

Neotropical Helminthology, 2022, 16(2), jul-dic:107-122.



Neotropical Helminthology



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

EVALUATION OF THE INVASIVE POTENTIAL OF L₃ JUVENILES OF THE *CONTRACAEUM OGMORHINI* JOHNSTON & MAWSON, 1941 COMPLEX (NEMATODA; ANISAKIDAE) IN AN EXPERIMENTAL MURINE MODEL

EVALUACIÓN DE LA POTENCIALIDAD INVASORA DE JUVENILES L₃ DEL COMPLEJO *CONTRACAEUM OGMORHINI* JOHNSTON & MAWSON, 1941 (NEMATODA; ANISAKIDAE) EN UN MODELO MURINO EXPERIMENTAL

Noelia Adelina Galeano¹; Silvia Elizabeth Guagliardo^{1,2}; Estefanía Tittarelli³; Edgardo Streitenberger³ & Ruben Daniel Tanzola^{1,2*}

¹Laboratorio de Parasitología y Patología de Organismos Acuáticos, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Argentina.

²Instituto de Investigaciones Biológicas y Biomédicas del Sur, INBIOSUR/UNS-CONICET, Bahía Blanca, Argentina.

³Depto. de Genética y Biología Molecular, IACA Laboratorios, Bahía Blanca. Argentina.

*Corresponding author: rtanzola@uns.edu.ar

Noelia Adelina Galeano: <https://orcid.org/0000-0002-5496-4396>

Silvia Elizabeth Guagliardo: <http://orcid.org/0000-0002-9565-8344>

Estefanía Tittarelli: <https://orcid.org/0000-0002-6882-6621>

Edgardo Streitenberger: <https://orcid.org/0000-0001-6453-9257>

Ruben Daniel Tanzola: <https://orcid.org/0000-0003-4154-3063>

ABSTRACT

Bibliography indicates that the larvae of the genus *Contracaecum* are of zoonotic importance. These papers are based on a single clinical case whose conclusions are doubtful and should be confirmed. In the present work, the results of experimental infections in Balb/cAnN mice, with L₃ juvenile of the *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 complex, are reported. The helminths were obtained in the stripped weakfish, *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830), the second most important commercial fishery resource in Argentina. The parasites were characterized by morphological and molecular criteria. Their population descriptors were established on a sample of 112 hosts. The potential for migration to the skeletal muscle of the fishes was evaluated and the background on experimental infection of *Contracaecum* spp. in mammalian hosts is discussed. It is concluded that the third-stage juveniles (L₃) of the *C. ogmorhini* complex, can cause injury in humans only if well defined conditions are met, including that the L₃ migrate naturally to the host's musculature (unproven event), that remain viable after gastric digestion by the host and that finds immunological conditions that allow its survival in the digestive tract of the mammal host.

Keywords: Anisakidosis – Balb/cAnN – *Contracaecum* – experimental model – pathogenicity

Este artículo es publicado por la revista *Neotropical Helminthology* de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú auspiciado por la Asociación Peruana de Helmintología e Invertebrados Afines (APHIA). Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24039/rnh20221621481>

RESUMEN

Los antecedentes de la literatura señalan que las larvas del género *Contracaecum* revisten importancia zoonótica. Dichos trabajos están basados en un único caso clínico cuyas conclusiones son dudosas y deberían confirmarse. En el presente trabajo se comunican los resultados de ensayos experimentales en ratones Balb/cAnN, infestados con juveniles de tercer estadio (L₃) del complejo *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941, obtenidas en la pescadilla de red, *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830), segundo recurso pesquero en importancia comercial de Argentina. Los parásitos se caracterizaron por criterios morfológicos y moleculares. Se establecieron sus descriptores poblacionales sobre una muestra de 112 hospedadores. Se evaluó el potencial de migración al músculo esquelético de la pescadilla. Se discuten los antecedentes sobre infestación experimental de *Contracaecum* spp. en hospedadores mamíferos. Se concluye que los juveniles de tercer estadio (L₃) del complejo *C. ogmorhini* parásitos de la pescadilla de red pueden provocar lesión en el humano solo si se cumplen condiciones muy definidas, entre ellas que las L₃ migren de modo natural a la musculatura del hospedador (evento no comprobado), que permanezcan viables tras la digestión estomacal del hospedador, que encuentre condiciones inmunológicas que permitan su sobrevida en el tubo digestivo del mamífero hospedador.

Palabras clave: Anisakidosis – Balb/cAnN – *Contracaecum* – Modelo experimental – Patogenicidad

INTRODUCCIÓN

Los productos de la pesca a nivel mundial, ocupan un lugar primordial en la alimentación humana como aporte de proteína (Sakanari *et al.*, 1995). Sin embargo, las malas prácticas de higiene de los alimentos suponen un riesgo en salud pública. La presencia de parásitos en el pescado es un fenómeno generalizado e imposible de eliminar de las poblaciones silvestres, porque los factores ecológicos que determinan las infecciones parasitarias, escapan del control humano. Entre las enfermedades zoonóticas transmitidas por alimentos se destaca la anisakidosis, debida al consumo de peces y cefalópodos crudos (Ishikura *et al.*, 1993). Los agentes etiológicos son nematodos de la familia Anisakidae, entre los que la literatura mundial reconoce principalmente larvas pertenecientes a los géneros *Anisakis* Dujardin, 1845; *Pseudoterranova* Mozgovoi, 1951, y en menor grado *Contracaecum* Raillet & Henry, 1912 e *Hysterothylacium* Ward & Magath, 1916 (Oshima, 1972; Jackson, 1975; Norris & Overstreet, 1976; Oshima, 1987; Yagi *et al.*, 1996; Audicana *et al.*, 2002; Audicana & Kennedy, 2008; Degese *et al.*, 2019; Morozinska-Gogol, 2019).

La mayoría de las citas sobre anisakidosis por *Contracaecum* spp. están basadas en un caso humano por larvas de *Contracaecum osculatum*

Rudolphi, 1802 en el mar Báltico (Schaum & Müller, 1967). Este antecedente ha sido referido en numerosas publicaciones posteriores (Myers, 1975; Acha & Szyfres, 1977; Cheng, 1978; Sakanari & McKerrow, 1989, Angot & Brasseur, 1993; Myjak *et al.*, 1994; Field-Cortazares & Calderón-Campos, 2009). Sin embargo, de la lectura de Schaum & Müller (*op. cit.*), así como por el grado de deterioro del espécimen en sus cortes histológicos, no es posible confirmar que se trate de larvas de *Contracaecum* ni mucho menos de la especie *C. osculatum*. De hecho, podría tratarse también de larvas de *Anisakis* sp. o de *Pseudoterranova* sp. (Petter, 1969; Shiraki, 1974). Angot & Brasseur (1995) opinan que dado que las larvas de *Contracaecum* spp. en peces, parasitan los mesenterios y cavidad visceral, y su localización muscular es accidental, “su patogenicidad, en humanos, queda por ser demostrada”. Sumado a esto, durante mucho tiempo, los trabajos de migración larvaria en mamíferos destacaron los ensayos experimentales de Cheng (1976) con larvas de *Contracaecum* spp. No obstante, la descripción morfológica y la presencia de L₄ y adultos en el mismo hospedador (*Gadus callarias* Linnaeus, 1758), indican que claramente pertenecerían al género *Hysterothylacium*. Lo cierto es que, hasta el presente, los eventos que imputan al género *Contracaecum* como agente causal de anisakidosis son escasos e imprecisos (Menghi *et al.*, 2011;

Shamsi & Butcher, 2011). Kliks (1983), con el término “anisakiasis transitoria”, designó una forma benigna, con expulsión por vía oral de larvas de *Pseudoterranova* sp. y de *Anisakis* sp. Tal podría ser el caso de los citados reportes de *Contracaecum* sp. en humanos. Procurando esclarecer su potencial invasor, en el presente trabajo se comunican los resultados de ensayos experimentales en ratones, infestados con larvas L₃ del complejo *Contracaecum ogmorhini*, Johnston & Mawson, 1941 obtenidas en la pescadilla de red, *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830) (Perciformes: Sciaenidae). Ruarte *et al.* (2004) señalan que la pescadilla de red es el segundo recurso en importancia comercial de Argentina, por tal motivo se ha elegido este hospedador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma y análisis de muestras

Fueron procesados 112 ejemplares adultos de *C. guatucupa* capturados entre 2009 y 2011 por la flota pesquera comercial que opera en el estuario de Bahía Blanca (38°44' S y 61°45' O), Argentina. Se evisceraron completamente antes de transcurridas ocho h post-captura. Se registraron la talla y el peso (total y eviscerado) en cm y g, respectivamente. Se examinaron macroscópicamente la superficie cutánea, branquial y oral; las vísceras dispuestas en la cavidad celómica y mesenterios. Los nematodos recolectados se fijaron y conservaron en etanol 70°, para estudios morfológicos, y etanol 96°, para estudios moleculares. Se calcularon los indicadores parasitarios prevalencia (P), intensidad media (IM) y abundancia media (AM), según Bush *et al.* (1997). Los valores de abundancia e intensidad se indican como el promedio y, entre paréntesis, el rango o amplitud y el error estándar de la media. Las medidas de los caracteres morfológicos están expresadas en milímetros (mm) como el promedio y el rango entre paréntesis, salvo que se indique otra unidad.

Se hallan depositados 12 especímenes L₃ voucher, conservados en alcohol etílico al 70%, en la colección de Helmintos de la División Zoología Invertebrados del Museo de La Plata bajo el número MLP- He 7769.

Identificación molecular

La obtención de ADN se realizó a partir de digestión enzimática de las larvas. Se colocaron las larvas en 200µL de solución fisiológica, se agregó igual volumen de MagnaPure DNA Tissue Lysis buffer (Roche®) y 20µL de proteinasa K. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a 56°C. Para inactivar la proteinasa K, la muestra fue sometida a 95°C por 10 min. Luego, el ADN se purificó utilizando un sistema automatizado MagnaPure Compact (Roche®), con un volumen final de elución de 50µL. 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). 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' de acuerdo a los procedimientos descriptos 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 µM de cada uno de los primers, en un volumen final de 25 µL. La PCR se realizó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems®) usando los siguientes parámetros de ciclo: 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. 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 kit de purificación PCR QIAquick (Qiagen®) y cuantificados con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®). El producto de PCR purificado se secuenció en ambos sentidos usando el kit BigDye Terminator v.1.1 de Applied Biosystem® en un volumen final de 20 µL, con una dilución de la master mix de 0,125X, 1µM de cada primer y 15 ng de producto de PCR. Los parámetros de ciclo 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.

Para analizar las relaciones filogenéticas, se buscaron secuencias del gen COX-2 depositadas

en la base de datos GenBank (NCBI). Se realizaron dos alineamientos distintos, uno general (44 secuencias) con el objetivo de visualizar la asociación entre la secuencia de la especie en estudio y las secuencias encontradas en GenBank. En un segundo alineamiento, más reducido (11 secuencias), se estudiaron asociaciones entre la secuencia en estudio y aquellas correspondientes a hospedadores mamíferos. Posteriormente, se alinearon las secuencias mediante el programa Muscle. Se utilizó el programa Jmodel Test para evaluar el modelo evolutivo que mejor aplicaba a nuestro alineamiento (Darriba *et al.*, 2012). Se realizaron los análisis filogenéticos aplicando distintos métodos: distancia o Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987), Máxima parsimonia (MP) a través del 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 MP se realizó consenso estricto (el 100% de los árboles más parsimoniosos encontrados presentan esa topología de ramas) y consenso mayoría (lo mismo, 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 de la misma se evaluó considerando un desvío estándar en las frecuencias de los clados menor a 0,01 y valores de población efectiva (ESS) mayor a 200. Valores que 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, en este método, fue evaluado mediante probabilidad *a posteriori*, considerando una rama confiable aquella con un valor mayor a 0,7. La visualización de los árboles obtenidos se realizó mediante el software FigTree v.1.4.2.

La secuencia de consenso obtenida (556 bp) fue depositada en GenBank bajo el número de acceso On854976.

Digestión enzimática del músculo estriado de *C. guatucupa*

Con el fin de comprobar la migración de las larvas desde la cavidad corporal hacia el músculo se tomaron muestras de musculatura ventral, dorsal y lateral de los peces en cuestión. Se procedió a su

digestión enzimática artificial. La solución digestora consistió en: solución salina de ácido clorhídrico (pH=1-2) con 10 g de Pepsina (riqueza 1:10.000) por L de solución salina. En un vaso de precipitado se introdujo la muestra de filete 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, se agitó con varilla de vidrio. El líquido resultante se observó bajo lupa estereoscópica.

Infestación en modelo murino

Se recolectaron larvas de *Contracaecum* sp. de la cavidad corporal de los peces. Se utilizaron para la infestación dos cepas de ratones, Balb/cAnN y CF1 de dos meses de vida y con un peso de aproximadamente 25 g. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del Depto. de Biología, Bioquímica y Farmacia bajo condiciones de temperatura controlada, entre 20 – 25°C, con periodos de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Las larvas fueron introducidas en el estómago de los ratones con una cánula de 15G que se encontraba sujeta a una jeringa de 5 mL y/o con pipeta plástica. Realizada la inoculación de las larvas se observó la materia fecal de los ratones durante las 24 h post-inoculación (PI).

Transcurrido el tiempo de infestación los ratones fueron sacrificados humanamente siguiendo los protocolos para la protección de los animales usados para la experimentación (UE 2010). Se disecó y observó bajo lupa estereoscópica el tubo digestivo de cada animal en toda su extensión para localizar la posible inserción de larvas. Como técnicas histológicas de rutina, los órganos fueron fijados en formalina 10% y en glutaraldehído 2,5% (en frío, para ser estudiados con microscopio electrónico de barrido) (Marca EVO 40 perteneciente al CCT/CONICET Bahía Blanca). El material fijado en glutaraldehído 2,5%, fue lavado en buffer y se procedió a la deshidratación en acetonas de 35°, 50°, 70°, 80°, 100°. Se realizó secado por punto crítico (Marca Polaroid) y posteriormente se metalizó con oro (Sputter coater, Pelco® 91000, 300 Å).

Para el análisis histopatológico se realizaron cortes a 5 µm teñidos con hematoxilina y eosina y tricrómico de Masson.

Aspectos éticos: Los autores señalan que se

cumplieron las normativas éticas nacionales e internacionales.

RESULTADOS

Identificación morfológica y molecular del parásito

Se examinaron 112 ejemplares (33 hembras, 60 machos y 19 individuos de sexo indeterminado) de *C. guatucupa*, cuyas talla y peso totales fueron

45,31 (25,7-53,2) cm y 792,94 (415-1.496) g, respectivamente. En ellos se encontró un total de 499 larvas identificadas morfológicamente *a priori* como *Contracaecum* sp. El 84,6% estaba asociado a los mesenterios y 15,4% libres en la cavidad celómica, con una prevalencia de 57,1%, abundancia media de 4,44 (0-9; 2,63) e intensidad promedio de 7,78 (1-12; 3,15).

Descripción del parásito (n=20)

Contracaecum sp. L₃

Los ejemplares fueron hallados libres o asociados

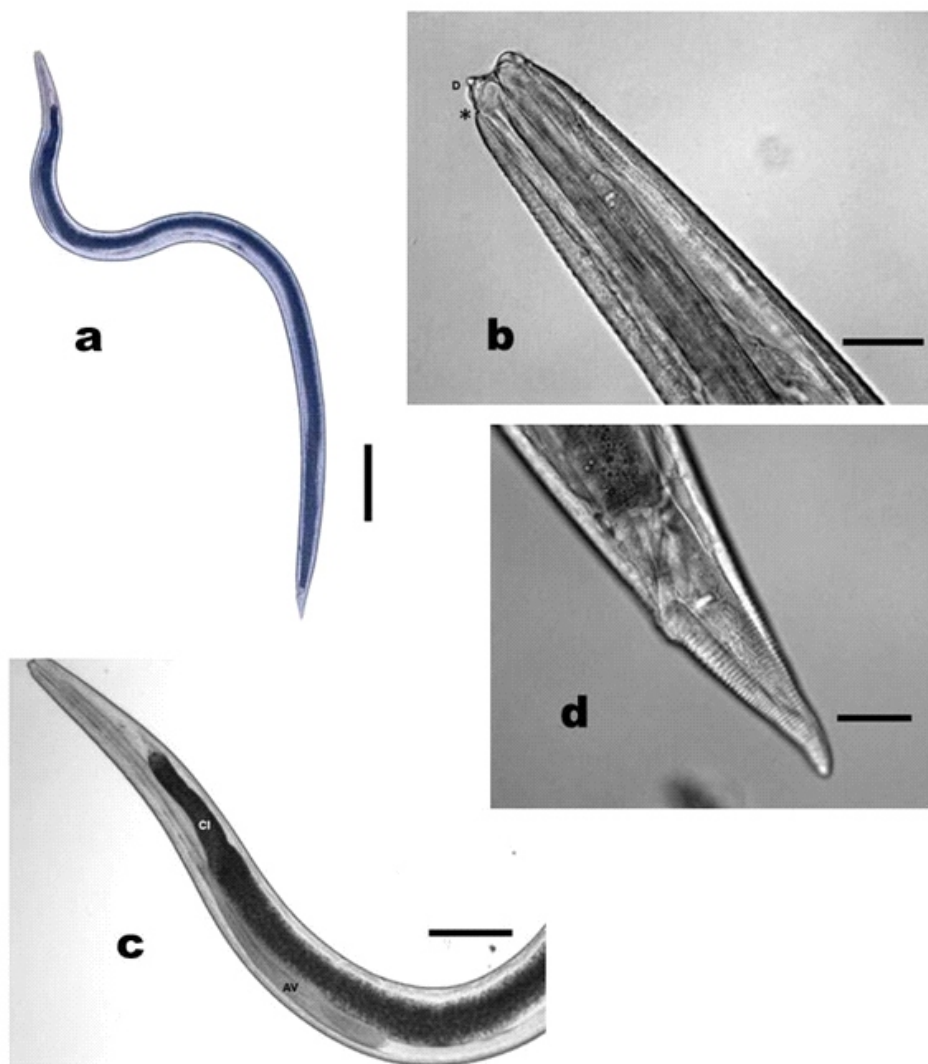


Figura 1. a) *Contracaecum* L₃ del complejo *C. ogmorhini* (*in toto*) de la cavidad visceral de *C. guatucupa*. Barra= 0,2 mm. b) Extremo anterior de la L₃, señalando el diente perforante (D) y ubicación del poro excretor (*). Barra= 0,05 mm. c) Detalle del apéndice ventricular (AV) y del ciego Intestinal (CI) de la L₃. Barra= 0,10 mm. d) Detalle del extremo caudal de la L₃. Barra= 0,05 mm

con otras formas parásitas en la cavidad celómica del hospedador en los mesenterios (Fig. 1a). Poseen una cutícula estriada transversalmente, con diminutas crestas longitudinales que recorren el cuerpo hasta la cola (Figs. 1b y 2). La longitud promedio de las larvas fue de 3,53 (2,72-4,65), con un ancho máximo de 0,130 (0,080-0,200). La boca está rodeada por tres primordios labiales y es notorio un diente larval, entre la posición de los futuros labios ventrolaterales y por delante del poro excretor. Poro excretor anterior e interlabial se ubica con respecto al extremo anterior a una distancia promedio de 0,015 (0,01-0,017). Ánfidos e interlabios no visibles. El anillo nervioso se encuentra a 0,185 (0,150-0,250) del extremo anterior. El esófago mide 0,44 (0,26-0,66) (Fig. 1c). El apéndice ventricular de 0,39 (0,3-0,66) de longitud promedio, se proyecta hacia la parte posterior desde el esófago. Ciego intestinal de 0,233 (0,15-0,39). Cola estriada, cónica y mide 0,10 (0,08-0,19). Fásmidos no visibles. No posee mucrón terminal (Fig. 1d).

Histología larval: Se observó en la superficie externa la cutícula, una capa homogénea de tonalidad rosada refringente que presenta una ornamentación externa dispuesta en pequeñas crestas longitudinales (Fig. 2). El espesor cuticular es de un promedio de 5,36 (3-6,73) μm . La relación

de proporción con respecto al diámetro corporal en determinados niveles indica 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, siendo el dorsal y ventral de menor desarrollo que los laterales. Cada cuadrante está constituido por aproximadamente 14 células musculares (contadas a nivel del 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.

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 la pescadilla de red fueron comparadas con las siguientes secuencias 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*,

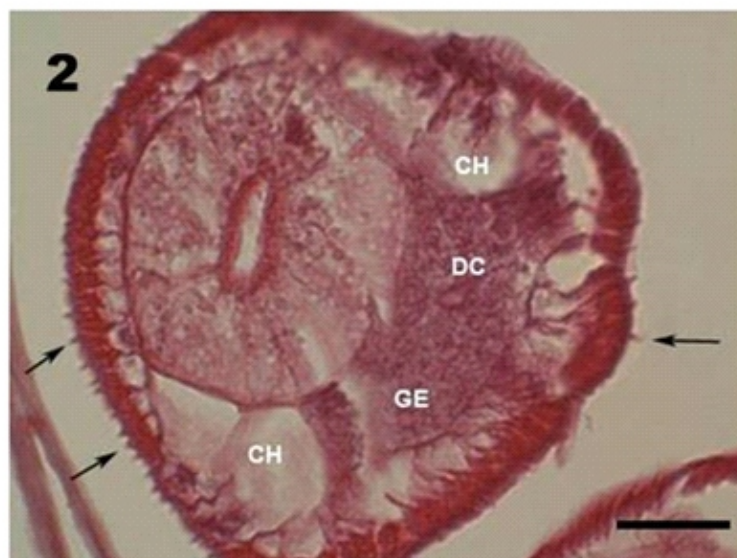


Figura 2. Corte transversal de la larva L₃ mostrando el detalle de estriás longitudinales (flechas), cordones hipodérmicos laterales (CH) y la glándula excretora (GE) con su ducto colector (DC). Hematoxilina y eosina. Barra: = 0,02 mm.

EU477213.1, *C. mirounga* Nikolskii, 1974, EU852337.1, *C. gibsoni* Mattiucci, Paoletti, Solorzano & Nascetti, 2010 (*Contracaecum* aff. *multipapillatum* A), EU852343.1, *C. overstreeti* Mattiucci, Paoletti, Solorzano & Nascetti, 2010 (*Contracaecum* aff. *multipapillatum* B), JN580992.1 *C. pelagicum* (Johnston & Mawson, 1942) (larvas), JN580993.1, *C. pelagicum* (larvas), EF535569.1, EF535568.1, EF122210.1, *C. pelagicum*, EU852350.1, *C. micropapillatum* (Stossich, 1890) Baylis, 1920, EF513494.1, *C. bioccai* Mattiucci, Paoletti, Olivero-Verbel, Baldiris, Arroyo-Salgado, Garbin, Navone, Nascetti, 2008, HQ328504.1, *C. chubutensis* Garbin, Diaz, Cremonte & Navone, 2008, EF513512.1, *C. septentrionale* Kreis, 1955, 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* 57 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* Hartwich, 1964, EU477211.1, *C. ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941, EU477212.1, *C. margolisi* Mattiucci, Cianchi, Paggi, Sardella, Timi, Webb, Bastida, Rodriguez & Bullini, 2003, DQ116435.1, y *Pseudoterranova ceticola* (Deardorff & Overstreet, 1981) Gibson, 1983. Debido a la asociación de la especie estudiada con otras que parasitan mamíferos marinos, se decidió ensayar un nuevo alineamiento solo con estas especies. La Fig. 3 muestra, a manera de síntesis, el árbol de consenso inferido por análisis Bayesiano, en el que se destaca claramente la proximidad filogenética de las larvas estudiadas en el presente trabajo, que agrupan con ambos miembros del complejo *C. ogmorhini*. Los métodos alternativos utilizados, NJ y MP, arrojaron resultados coincidentes. Por tal motivo, se identifican las larvas utilizadas para los ensayos experimentales como miembros de dicho complejo de especies crípticas.

Digestión enzimática. Presencia de larvas en filetes de *C. guatucupa*

Cynoscion guatucupa, constituye uno de los principales recursos pesqueros costeros de Argentina con un alto consumo en el mercado interno. *Contracaecum* es un género con representantes que al estado adulto parasitan

mamíferos pinnípedos, que forman grandes asentamientos en las costas marítimas. En estos hospedadores suelen alcanzar altos valores de prevalencia y abundancia, del mismo modo que en peces costeros, como la pescadilla de red, sobre los cuales depredan. Se extrajo por cada pez un promedio de 58,27 g de filete, principalmente de los flancos, que, de acuerdo a la bibliografía, es la región donde con mayor probabilidad se alojan larvas de anisákidos. Se digirió un total de 3.479,25 g de musculatura esquelética. No fue hallada ninguna larva de nematode en ninguno de los digestores, lo que permite inferir que las larvas encontradas en alta prevalencia y abundancia en la cavidad visceral, no migran a la musculatura de la pescadilla.

Invasión tisular de larvas del complejo *Contracaecum ogmorhini* en un hospedador mamífero experimental

Se inocularon por vía oral cuatro ratones cepa CF1 con larvas provenientes de la pescadilla. En el primero se inocularon 12 larvas. En un segundo ratón se inocularon cinco larvas. En el tercer ratón se inocularon 10 larvas y en un cuarto ratón, 12. La necropsia de los ratones se realizó a los 3, 10, 14 y 24 días PI. En ninguno de los casos se observaron larvas fijadas en el tubo digestivo o cicatrices provocadas por las mismas. Posteriormente se inocularon dos ratones de cepa Balb/cAnN. A uno de ellos se le administraron 23 larvas y a un segundo ratón, 18. Al observar la materia fecal de los ratones 24 hs PI se pudo observar en uno de ellos, la presencia de una larva muerta perteneciente a *Contracaecum* sp. La necropsia de los ratones se realizó a los seis y nueve días, respectivamente, posteriores a la inoculación. No se observaron larvas en el tubo digestivo. Nuevamente se inocularon dos ratones de cepa Balb/cAnN con 20 larvas a cada uno. La necropsia se realizó a los 5 y 12 días PI. En ninguno de los casos se observaron larvas fijadas en el tubo digestivo o cicatrices provocadas por las mismas. Algunos días después se volvieron a inocular dos ratones de cepa Balb/cAnN y uno CF1 con 20 larvas de *Contracaecum* sp. Este último no dio resultado positivo a la infección. A uno de los ratones Balb/cAnN se le inocularon 50 larvas de *Contracaecum* sp. La necropsia fue realizada 24 h PI. Al analizar el tubo digestivo se observó una larva fijada en el estómago (Fig. 4). La histopatología evidenció a la larva penetrando el

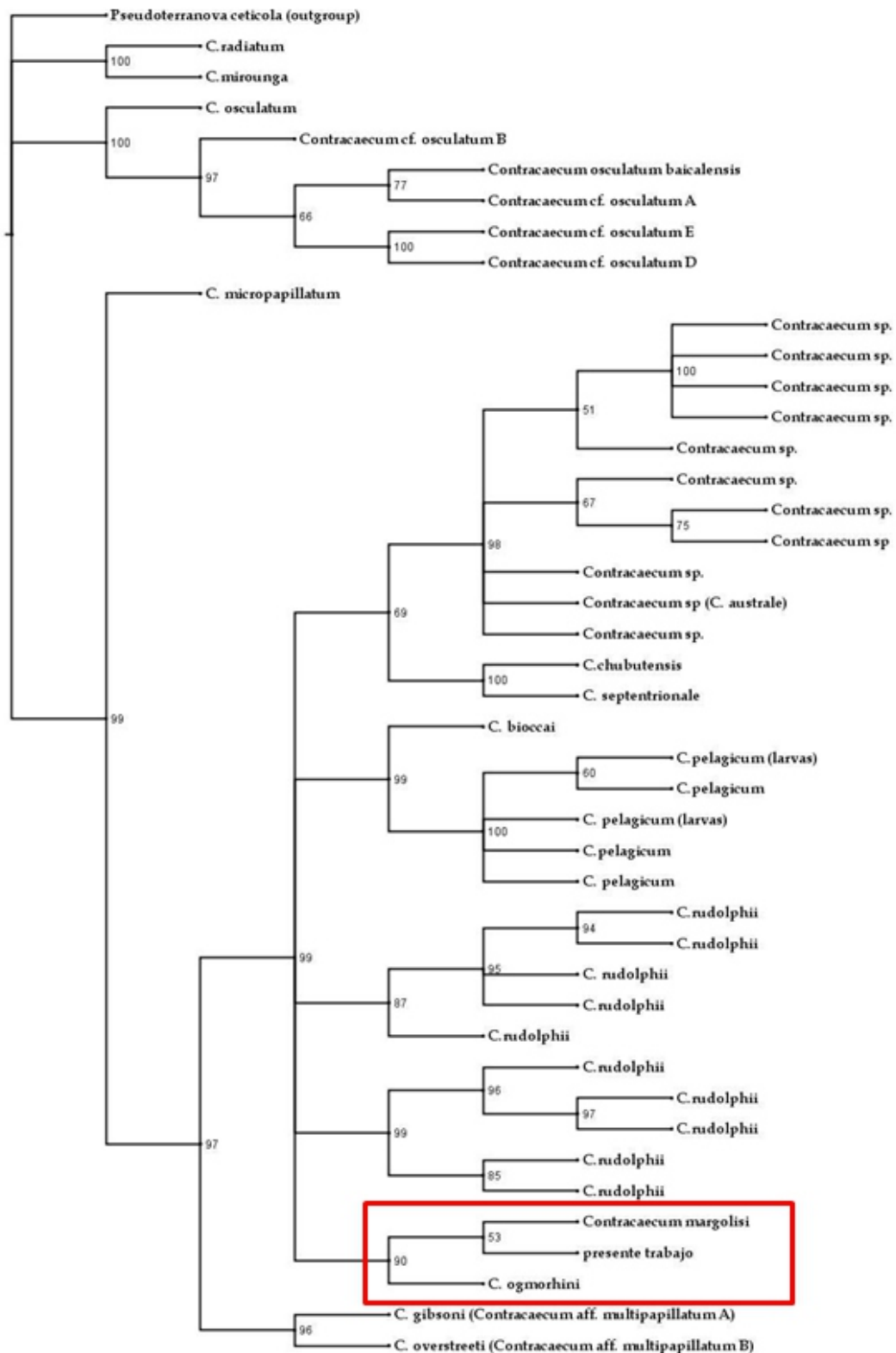


Figura 3. Árbol de consenso inferido por análisis Bayesiano (B), deducido del análisis de las secuencias COX2 ADNmt de *Contracaecum* spp. conocidas hasta el presente en 1.000.000 de generaciones. Los números en los nodos son las probabilidades (%) *a posteriori* (Pp) por el análisis bayesiano con un apoyo importante de $Pp \geq 95\%$.

epitelio de la mucosa, en la región fúndica estomacal, hasta alcanzar la capa muscular (Fig. 5). Se observó una compresión total del epitelio, con pérdida de la estructura glandular y adoptando un aspecto aplanado en torno a la larva. Un infiltrado leucocitario con presencia de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, rodeaba los tejidos próximos al sitio de penetración. Un segundo ratón cepa Balb/cAnN inoculado con 45

larvas, en la necropsia realizada 24 h PI, presentó dos larvas vivas fijadas a la pared de la cavidad gástrica (Figs. 6 y 7). En resumen, de un total de ocho ratones Balb/cAnN infestados experimentalmente, en dos hubo resultados positivos confirmando la penetración de larvas de *Contraecum* del complejo *C. ogmorhini* en la mucosa gástrica.

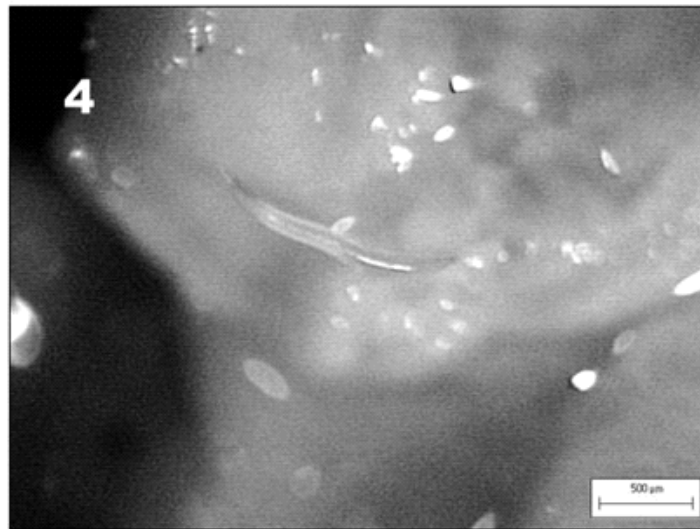


Figura 4. Larva L₃ de *Contraecum* del complejo *C. ogmorhini* prendida en la mucosa gástrica de ratón Balb/cAnN.

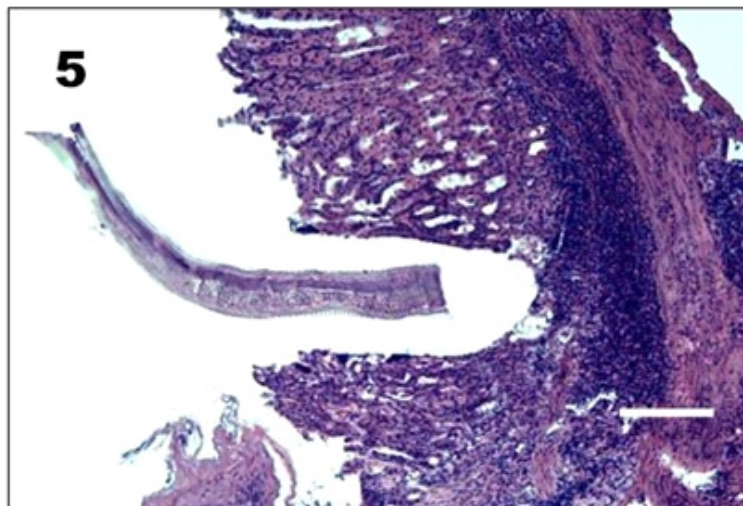


Figura 5. Sección histológica del estómago de ratón Balb/cAnN mostrando el sitio de inserción de una L₃, la lesión ulcerativa que provoca, así como la intensa infiltración inflamatoria en la mucosa y submucosa. Barra= 0,2 mm.



Figura 6. Larva L₃ de *Contracaecum* en el sitio de penetración de la pared estomacal de ratón Balb/cAnN. SEM.

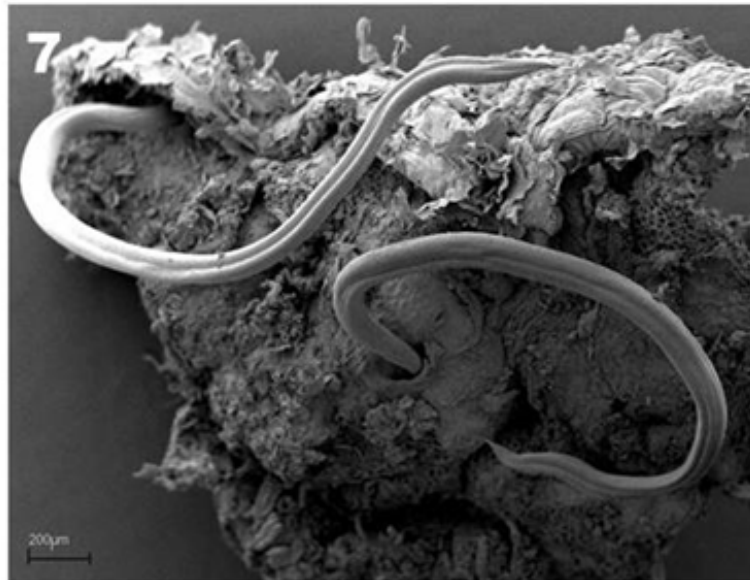


Figura 7. Dos L₃ de *Contracaecum* penetrando la pared gástrica de ratón Balb/cAnN. SEM.

DISCUSIÓN

Schaum & Müller (1967) comunicaron un caso humano de heteroquelidiasis (antiguo nombre usado para la anisakidosis) en un joven alemán de 26 años, con antecedentes de consumir habitualmente pescado semicrudo en el mar Báltico. El paciente presentaba fuertes dolores abdominales en la región del apéndice cecal. Por laparotomía le fue extraído el apéndice, y las

imágenes histológicas del absceso que había desarrollado, revelaron la presencia de una larva de nematodo ascaroideo. Los autores la identificaron con certeza como *C. osculatum* sobre la base de encontrar similitud en la porción anterior del parásito, asociado a que tal especie de anisákido es muy frecuente en peces costeros del Báltico. Realizaron múltiples estudios inmunológicos en el paciente, y ninguno arrojó resultados concluyentes sobre la identidad del nematodo. A pesar de ello, los autores insistieron en confirmar que se trataba de

larvas de *C. osculatum*. Esa afirmación constituyó el primer caso reportado de anisakidosis por una especie de *Contracaecum*, y el único conocido a nivel mundial hasta hace relativamente pocos años, en que se dieron a conocer dos casos adicionales (Smith, 1999; Menghi *et al.*, 2011; Shamsi & Butcher, 2011). Actualmente se acepta que no hay ningún rasgo morfológico que permita establecer la identidad específica en los estadios larvales de los nematodos anisákidos. Oshima (1972) descartó que la infección humana por *C. osculatum* pudiera ocurrir en la región de Extremo Oriente. Shiraki (1974) puso en dudas el hallazgo de Schaum & Müller (*op.cit.*) debido al mal estado del ejemplar en las secciones de tejido, cuya cutícula se ve deformada y el tubo digestivo degenerado, al punto de plantear que no hay suficientes razones como para descartar que el parásito pudiera ser *Anisakis* o *Terranova* (*sic*) en lugar de *C. osculatum*. Autores posteriores continuaron citando el antecedente de Schaum & Müller (*op.cit.*), y conservaron en la lista de especies de anisákidos de interés sanitario a *C. osculatum* (Myers, 1975; Acha & Szyfres, 1977; Cheng, 1978; Angot & Brasseur, 1993; Myjak *et al.*, 1994; Tanzola, 2006; Tanzola & Guagliardo, 2008). *Contracaecum osculatum* primariamente infecta el hígado, las vísceras y la cavidad visceral, siendo una de las especies dominantes durante todo el año en el bacalao del Atlántico, *Gadus morhua* Linnaeus, 1758 (Severin *et al.*, 2020). La presencia de larvas de *Contracaecum* sp. en la musculatura esquelética de los peces se considera accidental (Angot & Brasseur, 1995). Los resultados de la digestión enzimática de filetes de *C. guatucupa* en el presente trabajo, equivalente a 60 ejemplares elegidos aleatoriamente durante todo el período de estudio (2009-2011), no arrojó ninguna evidencia de invasión muscular de larvas de *Contracaecum* sp., a pesar de haberse recolectado casi 500 juveniles L₃ en la cavidad visceral y la serosa peritoneal de las 112 pescadillas procesadas.

Mediante el empleo de marcadores moleculares alozímicos y ADN mitocondrial, se ha demostrado la heterogeneidad genética de *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941, especie descrita en la costa sur de Australia, como parásita de la foca leopardo, *Hydrurga leptoni* (de Blainville, 1820). De modo tal que en el complejo de especies gemelas *C. ogmorhini* es posible agrupar a *C. ogmorhini* (*s.s.*), parásita del lobo marino de dos pelos, *Arctocephalus australis*

(Zimmermann, 1783) en los mares australes, y *C. margolisi*, parásita del lobo marino de California, *Zalophus californianus* (Lesson, 1828) (Mattiucci *et al.*, 2017). Los estadios larvales de ambas especies son morfológicamente indistinguibles, razón por la que se hace imprescindible el empleo de herramientas moleculares. Como se adelantó, nuestro material agrupa en este complejo con significativo porcentaje de similitud.

Shiraki (1969) administró por vía oral a conejos, larvas de *Anisakis* sp., *Pseudoterranova* sp. y *Contracaecum* sp. Al cabo de 24 hs PI solo las larvas de *Anisakis* y *Pseudoterranova* habían logrado penetrar la pared gástrica, pero no las de *Contracaecum*. Otsuru *et al.* (1968) administraron también a conejos larvas de *Contracaecum* sp. y de *Pseudoterranova* sp. alcanzando los mismos resultados que Shiraki (1969). Solo las larvas de *Pseudoterranova* lograron penetrar la mucosa estomacal a las 3 hs PI, en tanto la mayoría de las larvas de *Contracaecum* fueron encontradas muertas en el tracto digestivo. Empleando el mismo modelo experimental de Shiraki (1969) y Oishi *et al.* (1974) inocularon vía oral, larvas de *Anisakis* sp., *Pseudoterranova* sp. y *Contracaecum* sp. procedentes de peces marinos, y observaron que *Pseudoterranova* penetraba en forma más potente la mucosa digestiva, *Anisakis* en tanto la invadía de forma más débil y *Contracaecum* no producía invasión tisular.

Utilizando perros, Shiraki (1969) administró oralmente larvas de *Anisakis* sp., *Pseudoterranova* sp. y *Contracaecum* sp. obtenidas en peces marinos. Al cabo de 24 h PI solo las larvas de *Anisakis* y *Pseudoterranova* habían logrado penetrar la pared gástrica, no así las de *Contracaecum*. Si bien en ninguno de los trabajos citados se hace mención del estadio larval utilizado, es probable que en todos los ensayos hayan sido larvas de tercer estadio presentes en la cavidad visceral de los peces.

Deardorff & Overstreet (1980a) infectaron por vía oral con L₃ ratas, pollitos y crías de patos sin éxito. Cuando insertaron L₃ por medio quirúrgico a ratas, pollos, ratones blancos y hamsters, solo en las ratas se lograron mantener o viables, que mudaron a fase de adulto en 10 días y se mantuvieron vivos hasta nueve meses PI.

Fagerholm (1988) ensayó con L₃ de *C. osculatum* obtenidas en peces inoculando por vía oral ratas y hamsters. Entre dos y cinco días PI logró obtener el estadio de L₄. En otro experimento, introdujo quirúrgicamente L₃ y a los 42 días PI desarrollaron algunos adultos encapsulados, con lo que pudo confirmar la identidad específica de las larvas utilizadas.

Cabe destacar el ensayo experimental de Vidal-Martínez *et al.* (1994), quienes trabajaron con juveniles de cuarto estadio (L₄) de *C. multipapillatum*, un anisákido que tiene como hospedadores definitivos aves piscívoras, como cormoranes y garzas, pero no mamíferos. Las L₄ encapsuladas, extraídas del cíclido *Cichlasoma urophthalmus* (Günther, 1862), un recurso pesquero consumido habitualmente por habitantes de Yucatán, México, fueron administradas por vía oral a un gato de 2 meses de edad, a pollos de 3 semanas de edad, ratas de 1 mes y patos de 1-2 meses. No hubo resultados positivos a la infección en las ratas, pollos ni en los patos. Sin embargo, en el intestino anterior del gato hallaron machos maduros y hembras grávidas del nematode y tres vermes adheridos a la mucosa. Estos resultados confirmaron la potencialidad de *C. multipapillatum* de infectar mamíferos, a pesar de ser un anisákido con marcada especificidad por aves piscívoras. Vidal-Martínez *et al.* (1994) señalan que, si bien *C. multipapillatum* parasita de manera natural la cavidad visceral, el hígado y riñones del pez *C. urophthalmus*, accidentalmente podría ingresar al ser humano si en el proceso de evisceración quedaran adheridos fortuitamente al filete restos de peritoneo con alguna larva viable. Ello debiera además estar asociado al consumo de ese filete crudo o insuficientemente cocido. Asimismo, los autores hacen la salvedad que el hecho de haber empleado juveniles de cuarto estadio en la infestación experimental, en lugar de L³ como en los experimentos precedentes, podría tener la ventaja que el desarrollo avanzado del parásito ayude a inducir infectividad en los mamíferos. Indudablemente la inserción quirúrgica de larvas de anisákidos ha dado en numerosas oportunidades resultados que reflejan la capacidad de los parásitos de mantenerse viables, incluso mudar al estadio adulto. Pero ésta es claramente una situación forzada que escapa a la consideración de su rol zoonótico potencial, en virtud de que la puerta de entrada de los anisákidos

al ser humano es a través del consumo de carne de pescado crudo, infectada con sus larvas. Algunos autores, recientemente han acuñado el término “contracecosis” para referirse a los trastornos provocados en el humano por larvas de *C. multipapillatum*, pese a no conocerse ningún registro documentado de tal infección (Choc *et al.*, 2020).

En el presente estudio ocho ratones Balb/cAnN fueron inoculados con un total de 215 larvas, todas juveniles de tercer estadio (L₃) del complejo *C. ogmorhini*. Del total, 99,98% fueron defecadas muertas o destruidas en el tracto digestivo de los ratones. Solo tres larvas sobrevivieron y lograron penetrar en la mucosa gástrica de los hospedadores. La cepa Balb/cAnN se conoce por ser más susceptible a las infestaciones experimentales en contraste con la cepa CF1, más resistente. Esto puede explicar la diferencia en la infectividad de los parásitos en ambos modelos estudiados.

Menghi *et al.* (2011) reportaron el hallazgo en la materia fecal de una niña de nueve años en Buenos Aires (Argentina) de un nematodo al que, por la morfología labial y presencia de un mucrón caudal, identifican como perteneciente al “complejo *Anisakis-Contraecaecum*” (*sic*). Los autores aclaran que esta determinación, fue confirmada a partir de imágenes fotográficas por el CDC de Atlanta, EEUU. La paciente presentaba un cuadro de desnutrición y poliparasitismo por *Ascaris lumbricoides*, Limaeus, 1758 varias especies de *Entamoeba*, *Endolimax nana* Wenyon & O'Connor, 1917 y *Blastocystis hominis* (Alexieff, 1911) Brumpt, 1912. Además, la niña habitaba en condiciones sanitarias deficientes y su principal fuente de alimentos era pescado obtenido de la pesca, sin precisar de qué especie de pescado se trataba, ni si el mismo era consumido crudo o cocido. Dado lo poco probable que la paciente hubiese consumido pescado crudo, ya que no es el modo de preparación común en Argentina, sumado a la sintomatología gastroentérica compleja, agravada por su desnutrición y poliparasitismo, y a la imprecisa determinación del parásito como miembro de un complejo taxonómico no validado (los complejos específicos en los anisákidos se establecen entre especies crípticas a través de un perfil genético molecular, y no entre géneros [Mattiucci & Nascetti, 2008]), en el presente trabajo se considera dudoso el hallazgo reportado por

Menghi *et al.* (2011). Poder precisar la identidad taxonómica del material, permitiría enmarcar dicho reporte en lo que se denomina anisakiasis transitoria, que como se explicó previamente, sería una forma banal de infección (Kliks, 1983). En relación a cuadros de anisakiasis luminal transitoria, Shamsi & Butcher (2011), reportaron la expulsión por materia fecal de una larva, compatible con *Contracaecum* sp., de una paciente australiana con antecedentes de haber consumido caballa cruda, *Scomber scombrus* Linnaeus, 1758, en el sur de Australia. La mujer, mayor de edad, manifestaba fuertes dolores abdominales, vómitos y diarrea. Fue medicada y al tercer día de internación hospitalaria se produjo el evento de deposición de la larva. El espécimen fue determinado a partir de rasgos morfológicos del tubo digestivo anterior y la posición del poro excretor. Por lo que se conoce, este sería un antecedente válido de efectos nocivos de una larva viva perteneciente al género *Contracaecum* en el ser humano.

Finalmente, la literatura cuenta con numerosos antecedentes de invasión gástrica de anisákidos en sus hospedadores definitivos marinos. Obiekezie *et al.* (1992) describieron las lesiones en las paredes del estómago del eperlano, *Osmerus eperlanus* (Linnaeus, 1758). Deardorff & Overstreet (1980b) tipificaron las alteraciones histopatológicas causadas por *Goezia pelagia* Deardorff & Overstreet, 1980 en el estómago de los peces marinos *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) (bacalao), *Chaetodipterus faber* (Broussonet, 1782) (pez ángel) y *Ophichthus* sp. (anguila). Kinne (1984) señala lesiones nodulares fibróticas en la pared del estómago del tiburón martillo, *Sphyrna lewini* (Griffith & Smith, 1834), provocadas por *Terranova brooksi* Jacobson & Kistner, 1998. Tanzola (2004) describió las lesiones ulcerativas que provoca *Terranova galeocerdonis* (Thwaite, 1927) en la pared gástrica del tiburón toro o escalandrón, *Carcharias taurus* Rafinesque, 1810 y la localización de sus L⁴ en la submucosa estomacal. Ito *et al.* (1998) reportaron lesiones provocadas por larvas de *A. simplex*, *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) Gibson, 1983 y *C. osculatum* en el estómago de un ejemplar de *Phoca vitulina* Linnaeus, 1758. Vik (1964) comunicó el hallazgo de larvas de anisákidos provocando úlceras crateriformes en el estómago de ejemplares adultos de la marsopa

común, *Phocaena phocaena* (Linnaeus, 1758) Recientemente, Marcer *et al.* (2020) señalaron que *Sulcascaaris sulcata* Rudolphi, 1819, un anisákido parásito de la tortuga marina *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758), provoca gastritis ulcerativa de alta intensidad. Biolé *et al.* (2012) reportaron la presencia de *C. australe* en el proventrículo de *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin, 1789) produciendo invasión a la mucosa digestiva. Todos estos antecedentes reflejan claramente que, en sus hospedadores definitivos, los anisákidos habitualmente tienden a perforar la pared digestiva, preferentemente gástrica, de todas las especies, sean teleósteos, condricios, reptiles, aves o mamíferos. Una conducta mantenida a lo largo de toda su radiación adaptativa.

Teniendo en consideración los antecedentes documentados sobre el potencial infectivo de larvas de *Contracaecum* spp. en el ser humano, lo extremadamente rara de su casuística a nivel mundial y los resultados del presente estudio, nos permiten concluir que las larvas L₃ del complejo *C. ogmorhini*, de la cavidad visceral de *C. guatucupa*, solo bajo condiciones altamente definidas podrían provocar patología en el ser humano como para ser considerada una especie zoonótica. Tales condiciones se pueden sintetizar, entre otras, que las larvas estén vivas al momento de ser ingeridas, que invadan naturalmente la musculatura de los peces, que la carne esté cruda o poco cocida y que el hospedador posea un perfil genético o un estado inmunológico tal, que sea susceptible a la invasión tisular.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a la empresa pesquera Costas Argentinas, por su permanente apoyo y disposición en facilitar los peces estudiados. El presente trabajo fue realizado con las siguientes fuentes de financiamiento: PICT-ANPCyT 20438, PGI-UNS 24/B150 y 24/B183.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha, PN & Szyfres, B. 1977. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al*

- hombre y a los animales*. Publicación Científica N° 354, Organización Panamericana de la Salud OPS, 708 p.
- Angot, V & Brasseur, P. 1993. *European farmed Atlantic salmon (Salmo salar L.) are safe from anisakid larvae*. *Aquaculture*, vol. 118, pp. 339-344.
- Angot, V & Brasseur, P. 1995. *Les larves d'Anisakides et leur incidence sur la qualité des poissons et produits de poisson*. *Revue de Médecine et Veterinaire*, vol. 146, pp. 791-804.
- Audicana, MT, Ansotegui, IJ, Fernández de Corres, L & Kennedy, MW. 2002. *Anisakis simplex: dangerous – dead and alive?* *Trends in Parasitology*, vol. 18, pp. 20-25.
- Audicana, MT & Kennedy, MW. 2008. *Anisakis simplex: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity*. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 21, pp. 360-379.
- Biolé, FG, Guagliardo, SE, Mancini, MA, Tanzola, RD, Salinas, V & Morras, G. 2012. *Primer registro de Contracaecum australe (Nematoda: Anisakidae) en Phalacrocorax brasilianus (Aves: Phalacrocoracidae) de la región central de Argentina*. *BioScriba*, vol. 5, pp. 1-11. <http://www.bioscriba.org.ar>
- Bush, AO, Lafferty, KD, Lotz, JM & Shostak, AW. 1997. *Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited*. *Journal of Parasitology*, vol. 83, pp. 575-583.
- Cheng, TC. 1976. *The natural history of anisakiasis in animals*. *Journal of Milk and Food Technology*, vol. 39, pp. 32-46.
- Cheng, TC. 1978. *Parasitología General*. Ed. AC, 965 pp.
- Choc, L, Jiménez, A, Arguedas, D & Dolz, G. 2020. *Contracaecum multipapillatum (Nematoda: Anisakidae) en peces de aguas continentales de Guanacaste, Costa Rica e Izabal, Guatemala*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, vol. 12, e767.
- Darriba, D, Taboada, GL, Doallo, R & Posada, D. 2012. *jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing*. *Nature Methods*, vol. 9, pp. 772.
- Deardorff, TL & Overstreet, RM. 1980a. *Contracaecum multipapillatum (= C. robustum) from fishes and birds in the Northern Gulf of Mexico*. *Journal of Parasitology*, vol. 66, pp. 853-856.
- Deardorff, TL & Overstreet, RM. 1980b. *Taxonomy and biology of North American species of Goezia (Nematoda: Anisakidae) from fishes, including three new species*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, vol. 47, pp. 192-217.
- Degese, MF, Gatti, GM & Krivokapich, SJ. 2019. *Detection of anisakids (Nematoda, Anisakidae) in food and human clinical samples in Argentina*. *Revista Argentina de Parasitología*, vol. 8, pp. 9-14.
- Fagerholm, HP. 1988. *Incubation in rats of a nematodal (sic) larva from cod to establish its specific identity: Contracaecum osculatum (Rudolphi)*. *Parasitology Research*, vol. 75, pp. 57-63.
- Field-Cortazares, J & Calderón-Campos, R. 2009. *Intoxicación por Anisakis*. *Boletín Clínico de Hospital Infantil del Estado de Sonora*, vol. 26, pp. 43-47.
- Garbin, LE, Mattiucci, S, Paoletti, M, Diaz, JI, Nascetti, G & Navone, GT. 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*, vol. 62, pp. 309-319.
- Ishikura, H, Kikuchi, K, Nagasawa, K, Ooiwa, T, Takamiya, H, Sato, N & Sugane, K. 1993. *Anisakidae and anisakidosis*. *Progress in Clinical Parasitology*, vol. 3, pp. 43-101.
- Ito, M, Sato, T, Shirai, W & Kikuchi, S. 1998. *Parasites and related pathological lesions in the gastrointestinal tract of a seal (Phoca vitulina Linnaeus)*. *Journal of Veterinary and Medical Sciences*, vol. 60, pp. 1025-1028.
- Jackson, GJ. 1975. *The "new disease" status of human anisakiasis and North American cases: a review*. *Journal of Milk and Food Technology*, vol. 38, pp. 769-773.
- Kinne, O. 1984. *Diseases of Marine Animals. Vol. IV, Part 1. Introduction, Pisces*. *Biologische Anstalt Helgoland; Hamburg*, 541 pp.
- Kliks, M. 1983. *Anisakiasis in the western United States: four new case reports from California*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 32, pp. 526-32.
- Marcer, F, Tosi, F, Franzo, G, Vetri, A, Ravagnan S,

- Santoro, M & Marchiori, E. 2020. Updates on ecology and life cycle of *Sulcascaris sulcata* (Nematoda: Anisakidae) in Mediterranean grounds: molecular identification of larvae infecting edible scallops. *Frontiers in Veterinary Sciences*, vol. 7, pp. 64.
- Mattiucci, S & Nascetti, G. 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology*, vol. 66, pp. 47–148.
- Mattiucci, S, Paoletti, M, Cipriani, P, Webb, SC, Timi, JT & Nascetti, G. 2017. Inventorying biodiversity of Anisakid Nematodes from the Austral region: A hotspot of genetic diversity? In: Klimpel et al. (eds.). *Biodiversity and Evolution of Parasite Life in the Southern Ocean*. Parasitology Research Monographs, vol. 9, chapter 7: 109-140.
- Menghi, CI, Comunale, E & Gatta, CL. 2011. Anisakiosis: primer diagnóstico en Buenos Aires, Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, vol. 31, pp. 71-73.
- Morozinska-Gogol, J. 2019. Anisakis spp. as etiological agent of zoonotic disease and allergy in European region- an overview. *Annals of Parasitology*, vol. 65, pp. 303-314.
- Myers, BJ. 1975. The nematodes that cause anisakiasis. *Journal of Milk and Food Technology*, vol. 38, pp. 774-782.
- Myjak, P, Szostakowska, B, Wojciechowski, J, Pietkiewicz, H & Rokicki J. 1994. Anisakid larvae in cod from the southern Baltic Sea. *Archive of Fishery and Marine Research*, vol. 42, pp. 149-161.
- Norris, DE & Overstreet, RM. 1976. The public health implication of larval *Thynnascaris* nematodes from shellfish. *Journal of Milk and Food Technology*, vol. 39, pp. 47–54.
- Obiekiezie, AI, Lick, R, Kerstan, S & Möller, H. 1992. Larval nematodes in stomach wall granulomas of smelt *Osmerus eperlanus* from the german North Sea coast. *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 12, pp. 177-183.
- Oishi, K, Nagano, K & Suzuki, M. 1974. Pathogenic capacity of Anisakinae larvae from cod and Alaska pollack. [Abstract] Proceedings of the Third International Congress of Parasitology, Section G2, p. 1626.
- Oshima, T. 1972. Anisakis and anisakiasis in Japan and adjacent area. *Progress of Medical Parasitology in Japan*, vol. 4, 301-393.
- Oshima, T. 1987. Anisakiasis - Is the Sushi Bar Guilty. *Parasitology Today*, vol. 3, pp. 44 – 48.
- Otsuru, M, Shiraki, T, Hatsukano, T & Kenmotsu, M. 1968. Morphological observations and infection experiments on Anisakinae larvae of fish in Hokkaido coastal waters. *Kiseichugaku Zasshi (Japanese Journal of Parasitology)*, vol. 17, pp. 267.
- Petter, AJ. 1969. Enquete sur les Nématodes des sardines pechees dans la region nantaise. Rapport possible avec les granulomes eosinophiles observés chez l'homme dans la region. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, vol. 44, pp. 25-36.
- Ronquist, F & Huelsenbeck, JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under 270 mixed models. *Bioinformatics*, vol. 19, pp. 1572–1574.
- Ruarte, C, Lasta, C & Carozza, C. 2004. Pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*). En: Sanchez, R., Bezzi, S.I.; Boschi, E.E. (eds.). *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros*, tomo 4, pp. 271-281.
- Saitou, N & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, pp. 406–425.
- Sakanari, JA & McKerrow, JH. 1989. Anisakiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 2, pp. 278-284.
- Sakanari, JA, Moser, M & Deardorff, RL. 1995. Fish parasites and human health. *Epidemiology of human helminthic infections*. Report N° T-CSGCP-034, of the California Sea Grant College, University of California, 33 p.
- Schaum, E & Müller, W. 1967. Die heterocheilidiasis. Eine Infektion des Menschen mit Larven von Fisch-Ascariden. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, vol. 92, pp. 2230-2233.
- Severin, NL, Yurchenko, M, Sørensen, JS, Zuo, S, Karami, AM, Kania, PW & Buchmann, K.

2020. *Anisakid nematode larvae in the liver of Atlantic cod Gadus morhua L. from West Greenland*. Parasitology Research, vol. 119, pp. 3233-3241.
- Shamsi, S & Butcher, AR. 2011. *First report of human anisakidosis in Australia*. Medical Journal of Australia, vol. 194, pp. 199-200.
- Shiraki, T. 1969. *On the histological diagnosis of the diseases caused by migrating larval nematodes (mainly anisakiasis) in the gastro-intestinal tracts*. Saishin-Igaku (Advances in Medical Science), vol. 24, pp. 378-389.
- 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, vol. 22, pp. 57-98.
- Smith, JW. 1999. *Ascaridoid Nematodes and Pathology of the Alimentary Tract and its Associated Organs in Vertebrates, including Man: A Literature Review*. Helminthological Abstracts, vol. 68, pp. 49-96.
- 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, vol. 28, pp. 2731-2739.
- Tanzola, RD. 2004. *Aspectos sistemáticos, biológicos y patológicos de Terranova sp. (Nematoda: Anisakidae) en la Provincia Zoogeográfica Argentina*. [Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca]. 288 p.
- Tanzola, RD. 2006. *Anisakidosis*. In Basualdo, J, Coto, C & de Torres, R. (editores). *Microbiología Biomédica*, Editorial Atlante.
- Tanzola, RD & Guagliardo, SE. 2008. *Anisakidosis*. In Costamagna SR & Visciarelli, E (comp.). *Parasitosis regionales*, 2da edición, Editorial EdiUNS.
- UE. 2010. *Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de Septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos*. Diario Oficial de la Unión Europea. L276/33-79.
- Vidal-Martínez, VM, Osorio-Sarabia, D & Overtsreet, RM. 1994. *Experimental infection of Contracaecum multipapillatum (Nematode: Anisakinae) from Mexico in the domestic cat*. Journal of Parasitology, vol. 80, pp. 576-579.
- Vik, R. 1964. *Penetration of stomach wall by Anisakis-type larvae in porpoises*. Canadian Journal of Zoology, vol. 42, pp. 513.
- Yagi, K, Nagasawa, K, Ishikura, H, Nakagawa, A, Sato, N, Kikuchi, K & Ishikura, H. 1996. *Female Worm Hysterothylacium aduncum Excreted from Human: A Case Report*. Japanese Journal of Parasitology, vol. 45, pp. 12-23.

Received June 27, 2022.
Accepted August 30, 2022.