



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**ESCUELA DE ACUICULTURA Y PESQUERÍA**

**TESIS DE GRADO PRESENTADA PREVIO A LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE**

**INGENIERO EN ACUICULTURA Y PESQUERÍAS**

**MODALIDAD: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**TEMA:**

Distribución temporal de nematodos anisakidos del calamar gigante  
*Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) en el Pacífico ecuatoriano.

**AUTORA:**

**MUÑOZ CHUMO LEONELA GRISELDA**

**TUTOR DE TESIS:**

**YANIS CRUZ QUINTANA, Ph.D.**

**Bahía de Caráquez, Enero 2018**

## **DEDICATORIA**

A Dios, quien me acompaña en mi lucha por progresar.

A mis padres Santo Muñoz y Landy Chumo, por el cariño y apoyo incondicional que siempre he recibido de ustedes y por haberme inculcado el valor de la responsabilidad y superación, gracias a ustedes he logrado culminar mi carrera profesional.

A mis hermanos Adrián y Adonis, porque creen en mí y siempre me animan en los momentos difíciles.

Al Ing. Andrés Reyes Mero (+), que sin duda alguna fue una persona muy especial en mi vida, quién con sus palabras de motivación y superación, nunca permitió que desistiera de mi objetivo. Aunque ya no estés, creo que seguirás alentándome para continuar superándome y siempre dar lo mejor de mí.

Leonela Griselda Muñoz Chumo

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Manabí, por haber financiado este proyecto de investigación mediante una beca de titulación.

Al proyecto “Variación temporal de la comunidad de parásitos del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Pacífico ecuatoriano”, por darme la oportunidad de vincularme y poder así realizar mi trabajo de investigación.

Al Centro de Sanidad Acuícola de la Escuela de Acuicultura y Pesquería, de la Universidad Técnica de Manabí extensión Sucre, por el apoyo logístico brindado en esta investigación.

A los docentes de la Escuela de Acuicultura y Pesquería, de la Universidad Técnica de Manabí extensión Sucre, quienes con sus enseñanzas contribuyeron a mi formación profesional.

A la Familia Demera Muñoz (Ana, Pedro, Darwin, Ing. Estafania, Lisseth, Sahori y Sra. Carmen), por el apoyo incondicional que me brindaron en el transcurso de mi formación académica.

A Jonathan Lucas Demera, por brindarme su amistad y apoyo cuando más lo necesité, por todas las experiencias vividas durante nuestra formación profesional y en la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Yanis Cruz Quintana y a la Dra. Ana María Santana Piñeros, por su amor a la ciencia, se han convertido en personas muy importantes en mi formación profesional, brindándome su apoyo, amistad, enseñanzas y confianza para poder culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A Mennen Medina, Carlos Medina, José Medina y Luis Ureta, pescadores artesanales del Matal; al INOCAR y a los tripulantes del buque ORION, a todos ellos por la colaboración y apoyo logístico en la realización de los muestreos que hicieron parte de esta investigación.

A Geormery Mera y Víctor Caña por las muestras colectadas en el buque oceanográfico.

A todos ellos mis más sinceros agradecimientos.

Leonela Griselda Muñoz Chumo

## CERTIFICACIÓN DEL TUTOR DE TESIS

Yanis Cruz Quintana, Ph.D., Docente Principal Titular de la Facultad de Ciencias Veterinarias – Escuela de Acuicultura y Pesquería de la Universidad Técnica de Manabí, certifica que:

La tesis de grado titulada “**Distribución temporal de nematodos anisakidos del calamar gigante *Dosidicus gigas* (d’Orbigny, 1835) en el Pacífico ecuatoriano**”, es un trabajo de investigación original desarrollado por su autora Leonela Griselda Muñoz Chumo, en el marco del proyecto de investigación titulado “Variación temporal de la comunidad de parásitos del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Pacífico ecuatoriano”. Esta tesis ha sido desarrollada y concluida de acuerdo a los requerimientos establecidos en el reglamento de titulación, bajo mi dirección con asesoría permanente.

---

Yanis Cruz Quintana, Ph.D

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA EN ACUICULTURA Y PESQUERÍAS**

**TESIS DE GRADO**

**TEMA:**

Distribución temporal de nematodos anisakidos del calamar gigante *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) en el Pacífico ecuatoriano.

Sometida a la consideración del Tribunal de Defensa del Trabajo de Titulación y legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo para la obtención del título de:

**INGENIERO EN ACUICULTURA Y PESQUERÍAS**

**APROBACIÓN:**

**DR. EDIS MACÍAS RODRÍGUEZ, Ph.D**  
**DECANO (E) F.C.V.**

**ING. JAVIER CEDEÑO ESTRADA, M.Sc**  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

**LICDO. PATRICIO PANTA VÉLEZ, M. Sc**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**BIOL. MARJORIE IDROVO VISHUETE, M. Sc**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

**DR. YANIS CRUZ QUINTANA, Ph.D**  
**TUTOR**

**BIOL. ANA MARÍA SANTANA**  
**PIÑEROS, Ph.D**  
**REVISORA**

**AB. DANIEL CADENA MACÍAS**  
**SECRETARIO ASESOR JURÍDICO (E)**

## **DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DE AUTOR**

Las ideas, resultados y datos aquí presentados son de responsabilidad compartida entre la autora Leonela Griselda Muñoz Chumo; el Dr. Yanis Cruz Quintana quien fungió como líder del Proyecto que amparó esta tesis; y la Escuela de Acuicultura y Pesquería de la Universidad Técnica de Manabí, quien financió esta investigación.

---

Leonela Griselda Muñoz Chumo

## ÍNDICE

1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	1
2.	REVISIÓN DE LITERATURA Y MARCO TEÓRICO .....	2
2.1.	Nematodos anisákidos.....	2
2.2.	Anisakidosis .....	4
2.3.	Aspectos biológicos de <i>Dosidicus gigas</i> .....	5
2.4.	Registros taxonómicos de nematodos anisakidos en <i>Dosidicus gigas</i> .....	6
3.	VISUALIZACIÓN DEL ALCANCE DEL ESTUDIO.....	7
4.	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	8
4.1.	OBJETIVO GENERAL .....	8
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
5.	ELABORACIÓN DE HIPÓTESIS Y DEFINICIÓN DE VARIABLES .....	9
5.1.	HIPÓTESIS.....	9
5.2.	DEFINICIÓN DE VARIABLES .....	9
5.2.1.	Variables biológicas .....	9
5.2.2.	Variables parasitológicas.....	9
6.	DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN (METODOLOGÍA).....	11
6.1.	Área de estudio.....	11
6.2.	Procedimientos de laboratorio.....	12
6.3.	Análisis de la información .....	13
6.3.1.	Parámetros de infección .....	13



6.3.2.	Análisis estadísticos.....	13
7.	ANÁLISIS DE DATOS Y REPORTE DE RESULTADOS.....	14
7.1.	Registro taxonómico y parámetros de infección de nematodos anisakidos en <i>D. gigas</i> . .....	15
7.2.	Variación temporal de los nematodos anisakidos en <i>Dosidicus gigas</i> .....	17
7.3.	Evaluación de los daños histológicos ocasionados por nematodos anisakidos en <i>Dosidicus gigas</i> . .....	22
8.	DISCUSIÓN .....	25
9.	CONCLUSIONES .....	30
10.	RECOMENDACIONES.....	31
11.	REFERENCIAL .....	32
11.1.	PRESUPUESTO.....	32
11.2.	CRONOGRAMA .....	33
	BIBLIOGRAFÍA .....	34

## ÍNDICE DE TABLA

<b>Tabla 1.</b> Registro taxonómico de anisakidos en <i>Dosidicus gigas</i> . .....	6
<b>Tabla 2.</b> Medidas morfométricas y parámetros de infección de los nematodos de la familia Anisakidae en <i>Dosidicus gigas</i> en los meses de estudio. (n) tamaño de muestra, (LDM) longitud dorsal del manto, (D.E) desviación estándar, N/D: No dato.....	14
<b>Tabla 3.</b> Parámetros de infección de nematodos anisakidos en el calamar gigante <i>Dosidicus gigas</i> en el Pacífico ecuatoriano. Para cada especie de anisakido se presentan los sitios de infección y los parámetros de infección total y por temporada climática. En orden descendente se muestra la prevalencia (%), la abundancia media $\pm$ D.E. (desviación estándar), y la intensidad promedio $\pm$ D.E. (n) número de calamares revisados.....	17
<b>Tabla 4.</b> Resultados del análisis de contingencia 2x2, con una prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates ( $\chi^2$ Yates). El signo “x” significa la comparación de las prevalencias entre los meses de estudio y temporada climática en <i>D. gigas</i> . p: valor de significancia. N/D: No datos estadísticos porque no se encontraron ejemplares de <i>Anisakis</i> sp. durante esos dos meses de muestreo. ....	18
<b>Tabla 5.</b> Prevalencia y número de nematodos colectados por los sitio de infección en <i>D. gigas</i> en el Pacífico ecuatoriano. ....	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Ubicación geográfica del área de estudio y sitios muestreados en el Pacífico ecuatoriano. El rectángulo rojo comprende el área muestreada durante el mes septiembre del 2016 (crucero oceanográfico) y los círculos rojos muestran los meses (marzo, mayo, junio y julio) muestreados en la embarcación artesanal durante el 2017. .... 11
- Figura 2.** Nematodos de la familia Anisakidae en estadios larvales (L3) en *Dosidicus gigas* en el Pacífico ecuatoriano. **a.** Larva de *Anisakis* sp. Esacla = 500  $\mu\text{m}$ . **b.** Larva de *Porrocaecum* sp. Esacala: 600  $\mu\text{m}$ . (dc) diente cuticular; (l) labios; (pe) poro excretor; (e) esófago; (v) ventrículo; (ci) ciego intestinal; (i) intestino; (pa) poro anal; (tc) terminación cola; (m) mucrón..... 16
- Figura 3.** Abundancia media mensual (gráficos de la izquierda) y temporal (gráficos de la derecha) de los nematodos de la familia Anisakidae (**a, b**) y de las especies *Anisakis* sp. (**c, d**) y *Porrocaecum* sp. (**e, f**) en *Dosidicus gigas*. Los cuadrados representan el valor promedio; las cajas representan  $\pm$  el error estándar; las barras representan  $\pm$  una desviación estándar. .... 20
- Figura 4.** Intensidad promedio mensual (gráficos de la izquierda) y temporal (gráficos de la derecha) de los nematodos de la familia Anisakidae (**a, b**) y de las especies *Anisakis* sp. (**c, d**) y *Porrocaecum* sp. (**e, f**) en *Dosidicus gigas*. Los cuadrados representan el valor promedio; las cajas representan  $\pm$  el error estándar; las barras representan  $\pm$  una desviación estándar. ....21
- Figura 5.** Vista macroscópica e histológica de secciones del manto de *Dosidicus gigas*. **a.** una larva de nematodo Anisakidae (flecha) enquistada en la musculatura del manto. Nota respuesta tisular formando nódulos blanquecinos alrededor del nematodo. Escala = 100  $\mu\text{m}$ . **b.** Sección histológica del tejido que se mostró en la figura 6a. El nematodo (vista central), seccionado transversalmente, está redondeado por un tejido conectivo organizado y un infiltrado hemocítico. H-E, escala = 500  $\mu\text{m}$ . **c.** Degeneración de fibras musculares y necrosis focal con infiltrado hemocítico en el músculo del manto (M) por la presencia de nematodos Anisakidae (flecha). H-E, escala = 250  $\mu\text{m}$ . ....23

**Figura 6.** Vista macroscópica e histológica del aparato digestivo en *Dosidicus gigas*. **a.** Larvas de nematodo anisakidos (flecha) enquistados en las paredes del ciego espiralado y del ciego digestivo. Escala: cada división = 1 mm. **b.** Sección histológica transversal del ciego espiralado. Larva de nematodo Anisakidae (flecha) está redondeado por un tejido conectivo organizado y un infiltrado hemocítico. H-E, escala = 250  $\mu$ m. ....23

**Figura 7.** Vista macroscópica e histológica del manto en *Dosidicus gigas*. **a.** Vista macroscópica de un nódulo en el manto (flecha), justo debajo del epitelio. El tejido se ha cortado transversalmente para facilitar la vista. Escala = 500  $\mu$ m. **b.** Corte histológico del manto que muestra un nódulo hialino (flecha). H-E, escala = 500  $\mu$ m. **c.** Detalle de la imagen 7b mostrando el material rosado hialino (izquierda) y la necrosis focal (n) redondeados por fibroblastos y células pigmentadas (flecha). H-E, escala = 100  $\mu$ m. **d.** Células gigantes con bacterias fagocitadas (\*) y colonias de bacterias (flecha) libres entre las fibras del tejido conectivo. Nótese la organización de los tejidos alrededor de las colonias bacterianas. H-E, escala = 100  $\mu$ m. .... 24

## RESUMEN

La anisakidosis en humanos es causada por la infección de nematodos anisakidos adquirida por el consumo de productos marinos crudos o poco cocinados. Es una enfermedad emergente y de creciente preocupación que afecta la salud pública en países desarrollados; sin embargo, en los países de América Latina y particularmente en Ecuador, existe muy poca información sobre las especies de anisakidos, así como de los parámetros de infección de estos nematodos tanto en los hospederos intermediarios como en la población humana. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar la distribución temporal de nematodos anisakidos en calamar gigante *Dosidicus gigas*, uno de los hospederos intermediarios reportados para especies de anisakidos en el Pacífico ecuatoriano. Un total de 224 ejemplares de *D. gigas* fueron colectados entre septiembre 2016 y julio de 2017, y revisados interna y externamente mediante técnicas parasitológicas convencionales en el laboratorio CSA de la Escuela de Acuicultura y Pesquería de la Universidad Técnica de Manabí. Los nematodos obtenidos fueron preservados en alcohol al 70 %, aclarados con glicerina y ácido láctico, e identificados con ayuda de claves taxonómicas. Se determinaron los parámetros de infección, prevalencia, intensidad promedio y abundancia media, para cada especie de nematodo, por mes de muestreo y por temporada climática. Adicionalmente, fragmentos de tejido parasitado fueron fijados en formalina neutra al 10% y procesados por la técnica de inclusión en parafina para evaluar los daños histológicos. Se identificaron dos morfotipos pertenecientes a los géneros *Porrocaecum* y *Anisakis*. *Porrocaecum* sp. mostró los mayores parámetros de infección durante todo el estudio. La prevalencia no varió entre temporadas climáticas para ninguna de las dos especies ni para el total de anisakidos. La prevalencia de *Anisakis* sp. no varió entre meses, pero la prevalencia total de anisakidos y de *Porrocaecum* sp. varió significativamente entre algunos meses. El mes de septiembre representa un pico en la intensidad promedio de *Anisakis* sp. Las larvas de anisakidos causan reacciones locales en los tejidos infectados. El manto, parte comestible del calamar, mostró la mayor prevalencia e intensidad de infección, lo que constituye un riesgo a la salud pública.

**Palabras clave:** Anisakidosis, Parásitos, Océano Pacífico, Ecuador, Histología.

## SUMMARY

Anisakidosis in humans is caused by the infection of anisakid nematodes acquired by the consumption of raw or undercooked marine products. It is an emerging disease and of growing concern that affects public health in developed countries; however, in the countries of Latin America and particularly in Ecuador, there is very little information about the species of anisakids, as well as the infection parameters of these nematodes both in the intermediate hosts and in the human population. Therefore, the objective of this investigation was to determine the temporal distribution of anisakid nematodes in giant squid *Dosidicus gigas*, an intermediate hosts for anisakid species in the Ecuadorian Pacific. A total of 224 specimens of *D. gigas* were collected between September 2016 and July 2017, and reviewed internally and externally by conventional parasitological techniques in the CSA laboratory from the Escuela de Acuicultura y Pesquería, Universidad Técnica de Manabí. The nematodes obtained were preserved in 70% ethanol, cleared with glycerin and lactic acid, and identified with the help of taxonomic keys. The infection parameters, prevalence and mean abundance for each species of nematode, were determined by month of sampling and by climatic season. Additionally, parasitized tissue fragments were fixed in 10% neutral formalin and processed by the paraffin inclusion technique to evaluate histological damages. Two morphotypes belonging to the genera *Porrocaecum* and *Anisakis* were identified. *Porrocaecum* sp. showed the highest infection parameters during the study. The prevalence did not vary between climatic seasons for any of the two species nor for the total of anisakids. The prevalence of *Anisakis* sp. did not vary between months, but the total prevalence of anisakids and *Porrocaecum* sp. varied significantly between a few months. The month of September represents a peak in the mean intensity of *Anisakis* sp. Anisakid larvae cause local reactions in infected tissues. The mantle, an edible part of the squid, showed the highest prevalence and intensity of infection, which constitutes a risk to public health.

**Key words:** Anisakidosis, Parasites, Pacific Ocean, Ecuador, Histology

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El calamar gigante *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) es uno de los cefalópodos de mayor tamaño y uno de los más abundantes en los ambientes pelágicos-océánicos. Esta especie migratoria se distribuye en todo el Pacífico oriental, desde el Golfo de California hasta la región central de Chile, ha sido objeto de captura en el Pacífico ecuatoriano desde 1999, pero con la finalidad de utilizarlo como carnada para la pesca del picudo. Desde el año 2014, el objetivo de la captura cambió y se destina principalmente a consumo humano, razón por lo cual se ha incrementado el interés en investigar aspectos biológicos de la especie. Dada la importancia de los nematodos anisákidos por sus implicaciones negativas en la salud pública; considerando que existen registros previos de especies de la familia Anisakidae en *D. gigas* de México, Chile, y Perú; y considerando que el calamar gigante desde el 2014 se captura con fines de consumo en Ecuador; es sumamente importante determinar cuáles son las especies de anisákidos que parasitan a *D. gigas* del Pacífico ecuatoriano y cuál es la distribución temporal de estas especies en función de los parámetro de infección.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA Y MARCO TEÓRICO

### 2.1. Nematodos anisákidos

Los anisákidos son nematodos parásitos de la fauna marina que pertenecen a la familia Anisakidae. Estos tienen una amplia distribución mundial y ciclos de vida complejo que involucran invertebrados, cefalópodos, peces y mamíferos (Chai, Murrell y Lymbery, 2005). *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium* son los géneros más comunes que infectan a una gran diversidad de especies de peces y cefalópodos; caracterizándose en base a la presencia de tres labios, un diente larval, ventrículo y la presencia o ausencia de mucrón en la cola, apéndice ventricular y ciego intestinal (Nawa, Hatz y Blum, 2005; Hochberg y Hamer, 2010; Roongruangchai, Tamepattanapongsa y Roongruangchai, 2014). También destacan por su interés sanitario, ya que estos provocan cuadros clínicos que afectan a la salud humana (Abattouy, 2012).

Las larvas de anisákidos han sido reportadas en numerosas especies marinas destinadas al consumo humano. En el caso de peces, estas larvas han sido reportadas en muchas especies pertenecientes a los siguiente ordenes: Gadiformes (*Merluccius* spp., *Gadus morhua*, *Merlangius merlangus*, *Micromesistius poutasson*, *Pollachius pollachius*, *P. virens*, *Trisopterus luscus*, *T. minutuscapelanus*, *Phycis* spp., *Molva molva*, *M. blennoides*, *M. dypterygia*), Perciformes (*Scomber scombrus*, *Mullus barbatus*, *M. surmuletus*, *Serranus cabrilla*, *S. scriba*, *Pagellus cantabricus*, *Sparus pagrus*, *Boops boops*, *Thunnus tynnus*, *Auxis thazard*, *Trachurus trachurus*, *Trachynotus glaucus*, *Brama brama*, *Trichiurus lepturus*), Clupeiformes (*Salmo salar*, *Sardina pilchardus*, *Clupea harengus*, *Engraulis encrasicolus*), Pleuronectiformes (*Platichthys flesus*, *Pleuronectes platessa*, *Hippoglossoides* spp., *Solea vulgaris*, *Scophthalmus maximus*, *Lepidorhombus* spp.), Scorpaeniforme (*Helicolenus dactylopterus*, *Scorpaena scrofa*, *Trigloporus lastoviza*), Bericiformes (*Beryx decadactylus*), Lophiiformes (*Lophius piscatorius*) y Anquiliformes (*Conger conger*) (EFSA, 2010). En cefalópodos, larvas de anisákidos han sido reportadas en especies como *Todaropsis eblanae*, *Todarodes angolensis*, *T. sagittatus*, *Illex coindetii*, *I. argentinus*, *Dosidicus gigas*, *Loligo vulgaris*, *Octopus vulgaris* y *Sepia* spp. (Shukhgalter y Nigmatullin, 2001; Abollo, Gestal y Pascual, 2001; Mattiucci y Nacetti, 2008; EFSA, 2010). En los hospederos, las larvas de



anisákidos se encuentran enrolladas en forma de espiral plano, bajo el tejido conectivo del tubo digestivo, en la cavidad abdominal, en la superficie de los órganos internos como hígado y gónadas, entre los mesenterios y en la musculatura (Ruíz-Valero, Valero, Adroher y Ortega, 1992; Abollo et al., 2001; Tejada, 2009). Dada la práctica de eviscerar los organismos acuáticos antes de procesarlos para consumo humano, el mayor riesgo a la salud pública lo constituye la infección del músculo, ya que es la parte del organismo que se consume.

Los estadios larvales de anisákidos, al igual que cualquier otro grupo de parásitos, no se pueden identificar hasta nivel de especies con base en su morfología, debido al pobre o nulo desarrollo de sus órganos sexuales, los cuales constituyen en muchos casos caracteres morfológicos distintivos (Quiazon, Yoshinaga y Ogawa, 2008; Abattouy, 2012). Aunque las especies de anisákidos muestran preferencias ecológicas, de hospederos y de distribución geográfica que son útiles para su identificación (Mattiucci, Paoletti, Damiano y Nascetti, 2007; Mattiucci y Nascetti, 2008), la aplicación de métodos moleculares es crucial para la identificación taxonómica con base en las diferencias de la estructura genética entre las especies (Umehara, Kawakami, Araki y Uchida, 2008). Algunas especies han sido más estudiadas que otras desde el punto de vista molecular; por ejemplo *Anisakis simplex* (ss, C), *A. pegreffii*, *A. typica*, *A. ziphidarum*, *A. nascettii*, *A. physeteris*, *A. brevispiculata*, *A. paggiae*, *A. insignis*, *Pseudoterranova decipiens*, *P. krabbei*, *P. bulbosa*, *P. cattani*, *P. azarasi*, *Contracaecum osculatum*, *C. ogmorhini*, *C. turgidum*, *C. radiatum*, *C. mirounga* e *Hysterothylacium aduncum*, cuentan con técnicas moleculares para su identificación y se conoce parte de su ADN (Umehara et al., 2008; Espiñeira, Herrero y Vieites, 2010; Koinari, Karl, Elliot, Ryan y Lymbery, 2013; Cavallero et al., 2015), debido fundamentalmente a su mayor capacidad alérgica, lo que ocasiona mayores problemas a la salud pública (Abottouy, 2012; Baird, Gasser, Jabbar y Lopata, 2014).

De acuerdo a la literatura los parámetros de infestación de los anisákidos se ven influenciados por diversos factores como: la especie de anisákido, la especie de hospedero, la zona geográfica y la época del año (Petrie, Wooten, Bruno, Mackenzie y Bron, 2007), pero factores como la edad y el tamaño de los hospederos son fundamentales dado que estas especies de parásitos se acumulan hasta que un depredador del hospedero

permita continuar con el ciclo de vida (Abaunza, Villamor y Pérez, 1995; Mladineo, 2001, Valero et al., 2006; Incorvaia y Hernández, 2006).

## **2.2. Anisakidosis**

La anisakidosis es una enfermedad humana causada por la ingesta de larvas de parásitos de la familia Anisakidae presentes en especies marinas destinadas para consumo. Los anisákidos se han convertido en un problema de salud pública debido fundamentalmente al aumento entre un 40 y un 80% de la prevalencia de parasitismo en el pescado (Yubero, Auroux y López, 2004; Lymbery y Cheah, 2007; Cabezas, García, Fernández y González, 2007); y a las tendencias gastronómicas basadas en el consumo de mariscos crudos o pocos cocinados como son el sushi, sashimi, lomi-lomi hawaiano, ceviche, boquerones en vinagre, ahumados, marinados, semi-conserva, salado y seco (Puente et al., 2008; Baird et al., 2014). Las infecciones en los humanos provocan manifestaciones clínicas variadas, que pueden ser agrupadas en cuatro formas: gástrica, intestinal, reacciones alérgicas y ectópica (Baird et al., 2014). Las reacciones alérgicas son ocasionadas por antígenos somáticos que producen urticaria, angioedema y anafilaxia. La anisakidosis gástrica se caracteriza por dolor epigástrico, náuseas y fiebre de bajo grado (Kakizoe et al., 1995). La anisakiasis intestinal por lo general se basa en dolor abdominal intermitente o constante, y luego se puede producir peritonitis y/o ascitis (Ishikura et al., 1993). La anisakidosis ectópica se produce cuando las larvas ingeridas perforan la pared del estómago o del intestino, migrando a otros órganos como hígado, páncreas o pulmón (Nawa et al., 2005; Ito et al., 2007).

A nivel mundial estos parásitos han infectado a más de 2,5 millones de personas. Japón es el país con mayor prevalencia de anisakidosis, con 2000 a 3000 casos reportados anualmente, seguido de Italia, España, Estados Unidos, China, Alemania, Brasil, Canadá, Chile, Corea, Dinamarca, Francia, Noruega, Nueva Zelanda, Portugal, Reino Unido, Perú y Australia (Rello, Adroher y Valero, 2004; Bandes, Selgred, Ríos y Salas, 2005; Shamsi, 2011). En vista de esta situación, las autoridades de diferentes países (p. ej. Union Europea, FAO, Organización Mundial de la Salud) han establecido regulaciones para evitar estos problemas de salud. Es por ello que a los productos marinos se les puede detectar nematodos anisákidos utilizando métodos no destructivo (p. ej. examen visual,

transiluminación), destructivos (p.ej. digestión) (Jackson, Bier, Payne y McClure, 1981; Levsen, Lunestad y Berland, 2005), inmunológicos (Iglesias et al., 1996) y moleculares (Españeira et al., 2010), siendo este último el más utilizado en la actualidad por la detección e identificación simultánea de las larvas de anisákidos.

### **2.3. Aspectos biológicos de *Dosidicus gigas***

El calamar gigante *Dosidicus gigas* es la especie endémica de mayor abundancia y tamaño del Pacífico Oriental, que se distribuye desde California (37°N) hasta el sur de Chile (47°S) (Nesis 1970; 1983; Nigmatullin, Nesis y Arkhipkin, 2001), y habita principalmente en los ambientes oceánico y nerítico (Roper, Sweeney y Nauen, 1984). Varios autores mencionan que la abundancia y la distribución de la especie está asociada a las corrientes oceánicas, producción primaria, zooplancton y peces pelágicos (Bakun y Csirke 1998; Ichii et al., 2002; Bazzino, Salinas-Zabala y Markaida, 2007).

El calamar gigante *D. gigas* tiene una gran importancia en la estructura trófica de los ecosistemas que habita. Constituye una presa de cachalotes, delfines, tiburones y pelágicos mayores (p. ej. pez espada, merlín, atún) (Zuev, Nesis y Nigmatullin, 1975) y es un depredador de varias especies de peces, crustáceos y otros calamares, incluidos sus congéneres (Markaida y Sosa, 2003; Chong et al., 2005; Gilly et al., 2005; Ibáñez y Cubillos, 2007; Rosas-Luis, Salinas-Zavala, Koch, Monte-Luna, 2008; Roper, Nigmatullin y Jereb, 2010), lo que lo convierte en hospedero intermediario en los ciclos de vida de varias especies de parásitos, no solo nematodos sino también de cestodos y trematodos.

*D. gigas* soporta pesquerías comerciales (industrial y artesanal) y deportivas en el Pacífico, siendo explotada principalmente en México, Costa Rica, Perú y Chile (Morales-Bojorquez y Pacheco-Bedoya, 2016). Esta especie es la que soporta la mayor pesquería de cefalópodos a nivel mundial, con un volumen de captura de 1.161.690 toneladas en el 2014 (FAO, 2016). Particularmente en Ecuador, la información acerca de esta especie es escasa, y se ha enfocado principalmente a temas pesqueros; por ejemplo, determinación de la captura por unidad de esfuerzo para pesca de tipo industrial (6,8 kg/maq-h) y artesanal (8,5 kg/hombre-h) durante los años 1979, 1992, 1993 y 1995. Desde 1999 la captura de calamar gigante en Ecuador se destinaba principalmente para carnada de

pelágicos mayores, pero dada su abundancia en la zona y la escasez de otros recursos pesqueros tradicionales, a partir de 2014 se comienza a explotar como una alternativa de pesca para el sector artesanal e industrial, lo que genera nuevas investigaciones sobre aspectos biológicos pesqueros (Morales-Bojorquez y Pacheco-Bedoya, 2016; 2016a; 2017). Sin embargo, a pesar de destinarse para consumo humano, aspectos biológicos del calamar gigante en aguas ecuatorianas, como el caso de los parásitos causante de zoonosis, han sido muy poco estudiados.

#### 2.4. Registros taxonómicos de nematodos anisakidos en *Dosidicus gigas*.

A pesar de que *D. gigas* es un hospedero paraténico (hospedero intermediario que no interviene en el ciclo de vida del parásito) de nematodos de la familia Anisakidae, con registros de diferentes especies de anisakidos en varios países (Shukhgalter y Nigmatullin, 2001) (tabla 1), poco se ha investigado sobre la variación temporal de los parámetros de infección de las diferentes especies de anisakidos en cada localidad. Actualmente existen cuatro estudios en el Pacífico suramericano que incluyen reportes de nematodos anisakidos en *D. gigas*; sin embargo, dos de estos estudios en Perú (Iannacone y Alvariño, 2009; Céspedes, Iannacone y Salas, 2011) y uno en Chile (Pardo-Gandarillas, Lohrmann, Valdivia y Ibáñez, 2009) constituyen únicamente reportes puntuales de prevalencias. El cuarto estudio, realizado por Shukhgalter y Nigmatullin (2001), aporta información espacial de la distribución de anisakidos en calamar gigante e incluye muestreos en el Pacífico ecuatoriano en el período 1981-1982, pero además de necesitar una actualización, no aporta información temporal de los parámetros de infección.

**Tabla 1.** Registro taxonómico de anisakidos en *Dosidicus gigas*.

ESPECIE	SITIO DE INFECCIÓN	LOCALIDAD			
		Nicaragua	Ecuador	Perú	Chile
<i>Anisakis simplex</i> o tipo I	G, Pi, Cd y Ce	–	–	+	+
<i>Anisakis physeteris</i> o tipo II	G, Pi, Cd y Ce	+	+	+	+
<i>Porrocaecum</i> sp.	Cd, Pi	+	+	+	–
<i>Contracecum</i> sp.	Cd, Ce y Pi	–	–	+	–

Cd: Ciego digestivo, Ce: Ciego espiralado, G: Gónada, Pi: paredes del intestino.

### 3. VISUALIZACIÓN DEL ALCANCE DEL ESTUDIO

La familia Anisakidae incluye varias especies de nematodos que afectan al hombre, provocando reacciones alérgicas, alteraciones gastrointestinales y shock anafiláctico (Audicana y Kennedy, 2008). Por esta razón, esta familia de nematodos se ha convertido en una de las principales preocupaciones para la salud pública, fundamentalmente en zonas con altos índices de consumo de productos del mar (Lymbery y Cheah, 2007). El calamar gigante *D. gigas* es uno de los hospederos intermediarios de nematodos anisakidos, según reportes de México, Chile y Perú (Shukhgalter y Nigmatullin, 2001; Iannacone y Alvariño, 2009; Pardo-Gandarillas et al., 2009), y desde el año 2014 se captura en Ecuador con fines de consumo humano. Considerando la importancia de los nematodos anisakidos para la salud pública, los antecedentes de reportes de anisakidos en *D. gigas* y el desconocimiento sobre las especies de parásitos que afectan a este hospedero en el Pacífico ecuatoriano, es importante brindar un listado actualizado de los nematodos anisakidos que afectan al calamar gigante en el Pacífico ecuatoriano, incluyendo sus parámetros de infección, así como la variabilidad temporal de las diferentes especies observadas y los daños histológicos que ocasionan en el hospedero, información que servirá de base para posteriores estudios de riesgo de estos parásitos a la salud pública en el Ecuador.

## **4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la distribución temporal de nematodos anisakidos del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Pacífico ecuatoriano.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar las especies de anisakidos que parasitan al calamar gigante *D. gigas* en el área de estudio, y los parámetros de infección (Prevalencia, abundancia media e intensidad promedio) para cada una de las especies encontradas.

Determinar la variación temporal de los anisakidos parásitos de *D. gigas* en el área de estudio.

Evaluar los daños histológicos ocasionado por estos nematodos en el hospedero.

## 5. ELABORACIÓN DE HIPÓTESIS Y DEFINICIÓN DE VARIABLES

### 5.1. HIPÓTESIS

Los nematodos anisakidos que parasitan al calamar gigante *D. gigas* en el Pacífico ecuatoriano, presentaran variaciones en los parámetros de infección, en respuesta a la temporada climática (lluvias – secas).

### 5.2. DEFINICIÓN DE VARIABLES

Las variables que se tomaron para la siguiente investigación fueron:

#### 5.2.1. Variables biológicas

**Longitud dorsal del manto (LDM):** Es la medida tomada desde el margen anterior entre la fusión cabeza/manto hasta el ápice posterior del manto, la cual se expresa en cm.

**Peso:** Es el total de masa de un individuo, se expresa en gramos.

**Sexo:** Es el conjunto de características morfológicas y sexuales que diferencian a macho y hembra en organismos de una misma especie.

#### 5.2.2. Variables parasitológicas

Los parámetros de infección; prevalencia, abundancia media e intensidad promedio, se calcularon de acuerdo a la definición dada por Bush, Lafferty, Lotz y Shostak (1997).

**Prevalencia:** Es definida como el número de hospederos infectados con una especie particular de parásito dividido entre el número de hospederos revisados de una determinada especie. Se expresa como un porcentaje.

$$P = \frac{nh_i}{N} 100$$

En donde;  $n_{hi}$  es el número de hospederos infectados con una especie particular de parásito y  $N$  el número de hospederos revisados.

**Abundancia:** Es el número de individuos de una especie particular de parásitos en un hospedero.

**Abundancia media:** Es el número total de individuos de una especie particular de parásito dividido entre el número total de hospederos examinados de una determinada especie (infectados y no infectados).

$$A = \frac{Np}{N}$$

En donde  $Np$  es el número de una especie particular de parásito y  $N$  el número de hospederos revisados.

**Intensidad de infestación:** Es el número de individuos de una especie particular de parásito en un hospedero infectado.

**Intensidad promedio:** Es el número total de individuos de una especie particular de parásito dividido entre el número de hospederos infectados con una especie particular de parásito.

$$I = \frac{Np}{H_i}$$

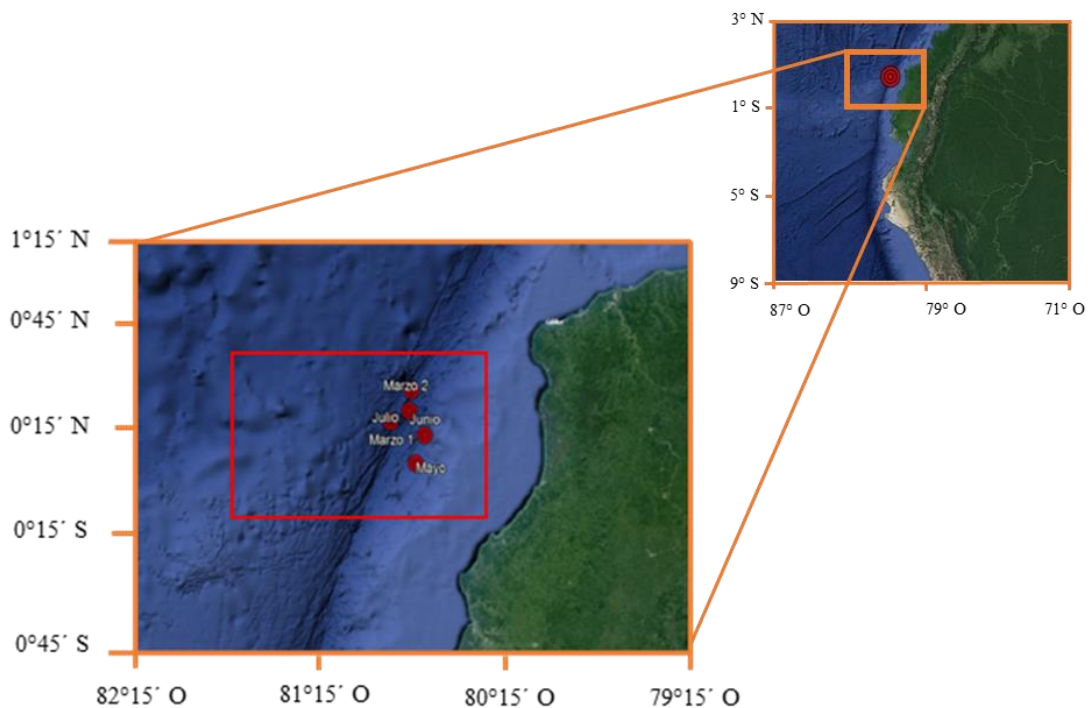
En donde  $Np$  es el número de una especie particular de parásito y  $H_i$  es el número de hospederos infectados con esa especie de parásito.



## 6. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN (METODOLOGÍA)

### 6.1. Área de estudio

El área de estudio comprende varios puntos en la costa ecuatoriana. Un primer muestreo (septiembre 2016) se realizó a bordo del buque oceanográfico de la armada, con colaboración del INOCAR, donde se colectaron muestras en varios puntos del Pacífico ecuatoriano. Los otros cuatro muestreos (marzo ( $00^{\circ}18'647''\text{N}$  y  $80^{\circ}41'412''\text{O}$ ;  $00^{\circ}31'121''\text{N}$  y  $80^{\circ}30'746''\text{O}$ ), mayo ( $00^{\circ}10'113''\text{N}$  y  $80^{\circ}44'132''\text{O}$ ), junio ( $00^{\circ}25'580''\text{N}$  y  $80^{\circ}46'903''\text{O}$ ), julio ( $00^{\circ}22'291''\text{N}$  y  $80^{\circ}52'311''\text{O}$ ) del 2017) fueron realizados a bordo de una embarcación de pesca artesanal del cantón Jama, provincia de Manabí. Dichos muestreos fueron realizados en puntos diferentes a diferentes distancias de la costa (Fig. 1), colectándose un mínimo de 30 ejemplares por mes.



**Figura 1.** Ubicación geográfica del área de estudio y sitios muestreados en el Pacífico ecuatoriano. El rectángulo rojo comprende el área muestreada durante el mes septiembre del 2016 (crucero oceanográfico) y los círculos rojos muestran los meses (marzo, mayo, junio y julio) muestreados en la embarcación artesanal durante el 2017.

En todos los muestreos, los organismos fueron capturados durante la noche de luna nueva, mediante línea de mano utilizando pulperos, metodología estandarizada para investigaciones de este tipo (Boyle y Rodhouse, 2007). Los individuos colectados fueron

colocados individualmente en bolsas plásticas, debidamente etiquetados, y mantenidos en refrigeración. A algunos de los ejemplares se les practicó un corte longitudinal en la parte ventral del manto y fueron fijados en formalina neutra al 10% para análisis histológico. Todas las muestras colectadas fueron trasladadas al laboratorio del Centro de Sanidad Acuícola (CSA) en la Escuela de Acuicultura y Pesquería de la UTM para su procesamiento.

## **6.2. Procedimientos de laboratorio**

En el CSA de la Escuela de Acuicultura y Pesquería, a cada ejemplar se le realizó una biometría tomando la longitud dorsal del manto LDM (cm) con una cinta métrica y su peso (g) con una báscula digital OHAUS. Posteriormente se le practicó una disección donde cada tejido u órgano se colocó en cajas de Petri con solución salina al 0,9% para su posterior observación bajo un microscopio estereoscopio. Los nematodos parásitos que se encontraron fueron preservados en tubos Eppendorf de 2,5 ml con etanol 70%. Para la fijación y procesamiento de los nematodos se utilizó la metodología de Vidal Martínez, Aguirre-Macedo, Scholz y Gonzáles-Solís (2002) modificada, que brevemente consistió en la aclaración de la cutícula al pasar los nematodos por soluciones graduales de glicerina-etanol (1:20, 1:10, 1:5, 1:2) con la modificación en el último paso (1:2) de mezclar 50% de ácido láctico y 50% de la solución de glicerina-etanol 1:2. Esta modificación permitió una mejor aclaración con el fin de visualizar las estructuras internas. La identificación taxonómica se realizó por el método clásico utilizando claves de identificación para el grupo proporcionadas por Anderson (1992) y Moravec (1994; 1998; 2004), y las claves de Koinari et al. (2013). Las imágenes fueron tomadas con ayuda de una cámara AmScope® de 9,1 MP acoplada al microscopio Olympus.

Para la evaluación histológica se extrajeron fragmentos de tejidos parasitados de 0,3 cm<sup>3</sup>, los cuales fueron procesados por la técnica de inclusión en parafina, cortados en secciones finas (5 µm), teñidos con los colorantes de rutina hematoxilina y eosina, y montados en portaobjetos con tolueno (Entellan®) (Humason, 1979). Las laminillas obtenidas fueron analizadas con ayuda de un microscopio Olympus® BX53 para la descripción de las lesiones. Las imágenes fueron tomadas con ayuda de una cámara AmScope® de 9,1 MP acoplada al microscopio Olympus.

### **6.3. Análisis de la información**

#### **6.3.1. Parámetros de infección**

Los parámetros de infección; prevalencia, abundancia media e intensidad promedio, fueron calculados para cada especie de parásito por mes de estudio y temporada climática, de acuerdo a la definición dada por Bush et al. (1997) (ver definición de variables en la sección 5.2.2).

#### **6.3.2. Análisis estadísticos**

Con el fin de determinar si existe asociación entre los parámetros de infección (abundancia e intensidad de una especie particular de parásito) y la longitud dorsal del manto o el peso del hospedero, se realizó un análisis de regresión lineal en donde las variables dependientes serán la longitud y el peso del hospedero, y las variables independientes serán la abundancia o intensidad. Se consideró una correlación positiva entre ambas variables planteadas si el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) resultara mayor a 0,5; con un nivel de probabilidad de  $p < 0,05$ . Para el análisis temporal se comparó la prevalencia de cada especie de anisakido entre los meses de muestreo y entre temporadas climáticas utilizando un análisis de tabla de contingencia 2x2, que consiste en una prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates ( $\text{Chi}^2_{\text{Yates}}$ ), utilizando un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Este mismo análisis se lo realizó para comparar la proporción de hembras y machos infectados con los no infectados.

Para comparar la abundancia e intensidad de los nematodos presentes en el hospedero, se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, una vez se determinó la normalidad de las variables. Esta normalidad se determinó mediante un análisis de Kolmogorov-Smirnov (Sokal y Rohlf, 1998).

## 7. ANÁLISIS DE DATOS Y REPORTE DE RESULTADOS

Se revisaron un total de 224 ejemplares de calamar gigante *Dosidicus gigas*, obtenidos desde septiembre 2016 hasta julio del 2017, con una talla promedio del LDM de  $22,03 \pm 4,26$  cm y un peso promedio de  $333,72 \pm 219,45$  g. Las medidas morfométricas mostraron diferencias significativas entre temporadas climáticas ( $p < 0,05$ ), pero no entre los meses de estudio ( $p > 0,05$ ). El análisis de regresión lineal no mostró una relación entre el LDM y la abundancia media ( $r^2 = 0,22$ ;  $p < 0,05$ ) o la intensidad promedio ( $r^2 = 0,23$ ;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, muestra una leve tendencia con el peso del hospedero tanto para la abundancia media ( $r^2 = 0,35$ ;  $p < 0,05$ ) como para la intensidad promedio ( $r^2 = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ). La proporción de hembras y machos fue de 3,31:1 y no se observó diferencias significativas entre los parámetros de infección (prevalencia y abundancia) y el sexo de la especie ( $\text{Chi}^2_{\text{Yates}} = 0,52$ ;  $p > 0,05$ ,  $H_{(1,224)} = 0,44$ ;  $p > 0,05$ ). En la tabla 2 se presentan las medidas morfométricas y los parámetros de infección de los organismos revisados en los meses de estudio.

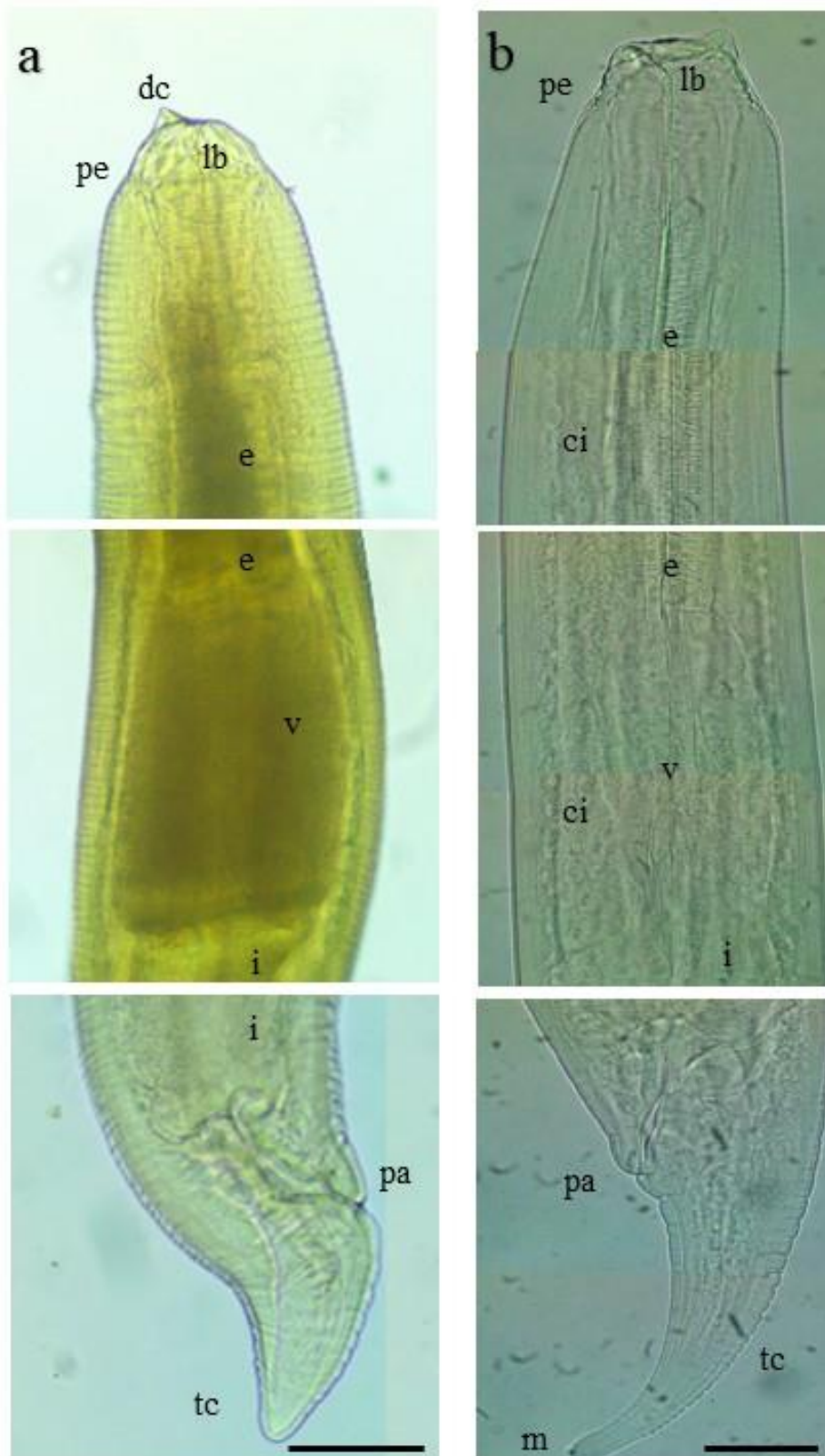
**Tabla 2.** Medidas morfométricas y parámetros de infección de los nematodos de la familia Anisakidae en *Dosidicus gigas* en los meses de estudio. (n) tamaño de muestra, (LDM) longitud dorsal del manto, (D.E) desviación estándar, N/D: No dato.

Meses	Septiembre 2016	Marzo 2017	Mayo	Junio	Julio
<b>n</b>	42	40	60	33	49
<b>LDM <math>\pm</math>D.E (cm)</b>	N/D	21,06 $\pm$ 3,79	23,46 $\pm$ 4,39	23,74 $\pm$ 4,91	19,94 $\pm$ 2,57
<b>Peso <math>\pm</math>D.E (g)</b>	N/D	277,98 $\pm$ 145,42	420,49 $\pm$ 221,65	408,44 $\pm$ 315,43	222,66 $\pm$ 88,36
<b>Prevalencia (%)</b>	30,95	40,00	56,67	63,64	59,18
<b>Intensidad promedio <math>\pm</math>D.E</b>	2 $\pm$ 1,62	1,69 $\pm$ 1,10	3,62 $\pm$ 2,76	3,48 $\pm$ 4,70	2,07 $\pm$ 1,54
<b>Abundancia media <math>\pm</math>D.E</b>	0,62 $\pm$ 1,60	0,68 $\pm$ 1,08	2,04 $\pm$ 2,74	2,21 $\pm$ 4,63	1,22 $\pm$ 1,53

### **7.1. Registro taxonómico y parámetros de infección de nematodos anisakidos en *Dosidicus gigas*.**

En los 224 hospederos revisados se encontraron 309 nematodos de la familia Anisakidae, pertenecientes a los géneros *Anisakis* y *Porrocaecum*. *Anisakis* sp., se caracterizó por presentar un diente cuticular ligeramente inclinado; un poro excretor situado ventrolateralmente a los labios; un ventrículo corto y ancho, con una unión ventrículo-intestinal recta o ligeramente inclinada; y la presencia de una cola post-anal cónica redondeada, sin mucrón (Fig. 2a). *Porrocaecum* sp. se distinguió por presentar interlabios armados con dientes; un ciego intestinal extendido antero-dorsalmente al esófago, justo debajo del anillo nervioso; un ventrículo pequeño, con unión ventrículo-intestino horizontal; y una cola post-anal alargada, con mucrón (Fig. 2b).

El 50,45 % (113) de los calamares revisados estuvieron infectados por al menos una especie de nematodos anisakidos. De las dos especies de parásitos encontradas, *Porrocaecum* sp, presentó parámetros de infección más elevados durante el estudio, con prevalencias de 49,11%, intensidad promedio de 2,65 y abundancia media de 1,30 (tabla 3). Esta especie fue más prevalente en los meses de mayo (56,67 %), julio (59,18 %) y junio (63,64 %), donde la intensidad promedio para estos meses osciló entre 2,07 y 3,59. *Anisakis* sp. presentó prevalencias de 3,13 % y se observó solamente en los meses de mayo (1,67 %), septiembre (7,14 %) y junio (9,09 %); sin embargo, en el mes de septiembre se registró una intensidad promedio elevada de  $4,00 \pm 1,55$ .



**Figura 2.** Nematodos de la familia Anisakidae en estadios larvales (L3) en *Dosidicus gigas* en el Pacífico ecuatoriano. **a.** Larva de *Anisakis* sp. Escala = 500  $\mu$ m. **b.** Larva de *Porrocaecum* sp. Escala = 600  $\mu$ m. (dc) diente cuticular; (lb) labios; (pe) poro excretor; (e) esófago; (v) ventrículo; (ci) ciego intestinal; (i) intestino; (pa) poro anal; (tc) terminación cola; (m) mucrón.

**Tabla 3.** Parámetros de infección de nematodos anisakidos en el calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Pacífico ecuatoriano. Para cada especie de anisakido se presentan los sitios de infección y los parámetros de infección total y por temporada climática. En orden descendente se muestra la prevalencia (%), la intensidad promedio  $\pm$  D.E. (desviación estándar), y la abundancia media  $\pm$  D.E. (n) número de calamares revisados.

Especies	Sitio de infección	Total (n=224)	Temporadas climáticas	
			Secas (n=124)	Lluvias (n=100)
<i>Anisakis</i> sp.	B,G, I, M, T	3,13 %	2,68 %	0,45 %
		2,29 $\pm$ 0,69	2,50 $\pm$ 0,92	1,00 $\pm$ 0,10
		0,07 $\pm$ 0,69	0,07 $\pm$ 0,91	0,00 $\pm$ 0,10
<i>Porrocaecum</i> sp.	B, Ce, Cd, I, M, Me, S, Se, T,	49,11 %	26,79 %	22,36 %
		2,65 $\pm$ 2,55	2,37 $\pm$ 2,70	2,98 $\pm$ 2,34
		1,30 $\pm$ 2,55	0,63 $\pm$ 2,69	0,67 $\pm$ 2,33

B: Branquias, Cd: Ciego digestivo, Ce: Ciego espiralado, G: Gónada, I: Intestino M: Manto, Me: Mesenterios, S: Sifón, Se: Saco espermatofórico, T: Tentáculo.

## 7.2. Variación temporal de los nematodos anisakidos en *Dosidicus gigas*.

La prevalencia mensual de nematodos de la familia Anisakidae (sin discriminar por especie), así como, la prevalencia mensual de *Porrocaecum* sp. mostraron diferencias significativas entre las combinaciones de septiembre con los meses mayo, junio y julio ( $p < 0,05$ ), mientras que la prevalencia por temporada climática (lluvias y secas) no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (tabla 4). La prevalencia de *Anisakis* sp. no mostró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre meses ni entre temporadas climáticas (tabla 4).

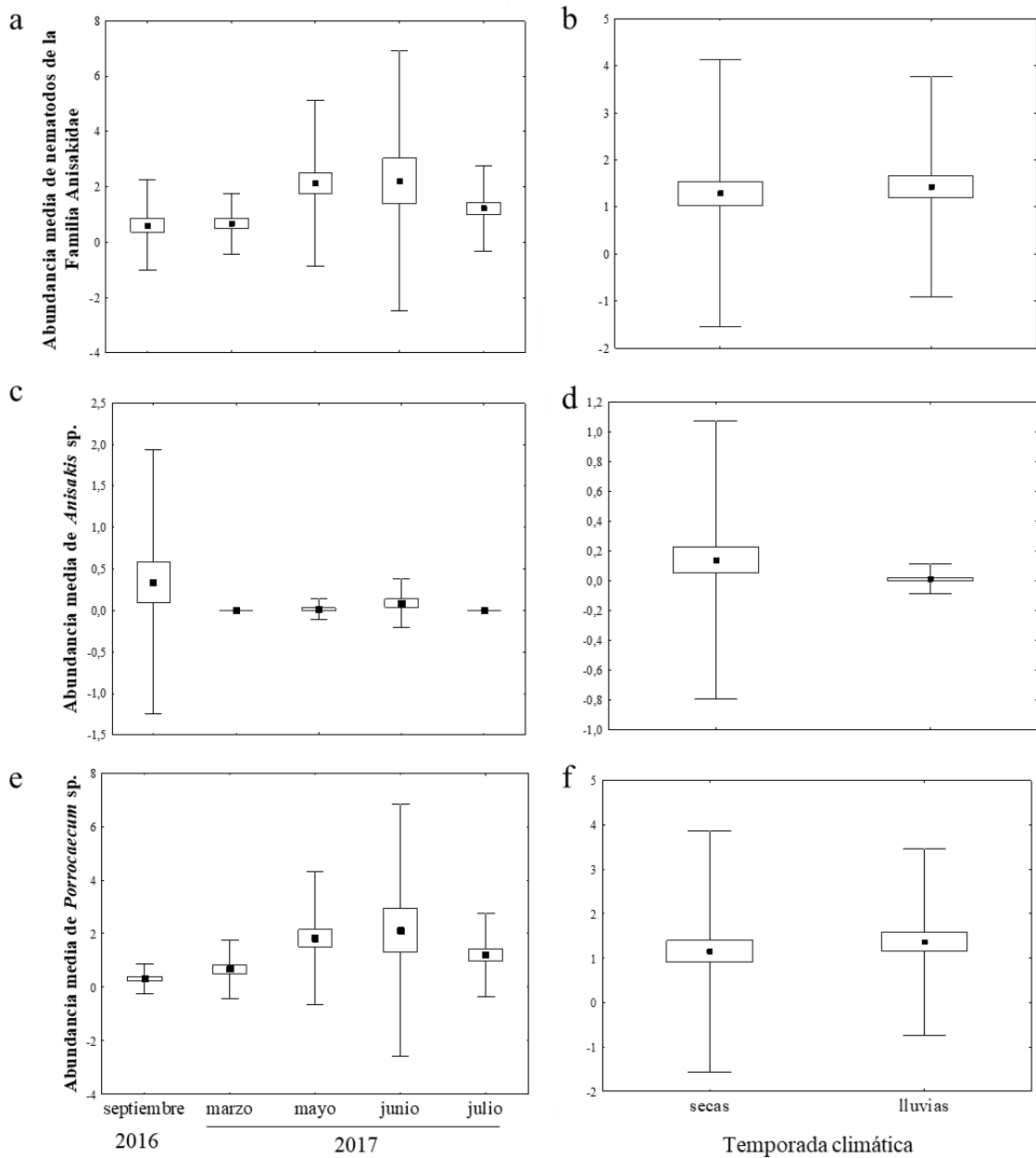
**Tabla 4.** Resultados del análisis de contingencia 2x2, con una prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates ( $\chi^2_{\text{Yates}}$ ). El signo “x” significa la comparación de las prevalencias entre los meses de estudio y temporada climática en *D. gigas*. p: valor de significancia. N/D: No datos estadísticos porque no se encontraron ejemplares de *Anisakis* sp. durante esos dos meses de muestreo.

Especie	Categoría	Combinaciones	$\chi^2_{\text{Yates}}$	p
Familia <i>Anisakidae</i>	Mensual	Septiembre x Marzo	0,39	> 0,05
		Septiembre x Mayo	5,58	< 0,05
		Septiembre x Junio	6,70	< 0,05
		Septiembre x Julio	6,16	< 0,05
		Marzo x Mayo	2,04	> 0,05
		Marzo x Junio	3,15	> 0,05
		Marzo x Julio	2,52	> 0,05
		Mayo x Junio	0,19	> 0,05
		Mayo x Julio	0,00	> 0,05
		Junio x Julio	0,03	> 0,05
Temporada climática		Lluvias <sub>(marzo + mayo)</sub> X Secas <sub>(junio + julio)</sub>	1,77	> 0,05
		Lluvias <sub>(marzo + mayo)</sub> X Secas <sub>(junio + julio + septiembre)</sub>	0,0	> 0,05
		Septiembre x Marzo	1,29	> 0,05
		Septiembre x Mayo	0,78	> 0,05
<i>Anisakis</i> sp.	Mensual	Septiembre x Junio	0,01	> 0,05
		Septiembre x Julio	1,73	> 0,05
		Marzo x Mayo	0,04	> 0,05
		Marzo x Junio	1,84	> 0,05
		Marzo x Julio	N/D	N/D
		Mayo x Junio	1,33	> 0,05
		Mayo x Julio	0,1	> 0,05
		Junio x Julio	2,40	> 0,05



		Lluvias <sub>(marzo + mayo)</sub> X		
		Secas <sub>(junio + julio)</sub>	0,50	> 0,05
	Temporadas			
	climáticas	Lluvias <sub>(marzo + mayo)</sub> X		
		Secas <sub>(junio + julio + septiembre)</sub>	1,58	> 0,05
		Septiembre x Marzo	1,79	> 0,05
		Septiembre x Mayo	9,58	< 0,05
		Septiembre x Junio	10,50	< 0,05
		Septiembre x Julio	10,16	< 0,05
	Mensual	Marzo x Mayo	2,04	> 0,05
		Marzo x Junio	3,15	> 0,05
		Marzo x Julio	2,52	> 0,05
<i>Porrocaecum</i>		Mayo x Junio	0,19	> 0,05
sp.		Mayo x Julio	0,00	> 0,05
		Junio x Julio	0,03	> 0,05
		Lluvias <sub>(marzo + mayo)</sub> X		
		Secas <sub>(junio + julio)</sub>	1,77	> 0,05
	Temporadas			
	climáticas	Lluvias <sub>(marzo + mayo)</sub> X		
		Secas <sub>(junio + julio + septiembre)</sub>	0,01	> 0,05

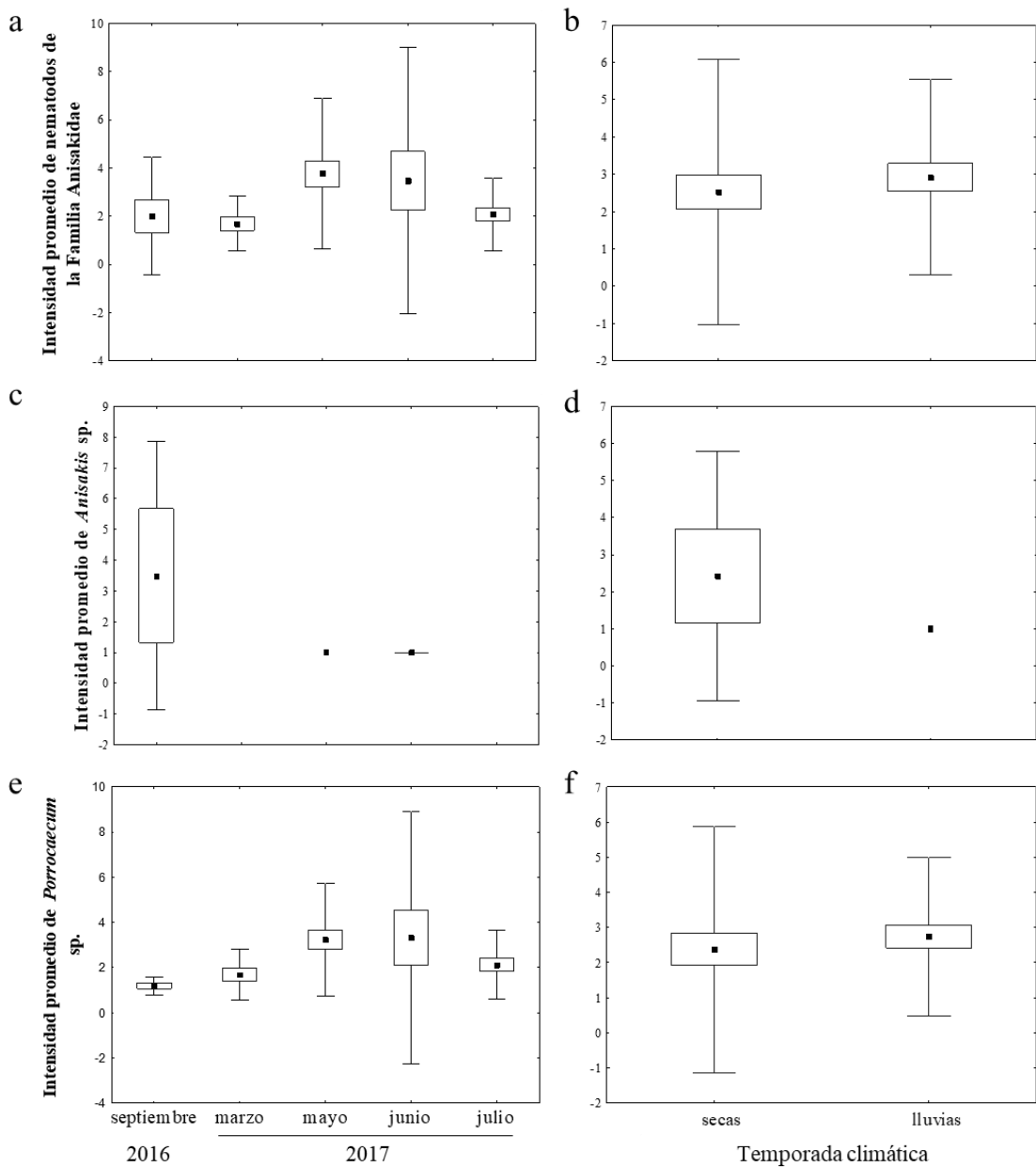
Los meses que mostraron mayores abundancias de nematodos de la familia Anisakidae y *Porrocaecum* sp. en *D. gigas* fueron junio ( $2,21 \pm 4,63$ ; 2,12) y mayo ( $2,04 \pm 2,74$ ; 2,03), mostrando diferencias significativas en relación a los otros meses ( $H_{(4, 224)} = 19,17$ ;  $p < 0,05$ ;  $H_{(4,223)} = 21,81$ ;  $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias por temporadas climáticas ( $p < 0,05$ ). *Anisakis* sp. mostró diferencias significativas entre meses ( $H_{(4,223)} = 11,35$ ;  $p < 0,05$ ), pero no entre temporadas climáticas ( $H_{(4,223)} = 3,51$ ;  $p > 0,05$ ) (Fig. 3).



**Figura 3.** Abundancia media mensual (gráficos de la izquierda) y temporal (gráficos de la derecha) de los nematodos de la familia Anisakidae (**a, b**) y de las especies *Anisakis* sp. (**c, d**) y *Porrocaecum* sp. (**e, f**) en *Dosidicus gigas*. Los cuadrados representan el valor promedio; las cajas representan  $\pm$  el error estándar; las barras representan  $\pm$  una desviación estándar.

La intensidad promedio de nematodos de la familia Anisakidae presentó diferencias significativas en relación a las temporadas climáticas ( $H_{(1,113)} = 4,43$ ;  $p < 0,05$ ) y a los meses de estudio ( $H_{(4,113)} = 18,74$ ;  $p < 0,05$ ), donde el mes de junio fue considerado diferente por reportar intensidades de  $3,48 \pm 4,70$ . *Anisakis* sp. no mostro diferencias significativas entre meses ( $H_{(4,7)} = 0,00$ ;  $p > 0,05$ ) ni entre temporadas ( $H_{(4,7)}$

= 0,33;  $p > 0,05$ ). *Porrocaecum* sp. mostró diferencias significativas entre temporadas climáticas ( $H_{(4,110)} = 4,39$ ;  $p < 0,05$ ) y entre los meses de estudio ( $H_{(4,110)} = 18,04$ ;  $p < 0,05$ ), donde el mes de mayo fue considerado diferente por presentar una intensidad de  $3,59 \pm 2,77$  (Fig. 4).



**Figura 4.** Intensidad promedio mensual (gráficos de la izquierda) y temporal (gráficos de la derecha) de los nematodos de la familia Anisakidae (a, b) y de las especies *Anisakis* sp. (c, d) y *Porrocaecum* sp. (e, f) en *Dosidicus gigas*. Los cuadrados representan el valor promedio; las cajas representan  $\pm$  el error estándar; las barras representan  $\pm$  una desviación estándar.

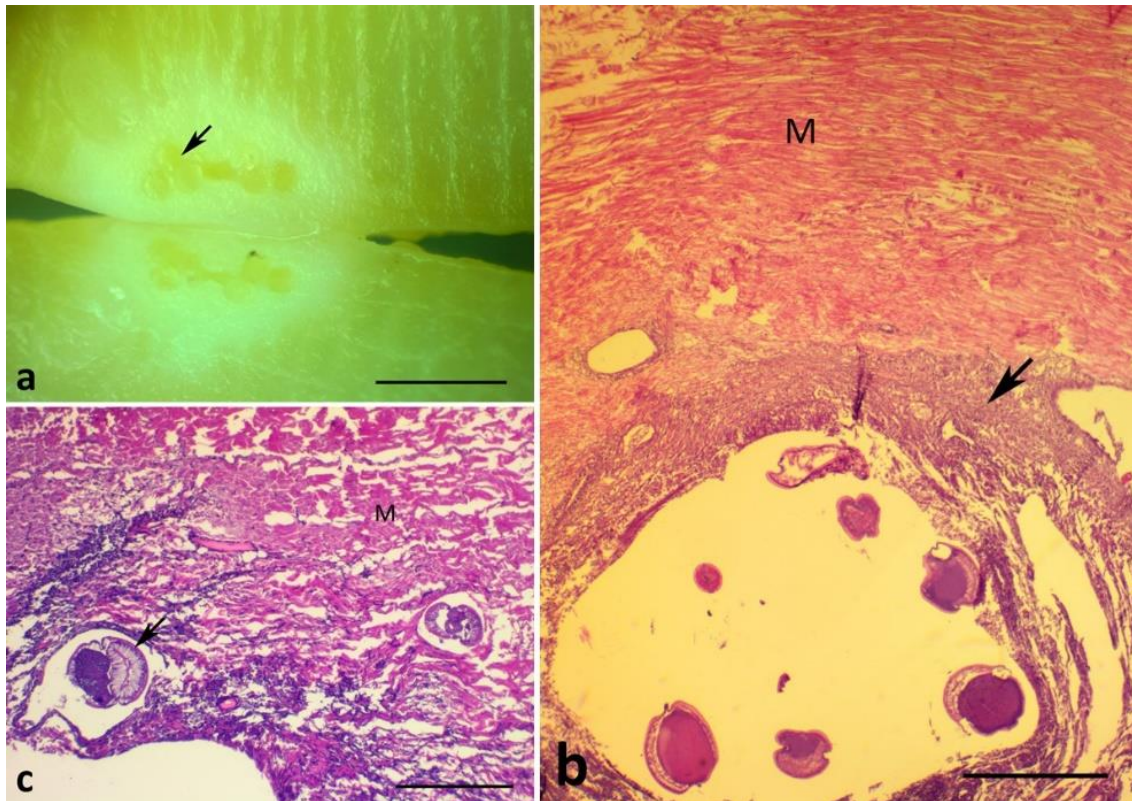
### 7.3. Evaluación de los daños histológicos ocasionados por nematodos anisakidos en *Dosidicus gigas*.

En los 113 calamares parasitados, el 70,06 % de los nematodos anisakidos se encontraron principalmente enquistados en la musculatura del manto, seguido de mesenterios con 48,59% y en menor medida en ciego digestivo, branquias, gónada, ciego espiralado, intestino, tentáculo, sifón y saco espermatofórico (tabla 5). Los ejemplares parasitados presentaron de 1 a 27 nematodos ( $2,73 \pm 3,14$ ) por hospedero.

**Tabla 5.** Prevalencia y número de nematodos colectados por los sitio de infección en *D. gigas* en el Pacífico ecuatoriano.

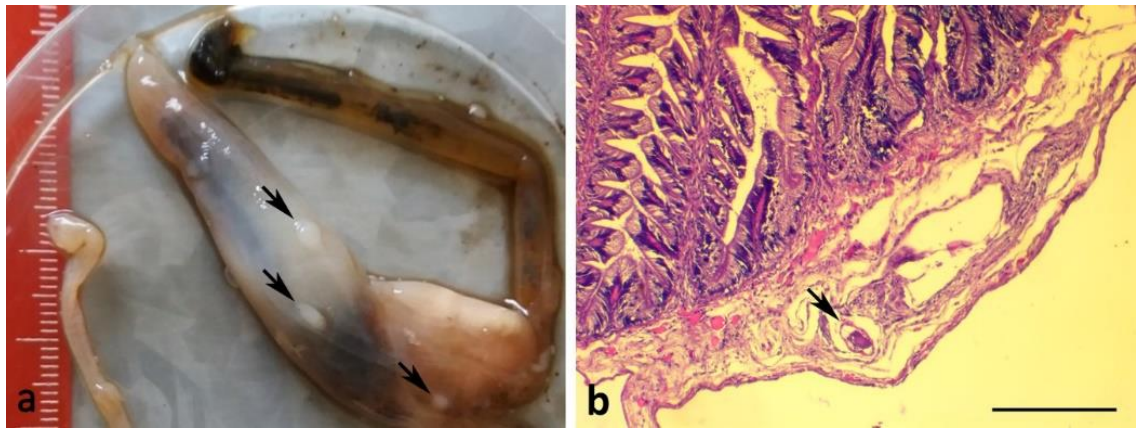
Sitio de infección	Número de nematodos colectados	Prevalencia (%)
Manto	164	70,06
Mesenterios	92	48,59
Ciego digestivo	16	13,56
Branquias	11	10,17
Gónada	13	5,65
Ciego espiralado	4	4,52
Intestino	3	3,39
Tentáculo	3	2,26
Sifón	2	1,13
Saco espermatofórico	1	1,13

Los quistes ocasionados por los nematodos son visibles macroscópicamente, como nódulos blanquecinos protuberantes en el sitio de infección (Figs. 5a y 6a). El tamaño del quiste depende de la longitud del nematodo y del tiempo de permanencia de la larva en el sitio de infección. Microscópicamente, la musculatura infectada por nematodos anisakidos presentó una reacción de tejido conectivo e infiltración hemocítica que rodea a los nematodos (Fig. 5b). También se observó una respuesta inflamatoria menos organizada que podría asociarse con una larva recién migrada (Fig. 5c). En el ciego digestivo las lesiones eran similares a las del manto, pero de menor tamaño debido a que en este órgano se encontraban las larvas de menor tamaño (Fig. 6b).

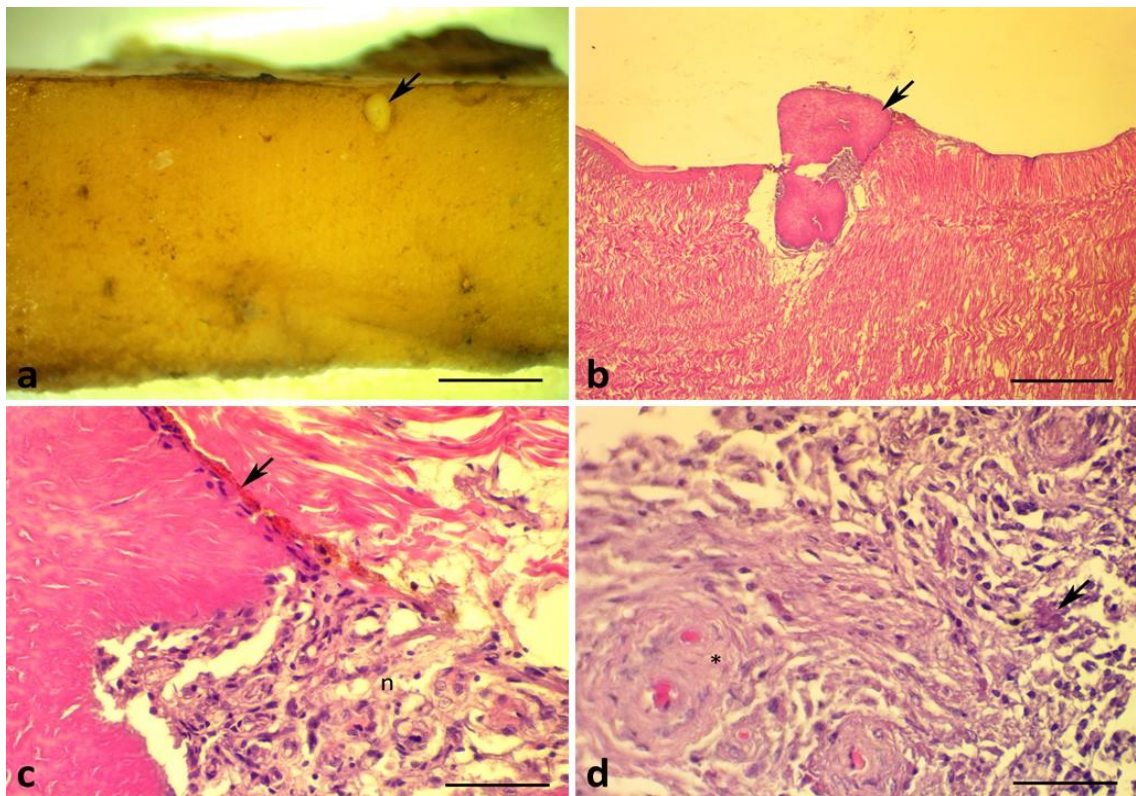


**Figura 5.** Vista macroscópica e histológica de secciones del manto de *Dosidicus gigas*. **a.** una larva de nematodo Anisakidae (flecha) enquistada en la musculatura del manto. Nota respuesta tisular formando nódulos blanquecinos alrededor del nematodo. Escala = 100  $\mu$ m. **b.** Sección histológica del tejido que se mostró en la figura 6a. El nematodo (vista central), seccionado transversalmente, está redondeado por un tejido conectivo organizado y un infiltrado hemocítico. H-E, escala = 500  $\mu$ m. **c.** Degeneración de fibras musculares y necrosis focal con infiltrado hemocítico en el músculo del manto (M) por la presencia de nematodos Anisakidae (flecha).H-E, escala = 250  $\mu$ m.

El 90,29 % de los organismos revisados presentaron nódulos de tamaño variable de color marrón principalmente en la musculatura del manto y en menor proporción en los tentáculos, cabeza y sifón, los cuales variaban de 1 a 30 nódulos ( $7,87 \pm 6,76$ ) en el hospedero (Fig.7a). Histológicamente, estos nódulos contienen un material hialino homogéneo, con muy pocas células en su interior (Fig. 7b), que podría ser de algún tipo de nematodo degradado, generando residuo durante la migración. Los nódulos están cubiertos por una capa de células pigmentadas de tejido fibro-conectivo que dan el color marrón (Fig. 7c). En algunas áreas se observaron focos de necrosis y proliferación de tejido conjuntivo asociado a colonias bacterianas, lo que sugiere una infección secundaria a la migración de las larvas de nematodos (Fig. 7d).



**Figura 6.** Vista macroscópica e histológica del aparato digestivo en *Dosidicus gigas*. **a.** Larvas de nematodo anisakidos (flecha) enquistados en las paredes del ciego espiralado y del ciego digestivo. Escala: cada división = 1 mm. **b.** Sección histológica transversal del ciego espiralado. Larva de nematodo Anisakidae (flecha) está redondeado por un tejido conectivo organizado y un infiltrado hemocítico. H-E, escala = 250  $\mu$ m.



**Figura 7.** Vista macroscópica e histológica del manto en *Dosidicus gigas*. **a.** Vista macroscópica de un nódulo en el manto (flecha), justo debajo del epitelio. El tejido se ha cortado transversalmente para facilitar la vista. Escala = 500  $\mu$ m. **b.** Corte histológico del manto que muestra un nódulo hialino (flecha). H-E, escala = 500  $\mu$ m. **c.** Detalle de la imagen 7b mostrando el material rosado hialino (izquierda) y la necrosis focal (n) redondeados por fibroblastos y células pigmentadas (flecha). H-E, escala = 100  $\mu$ m. **d.** Células gigantes con bacterias fagocitadas (\*) y colonias de bacterias (flecha) libres entre las fibras del tejido conectivo. Nótese la organización de los tejidos alrededor de las colonias bacterianas. H-E, escala = 100  $\mu$ m.

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el calamar gigante *Dosidicus gigas* del Pacífico ecuatoriano constituye un riesgo a la salud pública por estar infectado con nematodos de la familia Anisakidae. Los principales resultados fueron: 1. Se identificaron dos morfotipos pertenecientes a los géneros *Porrocaecum* y *Anisakis*. 2. *Porrocaecum* sp. mostró los mayores parámetros de infección durante todo el estudio. 3. La prevalencia no varió entre temporadas climáticas para ninguna de las dos especies ni para el total de anisakidos. 4. La prevalencia de *Anisakis* sp. no varió entre meses, pero la prevalencia total de anisakidos y de *Porrocaecum* sp. varió significativamente entre algunos meses. 5. El mes de septiembre representa un pico en la intensidad promedio de *Anisakis* sp. 6. Las larvas de anisakidos causan reacciones locales en los tejidos infectados. 7. El manto, parte comestible del calamar, mostró la mayor prevalencia e intensidad de infección, lo que constituye un riesgo a la salud pública. Estos resultados se discuten a continuación.

Los dos géneros de nematodos de la familia Anisakidae encontradas en este estudio, *Porrocaecum* y *Anisakis*, han sido reportados previamente para *D. gigas* en el Océano Pacífico (ver Shukhgalter y Nigmatullin, 2001; Iannacone y Alvariño, 2009; Pardo-Gandarillas, 2009). Sin embargo, solo el estudio de Shukhgalter y Nigmatullin (2001) incluye muestreos en el Pacífico ecuatoriano, pero estos estudios datan del período 1981-1982, por lo que requieren una actualización. *Anisakis* constituye un género de gran importancia para la salud pública porque alberga varias especies con gran potencial alergénico. Estos nematodos se encuentran en fase larval, utilizando a *D. gigas* como un hospedero paraténico, por lo que la identificación hasta nivel de especie no es posible utilizando métodos parasitológicos. Análisis moleculares posteriores, permitirán identificar las especies de anisakidos encontradas en este estudio.

*Porrocaecum* sp. presentó las mayores prevalencias, intensidad promedio y abundancia media con valores de 49,11%, 2,65 y 1,30, respectivamente. Estos valores han sido superiores a los de otros estudios. Por ejemplo, Shukhgalter y Nigmatullin (2001) encontraron prevalencias de 24% en Perú, 6,7% en Nicaragua y 12,9% en la Región este ecuatorial, a diferencia de Iannacone y Alvariño (2009) quienes reportan para

la zona norte de Perú una prevalencia, intensidad promedio y abundancia media de 2,3%, 1 y 0,02, respectivamente. Las altas prevalencias de esta especie de nematodo en este estudio podría deberse a una mayor presencia de hospederos definitivos, como el pez espada *Xiphius gladius*, en la región ecuatorial, lo que favorece la dispersión de larvas. Revelo (2012) manifiesta que *X. gladius* se encuentra disponible en Ecuador todo el año, siendo los meses de mayo a noviembre, donde presenta los mayores volúmenes de captura de la pesca comercial (artesanal e industrial). Por lo tanto, las altas prevalencias de *Porrocaecum* sp. en los meses de mayo, junio y julio, podría estar asociada a la abundancia de este hospedero definitivo en el área de estudio.

La prevalencia no varió significativamente entre temporadas climáticas para ninguna de las dos especies ni para el total de anisakidos. Sin embargo, las prevalencias de *Porrocaecum* sp. y *Anisakis* sp. mostraron una tendencia a ser mayor en temporada de secas con 26,79% y 2,68%, que en lluvias con 22,36% y 0,45%, respectivamente. Shukhgalter y Nigmatullin (2001) obtuvieron resultados similares, reportando prevalencias de 17,2 % (*Porrocaecum* sp.) y 38,7 % (*Anisakis* sp.) para la temporada de secas, mientras que para la temporada de lluvias reportan 3 % (*Porrocaecum* sp.) y 18,2 % (*Anisakis* sp.). Estos resultados también son congruentes con los de otros autores (Kennedy et al., 1986; Kennedy, 1990; Choudhury y Dick, 2000) que reportan una estabilidad de las poblaciones y/o comunidades de parásitos para diferentes hospederos en la región tropical. La variabilidad en los parámetros de infección se asocia a cambios ambientales como temperatura, salinidad, profundidad, etc., y/o variables biológicas del hospedero como talla, peso o estado inmunológico. Sin embargo, en la región tropical estos cambios no son significativos como para producir un cambio en los parámetros de infección, sino con la ocurrencia de fenómenos climatológicos extremos como el caso del Niño, la Niña, Huracanes, etc. Petrie et al. (2007) señalan que las prevalencias y los grados de parasitación de anisakidos son muy variables, y dependen de factores como la especie hospedera, zona geográfica, época del año y características individuales de cada hospedero. Por su parte, Reed et al. (2012) y Zorica et al. (2015) mencionan que la carga parasitaria varía estacionalmente y se relaciona con los hábitos alimentarios de la especie; mientras que Sánchez-Serrano y Cáceres-Martínez (2017) sugieren que el incremento de los parámetros de infección de los helmintos puede estar asociado con eventos ecológicos que ocurren estacionalmente. La subida de la corriente de Humbolt podría ser la causante



del leve incremento en la prevalencia de anisakidos en *D. gigas* del Pacífico ecuatoriano durante la época de secas, pero la ausencia de cambios significativos respecto a época de lluvias podría deberse a la ausencia de eventos climáticos extremos como el fenómeno del Niño ocurrido durante el período 2015-2016.

*Anisakis* sp. estuvo presente en los meses de mayo, septiembre y junio, mostrando una prevalencia global de 3,13%, muy baja en comparación con otras investigaciones en *D. gigas* en el Pacífico Oriental Tropical. Shukhgalter y Nigmatullin (2001) reportaron una prevalencia de *Anisakis* sp. de 24,2 % para el Pacífico-Este; Pardo-Gandarillas (2009) reportaron un 17,7% de prevalencia para la costa de Chile; mientras que Iannacone y Alvariño (2009) y Céspedes et al. (2011) reportaron prevalencias de 19 % y 50 % en el norte y sur de Perú respectivamente. Sin embargo, en este estudio se obtuvieron intensidades de infección por *Anisakis* sp. ( $4,00 \pm 1,55$ ) superiores a las reportadas en los estudios mencionados, p. ej., Iannacone y Alvariño (2009) en el norte de Perú, con un tamaño de muestra similar al de este estudio, presentó una intensidad promedio de 1,75. Una menor prevalencia y mayor intensidad de infección significa que un menor número de hospederos se encuentra infectado con un mayor número de anisakidos, y esto podría deberse a la distribución del hospedero durante los cambios ontogenéticos y/o a la presencia de hospederos definitivos en la zona durante una época del año. Septiembre fue el mes con mayor intensidad de infección por *Anisakis* sp., coincidiendo con la época (julio – septiembre) de apareamiento de cetáceos marinos frente a la costa ecuatoriana, reconocidos hospederos definitivos de nematodos anisakidos y depredadores de *D. gigas* (Rosas-Luis et al., 2008).

Las larvas de anisakidos provocaron mayormente lesiones en el manto, ciego espiralado y ciego digestivo, presentando una reacción del tejido conectivo e infiltración hemocítica leve. Estas alteraciones tisulares son evidentes en infestaciones de hospederos de peces (Smith, 1971; Hauck y May de 1977; Klimpel, Palm, Ruckert y Piatkowski, 2004) y cefalópodos (Pascual, González y Guerra, 2007). Además en el manto se presentaron nódulos de tamaño variable de color marrón, estos contienen un material hialino homogéneo, con una capa de células pigmentadas de tejido fibro-conectivo. Estas lesiones se caracterizaron por focos necróticos mezclados con colonias bacterianas a causa de la migración de las larvas de nematodos. Estas lesiones coinciden con el estudio

de Santoro et al. (2010) en tortugas marinas (*Caretta caretta*), las cuales tenían infección con larvas de *Anisakis pegreffii*. Estas reacciones son focales, por lo que no causan un gran daño en el hospedero y por tal motivo no comprometen la vida del animal. Sin embargo, la comercialización de este organismo podría ser afectada debido a la cantidad de lesiones presentes en el calamar, ya sea por los quites de nematodos o por los nódulos de color marrón.

En cuanto al sitio de infección, el manto de *D. gigas* presentó la mayor prevalencia (70 %) y el mayor número de nematodos (164) de la familia Anisakidae respecto a otros tejidos y órganos. Esto es sumamente importante dado que el manto es la parte comestible del calamar y por tanto, representa un alto riesgo zoonosario para los consumidores, quienes podrían contraer una anisakidosis. La anisakidosis es una zoonosis causada principalmente por los géneros *Anisakis*, *Contracaecum* y *Pseudoterranova* (Torres, Moya y Lamilla, 2000; Morales, 2008). Los humanos se infectan al consumir productos marinos infectados crudos o poco cocidos (Audicana, Del Pozo, Iglesias y Ubeira, 2003; Hochberg y Hamer, 2010). Las larvas, una vez que ingresan en el humano, puede ocasionar cuadros gástricos, alérgicos o gastroalérgicos. Las reacciones alérgicas (hipersensibilidad tipo I), ocasionadas principalmente por el género *Anisakis* (Gómez et al., 2003; Baird et al., 2016), son las más comunes, junto a las afecciones gástricas asociadas al género *Pseudoterranova*, (Terán-Angel y Rojas, 2012). Se ha reportado anisakidosis humana en más de veintiséis países en los cinco continentes, incluyendo, Holanda, Italia, Egipto, Nueva Zelanda, Canadá, Estados Unidos, Brasil, Perú, y Chile (Bouree, Paugam y Petithory, 1995; Audicana, Ansotegui, De Corres y Kennedy, 2002; Cabrera, Luna-Pineda y Suárez-Ognio, 2003; Couture, Measures, Gagnon y Desbiens, 2003; Audicana y Kennedy, 2008; Valle, Lopera, Sánchez, Lerma y Ruiz, 2012; D'amico et al., 2014; Torres-Frenzel y Torres, 2014; Torres, Puga, Castillo, Lamilla y Miranda, 2014; Colombo, Cattaneo, Castelletti y Bernardi, 2016). La mayoría de los casos notificados se han producido en España, Japón y otros países asiáticos, donde los estudios epidemiológicos han indicado que la anisakiasis (enfermedad causada por el género *Anisakis*) es más frecuente en poblaciones costeras (Klimpel y Palm, 2011; Audicana et al., 2002). En países como Brasil, Chile y Perú la anisakidosis es considerada un riesgo emergente para la salud (D'amico et al., 2014), asociado a la introducción de la dieta mediterránea y al aumento en el consumo de pescado para la prevención de enfermedades

cardiovasculares (Cabrera R, Trillo-Altamirano, 2004; Cabello, 2007; Morales, 2008; Tuemmers, Willgert y Serri, 2014). En Ecuador, no existen reportes oficiales de esta enfermedad, pero podría tratarse de una enfermedad emergente sub-diagnosticada, dado que existen reportes no publicados de anisakidos en varias especies de organismos acuáticos de interés comercial (Almeida, 2017) y que el consumo *per cápita* de productos marinos es de los más altos en Latinoamérica (FAO, 2014).

La mayor prevalencia de larvas de anisakidos en el manto podría estar relacionado con el tiempo de evisceración. En este estudio, los ejemplares de *D. gigas* fueron capturados pero no eviscerados, lo que pudo facilitar la migración de larvas desde las vísceras hasta el manto. Las larvas de los anisakidos requieren de un tiempo mínimo de treinta minutos para migrar del sistema digestivo del hospedero hacia el músculo (Cipriani et al., 2015), incrementando las probabilidades de ser ingerido por un hospedero definitivo. En el caso de peces se han reportado diferencias en la intensidad de infección de *A. pegreffii* y *A. simplex* (s.s.) entre vísceras y músculo, siendo mayores en este último sin que difiera la prevalencia total (Cipriani et al., 2015). En ese sentido, una medida práctica para reducir el riesgo de zoonosis en los consumidores podría ser la evisceración, siempre que se realice en un tiempo menor a 30 minutos post-captura. La congelación también ha resultado ser una medida efectiva para matar a los nematodos en los productos pesqueros, y se ha convertido en una exigencia en los países de la Unión Europea (D'amico et al., 2014). Sin embargo, en este estudio, algunos de los ejemplares analizados, que fueron mantenidos en congelación (-20°C) por 48 horas, mostraron nematodos anisakidos vivos, lo que sugiere que el tiempo de congelación debe ser ampliado a 72 horas o la temperatura de congelación reducida por debajo de -20°C.

## 9. CONCLUSIONES

Los nematodos de la familia Anisakidae encontrados en *Dosidicus gigas* pertenecen a los géneros *Porrocaecum* y *Anisakis*, si bien no es el primer reporte de estos géneros para Ecuador, pero este estudio es el primero en reportar el comportamiento temporal de anisakidos en *D. gigas*.

*Porrocaecum* sp. presentó los mayores parámetros de infección durante el estudio. *Anisakis* sp presentó prevalencias muy bajas en comparación con otros estudios, a diferencia de la intensidad promedio que presenta un pico en el mes de septiembre.

La prevalencia y la abundancia media no varían entre temporadas climáticas (lluvias – secas) para ninguna de las dos especies ni para el total de anisakidos.

Las lesiones de los nematodos en *D. gigas* son focales, por lo que no causan un gran daño en el hospedero que comprometan la vida del organismo; sin embargo, la comercialización de este calamar pudiera ser afectada por el número de lesiones en cada ejemplar.

El manto, parte comestible de *D. gigas*, es el sitio de infección con mayor prevalencia y el mayor número de nematodos anisakidos, lo que representa un alto riesgo zoonosario para los consumidores.

## 10. RECOMENDACIONES

Identificar mediante técnicas moleculares las especies larvales detectadas (*Anisakis* sp. y *Porrocaecum* sp.)

El calamar debe ser eviscerado al momento de la captura, para reducir la probabilidad de migración larval hacia el manto; congelar el producto por más de 72 horas antes de su consumo y el tiempo de cocción debe ser superior a 10 minutos a altas temperaturas (> 60°C), para garantizar la mortalidad de las larvas.

Las entidades de salud correspondientes, deben crear programas de control de riesgos en establecimientos alimentarios (fabricas procesadoras) y en los almacenamiento de productos de pesca (bodegas) ya sea para calamar o en otros mariscos de importancia comercial en nuestro país.

Ampliar los estudios de nematodos anisakidos en las especies de interés comercial en Ecuador mediante muestreos mensuales por un año y en varias localidades que cubran toda la costa ecuatoriana, lo que permitirá determinar la variación de los parámetros de infección temporal y espacial de las especies de nematodos anisakidos.

## 11. REFERENCIAL

### 11.1. PRESUPUESTO

CANTIDAD	DESCRIPCIÓN	TOTAL
1	Baño de Flotación 0.5 galones	\$1.232,00
1	Congelador MABE	\$549,19
20	Laminas portaobjetos biscelados Normax caja/100	\$79,80
10	Laminas cubreobjetos 22 x 22 caja/100	\$17,10
10	Caja para almacenamiento de 100 portaobjetos	\$68,40
3	Formaldehído Lobachemie 5 lts	\$109,44
1	Sodio Fosfato Dibásico Lobachemie 500 gr	\$21,66
1	Sodio Fosfato Monobásico Lobachemie 500 gr	\$20,52
1	Reactivos de PCR	\$464,80
1	Materiales de limpieza y protección	\$46,92
4	Muestreos	\$1.284,00
1	XIV Congreso colombiano de Ictiología y V encuentro de Ictiólogos Suramericanos	\$79,00
1	Impresiones, tintas y empastados del informe final	\$107,10
	<b>TOTAL</b>	<b>\$4.079,93</b>

Se anexan las facturas y copias del depósito realizado por la UTM.

## 11.2. CRONOGRAMA

Componentes/ rubros	Período*																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Objetivo específico 1: Determinar las especies de anisakidos que parasitan al calamar gigante <i>Dosidicus gigas</i> en el área de estudio, y <b>los parámetros de infección (prevalencia, abundancia media e intensidad promedio) para cada una de las especies encontradas.</b>																	
Actividades del objetivo específico 1																	
Colecta de calamares																	
Revisión y colecta de parásitos **																	
Procesamiento e identificación taxonómica																	
Redacción de resultados																	
Objetivo específico 2: <b>Determinar la variación temporal de los anisakidos parásitos de <i>D. gigas</i> en el área de estudio.</b>																	
Actividades del objetivo específico 2																	
Calcular los parámetros de infección y aplicar análisis estadísticos																	
Redacción de resultados																	
Objetivo específico 3: <b>Evaluar los daños histológicos ocasionado por estos nematodos en el hospedero.</b>																	
Actividades del objetivo específico 3																	
Procesamiento y análisis de muestras																	
Redacción de los resultados																	
Redacción del informe final***																	
Revisión y corrección del documento																	

\* El mes 1 corresponde a septiembre del 2016, mientras que el mes 17 corresponde a enero del 2018.

\*\* El mes 6 corresponde a febrero del 2017, fecha que se había depositado la beca otorgada para el proyecto de investigación.

\*\*\*Este proyecto de tesis forma parte del proyecto titulado “Variación temporal de la comunidad de parásitos del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Pacífico ecuatoriano”.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abattouy, N. (2012). *Prevalencia y factores de riesgo de la anisakiosis en el norte de Marruecos* (tesis doctoral). Universidad de Granada. España.
- Abaunza, P., Villamor, B., y Pérez, J. (1995). Infestation by larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridata) in horse mackerel, *Trachurus trachurus*, and Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*, En *ICES Divisions VIIIb, VIIIc and IXa (N-NW of Spain)* (pp. 223 – 233). España: Scientia Marina.
- Abollo, E., Gestal, C., y Pascual, S. (2001). Anisakid infection in the European shag *Phalacrocorax aristotelis aristotelis*. *Journal of Helminthology*, 75, 209 – 214.
- Almeida, A. (2017). *Parásitos metazoarios en peces del género Cynoscion Gill, 1861 desembarcados en Leonidas Plaza, Manabí, Ecuador* (tesis pregrado). Universidad Técnica de Manabí, Manabí, Ecuador.
- Anderson, R. (1992). *Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission*. Wallingford, United Kingdom: Center of Agriculture and Biosciences International.
- Audicana, M., y Kennedy, M. (2008). *Anisakis simplex*: From obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, 21 (2), 360 – 379.
- Audicana, M., Ansotegui, I., De Corres, L., y Kennedy, M. (2002). *Anisakis simplex*: Dangerous - Dead and alive?. *Trends in Parasitology*, 18 (1), 20 – 25.
- Audicana, M., Del Pozo, M., Iglesias, R., y Ubeira, F. (2003). *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens*. *Food Science and Technology*, 125, 613 – 636.
- Baird, F., Gasser, R., Jabbar, A., y Lopata, A. (2014). Foodborne anisakiasis and allergy. *Molecular and Cellular Probes*, 28, 167 – 174.
- Baird, F., Su, X., Aibinu, I., Nolan, M., Sugiyama, H., Otranto, D., ...Cantacessi, C. (2016). The *Anisakis* Transcriptome Provides a Resource for Fundamental and



Applied Studies on Allergy-Causing Parasites. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10 (7), 1 – 17.

- Bakun, A., y Csirke, J. (1998). Environmental processes and recruitment variability. En: P, Rodhouse, E. Dawe y R, O'Dor (Ed.), *Squid recruitment dynamics. The genus Illex as a model. The commercial Illex species. Influences on variability* (pp. 105 – 124). Roma, Italia: *FAO Fisheries Technical Paper*.
- Bandes, A., Selgred, S., Ríos, M., y Salas, H. (2005). Nematodos de la Familia Anisakidae en el pescado fresco que se expende para el consumo humano en Caracas, Venezuela. *INHRR*, 36 (2), 44 – 71.
- Bazzino, G., Salinas-Zavala, C., y Markaida, U. (2007). Variability in the population structure of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in Santa Rosalia, central Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 33, 173 – 186.
- Bouree, P., Paugam, A., y Petithory, J. (1995). Anisakidosis: Report of 25 Cases and review of the Literature. *Comparative Immunology Microbiology infect Diseases*, 18 (2), 75 – 84.
- Boyle, P., y Rodhouse, P. (2007). *Cephalopods: ecology and fisheries*. India: Blackwell Science.
- Bush, A., Lafferty, K., Lotz, J., y Shostak, A. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis revisited. *Journal of Parasitology*, 83, 575 – 583.
- Cabello, F. (2007). Acuicultura y salud pública. La expansión de la difilobotriasis en Chile y el mundo. (Aquaculture and public health. The emergence of diphyllbothriasis in Chile and the world). *Revista Médica de Chile*, 135 (8), 1064 – 1071.
- Cabezas, G., García, I., Fernández, J., y González, J. (2007). Informe de Vigilancia Tecnológica: Métodos para la detección e inactivación de *Anisakis simplex* y patologías de los productos. Recuperado de [http://www.elika.eus/datos/articulos/Archivo\\_EU496/TWR\\_ADEPESCA.pdf](http://www.elika.eus/datos/articulos/Archivo_EU496/TWR_ADEPESCA.pdf)

- Cabrera, R., y Trillo-Altamirano, M. (2004). Anisakidosis: ¿Una zoonosis parasitaria marina desconocida o emergente en el Perú? *Revista Gastroenterología del Perú*, 24, 335 – 342.
- Cabrera, R., Luna-Pineda, M., y Suárez-Ognio, L. (2003) Nuevo caso de infección humana por una larva de *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) en el Perú. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 23 (3), 217 – 220.
- Cavallero, S., Magnabosco, C., Civettini., Boffo, L., Mingarelli, G., Buratti, P.,...Arcangeli, G. (2015). Survey of *Anisakis* sp. and *Histerothylacium* sp. in sardines and anchovies from the North Adriatic Sea. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 18 – 21.
- Céspedes, R., Iannacone, J., y Salas, A. (2011). Helmintos parásitos de *Dosidicus gigas* “Pota” eviscerada en Arequipa, Perú. *Ecología Aplicada*, 10 (1), 1 – 11.
- Chai, J., Darwin-Murrell, K., y Lymbery, A. (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *International Journal for Parasitology*, 35, 1233 – 1254.
- Chong, J., Oyarzún, C., Galleguillos, R., Tarifeño, E., Sepúlveda, R., y Ibañez, C. (2005). Parámetros biológico-pesqueros de la jibia, *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae), frente a las costa de Chile Central (29°S-40°S) durante 1993-1994. *Gayana*, 69, 319 – 328.
- Choudhury, A., y Dick, T. (2000). Richness and diversity of helminth communities in tropical freshwater fishes: Empirical evidence. *Journal of Biogeography*, 27, 935 – 956.
- Cipriani, P., Smaldone, G., Acerra, V., D’Angelo, L., Anastasio, A., Bellisario, B., .... Mattiucci, S. (2015). Genetic identification and distribution of the parasitic larvae of *Anisakis pegreffii* and *Anisakis simplex* (s.s.) in European hake *Merluccius merluccius* from the Tyrrhenian Sea and Spanish Atlantic coast: Implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 198, 1 – 8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.019

- Colombo, F., Cattaneo, P., Castelletti, M., y Bernardi, C. (2016). Prevalence and Mean Intensity of Anisakidae Parasite in Sea food Caught in Mediterranean Sea Focus in on Fish Species at Risk of Being Raw-consumed. A Meta Analysis and Systematic Review. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 56 (9), 1404 – 1416. doi: 10.1080/10408398.2012.755947
- Couture, C., Measures, L., Gagnon, J., y Desbiens, C. (2003). Human intestinal anisakiosis due to consumption of raw salmon. *American Journal of Surgical Pathology*, 27 (8), 1167 – 1172.
- D'amico, P., Malandra, R., Costanzo, F., Castigliero, L., Guidi, A., Gianfaldoni, D., y Armani, A. (2014). Evolution of the *Anisakis* risk management in the European and Italian context. *Food Research International*, 64, 348 – 362. doi: 10.1016/j.foodres.2014.06.038
- EFSA. (2010). Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal*, 8 (4), 1543.
- Espiñeira, M., Herrero, B., y Vieites, F. (2010). Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR-RFLP of ITS – 1 region. *Food control*, 21, 1051 – 1060.
- FAO. (2014). *El Estado Mundial De La Pesca Y Acuicultura 2014*. Roma. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i3720s/i3720s01.pdf>
- FAO. 2016. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y nutrición para todos*. Roma.
- Gilly, W., Markaida, U., Baxter, C., Block, B., Boustany, A, Zeidberg, L., .... Salinas, C. (2006). Vertical and horizontal migrations by the jumbo squid *Dosidicus gigas* revealed by electronic tagging. *Marine Ecology Progress*, 324, 1 – 17.
- Gómez., B, Lasa, E., Arroabarren, E., Garrido, S., Anda, M., y Tabar, A. (2003). Allergy to *Anisakis simplex*. *Anales Sistema Sanitario Navarra*, 26 (2), 25 – 30.

- Hauck, A., y May, E. (1977). Histopathologic alterations associated with Anisakis larvae in Pacific herring from Oregon. *Journal of Wildlife Diseases*, 13, 290 – 293.
- Hochberg, N., y Hamer, D. (2010). Anisakidosis: Perils of the Deep. *Clinical Infectious Diseases*, 51(7), 806 – 812.
- Humason, G. (1979). *Animal tissue techniques*. San Francisco, California: W.H. Feeman and Company.
- Iannacone, J., y Alvarino, L. (2009). Catastre of endoparasite fauna of jumbo flying squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) in the north of Peru. *Neotropical Helminthology*, 3, 89 – 100.
- Ibañez, C., y Cubillos, L. (2007). Seasonal variation in the length structure and reproductive condition of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (d\_Orbigny, 1835) off central-south Chile. *Scientia Marina*, 71, 123 – 128.
- Ichii, T., Mahapatra, K., Watanabe, T., Yatsu, A., Inagake, D., y Okada, Y. (2002). Occurrence of jumbo flying squid *Dosidicus gigas* aggregations associated with the countercurrent ridge off the Costa Rica Dome during 1997 El Niño and 1999 La Niña. *Marine Ecology Progress Series*, 231, 151 – 166.
- Iglesias, R., Leiro, J., Ubeira, F., Santamarina, M., Navarrete, I., y Sanmartín, M. (1996). Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitology Research*, 82, 378 – 381.
- Incorvaia, I., y Hernández D. (2006). Nematodes parásitos como indicadores biológicos de *Macruronus magellanicus*. Recuperado de <http://marabierto.inidep.edu.ar/bitstream/handle/inidep/169/INIDEPIT61.pdf?sequence=1>
- Ishikura, H., Kikuchi, K., Nagasawa, K., Ooiwa, T., Tmiya, H., Sato, N., y Sugane, K. (1993). Anisakidae and anisakidosis. *Progress Clinical Parasitology*, 3, 43 – 102.
- Ito, Y., Ikematsu, Y., Yuzawa, H., Nishiwaki, Y., Kida, H., Waki, S., .... Kanematsu, T. (2007). Chronic gastric anisakiasis presenting as pneumoperitoneum. *Asian Journal Surgery*, 30 (1), 67 – 71.

- Jackson, G., Bier, J., Payne, W., y McClure, D. (1981). Recovery of parasitic nematodes from fish by digestion or elution. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 912 – 914.
- Kakizoe, S., Kakizoe, H., Kakizoe, K., Kakizoe, Y., Maruta, M., Kakizoe, T., y Kakizoe, S. (1995). Endoscopic findings and clinical manifestation of gastric anisakiasis. *American Journal Gastroenterology*, 90 (5), 761 – 763.
- Kennedy, C. (1990) Helminth communities in freshwater fish: structured communities or stochastic assemblages?. En W, Esch., O, Bush y J, AhoAlbert (Ed) *Parasite communities: Patterns and processes* (pp. 131 – 156). Europa: Springer.
- Kennedy, C., Bush, A., y Aho, J. (1986) Patterns in helminth communities: Why are fish and birds different? *Parasitology*, 93, 205 – 215.
- Klimpel, S., y Palm, H. (2011). Anisakid Nematode (Ascaridoidea) Life Cycles and Distribution: Increasing Zoonotic Potential in the Time of Climate Change?. *Progress in Parasitology*, 201– 222. doi: 10.1007/978-3-642-21396-0\_11
- Klimpel, S., Palm, H., Ruckert, S., y Piatkowski, U., (2004). The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). *Parasitology Research*, 94, 1 – 9.
- Koinari, M., Karl, S., Elliot, A., Ryan, U., y Lymbery, A. (2013). Identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) in marine fish hosts from Papua New Guinea. *Veterinary Parasitology*, 193, 126 – 133.
- Levsen, A., Lunestad, B., y Berland, B. (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, 828 – 832.
- Lymbery, A., y Cheah, F. (2007). Anisakid nematode and anisakiasis. En: K, Murrell y B, Fried (Ed.), *Food-Borne Parasitic Zoonoses: Fish and Plant-Borne Parasites* (pp. 185 – 207). New York: Springer.

- Markaida, U., y Sosa, O. (2003). Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83, 507 – 522.
- Mattiucci, S., y Nascetti, G. (2008). Chapter 2 advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host/parasite co-evolutionary processes. *Advances in parasitology*, 66, 47 – 148.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Damiano, S., y Nascetti, G. (2007). Molecular detection of sibling species in anisakid nematodes. *Parassitologia*, 49, 147 – 153.
- Mladineo, I. (2001). Effects of pH values and temperature changes on migration of *Anisakis simplex* DUJARDIN, 1845 invasive larvae (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in mackerel (*Scomber scombrus*, L.). *Acta Adriatica*, 41, 71 – 75.
- Morales, L. (2008). Pseudoterranovosis y sushi. *Parasitología*, 25 (3), 200 – 206.
- Morales-Bojórquez, E., y Pacheco-Bedoya, J. (2016a). Jumbo squid *Dosidicus gigas*: a new fishery in Ecuador. *Reviews in Fishery Sciences & Aquaculture*, 24, 98 – 110.
- Morales-Bojórquez, E., y Pacheco-Bedoya, J. (2016). Population dynamics of jumbo squid *Dosidicus gigas* in Pacific ecuadorian waters. *Journal of Shellfish Research*, 35: 1 – 14.
- Morales-Bojórquez, E., y Pacheco-Bedoya, J. (2017). A mantle structures stock assessment model for the jumbo squid, *Dosidicus gigas*, fishery of the Ecuadorian Pacific: a limited data approach. *Marine Biology Research*. doi: 10.1080/17451000.2016.1272696
- Moravec, F. (1994). *Parasitic nematodes of freshwater fishes of Europe*. Boston, London: Academic and Kluwer Academic publishers.
- Moravec, F. (1998). *Nematodes of freshwater fishes on the neotropical region*. Academic Praha.

- Moravec, F. (2004). Some aspects of the taxonomy and biology of dracunculoid nematodes parasitic in fishes: a review. *Folia Parasitologica*, 51, 1 – 13.
- Nawa, Y., Hatz, C., y Blum, J. (2005). Sushi delights and parasites: the risk of fishborne and foodborne parasitic zoonoses in Asia. *Clinical Infectious Diseases*, 41 (9), 1297 – 303.
- Nesis, K. (1970). The biology of the giant squid of Peru and Chile, *Dosidicus gigas*. *Oceanology*, 10 (1), 108 – 118.
- Nesis, K. (1983). *Dosidicus gigas*. En P, Boyle (Ed.), *Cephalopod life cycles*, (pp. 215 – 231). London: Academic Press.
- Nigmatullin, C., Nesis, K., y Arkhipkin, A. (2001). A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fishery Research*, 54, 9 – 19.
- Pardo-Gandarillas, M., Lohrmann, K., Valdivia, A., y Ibañez, C. (2009). First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current system off Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44, 397 – 408.
- Pascual, S., González, A., y Guerra, A. (2007). Parasites and cephalopod fisheries uncertainty: towards a waterfall understanding. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 17, 139 – 144.
- Petrie, A., Wootten, R., Bruno, D., MacKenzie, K., y Bron, J. (2007). A survey of *Anisakis* and *Pseudoterranova* in Scottish fisheries and the efficacy of current detection methods. Recuperado de [http://www.foodstandards.gov.scot/downloads/A\\_Survey\\_of\\_Anisakis\\_and\\_Pseudoterranova\\_in\\_Scottish\\_fisheries.pdf](http://www.foodstandards.gov.scot/downloads/A_Survey_of_Anisakis_and_Pseudoterranova_in_Scottish_fisheries.pdf)
- Puente, P., Anadón, A., Rodero, M., Romarís, F., Ubeira, F., y Cuéllar, C. (2008). *Anisakis simplex*: The high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. *Experimental Parasitology*, 118, 271 – 274.

- Quiazon, K., Yoshinaga, T., y Ogawa, K. (2008). Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitology International*, 57 (4), 483 – 489.
- Reed, C., MaCKenzie, K., y Van Der linge, C. (2012). Parasites of South Africa sardines, *Sardinops sagax*, and an assessment of their potential as biological tags. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 32 (2), 41 – 48.
- Rello, F., Adroher, F., y Valero, A. (2004) Anisakidos parásitos de peces comerciales. Riesgos asociados a la salud pública. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 17 (1), 173 – 197.
- Revelo, W. (2012). La pesca artesanal del pez espada *Xiphias gladius* en Ecuador. *Res Non Verba*, 109 – 124.
- Roongruangchai, J., Tamepattanapongsa, A., y Roongruangchai, K. (2014). Stereo and scanning electron microscopic studies of the third stage larvae of *Anisakis simplex*. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health*, 43 (2), 287 – 295.
- Roper, C., Nigmatullin, C., y Jereb, P. (2010). Family Ommastrephidae. En P, Jereb Y C, Roper (Ed), *Cephalopods of the World. An annotated and illustrated catalogue of species known to date* (pp. 269 – 347). Roma: FAO.
- Roper, C., Sweeney, M., y Nauen, C. (1984). Cephalops of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. FAO, pp. 125 – 277.
- Rosas-Luis, R., Salinas-Zavala, C., Koch, V., y Monte-Luna. (2008). Importance of jumb squid *Dosidicus gigas* (Orbigny, 1835) in the pelagic ecosystem of the central Gulf of California. *Ecological Modelling*, 218, 149 – 161.
- Ruíz-Valero, J., Valero, A., Adroher, F., y Ortega, J. (1992). Presencia de ascáridos en peces comerciales de frecuente consumo en Granada. España: Universidad de Granada. ISBN: 978-84-7801-153-7.



- Sánchez-Serrano, S., y Cáceres-Martínez, J. (2017). Primer registro helmintológico de la sardina monterrey *Sardinops sagax* en Baja California, México, durante dos estaciones del año. *Hidrobiológica* 27 (1): 1 – 11.
- Santoro, M., Mattiucci, S., Paoletti, M., Liotta, A., Degli, B., Galiero, G., y Nascetti, G. (2010). Molecular identification and pathology of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) infection in the Mediterranean loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Vetrinary Parasitology*, 174, 65 – 71.
- Shamsi, S., y Butcher, A. (2011). First report of human anisakidosis in Australia. *Medical Journal Australia*, 194(4), 199 – 200.
- Shukhgalter, O., y Nigmatullin, C. (2001). Parasitic helminths of the jumbo squid *Dosidiscus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in open waters of the central east Pacific. *Ficheries Research*, 54, 95 – 110.
- Smith, J. (1971). *Thysanoessa inermis* and *T. longicaudata* (Euphausiidae) as first intermediate hosts of *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridata) in the Northern Sea, to the north of Scotland and at Faroe. *Nature*, 234, 478.
- Sokal, R., y Rohlf, F. (1998). *Biometry, principles and statistic methods in biological*. San Francisco, California: W.H. Freeman.
- Tejada, M. (2009). *Anisakis*: efecto de los tratamientos dados al pescado en las larvas y en sus alérgenos. *Alimentación Nutrición y Salud*, 16 (3), 71 – 83.
- Terán-Ángel, G., y Rojas, J. (2012). Anisakidosis, inflamación e hipersensibilidad (Anisakidosis , inflammation and hypersensitivity ) *Resumen*, 1 (1), 30 – 37.
- Torres, P., Moya, R., y Lamilla, J. (2000). Nematodos anisakidos de interés en salud pública en peces comercializados en Valdivia, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 32(1). Recuperado de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2000000100014](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2000000100014)
- Torres, P., Puga, S., Castillo, L., Lamilla, J., y Miranda, J. (2014). Helminths, myxozoans and microsporidians in muscles of commercialised fresh fish and their importance

- as potential risk for human health in the city of Valdivia, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46 (1), 83 – 92.
- Torres-Frenzel, P., y Torres, P. (2014). Anisakid Parasites in Commercial Hake Ceviche in Southern Chile. *Journal Food Protection*, 77 (7), 1237 – 1240.
- Tuemmers, C., Willgert, K., y Serri, M. (2014). Anisakiasis y Difilobotriasis .Ictiozoonosis de riesgo para la salud pública asociada al consumo del pescado crudo en Chile. *Revista de la Universidad del Zulia*, 5 (11), 27 – 39.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., y Uchida, A. (2008). Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International*, 57, 49 – 53.
- Valero, A., Paniagua, M., Hierro, I., Díaz, V., Valderrama, J., Benítez, R., y Adroher, F. (2006). Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the Mediterranean coasts of Andalucía (Southern Spain). *Parasitology. International*, 55, 1 – 5.
- Valle, J., Lopera, E., Sánchez, M., Lerma, R., y Ruiz, J. (2012) Spontaneous splenic rupture and *Anisakis* appendicitis presenting as abdominal pain: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 6 (1), 114. Recuperado de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3355033&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vidal-Martínez, V., Aguirre-Macedo, M., Scholz, T., González-Solís, D., y Mendoza-Franco, E. (2002). *Atlas de los helmintos parásitos de cíclidos de México*. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Yubero, F., Auroux, F., y López, V. (2004). Anisakidos parásitos de peces Comerciales. Riesgos asociados a la Salud Pública. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 17, 173 – 196.
- Zorica, B., Kec, V., Vidjak, O. MlaDineo, I., y Balic, D. (2015). Feeding habits and helminth parasites of sardine (*S. pilchardus*) and anchovy (*E. encrasicolus*) in the adriatic sea mediterranean. *Mediterranean Marine Science*, 17 (1), 216 – 229.

Zuev, G., Nesis, K., y Nigmatullin, C. (1975). System and evolution of the squid genera *Ommastrephes* and *Sysplectoteuthis* (Cephalopoda, Ommastrephidae). *Zoologicheskii Zhurnal*, 54 (10), 1468 – 1479.