en su tubo digestivo (Anderson, 2000, Kloster & Plotz, 1992).

Las especies de *Contracaecum* se diferencian de otros anisákidos como *Pseudoteranova decipiens* e *Hysterothylacium aduncum* en que la larva III es directamente infestante para las especies de peces pequeños (McClelland, 1995).

Se han desarrollado algunos estudios experimentales de transmisión larvaria para establecer la correspondencia del ciclo de vida (Semenova, 1979).

Semenova (1979) infectó experimentalmente copépodos con larvas de *C. micropapillatum*, en los que se produjo la muda, días posteriores se encapsularon en el celoma y sirvieron para infestar peces y ranas. Las larvas III migraron a la cavidad visceral de estos hospedadores, se encapsularon y lograron ser infestivas para pelícanos (Anderson, 2000).

Los estudios taxonómicos en *Contracaecum* spp. realizados hasta el presente son numerosos, sobre todo en aquellos que parasitan peces, aves y mamíferos boreales (Hartwich, 1964; Fagerholm, 1989; 1990; Kloster & Plötz, 1992). Sin embargo, la taxonomía de este grupo sigue siendo confusa actualmente debido a la similitud morfológica entre las distintas especies, especialmente si se consideran los estadios larvales donde es muy difícil establecer la correspondencia entre adultos y larvas de

una misma especie. En las décadas recientes, la técnicas genéticas moleculares están aportando una solución a ésta problemática (Mattiucci & Nascetti, 2008).

### ***Hysterothylacium:***

El género *Hysterothylacium* comprende más de 59 especies (Klimpel et al., 2007). Bruce et al., (1994) enumeraron 52 especies de *Hysterothylacium* en peces marinos, de estuario y de agua dulce. Más tarde, Li et al., (2007) informaron sobre 61 especies de éste género (Moravec et al., 2012). Rossin et al. (2012) mencionaron 66 especies de éste género.

Estas especies son encontradas en su estadio adulto normalmente en el tubo digestivo de peces (hospedador definitivo). Los huevos embrionados salen con las heces del hospedador definitivo y desarrollan el estadio de larva II. Estas larvas son ingeridas por varios invertebrados (mysidáceos, copépodos, isópodos, poliquetos) donde ingresan e invaden el hemoceloma y posteriormente se desarrollan en estadios de larva III, que son transferidas al hospedador definitivo. En este estadio la larva cuenta con un extremo cefálico provisto de 4 elevaciones y una estructura similar a un diente. La cola es de aspecto cónico con una espina terminal. El ciego intestinal y el apéndice ventricular están bien desarrollados (Anderson, 2000). La localización de la larva IV y el adulto en algunas especies de este género como *H. aduncum* es el tubo digestivo (estómago, ciego pilórico e intestino) (Iglesias, 2002)

Koie (1993) estudió en *H. aduncum* la transmisión experimental en hospedadores invertebrados y peces, para determinar el rol de la variedad de hospedadores y distinguir los distintos desarrollos larvales. La autora concluyó que las primeras dos

mudas ocurren en los huevos, el tercer estadio de larva es infestivo para los hospedadores intermediarios (peces o invertebrados) la tercera muda puede ocurrir en un hospedador intermediario (un pez o un invertebrado no crustáceo) pero usualmente ésta muda o la cuarta ocurre en el tubo digestivo del hospedador definitivo.

Norris & Overstreet (1976) describieron dos tipos de larvas de *Hysterothylacium* (= *Thynnascaris* Dollfus) con características morfológicas diferentes. Larva tipo MA: 1-2 mm de longitud, provista de un esófago que representa el 11% del largo total. El apéndice ventricular es casi 13 veces más largo que el ciego intestinal. No poseen espina terminal. En cambio, las larvas tipo MB tienen una longitud de 2 mm, el esófago es sólo un 8% del largo total, el apéndice ventricular es casi 20 veces más largo que el ciego intestinal y no poseen espina terminal. Estas larvas son probablemente larvas III acorde con Koie (1993) y González (1998). González (1998) describió larvas estadio IV de *H. aduncum* en *Oncorhynchus mykiss* de Chile, con ciego intestinal más largo que el apéndice ventricular y cola multiespinosa. Este autor evaluó además la potencialidad zoonótica de larvas similares a las de tipo MA de Norris & Overstreet y larvas IV, concluyendo que las larvas utilizadas no resultaron infestivas.

En el marco de la presente tesis doctoral y a los efectos de conocer taxonómicamente el material a ensayar el riesgo zoonótico, se plantearon las siguientes hipótesis parciales:

**H1:** en el sudoeste bonaerense las larvas parásitas de la pescadilla de red, *C. guatucupa*, el pejerrey del mar *O. argentinensis* y el pejerrey de laguna, *O. bonaerensis*, pertenecen a los géneros *Contracaecum* e *Hysterothylacium*.

**H2:** las características histológicas de las larvas permiten identificarlas mediante cortes anatomopatológicos.

A los efectos de testear estas hipótesis se establecieron los siguientes objetivos:

- Precisar el estatus sistemático de los estadios larvales hallados.
- Caracterizar histológicamente los estadios larvales hallados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Toma de muestras y procesamiento de los hospedadores:

Se examinaron 112 ejemplares de pescadilla de red, *Cynoscion guatucupa*, 105 de pejerrey de mar, *Odontesthes argentinensis* y 90 ejemplares de pejerrey de laguna, *Odontesthes bonariensis* entre los años 2009 - 2011.

De cada pez se tomó el peso total y eviscerado en gramos (g.), además fueron medidos (largo total) en centímetros. Se procedió a la apertura de la cavidad abdominal. Se disecaron los órganos digestivos (estómago, ciego intestinal e intestino), de donde se colectaron y cuantificaron los nematodos de interés bajo lupa. Se registraron las localizaciones de las larvas encontradas. Los nematodos fueron fijados y conservados en alcohol 70% para efectuar estudios genómicos y en fijador Davidson para histología descriptiva. Algunos fueron aclarados con partes iguales de ácido acético/alcohol 98°. Para su diagnóstico fueron estudiados utilizando un microscopio óptico (Olympus CH20). Se hicieron dibujos con la ayuda de la cámara clara incorporada al microscopio. Las medidas de los caracteres morfológicos están expresadas en milímetros (mm.). Se expresa la media y el rango mínimo - máximo entre paréntesis. Se calcularon los índices morfométricos de Koyama et al. (1969). Para discriminar morfológicamente los distintos tipos larvales se siguió el criterio de Sey & Petter (1998).

Para realizar el estudio histológico de las larvas luego de fijadas en Davidson, se procedió a la deshidratación en alcohol etílico de gradación creciente (70°, 80°, 80°, 90°, 96°) por un período de 2 horas cada uno, seguido por una mezcla de

partes iguales de alcohol etílico/alcohol butílico por un período de 2 horas y luego se transfirieron por 24 horas a alcohol butílico. Transcurrido ese tiempo se llevaron a una estufa de 57°C donde se las colocó en una mezcla formada por partes iguales de alcohol butílico/Paraplast durante 2 horas, seguido de 2 cambios de 2 horas cada uno en Paraplast. Se realizaron tacos histológicos y se efectuaron cortes de las muestras de 5-7  $\mu$  de espesor en un micrótopo. Luego se colorearon con la técnica hematoxilina eosina (H - E) o tricrómico de Masson.

### **Biología molecular**

Los ensayos moleculares se realizaron en el Departamento de Biología Molecular de IACA laboratorios (Bahía Blanca).

#### **Especímenes analizados según criterios moleculares:**

Para la identificación a nivel molecular se emplearon larvas de *Contraecum* sp. (Lcg), del hospedador *Cynoscion guatucupa* ya que estas fueron las únicas de todo el estudio que provocaron lesiones gástricas en un modelo murino (ver capítulo III en el presente estudio).

#### **Protocolo para la extracción y amplificación de ADN larval:**

La obtención de ADN se realizó a partir de digestión enzimática de las larvas Lcg. Se colocaron las larvas en 200 $\mu$ L de solución fisiológica, se agregó igual volumen de MagnaPure DNA Tissue Lysis buffer (Roche) y 20 $\mu$ L de proteinasa K. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 56°C. Para inactivar la proteinasa K, la muestra se sometió a 95°C por 10 minutos. Luego, El ADN se purificó utilizando un

sistema automatizado MagnaPure Compact (Roche), con un volumen final de elución de 50uL.

Mediante el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron 4 segmentos del genoma: un fragmento de 519 pb correspondiente al gen de la citocromo oxidasa 2 mitocondrial (cox 2), un fragmento de 470 pb de la subunidad pequeña del gen del ARN ribosomal (rrnS), un fragmento de 451 pb correspondiente a la región ITS1 y uno de 284 pb de la región ITS2.

Se emplearon los siguientes primers:

El gen cox 2 fue amplificado con los primers 211F 5'-TTT TCT AGT TAT ATA GAT TGR TTY AT-3' y 210 R 5'-CAC CAA CTC TTA AAA TTA TC-3'.

Para la amplificación del gen rrnS se utilizaron los primers: MH3 F 5'TTG TTC CAG AAT AAT CGG CTA GAC TT-3' y MH4.5R 5'-TCT ACT TTA CTA CAA CTT ACT CC-3').

La amplificación de los región ITS-1 se llevó a cabo con la utilización de los primers SS1 F 5'GTTTCCGTAGGTGAACCTGCG-3' y NC13 R 5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT-3') y la región ITS-2 con los primers SS2 F 5'-TTGCAGACACATTGAGCACT-3' y NC2 R 5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3' de acuerdo a los procedimientos descritos por Garbin et al. (2011)

La amplificación se llevó a cabo usando el Kit HotStarTaq PlusMaster Mix (QIAGEN), con una concentración final de la *master mix* de 1 X, 0,5-5 ng de ADN y 0,5 uM de cada uno de los *primers*, en un volumen final de 25 uL.

La PCR se realizó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) usando los siguientes parámetros de ciclado:

**Cox2:** 95°C 10 min, 34 ciclos de 95°C 30 s, 46°C 60s y 72°C 90s y una extensión final de 72°C por 10 min.

**rrnS, ITS1, ITS2:** 95°C 10 min, 35 ciclos de 95°C 30 s, 55°C 30s y 72°C 30s y una extensión final de 72°C por 7 min.

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% para verificar la efectividad de la amplificación. Las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio utilizando luz UV. Finalmente, los productos fueron purificados con el QIAquick PCR purification kit (Qiagen) y cuantificados con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

#### **Secuenciación de los productos amplificados:**

El producto de PCR purificado se secuenció en ambos sentidos usando el kit BigDye Terminator V1.1 de Applied Biosystem en un volumen final de 20 ul, con una dilución de la *master mix* de 0,125X, 1uM de cada primer y 15 ng de producto de PCR. Los parámetros de ciclado fueron: 96°C 1 min, 30 ciclos de 96°C 10 s, 50°C 5 s y 60°C 4 min. Los productos de secuenciación se corrieron en un secuenciador automático ABI 3500 de Applied Biosystem y se analizaron mediante el programa Sequencing Analysis v5.4.

#### **Análisis filogenéticos:**

Para analizar las relaciones filogenéticas, se buscaron con la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990) secuencias del gen de la citocromo oxidasa 2 mitocondrial (cox 2), que se encuentran depositadas en el GenBank. Se realizaron 2

alineamientos distintos, uno general (44 secuencias) con el objetivo de visualizar las asociaciones de la especie en estudio y las encontradas en GenBank y un segundo alineamiento, más reducido (11 secuencias), sólo con especies que corresponden a hospedadores mamíferos.

Luego, se alinearon las secuencias mediante el programa Muscle. Se utilizó el programa Jmodel Test para evaluar el modelo evolutivo que mejor aplicaba al presente alineamiento (Darriba et al., 2012). Se realizaron los análisis filogenéticos aplicando distintos métodos: distancia o Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), Máxima parsimonia (MP) mediante el programa MEGA v.5.2 (Tamura et al., 2011) y bayesianos (MrBayes *software* v.3.2.6.(Ronquist & Huelsenbeck, 2003)).

El soporte de las ramas para el método de NJ y MP se evaluó mediante 1.000 repeticiones de bootstrap, considerando una rama confiable aquella con un valor mayor al 70 %. Para el MP se realizó consenso estricto (el 100% de los árboles más parsimoniosos encontrados presentan esa topología de ramas) y consenso mayoría (similar aplicado pero en el 50% o más de los árboles).

En la metodología bayesiana, donde se implementó la cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC), la convergencia se evaluó considerando un desvío estándar en las frecuencias de los clados menor que 0,01 y valores de población efectiva (ESS del inglés: *Effective Simple Size*) mayor que 200. Los valores se verificaron utilizando el programa Tracer v.1.5. Los resultados de las estimaciones de árboles se resumieron descartando el 10% de los árboles que se guardaron. El soporte de las ramas, fue evaluado mediante probabilidad *a posteriori*, considerando una rama confiable aquella con un valor mayor que 0,7.

La visualización de los árboles obtenidos se realizó mediante el software FigTree v.1.4.2.

## RESULTADOS

### Ubicación taxonómica

Phylum Nematoda

Clase Rhabditea (=Secernentea)

Orden Ascaridoidea

Superfamilia Ascaridoidea Railliet & Henry, 1915

Familia Anisakidae Railliet & Henry, 1912

Subfamilia Contraeaeina Mozgovoï & Shakhmatova, 1971

Género *Contraeaeum* Railliet & Henry, 1912

.

---

### Descripción morfológica del material estudiado:

~ *Contraeaeum* sp. en el hospedador *Cynoscion guatucupa*

Larva III (Figuras 1 a 4):

Los ejemplares fueron hallados libres o asociados con otras formas parásitas en la cavidad celómica del hospedador. En general se encontraron sobre mesenterios.

**Descripción** (basada en 20 individuos):

Poseen una cutícula estriada transversalmente (Figura 2). La longitud promedio de las larvas fue de 3,53 (2,72-4,65) mm, con un ancho máximo de 0,130 (0,080-0,200) mm. La boca está rodeada con primordios labiales. Presencia de diente. Ánfidos e interlabios no son visibles. El anillo nervioso se encuentra a una distancia de 0,185 (0,150-0,250) mm con respecto al extremo anterior. El poro excretor anterior e interlabial se encuentra con respecto al extremo anterior a una distancia promedio de

0,015 (0,01-0,017). El apéndice ventricular ciego de 0,39 (0,3-0,66) de longitud promedio, se proyecta hacia la parte posterior desde el esófago. El esófago mide 0,44 (0,26-0,66) mm (Figura 4). El largo del ciego intestinal es de 0,233 (0,15-0,39) mm. La cola es estriada, cónica y mide 0,10 (0,08-0,19) mm (Figura 3). Los fásquidos no son visibles. (Tabla I)



Figura 1: Vista general de la larva L3 de *Contracaecum* sp. (Escala=0,2 mm)

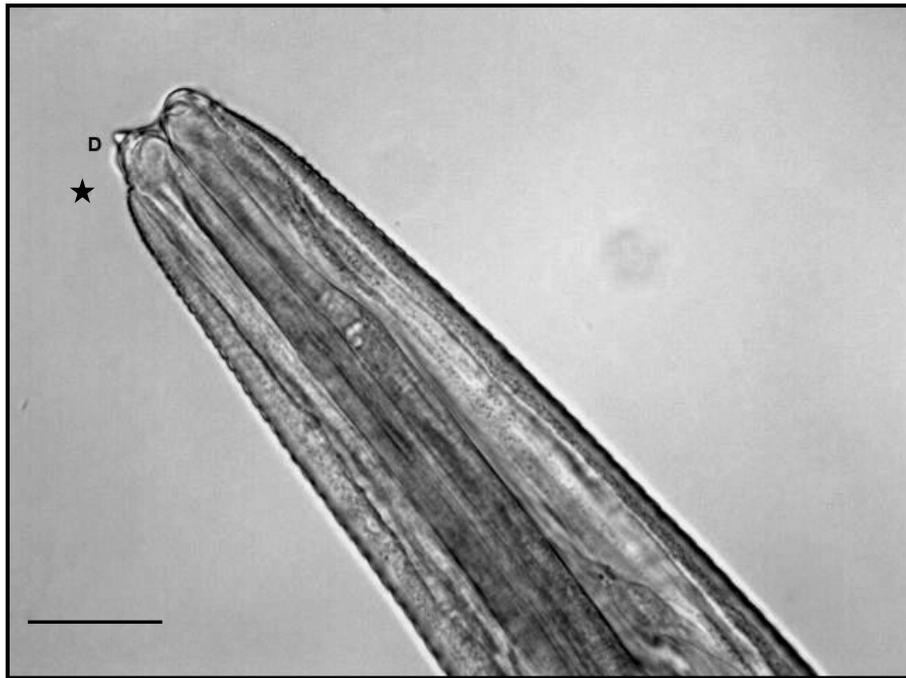


Figura 2: Extremo anterior de *Contracaecum* sp. encontrada en *C. guatucupa* señalando el diente perforante (D) y porción terminal del ducto y poro excretor (★) (escala=0,05mm).

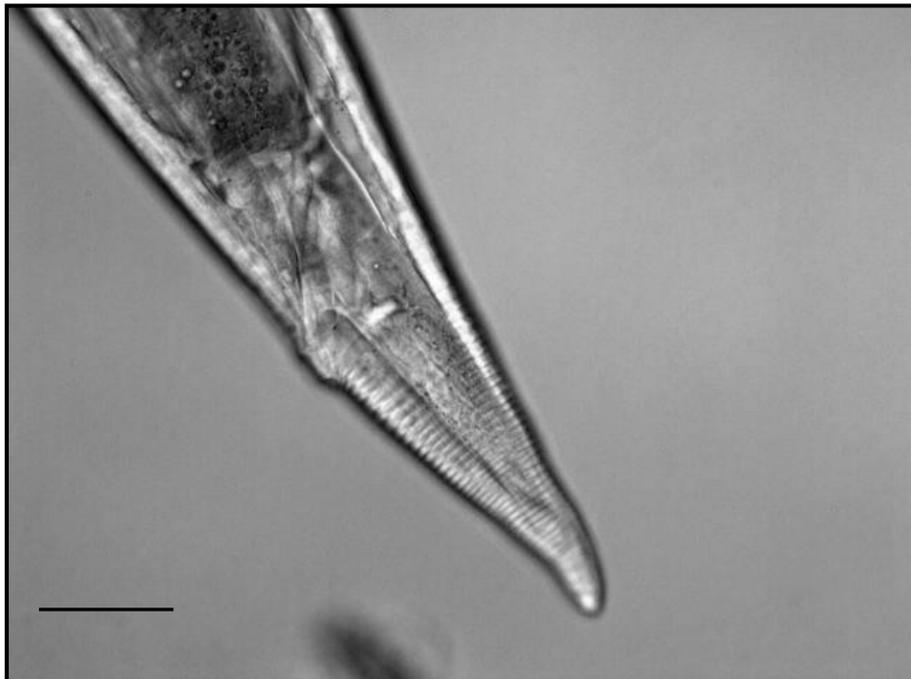


Figura 3: Extremo posterior de *Contracaecum* sp. encontrada en *C. guatucupa* (escala=0,05mm).

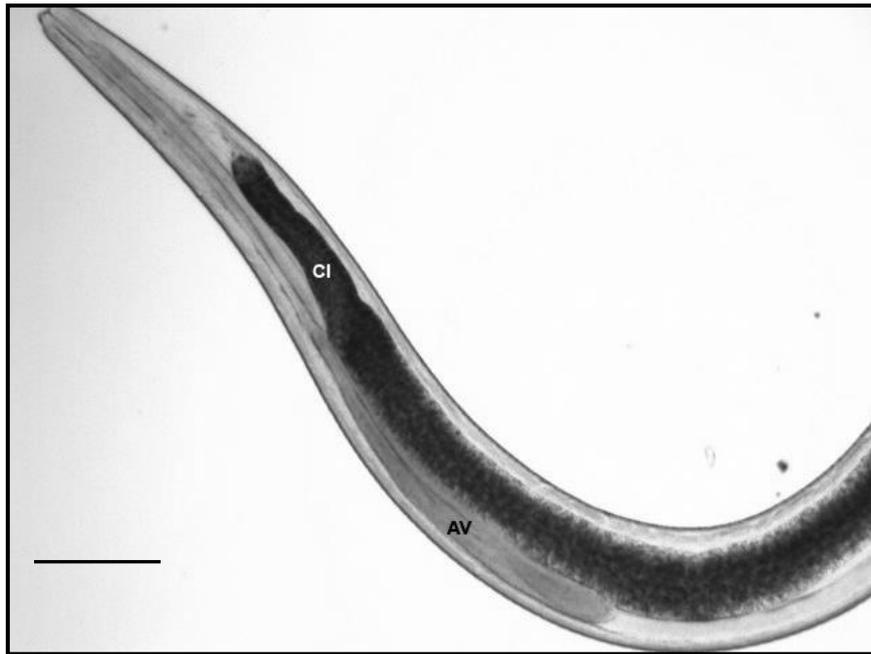


Figura 4: Vista del ciego intestinal (CI) y del apéndice ventricular (AV) de *Contracaecum* sp. encontrada en *C. guatucupa*. (escala=0,10 mm).

Tabla I: Medidas comparativas de larvas de *Contracaecum* sp. en *C. guatucupa*.

	Guagliardo (2003)	Presente estudio
Larvas medidas	N=30	N=20
Longitud del cuerpo	3,41 (2,61-4,30)	3,54 (2,72-4,65)
Ancho máximo del cuerpo	0,130 (0,09-0,176)	0,13 (0,08-0,2)
Distancia del extremo anterior al anillo nervioso	0,14 (0,11-0,176)	0,18 (0,15-0,25)
Largo del esófago	0,47 (0,35-0,58)	0,44 (0,26-0,66)
Largo del ciego intestinal	0,34 (0,24-0,48)	0,23 (0,15-0,39)
Largo del apéndice ventricular	0,34 (0,19-0,49)	0,39 (0,3-0,65)
Distancia del extremo anterior al poro excretor	-s/d	0,015 (0,01-0,017)
Longitud de la cola	0,103 (0,08-0,12)	0,11 (0,08-0,19)

### **Caracterización histológica de las larvas (Figura 6):**

En los cortes transversales de las larvas de *Contracaecum* sp. recolectadas en *C. guatucupa* se observó la cutícula en la superficie externa, una capa homogénea de tonalidad rosada refringente que presenta una ornamentación externa dispuesta longitudinalmente (Figura 6). No se alcanzaron a distinguir los estratos propios de dicha estructura. El espesor fue de un promedio de 5,36 (3-6,73)  $\mu$ . La relación de proporción con respecto al diámetro corporal en determinados niveles indicó que no sigue un patrón de grosor uniforme, ocurriendo zonas con la cutícula adelgazada; en general la proporción ronda 1:15 y 1:16. No presenta alas laterales.

Los cordones hipodérmicos corren longitudinalmente y dividen la musculatura somática en cuatro cuadrantes. Los cordones hipodérmicos dorsal y ventral son reducidos y los laterales son de gran tamaño con forma oval y poseen un núcleo.

Cada cuadrante está constituido por aproximadamente 14 células musculares (nivel núcleo de la glándula excretora). El sistema excretor está formado por una glándula unicelular gigante en forma de cinta que corre longitudinalmente adherida al lóbulo ventral del cordón lateral izquierdo.

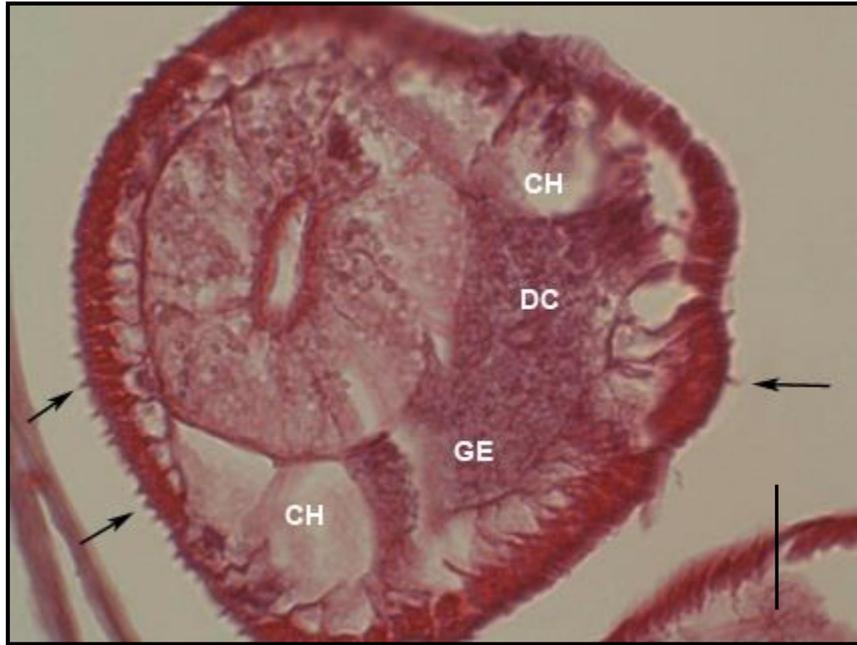


Figura 6: Corte transversal (H - E) de una larva L3 de *Contracaecum* sp. en *C. guatucupa*.(X1000). Vista de ornamentaciones de la cutícula (flechas), cordones hipodérmicos laterales (CH) y la glándula excretora (GE) con su ducto colector (CD). Tinción hematoxilina-eosina (escala=20  $\mu$ ).

---

~ *Contracaecum* sp. en el hospedador *Odontesthes argentinensis*:

Larva III: (Figuras 7 - 9)

Los ejemplares se hallaron libres en la cavidad celómica del hospedador, sobre los mesenterios o entre la grasa periférica al tubo digestivo.

**Descripción** (basada en 10 individuos):

Presentó una longitud del cuerpo promedio de 4,35 (3,5-5,2) mm. y un ancho máximo del cuerpo 0,136 (0,09-0,16). Posee una cutícula con estriaciones transversales. La boca está rodeada por tres esbozos de labios. Presencia de diente. El poro excretor es de posición ventral e interlabial y se encuentra a una distancia del extremo anterior de 0,0075 (0,0075-0,0075) mm. El anillo nervioso se encuentra a 0,18 (0,12-0,23) mm del extremo anterior. En la región anterior del tubo digestivo se

encuentra el esófago muscular de una longitud promedio de 0,42 (0,39-0,55) mm. Continúa en dirección posterior un ventrículo mas un apéndice ventricular de 0,41 (0,38-0,45) mm de longitud. El intestino se prolonga en un ciego intestinal de longitud 0,188 (0,175-0,210) mm con dirección anterior. No se observan fásmidos ni esbozos del aparato reproductor. La cola presenta una longitud de 0,102 (0,08-0,152) (Tabla II).



Figura 7: Vista general de *Contracaecum* sp. (L3) en *O. argentinensis*. (escala=0,3mm)



Figura 8: Extremo anterior de *Contracaecum* sp. (L3) en *O. argentinensis*. Ciego intestinal (CI) y apéndice ventricular (AV) (escala=0,2mm).



Figura 9: Extremo posterior de la L3 de *Contracaecum* sp. en *O. argentinensis*. (escala=0,10mm).

Tabla II: Medidas comparativas de larvas de *Contracaecum* sp. en *O. argentinensis*.

	Sanhueza (2002)	Presente estudio
Larvas medidas	N=14	N=10
Largo del cuerpo	4,21 (3,59-4,79)	4,35 (3,5-5,2)
Ancho máximo del cuerpo	0,17 (0,14-0,22)	0,136 (0,09-0,16)
Distancia del extremo anterior al anillo nervioso	0,19 (0,171-0,202)	0,18 (0,12-0,23)
Largo del esófago	0,53 (0,43-0,63)	0,42 (0,39-0,55)
Largo del ciego intestinal	0,28 (0,24-0,37)	0,188 (0,17-0,21)
Largo del apéndice ventricular más ventrículo	0,45 (0,30-0,53)	0,41 (0,38-0,45)
Poros excretor	-	0,0075 (0,0075-0,0075)
Longitud de la cola	0,15 (0,13-0,19)	0,102 (0,08-0,15)

### Caracterización histológica:

No se realizó debido a la baja abundancia (10 larvas en un total de 105 ejemplares), prevalencia e intensidad media presentadas por estas larvas en el hospedador *O. argentinensis*, como así tampoco se observó migración hacia la musculatura (ver capítulo II). Así mismo, debido al pequeño tamaño y el carácter friable del material estudiado la técnica histológica no brindó detalles morfológicos definidos que permitieran clarificar la microanatomía de las larvas de manera satisfactoria. En virtud del solapamiento morfométrico observado entre las larvas de *C. guatucupa* y *O. argentinensis* así como el solapamiento en la localización geográfica de ambos hospedadores y del comportamiento trófico de ambos hospedadores se postula que se trata de larvas de la misma especie de *Contracaecum*.

---

~ *Contracaecum* sp. en el hospedador *Odontesthes bonariensis*

Larva III: (Figuras 10 - 13):

Los ejemplares se hallaron principalmente entre la grasa periférica al tubo digestivo o libres en la cavidad celómica del hospedador.

**Descripción** (basada en 21 individuos):

Presenta una longitud promedio de 3,68 (2,29-4,8) y un ancho máximo promedio de 0,139 (0,090-0,210). Posee una cutícula estriada transversalmente (Figura 11). El extremo anterior es aguzado y ligeramente redondeado. Los labios no se encuentran bien desarrollados. Ánfidos e interlabios no visibles. Presencia de diente. El anillo nervioso se encuentra a 0,181 (0,150-0,240) del extremo anterior. El poro excretor es anterior e interlabial y se encuentra a 0,007 (0,005 - 0,0075) del extremo anterior de la larva (Figura 11). El esófago muscular tiene una longitud promedio de 0,38 (0,27-0,51), el ciego intestinal mide 0,21 (0,13-0,36) y el apéndice ventricular más el ventrículo miden 0,41 (0,27-0,52) (Figura 13). La cola es estriada, cónica y mide 0,08 (0,05-0,13) mm promedio (Figura 12). Los fásquidos no son visibles. No se observan estructuras del aparato reproductor (Tabla III).

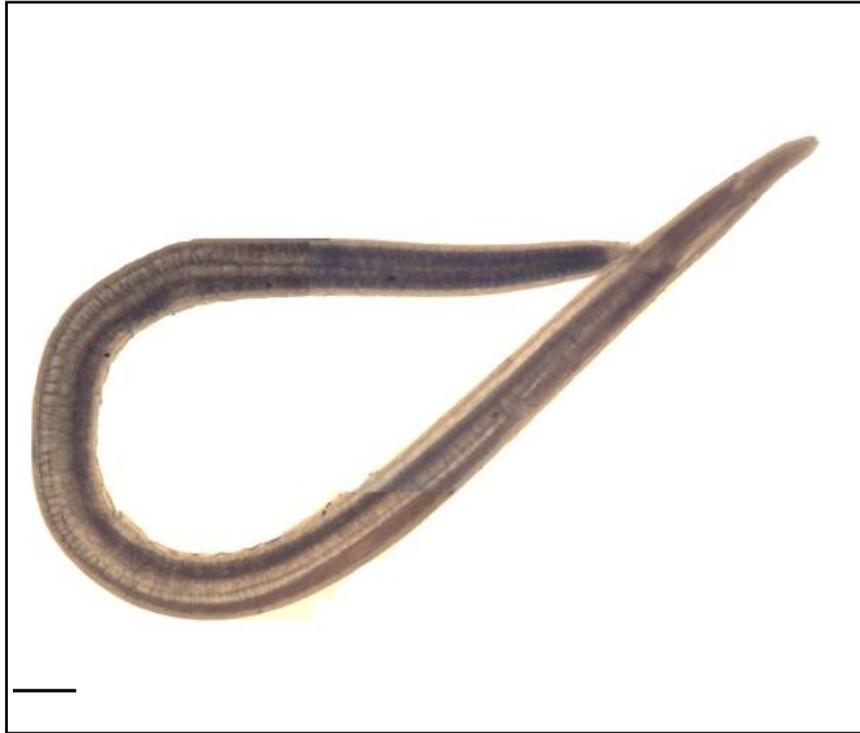


Figura 10: Vista general de *Contracaecum* sp. (L3) en *O. bonariensis* (escala=0,10mm)

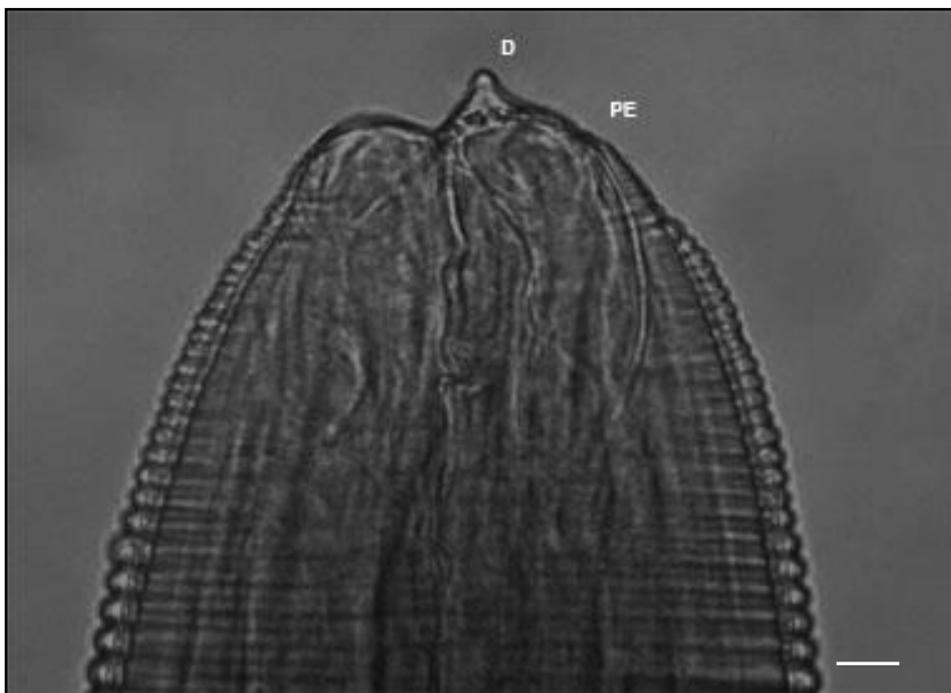


Figura 11: Extremo anterior de larva L3 de *Contracaecum* sp. encontrada en *O. bonariensis* señalando el diente perforante (D) y la porción terminal del ducto y del poro excretor (PE). (escala=0,02mm).

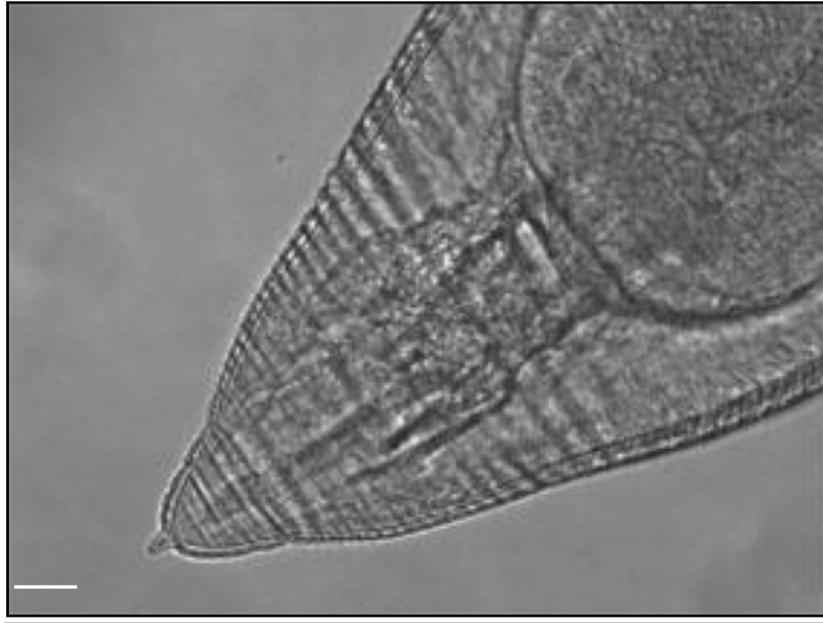


Figura 12: Extremo posterior de larva L3 de *Contracaecum* sp. encontrada en *O. bonariensis* (escala=0,02mm).

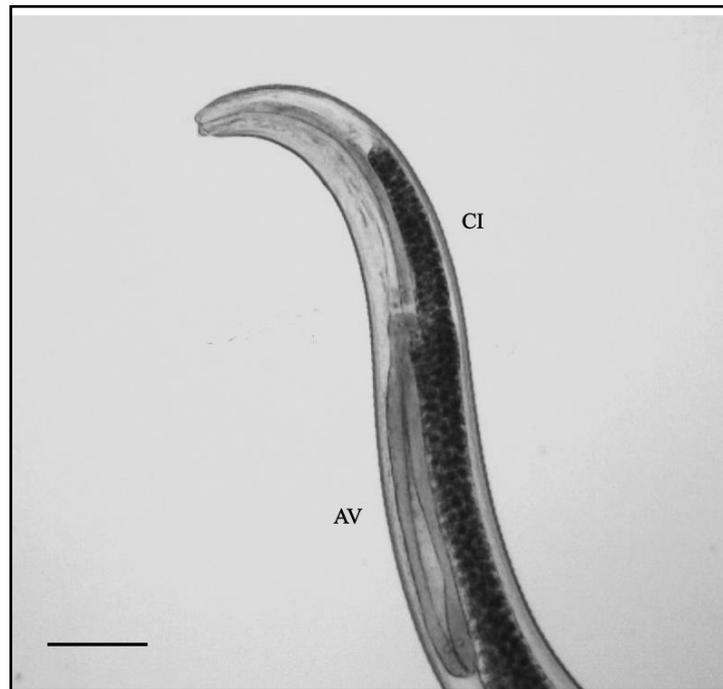


Figura 13: Vista del ciego intestinal (CI) y del apéndice ventricular (AV) de larva L3 de *Contracaecum* sp. encontrada en *O. bonariensis*. (escala=0,10mm).

Tabla III: Medidas comparativas de larvas de *Contracaecum* sp. en *O. bonariensis*.

	Drago (2004)	Presente estudio
Larvas medidas	N=20	N=15
Largo del cuerpo	3,22 (1,66-4,40)	3,68 (2,35-4,8)
Ancho máximo del cuerpo	0,14 (0,07-0,2)	0,139 (0,09-0,2)
Distancia del extremo anterior al anillo nervioso	0,164 (0,13-0,2)	0,181 (0,15-0,24)
Largo del esófago	0,36 (0,28-0,48)	0,38 (0,27-0,51)
Largo del ciego intestinal	0,17 (0,07-0,28)	0,21 (0,13-0,36)
Largo del apéndice ventricular más ventrículo	0,37 (0,23-0,48)	0,41 (0,27-0,52)
Poro excretor	-	0,007 (0,005 - 0,008)
Longitud de la cola	0,083 (0,06-0,10)	0,084 (0,052-0,13)

### **Caracterización histológica** (Figuras 14 y 15):

Al microscopio óptico, en el corte transversal, el estadio larval de *Contracaecum* sp. a nivel del núcleo de la glándula excretora evidencia una capa homogénea de tonalidad rosada refringente correspondiente a la cutícula. No se distinguen los estratos propios de dicha estructura por ser de pequeño espesor, siendo el mismo de un promedio de 2,57 (1,96 - 3,92)  $\mu$ . En la superficie expuesta del estrato cortical se aprecian ornamentaciones externas (Figura 14).

No presenta alas laterales. Entre la cutícula y la musculatura se observa una delgada hipodermis. El núcleo se proyecta hacia el pseudoceloma en cuatro porciones engrosadas bajo la forma de cordones hipodérmicos. Los cordones hipodérmicos corren longitudinalmente y dividen la musculatura somática en cuatro cuadrantes. Los cordones dorsal y ventral son reducidos. Los cordones laterales por

el contrario, son de gran tamaño y presentan un núcleo. El sistema nervioso central a partir de su par ganglionar lateral a nivel del anillo nervioso, envía nervios laterales que corren a lo largo del cuerpo por los cordones laterales. La glándula excretora contacta en todo su trayecto con el lóbulo ventral del cordón hipodérmico lateral. Como se mencionó en párrafos anteriores, los cordones de la hipodermis dividen la musculatura en cuatro cuadrantes o campos. En larvas de *Contracaecum* sp parásita de *O. bonariensis* cada cuadrante (a nivel del núcleo de la glándula excretora) está constituido por 11-15 células musculares. El sistema excretor es asimétrico formado por una glándula unicelular gigante en forma de cinta que corre longitudinalmente adherida al lóbulo ventral del cordón lateral izquierdo. El núcleo excretor es oval de aproximadamente 7 por 23  $\mu$  (Figura 15) El poro excretor abre ventralmente entre los esbozos de labios subventrales.

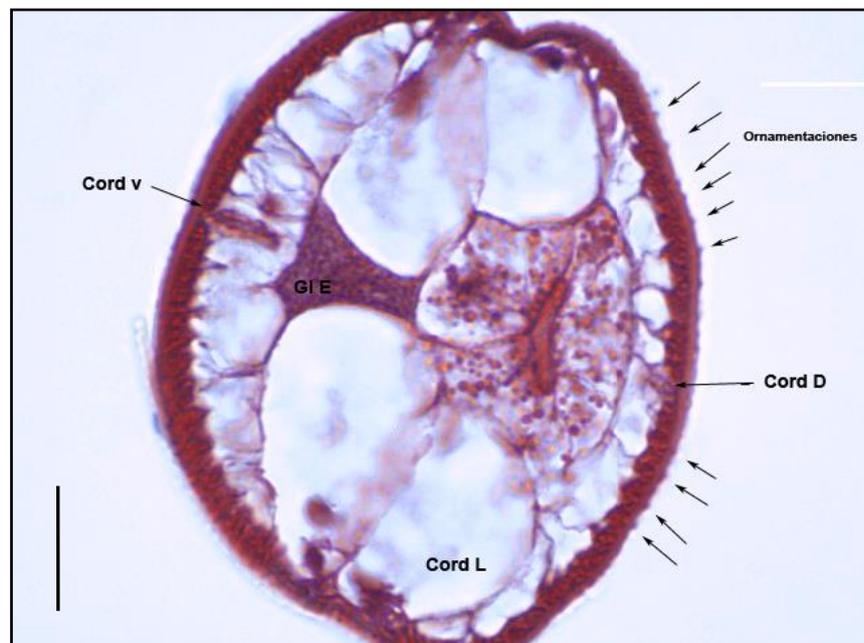


Figura 14: Corte transversal de larva L3 de *Contracaecum* sp. en *O. bonariensis*. Vista de cordones hipodérmicos ventral (Cord V) y dorsal (Cord D) e izquierdos (Cord L) y derechos. Gl. E: glándula excretora. Tinción tricrómico de Masson, (X1000, escala=2  $\mu$ m)



Figura 15: Corte transversal de larva L3 de *Contracaecum* sp. en *O. bonariensis*. Vista de glándula excretora (GE) con su núcleo (N). Tinción hematoxilina-eosina. (X1000, escala=2  $\mu$ m).

En la tabla 4 se compararon los datos morfométricos de las larvas del género *Contracaecum* en los tres hospedadores estudiados.

En la tabla 5 se compararon los índices morfométricos de Koyama et al. (1969) calculados para las larvas del género *Contracaecum* en los tres hospedadores estudiados.

Tabla IV. Comparación de medidas de larvas III *Contracaecum* sp. en los hospedador estudiados. Expresadas en milímetros.

Hospedador	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Odontesthes argentinensis</i>	<i>Odontesthes bonariensis</i>
Larvas medidas	N=20	N=10	N=21
Longitud del cuerpo	3,53 (2,72-4,6)	4,35 (3,5-5,2)	3,63 (2,35-4,8)
Ancho máximo del cuerpo	0,130 (0,08-0,2)	0,136 (0,09-0,16)	0,139 (0,09-0,2)
Distancia del extremo anterior al anillo nervioso	0,185 (0,15-0,25)	0,17 (0,12-0,21)	0,177 (0,15-0,24)
Largo del esófago	0,448 (0,26-0,66)	0,42 (0,39-0,55)	0,383 (0,27-0,51)
Largo del ciego intestinal	0,233 (0,15-0,39)	0,188 (0,17-0,21)	0,21 (0,13-0,36)
Largo del apéndice ventricular más ventrículo	0,393 (0,3-0,65)	0,41 (0,38-0,45)	0,41 (0,27-0,52)
Distancia del extremo anterior al poro excretor	0,015 (0,01-0,017)	0,008 (0,0075-0,0075)	0,007 (0,005-0,0075)
Longitud de la cola	0,105 (0,08-0,19)	0,102 (0,08-0,15)	0,085 (0,05-0,13)

Tabla V. comparación de índices morfométricos de Koyama et al., (1969) de las larvas III del género *Contracaecum* en los tres hospedadores estudiados.

Hospedador	<i>Cynoscion guatucupa</i>	<i>Odontesthes argentinensis</i>	<i>Odontesthes bonariensis</i>
Larvas medidas	N=20	N=10	N=21
$\alpha$	27.15 (34-23)	31.98(38.88-32.5)	26.11(26.11-24)
$\beta_1$	4.19 (4.85 -3.51)	5.25 (4.54-5.25)	4.577 (4.35-4.66)
$\beta_2$	7.87 (10.46 - 6.96)	10.35 (8.97 - 9.45)	9.47 (8.7 - 9.41)
$\gamma$	33.62(34-24.21)	42.64(43.75-34.66)	42.7(47-36.9)
X	8.98 (9.06 - 7.07)	10.61 (9.21 - 11.5)	8.85 (8.70 - 9.23)
Y	15.15 (18.13 - 11.79)	23.13 (20.58 - 24.76)	17.28 (18.07 - 13.3)
Z	1.68 (2 - 1.66)	2.18 (2.23 - 2.14)	1.95 (2.07 - 1.44)

Referencias: Índices de Koyama (Koyama et al. 1969):  $\alpha$  = Largo del cuerpo / Ancho del cuerpo,  $\beta_1$  = Largo del cuerpo / Largo esófago total,  $\beta_2$  = Largo del cuerpo / Largo preventrículo,  $\gamma$  = Largo del cuerpo / Cola, X=largo del cuerpo/largo Apéndice ventricular, Y=largo del cuerpo/largo del Ciego Intestinal, Z= largo Apéndice ventricular / largo del Ciego Intestinal.

## **Ubicación taxonómica**

**Phylum Nematoda**

**Clase Rhabditea (=Secernentea)**

**Orden Ascaridoidea**

**Superfamilia Ascaridoidea** Raillet & Henry, 1915

**Familia Anisakidae** Raillet & Henry, 1912

**Subfamilia Raphidascaridinae**

**Género *Hysterothylacium*** Ward et Magath, 1917.

---

### ***Hysterothylacium* sp. en el hospedador *C. guatucupa***

Larva III (Figuras 16-19)

Se las encontró libres en la cavidad del cuerpo o entre los mesenterios.

#### **Descripción** (basada en 10 individuos):

Posee una cutícula con suaves estriaciones transversales. En corte transversal se observa la presencia de alas laterales que se extienden a lo largo del nematode. El extremo anterior es redondeado. No se observan labios diferenciados (Figura 16). Dientes y deiridios no observados. El poro excretor de posición ventral se encuentra situado a la altura del anillo nervioso. El tubo digestivo está formado por un ciego intestinal dorsal al esófago y de longitud marcadamente menor que el apéndice ventricular (Figura 18). Se observan gónadas representadas como un filamento espiralado (Figura 19). La cola es cónica, con una espina terminal simple (Figura 17). Las medidas de las larvas halladas son las siguientes: la longitud promedio del cuerpo es de 12,61 (9-15,3) mm, el ancho máximo del cuerpo es de 0,34 (0,27-0,4), la distancia del extremo anterior al anillo nervioso es de 0,57 (0,48-0,62), el largo promedio del esófago es de 0,91 (0,67-1) mm, el largo promedio del ciego intestinal es 0,35 (0,25-0,48) y el largo del apéndice ventricular es de 0,93 (0,54-2) mm, el poro excretor se encuentra a una distancia de 0,64 (0,62-0,66) con respecto al extremo anterior y la longitud de la cola es de 0,21 (0,11-0,36). Relación largo total - largo del esófago: 13,84, relación largo del esófago - largo del apéndice ventricular: 0,97, relación largo del esófago - largo del ciego intestinal: 2,6 y relación apéndice ventricular - ciego intestinal: 2,65.



Figura 16: Extremo anterior de *Hysterothylacium* sp. LIII halladas en *C. guatucupa* (escala=0,1mm).

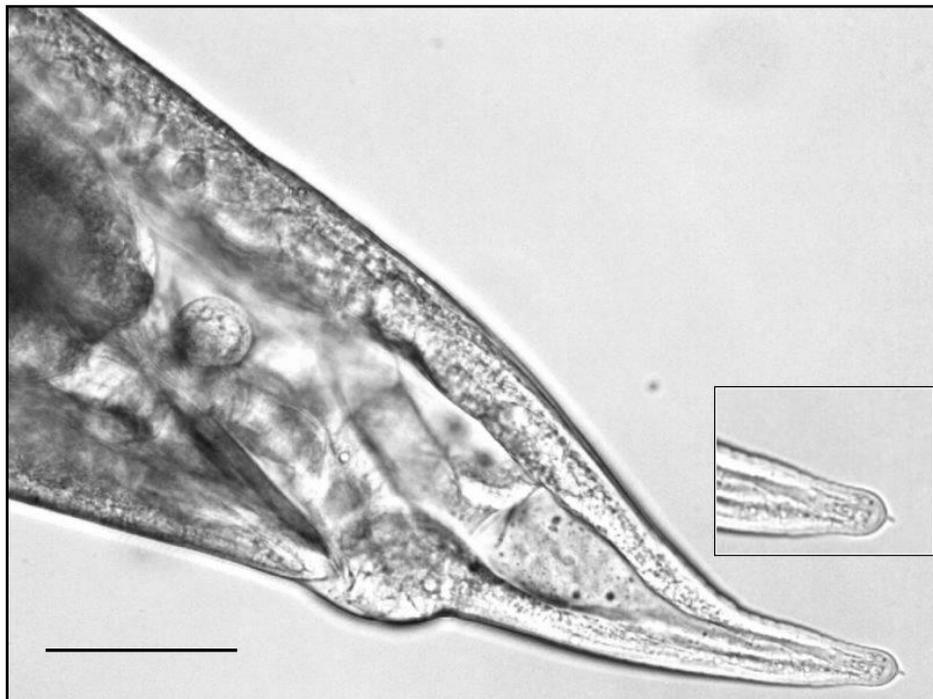


Figura 17: Extremo posterior de *Hysterothylacium* sp. mostrando en detalle la espina caudal (escala=0,1mm).

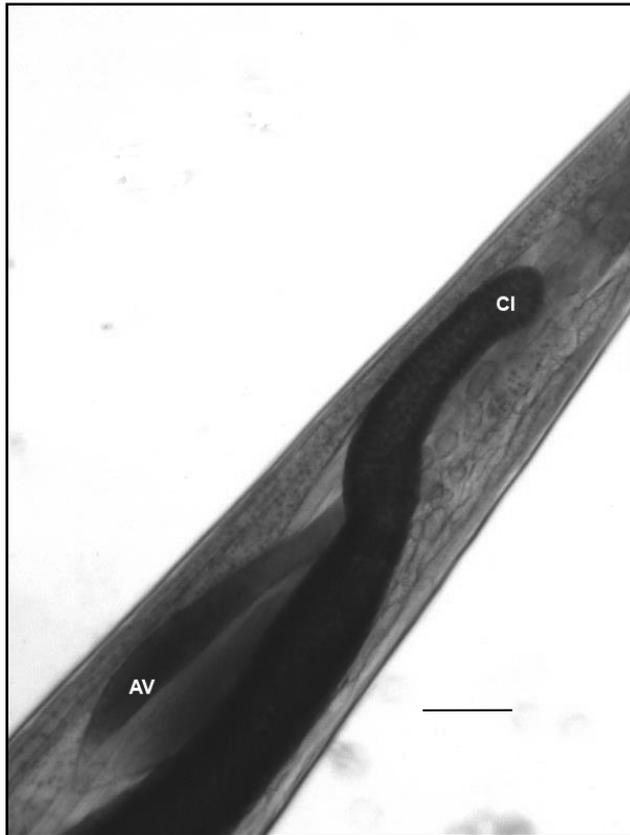


Figura 18: Región del ciego intestinal y apéndice ventricular de *Hysterothylacium* sp. (escala=0,1mm).

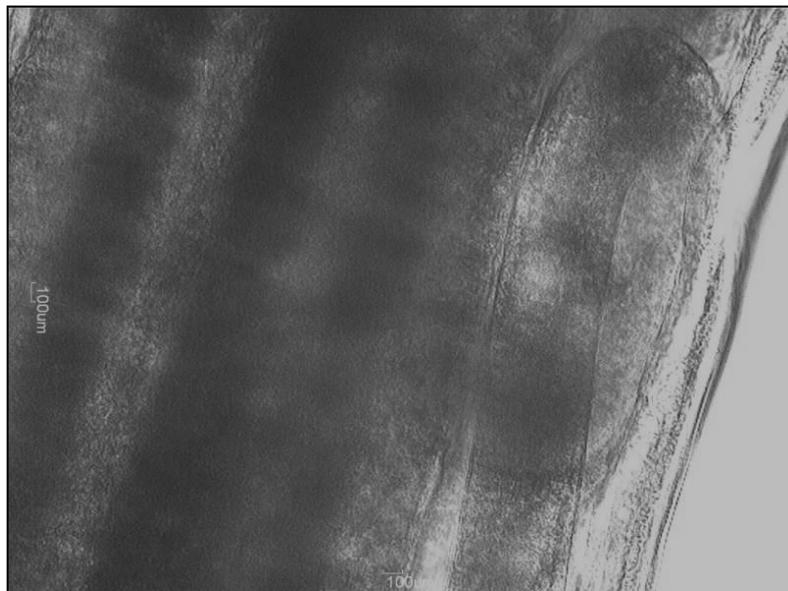


Figura 19: Vista en detalle de gónada espiralada (X400, escala=100 $\mu$ m).

Tabla V: Medidas comparativas de larvas de *Hysterothylacium* sp. en *C. guatucupa*.

	Guagliardo (2003)	Presente estudio
Larvas medidas	N=30	N=10
Longitud del cuerpo	11,53 (8,45-20,88)	12,61 (9-15,3)
Ancho máximo del cuerpo	0,34 (0,21-0,53)	0,34 (0,27-0,4)
Distancia del extremo anterior al anillo nervioso	0,42-0,45	0,57 (0,48-0,62)
Largo del esófago	0,91 (0,71-1,20)	0,91 (0,67-1)
Largo del ciego intestinal	0,35 (0,24-0,405)	0,35 (0,25 - 0,48)
Largo del apéndice ventricular	0,877 (0,576-1,032)	0,93 (0,54 - 2)
Distancia del extremo anterior al poro excretor	-s/d	0,64 (0,62 - 0,66)
Longitud de la cola	0,213 (0,12-0,324)	0,21 (0,11 - 0,36)

### Caracterización histológica:

La cutícula al microscopio óptico se observa como una capa homogénea de tonalidad rosácea. En la superficie cortical externa no se aprecian irregularidades en la ornamentación externa.

Las alas laterales presentan un esqueleto que esta embebido en la cutícula y tienen forma de “T” y se extienden a lo largo de la larva (Figura 20, 21).

La hipodermis se proyecta hacia el pseudoceloma en cuatro cordones. Los cordones dorsal y ventral se ubican entre la musculatura circundante, mucho más

reducidos que los cordones laterales. Por lo general, en los cortes de cada rama del cordón lateral se aprecia un sólo núcleo (Figura 21).

La musculatura somática está formada por un estrato único de células musculares longitudinales fusiformes. Los cordones hipodérmicos dividen esta musculatura en cuatro cuadrantes de aproximadamente 11-13 células musculares cada uno.

El tubo digestivo, en particular el intestino, que se observa en el corte transversal, se asienta sobre una membrana basal acidófila. La pared epitelial es de tipo cilíndrico con los núcleos basales y abundantes microvellosidades que conforman un borde o ribete en cepillo. En el lumen se aprecian restos digeridos de alimentos.

La gónada del sistema reproductor femenino está representada por un filamento espiralado en cuyo interior es posible distinguir células germinales inmaduras (Figura 19)

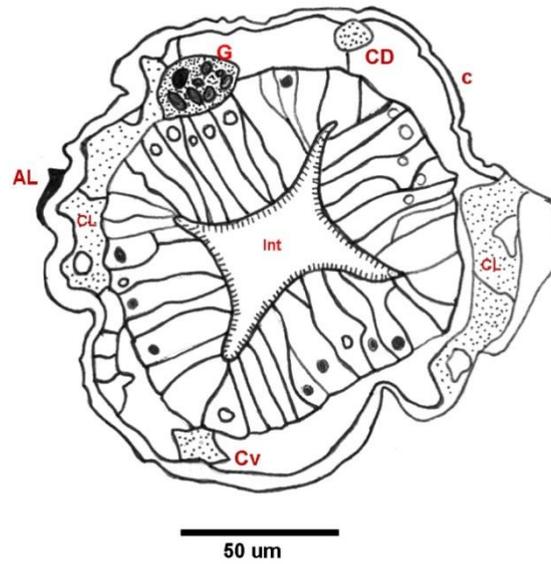


Figura 20: Corte histológico transversal de una larva L3 de *Hysterothylacium* sp. en *C. guatucupa* (40X). Referencias en el dibujo de cutícula (c), cordón hipodérmico ventral (Cv), dorsal (CD) y cordones laterales (CL). Ala lateral (AL), gónada (G) e intestino (Int). H-E.

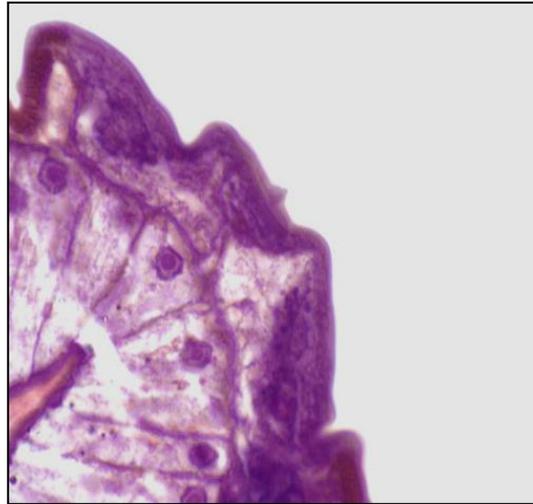


Figura 21: Vista en detalle del ala lateral y núcleo de cordones hipodérmicos laterales. H-E (1000X)

## Identificación molecular de las larvas de *Contracaecum* obtenidas en

### *C. guatucupa*:

Las secuencias del gen mitocondrial de ADN cox 2 de larvas de *Contracaecum* sp. halladas en *Cynoscion guatucupa* fueron comparadas con otras disponibles del género *Contracaecum* depositadas en GenBank: EU477207.1 *Contracaecum* cf. *osculatum* D, EU477205.1 *C. cf. osculatum* E, EU477204.1 *C. cf. osculatum* B, EU477203.1 *Contracaecum* cf. *osculatum* A, EU477208.1 *C. osculatum baicalensis*, EU477210.1 *C. radiatum*, EU477213.1 *C. mirounga*, EU852337.1 *C. gibsoni* (*Contracaecum* aff. *multipapillatum* A), EU852343.1 *C. overstreeti* (*Contracaecum* aff. *multipapillatum* B), JN580992.1 *C. pelagicum* (larvas), JN580993.1 *C. pelagicum* (larvas), EF535569.1, EF535568.1, EF122210.1 *C. pelagicum*, EU852350.1 *C. micropapillatum*, EF513494.1 *C. bioccai*, HQ328504.1 *C. chubutensis*, EF513512.1 *C. septentrionale*, GQ847541.1, GQ847544.1, GQ847532.1, GQ847542.1, GQ847536.1, GQ847533.1, GQ847539.1, GQ847543.1, GQ847538.1, GQ847534.1, *Contracaecum* sp., GQ847537.1 *Contracaecum*

sp. (*C. australe*) EF558892.1, EF513501.1, EF122202.1, EF535570.1, EF558891.1, EF122203.1, EF122204.1, EF513506.1, EF513511.1, EF558896.1 *C. rudolphii*, EU477211.1 *C. ogmorhini*, EU477212.1 *C. margolisi*, DQ116435.1 *Pseudoterranova ceticola*. Debido a la asociación de la especie estudiada con otras especies que parasitan mamíferos marinos se decidió ensayar un nuevo alineamiento sólo con estas especies.

Los alineamientos de mtADN *cox 2* (519 pb) del presente estudio en comparación con otras especies del género *Contracaecum* previamente secuenciadas y depositadas en GenBank se presentan en la figura 22. En la figura 23 se muestra una selección de secuencias que corresponden a hospedadores mamíferos.

Las relaciones genéticas establecidas para la especie de *Contracaecum* estudiada se muestran en los árboles contruidos mediante análisis Bayesiano, de Máxima Parsimonia (MP) y Neighbor-Joining (NJ) (figuras 24, 25, 26, 27).

Los análisis de MP consenso estricto y NJ, deducidos de las secuencias mtADN *cox 2* demostraron que los especímenes de *Contracaecum* sp. estudiados (n=3) están genéticamente más cercanos en principio a *C. margolisi* y luego a *C. ogmorhini*. Sin embargo, de acuerdo al análisis Bayesiano la relación fue inversa, más cercano a *C. ogmorhini* que a *C. margolisi*. A pesar de ello, se observa una congruencia en los diferentes métodos utilizados ya que siempre mostraron las mismas asociaciones con la especie en estudio.



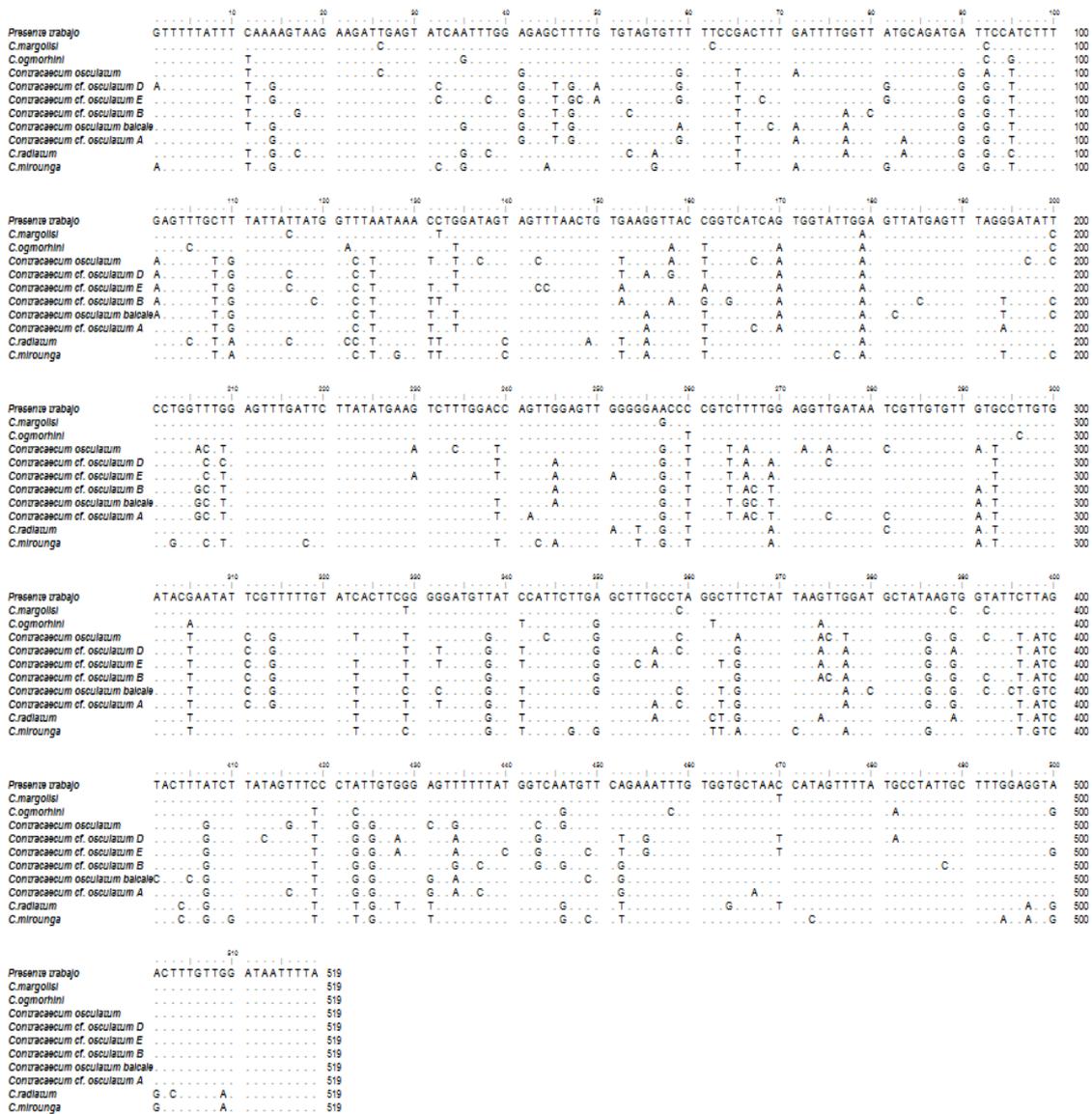


Figura 22: Secuencias alineadas de genes de ADN mitocondrial *Cox 2* (519 Pb), de *Contracaecum* sp. de *Cynoscion guatucupa* del Estuario de Bahía Blanca y otras especies de *Contracaecum* de mamíferos, mediante el programa Bioedit. Los puntos indican igualdad de nucleótidos.

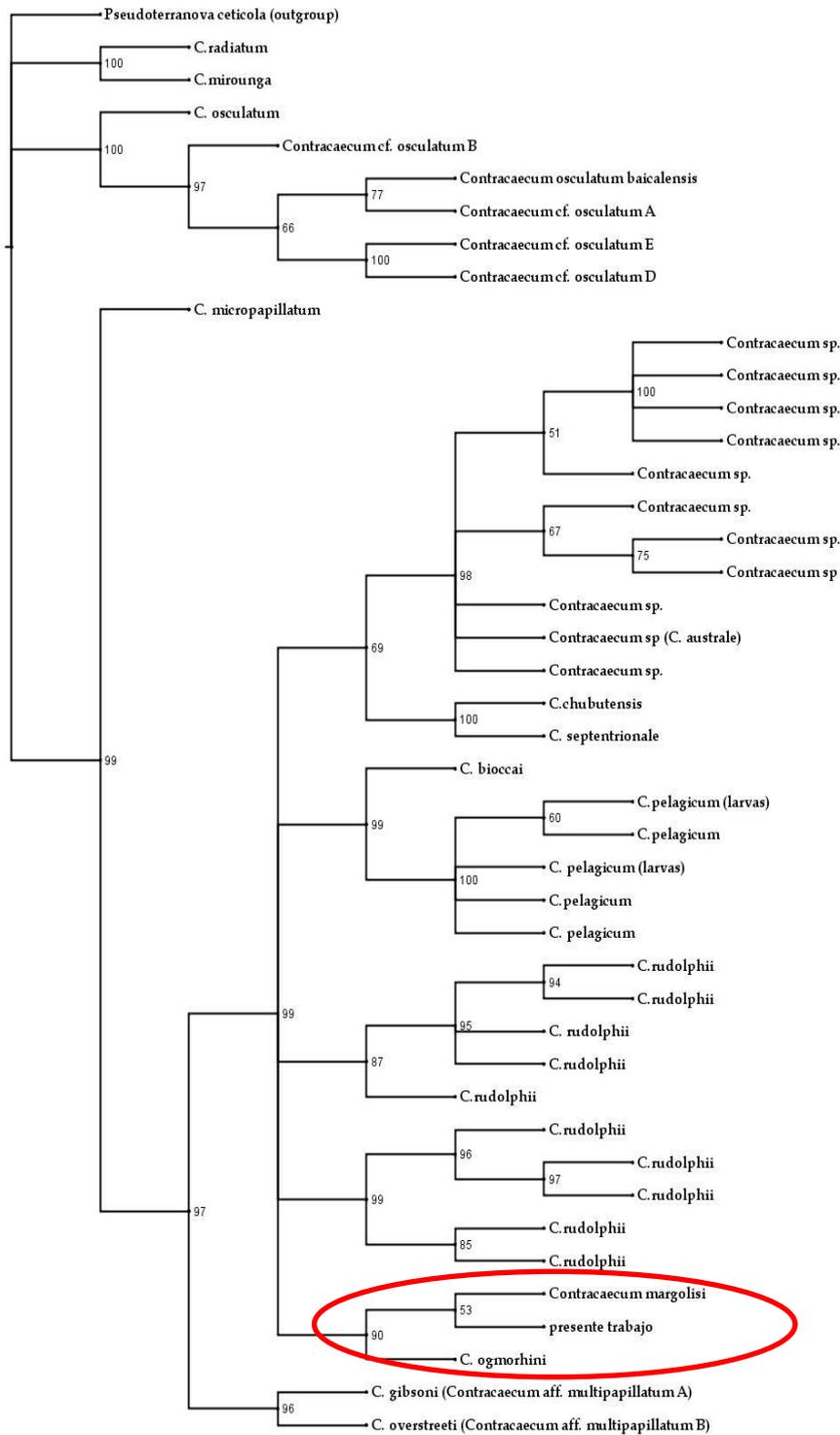


Figura 23: Árbol de consenso inferido por análisis Bayesiano (B). Se llevó a cabo utilizando el programa MrBayes software v.3.2.6, deducido del análisis de las secuencias *cox2* ADNmt de *Contracaecum* sp. conocidas hasta el presente en 1.000.000 generaciones. Los números en los nodos son las probabilidades (%) *a posteriori* (Pp) por el análisis bayesiano con un apoyo importante de  $P_p \geq 95\%$ .



Figura 24: Árbol de consenso inferido por análisis Bayesiano (B). Se llevó a cabo utilizando el programa MrBayes *software* v.3.2.6, deducido del análisis de las secuencias *cox2* ADNmt de *Contracaecum* sp. conocidas hasta el presente en 1.000.000 generaciones. Los números en los nodos son las probabilidades (%) *a posteriori* (Pp) por el análisis bayesiano con un apoyo importante de  $Pp \geq 95\%$ .

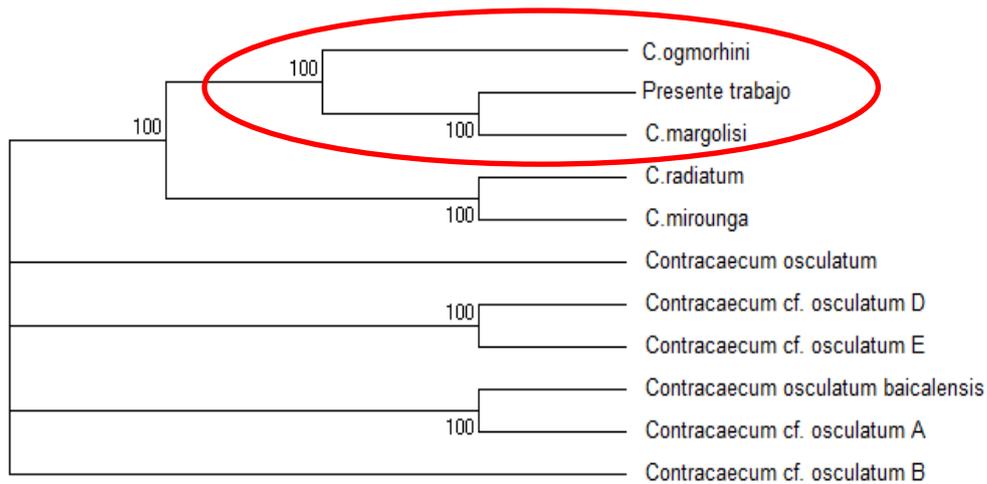


Figura 25: Árbol de máxima parsimonia (MP) consenso estricto derivado del gen de la citocromo oxidasa 2 mitocondrial (cox 2), para *Contracaecum* sp. de *C. guatucupa* del Estuario de Bahía Blanca. Los valores de Bootstrap  $\geq 70$  se indican en los nodos de las ramas.

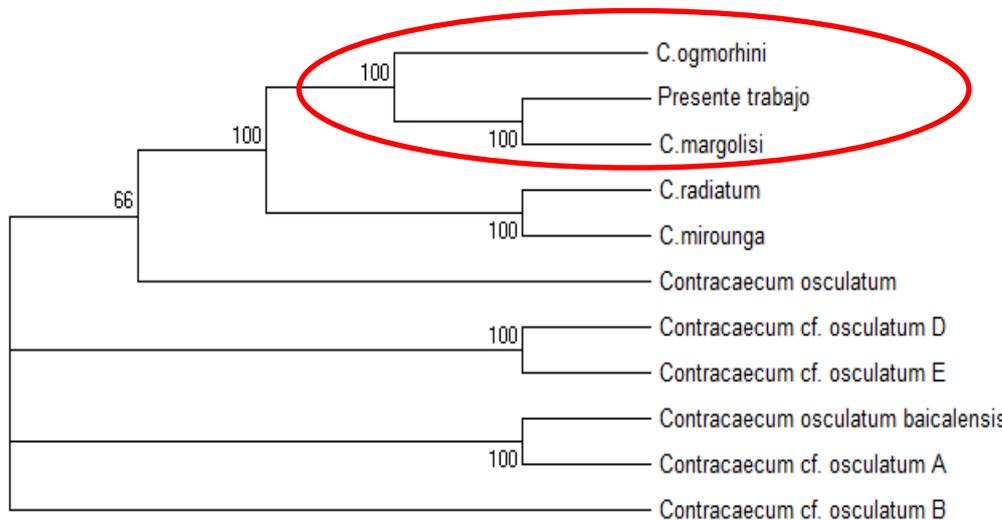


Figura 26: Árbol de máxima parsimonia (MP) consenso mayoría derivado gen de la citocromo oxidasa 2 mitocondrial (cox 2), para *Contracaecum* sp. de *C. guatucupa* del Estuario de Bahía Blanca. Los valores de Bootstrap  $\geq 70$  se indican en los nodos de las ramas.

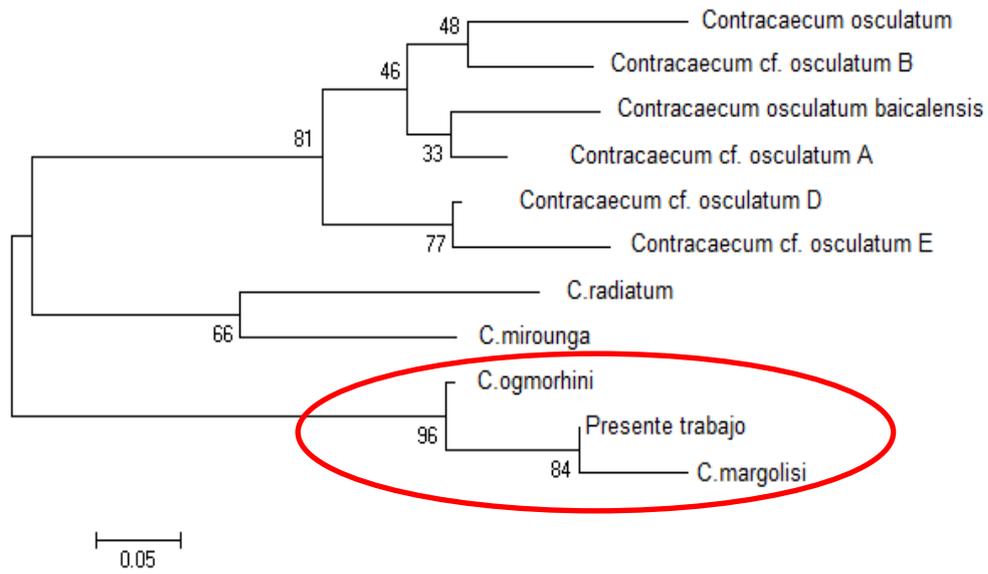


Figura 27: Árbol filogenético Neighbor-Joining (NJ) basado en secuencias parciales (519 nt) del gen la citocromo oxidasa 2 mitocondrial (cox 2). Los valores de bootstrap ( $\geq 70\%$ ) se indican en los nodos de las ramas.

## DISCUSIÓN

La presencia de ciego intestinal y de apéndice ventricular además de la posición del poro excretor justo debajo de las papilas labiales rudimentarias, permitieron incluir las larvas encontradas como una especie del género *Contracaecum*.

### ***Contracaecum* sp. en *C. guatucupa*:**

Según Fagerholm et al. (1990) en los estadios larvales es difícil identificar la especie a la que corresponde. Pero en las décadas recientes las técnicas genético moleculares han permitido reconocer especies dentro de la familia Anisakidae (Mattiucci & Nascetti, 2008). Los genes más utilizados como marcadores genéticos en el género *Contracaecum* son los de la citocromo oxidasa designados como *cox2*, genes altamente conservados en las mitocondrias y cuya variación en algunos pares de bases determina la divergencia de especies (D'Amelio et al., 2000, 2007).

Las larvas halladas coinciden morfológicamente con las de tipo B halladas por Incorvaia & Díaz de Astarloa (1998) en *Paralichthys orbignianus* y *P. patagonicus*. Además coincidieron con los índices morfométricos de Koyama et al., (1969)  $\alpha$ ,  $\beta$ , X, Y y Z calculados por los autores.

Timi et al., (2001) describieron larvas de *Contracaecum* sp en *Engraulis anchoita* de las costas Argentinas y Uruguayas, las cuales coinciden morfométricamente con las encontradas en este estudio, a excepción de la longitud del cuerpo, resultando de mayor longitud (5,01 (4,06-5,82)).

Las larvas descritas por Guagliardo (2003) y por Tanzola & Guagliardo (2004) para los hospedadores *Micropogonias furnieri* y *Cynoscion guatucupa* para la misma zona de estudio coincidieron con las halladas en este estudio (ver tabla 1).

Timi et al., (2005) registraron larvas de *Contracaecum* sp. en *C. guatucupa* en la costa norte de la provincia de Buenos Aires, pero su trabajo está referido a parásitos como indicadores de stock, por este motivo, al no presentar descripciones morfométricas, no fue posible la comparación de las larvas.

Se observaron muy pocas diferencias morfométricas entre las larvas de *Contracaecum* sp. L3 de *C. guatucupa* y las larvas L3 de *E. anchoita* estudiadas por Garbin et al. (2013) en Bahía Engaño, Chubut (*C. guatucupa*: 3,54 (2,72-4,65), *E. anchoita* 4,78 (3,89- 6,20)) y en la longitud del apéndice ventricular (*C. guatucupa*: 0,39 (0,3-0,65), *E. anchoita*: 0,24 (0,17-0,36)). Las larvas L3 de *E. anchoita* provenientes de Chubut presentaron a su vez muy poca variación morfométrica con respecto a las halladas por Timi et al., (2001) en el litoral de Mar del Plata.

#### ***Contracaecum* sp. en *O. argentinensis*:**

Las larvas registradas pertenecen a *Contracaecum* sp. tipo II según Cannon (1977).

Las características morfológicas de estas larvas coincidieron con las larvas tipo B descritas por Incorvaia & Díaz de Astarloa (1998) en *Paralichthys orbignianus* y *P. patagonicus*. Sin embargo, no coincidieron con los índices morfométricos de Koyama et al., (1969) para las mismas larvas, salvo el índice X (largo del cuerpo/largo del apéndice).

Timi et al., (2001) comunicaron el hallazgo de larvas de *Contracaecum* sp. en *Engraulis anchoita* de las costas Argentinas y Uruguayas, que coinciden morfológicamente con las larvas encontradas en el presente estudio, pero se observó una pequeña diferencia en el largo total de las larvas. Esta diferencia se suma al ancho total de las larvas y al largo del apéndice ventricular que se observa en los estudios realizados por Garbin et al., (2013) para el mismo hospedador.

Las descripciones coinciden totalmente con las realizadas por Sanhueza (2002) en el mismo hospedador (Tabla II).

Se postula que las larvas de *Contracaecum* halladas en *C. guatucupa* y *O. argentinensis* corresponden a la misma especie de *Contracaecum*, debido al solapamiento morfológico, de nicho trófico y geográfico de los hospedadores examinados, como se mencionó anteriormente.

#### ***Contracaecum* sp en *O. bonariensis*:**

Para el pejerrey de laguna, Mac Donagh (1928) comunicó la presencia de larvas en el intestino en las lagunas de Monte y Cochicó, provincia de Buenos Aires. Szidat & Nani (1951) describieron para *Odontesthes hatcheri* formas inmaduras de *Contracaecum* sp en el intestino, planteando que se trata de ejemplares del mismo género que los hallados por Mac Donagh en *O. bonariensis*.

Dado que los especímenes larvales hallados en *O. bonariensis* se asemejan únicamente a los hallados por Drago (2004) (ver tabla III), surge que estas larvas no pueden ser asimiladas a ninguna de las especies conocidas. En este caso se debería recurrir a técnicas genético moleculares que han permitan reconocer especies dentro de la familia Anisakidae (Mattiucci & Nascetti, 2008).

Estas larvas se asemejaron a las larvas tipo I descritas por Moravec, Kohn y Fernandes, 1993 (Moravec, 1998).

Ninguna de las larvas de estadio tres de *Contracaecum* sp. estudiadas en el presente trabajo presentó similitud, ni con las larvas descritas morfométricamente por Koyama et al. (1969), ni con los índices calculados por los mismos autores.

Por otra parte, la presencia del ciego intestinal y del apéndice ventricular además de la posición del poro excretor a la altura del anillo nervioso, permitieron incluir a otro tipo de larva encontrada en el presente trabajo como una especie del género *Hysterothylacium*.

#### ***Hysterothylacium* sp. en *C. guatucupa*:**

En relación con los datos morfométricos de las larvas de *Hysterothylacium* sp. encontradas en el presente trabajo y en relación con la descripción realizada por otros autores (ver tabla 4) se plantea que:

El material hallado no se corresponde con las características dadas por Norris & Overstreet (1976) designadas como tipos MA y MB y que revestirían interés zoonótico en el hemisferio Norte.

En Mar del Plata Incorvaia y Díaz de Astarloa (1998) describieron morfométricamente larvas de *Hysterothylacium* sp. en el lenguado *Paralichthys patagonicus* las que no coinciden con las descritas en este trabajo.

Navone et al. (1998) identificaron larvas de estadio III y IV y adultos de la especie *H. aduncum* en los hospedadores: *Themisto gaudichaudii*, *Engraulis anchoita*, *Merluccius hubbsi*, *Scomber japonicus*, *Genypterus blacodes* y *G. brasiliensis* de diferentes zonas del

mar Argentino. En su trabajo describieron morfológicamente los estadios larvales y adultos tanto machos como hembras. Las larvas estudiadas en el presente trabajo difirieron de las larvas estadio III y IV citadas por los autores, principalmente por poseer un ciego intestinal más corto que el apéndice ventricular. Las relaciones entre largo del cuerpo/largo esófago, largo del esófago/largo ciego intestinal y largo apéndice ventricular/largo del ciego intestinal obtenidas por los autores fueron mayores que en el presente trabajo y menores en relación con el largo del esófago/largo del apéndice ventricular.

Sey & Petter (1998) propusieron una clave dicotómica en la que describen seis tipos de larvas de tercer estadio de *Hysterothylacium* sp. de Kuwait, a las que designaron como tipos KA, KB, KC, KD, KE y KF. Las larvas examinadas en el presente trabajo coincidieron con las larvas tipo KB en cuanto a la presencia de poro excretor a nivel del anillo nervioso, a la ausencia de diente y a la presencia de una espina en la cola. Sin embargo se diferencian de los tipos antes mencionados por las características siguientes: la punta de la cola posee un círculo de espinas y el apéndice ventricular es más corto que el doble del esófago.

Bicudo et al. (2005) describieron morfológicamente larvas de *Hysterothylacium* sp de tercer estadio en el hospedador *Prionotus punctatus* en la zona costera de Río de Janeiro. Las principales características que no coinciden con las larvas en este trabajo fueron la ausencia de alas laterales y la presencia de un diente próximo a la abertura oral.

La presencia de larvas de *Hysterothylacium* sp. en *Cynoscion guatucupa* fue registrada por Timi et al. (2005). El trabajo tenía como objetivo determinar parásitos

como indicadores de stock en tres zonas del sudoeste del Océano Atlántico, por tal motivo, al no presentarse descripciones morfométricas, no fue posible realizar la comparación de las larvas.

Braicovich (2008) describió en *Percophys brasiliensis* larvas de estadio III, que se diferencian por el largo total, la relación largo del esófago y el apéndice ventricular, la relación esófago y el ciego intestinal y la relación apéndice ventricular y ciego intestinal. Se observa que habría un error en este valor ya que coincide con el valor dado por la autora para la medida de la cola de *Hysterothylacium* sp. La autora menciona que las larvas descritas se corresponden morfológicamente con larvas encontradas en otras especies de peces como *Micropogonias furnieri*, *Cynoscion guatucupa* y *Pinguipes brasilianus*, pero no coinciden con las estudiadas en el presente trabajo.

Fontenelle et al., (2013) en el estado de Santa Catarina en Brasil, describieron larvas estadio III en *C. guatucupa* a las cuales denominaron como *Hysterothylacium deardorffoverstreetorum*. De acuerdo con los datos morfométricos presentados por los autores, las larvas fueron ser muy similares a las encontradas en el presente trabajo, salvo por el largo del apéndice ventricular y distancia del extremo anterior al anillo nervioso.

Las características de las larvas en el presente trabajo coinciden con las larvas descritas por Guagliardo (2003) para el mismo hospedador *C. guatucupa* y en el mismo área de estudio.

## **Aportes de la morfohistología larval para el diagnóstico clínico de las anisakidosis**

Las manifestaciones clínicas de la anisakidosis suelen confundirse con otro tipo de enfermedades provocadas por otros agentes etiológicos, como por ejemplo *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* y *Toxocara canis*. Las técnicas inmunodiagnósticas suelen mostrar importante reactividad cruzada con estos nematodos principalmente debido al uso de múltiples antígenos del parásito en los tests (Fernández de Corres et al., 2001). Por lo tanto, la anamnesis juega un rol fundamental en el diagnóstico de esta enfermedad.

Para *Anisakis simplex*, por ejemplo, se ha registrado una proteína (Ani s 1) secretada por la glándula excretora que estimula la producción de IgE (IgE-binding proteína). Si bien este hallazgo no diferencia las distintas especies del complejo *A. simplex*, ha proporcionado un diagnóstico certero en el ensayo clínico, con una especificidad de 90% y una sensibilidad del 86% (Lymbery & Cheah, 2007). Las investigaciones referidas al diagnóstico de esta enfermedad se han realizado principalmente en el género *Anisakis*, por ser el principal agente que provoca esta enfermedad. Por su parte las radiografías simples y con contraste, así como las ecografías, no suelen ser muy específicas y pueden mostrar imágenes anormales. Si bien el diagnóstico certero es la visualización directa de la larva, donde el nematode se extrae mediante endoscopía, en algunos casos se realiza la extracción quirúrgica y un análisis anatomopatológico ulterior (Gómez et al., 2003). Por tal motivo se considera que es importante la tipificación histológica de las larvas, como las

estudiadas en este trabajo que permita la comparación y el diagnóstico frente a una misma manifestación clínica o patológica.

Realizando una comparación de las larvas de nematodos en un corte histológico transversal se pueden diferenciar claramente aquellas pertenecientes al género *Contracaecum*. La principal diferencia que se observa con las del género *Hysterothylacium* es la ausencia de alas laterales. *Hysterothylacium* presenta una gran variación en cuanto a ese carácter y se pueden hallar alas laterales con formas estrechas, anchas o aguzadas (Petter & Cabaret, 1995; Deardorff & Overstreet, 1981). Puede incluso haber ausencia de alas laterales, como en el caso de *H. patagonense* (Moravec et al., 1997). Otro rasgo morfológico divergente lo constituyen los cordones hipodérmicos laterales, siendo alargados en corte transversal en *Hysterothylacium* y de contorno ligeramente cuadrangular o redondeado en *Contracaecum*.

El número de células musculares observadas en los estadios larvales de *Contracaecum* sp. e *Hysterothylacium* sp. examinados en el presente estudio no presentó variación, sin embargo Shiraki (1974) observó variación al comparar larvas de *Hysterothylacium* (= *Thynascaris adunca*) de 15-18 células musculares por cuadrante contra 31-43 en larvas de *Contracaecum* tipo B.

El género *Terranova* presenta alas laterales embebidas en la cutícula que articulan en forma de "V". Se pueden observar o estar ausentes a lo largo de toda la longitud corporal dependiendo de la especie y del estadio ontogénico (Tanzola, 2004). Asimismo, se puede observar que los cordones hipodérmicos laterales también adoptan una forma de "V" claramente diferenciables de *Contracaecum* sp. e

*Hysterothylacium* sp. Tanzola (2004) describió en adultos machos de *Terranova galeocerdonis*, 30-33 células musculares por cuadrante a nivel esofágico y 46-50 células musculares a nivel medio del cuerpo, en tanto que para las hembras describió 38-40 y 46-50 células musculares, respectivamente, mientras que Shiraki (1974) en larvas de *Terranova decipiens* describió 52-74 células musculares por cuadrante.

Para poder diferenciar cortes de *Terranova* sp. en sección transversal de *Pseudoterranova* sp. se tiene en cuenta lo propuesto por Gibson (1983). En las especies de *Terranova*, la glándula excretora se expande hacia un nivel anterior y ocupa a nivel del esófago un 5-11% del diámetro corporal del adulto en tanto que en mamíferos marinos ocupa un 25-31%. El autor realizó una distinción genérica las especies similares a *Terranova* que se encuentran en mamíferos marinos y que designó como *Pseudoterranova* el género que contiene tres especies: *Pseudoterranova kogiae* (Johnston & Mawson, 1939), *P. decipiens* (Krabbe, 1878) y *P. ceticola* (Deardorff & Overstreet, 1981).

El género *Anisakis* se diferencia notablemente del resto de la familia Anisakidae porque no presenta alas laterales y sus cordones hipodérmicos laterales tienen forma bilobulada, con un pedúnculo que se une a la hipodermis. Además, la capa de células musculares presenta un mayor número de células por cuadrante, 48,5 - 69,5, con respecto a *Contraecaecum* sp. e *Hysterothylacium* sp. (Shiraki, 1974; Takabe, 1998; Céspedes et al., 2000; Roongruangchai et al., 2012).

En lo referente a *Toxocara canis*, cuyas larvas migrantes pueden provocar patologías en el humano se considera pertinente diferenciar en un corte transversal las larvas de este ascaroideo zoonótico con las de *Contraecaecum* sp. e

*Hysterothylacium* sp. la principal diferencia entre estos tres nematodos estriba en la región anterior en la ausencia de ciego intestinal y apéndice ventricular en *T. canis*. Además los cordones hipodérmicos laterales de *T. canis* presentan forma rectangular perpendicular a la cutícula en cuyo interior discurren notorios canales excretores ubicados próximos a la superficie cuticular.

Shalaby et al., (2009) no cuantificaron el número de células musculares por cuadrante, pero se puede observar en las fotografías de sus cortes transversales en los adultos de *T. canis* que el número de células es significativamente mayor que el observado en *Contraecum* sp. e *Hysterothylacium* sp. La superficie externa de la cutícula de *T. canis* no presenta irregularidades (Aukdtikalniene et al., 2000; Shalaby et al., 2009).

En el género *Ascaris* la presencia de conducto excretor en los cordones hipodérmicos laterales también es una característica relevante (Watson, 1965). Sin embargo, en los adultos de algunas especies se observan variantes, siendo en algunos casos similares a *Toxocara* pero en otros son de forma redondeada y pequeños respecto del diámetro corporal del nematode (Stretton, 1976; García & Bruckner, 1997). Además Stretton (1976) reconstruyó con macrofotografías electrónicas el número de células musculares en el segundo estadio de larvas de *Ascaris*. Posee 83 células musculares dispuestas en los cuatro cuadrantes, los cuadrantes dorsales y un cuadrante ventral contienen 21 células y el cuadrante restante posee 20 células. En los adultos Stretton, observa similar número de células con una pequeña variación de 24 o 21.

En relación con cutícula, los nematodos presentan grosores variables inclusive en un mismo estadio ontogénico, de acuerdo a la región del cuerpo. Tanzola (2004) para *Terranova galeocerdonis* describió regiones de 8,4  $\mu\text{m}$  y 67,2  $\mu\text{m}$  en las de mayor grosor. Incluso la relación de proporción con respecto al diámetro corporal del nematode varía con respecto a la región corporal. De larvas a adultos la cutícula aumenta en grosor manteniendo la estructura (Watson, 1965).

Por lo expuesto se considera un rasgo clínico de importancia diagnóstica la tipificación a nivel morfohistológico de aquellas larvas de nematodos que potencialmente puedan alojarse en tejidos humanos, como ya lo han anticipado Koyama et al. (1969).

#### **Estudios moleculares:**

La identificación a nivel específico empleando técnicas moleculares se realizó sólo para las larvas de *Contracaecum* sp. parásitas de la pescadilla de red, *Cynoscion guatucupa*, debido a que fueron las únicas de las ensayadas que produjeron resultados positivos de invasión en la mucosa digestiva de modelo murino (como se verá en el Capítulo III).

La correcta identificación taxonómica de los nematodos anisákidos, en cualquier etapa de su ciclo de vida es esencial para comprender la epidemiología del parásito y así desarrollar estrategias para el control de las enfermedades asociadas con ellos. Sin embargo, existen limitaciones al momento de la identificación de los estados larvarios usando criterios morfológicos, razón por la cual se recurrió a la identificación molecular mediante la secuenciación del gen que codifica la enzima citocromo oxidasa 2, *cox2*. Los análisis de las secuencias ubicaron éstas larvas en el

mismo cluster junto a *Contracaecum margolisi* y *C. ogmorhini*. Sin embargo, y debido al escaso registro de secuencias depositadas en Gen Bank no se pudo establecer con cuál de éstas dos especies resulta más emparentada. *Contracaecum* sp. (presente trabajo) apareció genéticamente relacionado con *C. margolisi*, según análisis bayesiano de especies parásitas de mamíferos y aves, así como en MP y NJ, en los cuales los valores de probabilidad fueron de 53% y de bootstrap  $\geq 70$ , respectivamente. En el análisis bayesiano donde se muestra la relación de especies parásitas de mamíferos marinos, la asociación más fuerte se dió con *C. ogmorhini* con valores de probabilidad *a posteriori* mayores a 70%.

Estudios moleculares basados en datos de alozimas, el análisis de la secuencia parcial de la citocromo oxidasa mitocondrial b (ADNmt cytb) (Mattiucci et al., 2003) y marcadores moleculares en los espaciadores transcritos internos de ADN ribosómico (Zhu et al., 2001), demostraron que *C. ogmorhini* es un **complejo de especies** compuesto por al menos dos genotipos distintos, que no pueden ser diferenciados morfológicamente denominados *C. ogmorhini s. s* y *C. margolisi* (Mattiucci et al., 2003), con distinta distribución geográfica y especies hospedantes. Mientras que *C. ogmorhini s.s.* se encuentra en mamíferos del hemisferio Sur *C. margolisi* se encuentra en el hemisferio Norte. La distribución alopátrida de estas dos especies estaría relacionada con la de sus distintos hospedadores definitivos (Mattiucci et al., 2003).

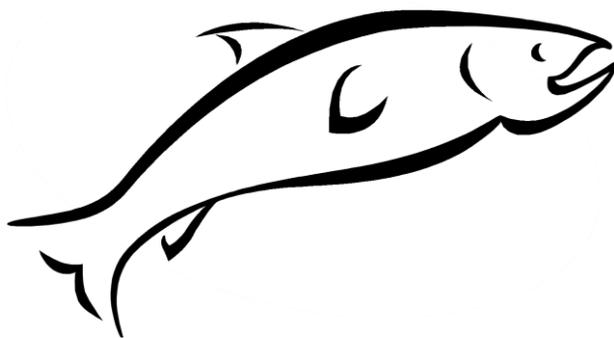
Hasta el momento no se detectó ninguna evidencia de intercambio de genes entre los dos taxones, *C. margolisi* y *C. ogmorhini* (s.s.), que parasitan distintos pinnípedos otáridos en las dos áreas geográficas. Sólo se recolectaron hasta ahora

muestras alopátridas, lo que impide una demostración de aislamiento reproductivo en el campo (que sostendría el concepto de especies biológicas). Dichas investigaciones indican una divergencia genética entre las especies boreales y australes a nivel nuclear similar a la que se encuentra frecuentemente entre las especies alopátridas y simpátridas de los nematodos anisákidos, pertenecientes a los géneros *Anisakis* Dujardin, 1845, *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 y *Pseudoterranova* Mosgovi, 1950 (Mattiucci et al., 2003, Mattiucci et al., 2009). Esta situación muestra que la caracterización genética en algunos taxones sería insuficiente para determinar el estatus de una especie cuando se utiliza un único gen (en el presente estudio, Cox 2). Situación que evidencia que se debería realizar un trabajo exhaustivo combinando una mayor cantidad de marcadores moleculares y taxonomía morfométrica convencional.

El hecho de encontrar afinidad molecular del material estudiado en el presente trabajo con especies que parasitan mamíferos marinos, constituye un interesante punto de partida para rastrear vínculos potenciales en especies que puedan tener implicancia zoonótica. Dicho de otro modo, a partir de los hallazgos del presente trabajo, la búsqueda de especies del género *Contracaecum* que puedan importar riesgo zoonótico debería enfocarse prioritariamente en especies parásitas de mamíferos marinos, sin descartar la posibilidad que taxones parásitos de aves aún no investigados también puedan provocar lesión en humanos. Hasta tanto se disponga de mayor información a nivel genético del género *Contracaecum*, se concluye que las larvas que produjeron lesión en la mucosa de ratones BALB /cAnN pertenecen al complejo *Contracaecum ogmorhini* s.l.

## **CAPITULO II**

### **Interacción parásito-hospedador intermediario**



---

## INTRODUCCIÓN

---

### Características biológicas de los hospedadores examinados:

#### *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830)

La pescadilla de red *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830) es un pez demersal que habita aguas de salinidades no inferiores a 18 UPS y rangos de temperatura entre 13,1° C y 20,8° C. Su distribución está restringida al Atlántico Sur, desde Río de Janeiro (22° 35' S) al Norte de la Patagonia (43° S), entre la costa y los 100 metros de profundidad aproximadamente, en aguas típicamente marinas y estuarinas (López Cazorla, 2000, Ruarte & Sáez, 2008).

Los estudios realizados por López Cazorla (1996) en el estuario de Bahía Blanca propuso como la alimentación principal para los adultos de pescadilla en verano a *Arthromysis magellanica*, peces, *Artemesia longinaris* y *Neomysis americana*. Para fines de verano y otoño, predomina *P. petrunkevitchi*, peces, *Artemesia longinaris* y *Pleoticus muelleri*. En la Zona Común Argentino - Uruguay como en la zona de "El Rincón", la pescadilla está definida como una especie ictiófaga, con una marcada preferencia por *Engraulis anchoita*, siendo éste el ítem presa dominante en todas las épocas del año, teniendo como excepción la época invernal en la zona "el Rincón", debido a la migración que la anchoita realiza hacia la región norte. Dentro del grupo de los crustáceos, el ítem más importante es *Peisos petrunkevitchi* en la época de invierno. Si bien esta especie es abundante todo el año, *C. guatucupa* la consume

cuando se produce la migración de la merluza, *Merluccius hubbsi* (García, 2007; Sardiña & López Cazola, 2005).

La reproducción de *C. guatucupa* tiene lugar en la zona externa al estuario, y el ingreso al mismo tiene una función trófica para los adultos y de crecimiento y alimentación para sus larvas y juveniles. Éstos últimos son hallados durante el verano y el otoño con tallas que van desde los 3 cm hasta los 18 cm de longitud total (LT) (edad 0+). Los juveniles más grandes migran aguas afuera del estuario y vuelven a ingresar como adultos con tallas que superan los 30 cm LT. Si bien los adultos son encontrados en el área durante todo el año, presentan dos picos de abundancia, el primero durante abril-mayo y el segundo y más importante, en agosto-septiembre (López Cazorla, 2000).

Se la considera la segunda especie más importante, después de la corvina (*Micropogonias furnieri*), como recurso pesquero.

Su captura en todo el país a lo largo de los años 2009 - 2016 tuvo un promedio de 107.194,5 toneladas. Para el mismo período, en el puerto de Bahía Blanca se observó que la captura fue disminuyendo de 252,5 toneladas anuales a 1,2 en 2014 elevándose en 2015 a 13,9 toneladas. Para 2016 no existe aun registro. (Fuente: Subsecretaría de Pesca y Acuicultura - MAGyP 2016).

### ***Odontesthes argentinensis* (Valenciennes, 1835)**

El pejerrey *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes, 1835) se distribuye desde el sur de Brasil hasta Chubut. Es una especie que habita aguas costeras y está adaptada a cambios de salinidad y temperatura. Es probable que para reproducirse efectúe migraciones hacia zonas estuariales (Cousseau y Perrota, 1998). El periodo de

desove ocurre entre los meses de agosto a noviembre (Sanhueza, 2002). La dieta está basada en organismos bentónicos como cangrejos, anfípodos, misidáceos y gasterópodos (López Cazorla, 1996).

Su captura en todo el país a lo largo de los años 2009 - 2016 tuvo un promedio de 16,73 toneladas. Para el mismo período, en el puerto de Bahía Blanca se observa que la captura promedio fue de 0.1 toneladas (Fuente: Subsecretaría de Pesca y Acuicultura - MAGyP 2016)

### *Odontesthes bonariensis*

El pejerrey bonaerense, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier & Valenciennes, 1835) es uno de los peces que posee mayor importancia económica en los ambientes acuáticos continentales de Argentina (López & García, 2001). Ha constituido históricamente un recurso de pesca deportiva y comercial, conformando la especie emblemática de la pesquería del centro del país, movilizándolo a miles de adeptos que se trasladan en su búsqueda, generando un movimiento económico millonario (Mancini & Grosman, 2008).

Su distribución geográfica original presenta dudas debido a que la descripción de la especie se realizó sobre poblaciones introducidas y mantenidas mediante la siembra (López et al., 1991). Originalmente habitaba el río de La Plata, el río Paraná y las aguas bonaerenses vinculadas con la cuenca del Salado. En la actualidad es una especie neotropical de amplia distribución en el territorio Argentino y del mundo (Ringuelet et al., 1967, López & García, 2001).

El pejerrey es un pez ágil, veloz, que presenta un cuerpo hidrodinámico con cabeza alargada y boca protráctil que le permite abarcar un amplio espectro trófico.

Prefiere las aguas frescas que no se calientan excesivamente en verano. La temperatura del agua óptima para el desarrollo de los huevos y la sobrevivencia de los individuos juveniles y adultos, es entre 17 a 25°C. En invierno y en los días de verano muy cálidos, suele disminuir sus movimientos y descender a las capas más profundas de la columna de agua (Ringuelet, 1967). De acuerdo al consumo de oxígeno, es una de las especies con mayor demanda con un valor de referencia mínimo de 3,5-4 MG/L de oxígeno disuelto (Mancini & Grosman, 2008). Bajo condiciones naturales se caracteriza por presentar un crecimiento lento y si bien existen diferencias de acuerdo al ambiente, en promedio mide de 16-18 cm de longitud total al año de vida. Los mayores registros de longitud total y peso de esta especie en Argentina son de 74 cm y 5,2 Kg. (Mancini & Grosman, 2008). La alimentación del pejerrey está compuesta por un amplio rango de ítems alimenticios, con tres patrones estacionales: en verano micrófagos, macrófagos en invierno y de manera intermedia a las dos situaciones anteriores en otoño y primavera. Cuando el zooplancton, que es su principal ítem, escasea, consume macrozooplancton (cladóceros y copépodos). En ambientes híper eutróficos consume algas, principalmente cianofíceas o cianobacterias. Se observaron también restos de vegetación y ocasionalmente gasterópodos (*Heleobia parchappei*), camarones (*Palaemonetes argentinus*), larvas de insectos y artrópodos que caen al agua (Ringuelet, 1942, Mancini & Grosman, 2008).

## Zona de estudio:

Las investigaciones de este trabajo de tesis se centralizaron en dos cuerpos de agua: cuerpos de agua continentales, como las lagunas Cochicó y Alsina, que forman parte de las Lagunas Encadenadas del Oeste situadas en la provincia de Buenos Aires y un ambiente marino costero: el estuario de Bahía Blanca.

El sistema de Lagunas Encadenadas del Oeste (Figura 2) está formado por cinco lagunas principales: Alsina, Cochicó, del Monte, del Venado y Epecuén, ubicadas entre los paralelos 36° 30' y 37° 30' S y los meridianos 61° 00' y 63° 30' O (Schwerdt & López Cazorla, 2009). Es una cuenca endorreica con una superficie que varía entre 35.000 y 58.000 ha, como consecuencia de las grandes diferencias de precipitaciones y evaporación entre años sucesivos, que afectan directamente el nivel de agua de las lagunas y producen fuertes bajantes o inundaciones (López et al., 2001; Quiros, 2002). Además, se distinguen por su marcado gradiente de salinización hacia el oeste (López et al., 2001)

La ictiofauna está compuesta por las siguientes especies: *Cyprinus carpio*, *Cyphocharax voga*, *Hoplias malabaricus*, *Oligosarcus jenynsii*, *Galeocharax humeralis*, *Salminus maxillosus*, *Astyanax eigenmanniorun*, *Bryconamericus iheringi*, *Hyphessobrycon anisitsi*, *Cheirodon interruptus*, *Loricarichthys anus*, *Corydoras paleatus*, *Rhamdia quelen*, *Odontesthes bonariensis*, *Jenynsia multidentata*, "*Cichlasoma*" *facetum*, *Cnesterodon decenmaculatus*, *Parapimelodus valenciennis* (Schwerdt & López Cazorla, 2009)

Ictiogeográficamente pertenecen a la Provincia Parano-Platense del Dominio Paranense, subregión Brasílica.

El estuario de Bahía Blanca (figura 1, 3, 4) está localizado en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires entre los 38°44'-39°27' Latitud Sur y 61°45'-62°30' Longitud Oeste. Abarca aproximadamente 3000 Km<sup>2</sup> de superficie (Melo, 2004).

Presenta dos zonas definidas: una interna y otra externa. La zona interna, comprendida entre Ingeniero White y Villarino Viejo, está condicionada por el aporte fluvial del río Sauce Chico y el arroyo Napostá Grande. En esta zona la salinidad es baja en invierno (<19 ppm) y alta durante el verano (>40 ppm). La zona externa del estuario, desde Puerto Belgrano hasta la boca, se caracteriza por un mayor intercambio de agua con el mar adyacente y por variaciones de salinidad menos importantes (31-36 ppm) (Freije et al., 1981; Piccolo & Perillo, 1990).

Su configuración regional se caracteriza por una red de canales de diversas dimensiones, generalmente de tipo divagante y meandroso. Presenta numerosos islotes de relieve plano y escasa altitud y amplias llanuras de fango y arena que se cubren periódicamente con las pleamares (Aliotta & Lizasoain, 2004). La profundidad media es de 10 metros aunque en la boca suele alcanzar los 22 metros. Los canales en bajamar delimitan extensas planicies de marea que ocupan 1.150 km<sup>2</sup> con parches de marismas bajas e islas, entre las cuales se destacan Isla Bermejo, Trinidad, del Embudo, Wood (o del Monte) y Ariadna, que en conjunto representan unos 410 km<sup>2</sup> (Perillo et al., 2001).

El estuario está afectado por vientos durante todo el año con predominancia del sector N y NNO y en menor escala desde el S y SO. Los vientos preponderantes son los de mayor intensidad (velocidad promedio 5 m. s<sup>-1</sup>) y frecuencia, fluyen paralelos a los canales mayores afectando de manera considerable la circulación y la mezcla

vertical de aguas. La temperatura media anual de superficie es de 13°C variando entre 21,6°C en verano y 8,5°C en invierno (Píccolo & Perillo, 1990).

Este estuario, al igual que otras áreas protegidas y costeras, cumple una función especial en la biología de los peces, al comportarse como un área de alimentación y de cría (López Cazorla, 2004).

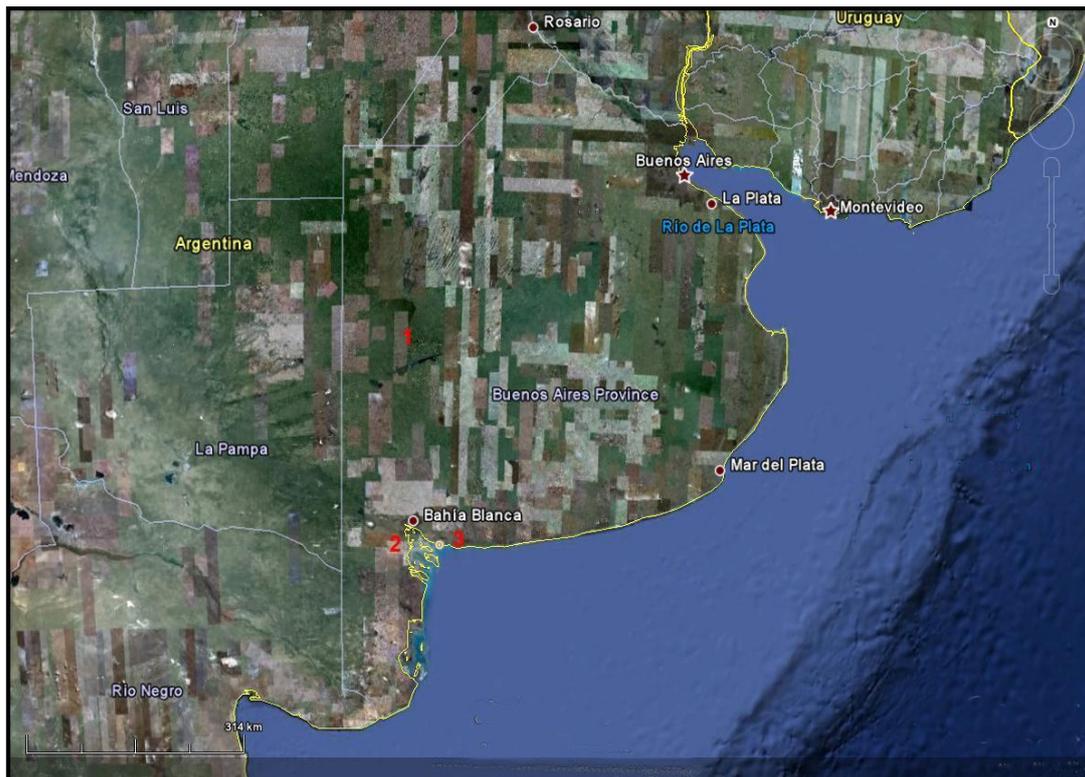


Figura 1: Imagen satelital de la provincia de Buenos Aires, indicando (en rojo) los sitios de muestreo: 1 Lagunas Encadenadas del Oeste, 2 Estuario de Bahía Blanca y 3 Puerto Belgrano, Punta Alta.



Figura 2: Imagen satelital del sitio de muestreo 1: Lagunas Encadenadas del Oeste, Provincia de Buenos Aires, Argentina.



Figura 3: Imagen satelital del sitio de muestreo 2: Estuario de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires, Argentina.



Figura 4: Imagen satelital del sitio de muestreo numero 3: Puerto Belgrano, Punta Alta, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Indicando con una estrella lugar de toma de muestras.

Hasta aquí se caracterizaron los hospedadores y las zonas donde se realizaron las capturas de los mismos a fin de establecer el potencial zoonótico de las especies parásitas encontradas en ellos. A continuación se aborda el estudio de las larvas de anisákidos, sus sitios de localización en el hospedador y la forma en que las mismas pueden ser detectadas.

### **Localización de las larvas en los hospedadores:**

Dentro de la cavidad abdominal, la localización de las larvas es variable pudiéndose hallar en la superficie hepática, entre los mesenterios, las gónadas o en la submucosa del tubo digestivo, generalmente encapsuladas (Smith & Wootten, 1978). Se observan más frecuentemente larvas de anisákidos en la cavidad abdominal libres, enrolladas en espiral y a veces rodeadas por una cápsula (Petersen et al., 1993, Guagliardo et al., 2009).

Numerosos autores describieron la presencia de larvas de anisákidos encapsuladas en la musculatura del pescado y entre ellos, Smith & Wootten (1975) propusieron que la migración larval se debe a cambios fisicoquímicos en las vísceras y a un probable incremento en la temperatura en el interior de los peces. Existen otros trabajos sobre las posibles causas de la migración de estas larvas hacia la musculatura del pescado tras su captura. Para Cattán & Carvajal (1984) es probable que el comportamiento de los nematodos varíe en los diferentes hospedadores. Sus resultados mostraron que ni la temperatura de refrigeración ni un aumento en la temperatura ambiental afectan la migración víscero - muscular.

Huang (1990) describió la presencia de larvas en la musculatura ventral del pescado. Un estudio realizado por Deardorff & Throm (1988) confirmaron que se encuentran mayor número de anisákidos en la musculatura ventral que en la región posterior del pez estudiado. Además los autores encontraron mayor cantidad de parásitos en las rodajas del pescado ya que estas incluían dicha musculatura.

Smith (1984) remarcó la migración de las larvas hacia el músculo en especies de pescados llamados grasos como el jurel (*Trachurus* sp.) y el arenque (*Clupea harengus*), en los cuales el almacenamiento de los lípidos se produce principalmente en el músculo, pero no en los peces no grasos como bacaladilla (*Micromesistius spoutassou*) o merlán (*Merlangius merlangus*) donde el almacenamiento ocurre principalmente en el hígado o en los mesenterios. Sin embargo, estudios realizados por Silva & Eiras (2003) no evidenciaron una relación entre la migración de *Anisakis* sp y el contenido graso en el músculo de los hospedadores estudiados.

Huss (1988) sostuvo que las prácticas de manipulación durante la pesca incluyendo el enfriamiento por diversos métodos, no influirían en la proporción de migración desde las vísceras hasta el músculo o viceversa. No obstante, Hauck (1977) observó en un trabajo realizado en *Clupea harengus pallasii*, arenque del Pacífico, que el tiempo entre la captura y el procesado así como la exposición de las larvas a las temperaturas de ahumado y a las salmueras, estimularían las migraciones de las larvas.

Los métodos propuestos que llevan a matar el estadio larvario de los anisákidos son numerosos. Entre ellos se encuentra el citado por el mismo autor (Hauch, 1977), quien se basó en método de congelamiento de pescado durante un determinado tiempo efectivo. Deardorff & Throm (1988) utilizaron un método por túnel de congelación rápida sobre filete y rodajas de salmón (*Oncorhynchus nerka*) y gallineta nórdica (*Sebastes pinniger*). Observaron su efectividad con la aplicación de -35° C durante 15 horas. Sin embargo, Saad & Luque (2009) hallaron en la musculatura lateral de *Pagrus pagrus* larvas de *Anisakis* sp., *Contracaecum* sp. e *Hysterothylacium* sp. Se evidencia que el método de congelamiento rápido, utilizado en el momento de la captura, no fué una buena medida preventiva para evitar la migración de los nematodos.

Por lo tanto, no está del todo claro cuándo y bajo qué condiciones y en qué especies de peces ocurre la migración de las larvas de nematodos hacia la musculatura de los peces.

Las temperaturas de refrigeración no mataron las larvas, éstas son sensibles a las temperaturas de congelación -20° durante 24 horas así como al calentamiento a 55° durante 1 minuto (Huss, 1997)

Adams et al. (1999) plantearon dañar la cutícula de los nematodos, que los hace resistentes para sobrevivir a los ácidos y enzimas digestivas de los mamíferos, mediante el uso de microondas aplicando 65° C o 77° C (según el tamaño del filete). Audicana & Kennedy (2008) propusieron cocinar en microondas a temperatura >74° por un tiempo mayor a 15 segundos.

En los ahumados fríos donde la temperatura del filete no supera los 40° C las larvas pueden mantenerse vivas (Smith & Wootten, 1978).

Las larvas que se encuentran en el pescado en salmuera y en escabeche, pueden sobrevivir 10 días a una concentración de sal del 6%. Cuando se incrementa la concentración de sal en un 8-9 % el tiempo de supervivencia puede reducirse a 5-6 semanas. Una concentración de de sal al 10% suele ser letal para los nematodos (Karl et al., 1994, Arcangeli et al., 1996, Huss, 1997).

El empleo de diferentes dosis de radiación gamma tampoco fue un método eficaz para garantizar el consumo seguro de pescado (Santo Padovani et al., 2005)

Larvas de los géneros *Anisakis*, *Contracaecum*, *Hysterothylacium* y *Pseudoterranova* obtenidas de especies de peces del Mar Argentino no sobrevivieron a temperaturas de freezado entre -18°C y -22°C por un período de 24 horas. *Anisakis* sp. no resistió en horno microondas a 600 watts de potencia, ni temperaturas por encima de los 75,56 °C, tampoco a la salmuera durante 16 horas, en tanto que los géneros *Contracaecum*, *Hysterothylacium* y *Pseudoterranova* no sobrevivieron a la salmuera más de una hora (Lanfranchi & Sardella, 2010)

Las normas de prevención de parasitosis están previstas desde hace tiempo en la Comunidad Europea. El Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea en la Directiva 91/493/CEE del Consejo, de 22 de julio de 1991 fijaron las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros. El 29 de abril de 2004, por Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, establecieron normas

específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Este reglamento prevé la obligación de congelar los productos de la pesca para consumir peces crudos o prácticamente crudos, incluso en el comercio al por menor (que abarca a los establecimientos que sirven comida), marinada en el caso de ahumados, escabeches y salazones. El 5 de diciembre de 2005 por su parte el Reglamento (CE) n° 2074/2005 de la Comisión estableció normas detalladas que recaen sobre los operadores de empresas alimentarias relativas a las inspecciones visuales para detectar parásitos en los productos de la pesca. Allí se establecieron normas detalladas relativas a las inspecciones visuales para detectar parásitos en los productos de la pesca. Además se definió el concepto de «Parásito visible»: parásito o grupo de parásitos que tienen una dimensión, color o textura que permiten distinguirlo claramente de los tejidos del pez. Otros términos definidos son: Inspección visual e Inspección al trasluz.

En el puerto de Bahía Blanca las empresas exportadoras se ajustan y adoptan los acuerdos de la Unión Europea (Dr. Juan Pablo Cáceres, Jefe de Pesca del Senasa Bahía Blanca- comunicación personal-)

### **Métodos de detección en el pescado:**

La mayoría de los métodos utilizados exigen destruir o fragmentar los productos de la pesca. Clásicamente se utilizan los siguientes métodos:

- Examen visual simple.
- Transiluminación.
- Digestión por jugo gástrico artificial.

— Examinación UV

Y recientemente:

— PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

### **Examen visual simple:**

Es un examen no destructivo de los peces o productos de la pesca, realizado con o sin un medio óptico de aumento y en buenas condiciones de iluminación para el ojo humano. Consiste en la búsqueda directa de las larvas en la superficie de las vísceras, mediante la utilización de tijeras y pinzas (Huang, 1990, Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea, anexo III, sección VIII, capítulo II, punto 4, del Reglamento (CE) no 853/2004).

### **Transiluminación:**

También llamada Inspección al trasluz o Candling se utiliza en el caso de pescado plano o filetes de pescado. Consiste en la observación del pescado sostenido frente a una fuente luminosa en una habitación a oscuras para detectar parásitos. Díaz Estruch (1992) describió las mesas iluminadas como un tablero transparente sobre el que se coloca el filete de pescado y donde recibe iluminación mediante lámparas de luz blanca fría de 1500 lux. Así las larvas se distinguen como nódulos más oscuros. Este método no es muy efectivo en filete de espesor mayor a 0.5 cm. Cuando el filete es de 1 cm sólo se ven representantes de ciertos géneros de anisákidos (Huang, 1990). Levsen et al.

(2005), realizaron un estudio de esta metodología y concluyeron que no es un método muy efectivo para detectar nematodos en el filete.

En el puerto de Bahía Blanca actualmente se implementa esta metodología de transiluminación mediante efectos de luz, desde abajo o desde arriba (Dr. Juan Pablo Cáceres, Jefe de Pesca del Senasa Bahía Blanca-comunicación personal).

### **Digestión por jugo gástrico artificial:**

La digestión enzimática es un método corriente para recuperar las larvas de nematodos de los tejidos de distintas especies hospedadoras como mamíferos, reptiles, gastrópodos (Agoulon et al., 2001) y peces (Smith & Wootten, 1975, Huang, 1988, Deardorff & Throm, 1988, Deardorff & Kent, 1989; Adams, 1999).

La investigación de los nematodos anisákidos en el músculo por digestión la describió la U.S Food and Drug Administration y otros autores, pudiendo presentar pequeñas variaciones en las proporciones que se utilizan en el método. Principalmente consiste en una solución salina de PH=2 en donde se incorpora pepsina y se trabaja en un rango de temperatura ( $37 \pm 0.5$  °C) (Deardorff &Throm, 1988, Agoulon et al., 2001, U.S Food and Drug Administration, 2001).

### **Examinación Ultra violeta (UV)**

Este método es recomendado por la U.S. Food and Drug Administration (2001) para examinar la carne de pescado más oscura. Se debe realizar en una

habitación oscura y si es necesario se debe retirar la piel del filet. Se examina cada parte en ambos lados con luz ultravioleta de onda larga reflejada (366 nm de longitud de onda). Los parásitos emiten fluorescencia azul o verde bajo la luz de esta longitud de onda. Las espinas de pescado y los tejidos conectivos, que también presentan fluorescencia azul, pueden diferenciarse por su distribución y por la forma regular.

Se debe tener precaución en no exponer nunca los ojos sin protección a los rayos UV, ya sea directa o reflejada. Se deben utilizar anteojos con lentes de óxido de uranio, gafas de soldadores, etc. Cuando tales radiaciones están presentes se debe cuidar la exposición de la piel a las radiaciones UV (Bier et al., 2012)

El procedimiento de examinación a trasluz se aplica al pescado fresco o congelado de carne blanca procesada como filetes, lomos, trozos o pescado picado. El procedimiento de la luz ultravioleta (UV) se implementa para el pescado de carne oscura (U.S Food and Drug Administration).

### **PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

Es un método que se desarrolló recientemente en ésta área como consecuencia del aumento en las reacciones alérgicas ocasionadas por *Anisakis* sp. y/o *Peudoterranova* sp. incorporados a través de la alimentación. Es un método altamente específico y sensible con una detección de 40 ppm de parásitos por 25 gramos de muestra. Puede utilizarse para material fresco o procesado (EFSA European Food Safety Authority, 2010). Se reportaron

reacciones alérgicas en pacientes hipersensibles que consumieron carne de pollo alimentado con carne de pescado (López & Pardo, 2010). Los nueve tipos de alérgeno de *Anisakis sp* descubiertos hasta el momento tienen la capacidad de atravesar la barrera digestiva y de ser altamente resistentes a procesos de cocción y a tratamientos con pepsina (Armentia et al., 2006). El objetivo principal de esta metodología es permitir el monitoreo de los niveles de contaminación con larvas de nematodos en los filetes de pescado y en sus productos derivados (Mossali et al., 2010).

Con los antecedentes planteados hasta aquí y con el fin de observar qué sucede con los peces examinados en el marco de la presente tesis se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

**H3:** los recursos pesqueros pescadilla, pejerrey de laguna y pejerrey de mar, están altamente parasitados por larvas de *Contracaecum spp.* e *Hysterothylacium spp.*

**H4:** las larvas de *Contracaecum spp.* e *Hysterothylacium spp.* parásitas de los recursos pesqueros citados migran activamente hacia la musculatura estriada de los peces.

El capítulo tiene como objetivos:

— Determinar la abundancia media, prevalencia e intensidad media parasitaria de *Contracaecum spp.* e *Hysterothylacium spp.* en diferentes especies de peces

comúnmente destinadas al consumo humano en Argentina (pescadilla, pejerrey de laguna, pejerrey de mar) que habitan el área de estudio.

- Evaluar la capacidad miotrópica de los estadios larvales (L3) de *Contracaecum* sp. e *Hytherothylacium* sp. en peces destinados al consumo humano.
- Evaluar la capacidad migratoria de los estadios larvales (L3) de *Contracaecum* sp. en el pez *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) (Cyprinodontiformes, Anablepidae) (nv: madrecita).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Toma de muestras:

Las especies de pescado seleccionadas pertenecen a blancos de capturas comunes dentro de las lagunas Cochicó y Alsina, para cuerpos de agua dulce y al Estuario de Bahía Blanca. Se consideró el criterio de consumo humano debido a que el estudio empleó especímenes procedentes de actividad de pesca deportiva en dichas zonas y por la exposición potencial de los pescadores a la carne cruda de los pescados, como un importante factor de riesgo.

Se recolectó entre los años 2009-2011 un total de 307 ejemplares de pescado fresco de las siguientes especies:

- Pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*) (112).
- Pejerrey de mar (*Odontesthes argentinensis*) (105+80 vísceras provistas por pescadores deportivos).
- Pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*) (90).

Los ejemplares fueron capturados por pesca manual con caña y anzuelo, junto con algunos ejemplares de pescadilla y pejerrey de mar que fueron provistos por empresas pesqueras del puerto de Ingeniero White. El pescado no permaneció almacenado más de 8 o 9 horas, salvo el pejerrey de las lagunas que fue transportado al laboratorio 24 horas después de ser capturado. En las lagunas, las muestras fueron tomadas con redes de enmalle.

Las muestras fueron tomadas entre 2009-2011 Las fechas de muestreo se distribuyeron como se indica en las tablas I, II, III.

Tabla I: muestreos mensuales del año 2009:

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
<i>C. guatucupa</i>												
<i>O. argentinensis</i>												
<i>O. bonariensis</i>												

Tabla II: muestreos mensuales del año 2010:

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
<i>C. guatucupa</i>												
<i>O. argentinensis</i>												
<i>O. bonariensis</i>												

Tabla III: muestreos mensuales del año 2011:

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
<i>C. guatucupa</i>												
<i>O. argentinensis</i>												
<i>O. bonariensis</i>												

Previo a la evisceración de los ejemplares identificados individualmente, se tomó su talla y su peso (total y eviscerado) en centímetros y en gramos, respectivamente. Posteriormente, se examinó macroscópicamente la superficie cutánea, branquiales y oral. Posteriormente se procedió a la apertura de la cavidad abdominal en sentido cráneo-ventral desde el orificio cloacal hasta la base de los opérculos. Una vez expuesta la cavidad general se examinaron macroscópicamente las vísceras dispuestas en la cavidad celómica y mesenterios con el fin de localizar la presencia de larvas de nematodos.

Se calcularon los siguientes índices parasitológicos según Bush et al. (1997): Prevalencia (P): número de hospedadores infectados por una especie

parásita particular, dividido por el número de total de hospedadores examinados; se expresa en porcentaje. Intensidad media (IM): intensidad promedio de una especie particular de parásito entre los hospedadores infectados. Se calcula como el número total de parásitos/número de hospedadores infectados. Abundancia (A): número de parásitos de una especie particular en o sobre un hospedador sin tener en cuenta si el hospedador está o no infectado. Se calcula como el número total de parásitos/ número total de hospedadores examinados. Se comparó la prevalencia obtenida con otros autores que trabajaron en las mismas especies hospedadoras (Morales & Pino, 1987).

Se extrajeron las vísceras y se procedió a la apertura del tubo digestivo para su posterior observación bajo lupa estereoscópica. Además se tomaron muestras de la musculatura ventral, dorsal y lateral del pez en cuestión. Los nematodos recolectados se fijaron y conservaron en alcohol 70°.

Finalizada la exploración visual de la musculatura. Se procedió a su digestión enzimática artificial. La solución digestora consistió en:

- Solución salina de ácido clorhídrico (PH=1-2).
- 10 gramos de Pepsina (1:10.000) por litro de solución salina.

En un vaso de precipitado se introdujo cada muestra de filet y la solución para digestión, en una proporción 1:2, respectivamente. Se incubó en baño termostático a una temperatura de 37° C por un período de cinco horas y se agitó regularmente el contenido con varilla de vidrio, con la finalidad de crear

condiciones similares a las del estómago humano. Transcurrida la digestión enzimática artificial, la muestra se observó bajo lupa estereoscópica.

### **Infestaciones experimentales en *Jenynsia multidentata*:**

Con el objetivo de observar migración larval en un modelo teleósteo en forma experimental se realizaron dos infestaciones de *J. multidentata* (madrecita). Las madrecitas fueron obtenidas de un estanque ubicado en un invernáculo aledaño a un establecimiento de cría comercial de rana toro, en Villa Bordeau, Partido de Bahía Blanca, que no tiene contacto hídrico con ningún cuerpo de agua natural, como tampoco contacto con cielo abierto por donde acceder aves al estanque, que pudiese aportar estadios infectivos de parásitos. En la primera infestación se utilizaron 8 madrecitas, que se inocularon cada una con 5 larvas L3 de *Contracaecum* sp., provenientes de *C. guatucupa*. En una segunda infestación se inocularon 4 madrecitas con 12 larvas cada una de *Contracaecum* sp. provenientes del *O. bonariensis*. Una muestra de madrecitas criadas en el citado estanque completamente aislado del medio exterior, fue examinada previamente a la infestación y en ningún caso se hallaron parasitadas. Las larvas fueron introducidas en la boca con una pipeta plástica. Si las larvas eran regurgitadas se las inoculaba nuevamente. Las madrecitas fueron colocadas en un acuario donde se las mantuvo hasta el día de la necropsia. En la primera infestación las necropsias se realizaron a los 3, 9, 24, 37 y 45 días PI (postinoculación). En la segunda infestación las necropsias se realizaron a 3, 7, 17, 24 días PI. Se examinaron los órganos internos, la cavidad

general y la musculatura para evidenciar la presencia de larvas y detectar una posible migración.

## RESULTADOS

En los 112 ejemplares (33 hembras, 60 machos y 19 individuos de sexo indeterminado) examinados de pescadilla de red (*C. guatucupa*) cuyas tallas y pesos totales fueron 45,31 (25,7-53,2) cm y 792,94 (415-1.496) g respectivamente, se recuperó un total de 622 nematodos, 84,6% asociado a los mesenterios y 15,4% en cavidad celómica. Del total de los nematodos, 499 correspondieron al género *Contracaecum* con abundancia de 4,44, prevalencia 57,1% e intensidad promedio de 7,78. Al género *Hysterothylacium* correspondieron 123 nematodos con una abundancia de 1,09, prevalencia 28,5% e intensidad promedio de 3,84.

En los gráficos 1 y 2 se muestra la distribución en el número de larvas halladas de *Contracaecum* sp. e *Hysterothylacium* sp., respectivamente, a lo largo de los años muestreados.

Se extrajo por ejemplar un promedio de 58,27 g de filet que constituyó un total de 3.479,25 g de filetes examinados.

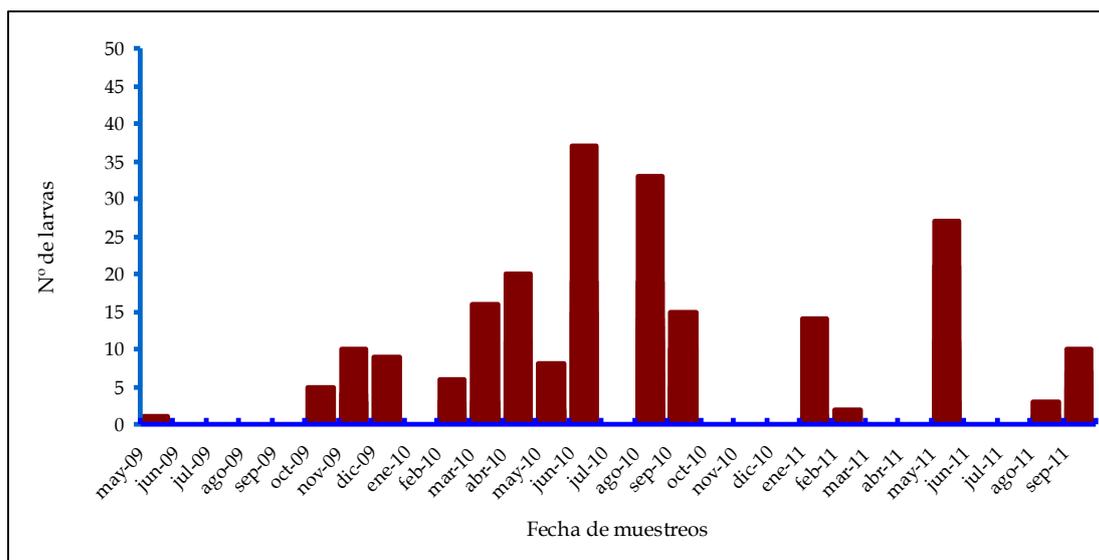


Gráfico n° 1: Indica el número de larvas encontradas de *Contracaecum* sp. en *C. guatucupa* en los meses que se realizó muestreo.

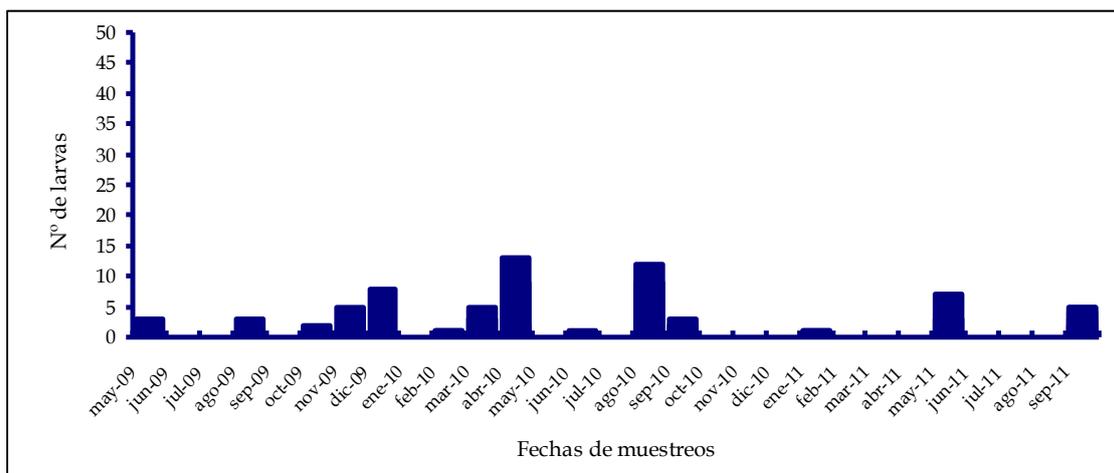


Gráfico n° 2: Indica el número de larvas encontradas de *Hysterothylacium* sp. en *C. guatucupa* por fecha en que se realizó el muestreo.

Los ejemplares de *O. argentinensis* (pejerrey de mar) tuvieron una talla y peso total de 28,37 (16,5-40,1) y 196,84 (34,4-516), respectivamente. Se encontraron 25 individuos del género *Contraecum* en 105 ejemplares, 16 de los cuales estuvieron parasitados. La abundancia fue de 0,23, prevalencia de 15,23% e una intensidad promedio de 1,56. En el gráfico 3 se muestra la distribución del número de larvas halladas a lo largo de los años muestreados. Se analizaron 1.327,1 g de filet. El promedio recolectado de filet por pez fue de 18,43 g.

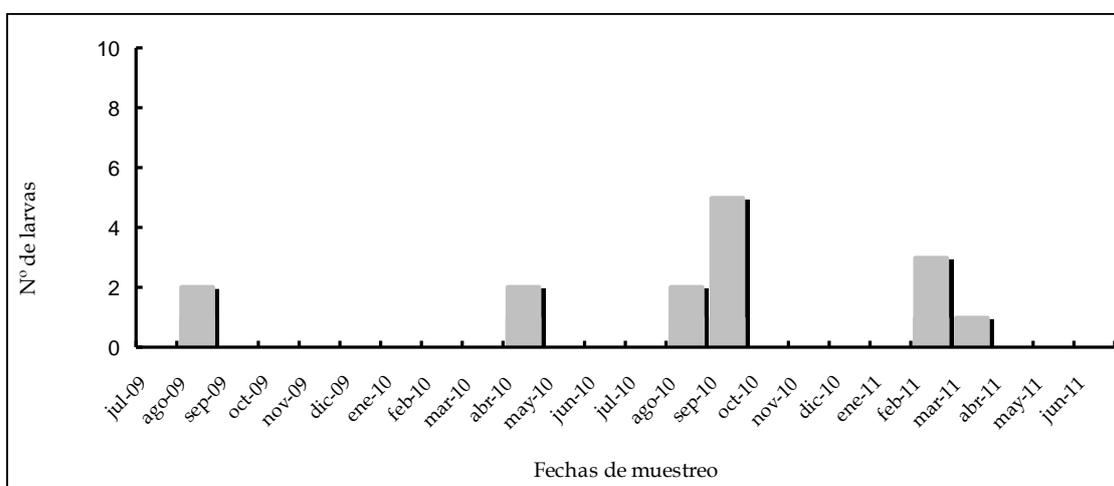


Gráfico 3: Indica el número de larvas encontradas de *Contraecum* sp. en *O. argentinensis* por fecha en que se realizó el muestreo.

De los 90 ejemplares de *O. bonariensis* (pejerrey bonaerense) cuyos pesos y tallas respectivos fueron 30,7 (21,5-36,5) cm y 233,36 (88-379,3) g se obtuvo un promedio de 27,4 grs. de filet/pez para digestión enzimática artificial que significó un total de 1.754,9 g de musculatura esquelética. Se recolectó un total de 643 nematodos pertenecientes al género *Contracaecum* cuyo porcentaje de localización fue en cavidad celómica (5,51%), adheridos a los mesenterios (98,05%) y musculatura (0,81%).

Del total de peces examinados solo 17 no registraron ningún parásito. La abundancia, prevalencia (%) e intensidad media de *Contracaecum* sp. fueron 7,7, 79,5 y 9,74, respectivamente. En el gráfico 4 se muestra la distribución en el número de larvas registradas a lo largo de los años muestreados.

En el total de filetes examinados de todos los hospedadores mencionados anteriormente, sólo se encontraron 4 nematodos en *O. bonariensis* (Figura 7 y 8).

La determinación de estas se llevó a cabo mediante microscopía óptica y se tuvo en cuenta las características del ciego intestinal, apéndice ventricular y posición de poro excretor.

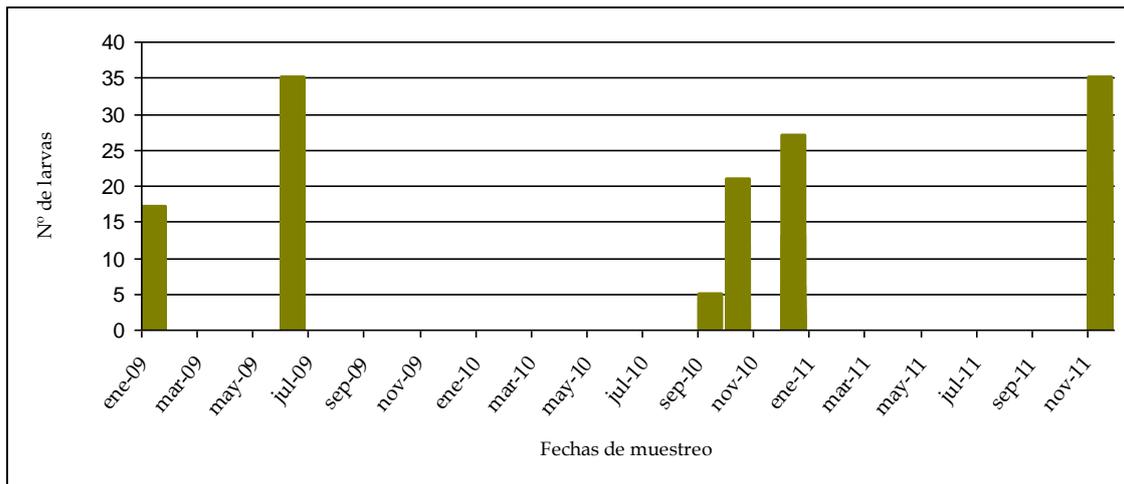


Gráfico 4: Indica el número de larvas encontradas de *Contracaecum* sp. en *O. bonariensis* por fecha de muestreo.

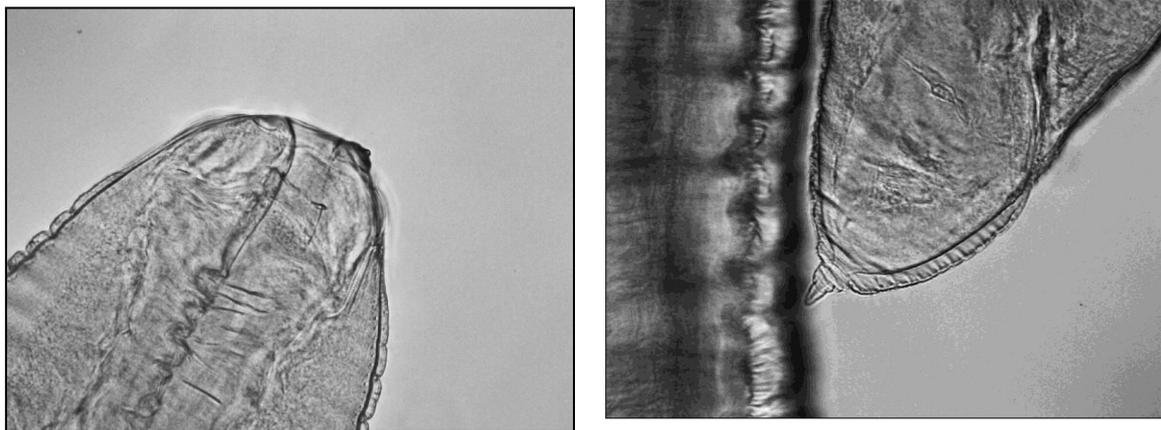


Figura 7 y 8: Extremos anterior y posterior, respectivamente, de una larva de *Contracaecum* sp. encontrada en musculatura de *O. bonariensis* (40X).

Al realizar la necropsia de *J. multidentata* infestadas con larvas L3 de *Contracaecum* sp. obtenidas de *C. guatucupa* y de *O. bonariensis*, no se observaron larvas en el examen de ningún de los órgano interno, ni tampoco en la cavidad general. Al realizar la prospección de la musculatura dorsal y lateral tampoco se observó ninguna larva.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo en relación con la abundancia, la prevalencia y la intensidad media, tanto de *Contracaecum* sp. como de *Hysterothylacium* sp. en *Cynoscion guatucupa*, pueden ser comparados con los estudios realizados por Guagliardo (2003), Tanzola & Guagliardo (2004) y Timi et al. (2005).

Los valores de abundancia e intensidad media para *Contracaecum* sp. e *Hysterothylacium* sp. hallados por Guagliardo (2003) y Tanzola & Guagliardo (2004) son similares a los hallados en el presente trabajo, sin embargo se observó una disminución en la prevalencia. Al realizar la comparación entre las prevalencias, la prueba estadística demostró diferencias altamente significativas ( $Z = 5.74$ ;  $p < 0,001$ ) para *Contracaecum* sp. en tanto para *Hysterothylacium* sp. no presentó diferencias ( $Z = 1.62$ ;  $p > 0.05$ ).

Estos resultados estarían evidenciando cambios en el ambiente que pueden afectar los estadios de vida libres o la disponibilidad de hospedadores intermediarios de ambos géneros de anisákidos. Si bien la transmisión parasitaria de ambos géneros en la región no es conocida en etapas tempranas, varios autores mencionan que los copépodos serían principalmente los transmisores de la L3 y en menor medida eufáusidos, anfípodos y quetognatos. (Dziekonska-Rynko et al., 2008, Koie & Fagerholm, 1995, Moravec, 2009).

Un estudio comparativo del período 1979-1980 con respecto al período 1990-1991 realizado en el estuario de Bahía Blanca mostró variaciones en la

estructura y en la composición del zooplancton, algunas de cuyas especies constituyen ítems alimenticios de la pescadilla. Estas variaciones fueron provocadas principalmente por el dragado o por la introducción de nuevas especies del zooplancton por el agua de lastre (Hoffmeyer, 2004). Uno de los cambios importantes observados en la composición de zooplancton en este estudio fue la disminución en la frecuencia y abundancia de *P. petrunkevitchi* el alimento principal en la dieta de la pescadilla. Otros ítems importantes también mostraron cambios, un aumento en la frecuencia y abundancia del quetognato *S. friderici* y de los misidáceos *Arthromysis magellanica* y *Neomysis americana*.

Al ser el estuario relativamente poco profundo, la interacción entre el bentos y el plancton es muy importante. Las actividades de dragado que afectan el bentos podría también afectar el plancton. Por lo tanto, las comunidades del zooplancton son un reflejo de cómo el medio ambiente se está alterando y cómo van variando los recursos naturales, ya sea por cambios naturales o provocados por el hombre a nivel local (Hoffmeyer, 2004). Según informes del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO) la salinidad en el estuario de Bahía Blanca fue superior a la registrada años anteriores 32,54 ups (Agosto de 2008) - 41.53 ups (Abril 2009) debido a la ausencia de lluvias; ésto sería un factor clave en la supervivencia de las larvas libres. Si bien la cutícula les proporciona cierta protección a los helmintos no lo hace frente a cambios abruptos de la salinidad (Pietrock & Marcogliese, 2003). Otro factor que afectaría a los nematodes (huevos o estadios libres) son la temperatura y el pH (Pietrock & Marcogliese, 2003). Según informes del IADO, se registraron temperaturas ligeramente

superiores a las anteriores que si bien no representan diferencias significativas son importantes destacarlas porque estarían indicando un leve calentamiento del sistema. En cuanto al pH, se observó que también aumentó con respecto a registros anteriores. Un trabajo realizado por Dziekońska-Rynko et al. (2014) indica que frente a condiciones extremas de temperatura, los invertebrados bentónicos serían el principal reservorio de huevos de *C. rudolphii*. Por lo tanto los efectos que afectan al bentos y en consecuencia al plancton y el cambio de los parámetros físico-químicos del estuario influirían en el desarrollo natural del ciclo de vida de algunos nematodos.

Timi et al. (2005) estudiaron el ensamble parasitario de *C. guatucupa* en la zona de Mar del Plata, hallando larvas de *Contracaecum* sp. e *Hysterothylacium* sp. Los autores no presentan descripciones morfométricas de las larvas, como se mencionó previamente, concluyen que la población de *C. guatucupa* de la zona común de pesca Argentina - Uruguay y del Rincón serían poblaciones diferentes. En nuestro trabajo se compararon las prevalencias parasitaria de las larvas de *Contracaecum* sp. y de *Hysterothylacium* sp. en las pescadillas de las zonas mencionadas con las del estuario. Se observó que ambas metapoblaciones de nematodos presentan diferencia espaciales (*Contracaecum* sp.  $Z=6,81$ ;  $P<0.001^{**}$  e *Hysterothylacium* sp.  $Z=51.6$ ;  $P<0.001^{**}$ ). Estas variaciones encontradas responderían a diferentes condiciones ecológicas de ambas zonas, así como a la disponibilidad circunstancial de ítems tróficos de la pescadilla.

Como indican Cardelli et al. (2006), los misidáceos *Arthromysis magellanica* y *Neomysis americana* (Smith) forman parte de la dieta de varias

especies de peces del estuario entre ellas el pejerrey (*Odontheistes* spp.), y la pescadilla de red. Por lo tanto en, *O. argentinensis*, sucedería algo similar a lo planteado para *C. guatucupa*. En este caso, hubo cambios en la prevalencia de *Contracaecum* sp. a lo largo de estos años ( $Z=10.93$ ;  $p<0.001$  \*\*) con respecto a los valores tomados por Sanhueza (2002).

En relación con los valores obtenidos para la especie *O. bonariensis* de las lagunas Cochicó y Alsina pertenecientes al sistema de las Encadenadas del Oeste y en comparación con lo aportado por Tanzola et al. (2009), se hallaron diferencias significativas en la prevalencia ( $Z=13.06$ ;  $p<0.001$ \*\*) que se atribuirían al tamaño muestral desbalanceado (15 ejemplares en Laguna del Monte frente a 90 en lagunas Cochicó y Alsina).

El comportamiento migratorio de las larvas de anisákidos sería diferente entre las especies de esta familia y también dentro de un mismo rango geográfico (Suzuki et al., 2010). El mayor número de antecedentes bibliográficos sobre la migración larval y estudios experimentales corresponde a los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova*.

El aporte realizado en el presente trabajo permitió evaluar la migración de las larvas de los nematodos *Contracaecum* sp. e *Hysterothylacium* sp. en tres hospedadores de importancia para el consumo humano. Sólo en *O. bonariensis* se hallaron larvas de *Contracaecum* sp. invadiendo el filet o la musculatura del pez. Esta migración al músculo ocurriría *in vivo* de manera natural, cuando los peces son capturados, con larvas invadiendo la musculatura. Karl et al. (2011)

demonstraron en *Oncorhynchus keta* y *O. nerka*, altas intensidades y prevalencias de *Anisakis* sp. en la musculatura, principalmente hipaxial y bajas en la cavidad en el momento de la captura, indicando, según los autores, una migración *in vivo* hacia la musculatura luego de la ingesta de los nematodos por la alimentación o durante las primeras etapas del ciclo de vida de los hospedadores. A similar conclusión llegaron Herreras et al. (2000) en *Merluccius hubbsi*. La migración de *Anisakis* sp. y de *Pseudoterranova* sp. hacia la musculatura ocurrió previo a su captura, ya que fueron rápidamente eviscerados luego de esta. Podría entonces plantearse una hipótesis causal denso dependiente donde a mayor cantidad de larvas en la cavidad visceral, mayor probabilidad de migración al músculo, tal vez por desplazamiento de los vermes buscando mejores condiciones.

Como indicó Tanzola (2011), la migración también respondería a señales presentes en la musculatura de los peces que han sido decodificadas por las larvas.

Smith & Wootten, (1975) y Smith, (1984) postularon que la migración larval de anisákidos hacia los tejidos estaría influenciada por cambios fisicoquímicos tales como la temperatura en el interior del cuerpo de los peces o el contenido graso almacenado en el hígado. En *O. bonariensis* el procesado y eviscerado se realizó 24 horas después de su captura y en algunos casos con mayor demora. Hasta ese momento, la conservación se realizó en frío pero a temperaturas que no bajaron de los 10°C. En cambio para *C. guatucupa* y *O. argentinensis* no transcurrieron 24 horas y cuando se demoró el muestreo el

material fue conservado en cámaras de frío a 4 °C y rápidamente eviscerado. Esto explicaría en parte la presencia de las larvas en el examen de filet.

Una distribución asimétrica de las larvas L3 de *Anisakis* sp. y de *Pseudoterranova* sp. fue comunicada por Smith & Hemmingsen (2003) en *Gadus morhua* L. La posición del hígado en la cavidad del cuerpo del pez y la predilección por este órgano, incidirían en la migración de los nematodos.

Si bien el método de transiluminación es recomendado para la visualización de las larvas de nematodos en las plantas de producción pesquera, Levsen et al. (2005) revelaron que solo el 7 - 10% de larvas en filetes puede ser detectado mediante este método. En el ámbito de la investigación, es más efectivo el método de digestión artificial seguido de la visualización con luz ultravioleta. Por esta razón se afirma que en este trabajo y como consecuencia del método de visualización empleado no sólo se utilizó el método correcto, si no también que se observó el número real de larvas presentes en el filet.

Los resultados de la infestación experimental directa de larvas L3 de *Contracaecum* sp. obtenidas de *C. guatucupa* en *J. multidentata* coincidirían con lo observado en el análisis de filetes, donde no hubo migración. Otros antecedentes en este tema demostraron que fue posible una infestación directa con larvas de tercer estadio específicamente de *Contracaecum rudolphii* en *Cyprinus carpio* (Dziekonska-Rynko & Rokicki, 2007, Moravec, 2009). En su trabajo, Dziekonska-Rynko & Rokicki, inocularon aproximadamente 5000 larvas, y encontraron a los 14 días solo 2 en la cavidad del cuerpo.

## CAPITULO III

### Infestación experimental en modelo murino



---

## INTRODUCCIÓN

---

Las infestaciones con nematodos parásitos gastrointestinales son muy comunes y contribuyen significativamente a la morbilidad y a la mortalidad de los humanos (Paterson et al., 2002). Se caracteriza por el desarrollo de respuestas inmunomodulatorias y por distintos tipos de alergias. Las respuestas de protección contra nematodos intestinales están asociadas con la producción de citokinas Th2 por las células T helper y en algunos casos por los basófilos, con altos niveles de anticuerpos IgE e IgG, con producción de citoquinas antiinflamatorias en particular la IL-10, mastocitos y eosinofilia, todas reacciones típicamente alérgicas y respuestas inmunes contra helmintos en los tejidos (Harnett & Harnett, 2006, Audicana & Kennedy, 2008). Aún no se determinó cuál de éstos mecanismos inmunes está implicado o asociado con la expulsión del parásito pero se plantea que estaría mediado por mastocitos (Audicana & Kennedy, 2008).

Uno de los principales atributos que poseen los parásitos es la especificidad hospedatoria. Aún cuando un parásito pueda desarrollarse en un variado número de especies hospedadoras, generalmente lo hará con mayor éxito en una o en dos que en el resto (Poulin, 2007). En la anisakidosis humana, el caso es peculiar ya que los parásitos no están adaptados a convivir con los humanos y la infestación es accidental. Una hora o menos posterior a la ingestión de la larva, la misma se adhiere a la mucosa gastrointestinal

provocando lesiones hemorrágicas. Entre las 4 horas a 6 días la larva ya penetró la mucosa y submucosa del hospedador y generó un infiltrado de eosinófilos mediante factores quimiotácticos. Entre los 7 a 14 días se produce la formación de un granuloma y transcurridos más de 14 días la larva muere persistiendo la inflamación y el granuloma (Ramakrishna & Burt, 1991, Audicana & Kennedy, 2008). Exámenes histopatológicos de anisakidosis gastrointestinal invasiva revelaron a las larvas embebidas en un denso granuloma eosinofílico en la mucosa, localizado como un tumor en la pared del estómago o en el intestino (Lymbery & Cheah, 2007). Más del 90% de los casos descritos son causados por una única larva (Ikeda et al., 1989).

Durante los últimos años, los estudios indicaron que los cambios en la patología de la anisakidosis ocurren junto al sitio del tracto gastrointestinal afectado (Audicana & Kennedy, 2008) estando la virulencia determinada por la susceptibilidad del hospedador accidental (Williams & Jones, 1994, Audicana & Kennedy 2008).

Perterguer & Cuéllar (1998) utilizaron un modelo murino, pero con 2 cepas diferentes: cepa BALB/c y cepa C57BL/10. Al inocularlos oralmente con larvas L3 de *A. simplex*, los autores observaron diferentes respuestas en cuanto a los tipos y concentraciones de inmunoglobulinas a lo largo de la infección, concluyendo que la variación se debió a las características fisiológicas e inmunológicas de ambas cepas utilizadas.

Muchos estudios con miembros del género *Contracaecum* e *Hysterothylacium* se realizaron en animales experimentales con el objeto de

establecer un modelo de estudio. Norris & Overstreet (1976) realizaron un estudio con dos tipos de larvas del género *Hysterothylacium* (Tipo MA y Tipo MB) recolectadas de *Trichiuris lepturus*. Estas larvas se introdujeron en el estómago de dos grupos de ratones, que fueron examinados posteriormente a intervalos de horas o de días, dependiendo del grupo. Los autores observaron que las larvas tipo MA murieron 2 horas postinoculación y no encontraron lesiones en el tubo digestivo. En cambio las larvas tipo MB, a las 12 horas postinoculación se encontraron adheridas a la mucosa asociadas con áreas hemorrágicas difusas. Estas mismas larvas en el segundo día postinoculación cesaron su movimiento y ya en el quinto día observaron lesiones hemorrágicas resueltas y elevaciones de la capa serosa en forma de cicatrices. Este mismo tipo de larva (MB) también causó lesiones hemorrágicas al ser inoculadas en el estómago de monos Rhesus (Overstreet & Meyer, 1981).

González (1998) infectó ratones con larvas L3 y L4 de *Hysterothylacium aduncum* provenientes de truchas de cultivo de Chile. Las larvas murieron rápidamente en los ratones que mantuvieron a temperatura ambiente pero sobrevivieron 18-22 hs postinoculación en los ratones muertos y refrigerados.

Otros trabajos de infección experimental realizados para evaluar el potencial zoonótico de las larvas, fueron realizados con miembros del género *Contraecium* en hospedadores como gatos domésticos (Vidal-Martínez et al., 1994) y conejos (Barros et al., 2004). Los mencionados autores observaron nematodos adheridos a la mucosa intestinal y en la pared gástrica, respectivamente.

En este capítulo se plantearon las siguientes hipótesis parciales:

H5: las larvas de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. provocan invasión de la mucosa digestiva en mamíferos.

H6: la invasión larval de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. provoca alteración en los parámetros hemáticos en mamíferos.

A los efectos de testear las hipótesis precedentes se establecieron los siguientes objetivos:

- Determinar el poder infectivo de las larvas de *Contracaecum* spp e *Hysterothylacium* spp halladas en los hospedadores estudiados sobre el modelo murino.
- Analizar el daño tisular de los estadios larvales.
- Analizar el efecto de la parasitosis sobre parámetros hemáticos en modelo murino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron larvas de *Contracaecum* e *Hysterothylacium* del pejerrey bonaerense (*Odontesthes bonariensis*) y de la pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*).

Se utilizaron para la infestación dos cepas de ratones, Balb/cAnN y CF1 de 2 meses de vida y con un peso de aproximadamente 25 g. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio bajo condiciones de temperatura controlada, entre 20 - 25°C, con períodos de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Se les suministró alimento en forma de pellet y agua potable libremente en frascos bebederos de vidrio. Ya que el ratón es un animal social, se los mantuvo siempre en grupos hasta que se lo necesitó aislar después del ensayo.

Las larvas fueron introducidas en el estómago de los ratones con una cánula de 15G que se encontraba sujeta a una jeringa de 5ml y/o con pipeta plástica. Se tomaron muestras de sangre de ratón pre y postinoculación, en éste caso la extracción se realizó minutos antes de proceder a la necropsia. Se confeccionaron extendidos sanguíneos que fueron teñidos con coloración de Giemsa y montados con bálsamo de Canadá sintético. Se observaron bajo microscopio óptico con objetivo seco X40. Se establecieron las fórmulas leucocitarias de cada extendido. Realizada la inoculación de las larvas se observó la materia fecal de los ratones durante las 24 hs postinoculación.

Transcurrido el tiempo de infestación los ratones fueron sacrificados mediante desmedulación por golpe traumático occipital. Se disecó y observó

bajo lupa estereoscópica el tubo digestivo en toda su extensión para localizar la fijación de las larvas. Se fijaron los órganos digestivos en formalina 10% y en glutaraldehído 2.5% (en frío). Para el primer caso, el material fue procesado utilizando técnicas histológicas de rutina. Se efectuó la deshidratación a través de una batería creciente de alcoholes (70°, 80°, 96°, alcohol etílico y butílico, alcohol butílico y en estufa se prosiguió con alcohol butílico- Paraplast) y se incluyeron pequeños trozos de tejido de 1 cm<sup>3</sup> de espesor en Paraplast. Se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor en micrótomos rotativos. A continuación se realizó la desparafinación, se hidrató el material y posteriormente se coloreó. Las técnicas de coloración fueron hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

Para estudiarlos con microscopio electrónico de barrido (Marca EVO 40), el material se fijó en glutaraldehído 2.5%, se lavó en buffer y se procedió a la deshidratación en acetona de 35°, 50°, 70°, 80°, 100°. Se realizó secado por punto crítico (Marca Polaroid) y posteriormente se metalizó con oro (Sputter coater, Marca Pelco 91000, 300 Å). Se observaron en SEM las larvas penetrando la mucosa intestinal y se fotografiaron.

#### **Eutanasia de los ratones empleados en experimentación:**

En virtud que a la fecha de realizar los experimentos de infestación en ratones (mayo 2009 – Abril 2010), el Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia no contaba con un CICUAE (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación) y tampoco se había promulgado la Directiva 2010/63 EU del Parlamento de la Comunidad Europea acerca de la protección de los animales usados para experimentación (22/09/2010), que

sirve como guía internacional para el trabajo con animales de experimentación, se deja constancia que la eutanasia de los animales fue realizada bajo el máximo cuidado profesional y técnico del personal a cargo del Bioterio departamental brindándoles el cuidado y bienestar necesarios a todos los ejemplares utilizados.

### **Infestaciones experimentales en aves (*Cairina moschata*, n.v. “pato criollo”)**

Se realizaron infestaciones con larvas de *Contraecum* sp (LCg y LOB) en ejemplares de 3 meses de vida, todos machos, con el objetivo de determinar el rol biológico de las aves en esta especie de nematode. Las larvas se inocularon con pipetas directamente en la cavidad bucal del pato. Otra forma de infección fue con larvas encapsuladas en el tubo digestivo de los peces estudiados. Transcurridos los días de infestación se realizó la desparasitación de los patos con Piperazina en una dosis de 10 grs /litro de agua, que fue suministrada en los bebederos. Posterior a cada infestación experimental se observaron muestras de materia fecal de cada pato. Por necropsia de cada una de las aves se examinó el tubo digestivo completo.

## RESULTADOS

Las infecciones en ratones se realizaron de la siguiente manera (se resumen en tabla 3):

En junio de 2009 se infectaron 3 ratones cepa CF1 con 5, 9 y 8 larvas de *Contracaecum* sp. pertenecientes a *O. bonariensis* (L3Ob). Un ejemplar de ratón se tomó de control. La necropsia del primer ratón se realizó 48 horas después de la inoculación de las larvas. La necropsia del segundo se realizó a los 5 días posteriores a la inoculación y la necropsia del tercer ratón infectado y el control se realizó a los 11 días posteriores a la inoculación. En ninguno de los casos se observaron larvas fijadas en el tubo digestivo o cicatrices provocadas por las mismas. La relación en la fórmula leucocitaria de los extendidos sanguíneos realizados pre y postinoculación no evidenció ningún cambio significativo.

En diciembre de 2009 se infectaron 4 ratones cepa CF1 con larvas provenientes de la pescadilla, *C. guatucupa* (L3Cg). En el primero se inocularon 12 larvas de *Contracaecum* sp. y una larva de *Hysterothylacium* sp. En el segundo ratón de igual cepa se inocularon 5 larvas de *Contracaecum* sp. En el tercer ratón se inocularon 10 larvas de *Contracaecum* sp. y una larva de *Hysterothylacium* sp. y en el cuarto ratón se inocularon 12 larvas de *Contracaecum* sp. y una larva de *Hysterothylacium* sp. La necropsia de los ratones se realizó a los 3, 10, 14 y 24 días postinoculación. En ninguno de los casos se observaron larvas fijadas en el tubo digestivo o cicatrices provocadas por las mismas. La relación en la fórmula

leucocitaria de los extendidos sanguíneos realizados pre y postinoculación no evidenció ningún cambio significativo.

En abril de 2010 se inocularon 2 ratones de cepa Balb/cAnN, con larvas provenientes de *C. guatucupa* (L3Cg). A un ratón se le inocularon 23 larvas de *Contracaecum* sp. y 5 larvas de *Hysterothylacium* sp. y al segundo ratón se inoculó con 18 larvas de *Contracaecum* sp. y 9 larvas de *Hysterothylacium* sp. Al observar la materia fecal de los ratones 24 hs postinoculación se pudo observar en uno de ellos la presencia de una larva perteneciente a *Contracaecum* sp. (Figura 1). La necropsia de los ratones se realizó a los 6 y 9 días, respectivamente, posteriores a la inoculación. No se observaron larvas en el tubo digestivo y no hubo cambios significativos en la composición de leucocitos en la sangre extraída de los ratones pre y postinoculación.

En mayo de 2010 se inocularon dos ratones de cepa Balb/cAnN con 20 larvas de *Contracaecum* sp. a cada uno, obtenidas en *C. guatucupa* (L3Cg). La necropsia se realizó a los 5 y a los 12 días después de la inoculación. En ninguno de los casos se observaron larvas fijadas en el tubo digestivo o cicatrices provocadas por las mismas. La relación en la fórmula leucocitaria de los extendidos sanguíneos realizados pre y postinoculación no evidenció ningún cambio significativo. En el mismo mes, mayo, se volvieron a inocular dos ratones de cepa Balb/cAnN y uno CF1 con 20 larvas de *Contracaecum* sp. (L3Cg). A uno de los ratones Balb/cAnN se le inocularon 50 larvas de *Contracaecum* sp. (L3Cg) y a otro ratón se le inocularon 10 larvas de *Hysterothylacium* sp., ambas larvas obtenidas en *C. guatucupa*. La necropsia de

todos los ratones fue realizada 24 hs postinoculación. Al examinar el tubo digestivo de uno de los ratones cepa Balb/cAnN inoculado con 50 larvas de *Contracaecum* sp. se observó una larva fijada en el estómago (Figura 3, 4, 5 y 6). La relación en la fórmula leucocitaria de los extendidos sanguíneos realizados pre y postinoculación no evidenció ningún cambio. En los otros dos ratones examinados no se encontraron larvas. La histopatología evidenció la larva fijada al tubo digestivo y en la región fúndica del estómago, penetrando el epitelio de la mucosa gástrica llegando hasta la capa muscular (Figuras: 4, 5 y 6). Se observó una compresión total del epitelio, con pérdida de la estructura glandular y adoptando un aspecto aplanado entorno a la larva (Figura 6). Un infiltrado leucocitario con presencia de monocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, rodeaba los tejidos próximos al sitio de penetración de la larva (Figuras: 7 y 8).

Un ratón de cepa CF1 se inoculó en julio de 2010 con 10 larvas de *Contracaecum* sp. y 1 larva de *Hysterothylacium* sp. provenientes de *C. guatucupa*. En la necropsia realizada del tubo digestivo 24 horas postinoculación, no se observó ninguna larva. En los extendidos sanguíneos la composición de leucocitos en la sangre extraída de los ratones pre y postinoculación no varió.

En septiembre de 2010 se inoculó un ratón cepa Balb/cAnN con 45 larvas de *Contracaecum* sp. provenientes de *C. guatucupa* (L3Cg). En la necropsia realizada 24 horas posteriores a la inoculación se observaron dos larvas vivas fijadas a la pared de la cavidad gástrica (Figuras: 9, 10, 11 y 12). El material fue fijado en glutaraldehído 2.5%. En los extendidos sanguíneos realizados se

registro un aumento en el porcentaje de neutrófilos postinoculación (37%) con respecto a los extendidos realizados preinoculación (14%).

En octubre de 2010 se inoculó un ratón cepa Balb/cAnN con 35 larvas de *Contracaecum* sp. L3Ob. 24 horas posteriores a la inoculación se procedió a la necropsia del mismo y se observaron 2 larvas y fijadas al estómago del ratón (Figura 13). El material se fijó en formalina 10% para su posterior análisis histológico. Esta inoculación fue repetida en otro ratón de igual cepa pero con 30 larvas de la misma procedencia. Se observó en el estómago la fijación de 2 larvas que se encontraban vivas. El material fue fijado en formalina 10% para su posterior análisis histológico. En los extendidos sanguíneos, la composición de leucocitos en la sangre extraída de los ratones pre y postinoculación no varió. Al realizar el estudio histopatológico de este material considerado positivo se observó bajo la lupa estereoscópica que las larvas no habían penetrado la mucosa gástrica ya que solo se encontraban en contacto con la mucosa digestiva (Figura 13).

En diciembre de 2010 se inoculó un ratón cepa Balb/cAnN con 30 larvas de *Contracaecum* sp. de laguna Cochicó. 24 horas posteriores a la inoculación se procedió a la necropsia del mismo y no se observó ninguna larva fijada al tubo digestivo. Esta inoculación se repitió al día siguiente con 35 larvas y los resultados fueron similares. En los extendidos sanguíneos no se observaron variaciones en la composición leucocitaria.

En junio de 2011 se inoculó un ratón cepa Balb/cAnN con 5 larvas de *Hysterothylacium* sp. En la necropsia y posterior visualización de los órganos no

se observó ninguna larva. La composición leucocitaria no varió pre y postinoculación.

Las infestaciones (PI) de los patos se realizaron de la siguiente manera: el 29 de abril de 2010 se infestaron dos patos con 25 larvas de *Contracaecum* sp. L3Cg cada uno. Los patos fueron desparasitados 19 días PI. La observación de la materia fecal se realizó durante los dos días posteriores y no se observó ningún nematode. En mayo se volvieron a infestar con larvas encapsuladas en el tubo digestivo de la pescadilla. La desparasitación se realizó transcurridos 42 días PI. En la materia fecal analizada no se observó la presencia de ningún nematode. En mayo de 2010 se infestó un tercer pato con 50 larvas de *Contracaecum* sp. L3Cg. La desparasitación se realizó en junio transcurridos 40 días de infección. No se observó ningún nematode en la materia fecal analizada. En enero de 2012 se inoculó un cuarto pato con 30 larvas de *Contracaecum* sp. L3Ob. No se observó ningún nematode en la materia fecal analizada.

En ninguno de los casos se registraron en el tubo digestivo de los patos rastros de las larvas inoculadas.

Tabla 3: Resumen de la secuencia de infestaciones experimentales realizadas.

Fecha	Procedencia de las larvas	Cepa de ratón	Número de larvas	Especie de larva	Necropsia	Resultados
Junio 2009	Pejerrey de Laguna Cochicó	CF1 n° 1	5	<i>Contracaecum</i> sp.	48 hs	Negativo
		CF1 n° 2	9	<i>Contracaecum</i> sp.	120 hs	Negativo
		CF1 n° 3	8	<i>Contracaecum</i> sp.	264 hs	Negativo
Diciembre 2009	Pescadilla de red	CF1 n° 4	12 1	<i>Contracaecum</i> sp. <i>Hysterothylacium</i> sp.	72 hs	Negativo
		CF1 n° 5	5	<i>Contracaecum</i> sp.	240 hs	Negativo
		CF1 n° 6	10 1	<i>Contracaecum</i> sp. <i>Hysterothylacium</i> sp.	336 hs	Negativo
		CF1 n° 7	12 1	<i>Contracaecum</i> sp. <i>Hysterothylacium</i> sp.	576 hs	Negativo
Abril 2010	Pescadilla de red	Balb/cAnN n° 1	23 5	<i>Contracaecum</i> sp. <i>Hysterothylacium</i> sp.	144 hs	Negativo
		Balb/cAnN n° 2	18 9	<i>Contracaecum</i> sp. <i>Hysterothylacium</i> sp.	216 hs	Negativo
Mayo 2010	Pescadilla de red	Balb/cAnN n° 3	20	<i>Contracaecum</i> sp.	120	Negativo
		Balb/cAnN n° 4	20	<i>Contracaecum</i> sp.	288	Negativo
Mayo 2010	Pescadilla de red	<b>Balb/cAnN n° 5</b>	<b>50</b>	<b><i>Contracaecum</i> sp.</b>	<b>24 hs</b>	<b>Positivo</b>
		Balb/cAnN n° 6	10	<i>Contracaecum</i> sp.	24 hs	Negativo
		CF 1 n° 8	20	<i>Contracaecum</i> sp.	24 hs	Negativo
Julio 2010	Pescadilla de red	CF1 n° 9	10 1	<i>Contracaecum</i> sp. <i>Hysterothylacium</i> sp.	24 hs	Negativo
Septiembre 2010	<b>Pescadilla de red</b>	<b>Balb/cAnN n° 7</b>	<b>45</b>	<b><i>Contracaecum</i> sp.</b>	<b>24 hs</b>	<b>Positivo</b>
Octubre 2010	Pejerrey de laguna Cochicó	Balb/cAnN n° 9	35	<i>Contracaecum</i> sp.	24 hs	Negativo
		Balb/cAnN n° 10	30	<i>Contracaecum</i> sp.	24 hs	Negativo
Diciembre 2010	Pejerrey de laguna	Balb/cAnN n° 11	30	<i>Contracaecum</i> sp.	24 hs	Negativo
Diciembre 2010	Pejerrey de laguna	Balb/cAnN n° 12	35	<i>Contracaecum</i> sp.	24 hs	Negativo
Junio 2011	Pescadilla de red	Balb/cAnN n° 13	5	<i>Hysterothylacium</i> sp.	24 hs	Negativo
Septiembre 2011	Pescadilla de red	Balb /c AnN n° 14	5	<i>Hysterothylacium</i> sp.	24 hs	Negativo
Septiembre 2011	Pescadilla de red	Balb /c AnN n° 15	5	<i>Hysterothylacium</i> sp.	24 hs	Negativo

El ejemplar Balb n° 8 murió en el momento de la infestación.



Figura 1. Larva de *Contracaecum* sp. hallada en heces de ratón Balb/cAnN n°1.  
(1: escala=0,15 mm, 2: escala=0,1 mm)

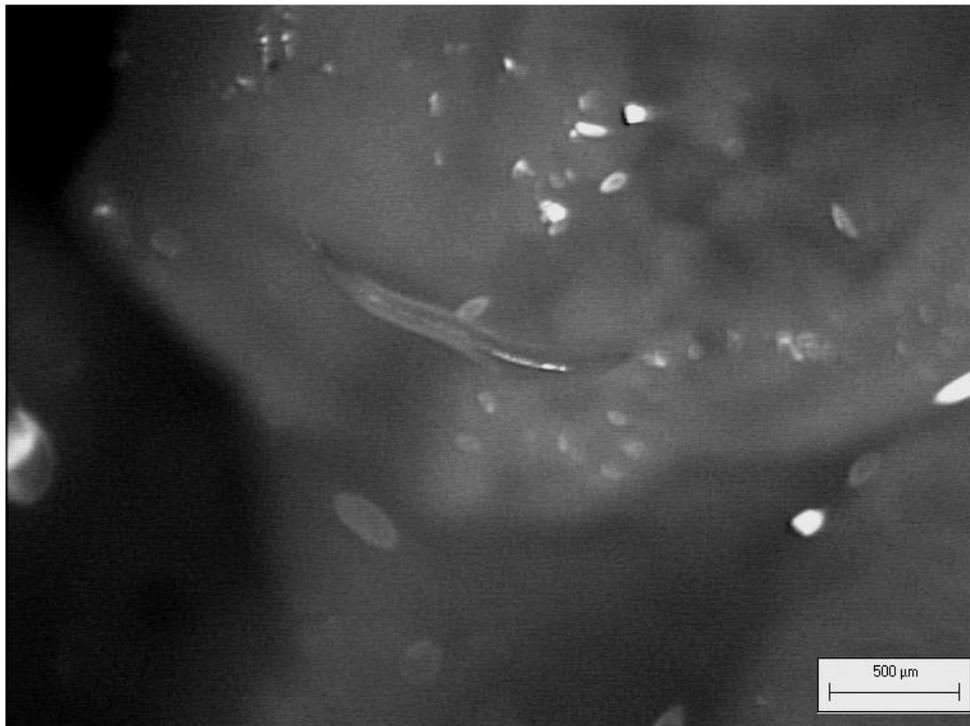


Figura 3: Larva (L3Cg) de *Contracaecum* sp. fijada en la mucosa gástrica de ratón de cepa Balb/cAnN n° 5 (lupa estereoscópica).

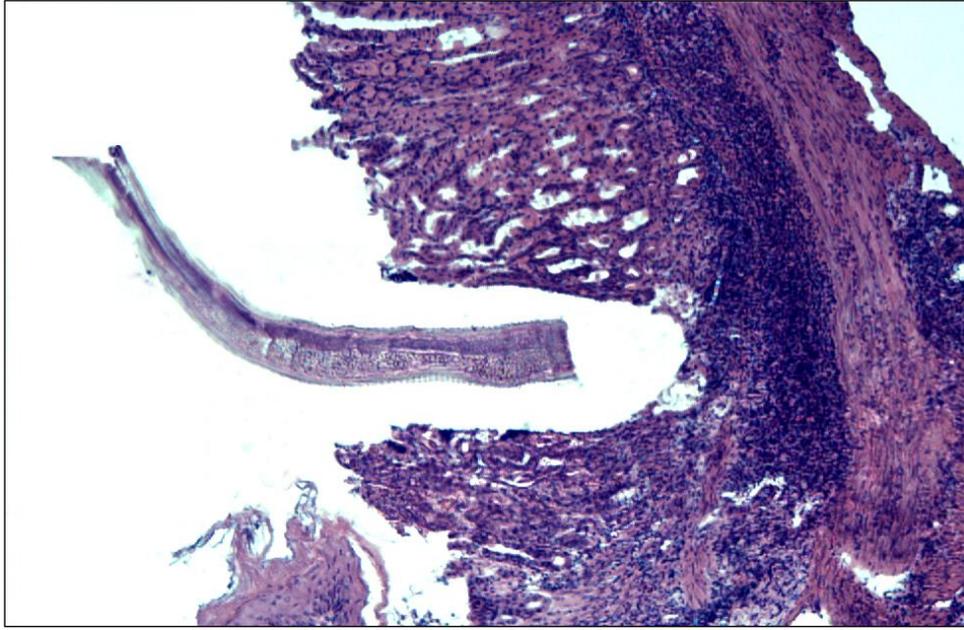


Figura 4: Larva (L3Cg) de *Contracaecum* sp. fijada al estómago de ratón Balb/cAnN n° 5 Hematoxilina eosina, X40,

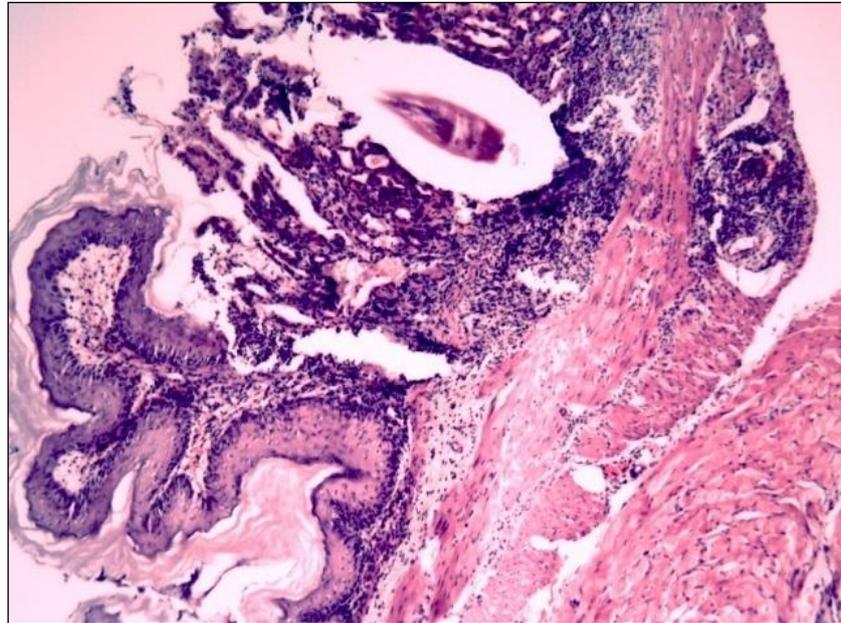


Figura 5: Larva (L3Cg) de *Contracaecum* sp. fijada al estómago de ratón Balb/cAnN n° 5 Hematoxilina eosina, X100.

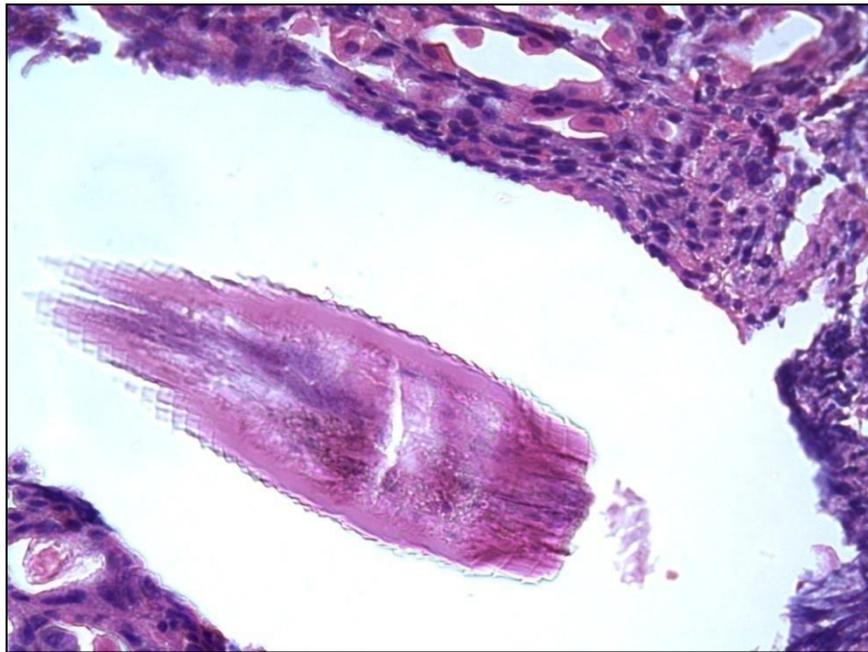


Figura 6: Detalle de la larva (L3Cg) y del epitelio de la mucosa afectada. Hematoxilina eosina, X400.

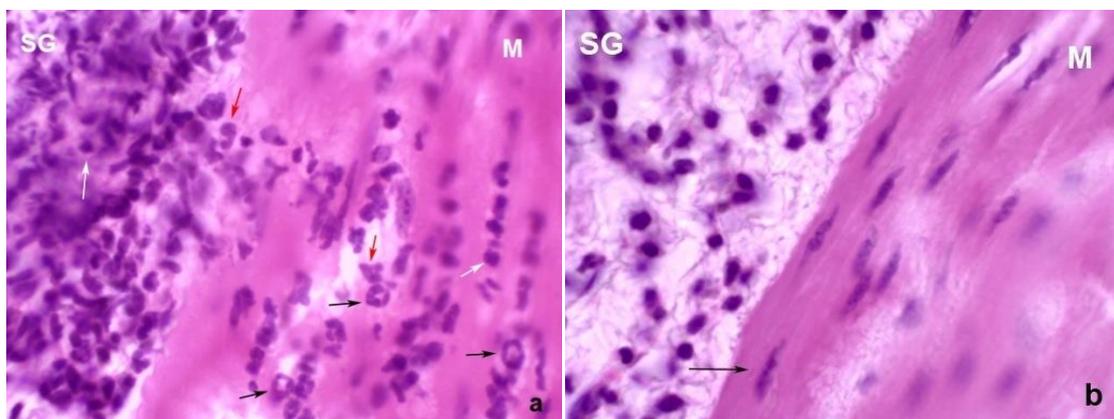


Figura 7: a) Infiltrado leucocitario en tejido de la submucosa gástrica (SG) y tejido muscular (M) de ratón, afectados por L3Cg Flechas negras: monocitos. Flechas rojas: neutrófilos. Flechas blancas: linfocitos.; b) tejido normal. Flecha negra: fibra muscular. Hematoxilina eosina, X1000.

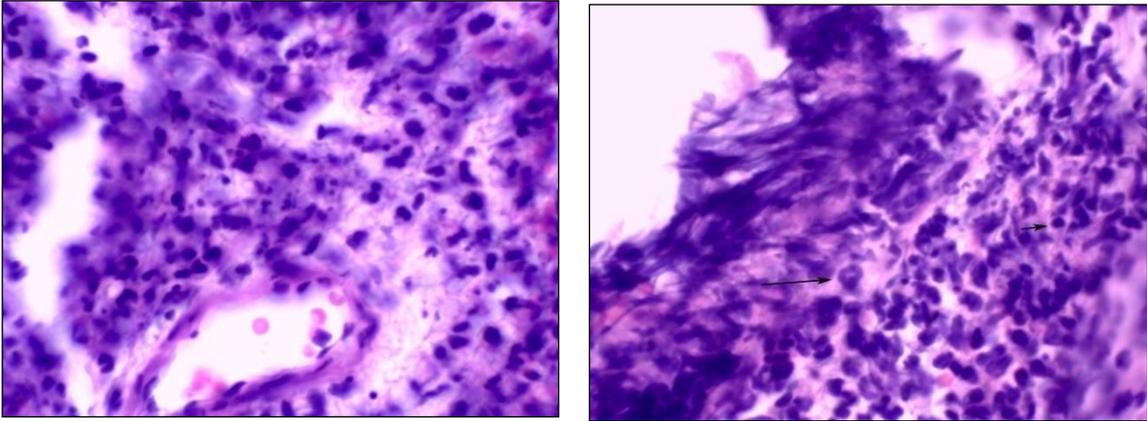


Figura 8: Detalle de infiltrado celular en ratón Balb/cAnN n° 5. Monocito, linfocito. Hematoxilina-eosina, X1000.

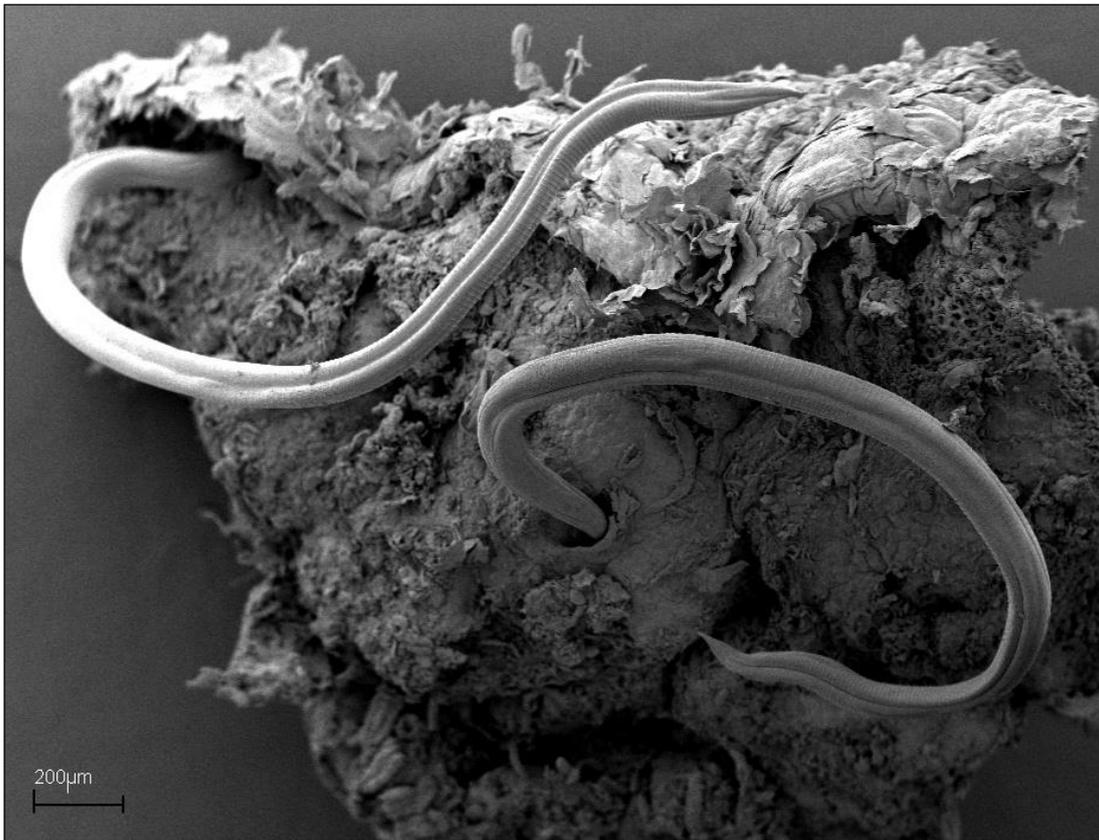


Figura 9: Ultraestructura electrónica de larvas de *Contracaecum* sp. (L3Cg) penetrando la mucosa gástrica de ratón Balb/cAnN n° 7.



Figura10: Ultraestructura electrónica de larva L3Gc de *Contracaecum* sp. penetrando la mucosa gástrica de estómago de ratón Balb/cAnN nº 7.



Figura 11: Ultraestructura electrónica de larva L3Gc de *Contracaecum* sp. penetrando la mucosa del estómago de ratón Balb/cAnN nº 7.

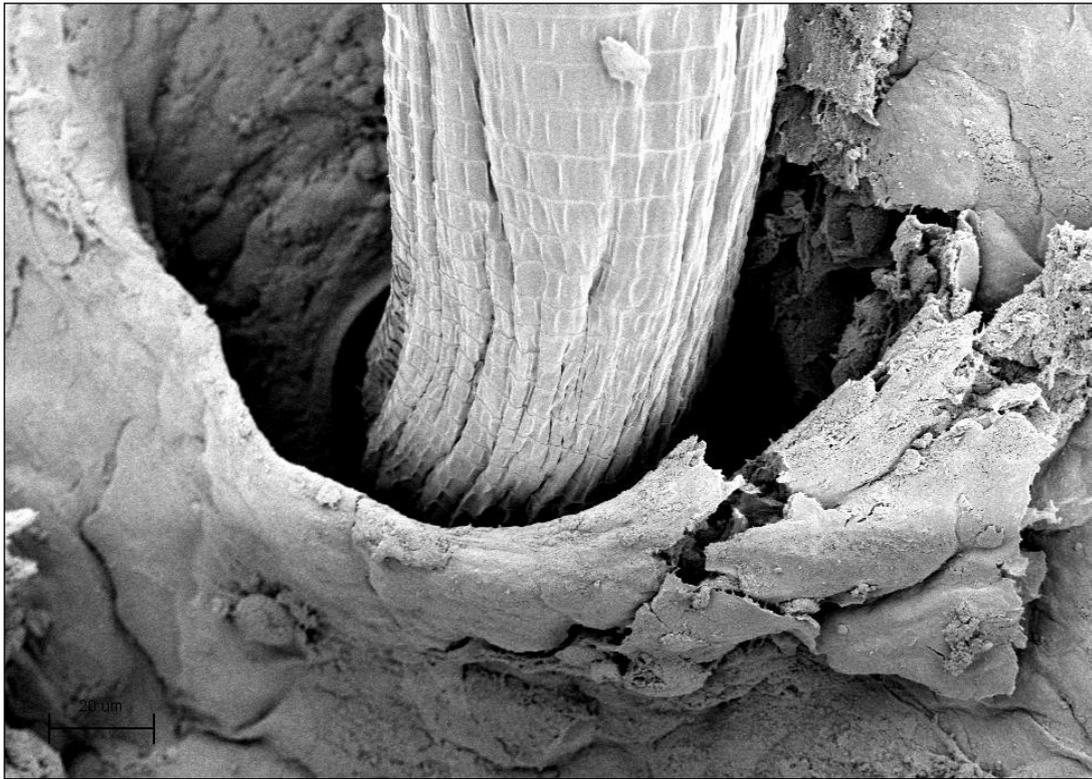


Figura 12: Ultraestructura electrónica de larva L3Gc de *Contracaecum* sp. penetrando la mucosa del estómago de Balb/cAnN n° 7.

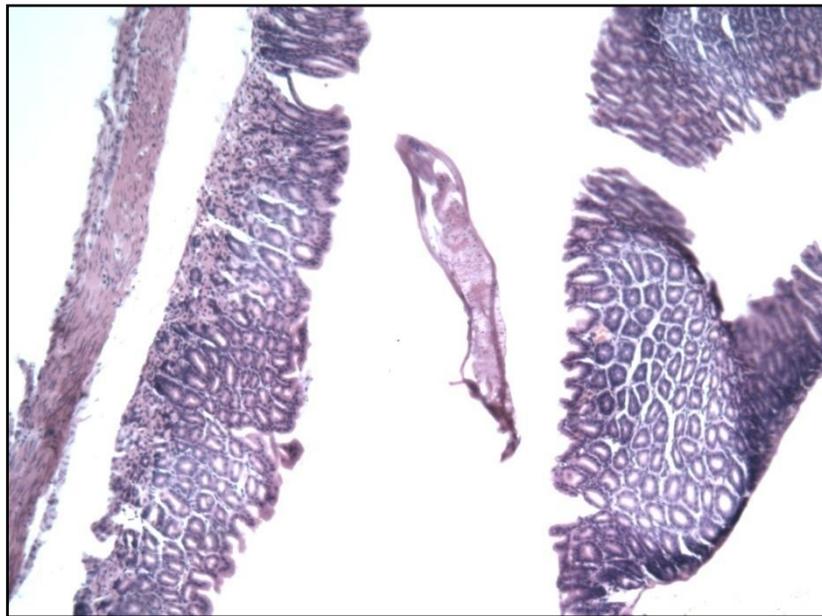


Figura 13: Larvas de *Contracaecum* sp. de *O. bonariensis* sobre la mucosa gástrica de Balb/cAnN n° 9. (hematoxilina-eosina, x400)

## DISCUSIÓN

En este trabajo se comprobó que las larvas de *Hysterothylacium* sp. halladas en *Cynoscion guatucupa* no fueron infectivas para ninguna de las dos cepas de ratones utilizadas, Balb/cAnN y CF1. Estas larvas no se asemejaron morfológicamente a ninguno de los dos tipos de larvas descritas en el trabajo realizado por Norris & Overstreet (1976). A diferencia de las larvas citadas por estos autores, las estudiadas en la presente tesis fueron de mayor tamaño, poseen una espina terminal y la relación ciego intestinal/apéndice ventricular es menor. Tampoco se asemejaron morfológicamente a las larvas de tercer o cuarto estadio de *Hysterothylacium aduncum* encontradas por González (1998) en *Oncorhynchus mykiss*. En este último caso, las larvas introducidas mediante cirugía en la cavidad abdominal de ratones, cuya cepa no fue mencionada, también fueron diferentes morfológicamente a las larvas tipo MB de Norris & Overstreet (1976). Los resultados de infestación en el trabajo de González (1998) fueron positivos con ratones muertos y refrigerados. Los autores concluyeron que estas larvas eran menos agresivas que las tipo MB de Norris & Overstreet y no presentarían ningún riesgo en producir anisakidosis.

Al analizar los ensayos de infestación con las larvas de *Contracaecum* sp. halladas en la pescadilla de red inoculadas oralmente en ratones de cepa Balb/cAnN, las infestaciones fueron positivas, en cambio no fueron en la cepa CF1. Esto significó haber visualizado larvas fijadas en la mucosa gástrica mediante lupa estereoscópica que posteriormente fue comprobado utilizando

técnicas histopatológicas o por observación de la penetración con microscopía electrónica. Hasta el momento, este trabajo de tesis aporta el primer ensayo realizado en modelo murino con larvas del género *Contracaecum* introducidas oralmente.

Las larvas de *Contracaecum* sp. halladas en el pejerrey de laguna no produjeron ningún tipo de lesión histopatológica a pesar de ser vistas con lupa estereoscópica sobre la mucosa gástrica del ratón. Estas larvas serían altamente específicas en cuanto a su hospedador definitivo. Si se confirmara que pertenecen a la especie *Contracaecum australe* descrita por Garbin et al. (2011) y Garbin et al. (2014), es una especie que parasita cormoranes de las especies *Phalacrocorax brasilianus* y *P. gaimardi*. Por este motivo se supone que la infección en mamífero no habría prosperado.

Estudios previos con L3 del género *Contracaecum*, específicamente *C. multipapilatum* fueron realizados en gatos domésticos produciendo lesiones ulcerosas e hiperemia de la mucosa intestinal (Vidal-Martínez et al., 1994). En otros ensayos realizados en conejos con la misma especie, se observó ruptura del epitelio de la mucosa gástrica en el sitio de fijación de las larvas, generando un infiltrado leucocitario con necrosis local llegando a la submucosa (Barros et al., 2004).

Strom et al. (2015) infectaron cerdos con larvas L3 de *Contracaecum osculatum* (parásito de mamíferos marinos) y observaron que al penetrar la mucosa estomacal provocaron un masivo infiltrado celular y presencia de gránulos eosinofílicos.

Otros ensayos con resultados positivos se realizaron en ratones o ratas que fueron inoculadas con larvas L3 de los géneros *Anisakis* y *Terranova*. (Deardorff et al., 1983, Jones et al., 1990, Iglesias et al., 1993, Amano et al., 1995, Baeza et al., 2005).

La vía de infestación natural en el hombre se produce mediante la ingestión de pescado parasitado, crudo o mal cocido. Por tal motivo se consideró elegir la vía oral como vía de inoculación de los ratones. Otros trabajos utilizan como vía de inoculación de las larvas la inyección intraperitoneal o la cirugía de la cavidad celómica de los ratones. Pero autores como Peterguer & Cuellar (1998), consideraron que con la utilización de estas vías resulta difícil estudiar los mecanismos inmunopatológicos de la anisakidosis, ya que por esta metodología de infestación no es posible determinar con precisión la carga parasitaria que permanece dentro del ratón. En cambio, al inocular por la vía oral y mediante un examen de materia fecal, se tiene un mejor control en el número de larvas que puedan ser expulsadas con el bolo fecal. Por su parte, Cho et al. (2005), destacaron que la inoculación por vía peritoneal no generó respuesta inmune y al inocular oralmente una larva de estadio tres de *Anisakis simplex* en un ratón, generó una respuesta inmune de tipo alérgica.

El tiempo que transcurre realizada la inoculación de las larvas en los ratones, sería un factor importante para la observación de la fijación de la larva, ya que 24 horas postinoculación, las larvas se encontraron vivas y adheridas al epitelio de la mucosa gástrica. En los casos donde la necropsia y la visualización

bajo lupa estereoscópica del estómago superaron las 48 horas, no se observó ninguna larva fijada al tubo digestivo. Esto concuerda con lo descrito por Norris & Overstreet (1976), en cuanto a que al segundo día de infestación las larvas mueren y las lesiones producidas por las mismas cicatrizan, las lesiones hemorrágicas se resuelven al 5 día postinoculación (PI) y transcurridos los 14 días (PI) se pueden observar elevaciones de la mucosa que corresponderían a una cicatrización. En muchos casos donde se describen las lesiones en el tubo digestivo provocadas por larvas de nematodes específicamente con *Anisakis simplex* o con representantes del género *Pseudoterranova* entre las 24 hs a 6º día PI, aparecen ulceraciones en el epitelio de la mucosa. Se observaron focos hemorrágicos e infiltrado eosinofílico rodeando a las larvas las cuales comienzan a morir a partir del 7º día PI. A los 30 días PI, los granulomas se hallaron completamente resueltos con ausencia de restos parasitarios (Deardorff et al 1983, Audicana & Kennedy, 2008).

Los resultados del presente trabajo permiten confirmar que las larvas inoculadas de estadio tres de *Contracaecum* sp. halladas en *Cynoscion guatucupa* penetraron el epitelio de la mucosa gástrica. En torno a la penetración de las mismas se observó un infiltrado leucocitario con presencia de linfocitos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos alrededor del nematode.

No se observó en los ratones ninguna manifestación clínica que evidencie la infestación como se observa en la anisakidosis humana. De acuerdo con lo observado en la necropsia y teniendo en cuenta lo que ocurre en las

infestaciones accidentales en el hombre, deberían producirse vómitos entre la 1<sup>o</sup> hora y las 12 hs postinoculación.

Las larvas tienen la capacidad de secretar sustancias causando hidrólisis en los tejidos gastrointestinales. Las enzimas proteolíticas constituyen estas sustancias capaces de degradar el ácido hialurónico que forma parte de la matriz intersticial del tejido conectivo (Hotez et al., 1994). Así penetran la mucosa invadiendo los tejidos del hospedador. En la infectividad de las larvas L3 de *H. aduncum* con el hospedador interviene la enzima proteolítica: metaloproteasa, en un PH óptimo de 4. Esta actividad parece depender de la disponibilidad exógena de sustancias nutritivas de origen proteico, que proviene de la digestión del hospedador o de la presencia de pepsina en el medio de cultivo. Otra serina-proteasa estaría relacionada con la maduración sexual del nematode (Iglesias et al., 2002, Malagon et al., 2011).

Domínguez-Ortega et al. (2003) observaron en humanos infectados con *Anisakis simplex*, leucocitosis, neutrofilia y 24 hs. posteriores al inicio de los síntomas, un incremento en la eosinofilia. En otros casos, la eosinofilia incrementó a los 8-15 días (Bouree et al., 1995). Jones et al., (1990) observaron máxima neutrofilia a los 14 días PI. Estos resultados explicarían la escasa (o ausente) variación en la fórmula leucocitaria pre y postinoculación que se observó hs en este estudio 24 después de la inoculación.

Como se mencionó, en los ensayos de infestación realizados se utilizaron dos cepas de ratones, la Balb/cAnN y la CF1. Si se compara la infestación con similar número de larvas y tiempo de infestación los resultados fueron positivos

en la cepa Balb/cAnN y negativos en la cepa CF1, lo que demostraría una diferencia en cuanto a la susceptibilidad de la cepa de ratón. Así también lo indica un trabajo de Lyons et al., (2005), en el cual compararon estas mismas cepas de ratones infectados con *Chlamydia trachomatis*. Los autores concluyeron que la cepa Balb/c fue más susceptible a la infección que la cepa CF1. Este tipo de comparaciones se utilizó además en ensayos experimentales sobre asma, ya que la cepa Balb/c presenta una mayor respuesta de anticuerpos IgE específicos tras la inmunización (Matheu et al., 2001). Iglesias et al. (1993) al comparar la respuesta inmune en ratones de cepa Balb/c y CBA/J con la respuesta inmune en el hombre, concluyeron que son similares y que éstas cepas de ratones serían buenos modelos de estudio.

Los resultados en cuanto a la inoculación de las larvas de *Contracaecum* sp. en pato estarían indicando dos alternativas: La intensidad de las larvas administradas no fue la correcta o las larvas no se instalaron a lo largo del tracto digestivo debido a que no era el hospedador adecuado (Garbin et al., 2007). De esta manera, se corrobora parte de la hipótesis que se propuso en cuanto a determinar el poder infectivo de las larvas de *Contracaecum* spp. e *Hysterothylacium* spp. encontradas en los hospedadores estudiados sobre el modelo murino.

De acuerdo con los resultados alcanzados, las larvas de *Contracaecum* sp. infestivas para el modelo murino utilizado, potencialmente podrían inducirían lesión en otros mamíferos, incluido el hombre. Por tal motivo la prevención de anisakidosis humana debe basarse en una educación sanitaria dirigida a evitar

hábitos de consumo de pescado fresco crudo o poco cocinado e insistirse en la congelación por debajo de  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $>72\text{hs}$ ) o en la cocción completa a temperaturas no inferiores a  $60^{\circ}$ .

---

## CONCLUSIONES GENERALES

---

Del estudio de la potencialidad zoonótica de los nematodos Anisakidos pertenecientes a los géneros *Contracaecum* e *Hysterothylacium* hallados en los hospedadores *Cynoscion guatucupa*, *Odontesthes argentinensis* y *Odontesthes bonariensis*, se desprenden las siguientes conclusiones:

- Las larvas halladas en los hospedadores estudiados pertenecen a los géneros *Contracaecum* e *Hysterothylacium*.
- Las larvas de *Contracaecum* sp. e *Hysterothylacium* sp. no migran a la musculatura estriada. Para el caso observado en *O. bonariensis* son necesarios mayor número de estudios que confirmen el comportamiento miotrópico y las condiciones bajo las que ocurre.
- Las larvas de *Contracaecum* sp. no resultaron ser infectivas en otros modelos de estudio como aves acuáticas o teleósteos de forrajeo, como la madrecita del agua, *Jenynsia multidentata*
- Las larvas de *Contracaecum* sp del hospedador *C. guatucupa* fijada al tubo digestivo provocaron una compresión total del epitelio, con pérdida de la estructura glandular. Se observó un infiltrado leucocitario con presencia de

monocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, próximos al sitio de penetración de la larva.

- Las larvas de *Contracaecum* sp. del hospedador *O. bonariensis* no provocaron invasión de la mucosa gástrica en modelo murino
- Las larvas de *Hysterothylacium* sp. no provocaron invasión de la mucosa gástrica en modelo murino.
- La invasión larval de *Contracaecum* sp. provoca una pequeña alteración en los parámetros hemáticos en mamíferos.
- Las larvas de *Contracaecum* sp. del hospedador *C. guatucupa* presentan una filiación genética con las especies *C. ogmorhini* y con *C. margolisi*, ambas parásitas de mamíferos marinos.
- Las larvas de *Contracaecum* sp. del hospedador *C. guatucupa* presentan una filiación genética con las especies *C. ogmorhini* y con *C. margolisi*, ambas parásitas de mamíferos marinos.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

---

- Abollo, E.; Gestal, C. & S. Pascual. 2001. Anisakid infection in the European shag *Phalacrocorax aristotelis aristotelis*. *Journal of Helminthology* 75: 209-214.
- Abuin, J.; Tanzola, D.; Rodríguez, P. & R. Iachini. 2012. Primer caso clínico de anisakidosis por diagnóstico endoscópico digestivo en la República Argentina. *Revista Argentina de Parasitología* 1(1): 118-118.
- Adams, A.M.; Miller, K.S.; Wekell, M.M. & F.M. Dong. 1999. Survival of *Anisakis simplex* in microwave processed arrow tooth flounder (*Atheresthes stomias*). *Journal of Food Protection* 62: 403-406.
- Agoulon, A.; Blanc, G.; Le Bris, H. & A. Marchand. 2001. Recovery of third-stage larvae of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Racunculoida) from the flesh of fish: assessment of a digestive medium as a toll for the study of fish paratenic hosts. *Bulletin Francais de la Peche et de la Pisciculture* 357/360: 595-608.
- Alarcos, A.J. & J.A. Etchegoin. 2010. Parasite assemblages of estuarine-dependent marine fishes from Mar Chiquita coastal lagoon (Buenos Aires Province, Argentina). *Parasitology Research* 107(5): 1083-1091.
- Aliotta, S. & G.O. Lizasoain. 2004. Tipos de fondos y su caracterización geológica por métodos sismoacústicos, p 51-59. In: Piccolo, MC y

- Hoffmeyer, M.S (Eds) Ecosistemas del Estuario de Bahía Blanca. Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. & D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-410.
- Amano, T.; Nakazawa, M.; Sugiyama, H.; Secor, W.E. & T. Oshima. 1995. Specific antibody patterns of wistar rats inoculated with third stage larvae of *Anisakis simplex*. *Journal of Parasitology* 81(4): 536-542.
- Anderson, R.C. 2000. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission, 2<sup>nd</sup> ed. Cabi Publishing, New York, New York, 672 p.
- Añibarro, B., & F.J. Seoane. 1998. Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102: 331-332.
- Arenal-Vera, J.J.; Marcos-Rodríguez, J.L.; Borrego-Pintado, M.H.; Bowakin-Dib, W.; Castro-Lorenzo, J. & J.I. Blanco-Álvarez. 1991. Anisakiasis aguda como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico: primer caso en la literatura médica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 79: 355-358.
- Arcangeli, G.; Galuppi, A.; Bichieri, M.; Gamberini, R. & M. Presicce. 1996. Prove sperimentali sulla vitalita di larve del genere *Anisakis* in semiconserva ittiche. *Industria Conserve* 71: 502-507.
- Armentia, A.; Martín-Gil, F.J.; Pascual, C.; Martín-Esteban, M.; Callejo, A. & C. Martínez. 2006. *Anisakis simplex* Allergy After Eating Chicken Meat. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 16(4): 258-263.

- Audicana, M.T., Ansotegui, I.J.; Fernández de Corres, L. & M.W. Kennedy. 2002. *Anisakis simplex*: dangerous – dead and alive? *Trends in Parasitology* 18(1): 20-25.
- Audicana, M.T. & M.W. Kennedy. 2008. *Anisakis simplex*: From obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews* 21(2): 360-379.
- Aukdtikalnienė, R.; Kublickienė, O.; Vydniauskas, A. & R. Zilinskienė. 2000. Histological investigations of *Toxocara canis* tissues and their micromorphological changes under the action of albendazole *in vivo*. *Acta Zoologica Lituanica* 10(2): 78-84.
- Baeza, M.L.; Conejero, L.; Higaki, Y.; Martín, E.; Pérez, C.; Infante, S.; Rubio, M. & J.M. Zubeldia. 2005. *Anisakis simplex* allergy: a murine model of anaphylaxis induced by parasitic proteins displays a mixed Th1/Th2 pattern. *Clinical and Experimental Immunology* 142: 433-440.
- Barros C.; Manzarbeitia F.; López Vélez R. & J.M. Oñate. 1992. Anisakiasis Humana en España por consumo de sardinas crudas. *Alimentaria* Junio: 57-61.
- Barros, L.A.; Sigarini, C.O. & Pinto, R.M. 2008. Resistencia de larvas de *Contraecum sp.*, a baixas temperaturas. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*: 15(3): 143-145.
- Barros, L.A.; Tortelly, R.; Pinto, R.M. & D.C. Gomes. 2004. Effects of experimental infection with larvae of *Eustrongylides ignotus* Jaegerskiold, 1909 and *Contraecum multipapillatum* (Drasche, 1882) Baylis, 1920 in

- rabbits. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 56(3): 32 5-332.
- Beldsoe G.E. & M.P. Oria. 2001. Potential hazards in cold smoked fish: parasite. *Journal of Food Science* 66(7): 1100-1103.
- Bier, J.W.; Jackson, G.J.; Adams, A.M.; & R.A. Rude. 2001. Parasitic Animals in Foods. En "U.S. Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition Bacteriological Analytical Manual Online". George J. Jackson, Robert I. Merker & R. Bandler Bam (coord.) 8 ed. Cap 19.
- Boero, J.J. & J.E. Led 1970. El parasitismo de la fauna autóctona. VI. Los parásitos de la avifauna argentina. Quintas Jornadas de Veterinaria, La Plata, Argentina 2: 65-71.
- Boero, J.J. & J.E. Led. 1971. El parasitismo de la fauna autóctona. V. Los parásitos de la fauna argentina. *Analecta Veterinaria* 3: 91-103.
- Bouree, P., Paugam, A. & J. C. Petithory. 1995. Anisakidosis: Report of cases and reiew of the literature. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 18(2): 75-84.
- Bicudo, A.J.A.; Tavares, L.E.R. & J. L. Luque. 2005. Metazoarios parasitos da Cabrinha *Prionotus punctatus* (Bloch, 1793) (Osteichthyes: Triglidae) do litoral do Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 14: 27-33
- Biole, F.G.; Guagliardo S.E.; Mancini, M.A.; Tanzola, R.D.; Salinas, V. & G. Morra. Primer registro de *Contracaecum australe* (Nematoda: Anisakidae)

- en *Phalacrocorax brasilianus* (Aves: Phalacrocoracidae) De La Region central de Argentina. *BioScriba* 5: 1-11
- Brizzola, S.M. & R.D. Tanzola. 1995. *Hysterothylacium rhamdiae* sp. n., (Ascaridoidea: Anisakidae) from a Neotropical Catfish, *Rhamdia sapo* (Pisces: Pimelodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 90 (3): 349-352.
- Bush, A.O.; Lafferty, K.D.; Lotz, J.M. & Shostak, AW. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology* 83: 575 -583.
- Cabrera, R. & M. del P. Trillo-Altamirano. 2004. Anisakidosis: ¿Una zoonosis parasitaria marina desconocida o emergente en el Perú? *Revista de Gastroenterología del Perú* 24: 335-342.
- Cannon, L.R.G. 1977. Some larval ascaridoids from south-eastern Queensland marine fishes. *International Journal of Parasitology* 7: 233-243.
- Cardelli, N.V., Cervellini, P.M. & M.C. Piccolo. 2006. Abundancia estacional y distribución espacial de Mysidacea en el Atlántico Sudoccidental, estuario de Bahía Blanca (38°42'-39°26'S y 62° 28'-61°40'W). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 41: 177 - 185
- Carozza, C.R.; Cotrina, C.P. & M.B. Cousseau. 1997. Muestreo bioestadístico de pescado en el puerto de Mar del Plata, corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) periodo 1986-1988.
- Cattan, P.E. & J. Carvajal. 1984. A study of the migration of larval *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridida) in the Chilean hake, *Merluccius gayi* (Guichenot). *Journal of Fish Biology* 24: 649-654.

- Céspedes, M.; Saez, A.; Rodríguez, I.; Pinto, J.M. & R. Rodríguez. 2000. Chronic anisakiasis presenting as a mesenteric mass. *Abdominal Imaging* 25: 548–550.
- Cheng, T.C. 1976. The Natural History of Anisakiasis in animals. *Journal of Milk and Food Technology* 39(1): 32-46.
- Cho, T.H.; Park, H.Y.; Cho, S.; Sohn, J.; Yoon, Y.W.; Cho, J.E. & S.W. Cho. 2005. The time course of biological and immunochemical allergy states induced by *Anisakis simplex* larvae in rats. *Clinical and Experimental Immunology* 143: 203-208.
- Cremonte, F. & N. Sardella. 1997. The parasitofauna of *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782 (Pisces: Scombridae) in two zones of the Argentine Sea. *Fisheries Research* 31: 1-9.
- Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R. & D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.
- D'Amelio, S.; Mathiopoulos, K.D.; Santos, S.P.; Pugachev, O.N; Webb, S.C.; Picanço, N. & L. Paggi. 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology* 30(2): 223–226.
- D'Amelio, S.; Barros, N.B.; Ingrosso, S.; Fauquier, D.A.; Russo, R. & L. Paggi. 2007. Genetic characterization of members of the genus *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) from fish-eating birds from west-

- central Florida, USA, with evidence of new species. *Parasitology* 134(7): 1041-51.
- De la Torre Molina, R.; Pérez Aparicio, J.; Hernández Bienes, M.; Jurado Pérez, R.; Martínez Ruso, A. & E. Morales Franco. 2000. Anisakiasis en pescados frescos comercializados en el norte de Córdoba. *Revista Española de Salud Pública* 74: 517-526.
- Deardorff, T.L. & R.M. Overstreet. 1981. Larval *Hysterothylacium* (= *Thynnascaris*) (Nematoda: Anisakidae) from fishes and invertebrates in the Gulf of Mexico. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 48: 113-126.
- Deardorff, T.L. & M.L. Kent. 1989. Prevalence of larval *Anisakis simplex* in penreared and wild-caught salmon (Salmonidae) from Puget Sound, Washington. *Journal of Wildlife Diseases* 25: 416-419.
- Deardorff, T.L.; Fukumura, T. & R.B. Raybourne. 1986. Invasive Anisakiasis. A case report from Hawaii. *Gastroenterology* 90: 1047-1050.
- Deardorff, T.L.; Kayes, SG. & T. Fukumura. 1991. Human anisakiasis transmitted by marine food products. *Hawaii Medical Journal* 50: 9-16.
- Deardorff, T.L.; Kliks, M.M. & R. S. Desowitz. 1983. Histopatological induced by larval *Terranova* (Type HA) (Nematoda: Anisakinae) in experimentally infected rats. *Journal of Parasitology* 69: 191-195.
- Deardorff, T.L. & R. Throm. 1988. Commercial blast-freezing of third-stage *Anisakis simplex* larvae encapsulated in Salmon and Rockfish. *Journal of Parasitology* 74(4): 600-603.

- Diaz Estruch, J. 1992. Parasitosis por nematodos. *Alimentaria* 28: 43-45.
- Domínguez Ortega, J.; Cimarra, J.; Sevilla, M.; Alonso Llamazares, A.; Moneo, I.; Robledo Echarren, T. & C. Martínez Cocera. 2000. Anisakis simplex: a cause of intestinal pseudo-obstruction. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 92: 132-139
- Domínguez Ortega, J.; Martínez-Alonso, J.C.; Alonso Llamazares, A.; Argüelles-Grande, C.; Chamorro, M.; Robledo, T.; Palacio, R. & C. Martinez Cocera. 2003. Measurement of serum levels of eosinophil cationic protein in the diagnosis of acute gastrointestinal anisakiasis. *Clinical Microbiology and Infection* 9(5): 453-457.
- Dorny, P.; Praet, N.; Deckers, N. & S. Gabriel. 2009. Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology* 163: 196-206.
- Drago, F. 2004. Dinámica estacional y ecología de las poblaciones de parásitos del pejerrey, *Odontesthes bonariensis* [Cuvier & Valenciennes, 1835], en lagunas de la provincia de Buenos Aires. Tesis de doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
- Dziekonska-Rynko, J. & J. Rokicki. 2007. Life cycle of the nematode *Contracaecum rudolphii* Hartwig, 1964 (sensu lato) from northern Poland under laboratory conditions. *Helminthologia* 44(3), 95-102.
- Dziekonska-Rynko, J., Rokicki, J. & B. Wziątek. 2008. Experimental infection of *Carassius auratus* (L., 1758) with the second stage larvae of the nematode *Contracaecum rudolphii* Hartwich, 1964. *Wiadomosci parazytologiczne*, 54(4), 339-343.

- Dziekonska-Rynko, J.; Mierzejewska, K. & J. Rokicki. 2014. *In vitro* infection experiments with eggs of the nematode *Contracaecum rudolphii* Hartwich, 1964 (*sensu lato*) targeting aquatic insect larvae (Odonata: Coenagrionidae and Libellulidae; Trichoptera: Integripalpia) as possible intermediate hosts. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 43(2): 165–169.
- Edgar, R.C. 2004. Muscle: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5): 1792–1797.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal* 8(4): 1543.
- Evdokimova, E.B. 1973. Parasitefauna of commercial teleost fishes at the Patagonian Shelf. Thesis Zoologicheskii Institut Akademii Nauk USSR, Kaliningrado, 18 pp.
- Fagerholm, H.P. 1989. Intra-specific variability of the morphology in a single population of the seal parasite *Contracaecum osculatum* (Rudolphi) (Nematoda, Ascaridoidea), with a redescription of the species. *Zoologica Scripta* 18(1): 33-41.
- Fagerholm, H.P. 1990. Systematic position and delimitation of Ascaridoid nematode parasites of the genus *Contracaecum* with a note on the Superfamily Ascaridoidea. PhD Thesis, National Veterinary Institute, Helsinki, Finland.
- Fernández de Corres, L.; Del Pozo, M.D.; Aizpuru, F. & E. Buendia. 2001. Prevalencia de la sensibilización a *Anisakis simplex* en tres áreas

- españolas, en relación a las diferentes tasas de consumo de pescado. Relevancia de la alergia a *Anisakis simplex*. *Alergología e Inmunología Clínica* 16: 337-346.
- Ferre, I. 2001. Anisakiosis y otras zoonosis parasitarias transmitidas por consumo de pescado. *Revista AquaTIC* 14.
- Fontenelle, G.; Knoff, M.; Felizardo, N.N.; Lopes, L.M.S. & S.C. Clemente. 2013. Nematodes of zoonotic importance in *Cynoscion guatucupa* (Pisces) in the state of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 22(2): 281-284.
- Freije, R.H.; Asteasuain, R.O.; De Schmidt, A.S. & J.R. Zavatti. 1981. Relación de la salinidad y temperatura del agua con las condiciones hidrometeorológicas en la porción interna del estuario de Bahía Blanca. *Contribuciones Científicas I.A.D.O. N°57*, 20 pp.
- García L.S. & D.A. Bruckner. 1997. *Diagnostic medical parasitology*. Editorial ASM PRESS, Washington. DC. Tercera edición. 901 p. Capítulo 23.
- Galeano, N.A & R.D. Tanzola. (2012). *Contracaecum ovale* (Nematoda: Anisakidae) from *Rollandia rolland* Quoy & Gaimard 1824 (Aves, Podicipedidae) in Argentina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 21(2): 143-147
- Gayevskaya, A.V.; Rodyuk, G.N. & A.M. Parukhin. 1990. Peculiarities and formation of parasitofauna of the Patagonian toothfish *Dissostichus eleginoides*. *Biologia Moria* 4: 23-28.

- Garbin, L.E. 2009. Taxonomía y evaluación de la especificidad hospedatoria de nematodos Anisakidae parásitos de aves marinas en el area de Península de Valdés, Chubut, Argentina. Tesis Doctoral. FCNyM, UNLP, 180p.
- Garbin, L.E.; Capasso, S.; Díaz, J.I.; Morgenthaler, A.; Millones, A. & G.T. Navone. 2014. Nuevo hospedador y registro geográfico de *Contracaecum australe* (Nematoda, Anisakidae) parasitando a *Phalacrocorax gaimard* (Aves, Phalacrocoracidae) en costas del Atlántico Sudoccidental. *Revista Argentina de Parasitología* 2(3): 6-11.
- Garbin, L.E.; Díaz, J.I.; Cremonte F. & G.T. Navone. 2008. A new anisakid species parasitizing the imperial cormorant *Phalacrocorax atriceps* from the north patagonian coast, Argentina. *Journal of Parasitology* 94: 852-859.
- Garbin, L.E.; Navone, G.T.; Díaz, J.I. & F. Cremonte. 2007. Further study of *Contracaecum pelagicum* (Nematoda: Anisakidae) in *Spheniscus magallanicus* (Aves: Spheniscidae) from argentinean coasts. *Journal of Parasitology* 93: 143-150.
- Garbin, L.E.; Mattiucci, S.; Paoletti, M.; Diaz J.I.; Nascetti, G. & G.T. Navone. 2013. Molecular identification and larval morphological description of *Contracaecum pelagicum* (Nematoda: Anisakidae) from the anchovy *Engraulis anchoita* (Engraulidae) and fish-eating birds from the Argentine North Patagonian Sea. *Parasitology International* 62 (2013) 309-319
- Garbin L.E.; Mattiucci, S.; Paoletti, M.; González-Acuña, D. & G. Nascetti. 2011. Genetic and Morphological evidences for the existence of a new species de *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) parasite of *Phalacrocorax*

- brasilianus* (Gmelin) from Chile and its genetic relationships with congeners from fish-eating birds. *Journal of Parasitology* 97(3): 476-492.
- García, L.S. & D.A. Bruckner. 1997. Diagnostic medical parasitology (3rd ed). ASM Press, Washington, D.C.
- Gayevskaya, A.V.; Rodyuk, G.N. & A.M. Parukhin. 1990. Peculiarities and formation of parasitofauna of the Patagonian toothfish *Dissostichus eleginoides*. *Biologia Morya* 4: 23-28.
- Gómez, B. ; Lasa, E.; Arroabarren, E.; Garrido, S.; Anda, M. & A.I. Tabar. 2003. Alergia a *Anisakis simplex*. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 26 (2): 25-30.
- Gonzales, L. 1998. Experimental infection of mice with *Hysterothylacium aduncum* (nematoda: anisakidae).larvae from marine-farmed trout in Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 30(1): 139-142.
- González, R.A. & M.A. Kroeck. 2000. Enteric helminths of the shortfin squid *Illex argentinus* in San Matías Gulf (Argentina) as stock discriminants. *Acta Parasitologica* 45 (2): 89-93.
- Guagliardo, S.E. 2003. *Estudio sistemático, biológico y ecológico de los cestodes tripanorricos (eucestoda; trypanorhyncha) parásitos de peces marinos en el área de Bahía Blanca.* (Tesis doctoral). Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca.
- Guagliardo, S.E., De Salvo, M.N., Schwerdt, C.B., Galeano, N. & R.D. Tanzola. 2009. Anisákidos del savorín, *Seriolella porosa* (Pisces: Centrolophidae). Análisis de la interacción parásito-hospedador. *BioScriba* 2(2): 106-114.

- Gutiérrez, R.O. 1943. Sobre la morfología de una nueva especie de *Contracaecum*. *Revista Brasileira de Biología* 3(2): 159-172
- Hamann, M. I. 1999. Ecological aspects between *Contracaecum* sp. (Nematoda, Anisakidae) and the host *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1860 (Pisces, Characidae) in natural populations of northeastern Argentina. *Boletín Chileno de Parasitología* 54 (3-4):74-82.
- Harnett, W. & M.M. Harnett. 2006. Molecular basis of worm-induced immunomodulation. *Parasite Immunology* 28: 535-543.
- Hatwich, G. 1964. Die Typen Parasitischer Nematoda in der Helminthen-Sammlung des Zoologischen Museums in Berlin. I. Ascaridoidea *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum* 40 : 1-53.
- Na, H.K.; Seo, M.; Chai, J-Y.; Lee, E.K. & S.M Jeon. 2013. A Case of Anisakidosis Caused by *Pseudoterranova decipiens* Larva. *The Korean Journal of Parasitology* 51(1): 115-117
- . Hauck, A.K. 1977. Occurrence and survival of the larval nematode *Anisakis* sp. in the flesh of fresh, frozen, brined, and smoked Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. *The Journal of Parasitology* 63(3): 515-519.
- Herreras, M.V.; Aznar, F.J.; Balbuena, J.A. & J.A, Raga. 2000. Anisakid Larvae in the Musculature of the Argentinean Hake, *Merluccius hubbsi*. *Journal of Food Protection* 8 : 1015-1153.
- Hiramatsu, K.; Kamiyamamoto, S.; Ogino, H.; Satomura, Y.; Konishi, K. ; Miwa, A.; Demachi, H. & Y. Noda 2004. A case of acute gastric anisakiasis presenting with malignant tumor-like features: a large gastric vanishing

- tumor accompanied by local lymph node swelling. *Digestive Diseases and Sciences* 49(6): 965-969.
- Hoffmeyer, M.S. 2004. Decadal change in zooplankton seasonal succession in the Bahía Blanca Estuary, Argentina, following introduction of two zooplankton species. *Journal of Plankton Research* 26(2): 1-9.
- Hotez, O.; Cappello, M.; Hawdon, J.; Bckers, C. & J. Sakanari. 1994. Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*. Possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *The Journal of Infectious Diseases* 170: 918-926.
- Huang, W. 1990. Methodes de recherché de larves d'Anisakides dans les poissons marins. Possibilites d'application a l'inspection des poissons commercialises en region parisienne. *Recueil de médecine vétérinaire* 166: 895-900.
- Huss, H.H. 1997. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. Roma. Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion (FAO). Documento Técnico de Pesca 334. p 37-43.
- International Commission on Zoological Nomenclature, 1999. International Code of Zoological Nomenclature. International Trust for Zoological Nomenclature.
- Iglesias, R.; Leiro, J.; Ubeira, F.M.; Santamarina, M. T. & M.L. Sanmartín. 1993. *Anisakis simplex*: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunology* 15: 243-250.

- Iglesias, L.; Valero, A.; Gálvez, L.; Benitez, R. & J. Adroher. 2002. *In vitro* cultivation de *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda : Anisakidae) from 3rd-stage larvae to egg-laying adults. *Parasitology* 125: 467-475.
- Ikeda, K.; Kumashiro, R. & T. Kifune. 1989. Nine cases of acute gastric anisakiasis. *Gastrointestinal Endoscopy* 35: 305-308.
- Incorvaia, I. S. & J. M. Díaz de Astarloa. 1998. Estudio preliminar de las larvas (Nematoda: Ascaridida) parásito de *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) y *Paralichthys patagonicus* (Pisces: Pleuronectiformes). *Boletín Chileno de Parasitología* 53: 38-42.
- Incorvaia, I.S. & D. R. Hernández. 2001. Utilización de los nematodos parásitos como indicadores de la merluza de cola, *Macruronus magellanicus*. *INIDEP Informe Técnico* N° 52, 14 pp.
- Jofre Morales, L.; Neira O.P.; Noemi H.I. & J.L. Cerva C. 2008. Pseudoterranovosis y sushi. *Revista Chilena de Infectología* 25(3): 200-206.
- Jones, R.E.; Deardorff, T.L. & G. Stephen. 1990. *Anisakis simplex*: Histopathological changes in experimentally infected CBA/J mice, *Experimental Parasitology* 70(3) : 305-313.
- Jörg, M. E. 2000. Anisakidosis: relato de un caso humano en III Congreso Argentino de Parasitología. Tomo II. Mar del Plata, 514 pp.
- Karl, H.; Roepstorff, A.; Huss, H.H. & B. Bloemsma. 1994. Survival of *Anisakis* larvae in marinated herring fillets. *International Journal of Food Science & Technology* 29(6): 661-670.

- Karl, H. ; Baumann, F. ; Ostermeyer, U. ; Kuhn T. & S. Klimpel. 2011. *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Diseases of Aquatic Organisms* 94, 201–209.
- Koie, M. 1993. Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Zoology* 71: 1289-1296.
- Koie, M. & H.P. Fagerholm. 1995. The life cycle of *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802) *sensu strictu* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in view of experimental infections. *Parasitology Reserch* 81:481–48.
- Klimpel, S.; Kleinertz, S.; Hanel, R. & S. Rückert. (2007). Genetic variability in *Hysterothylacium aduncum*, a raphidascarid nematode isolated from sprat (*Sprattus sprattus*) of different geographical areas of the northeastern Atlantic. *Parasitology Research* 101:1425–1430.
- Kloser, H. & J. Plötz. 1992. Morphological distinction between adult *Contracaecum radiatum* and *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Anisakidae) from the Weddell seal (*Leptonychotes weddelli*). *Zoologica Scripta* 21(2): 129-132.
- Koyama, T.; Kobayashi, A. ; Kumada, M. ; Komiya, Y. ; Oshima, T. ; Kagei, N. ; Ishii, T. & M. Mashida. 1969. Morphological and taxonomical studies on Anisakidae larvae found in marine fishes and squids. *Japanese Journal of Parasitology* 18: 466-487.

- Labriola, J.B. & D.M. Suriano. 1995. Helminths parasites of birds (Ardeidae) of the Laguna de Monte, Argentina. *Parasitología al Día* 19: 324.
- Labriola, J.B. & D.M. Suriano. 1996. Parasitic Nematodes of Birds from De Monte Pond, Buenos Aires, Argentina. *Boletín Chileno de Parasitología* 51: 59-65.
- Lanfranchi, A.L. & N.H. Sardella. 2010. Anisakids survival after microwaving, freezing and salting fish from Argentina. *Food Science and Technology Research* 16: 499 - 504.
- Levsen, A. ; Tore Lunestad, B. & B. Berland. 2005. Low Detection Efficiency of Candling as a Commonly Recommended Inspection Method for Nematode Larvae in the Flesh of Pelagic Fish. *Journal of food Protection* 68(4): 828-832.
- López Cazorla, A. 1996. The food of *Cynoscion striatus* (Cuvier) (Pisces: Sciaenidae) in the Bahía Blanca area, Argentina. *Fisheries Research* 28: 371-379.
- López Cazorla, A. 2000. Age structure of the population of weakfish *Cynoscion guatucupa* (Cuvier) in the Bahía Blanca waters, Argentina. *Fisheries Research* 46: 279-286.
- López Cazorla, A. 2004. Peces. p191-201. In: Piccolo, MC y Hoffmeyer, M.S (Eds) Ecosistemas del Estuario de Bahía Blanca. Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina.

- López, H.; Baigun, C.; Iwaszkiw, J.; Delfino, R. & O. Padín. 2001. La cuenca del salado: uso y posibilidades de sus recursos pesqueros. EDULP, La Plata, 60pp.
- López, H. & M. García. 2001. Aspectos históricos e importancia regional del pejerrey bonaerense, p.15-20. In: Grosmann F. (ed.) Fundamentos Biológicos, Económicos y Sociales para una Correcta Gestión del Recurso Pejerrey. Editora Astyanax, Azul, Buenos Aires, Argentina.
- López, H.L.; García, M.L. & C. Togo. 1991. Bibliografía de los pejerreyes argentinos de agua dulce. En: Situación ambiental de la Provincia de Buenos Aires. A. Recursos y rasgos naturales en la evaluación ambiental. CIC I (6): 1-72.
- López, I. & M.A. Pardo. 2010. Evaluation of real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Anisakis simplex* parasite as a food-borne allergen source in seafood products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 1469-1477.
- López Peñas, D.; Ramírez Ortiz, ML.; del Rosal Palomeque, R.; López Rubio, F.; Fernández Crehuet, R. & G. Miño Fugarolas. 2000. Estudio de 13 casos de anisakidosis en la provincia de Córdoba. *Medicina Clínica* 5: 177-180.
- Lymbery, A.J. & F.Y. Cheah. 2007. Anisakid Nematodes and Anisakiasis. In: *Food Borne Parasitic Zoonoses: Fish and Plant-Borne Parasites*. Murrel, D, Fried, B. (eds). Springer, New York, pp 185-207.
- Lyons, J.M.; Ito, Jr J.I.; Pena, A.S. & S.A Morré. 2005. Differences in growth characteristics and elementary body associated cytotoxicity between

- Chlamydia trachomatis* oculogenital serovars D and H and *Chlamydia muridarum*. *Journal of Clinical Pathology* 58: 397-401.
- Mac Donagh, E. 1928. Estudio preliminar de la ecología del pejerrey en las lagunas Del Monte y Cochicó (Guamini). *Anales de la Oficina de Química, La Plata*. 1(2): 1-39.
- Malagón, D.; Benítez, R.; Adroher, F.J. & M.Díaz-López. 2011. Proteolytic activity in *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae), a fish gastrointestinal parasite of worldwide distribution. *Veterinary Parasitology* 183 : 95- 102.
- Mancini, M. & F. Grosman. 2008. *El pejerrey de las lagunas pampeanas: Análisis de casos tendientes a una gestión integral de las pesquerías*. Universidad Nacional de Río Cuarto-Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Eds), Río Cuarto, pp 446.
- Mancini, M.; Nicola, I.; Larriestra, A.; Salinas, V. & C. Bucco. 2005. Patrones de riesgo e implicancias de la presencia de *Contracaecum* sp. (Nematoda. Anisakidae) en pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinopsidae). *Biología Acuática* 22: 197-202.
- Mancini, M.; Bucco, C.; Salinas, V.; Larriestra, A.; Tanzola, R.D. & S.E. Guagliardo. 2008. Seasonal variation of parasitism in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes, Atherinopsidae) from la Viña reservoir (Córdoba. Argentina). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 17(1): 28-32.

- Matheu, V.; Navikas, V. & S. Issazadeh. 2001. Susceptibilidad de la cepa murina B10.RIII a padecer enfermedad inflamatoria alérgica pulmonar. Un modelo murino de asma. *Alergología e Inmunología Clínica* 16: 282-290.
- Mattiucci, S.; Cianchi, R.; Nascetti, G.; Paggi, L.; Sardella, N.; Timi, J.; Webb, S.C.; Bastida, R.; Rodríguez, D. & L. Bullini. 2003. Genetic evidence for two sibling species within *Contraecaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. *Systematic Parasitology* 54(1): 13-23.
- Mattiucci, S. & G. Nascetti. 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology* 66: 147-148.
- Mattiucci, S.; Paoletti, M. & S.C. Webb. 2009. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology* 74, 199-217.
- Mac Donagh, E.J. (1928). Estudio preliminar de la ecología del pejerrey en las Lagunas del Monte y Cochicó (Guaminí). *Anales de la Oficina Química* 1 (2): 1-40.
- MacKenzie, K. & M. Longshaw. 1995. Parasites of the hakes *Merluccius australis* and *M. hubbsi* in the waters around the Falkland Islands, southern Chile, and Argentina, with an assessment of their potential value as biological tags. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52(1): 213-224.

- Menghi, C.I.; Comunale, E. & C.L. Gatta. 2011. Anisakiosis: primer diagnóstico en Buenos Aires, Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 31: 71-73.
- Melo, W.D. 2004. Orígenes morfológicos. In: Piccolo, MC y Hoffmeyer, M.S (Eds). Ecosistemas del Estuario de Bahía Blanca. Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina.
- Morales, G. & L. Pino 1987. Parasitología Cuantitativa. Fundación Fondo Ed. Acta Científica Venezolana, Caracas; 132 pp.
- Moravec, F. 1998. Nematodes of freshwater fishes of the Neotropical Region. *Academia Praha Czech Republic*, 464 pp.
- Moravec, F. 2009. Experimental studies on the development of *Contracaecum rudolphii* (Nematoda: Anisakidae) in copepod and fish paratenic hosts. *Folia Parasitologica* 56: 185-193.
- Moravec, F. ; Urawa, S. & Coria, C. O. 1997. *Hysterothylacium patagonense* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from freshwater fishes in Patagonia, Argentina, with a key to the species of *Hysterothylacium* in American freshwater fishes. *Systematic Parasitology* 36: 31-38.
- Mossali, C.; Palermo, S.; Capra, M.; Piccolo, G.; Botti, S.; Bandi, C.; D'Amelio, S. & E. Giuffra. 2010. Sensitive detection and quantification of *Anisakis* parasite residues in food products. *Foodborne Pathogens and Disease* 7: 391-397.

- Mudry, J.; Lefebvre, P.; Dei-Cas, E.; Vernes, A.; Poirriez J. & M. Debat. 1982. Anisakiase humaine: 5 cas dans le nord de la France. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 10: 83-87.
- Na, H.K.; Seo, M.; Chai, J.Y.; Lee, E.K. & S.M. Jeon. 2013. A case of anisakidosis caused by *Pseudoterranova decipiens* larva. *Korean Journal of Parasitology* 51(1): 115-117.
- Navone, G.T.; Etchegoin, J.A. & F. Cremonte. 2000. *Contracaecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakidae) from *Egretta alba* (Aves: Ardeidae), and comments on other species of genus in Argentina. *Journal of Parasitology* 86: 807-810.
- Navone, G.T.; Sardella, N.H. & J.T. Timi. 1998. Larvae and adults of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda: Anisakidae) in fishes and crustaceans in the South West Atlantic. *Parasite* 5: 127-136.
- Nigmatullin, Ch.M. & O.A. Shukhgálder 1990. Helminthofauna y aspectos ecológicos de las relaciones parasitarias del calamar (*Illex argentinus*) en el Atlántico Sudoccidental. *Frente Marítimo* 7A: 57-68.
- Noh, J.H.; Kim, B.J.; Kim, S.M.; Ock, M.S.; Park, M.I. & J.Y. Goo. 2003. A case of acute gastric anisakiasis provoking severe clinical problems by multiple infection. *The Korean Journal of Parasitology* 41: 97-100.
- Norris D.E. & Overstreet R.M. 1976. The Public health implications of larval *Thynnascaris* nematodes from shellfish. *Journal of Milk and Food Technology* 39(1): 47-54.

- Overstreet, R.M. & Meyer G.W. 1981. Hemorrhagic lesions in stomach of *Rhesus monkey* caused by a piscine ascaridoid nematode. *Journal of Parasitology* 67(2): 226-235.
- Ortubay, S.G.; Semenas, L.G.; Úbeda, C.A.; Quaggiotto, A.E. & G. P. Viozzi. 1994. *Catálogo de peces dulceacuícolas de la Patagonia Argentina y sus parásitos metazoos*. Dirección de Pesca, Subsecretaría de Recursos Naturales, Provincia de Río Negro, Argentina, 110 pp.
- Paterson, J.C.M.; Garside, P.; Kennedy, M.W. & C.E. Lawrence. 2002. Modulation of a Heterologous Immune Response by the Products of *Ascaris suum*. *Infection and Immunity* 70(11): 6058-6067.
- Pazos G.E.; Laurenti S. & J.E. Díaz. 2003. Helmintofauna del pingüino de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) en Península Valdés, Provincia del Chubut. Resultados Preliminares. *Historia Natural* (2° Serie) II, 85-94.
- Pelegrini, M.; Occhini, R.; Tordini, G.; Vindigni, C.; Russo, S. & G. Marzocca. 2005. Acute abdomen due to small bowel anisakiasis. *Digestive and Liver Disease* 37: 65-67.
- Pereira Bueno, J.M. 1993. Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiosis. Monografía de la Consejería de Sanidad y Bienestar Social, Junta de Castilla y León, 64 pp.
- Perillo, G.M.E.; Piccolo, M.C.; Parodi, E. & R.H. Freije. 2001 The Bahía Blanca Estuary, Argentina. *En: Seeliger U. & B Kjerfve (eds.). Coastal Marine Ecosystems of Latin America. Ecological Studies* 144: 205-217.

- Peterguer M.J. & C. Cuéllar. 1998. Isotype-Specific Immune Responses in Murine Experimental Anisakiasis. *Journal of Veterinary Medicine B* 45: 603-610.
- Petersen, F.; Palm, H.; Moller, H. & M.A. Cuzi. 1993. Flesh parasites of fish from central Philippine waters. *Diseases of Aquatic Organisms* 15: 81-86.
- Petter A.J. & J. Cabaret. 1995. Ascaridoid nematodes of teleostean fishes from the eastern north Atlantic and seas of the north of Europe. *Parasite* 2: 217-230.
- Piccolo, M.C. & G.M. E. Perillo. 1990. Physical characteristics of the Bahia Blanca Estuary (Argentina). *Estuarine and Coastal Shelf Sciences* 31: 303-324.
- Pietroock M. & D.J. Marcogliese. 2003. Free-living endohelminth stages: at the mercy of environmental conditions. *Trends in Parasitology* 19(7): 293-299.
- Plath, F.; Holle, A.; Zende, D.; Möller, F.W.; Barten, M.; Reisinger, E.C. & S. Liebe. 2001. Anisakiasis of the stomach a case report from Germany. *Zeitschrift Für Gastroenterologie* 39(2): 177-180.
- Poulin, R. 2007. *Evolutionary Ecology of Parasites*. Second Edition. Princeton University Press, New Jersey.
- Purello D'Ambrosio, F.; Pastorello, E.; Gangemi, S.; Lombardo, G.; Ricciardi, L.; Fogliani, O. & R.A. Meredino. 2000. incidente of sensitivity to Anisakis simples in a risk population of fishermen/fishmorngrers. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 84: 439-444.

- Quijada, J.; Lima dos Santos, C.A. & N. Avdalov. 2005. Enfermedades parasitarias por consumo de pescado. Incidencia en América Latina. Infopesca Internacional N° 24.
- Quirós, R.; Rosso, J.J.; Rennella, A.; Sosnovsky, A. & M. Boveri. 2002. Análisis del estado trófico de las lagunas Pampeanas (Argentina). *Interciencia* 27(1): 584-591.
- Ramakrishna, N.R. & M.D.B. Burt. 1991. Tissue response of fish to invasion by larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda: Ascaridoidea). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48(9): 1623-1628.
- Rello, F.J.; Adroher, F.J.; Benítez, R. & A. Valero. 2009. The fishing area as a possible indicator of the infection by anisakids in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) from southwestern Europe. *International Journal of Food Microbiology* 129: 277–281.
- Rello, F.J.; Adroher, F.J. & A. Valero. 2008. *Hysterothylacium aduncum*, the only anisakid parasite of sardines (*Sardina pilchardus*) from the southern and eastern coasts of Spain. *Parasitology Research* 104(1): 117-121.
- Revenga, J. & P. Scheinert. 1999. Infections by helminth parasites in “puyenes”, *Galaxias maculatus* (Galaxiidae, Salmoniformes), from Southern Argentina with special reference to *Tylodelphis bariloensis* (Digenea, Platyhelminthes). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94(5): 605-609.
- Ringuelet, R. 1942. Ecología alimenticia del pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) com notas limnológicas sobre la laguna de Chascomús. *Revista del Museo de La Plata. (n.s.) Sección Zoología* 2(17): 427-461.

- Ringuelet, R.A.; Arámburu, R.H. & A. Alonso de Arámburu. 1967. Los peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, 602 pp.
- Roongruangchai, J.; Tamepattanapongsa, A. & K. Roongruangchai. 2012. Light and Transmission Electron Microscopic Studies of the Third Stage Larvae of *Anisakis simplex*. *Sriraj Medical Journal* 64 (1): S72-S77.
- Ronquist, F. & J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under 270 mixed models. *Bioinformatics (Oxford England)* 19(12): 1572-1574.
- Rosales, M.J.; Mascaró, C.; Fernández, C.; Luque, C.; Sánchez Moreno, M.; Parra, L.; Cosano, A. & J.R. Muñoz. 1999. Acute intestinal anisakiasis in Spain: a Fourth-stage *Anisakis simplex* larva. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94(6): 823-826.
- Rosa da Cruz, A.; De Souza Souto, P.C.; Kusano Bucalen Ferrari, C.; Marques Alegretti, S. & W.W. Arrais-Silva. 2010. Endoscopic imaging of the first clinical case of anisakidosis in Brazil. *Scientica Parasitologica* 11(2): 97-100.
- Rossin, M.A.; Datri, L.L.; Incorvaia, I.S & J.T. Timi. 2011. A new species of *Hysterothylacium* (Ascaridoidea, Anisakidae) parasitic in *Zenopsis conchifer* (Zeiformes, Zeidae) from Argentinean waters. *Acta Parasitologica* 56(3): 310-314.
- Ruarte, C.O. & M.B. Sáez. 2008. Estudio preliminar sobre la estructura de edades y el crecimiento de la pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*,

- Pisces, Sciaenidae) en el área sur de la provincia de Buenos Aires. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* 19: 37-44.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4): 406-425.
- Saad, C.D. & Luque, J.L. 2009. Larval Anisakidae in musculature of *Pagrus pagrus* from the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 18: 71-73.
- Sakanari, J.A; Loinaz, M.; Deardorff, T.; Raybourne, R.B.; Mckenrrow, J.H. & G. Pierson. 1988. Intestinal Anisakiasis. A case diagnosed by morphologic and immunologic methods. *American Journal of Clinical Pathology* 90(1): 107-113.
- Sakanari J.A & J.H. McKerrow. 1989. Anisakiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 2: 278-284.
- Sapunar, J.; Doerr, E. & T. Letonja. 1976. Anisakiasis humana en Chile. *Boletín Chileno de parasitología* 31: 79-83.
- Sanhueza, C. 2002. Parasitofauna del pejerrey *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes, 1835) (Pisces: Atherinidae), en el estuario de Bahía Blanca. Tesina de licenciatura. DBByF. Universidad Nacional del Sur.
- Santo Padovani. R.E.; Knoff, M.; São Clemente, S.E.; Marques de Mesquita, E.F. & E. F. Oliveira. 2005. The effect of *in vitro* gamma radiation on Anisakis sp. larvae collected from the pink cusk-eel *Genypterus brasiliensis* Regan, 1903. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária* 12: 137-141.

- Sardella, N.H.; Avendaño M.F. & J.T. Timi. 1998. Parasite communities of *Genypterus blacodes* and *G. brasiliensis* (Pisces: Ophidiidae) from Argentina. *Helminthologia* 35: 209-219.
- Sardella, N.H. & J.T. Timi. 1996. Parasite communities of *Merluccius hubbsi* from the Argentinian-Uruguayan common fishing zone. *Fisheries Research* 27: 81-88.
- Sardella, N.H. & J.T. Timi. 2004. Parasites of Argentine hake in the Argentine Sea: population and infracommunity structure as evidence for host stock discrimination. *Journal of Fish Biology* 65: 1472-1488.
- Sardiña, P. & A. López Cazola. 2005. Feeding habits of the juvenile striped weakfish, *Cynoscion guatucupa* Cuvier 1830, in Bahía Blanca estuary (Argentina): seasonal and ontogenetic changes. *Hidrobiología* 532: 23 - 38.
- Schuurmans Stekhoven, J.H. 1950. Nematodos parasitarios del Chaco Paraguayo y de Argentina. *Acta Zoológica Lilloana* 9: 325-345.
- Schwerdt, M. & A. López Cazorla. 2009. Ambientes y recursos naturales del sudoeste bonaerense. Producción, contaminación y conservación. Bahía Blanca. Ediuns, 514 pp.
- Shalaby, H.A.; Abdel-Shafy, S.; Abdel-Rahman, K.A. & A.A. Derbala. 2009. Comparative in vitro effect of artemether and albendazole on adult *Toxocaracanis*. *Parasitology Research* 105: 967-976.
- Shamsi, S. & A.R. Butcher. 2011. First report of human anisakidosis in Australia. *The Medical Journal of Australia* 194(4): 199-200.

- Shamsi, S.; Norman R.; Gasser, R. & I. Beveridge. 2009. Redescription and genetic characterization of selected *Contracaecum* spp. (Nematoda: Anisakidae) from various hosts in Australia. *Parasitology Research* 104(6): 1507-1525.
- Shiraki, T. 1974. Larval nematodes of family Anisakidae (Nematoda) in the northern Sea of Japan as a causative agent of eosinophilic phlegmone or granuloma in the human gastro-intestinal tract. *Acta Medica et Biologica* 22: 57-98
- Silva, M.E.R. & J. C. Eiras. 2003. Occurrence of *Anisakis* sp. in fishes off the Portuguese West coast and evaluation of its zoonotic potential. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 23(1): 13-17.
- Smith, J.W. 1984. The abundance of *Anisakis simplex* L3 in the body cavity and flesh of marine. *International Journal for Parasitology* 14 (5): 491-495.
- Smith, J.W. 1999. Ascaridoid Nematodes and Pathology of the Alimentary Tract and its Associated Organs in Vertebrates, including Man: A Literature Review. *Helminthological Abstracts* 68 (2): 49-96.
- Smith, J.W. & R. Wootten. 1978. *Anisakis* and Anisakiasis. *Advances in Parasitology* 16: 93-163.
- Smith, J.W. & W. Hemmingsen. 2003. Atlantic cod *Gadus morhua* L.: visceral organ topography and the asymmetrical distribution of larval ascaridoid nematodes in the musculature. *Ophelia* 57: 137-144.
- Stretton, A.O.W. 1976. Anatomy and development of the somatic musculature of the nematode *Ascaris*. *The Journal of Experimental Biology* 64: 773-788.

- Strom, S.B.; Haarder, S.; Korbut, R.; Mejer, H.; Thamsborg, S.M.; P. W. Kania & K. Buchmann. 2015. Third-stage nematode larvae of *Contracaecum osculatum* from Baltic cod (*Gadus morhua*) elicit eosinophilic granulomatous reactions when penetrating the stomach mucosa of pigs. *Parasitology Reserch* 114: 1217-1220.
- Suzuki, J.; Murata, R.; Hosaka, M. & J. Araki. 2010. Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *International Journal of Food Microbiology* 137: 88-93.
- Szidat, L. 1955. La fauna de parásitos de *Merluccius hubbsi* como carácter auxiliar para la solución de problemas sistemáticos y zoogeográficos del género *Merluccius* L. Comunicaciones del Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales y Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" Zoología Tomo III N° 1, 54 pp.
- Szidat, L. 1961. Versuch einer Zoogeographie des Sud-Atlantic mit Hilfe von Leitparasiten der Meeresfische. *Parasitologische Schriftenreihe* 13: 1-98. (En alemán).
- Szidat, L. 1969. Los parásitos de la palometa *Parona signata* (Jenyns, 1842) Berg, 1895 y su aplicación a problemas zoogeográficos del Atlántico Sur. *Neotropica* 15(48): 125-131.
- Szidat, L. & A. Nani (1951). Diplostomiasis cerebrealis del pejerrey. *Revista del Instituto Nacional de Investigaciones de las Ciencias naturales. Ciencias Zoológicas* 1(8): 324-384.

- Takabe, K.; Ohki, S.; Kunihiro, O.; Sakashita, T.; Endo, I.; Ichikawa, Y.; Sekido, H.; Amano, T.; Nakatani, Y.; Suzuki, K. & Shimada, H. 1998. Anisakidosis: A cause of intestinal obstruction from eating sushi. *American Journal of Gastroenterology* 93: 1172-1173.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tanzola, R.D. 2009. Anisakidosis en Argentina. Situación actual y perspectivas. En "Clínicas infectológicas del Hospital F.J. Muniz. Seijo, de Vedia, Corti, Metta (eds.) 235-239.
- Tanzola, R.D. 2011. La migración larval: clave para el desarrollo de anisakidosis humana. En "Temas de Zoonosis V" 488 pp. Asociación Argentina de Zoonosis (ed.) vol. 8, cap. 47: 415-419.
- Tanzola, R.D. & S.E. Guagliardo. 2000. Helminth fauna of the Argentine conger, *Conger orbignyanus* (Pisces: Anguilliformes). *Helminthologia* 37: 229-232.
- Tanzola, R.D.; Guagliardo, S.E.; Brizzola, S.M. & M.V. Arias. 1997. Helminth fauna of *Porichthys porosissimus* (Pisces: Batrachoidiformes) in the estuary of Bahía Blanca, Argentina. *Helminthologia* 34: 221-227.
- Tanzola, R.D.; Guagliardo, S.E.; Brizzola, S.M.; Arias, M.V. & S.E. Botte. 1998. Parasite assemblage of *Sympterygia bonapartei* (Pisces: Rajidae), and endemic skate of the Southwest Atlantic. *Helminthologia* 35: 123-129.

- Tanzola R.D. & S.E. Guagliardo. 2004. Nematodes anisákidos presentes en peces del área de Bahía Blanca y el riesgo potencial de anisakidosis humana. *Revista de la Asociación Médica de Bahía Blanca* 14(3): 67-73.
- Tanzola, R.D.; Guagliardo, S.E.; Romero, A.; Schwerdt, C.B.; Schwerdt, M. & N.A. Galeano. 2009. Ambientes y recursos naturales del sudoeste bonaerense. Producción, contaminación y conservación. Bahía Blanca. Ediuns, 514 pp.
- Timi, J.T. 2003. Parasites of Argentine anchovy in the south-west Atlantic: latitudinal patterns and their use for discrimination of host populations. *Journal of Fish Biology* 63: 90-107.
- Timi, J.T. & A.L. Lanfranchi. 2009. The metazoan parasite communities of the Argentinean sandperch *Pseudoperca semifasciata* (Pisces: Perciformes) and their use to elucidate the stock structure of the host. *Parasitology* 136: 1209-1219.
- Timi, J.T. & R. Poulin. 2003. Parasite community structure within and across host populations of a marine pelagic fish: how repeatable is it?. *International Journal for Parasitology* 33: 1353-1362.
- Timi, J.T.; Luque, J.L. & N.H. Sardella. 2005. Parasites of *Cynocion guatucupa* along South America Atlantic coasts: evidence for stock discrimination. *Journal of Fish Biology* 67: 1603-1618.
- Timi, J.T.; Sardella, N.H. & G.T. Navone. 2001. Parasitic nematodes of *Engraulis anchoita* Hubbs et Marini, 1935 (Pisces, Engraulidae) off the Argentine

- and Uruguayan coasts, South West Atlantic. *Acta Parasitologica* 46 (3): 186-193.
- U.S Food and Drug Administration. Manual Analítico Bacteriológico Capítulo 192001. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071468>.
- Van Thiel, PH. 1962. Anisakiasis. *Parasitology* 52:16-17.
- Vidal Martínez, V.M.; Osorio-Sarabia, D. & R.M. Overstreet. 1994. Experimental infection of *Contraecium multipapillatum* (Nematoda: Anisakinae) from Mexico in the domestic cat. *Journal of Parasitology* 80: 576-57.
- Yagi, K.; Nagasawa, K.; Ishikura, H.; Nakagawa, A.; Sato, N.; Kikuchi, K. & H. Ishikura. 1996. Female Worm *Hysterothylacium aduncum* Excreted from Human: A Case Report. *Japanese Journal of Parasitology* 45(1)12-23.
- Yamaguti, S. 1961. *Systema Helminthum. Vol. III. The Nematodes of Vertebrates*. Interscience Publishers, Inc. New York, 1261 pp.
- Watson, B.D. 1965. The fine structure of the body-wall and the growth of the cuticle in the adult nematode *Ascaris lumbricoides*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 106(1): 83-91.
- Watt, I.A.; Girdwood, R.A.; Mclean, N.R.; Kissen, L.H. & A.H.B. Fyfe. 1979. Eosinophilic Gastroenteritis associated with a larval anisakine nematode. *The Lancet* 314 (8148): 893-894.
- Williams, H. & A. Jones. 1994. Fish worm and man. In Williams, H. and A. Jones (ed), *Parasitic worms of fish*, London, United Kingdom.

Wöhler, O.C.; María, N.R.; Bergamaschi, N.J.; Martínez, P.A.; Incorvaia, S.I.; Manca, E.; Carrizo, J.C. & A.R. Giussi. 2001. Pesca experimental al Norte de los 48°S, entre la milla 170 y la isobata 1000 metros. *INIDEP Informe Técnico N° 44*, 36 pp.