



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS DEL MAR

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA MARINA

TESIS

SUPERVIVENCIA DE LARVAS III DE *Contracaecum multipapillatum* sensu lato (NEMATODA: ANISAKIDAE) DE LISAS (PISCES: MUGILIDAE) EN DIFERENTES MEDIOS CULINARIOS Y ASPECTOS SOBRE SU CICLO DE VIDA EN LA PAZ, B.C.S.

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO MARINO

PRESENTA:

GLORIA ISABEL VALLES VEGA

DIRECTORA:

M en C. MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ DEL PRADO ROSAS

LA PAZ, BAJA CALIFORNIA SUR, ABRIL 2011



UABCS

ÁREA DE CONOCIMIENTO DE CIENCIAS DEL MAR
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA MARINA
P.E. ACREDITADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR
comprometidos con la comunidad

Fecha: 06 de abril del 2011

**B.M. MARCO ANTONIO MEDINA LÓPEZ,
JEFE DEL DEPARTAMENTO ACADÉMICO
DE BIOLOGÍA MARINA,
PRESENTE.**

Los abajo firmantes comunicamos a usted, que habiendo revisado el **trabajo de tesis terminado** que realizó el (la) pasante de Biólogo Marino **C. Gloria Isabel Valles Vega**, con el Título: **“SUPERVIVENCIA DE LARVAS III DE *Contracaecum multipapillatum sensu lato* (NEMATODA: ANISAKIDAE) DE LISAS (PISCES: MUGILIDAE) EN DIFERENTES MEDIOS CULINARIOS Y ASPECTOS SOBRE SU CICLO DE VIDA”**; otorgamos nuestro **voto aprobatorio** y consideramos que dicho trabajo está listo para su defensa a fin de obtener el título de Biólogo Marino.

Maria del Carmen Gómez del Prado Rosas madec@uabcs.mx
Nombre Completo Firma

PRESIDENTE

Dr. CARLOS ANTONIO SANCHEZ OCHOA [Firma]
Nombre Completo Firma

SECRETARIO

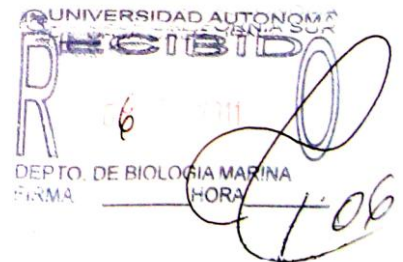
Juan Pablo [Firma] [Firma]
Nombre Completo Firma

VOCAL

Maria del Carmen Gómez del Prado Rosas madec@uabcs.mx
Nombre Completo Firma

DIRECTOR DE TESIS

C.c.p. Dirección de Servicios Escolares.
C.c.p. Interesado
C.c.p. Archivo



A mi familia y, de manera especial,
a mi madre por su cariñoso apoyo.

Agradecimientos

Antes que nada, agradezco, a mi primer y única mamá académica, la maestra, Mary Carmen Gómez del Prado Rosas, por su apoyo incondicional, paciencia, su inestimable ayuda en todo momento y su actitud siempre estimulante y alentadora para la realización de este trabajo.

A los Doctores Carlos Sánchez Ortiz y Juan Carlos Pérez Urbiola por su disposición y valiosos comentarios.

Al Dr. Sergio Hernández Trujillo por su colaboración y disposición para llevar a cabo este trabajo.

Al Sr. Elías Salazar integrante de la Cooperativa Pesquera del Esterito en La Paz y al centro comercial Ley por su generosa colaboración y disposición en proporcionar lo necesario para materializar este estudio.

A la Bióloga Yolanda Hornelas Orozco del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por su colaboración y ayuda en la toma de las micrografías electrónicas de este trabajo.

A la Dra. Mara Cortez por facilitarnos el acceso al laboratorio de Microscopia Electrónica del Departamento Académico de Geología de la UABCS y a Karla Sidón por su tiempo otorgado para la toma de las micrografías electrónicas de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Vázquez y Neftalí Gutiérrez por su disposición y ayuda para la identificación taxonómica.

Al trío de los amargados (Karlita, Ramón y Felipe) por formar parte de esta experiencia inolvidable.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de parasitología, Horacio, Magui, Rosy y Marco por compartir largos días de trabajo y hacerlos amenos.

A las que siempre estuvieron ahí y “por ahí”, que no son más que Carmelita, Dalia, Yesi “primis”, Emma Márquez y Dulce, quienes me han instruido y apoyado especialmente en el aspecto “informal”.

A mi familia; a mi mamá por ser mi mayor ejemplo a seguir, mi fortaleza y apoyo incondicional. A mi hermano Josué por cuidarme y apoyarme siempre. A mi abuelita Gloria por chiquearme y regañarme. A mi ángel guardián mi abuelito José que me cuida desde el lugar en el que este. A mis tíos Alejandro y Mary y mis niñas lindas por estar siempre a mi lado. Alfredo mi hermano adoptivo por hacerme renegar y alentarme en mis ante bajos. Sin ustedes no seria lo que soy.

GRACIAS A TODOS



ÍNDICE

Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tablas.....	vi
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	13
OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS.....	14
ÁREA DE ESTUDIO.....	15
METODOLOGÍA.....	18
Material biológico.....	18
Identificación taxonómica del nemátodo.....	18
Terminos ecológicos en parasitología.....	19
Supervivencia de nemátodos en lisas frescas.....	20
Supervivencia de nemátodos en lisas congeladas.....	21
Técnica histológica.....	22
Técnica de microscopia electronica de barrido.....	23
Primer hospedero intermediario.....	24
<i>Sedimento</i>	24



<i>Zooplanton</i>	25
RESULTADOS.....	26
Identificación taxonómica del nemátodo.....	26
Descripción de la larva de <i>Contracaecum multipapillatum s. l.</i>	26
Terminos ecológicos en parasitología.....	30
Supervivencia.....	32
Descripción histológica de cortes transversales de Larva L3 y de la cutícula por microscopia electrónica de barrido.....	34
Primer hospedero intermediario.....	56
DISCUSIÓN.....	58
Identificación taxonómica del nemátodo.....	58
Parámetros ecológicos en parasitología.....	58
Supervivencia.....	60
Descripción histológica de cortes transversales de Larva L3 y de la pared del cuerpo por microscopia electrónica de barrido.....	62
Primer hospedero intermediario.....	65
CONCLUSIONES.....	69
RECOMENDACIONES.....	71
LITERATURA CITADA.....	73



Lista de Figuras

1. Ciclo de vida probable de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s.l.....	5
2. Corte transversal de la morfología anatómica de los nemátodos	8
3. Mapa del área de estudio.....	17
4. Métodos de separación de sedimento.....	25
5. Larva L3 de <i>C. multipapillatum</i> s. l. de <i>M. curema</i>	28
6a Extremo anterior de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l.....	29
6b. Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior de la larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l.....	29
7. Larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en diferentes órganos de <i>M. curema</i>	31
8. Supervivencia de la larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en días de los diferentes medios.....	32
9. Larva L3 <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en el medio de solución salina 0.9% en temperatura ambiente.....	35
10. Larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en el medio de solución salina al 0.9 % a temperatura de refrigerador.....	37
11. Larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en el medio de limón en temperatura ambiente.....	39
12. Larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en el medio de jugo de limón a temperatura de refrigeración.....	41
13. Larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en el medio de vinagre en temperatura ambiente.....	43
14. Larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en el medio de vinagre	



en temperatura de refrigeración.....	45
15. Larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en el medio de microondas.....	47
16. Larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en el medio de cocimiento en aceite.....	49
17. Larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en el medio de cocimiento en empapelado en aluminio.....	51
18. Larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l. en el medio de congelación.....	53
19. Costes histológicos y micrografías electrónicas de barrido del extremo anterior y posterior de la larva L3 de <i>Contracaecum multipapillatum</i> s. l	55
20. <i>Labidocera trispinosa</i> con un parásito en el hemocele.....	57
21. <i>Acartia lilljeborgii</i> con un parásito en el hemocele.....	57

Lista de Tablas

I. Supervivencia de <i>C. multipapillatum</i> s.l. en el medio de cocimiento con sus respectivas replicas.....	33
II. Organismos encontrados en las muestras de sedimento con el proceso de elutriación.....	56
III. Organismos encontrados en las muestras de sedimento con la técnica de Baermann.....	56



RESUMEN

La enfermedad Anisakidosis es producida por nemátodos parásitos (*Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium*) consumidos en el pescado crudo o semicrudo en cebiche, mariscales o sushi. La población de La Paz, Baja California Sur, consume lisas *Mugil curema* y *M. cephalus* en cebiche y tacos, peces con altas prevalencia e intensidad de parasitismo por larvas L3 de *Contracaecum multipapilatum sensu lato*, lo que podría incrementar el riesgo de adquirir la enfermedad. Se estudió la supervivencia de las larvas en diferentes medios culinarios y los efectos en su organización anatómica mediante la técnica histológica convencional y microscopía electrónica de barrido. Se recolectaron 709 larvas de 58 lisas *M. curema* procedentes del Estero Zacatecas y Balandra. Los nemátodos se mantuvieron en solución salina al 0.9% (testigo), jugo de limón y vinagre al 4% en temperaturas ambiente (24 a 27 °C) y refrigeración (9°C). Se cocinaron filetes de pescado con nemátodos en horno de microondas durante 2, 3 y 5 min en temperaturas de 85, 88 y 93°C y en estufa convencional se empapelaron y cocinaron durante 7 y 10 min de 82 a 90°C. Otros se frieron durante 5 y 7 min de 70 a 82 °C. Se revisaron lisas destinadas para su distribución a supermercados, congelados por 7 días en – 20 a -30°C. En temperatura ambiente los nemátodos tuvieron una supervivencia máxima de 16 días en solución salina, ocho días en jugo de limón y 42 días en vinagre. En refrigeración perduraron 14 días en solución salina, seis días en jugo de limón y 26 días en vinagre. En microondas, y cocimiento en aceite y empapelado se obtuvo la muerte



definitiva igual que en congelación. Los medios que provocaron más lesiones fueron el limón, vinagre y cocimiento. Los daños en el tegumento incluyeron cambios de grosor, aspecto, ruptura y desprendimiento de la cutícula de la hipodermis; forma irregular de los cordones epidérmicos; desgarramiento, acortamiento de las células musculares de tipo celomario y adhesión de sus fibras contráctiles. La organización histológica del aparato digestivo incluye ensanchamiento de la luz intestinal y desorganización de su arreglo celular. Además la deshidratación del pseudoceloma. Considerando que para su consumo el tiempo de preparación de la carne de pescado y su exposición al limón o vinagre es de 8 a 10 horas, probablemente la viabilidad de los nemátodos no se vería afectada en el caso de ingestión accidental, por lo que se recomienda su cocimiento o congelación por más de una semana de -20 a -30°C y cocimiento posterior. El primer hospedero intermediario no se encontró en muestras de sedimento (poliquetos, caprellidos, isópodos y copépodos) ni en zooplancton, pero en este último los copépodos *Labidocera trispinosa* y *Acartia lilljeborgii* presentaron larvas de céstodos y hemiúridos respectivamente. En infecciones experimentales los copépodos y peces pequeños actúan como hospederos intermediarios ya que pueden comerse las larvas del nemátodo en vida libre.

Palabras clave: Anisákidos, *Mugil curema*, supervivencia, La Paz, BCS. México.



INTRODUCCIÓN

La Ictiozoonosis son enfermedades transmitidas al ser humano por bacterias, virus y parásitos (helmintos), por el consumo de pescado, proveniente de las pesquerías y de la acuicultura. Existe una amplia variedad de parásitos que pueden infectar a los peces, pero solo un número respectivamente pequeño puede causar enfermedades al ser humano (Quijada *et al.*, 2005).

Entre los causantes de las Ictiozoonosis se encuentran gusanos del phylum Nematoda que se caracterizan por causar graves enfermedades en el hombre, tales como algunas especies de la familia Anisakidae [*Anisakis simplex*, *Pseudoterranova decipiens* complex y *Contracaecum* (= *Thynascaris*) *osculatum*], que provocan la Anisakidosis (Cabrera *et al.*, 2004). Ésta es una enfermedad del aparato digestivo causada por la ingestión del tercer estadio larvario (L3) del nemátodo. Basada en la localización dentro del humano, la enfermedad se clasifica en anisakidosis gástrica, intestinal y extraintestinal (pulmón, hígado y páncreas). Recientemente se ha descrito la forma gastroalérgica que provoca urticaria, angioedema o anafilaxia acompañada de un cuadro digestivo. Generalmente se distinguen dos etapas: la fase aguda, donde el cuadro clínico se caracteriza por náuseas y vómitos que se presentan 4 a 6 horas después de la ingestión del pescado infectado o bien, dolor abdominal, epigástrico y diarrea; la forma intestinal a veces se confunde con una apendicitis. En la fase crónica se pueden encontrar lesiones ulcerativas o tumores que a veces son confundidos con cáncer gástrico. También se ha



mencionado que está asociada con asma ocupacional y síntomas reumatológicos (Cabrera *et al.*, 2004 y Quijada *et al.*, 2005).

Los anisákidos adultos son parásitos de mamíferos marinos (ballenas, delfines y lobos marinos) y de algunas aves piscívoras (pelícanos y cormoranes), por medio de sus heces depositan en el mar los huevos embrionados que contienen el primer estadio larvario, éste muda poco después, al segundo estadio (L2), esta larva eclosiona en el agua y es ingerida por un invertebrado crustáceo que actúa como primer hospedero intermediario generalmente copépodos. Los peces que se alimentan de copépodos parasitados, actúan como segundos hospederos intermediarios, donde se desarrolla al tercer estadio (L3). El parásito completa su ciclo cuando los hospederos definitivos ingieren los peces o cefalópodos portadores de la larva L3 completándose el resto del desarrollo hasta la aparición de los vermes adultos (Fig. 1). El hombre actúa como hospedero accidental, cuando consume la larva L3 que se encuentra libre o enquistada en los tejidos de peces. En el hombre el parásito no logra desarrollarse hasta la fase adulta y sólo muda hasta la larva L4 (Cabrera *et al.*, 2004).

En América Latina se han descrito varias especies de peces como hospederos intermediarios de anisákidos, dentro de ellas está *Trachurus murphy*, *Merluccius hubbsi*, *Merluccius gayi*, *Sciaena deliciosa*, *Trichiurus lepturus*, *Pagrus pagrus*, *Mugil cephalus* y *M. curema* (Quijada *et al.*, 2005).

Por otra parte, *M. cephalus* Linnaeus, 1758 y *M. curema* Valenciennes, 1836, peces comúnmente llamados lisas, se caracterizan por presentar altas prevalencias e intensidades promedio de la larva L3 de *Contracaecum* sp.



Estas especies son muy abundantes en esteros, bahías y sistemas lagunares (Castro-Aguirre *et al.*, 1999). *M. cephalus* es cosmopolita de mares templados, tropicales y subtropicales. En el Océano Pacífico americano, se distribuye desde California hasta Chile, incluyendo el Golfo de California e Islas Galápagos. En el Océano Atlántico, desde Cabo Cod a Brasil, incluidos el Golfo de México y el Caribe (Castro-Aguirre *et al.*, 1999). *M. curema* se encuentra en el Pacífico Americano desde bahía Sebastián Vizcaíno, Baja California Sur, México hasta Coquimbo, Chile. En el Atlántico también se encuentra desde Cabo Cod a Brasil, incluidos el Golfo de México y las Antillas (Castro-Aguirre *et al.*, 1999). Las dos especies son eurihalinas, presentando movimientos de penetración y salidas a lugares dulceacuícolas (Castro-Aguirre *et al.*, 1999). En México, ambas especies tienen importancia comercial pues se consumen con frecuencia debido a su bajo costo en tacos, ahumadas y en cebiche principalmente. Plomozo-Lugo (2010) menciona que la captura de la flota ribereña en el litoral del Golfo de California en el periodo 2001-2005 fue de 19, 115. 65 toneladas de las especies más importantes, generando una ganancia económica de \$279, 140, 691 millones de pesos, donde la lisa constituye una de las 4 especies más importantes con una captura de 2, 103.18 toneladas.

Particularmente el género de *Contracaecum* (Railliet y Henry 1912) incluye aproximadamente 100 especies, que se distribuyen a nivel mundial, por lo general la larva mide entre 4 y 16 mm. En el extremo anterior son observados tres labios, un diente cuticular cónico y ligeramente romo. El poro excretor abre inmediatamente posterior al diente. Después de los labios hay un collar formado de anillos cuticulares que separa el cuello del cuerpo, las



anulaciones del collar son interrumpidos por una línea lateral. En el tubo digestivo pueden destacarse dos ciegos, es decir, uno esofágico y el otro intestinal. El extremo posterior es cónico, la cola post-anal larga con mucrón. *In vivo*, presenta un color blanco-amarillento y en algunos casos, se encuentran enrollados sobre sí mismos, enquistándose en diversos órganos del hospedero y con movimientos casi nulos (Olivero-Verbel y Baldiris-Avila 2008; Salgado-Maldonado y Barquín-Álvarez 1978; Thiengo *et al.*, 2000).

En particular, respecto al ciclo de vida de *Contracaecum*, Anderson (2000) menciona que las aves piscívoras son los hospederos definitivos de su fase adulta. Los huevos embrionados en primera fase larvaria se depositan en el agua, en donde se desarrollan y eclosiona como segunda fase larvaria, con un diente ventral a la abertura oral, el ventrículo y el ciego ventricular pequeño, etapa de vida libre hasta ser ingerida por un invertebrado crustáceo, generalmente copépodos que actúan como primer hospedero intermediario, en cuyo hemocele aumenta ligeramente su tamaño y un desarrollo parcial de los órganos. Posteriormente los copépodos y otros invertebrados son consumidos por peces que sirven como segundos hospederos intermediarios vertebrados en los que la larva alcanza su tercer estadio, crecen sustancialmente y se encapsulan en el mesenterio de diferentes órganos, se ha demostrado que la transferencia de las larvas de un pez a otro es posible mediante depredación (Fig. 1).

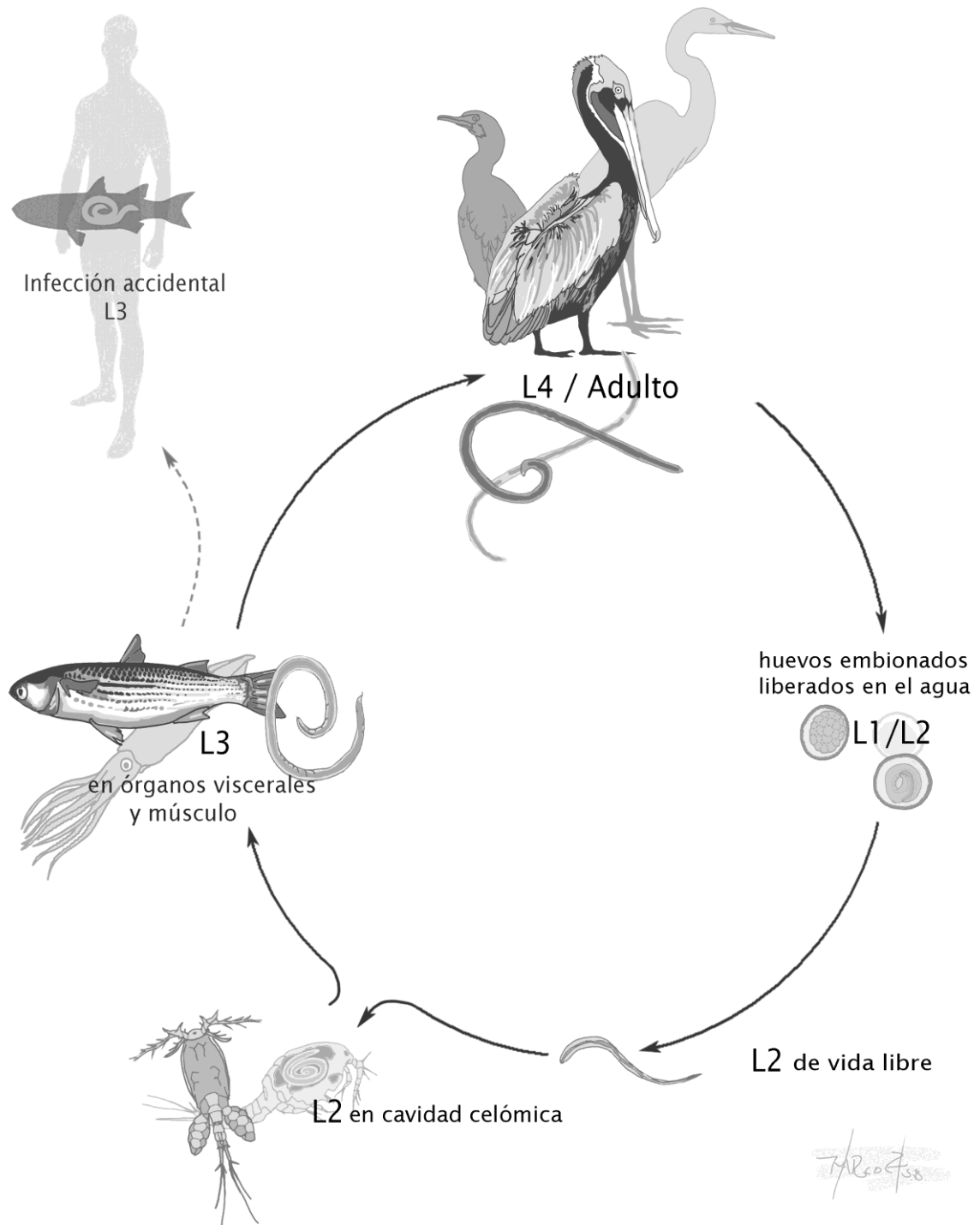


Figura. 1. Ciclo de vida probable de *Contracaecum multipapillatum* s. l. (tomado de Salazar, 2011).



La tercera fase larvaria de varias especies de *Contracaecum* se han registrado en peces del Golfo de México y América Central, encontrándose aproximadamente cuatro especies dentro del género, como es el caso de *C. multipapillatum* (von Drasche, 1882) morfológicamente el adulto se caracteriza por presentar tres labios generalmente de forma hexagonal, interlabios presentes y bien desarrollados. El esófago con una reducción del ventrículo globular. El ventrículo con un apéndice posterior sólido. Ciego intestinal presente. Los machos sin alas caudales y hasta 7 pares de papilas postanal, subventrales y laterales, numerosas papilas preanales, espículas iguales y gubernaculum ausente. Las hembras tienen la vulva en la parte anterior del cuerpo (Navone *et al.*, 2000).

Sin embargo, es difícil identificar a los anisákidos a nivel especie, ya que algunas de las características diagnósticas carecen de valor interespecífico, y algunas especies morfológicas forman en realidad complejos de varias especies diferenciadas genéticamente (Nalder *et al.*, 2005; Mattiucci *et al.*, 2008; Shamsi *et al.*, 2008; Shamsi *et al.*, 2009). En este caso la larva L3 del presente estudio, está dentro del complejo de *C. multipapillatum*, donde se han descrito cuatro especies nuevas utilizando la diferenciación de alozimas y secuencias, como las de ADN mitocondrial de la subunidad II del citocromo-oxidasa (COX2) donde se describe a *C. gibsoni* y *C. overstreeti* antes denominadas *C. multipapillatum* sp. "A" y *C. multipapillatum* "B" y con el primer y segundo espaciador transcrito interno del ADN ribosomal (ITS-1, ITS-2) a *C. multipapillatum* sp. "C" y *C. multipapillatum* sp. "D" (Mattiucci *et al.*, 2006; Mattiucci *et al.*, 2010; Shamsi *et al.*, 2008).



Las larvas presentes en las lisas *M. cephalus* de la Bahía de La Paz pertenecen a dicho complejo y aparentemente es una especie distinta de las cuatro ya descritas (Overstreet, 2007 * *comunicación personal*).

Descripción Histológica de los nemátodos.

Los nemátodos se caracterizan por tener el cuerpo cilíndrico, de forma alargada. La pared corporal está constituida por una cutícula de tipo acelular formada principalmente de proteínas secretadas por la epidermis subyacente, la cutícula está formada por tres capas principales (zona cortical, zona media y zona basal), que contienen colágeno y otros compuestos, y una epicutícula, la cual es delgada y puede presentar un recubrimiento de quinona. La epidermis, también denominada hipodermis porque se encuentra bajo la cutícula, es por lo general celular, pero puede ser sincicial en algunas especies, presenta cuatro engrosamientos longitudinales que penetran en el pseudocelo y se extienden a lo largo del cuerpo denominados cordones longitudinales que son una expansión del citoplasma hacia el interior, formando crestas a lo largo de las líneas media dorsal, media ventral y medias laterales del cuerpo. Los núcleos epidérmicos regularmente están restringidos a estos cordones y se disponen en hileras. La capa muscular de la pared del cuerpo está formada en su totalidad por fibras longitudinales, situadas entre los cordones longitudinales. Estas fibras pueden ser anchas y planas, o bien altas y estrechas, dependiendo de la especie. Cada fibra muscular posee un brazo delgado que va de ésta al cordón nervioso longitudinal dorsal o ventral, donde se produce la inervación.



El pseudocele o pseudoceloma es una cavidad situada entre la pared y las vísceras, se encuentra relleno de un líquido y tejido fibroso. El aparato digestivo está dividido en una región anterior (faringe) y el resto que constituye el intestino. En corte transversal la faringe muestra una luz cuticular trirradiada y su pared contiene fibrillas musculares arregladas radialmente entre las superficies externa e interna conteniendo además algunas células glandulares. La pared intestinal presenta pocas células musculares y está constituido de epitelio cilíndrico. El sistema excretor no posee células flamíferas ni ningún mecanismo que provoque una corriente; está formado por canales excretores en forma de H rodeados de material citoplásmico y con un poro excretor que parte del tubo común, los canales se encuentran situados en el espesor de los cordones laterales epidérmicos (Sherman y Sherman, 1970; Perez-Iñigo, 1976; Harrison y Ruppert, 1991) (Fig. 2).

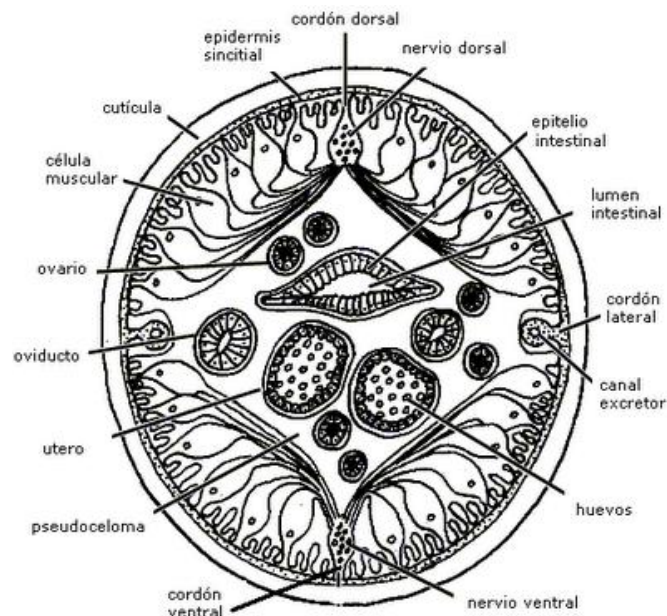


Figura. 2. Corte transversal de la morfología anatómica de los nematodos. (Tomado de Sherman y Sherman, 1970).



En México no hay registros de infección en el humano por nemátodos anisákidos, pero estos datos pueden estar relacionados con la falta de conocimiento de la población y de la comunidad médica, ya que tiene una dificultad diagnóstica por ser confundida fácilmente con otras enfermedades del tracto gastrointestinal, considerando que el pescado es un organismo que representa peligro potencial de transmitir enfermedades al humano, causadas principalmente por helmintos en su músculo, este proyecto se enfocará en estimar la supervivencia de la larva L3 de *Contracaecum multipapillatum s. l.* en diferentes medios utilizados en la preparación culinaria del pescado y sus cambios en la organización tisular derivados de su inmersión en los diferentes medios.

ANTECEDENTES

El primer caso humano de Anisakidosis que se registró fue por Straub en 1955 en Holanda y descrita por Van Thiel (1960) como un caso de anisakidosis intestinal debido al consumo de arenques crudos o ligeramente salados. Esta enfermedad también se denominó “enfermedad del gusano del arenque”. Desde la descripción del primer caso, se describieron 149 casos más de anisakidosis en Holanda entre 1955 y 1967 (Osanz-Mur, 2001).

El primer caso descrito en Norteamérica fue en 1972, donde se identificó al nematodo causante como perteneciente al género *Phocanema* (*Terranova*=*Pseudoterranova*) y fue recuperado quirúrgicamente de un aneurisma de la arteria ilíaca (Cheng 1982, *In*: Osanz-Mur, 2001).



En la actualidad existe una gran variedad de trabajos relacionados con las enfermedades parasitarias asociadas al consumo de pescado. En los últimos 10 años se han incrementado notablemente los casos de Anisakidosis en diversas partes del mundo (Rello-Yubero *et al.*, 2004).

En Europa se han notificado alrededor de 500 casos anuales, tan solo en España 120 casos que consultaron por síntomas alérgicos, 96 casos se implicaron verdaderamente con *Anisakis simplex*, de los cuales a 24 se les extrajo uno o más parásitos del estómago, a esta entidad la denominaron Anisakiasis gastro-alérgica diferenciándola de la Anisakiasis gástrica, dado que los síntomas de hipersensibilidad tras el contacto con el parásito eran más intensos y severos que los gástricos. Al parecer el nemátodo vivo fue la fuente antigénica y que necesito fijarse a la submucosa para producir la reacción de hipersensibilidad (López-Serrano *et al.*, 2000).

En Estados Unidos se han registrado cerca de 50 casos anuales y sólo en Japón, se han notificado más de 2000 al año que representa el 95% de los casos que ocurren en el mundo (Cabrera y Trillo-Altamirano, 2004).

Quijada *et al.* (2005) mencionan que en 1993 se registraron 11,629 casos y la infección humana por esos nemátodos fue descrita en Chile, Perú y Brasil. En Perú se describieron ocho casos; sin embargo, sólo cinco de ellos fueron confirmados, de éstos, sólo a tres pacientes se les extrajo el parásito. Dos de los casos fueron causados por *Pseudoterranova decipiens* y afectaron la mucosa gástrica. Otro caso eliminó la larva por vía bucal de aproximadamente 20 mm de longitud. El paciente había ingerido 12 horas



antes un mariscal y posteriormente a la ingesta relató dolor epigástrico persistente (Torres *et al.*, 2000).

Cabrera y Trillo-Altamirano (2004) proponen varios factores que están asociados a la presencia de la anisakidosis en el mundo, debido a la globalización en el consumo del sushi, sashimi y pescado ahumado. También mencionan que en Perú, la anisakidosis está asociada al incremento del consumo de cebiche no solo en los departamentos de la costa, sino en la sierra y selva, por lo tanto, el número de casos humanos está subestimado y existe la posibilidad que se incremente en los próximos años.

Por otra parte, con el fin de evaluar el peligro que representa la Anisakidosis para la salud pública y sugerir medidas preventivas Anabe-Bandes *et al.* (2005) en Venezuela realizaron un estudio para determinar la prevalencia e intensidad media de parasitismo por las larvas de nemátodos de la familia Anisakidae, en especies de pescado fresco de mayor consumo. Las muestras parasitadas fueron la lisa (*Mugil curema* y *M. incilis*) y el lebranche (*Mugil liza*) con una prevalencia entre 76% y 94% y una intensidad media de 13.1 ± 5.2 parásitos /unidad y 10.7 ± 3.6 parásitos/unidad, respectivamente. Las larvas de nemátodos identificados en las muestras de lisa fueron *Pseudoterranova* sp. (56%), *Contracaecum* sp. (48%) y *Anisakis* sp. (16%) y en las de lebranche fueron *Pseudoterranova* sp. (47%), *Contracaecum* sp. (47%), *Anisakis* sp. (16%) e *Hysterothylacium* sp. (3%) ubicándose principalmente en el mesenterio y las vísceras.

Dentro de las especies de la familia Anisakidae la más estudiada ha sido *Anisakis simplex* y en relación a su supervivencia en diferentes condiciones, se



ha encontrado que en procesos de ahumado hasta 40°C las larvas sobreviven. Los filetes en salmuera suave y escabeche de 6% de sal y 2 a 2.5% de ácido acético, sobreviven hasta 10 semanas y viven de cinco a seis semanas si la concentración de sal se incrementa de 8 a 9%. El cocimiento en estufa del músculo del pez a 70°C, el cocimiento en microondas aplicando temperaturas de 65 a 77°C o la congelación a -20°C aseguran la muerte de la larva (Oshima, 1972).

Hierro *et al.* (2006) estudiaron el efecto de monoterpenos en las larvas L3 de *Anisakis simplex* s. l. encontrando alteraciones en la cutícula y proyecciones a manera de espinas en todos los tratamientos empleados

Por otra parte Jofré *et al.*, 2008, elaboraron un estudio para buscar estrategias de prevención para consumo de pescado, debido a que en Chile se presentó un caso de ingestión accidental de *P. decipiens*. Propusieron cocinar el pescado o mariscos con temperaturas sobre 60°C durante al menos 15 minutos, en horno de microondas a temperaturas mayores a 77° C o bien congelar el pescado antes de la preparación a -20 °C por más de una semana ya que en salsa de soya puede resistir la larva por 18 horas, en solución salina al 1-2% sobrevive por más de seis meses, al 4,3% siete semanas y al 8-9% cinco a seis semanas. En ácido acético al 1% más de tres meses.

En el caso particular de *Contracecum* (Contracecosis) en el humano, Schaum y Müller (1967) registraron por primera vez a *C. osculatum* en un paciente de Alemania que presentó dos granulomas eosinofílicos en el intestino. Deardorff y Overstreet (1980) infectaron animales de laboratorio (roedores) con larvas de *C. multipapillatum* manifestando varias patologías.



Vidal *et al.* (1994) infectaron gatos con larvas de *C. multipapillatum* manifestando hemorragias y úlceras.

Da Silva y Barros 2008 estudiaron la acción *in vitro* del aceite de citronella en larvas L3 de *Contracaecum* sp. como método alternativo para el tratamiento de esta parasitosis donde encontraron que en exposición de más de dos horas la larva muere. Además encontraron ruptura cuticular, desintegración de la pared intestinal y presencia de algunas proyecciones de los órganos hacia la parte interna del nemátodo.

En Baja California Sur el primer trabajo que se realizó para medir la supervivencia de la larva de *Contracaecum* sp. de las lisas en diferentes medios y temperaturas fue por Gómez del Prado-Rosas *et al.* (2008). Encontraron que la larva en solución salina al 0.9% sobrevive cuatro, 12 y 12 días en temperaturas de 37, 24, 15°C respectivamente. En jugo de limón la larva sobrevive uno, seis y tres días y en vinagre al 1% uno, uno y dos días en las respectivas temperaturas.

JUSTIFICACIÓN

En México los peces *Mugil curema* y *M. cephalus* tienen un alto valor comercial siendo uno de los recursos de la pesca ribereña más importantes del país. Sin embargo, presentan altas prevalencias e intensidades promedio de parasitismo por larvas L3 de *Contracaecum* sp. y aunque en el país aún no se conocen casos de Anisakidosis en el humano y debido a los diferentes hábitos de preparación empleados para el consumo del pescado, es fundamental conocer la supervivencia en días de estas larvas en medios culinarios, ante la



posibilidad de que la población se encuentre en riesgo de adquirir esta enfermedad. Por lo anterior, es elemental conocer su ciclo biológico, ya que el parásito lo completa cuando los hospederos definitivos ingieren los peces portadores de la larva L3.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la tasa de supervivencia en días de la larva L3 de *Contracaecum multipapillatum s. l.* en diferentes medios culinarios y conocer los posibles hospederos intermediarios involucrados en el ciclo de vida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar la supervivencia en días de la larva (L3) de *Contracaecum multipapillatum s. l.* de lisas frescas en cuatro medios culinarios: vinagre diluido 4%, jugo de limón y solución salina al 0.9% (en temperatura ambiente y refrigeración), horno de microondas y cocimiento en estufa (frito y empapelado en aluminio).
2. Estimar la supervivencia en días de la larva (L3) de *Contracaecum multipapillatum s. l.* en lisas congeladas del supermercado.
3. Describir por métodos histológicos y microscopía electrónica de barrido los daños causados a la organización de las estructuras internas y los tejidos de la pared corporal debidos a los diferentes medios culinarios utilizados en las pruebas de supervivencia.
4. Identificar el organismo que actúa como primer hospedero intermediario en sedimento de la zona intermareal y en la columna de agua.



ÁREA DE ESTUDIO

La Bahía de La Paz, B.C.S., constituye el cuerpo de agua más extenso en la costa oriental de la península de Baja California y uno de los más importantes en el Golfo de California. Se encuentra situada en la región suroeste del Golfo de California entre los paralelos 24°45' y 24°15' Norte, y los meridianos 110°15' y 110°45' Oeste (Fig.3). La topografía del fondo es variable, siendo la parte sur relativamente somera (40 m) y la parte norte la más profunda con la depresión Alfonso (hasta 450 m). En la boca principal hay un canal bien definido entre 220 y 320 m de profundidad. El intercambio de agua entre la bahía y el Golfo de California se realiza a través de la boca principal y parcialmente por la boca secundaria: el Canal de San Lorenzo (hasta 18 m. de profundidad) en la parte este de la bahía (Salinas *et al.*, 2003).

El clima es de tipo BW (h') hw (e') (García, 1988) seco, semidesértico. Su temperatura media anual es entre 22°C y 24°C, con régimen de lluvias en verano y una precipitación media anual menor de 200 mm (Roden, 1958. *In*: Salinas *et al.*, 2003). En verano hay un sistema de brisas que ocasionan cambios diurnos del viento: los dominantes del sur se desarrollan de marzo a agosto y son conocidos localmente como Coromueles, mientras que de septiembre a febrero los vientos provienen del noroeste y se les denomina Collas. La Cordillera de Baja California es un obstáculo para que los vientos del noroeste y las brisas del Océano Pacífico penetren libremente a la bahía, existiendo también la influencia de tormentas tropicales del sur en verano y frentes fríos del norte en invierno (Salinas *et al.*, 2003).



Balandra cuenta con el manglar más grande dentro de la Bahía de La Paz, se localiza en los 24°19' 15" N y 110°18'45" W. Tiene una superficie de 52.5 hectáreas, un cuerpo lagunar de 30 ha. y una comunidad de manglar de 22 ha. Por lo que cuenta con un número mayor de especies de peces, debido a la influencia oceánica a la que está sometida, a su mayor extensión y a la heterogeneidad de sustratos (Pedrín-Avilés *et al.*, 1992) (Fig. 3).

La Ensenada de La Paz, es una laguna costera que se encuentra al sureste de la Bahía de La Paz, entre los 24° 06' N y 110° 25' O. Separada de la bahía por una barra de arena denominada Mogote y se comunica con ella a través de un canal de 4 km de longitud por 1-1.5 km de anchura aproximadamente y 8 m de profundidad. La ensenada tiene una superficie aproximada de 45 km², con una profundidad media de 8 m; salinidad promedio alrededor de 36 ‰, lo que le confiere cierto grado de hipersalinidad (García, 1988 y Morales Cabrera, 1982. *In*: Arreola-Lizárraga y González-Navarro, 1996) (Fig. 3).

El Estero Zacatecas se encuentra ubicado en los 24°08' N y 110°23' W, a 9.7 km de la ciudad de La Paz. Se estima que tiene una superficie de 20.2 ha para la zona intermareal, de la cual 16.2 corresponden al bosque de mangle. El canal de marea principal tiene una boca de 49.5 m de ancho y 1300 m de longitud (González-Zamorano *et al.*, 2005) (Fig. 3).

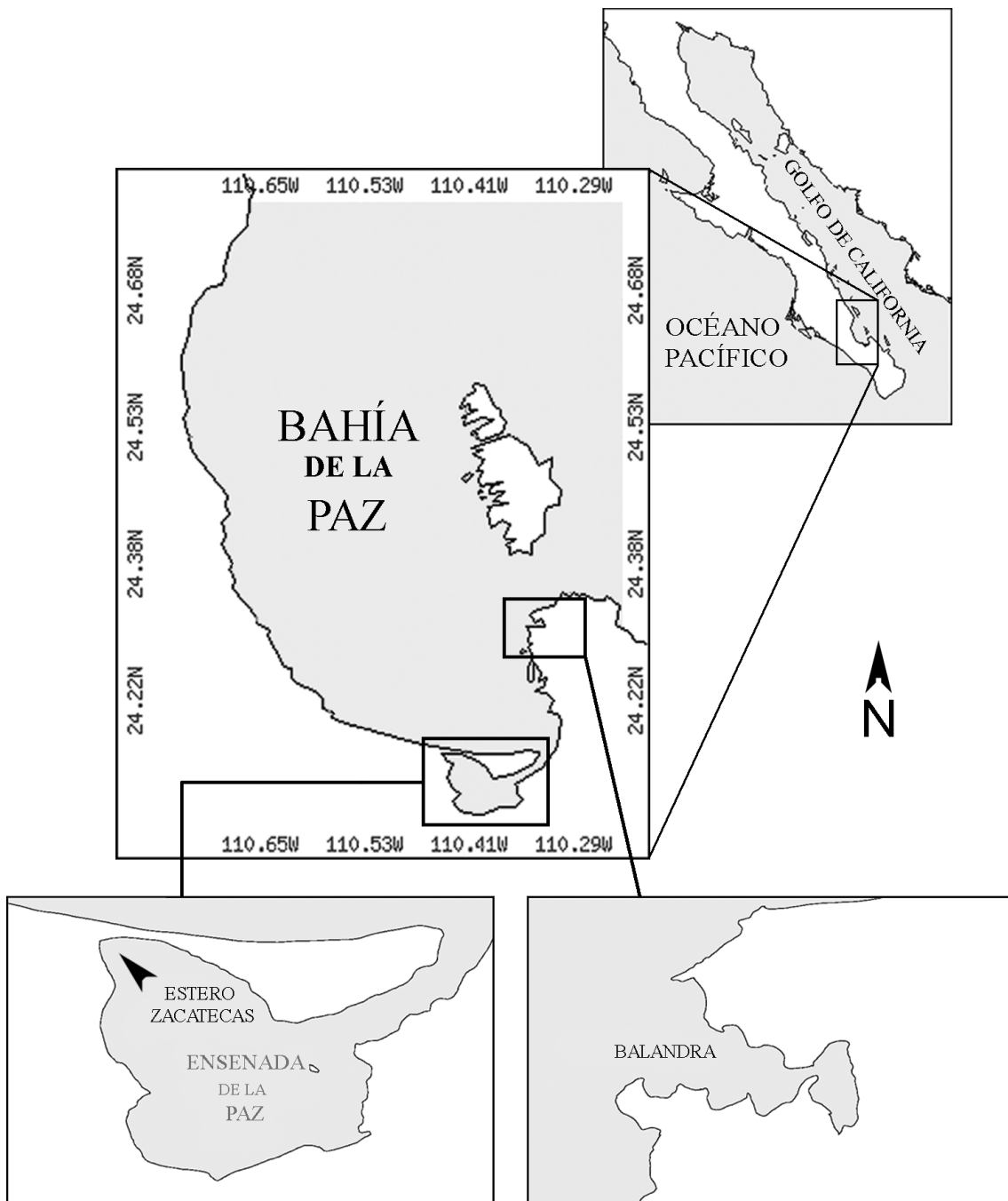


Figura. 3. Área de estudio Balandra y Estero Zacatecas en La Bahía y Ensenada de La Paz, B.C.S., México.



METODOLOGÍA

Material biológico.

Durante dos temporadas: marzo a junio de 2009 y noviembre de 2009 a marzo de 2010 se revisaron 40 lisas *M. curema* frescas donadas por el Sr. Elías Salazar integrante de la Cooperativa Pesquera del Esterito en La Paz, BCS y 18 lisas *M. curema* de noviembre del 2009 congeladas a temperaturas de -20 a-30 °C durante 15 días, obtenidas por donación del centro comercial Ley provenientes de Bahía Almejas, para la obtención de nemátodos y realización de las pruebas de supervivencia. Las muestras mencionadas se lograron obtener mediante el apoyo recibido por parte de Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y de la Comisión Estatal para la Protección de Riesgo Sanitario de la Secretaria de Salubridad respectivamente.

Identificación taxonómica.

Los nemátodos encontrados se identificaron morfológicamente a nivel genérico con las claves de identificación de Yamaguti (1961) y Hartwich (1974) y en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) se realizó la secuenciación del primer espaciador interno transcrito, ITS-1 (primers SS1F/NC13R) y segundo espaciador interno transcrito, ITS-2 (primers SS2F/NC2R) del ADN ribosomal para compararse con las secuencias de diferentes especies del género en la base de datos del Gen Bank.



Su descripción se basó en 10 ejemplares que se midieron con un ocular micrométrico anotándose en milímetros (mm) sus tallas mínima, máxima y promedio entre paréntesis.

Parámetros ecológicos en parasitología.

Los peces se transportaron en hielera al laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), donde se tomaron los parámetros merísticos del pez (longitud total, longitud patrón y altura). Posteriormente se disecaron y se revisó detalladamente la serosa y la luz del estómago e intestino, toda la estructura del hígado, riñón, bazo y gónadas así como la columna vertebral y el músculo dorsal a ella.

En la bitácora se registró la cantidad de nemátodos encontrados en cada uno de los órganos de los peces para el análisis de los parámetros ecológicos de prevalencia parasitaria e intensidad media de infección con el criterio de Bush *et al.* (1997) en donde:

La prevalencia parasitaria es el porcentaje de la población de hospederos parasitados, respecto a la población de hospederos revisados:

$$\text{Prevalencia (\%)} = \frac{\text{No. de Hospederos infectados}}{\text{No. de Hospederos examinados}} \times 100$$

La intensidad media de infección es la cantidad de parásitos de una especie encontrados en cada hospedero parasitado:

$$\text{Intensidad media de infección} = \frac{\text{No. de larvas}}{\text{No. de Hospederos infectados}}$$



Los nemátodos encontrados en cada uno de los peces se colocaron en cajas de Petri agregando 2 ml de solución salina al 0.9% para mantenerlos vivos y someterlos a los diferentes medios en los que se midió su supervivencia en términos de duración en días.

Supervivencia de nemátodos en lisas frescas.

Para la realización de las pruebas de supervivencia se manejó un total de 10 nemátodos en cada medio con el que se trabajó y que se mencionan a continuación. En todos se midió el pH y se realizaron recambios de cada medio diariamente durante los días que se mantuvieron vivos los nemátodos. Se hicieron dos réplicas de cada una de las siguientes pruebas:

1. Vinagre diluido al 4 %
2. Jugo de limón
3. Solución salina al 0.9%
4. Cocimiento en horno de microondas
5. Cocimiento en aceite comestible en estufa normal
6. Cocimiento al vapor (empapelado en aluminio)

En los tres primeros medios, la supervivencia de los helmintos se midió tanto en condiciones ambientales como en condiciones de refrigeración (9° C), ya que los hábitos culinarios comunes requieren de varias horas para el cocimiento del pescado. En todos los días se tomó la lectura de la temperatura ambiental. Como medio testigo se tomó a la solución salina al 0.9% en temperatura ambiente.



Respecto al horno de microondas, los nemátodos se colocaron dentro de un filete de lisa y se sometieron a su cocimiento en la máxima potencia, en tres tiempos (2, 3 y 5 min), y se tomó la temperatura del filete una vez terminado cada uno de los tiempos de exposición mencionados.

En cuanto al cocimiento en aceite comestible se realizó en una estufa normal de marca RIVAL con llama media, los nemátodos se colocaron en filetes, se doblaron y se dejaron durante cinco y siete minutos, que es el tiempo estimado en el que se cuece la carne fileteada sin llegar a dorarse. Se tomó la temperatura de cada uno de los filetes cocidos.

En el cocimiento al vapor (empapelado en aluminio), también se colocaron los nemátodos en filetes, se doblaron, se envolvieron en papel aluminio y se dejaron cocer por ambos lados durante cinco y siete minutos. Se tomó la temperatura de cada uno de los filetes cocidos.

Los nemátodos muertos se colocaron en frascos viales con alcohol etílico 70% para su fijación y conservación con los datos correspondientes anotados en la etiqueta respectiva.

Supervivencia de nemátodos en lisas congeladas.

Después de su descongelamiento natural, se realizó la disección correspondiente para la búsqueda de los parásitos. Los nemátodos encontrados se fijaron en alcohol al 70% y se anotó la información relacionada con su procedencia, tiempo y temperatura de congelación.



Técnica histológica.

Las larvas que se sometieron a la técnica histológica fueron aquellas que sobrevivieron más tiempo en cada uno de los medios empleados (5 min a 42 días), las cuales se fijaron en alcohol etílico 70%, se cortaron en tres fragmentos (anterior, medio y posterior) y se sometieron a cada uno de los siguientes pasos:

- a. Se deshidrataron en el procesador de tejidos en una serie de alcohol etílico gradual (70%, 80%, 90%, 96% y tres cambios de 100%) durante una hora en cada uno.
- b. Se transparentaron con solución alcohol etílico absoluto/Citrisoly (1:1) y Citrisoly puro durante 30 minutos.
- c. Se infiltraron con una solución citrisolv/parafina (Paraplast) (1:1) 30 minutos, y dos cambios de parafina a 60° C por dos horas.
- d. Se incluyeron en moldes para cortes en parafina empleando parafina con 60 grados de fusión en un centro de inclusión.
- e. Los cortes transversales de 4 micras se realizaron con un micrótomos de rotación Richert-Jung 2040.
- f. Obtenidos los cortes, se pasaron a un baño de flotación conteniendo agua y gelatina a 40°C para ser colocados en sus respectivos portaobjetos.
- g. Los cortes se tiñeron con hematoxilina de Weigert-eosina, aclarados en Citrisoly y montados en preparaciones permanentes con Cytoseal.
- h. Se tomaron micrografías con un sistema digital de captura de imágenes acoplado a un microscopio Nikon optiphot 2, así como las medidas en



micras (μm) del diámetro del eje dorso-ventral y del eje lateral de los cordones epidérmicos.

Técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB).

Esta actividad se llevó a cabo en el laboratorio de microscopía electrónica de barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y de la UABCS. Los nemátodos fijados en alcohol etílico 70% se sometieron a una serie de alcoholes graduales para su completa deshidratación, manteniéndolos 30 min. en cada uno de ellos hasta llegar al de 100% y se realizaron dos cambios en cada tipo de alcohol. Posteriormente se sometieron al proceso de secado crítico con CO_2 en un aparato Samdri 795. Cada ejemplar se colocó en su respectivo portamuestras y se sometieron al recubrimiento con oro en una ionizadora Jeol Fine Coat ion sputter JFC-1100.

Finalmente, el 90% de las micrografías se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6360 LV procedente de la UNAM y el 10% de las microfotografías con un microscopio electrónico de barrido Hitachi s-2300 de la UABCS. En ambos casos las escalas de las imágenes se anotaron en micras (μm)

Primer hospedero intermediario.

Sedimento

Se realizaron transectos de 50 metros en la zona intermareal de Balandra y del Estero de Zacatecas, cada mes durante febrero a julio 2009. Se tomó una



muestra de sedimento con la ayuda de un nucleador, cada 5 metros. El sedimento obtenido se colocó en un frasco de plástico y tapa enroscable en el que se fijó con formol al 10%.

Posteriormente, en el laboratorio se separaron los organismos del sedimento usando dos métodos: el proceso de elutriación y la técnica de Baermann. El primero consiste en la separación mediante centrifugación de partículas basado en el tamaño de las mismas (Flores-Chávez *et al.*, 2009). Se utilizó un sistema con un dispositivo de decantación que somete una corriente de flujo de aire, donde las partículas más ligeras son llevadas hacia arriba, mientras que las partículas relativamente más pesadas caen en el tamiz y con la velocidad y turbulencia de la corriente de aire mejora la acción de separación (Fig. 4a). El segundo es empleado para la búsqueda de helmintos en heces (Pereira-Lima y Delgado, 1961), en este caso, se adecuó para el sedimento, donde se utilizó un embudo con papel filtro, se colocó el sedimento y después se le agregó agua caliente para filtrarlo, el contenido se depositó en una vaso de precipitado (Fig. 4b).

Los organismos encontrados en los dos métodos se fijaron en alcohol etílico anhidro 70% y se observaron en el microscopio estereoscópico para buscar los nemátodos. En el caso de duda de la presencia del parásito en alguno de ellos, se colocó en salicilato de metilo para su aclaración y su identificación.



Figura 4. Métodos de separación de sedimento. **a** Proceso de elutriación. **b** Técnica de Baerman.

Zooplankton

Se revisaron cinco muestras de zooplankton de la Bahía de La Paz (tres de junio 2008 y dos de febrero 2009) obtenidas mediante arrastres superficiales durante la marea más alta; con una red cónica de 60cm de diámetro de boca y luz de malla de 333 μm , equipada con un flujómetro. Las muestras de zooplankton fueron facilitadas por el laboratorio de Plancton del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR).

Para la búsqueda del primer hospedero intermediario, se observaron las muestras de zooplankton en el microscopio estereoscópico, separándose los crustáceos parasitados de los sanos. La identificación taxonómica de los crustáceos parasitados fue realizada por el Dr. Sergio Hernández Trujillo del CICIMAR.

Posteriormente los crustáceos parasitados se disecaron para la extracción de sus parásitos los cuales se tiñeron con acetocarmín, se transparentaron con salicilato de metilo y se montaron en preparaciones permanentes con resina sintética para su posterior identificación taxonómica con la literatura especializada.



RESULTADOS

Identificación taxonómica del nematodo.

Se obtuvieron secuencias de 186 pares de bases (pb) del ITS-1 y 231 pb del ITS-2, con homologías de 90% (167/186 pb) y 96% (220/231 pb) respectivamente, lo que indica que las larvas de nemátodos encontradas en las lisas *M. curema* pertenecen al complejo *C. multipapillatum* y deben ser referidas como *C. multipapillatum sensu lato*.

Descripción de la larva de *Contraecum multipapillatum s. l.*

Descripción y medidas basadas en 10 especímenes. Cuerpo de forma cilíndrica con extremo anterior más romo que el posterior el cual es cónico terminando en una punta denominada mucrón (Figs. 5a y 5d). La longitud total es de 17.20 a 23.21 (20.63) con un grosor de 0.76 a 0.94 (0.81). La cutícula es gruesa con finas estriaciones transversales muy marcadas en el extremo anterior del cuerpo, después de los labios se observan aproximadamente 32 anillos cuticulares que conforman el collar que delimita el cuello del cuerpo (Figs. 5c y 5b). En el extremo anterior se observan 3 labios de forma redondeada, un dorsal con dos papilas y dos subventrales cada uno con una papila, entre la base de estos últimos se encuentra situado un diente cuticular cónico. El poro excretor abre posterior al diente (Figs. 5b, 5c, 6a, 6b). El anillo nervioso se encuentra a una distancia de 0.22 a 0.45 (0.34) del extremo anterior del cuerpo. El tubo digestivo está conformado por una faringe muscular en su mayor extensión y un ventrículo glandular pequeño y esférico con una longitud total que incluye a las dos regiones de 2.68 a 3.82 (3.17) y de ancho



en la región muscular de 0.10 a 0.19 (0.13). Del ventrículo parte el ciego esofágico con una longitud de 0.77 a 1.72 (1.08) y de ancho 0.10 a 0.19 (0.13). El intestino expone un ciego anterior con una longitud de 2.16 a 3.07 (2.56) y un ancho de 0.22 a 0.30 (0.27) más grande que el ciego esofágico (Fig. 5a). El intestino termina en el recto y ano, observándose tres glándulas rectales. El ano está situado a una distancia de 0.11 a 0.24 (0.17) del extremo posterior (Fig.5d).

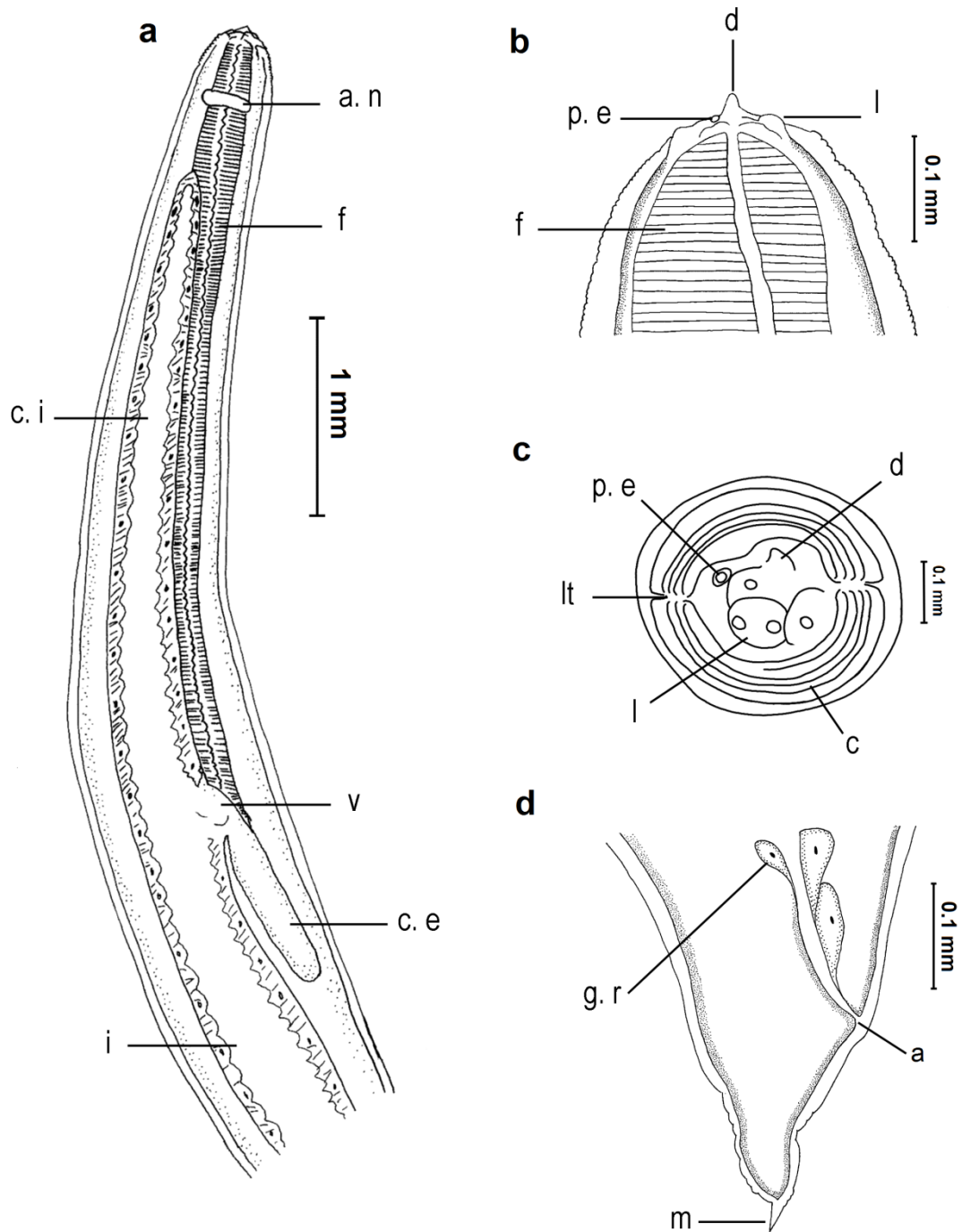


Figura 5. Larva L3 de *C. multipapillatum* s. l. de *M. curema*. **a.** Región anterior del nemátodo que muestra anillo nervioso (an), faringe (f), ciego intestinal (c.i), ventrículo (v), ciego esofágico (c.e) e intestino (i) (10X). **b.** Detalle del extremo anterior que muestra diente (d), poro excretor (pe), labios (l) y faringe (f) (40X). **c.** Detalle de los labios en vista apical que muestra diente (d), poro excretor (pe), línea lateral (lt), labios (l) y collar (c) (10X). **d.** Extremo posterior que muestra glándulas rectales (g.r), recto (r) y mucrón (m) (40X).

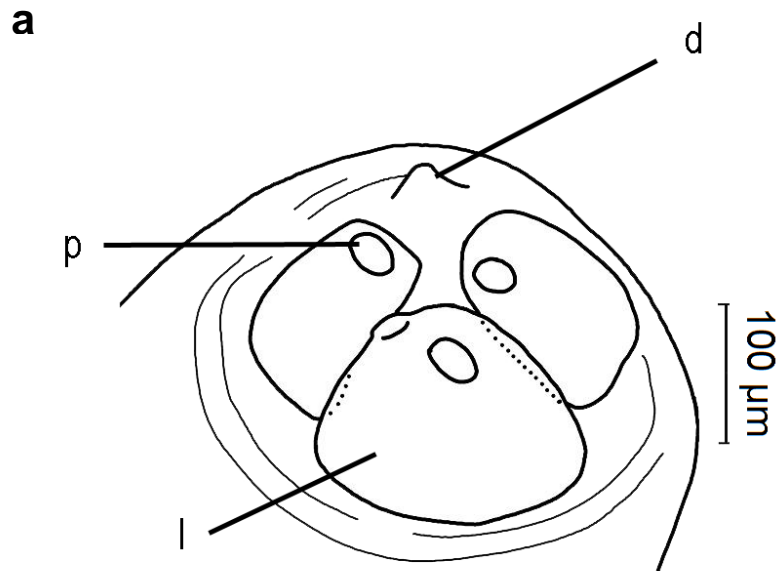


Figura 6a. Extremo anterior de *Contracaecum multipapillatum* s. l. que muestra diente (d), papilas de los labios (p) y labios (l) (10X).

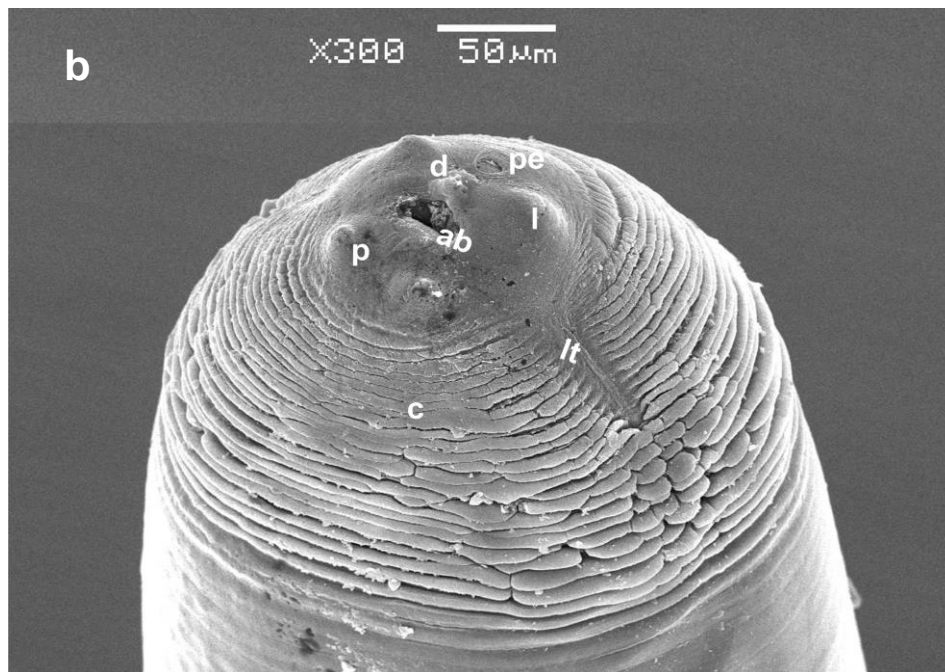


Figura 6b. Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior de la larva L3 de *Contracaecum multipapillatum* s. l. muestra poro excretor (pe), labios (l) papilas de labios (p), diente (d), abertura oral (ab) collar (c) y línea lateral (lt).



Parámetros Ecológicos en Parasitología.

De las 40 lisas *M. curema* frescas revisadas en el periodo de marzo a junio de 2009 se obtuvieron 201 larvas, con una prevalencia de parasitación de 95% y una intensidad media de 10.5 parásitos y en el periodo de noviembre de 2009 a marzo de 2010 se encontraron 476 larvas, obteniendo una prevalencia de parasitación del 100% y una intensidad media de 23.8 parásitos. De las 18 lisas congeladas que se revisaron se encontraron 32 larvas muertas, la prevalencia de parasitación fue de 77.7% y la intensidad media fue de 2.2 parásitos.

De los órganos revisados de los peces frescos en el periodo marzo-junio 2009 los mas parasitados fueron el intestino con 83 parásitos y el músculo-columna vertebral con 75 parásitos (Fig. 7), en el periodo noviembre de 2009-marzo 2010 el músculo-columna vertebral con 223 parásitos y el intestino con 121 parásitos (Fig. 7). De los peces congelados los órganos mas parasitados fueron el músculo-columna e hígado con 14 parásitos (Fig. 7).

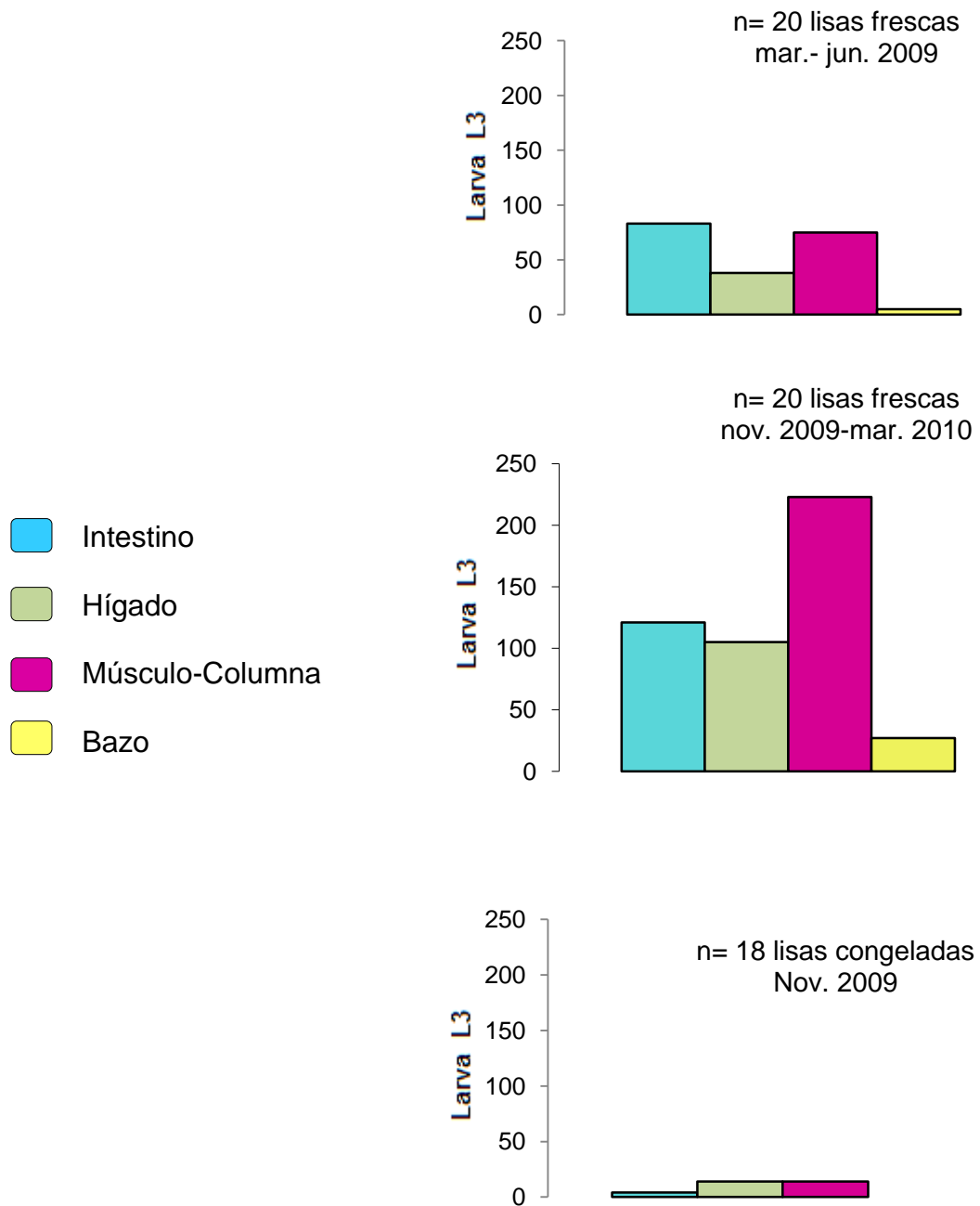


Figura 7. Larva L3 de *Contracaecum multipapillatum s. l.* en diferentes órganos de *M. curema*.



Supervivencia.

Las larvas L3 recolectadas de las 40 lisas se sometieron a los diferentes medios, donde se encontró que en temperaturas de 24 a 26°C sobrevive 16 días en solución salina 0.9%, en jugo de limón 8 días y 42 días en vinagre al 4%. En cambio, en temperatura de 9°C sobrevive 14 días en solución salina 0.9%, en jugo de limón 6 días y 26 días en vinagre 4%. El medio donde la supervivencia fue mayor en vinagre tanto en temperatura ambiente y refrigeración (Fig.8).

Por otra parte, en el proceso de cocimiento de los filetes en microondas y en estufa con aceite y empapelados con temperaturas de 70 a 90 °C las larvas murieron inmediatamente (Tabla I). Así como las encontradas en los peces congelados por siete días en temperaturas de -20 a-30 °C.

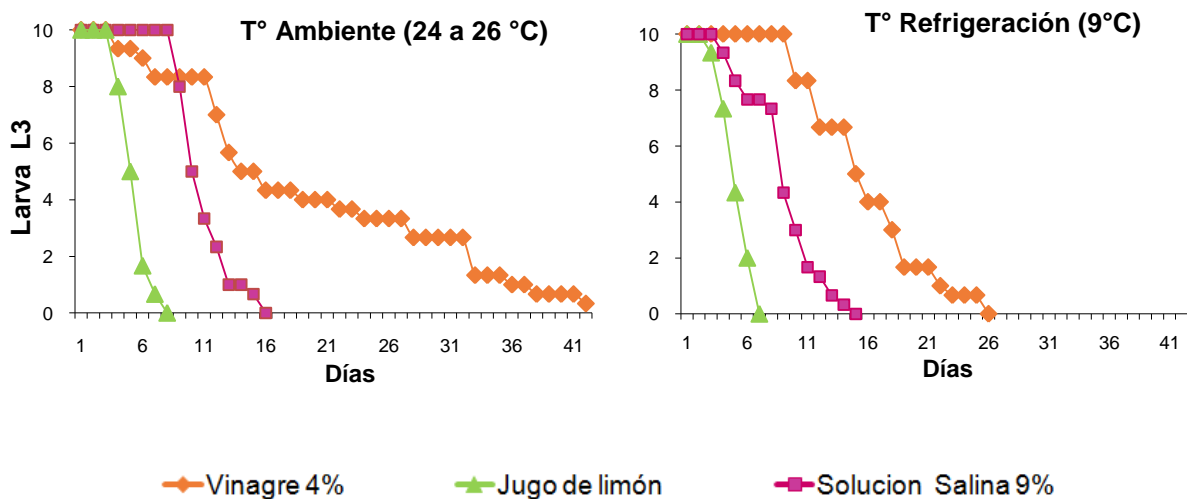


Figura 8. Supervivencia de larvas L3 de *Contracaecum multipapillatum s. l.* en días de los diferentes medios y temperaturas.



Tabla I. Supervivencia de *C. multipapillatum* s. l. en el medio de cocimiento con sus respectivas replicas. Tiempo en minutos (T), temperatura en grados centígrados (°C) y supervivencia (S)

Control			Réplica I			Réplica II		
T	°C	S	T	°C	S	T	°C	S
Microondas								
2	85	Muertos	2	85	Muertos	2	85	Muertos
3	88	Muertos	3	88	Muertos	3	88	Muertos
5	93	Muertos	5	93	Muertos	5	93	Muertos
Aceite								
5	70	Muertos	5	70	Muertos	5	70	Muertos
7	82	Muertos	7	82	Muertos	7	82	Muertos
Empapelado								
7	82	Muertos	7	82	Muertos	7	82	Muertos
10	90	Muertos	10	90	Muertos	10	90	Muertos



Descripción histológica de cortes transversales de Larva L3 y de la pared del cuerpo por microscopía electrónica de barrido.

De la evaluación de los cortes histológicos de las larvas expuestas en los diferentes medios utilizados para conocer la supervivencia en días, se encontró que en solución salina al 0.9% (testigo) en temperatura ambiente con un diámetro en el eje dorso-ventral de 640.22 y en el eje de los cordones laterales de 651.61 muestra que la cutícula está totalmente adosada a la hipodermis, con grosor y aspecto uniforme, las células musculares de tipo celomiarario con aspecto homogéneo, bien delimitadas, las fibras contráctiles y la zona apical no contráctil. El digestivo con muchas células caliciformes y ciego esofágico presente. Probablemente glándula excretora (Fig. 9a).

Los organismos en solución salina al 0.9% (testigo) en temperatura ambiente sometidos a la técnica de MEB, muestran en la cutícula del extremo anterior separación y ruptura de los anillos cuticulares del collar, en cambio, el extremo posterior se observa que la cutícula tiene un aspecto uniforme (Figs. 9b y 9c).

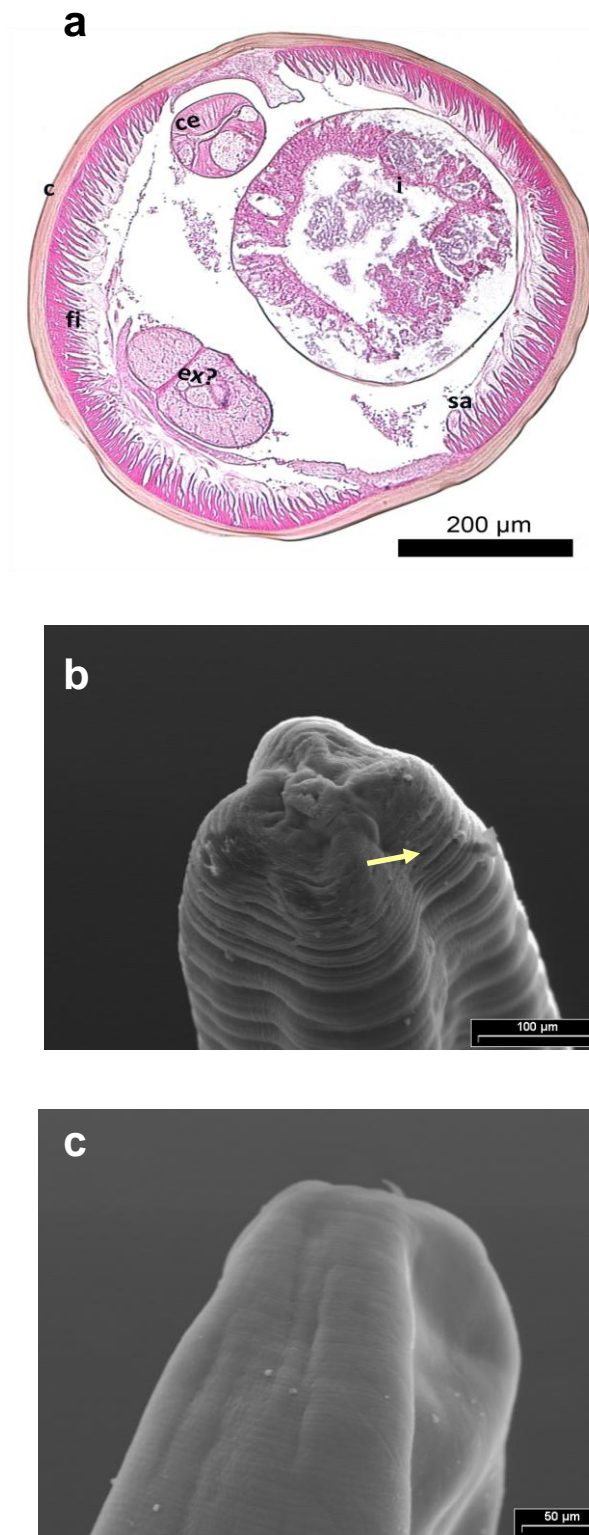


Figura 9. Larva L3 *Contracaecum multipapillatum* s. l. en el medio de solución salina 0.9% en temperatura ambiente. **a.** Corte histológico de la parte anterior de la región media del cuerpo. Cutícula (c), cordón longitudinal (cl), intestino (i), ciego esofágico (ce), fibras contráctiles (fi), porción sarcoplásmica (sa). glándula excretora (ex). 96X. **b.** Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior La flecha indica la separación de los pliegues cuticulares del collar. 300X. **c.** Micrografía electrónica de barrido del extremo posterior. 400X.



Los organismos en solución salina al 0.9% en temperatura de refrigeración con un diámetro en el eje dorso-ventral Fig. 10a de 656.21 y Fig. 10b 656.80 el eje de los cordones laterales Fig. 10a de 625.11 y Fig. 10b 627.58, no sufren cambios muy notables respecto a lo mencionado en temperatura ambiente. La cutícula está totalmente adosada a la hipodermis. La pared del digestivo con células cilíndricas con núcleos basales y se observa el ciego esofágico. (Fig. 10a). Las células celomarias bien delimitadas distribuidas en 4 grupos separados por los cordones epidérmicos dorsal, ventral y laterales (Fig. 10b).

En el MEB, la cutícula de las larvas en solución salina al 0.9 % en temperatura de refrigeración se observa con ligeras separaciones de los pliegues cuticulares del collar e invaginación de los labios, después del collar la cutícula tiene un aspecto uniforme al igual que en el extremo posterior (Figs. 10c y 10d).

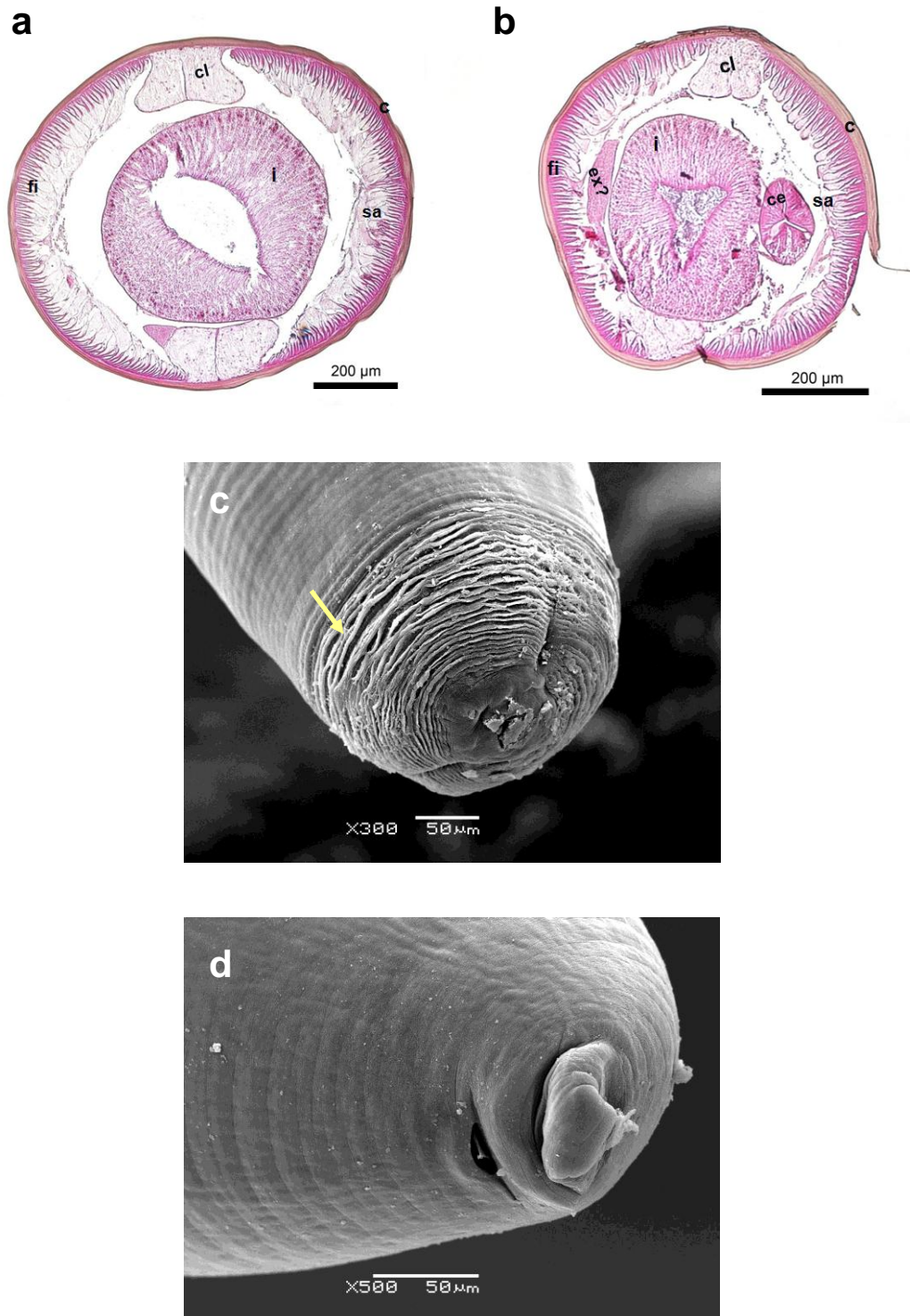


Figura 10. Larva L3 de *Contracaecum multipapillatum* s. l. en el medio de solución salina al 0.9 % a temperatura de refrigerador. **a.** Coste histológico de la parte anterior de la región media del cuerpo y **b.** Corte histológico de la parte posterior de la región media del cuerpo. Cutícula (c), cordón longitudinal (cl), intestino (i), ciego esofágico (ce), fibras contráctiles (fi), porción sarcoplásmico (sa). 96 X. **c.** Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior. La flecha indica la separación de los pliegues cuticulares del collar. **d.** Micrografía electrónica de barrido del extremo posterior.



Los nemátodos expuestos en jugo de limón en temperatura ambiente con un diámetro en el eje dorso-ventral de 468.13 y en el eje de los cordones laterales de 444.92, presenta la cutícula con ligero adelgazamiento en algunas zonas y evidente separación de la hipodermis. Los cordones epidérmicos laterales con forma irregular y no adosada a la cutícula. Las fibras contráctiles con ligeras lesiones, se ven más cortas, no se observa la región apical de las células sólo las fibras contráctiles basales. El digestivo con algunas células caliciformes y las células cilíndricas con núcleos basales y ciego esofágico presente. También se observa probable esbozo del ovario (Fig. 11a).

Los nemátodos expuestos en jugo de limón en temperatura ambiente, en el MEB se observa la cutícula del extremo anterior con ligeras separaciones de los pliegues cuticulares y descarapelamiento en algunas zonas, los labios se ven invaginados. El extremo posterior la cutícula tiene un aspecto uniforme (Figs. 11b y 11c).

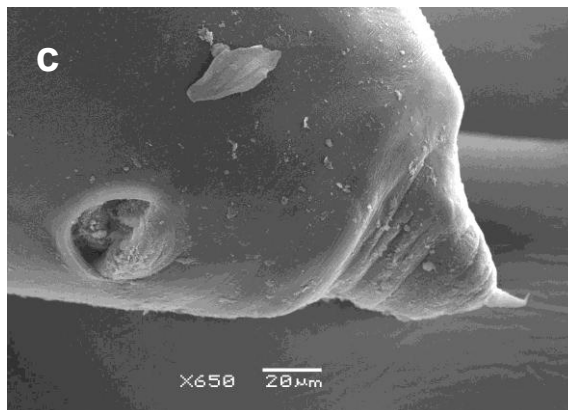
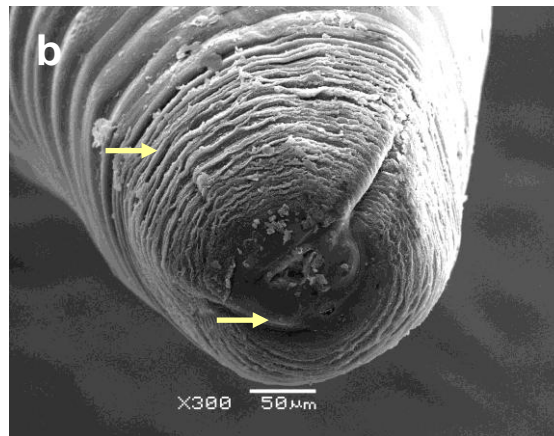
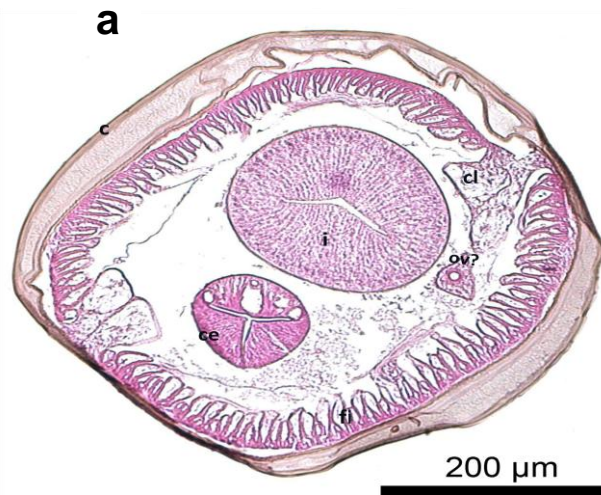


Figura 11. Larva L3 de *Contracaecum multipapillatum* s. l. en el medio de limón en temperatura ambiente. **a.** Corte histológico de la parte anterior de la región media del cuerpo. Cutícula (c), cordón longitudinal (cl), intestino (i), ciego esofágico (ce), ovario (ov), fibras contráctiles (fi). 96X. **b.** Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior. Las flechas señalan la invaginación de los labios y separación cuticular del collar. **c.** Micrografía electrónica de barrido del extremo posterior.



Las larvas que estuvieron en jugo de limón en temperatura de refrigeración con un diámetro en el eje dorso-ventral de 435.65 y en el eje de los cordones laterales de 418.71, muestra la cutícula separada de la hipodermis en algunas zonas. No se observa la región citoplásmica apical de algunas células musculares manteniéndose solamente las fibras contráctiles acortadas. El digestivo presenta las características histológicas generales descritas anteriormente así como el ciego esofágico y la presencia del esbozo del ovario (Fig.12a).

En los organismos expuestos en jugo de limón en temperatura de refrigeración sometidos al MEB, se observa la cutícula rota en algunos anillos que conforman el collar (Fig. 12b). El extremo posterior tiene el mismo aspecto que el de los ejemplares de temperatura ambiente (Fig. 12c).

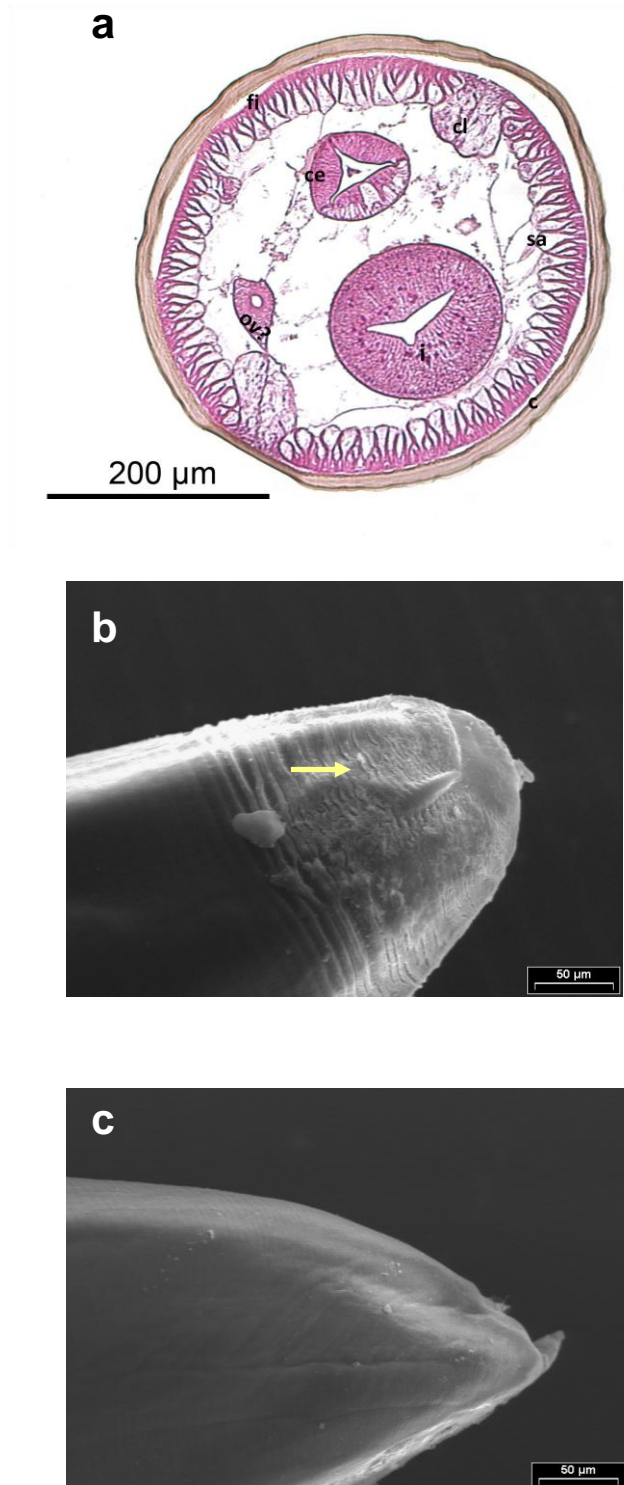


Figura 12. Larva L3 de *Contracaecum multipapillatum* s. l. en el medio de jugo de limón a temperatura de refrigeración. **a.** Corte histológicos de la parte anterior de la región media del cuerpo. Cutícula (c), cordón longitudinal (cl), intestino (i), ciego intestinal (ci), fibras contráctiles (fi), porción sarcoplásmica(sa), ovario (ov). 96 X. **b.** Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior. La flecha indica las zonas de ruptura cuticular del anillo. 400 X. **c.** Micrografía electrónica de barrido del extremo posterior. 400 X.



Los cortes histológicos de las larvas del medio de vinagre al 4% en temperatura ambiente con un diámetro del eje dorso-ventral de 552.16 y del eje de los cordones laterales de 499.43, la cutícula se observa con adelgazamiento en algunas zonas y ligera separación de la hipodermis. Los cordones epidérmicos laterales con forma irregular. Las fibras contráctiles se ven más cortas y angostas y algunas zonas no se aprecia la región apical no contráctil. El digestivo con pared ligeramente desintegrada se observan el ciego esofágico y el posible esbozo del ovario (Fig. 13a).

La cutícula de los organismos expuestos a vinagre al 4% en temperatura ambiente, observadas en el MEB, muestran que en la región del extremo anterior se observa con aspecto homogéneo, los pliegues cuticulares son uniformes, en cambio el extremo posterior presenta en algunas zonas lesiones de quemaduras y ruptura (Figs. 13b y 13c).

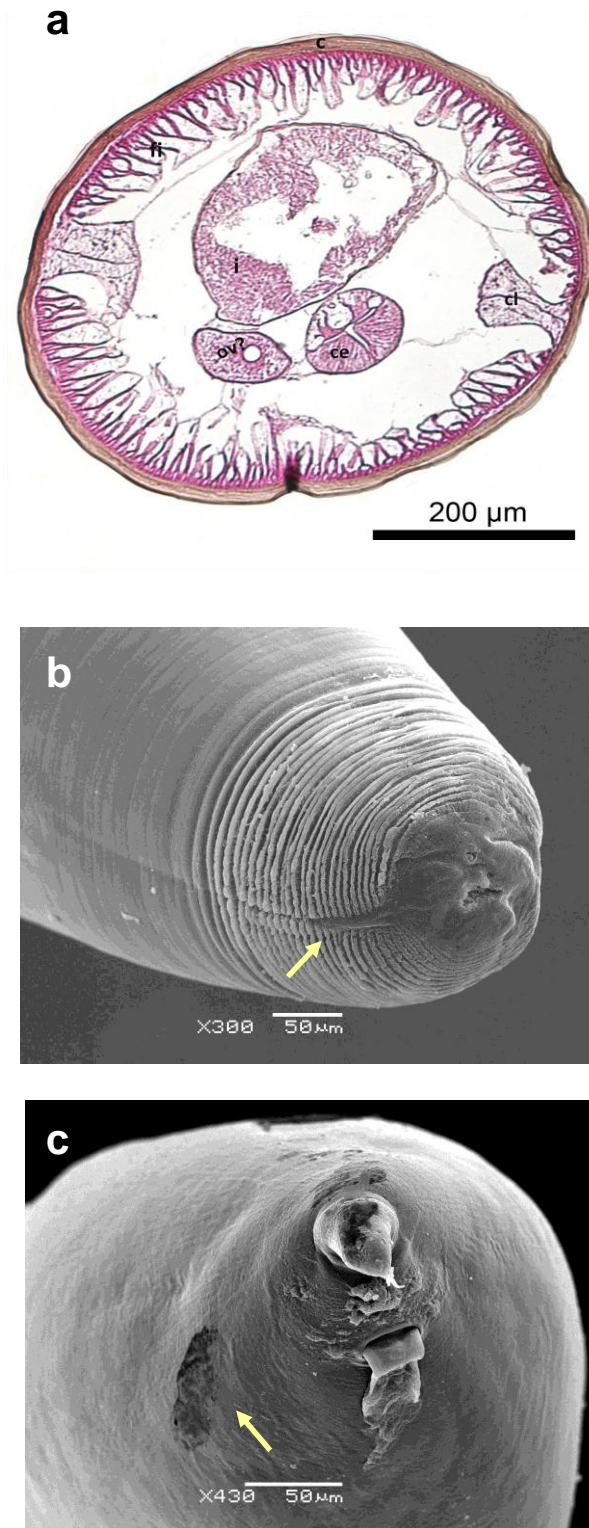


Figura 13. Larva L3 de *Contracaecum multipapillatum* s. l. en el medio de vinagre en temperatura ambiente. **a.** Corte histológico de la parte anterior de la región media del cuerpo Cutícula (c), cordón longitudinal (cl), intestino (i), ciego intestinal (ci), fibras contráctiles (fi). 96X. **b.** Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior. La flecha indica la línea lateral que modifica la interrupción de los anillos cuticulares del collar. **c.** Micrografía electrónica de barrido del extremo posterior.



Los organismos expuestos en vinagre 4% en temperatura de refrigeración con un diámetro del eje dorso-ventral de 492.25 (Fig. 14a) y 443.58 (Fig. 14b) y el eje de los cordones laterales de 624.32 (Fig. 14a) y 443.87 (Fig. 14b). En la primera figura los cordones epidérmicos están mejor definidos y se observa el ciego esofágico y aparentemente un esbozo del ovario. La segunda figura indica una región mas posterior en donde el intestino también muestra cierta destrucción de su pared, además el pseudoceloma se deshidrato haciendo que el intestino se mantenga en contacto con las fibras musculares.

En el MEB, se observa que los organismos expuestos en vinagre 4% en temperatura de refrigeración tienen la cutícula del extremo anterior con ligera separación y ruptura de algunos pliegues que conforman el collar. La cutícula del extremo posterior se observa uniforme (Figs. 14c y 14d).

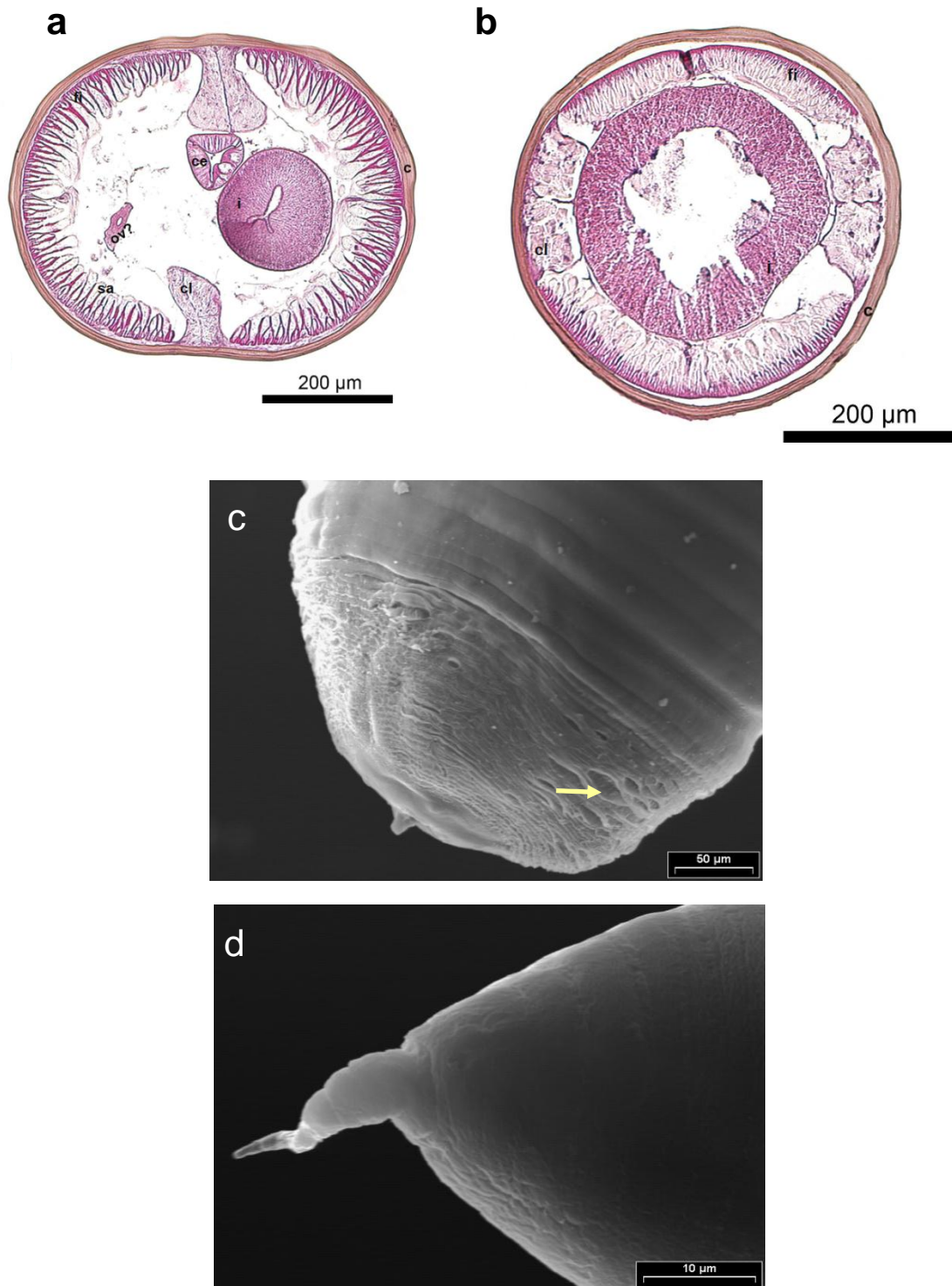


Figura 14. Larva L3 de *Contracaecum multipapillatum* s. l. en el medio de vinagre en temperatura de refrigeración. **a.** Corte histológico de la parte anterior de la región media del cuerpo y **b.** Corte histológico de la parte posterior de la región media del cuerpo. Cutícula (c), cordón longitudinal (cl), intestino (i), ciego intestinal (ci), ovario (ov), fibras contráctiles (fi), porción sarcoplásmica (sa). 96X. **c.** Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior. La flecha indica la línea lateral que modifica la interrupción de los anillos cuticulares del collar. **d.** Micrografía electrónica de barrido del extremo posterior.



En las larvas que se cocinaron en microondas con un diámetro del eje dorso-ventral de 427.02 y del eje de los cordones laterales de 788.68, se observa que la mayor parte de la cutícula está adosada sobre la hipodermis. Los cordones epidérmicos laterales con forma irregular adosados a la hipodermis y alcanzan a tocar el borde externo del intestino. Por la deshidratación sufrida las fibras contráctiles de las células musculares están muy cortas y adheridas entre sí y su región apical alcanzan a tocar el borde externo del intestino. Éste tiene un mayor diámetro y las células musculares alteradas con aspecto granuloso tienen un orden similar a las celdas de un panal (Fig. 15a).

En el MEB las larvas que se cocinaron en microondas se observa que la cutícula de la región después del collar tiene un aspecto homogéneo, el extremo anterior está cubierto por el músculo del pescado. En el extremo posterior se ve que la cutícula presenta algunas lesiones ligeras de quemaduras y ruptura provocada por el cocimiento (Figs. 15b y 15c).

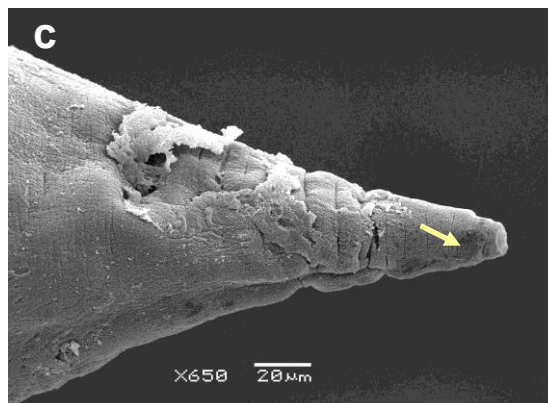
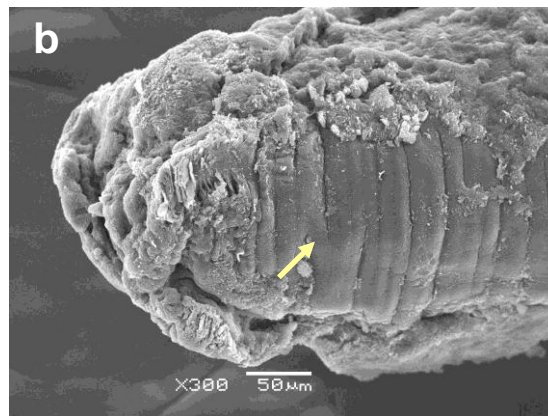
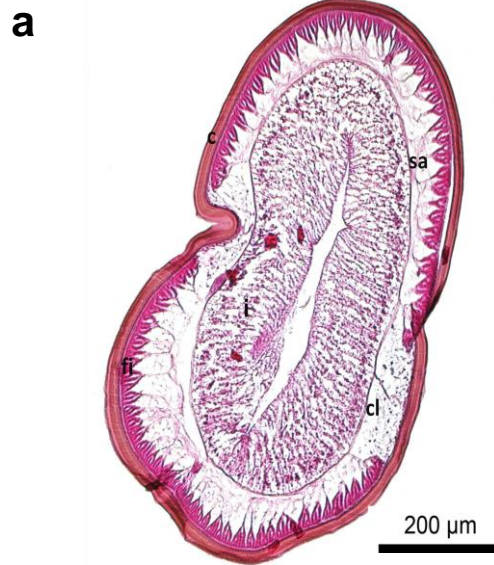


Figura 15. Larva L3 de *Contraecum multipapillatum* s. l. en el medio de microondas. **a.** Corte histológico de la parte posterior de la región media del cuerpo Cutícula (c), cordón longitudinal (cl), intestino (i), fibras contráctiles (fi), porción sarcoplásmica (sa). 80X **b.** Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior. La flecha señala la región después del collar. **c.** Micrografía electrónica de barrido del extremo posterior. La flecha indica zonas del extremo posterior con lesiones de quemaduras.



Por otra parte las larvas que se expusieron en cocimiento en aceite con un diámetro del eje dorso-ventral de 586.11 μm y del eje de los cordones laterales de 632.60 μm , presentan una cutícula con grosor variable y separación de la hipodermis en algunas zonas. Los cordones epidérmicos laterales con forma irregular, de aspecto no homogéneo y tocan el borde externo del intestino. Las fibras contráctiles de las células musculares, son más cortas en las zonas cercanas a los cordones laterales pero están alargadas en la mayoría de su extensión, la región apical de las células también alcanzan el borde externo del intestino por la deshidratación producida. En el intestino las células de la pared presentan una desintegración y desgarramiento en algunas zonas, el ciego esofágico con un ligero desorden de las células y la presencia del esbozo del ovario pegado a la pared del intestino (Fig. 16a).

En el MEB las larvas que se cocinaron en aceite la cutícula del extremo anterior presenta separación y ruptura de los pliegues, en algunas zonas éstos tienen descarapelamiento y los labios están invaginados. En algunas zonas del extremo posterior se observan lesiones de quemaduras (Figs. 16b y 16c).

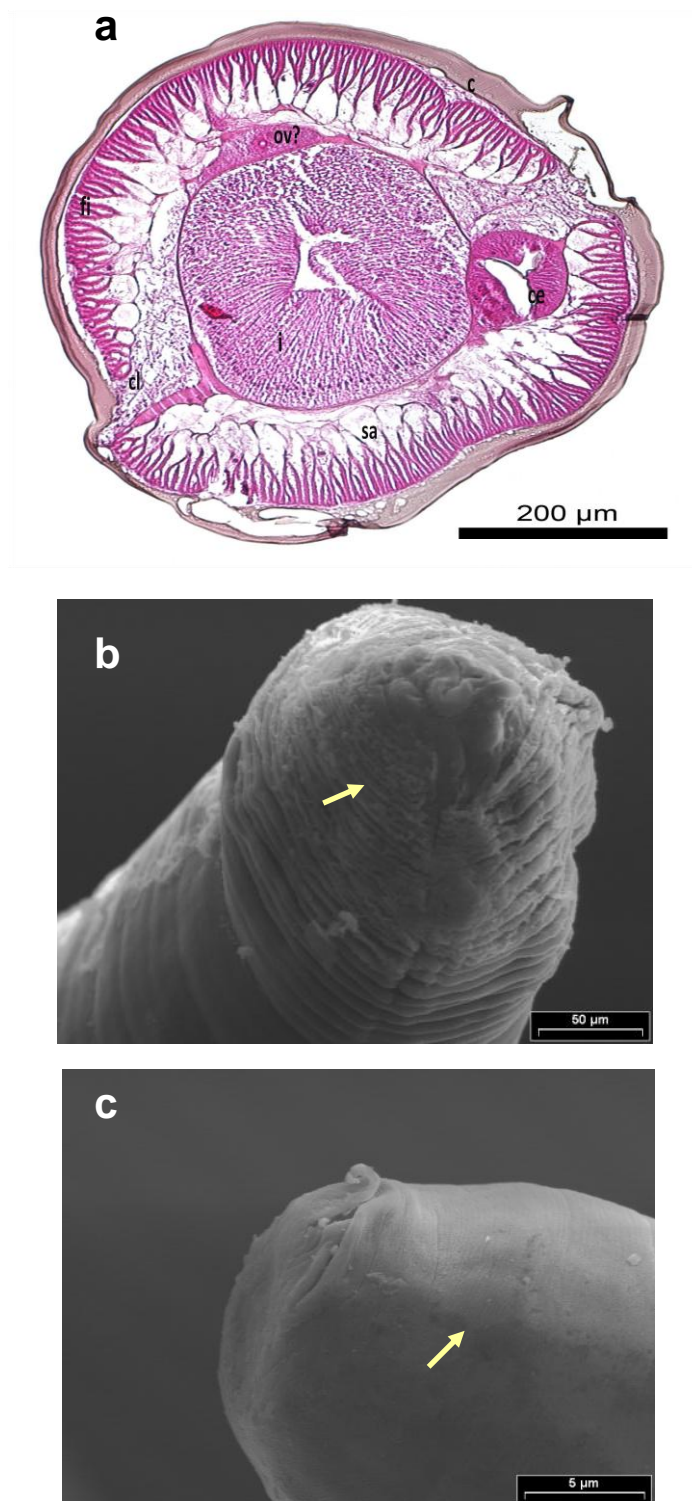


Figura 16. Larva L3 de *Contracaecum multipapillatum* s. l. en el medio de cocimiento en aceite. **a.** Corte histológico de la parte anterior de la región media del cuerpo. Cutícula (c), cordón longitudinal (cl), intestino (i), ciego esofágico (ci), ovario (ov), fibras contráctiles (fi), porción sarcoplásmica (sa). 96X. **b.** Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior. La flecha indica ruptura y descarapelamiento de los pliegues cuticulares del collar. 500X. **c.** Micrografía electrónica de barrido del extremo posterior. La flecha señala lesiones de quemadura. 600X.



En los especímenes que se empapelaron con un diámetro del eje dorso-ventral de 480.88 y del eje de los cordones laterales de 434.45, se puede ver que la mayor parte de la cutícula está adosada a la hipodermis, con aspecto uniforme en la zona de mayor grosor y más adelgazada en la zona opuesta. Los cordones epidérmicos laterales con forma irregular. La región citoplásmica de las células musculares está en contacto con el mesénquima laxo del pseudoceloma, alcanzando el borde externo del intestino debido a la deshidratación producida. Las fibras contráctiles musculares se ven acortadas y adheridas entre si en la zona de mayor grosor de la cutícula. El arreglo de las células de la pared del intestino tienen una desintegración mayor (Fig. 17a).

En el MEB, los nemátodos que se empapelaron y cocinaron, muestran que la cutícula en algunas zonas presentaron descarapelamiento y separación de los pliegues cuticulares que conforman el collar y el extremo posterior tiene zonas con lesiones graves de quemaduras (Figs. 17b y 17c).

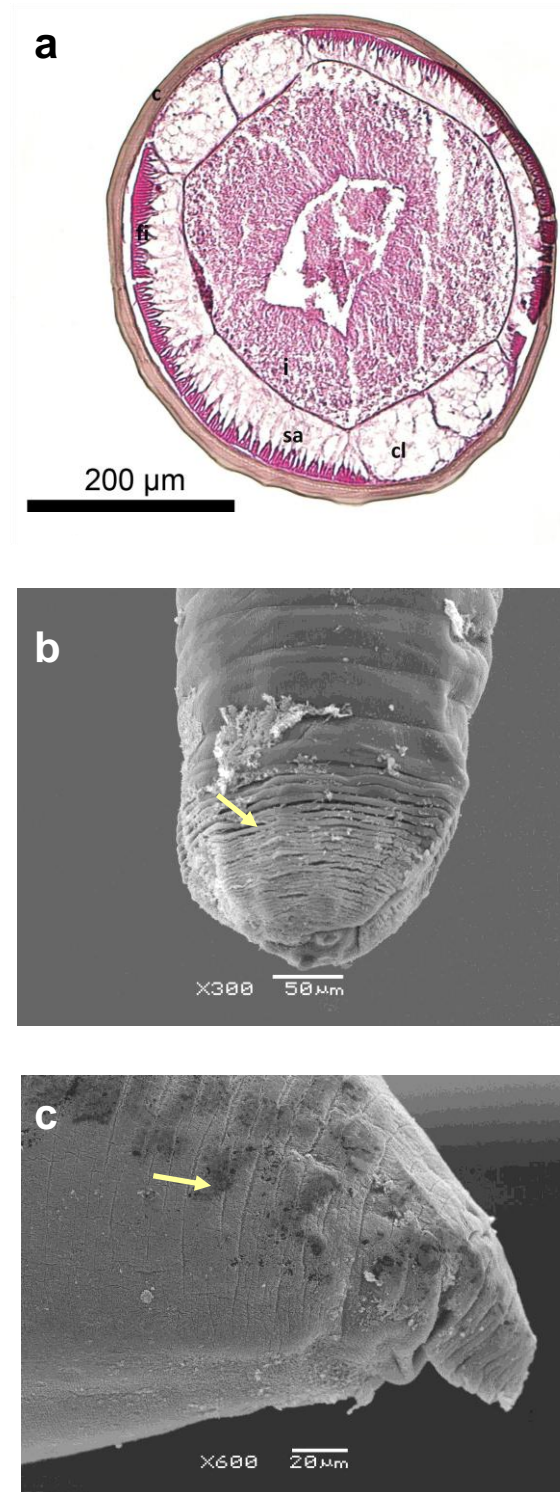


Figura 17. Larva L3 de *Contracaecum multipapillatum* s. l. en el medio de cocimiento en empapelado en aluminio. **a.** Corte histológico de la parte posterior de la región media del cuerpo. Cutícula (c), cordón longitudinal (cl), intestino (i), ciego intestinal (ci), fibras contráctiles (fi), porción sarcoplásmica (sa). 96X. **b.** Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior. La flecha indica la separación de los pliegues cuticulares del collar. **c.** Micrografía electrónica de barrido del extremo posterior. La flecha señala las lesiones de quemadura causadas por el medio. La flecha señala lesiones de quemadura. 600X.



En cambio los nemátodos que se sometieron a congelamiento el diámetro del eje dorso-ventral de 780.42 y del eje de los cordones laterales de 811.48, la cutícula se ve adosada a la hipodermis en la mayor parte de su extensión, con aspecto uniforme. Los cordones epidérmicos laterales con forma irregular y adosados a la hipodermis y uno de ellos alcanza el borde externo del intestino. Las fibras contráctiles de las células musculares más cortas en una zona y alargadas en la otra y muy adheridas entre sí, la región apical de las células también alcanzan el borde externo del intestino. Las células de la pared del intestino con núcleos basales y arreglo uniforme y se observa probable glándula excretora (Fig. 18a).

En el MEB las larvas sometidas a congelamiento se observa ruptura cuticular y pérdida de las estriaciones cuticulares del collar, la morfología de los labios no se distingue (Fig. 18b). El extremo posterior aparentemente muestra ligera ruptura de la cutícula (Fig. 18c).

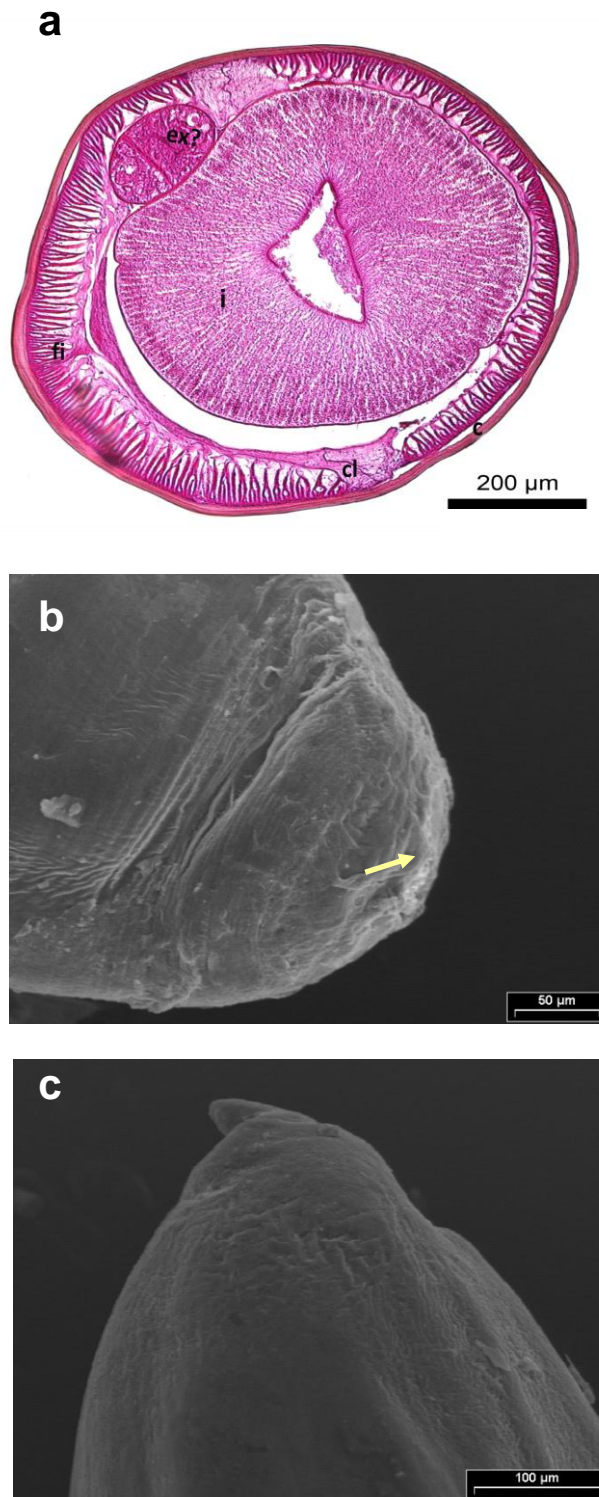


Figura 18. Larva L3 de *Contracaecum multipapillatum* s. l. en el medio de congelación. **a.** Corte histológico de la parte anterior de la región media del cuerpo. Cutícula (c), cordón longitudinal (cl), intestino (i), fibras contráctiles (fi), porción sarcoplásmica (sa). 9 X. **b.** Micrografía electrónica de barrido del extremo anterior. La flecha indica la localización de los labios. 400 X. **c.** Micrografía electrónica de barrido del extremo posterior. 300 X.



De la observación de los cortes histológicos se encontró que los medios que provocan más lesiones son el limón, vinagre y cocimiento. Las lesiones incluyeron la ruptura de la cutícula, separación de la hipodermis así como cambios en su grosor. Los cordones epidérmicos tuvieron forma irregular. En las células musculares se observó acortamiento y adhesión de las fibras contráctiles y presencia variable de la región citoplásmica no contráctil incluyendo su desaparición. La organización histológica del aparato digestivo incluye cambios en su volumen y desorganización del arreglo celular incluida su desintegración. En relación al pseudoceloma el cambio más notable fue su desaparición por estar ocupado completamente por las células musculares y el digestivo (Fig. 18 a, d, g, j y n).

Respecto a las observaciones con el MEB se encontró que los medios que provocan más lesiones en la cutícula son el jugo de limón y cocimiento. Las lesiones incluyeron separación de los pliegues que conforman el collar, descarapelamiento y ruptura de la cutícula e invaginación de los labios. La zona más lastimada en los diferentes nemátodos sometidos a los medios fue el extremo anterior, ya que el extremo posterior solo presentó algunas lesiones de quemaduras en los medios de vinagre y cocimiento, la parte intermedia del cuerpo muestra un aspecto homogéneo (Fig. 18 b, c, e, f, h, i, k, l, o y p).

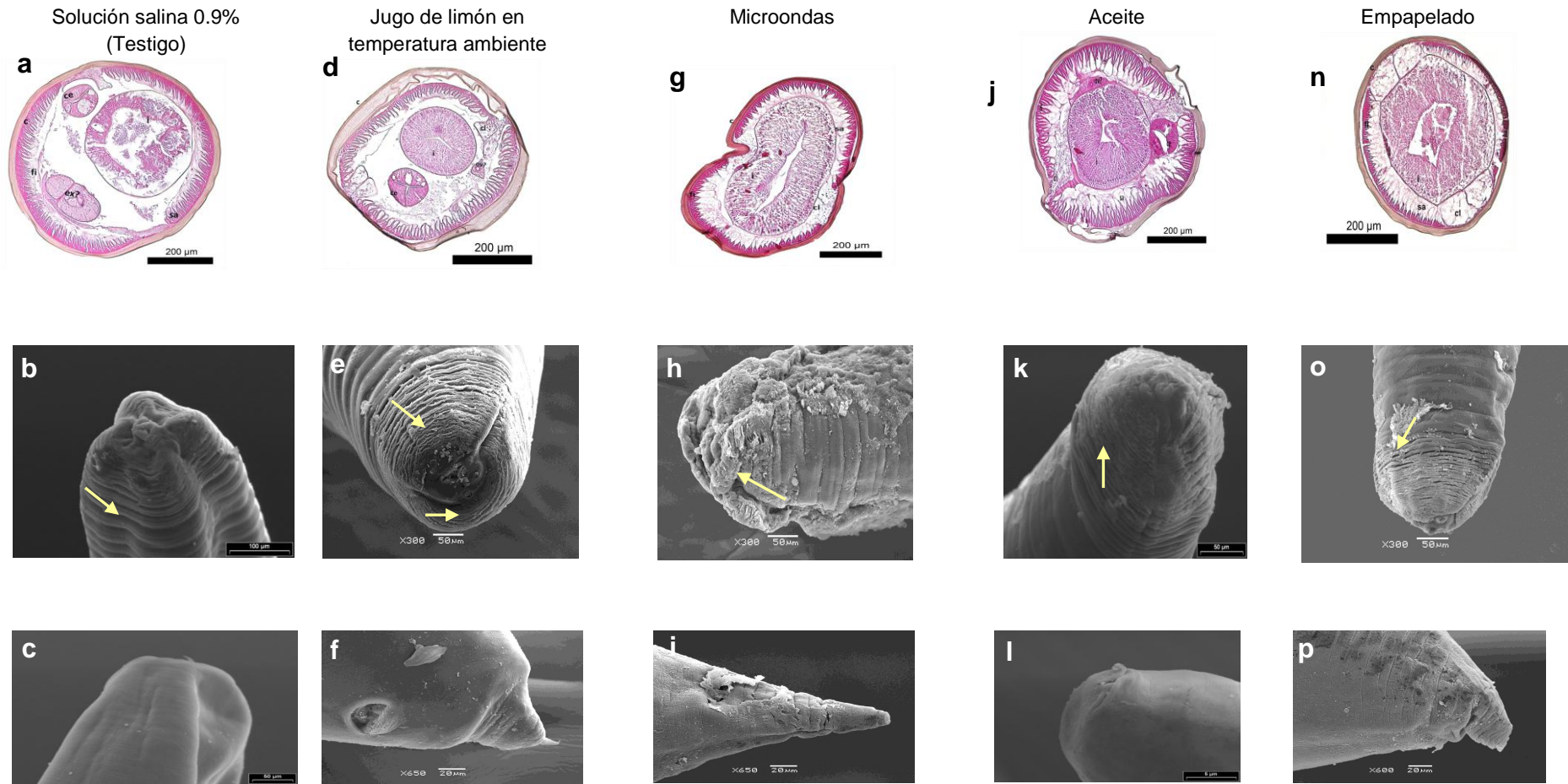


Figura 19. Cortes histológicos (línea superior) y micrografías electrónicas de barrido del extremo anterior (línea media) y posterior (línea inferior) de la larva L3 de *Contracaecum multipapillatum s.l.* Cutícula(c), Cordón longitudinal (cl), Intestino (i), Ciego esofágico (ce), Fibras contráctiles (fi), Porción sarcoplásmica (sa). Glándula excretora (ex). Las flechas señalan los daños ocasionados por los medios.



Primer hospedero intermediario.

Se obtuvieron 60 muestras de sedimento de las zonas del Estero de Zacatecas y de Balandra recolectadas en el periodo febrero a julio de 2009. De estas muestras 40 de los meses de febrero, marzo, abril y mayo se tamizaron mediante el proceso de elutriación, donde se encontraron poliquetos, isópodos, caprelidos y copépodos sanos (Tabla II).

De los meses de junio y julio, las 20 muestras recolectadas se tamizaron con la técnica de Baermann, donde se obtuvieron nemátodos de vida libre y copépodos no parasitados (Tabla III).

Tabla II. Organismos encontrados en las muestras de sedimento con el proceso de elutriación.

Estación	Poliquetos	Caprelidos	Copépodos	Isópodos	Total
Balandra	106	5	86	18	215
E. Zacatecas	66	6	49	13	134
Total	172	11	135	31	

Tabla III. Organismos encontrados en las muestras de sedimento con la técnica de Baermann.

Estación	Nemátodos de vida libre	Copépodos	Total
Balandra	46	22	68
E. Zacatecas	68	18	86
Total	114	40	



De las muestras de zooplancton de la columna de agua de la Bahía de La Paz revisadas se encontraron larvas de peces, eufaúsidos y quetognatos no infectados por nemátodos. Sin embargo, en las muestras de febrero 2009 se encontraron 38 copépodos de la especie *Labidocera trispinosa* infectados probablemente con céstodos (Fig. 20) y de las muestras de junio 2008 se encontraron 15 copépodos de la especie *Acartia lilljeborgii* infectados por metacercarias de hemiúridos (Fig. 21).



Figura 20. *Labidocera trispinosa* con un parásito en el hemocele

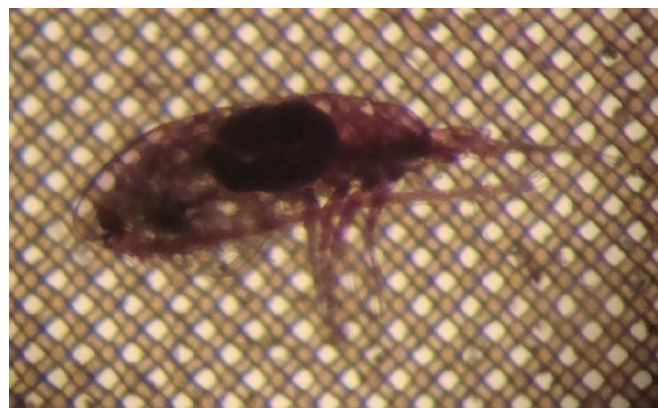


Figura 21. *Acartia lilljeborgii* con un parásito en el hemocele

Durante el periodo del tiempo de las actividades mencionadas no se encontró el organismo que pudiera actuar como primer hospedero intermediario de *C. multipapillatum* s. l. en estadio dos.



DISCUSIÓN

Identificación taxonómica.

La correcta identificación taxonómica de los nemátodos anisákidos, en cualquier etapa de su ciclo de vida es elemental para comprender la epidemiología del parásito y así poder desarrollar estrategias para el control de las enfermedades asociadas con ellos. Sin embargo, existen limitaciones al momento de la identificación de los estados larvarios usando las características morfológicas (Olivero-Verbel y Baldiris-Avila. 2008), por lo que se acudió a la identificación molecular a través de la secuenciación del ITS-1 e ITS-2, indicando que estas larvas de nemátodos pertenecen a una especie genéticamente cercana a las especies del complejo de *C. multipapillatum*, pero aun se encuentra en proceso la confirmación de que se trate de una especie diferente a las cuatro integrantes de este complejo, por lo que la manera indicada para referirse a los especímenes encontrados en *M. curema* de la Bahía y Ensenada de La Paz es *C. multipapillatum* s. l. Además, probablemente las larvas de los nemátodos que se encuentran en *M. cephalus* de la Bahía de La Paz es la misma especie de dicho estudio según Overstreet, 2007 (comunicación personal).

Términos Ecológicos en Parasitología.

Las Larvas de L3 de varias especies de *Contracaecum* han sido encontradas en peces del Golfo de México y aguas adyacentes, una familia en particular es la Mugilidae, que se caracterizan por presentar un alto índice de parasitosis, en este estudio se trabajó con *M. curema* donde se registró una prevalencia de 95% y 100%, e intensidad media de 10.5 y 23.8 reflejando un



alto poder de colonización de este nemátodo. Estos resultados coinciden con Salgado-Maldonado y Barquín-Álvarez (1978) en *M. cephalus* donde registran una prevalencia parasitaria de 100% para *Contracaecum* sp. en los meses de mayo y julio. Ellos mencionan que la carga parasitaria en general y helmintológica en particular, que afecta a las lisas, puede explicarse con base en su edad, hábitos alimenticios y las áreas geográficas en que se desarrolle el sistema. Por su parte, Rawson (1976) *In*: Salgado-Maldonado y Barquín-Álvarez (1978) y Valles-Ríos *et al.*, 2000 mencionan que el incremento del número de parásitos con la edad y la talla del huésped es atribuido a la acumulación del nemátodo *C. multipapillatum*, el cual permanece alojado en el pez por varios años, así como a la mayor probabilidad de interacción con otros huéspedes infectados como los juveniles que están en contacto con los peces de edad más avanzada, en los períodos de abundancia del parásito.

La acción parasitaria de los nemátodos nos puede indicar que cualquier grado de infección compromete la integridad del pez, y por lo tanto, del órgano donde se encuentra, de los peces revisados los órganos más parasitados fueron el intestino y el músculo-columna vertebral (Fig.7). La preferencia del parásito a los órganos viscerales, es hacia el mesenterio intestinal lo que podría limitar su potencial zoonótico, sin embargo, varios autores han descrito la presencia de larvas encapsuladas en la musculatura del pescado, en especial en la musculatura ventral, por lo que proponen la posibilidad de migración de estas larvas hacia la musculatura del pescado tras su captura (Osanz-Mur, 2001). En estudios respecto a la migración de larvas de anisákidos en el músculo del arenque del Pacífico, han observado que el tiempo entre la captura y el procesado y la exposición de las larvas a las



temperaturas del ahumado y a las salmueras, pueden estimular las migraciones de dichas larvas hacia los músculos en busca de un lugar más adecuado Hauck, (1977) *In*: Osanz-Mur (2001), por lo que si los peces no son propiamente congelados y eviscerados después de la captura, los nemátodos pueden migrar al músculo y representar un riesgo de parasitosis para los humanos. Smith (1984) *In*: (Wharton *et al.*, 1999) menciona que la encapsulación puede simbolizar la preparación para la migración de las vísceras hacia el músculo, lo que esta relacionado con los peces que acumulan gran cantidad de lípidos en el tejido muscular.

Huss y Drewes (1989) *In*: Osanz-Mur (2001) mencionan que no hay evidencia de que los nemátodos emigren desde las vísceras hacia la musculatura después de la captura, independientemente de las condiciones de almacenamiento, por lo que no se conocen procedimientos de manipulación prácticos del pescado aplicables que pueden eliminar o reducir, la presencia de nemátodos en los filetes de pescado.

Supervivencia.

Haciendo una integración de los diferentes procesos utilizados para inactivar la larva L3 de los anisákidos, Jofré *et al.*, 2008 menciona que *Pseudoterranova* en soluciones salinas al 1-2% sobrevive por más de seis meses, al 4-3% siete semanas y al 8-9% cinco a seis semanas, la supervivencia en este estudio de *C. multipapillatum* s. l. en solución salina al 0.9% es de 16 días en temperatura ambiente y 14 días en refrigeración, existe una incompatibilidad en los tiempos en días en la supervivencia en los estudios esto se puede deber a que son especies diferentes. Sin embargo Huss (1988)



In: Osanz-Mur (2001) menciona que una solución de sal concentrada a mayor del 10%, es letal para los nemátodos, pero se puede esperar una supervivencia de más de dos semanas a una concentración de sal más baja.

Por otra parte, en este trabajo la concentración utilizada de ácido acético fue mayor, lo que justifica la acción de supervivencia en menos tiempo si se compara con los resultados obtenidos por Jofre *et al.*, (2008) que utiliza el ácido acético al 1% en *Pseudoterranova* en donde resiste más de tres meses. Considerando que la supervivencia de *C. multipapillatum* s. l. en este medio fue alrededor de 2 a 5 semanas en las diferentes temperatura; Karl *et al.*, (1994); Huss, (1997) *In: Osanz-Mur (2001)* mencionan que el efecto del ácido no es tan pronunciado, como el incremento de la concentración de sal a 8-9%, con lo que el tiempo de supervivencia puede reducir, ya que la adición de sorbatos al escabechado no tiene influencia en la viabilidad de los nemátodos, debido a que la cutícula confiere a los nemátodos anisákidos la resistencia necesaria para sobrevivir a los ácidos y enzimas digestivas de los mamíferos.

En relación con las larvas expuestas a cocimiento en estufa empleando aceite a temperaturas de 70 y 82°C y empapelados a 82 y 90 °C las larvas de *C. multipapillatum* s. l. murieron, resultado similar a lo obtenido por Torre-Molina *et al.* (2000) *In: Jofre et al.* (2000) quienes encontraron que las larvas de anisákidos se destruyen por el calor a 60°C durante 10 minutos. Respecto al microondas ellos mencionan que las larvas no se destruyen por este tratamiento en contraste con los resultados obtenidos en este estudio en el que las larvas murieron tras su exposición a temperaturas de 85 a 93 °C durante 2 a 5 min, lo cual está acorde con lo mencionado por Jofre *et al.* 2000 quienes indican que la cocción en horno de microondas requiere de una temperatura



mayor a 77°C en la porción más gruesa del producto, para inactivar las larvas de anisákidos.

Los resultados presentados en proporción a las bajas temperaturas utilizadas en los centros comerciales son similares con lo expresado por Deadorff y Throm (1988) in Antunes *et al*, (2008) donde muestran que la larva de *Anisakis* muere a los -35°C en un período de una hora, aunque hay diferencia en la metodología empleada y en la especie del parásito en prueba, se puede ver que al ser sometido el pescado entero a bajas temperaturas por más de una semana la larva no sobrevive, reflejándose también en la baja prevalencia de 77.7% y la intensidad media de 2.2 en comparación con los peces frescos de este trabajo.

Descripción histológica de cortes transversales de Larva L3 y de la pared del cuerpo por microscopia electrónica de barrido.

Considerando que la supervivencia de *C. multipapillatum* s. l. es mayor a un día en los medios de solución salina, limón y vinagre, es importante conocer las lesiones provocadas a la larva en los diferentes medios utilizados. Sin embargo, hay una ausencia de bibliografía que permita establecer una comparación y medir, en cierta forma, las lesiones que se observaron en los medios empleados en este trabajo. Da Silva Justino y Antunes Barros (2008) en el estudio realizado para determinar la resistencia de larvas de *Contracaecum* sp. con aceite de citronela obtenido de la planta *Cymbopogon* sp., encontraron en general, que después de introducir las larvas L3 en el aceite de una a cuatro hrs., las lesiones en la composición estructural de la pared corporal y órganos internos de los nemátodos, consistieron en la ruptura



cuticular y desintegración de la pared intestinal, y la presencia de algunas proyecciones de los órganos hacia la parte exterior del parásito produciendo protuberancias evidentes.

De acuerdo con estos autores, las lesiones de los nemátodos observadas después de una hora de exposición al aceite, incluyeron el desprendimiento de la cutícula de la hipodermis en algunas zonas. Este efecto también se presentó en las larvas sometidas en los medios de este trabajo (Fig.19). Sin embargo, los autores mencionados observaron el desprendimiento total de la cutícula en los tratamientos de 2 a 4 hrs de inmersión de las larvas en citronela, lo cual tampoco se observó en este trabajo.

Por su parte, Hierro *et al.* (2006), encontraron alteraciones en la cutícula de la larva L3 de *Anisakis simplex s. l.* tales como rugosidades y deformaciones o proyecciones a manera de espinas en todos los tratamientos empleados cuando las ratas a las que infectaron con este nemátodo fueron tratadas experimentalmente con citral, citronela, cuminaldehído y carvacrol en aceite de olivo, excepto en el del cuminaldehído. Estas características no fueron observadas en la cutícula de los ejemplares de este trabajo.

Otro cambio identificado por Da Silva Justino y Antunes Barros (2008) es el aumento del volumen del nemátodo después de 4 hrs de inmersión en el aceite de citronela. En contraste, en el presente trabajo se observó la deshidratación de las larvas en los tres medios de cocimiento así como en el de congelación, provocando la desaparición aparente del pseudoceloma, ya que éste está ocupado en su totalidad por el intestino y las células musculares del tegumento (Figs. 15, 16, 17 y 18).



En el tratamiento de citronela durante 4hrs empleado por los autores, se observó la desintegración de la pared del intestino y desorganización del arreglo de las células musculares del tegumento. Hierro et al. (2006) también registran la ruptura de la pared intestinal de la larva L3 de *Anisakis simplex* s. l. en los tratamientos con citral y citronela. Además estos autores indicaron que el cuminaldehído y el carvacrol causaron el ensanchamiento de la luz intestinal con presencia de material celular. Estas características aunque en menor proporción, se encontraron en las larvas del presente trabajo, expuestas a vinagre en temperatura ambiente y refrigerado, en cocimiento en microondas, aceite y empapelado.

Un aspecto importante a considerar es que las larvas que se sometieron a la técnica histológica fueron aquellas que sobrevivieron más tiempo en cada uno de los medios utilizados en este trabajo (5 min a 42 días), en contraste con los tiempos de inmersión en el aceite de citronela empleados por Da Silva Justino y Antunes Barros (2008), los cuales no excedieron las 4 hrs. las lesiones descritas en ambos trabajos, son similares en términos generales, es decir, en ambos casos se observó desprendimiento de la cutícula de la hipodermis, alteración en la organización de las células musculares y del intestino, incluyendo la desintegración de su pared.

Sin embargo, los daños fueron menos drásticos en aquellas larvas expuestas al jugo de limón y vinagre tanto de temperatura ambiente como de refrigeración considerando que estos resultados se obtuvieron en exposiciones a los medios hasta por 42 días, en comparación con el aceite de citronela cuyas lesiones fueron más drásticas en menor tiempo de exposición.



Respecto al grado de desintegración de la pared intestinal, podría considerarse de importancia similar el efecto que causó la inmersión por 4 hrs en el aceite de citronela y el del cocimiento en aceite y empapelado que ocurrieron en menos de 10 min.

Primer hospedero intermediario.

No obstante se han hecho muchas investigaciones para conocer el ciclo de vida de los Anisákidos por medio de infecciones experimentales, pero toda vía no se han aclarado totalmente, en especial, la manera en que la larva se transfiere al primer hospedero. El probable ciclo de vida que se describe para *Contracaecum multipapillatum* por Huizinga (1967) es el siguiente los adultos y la cuarta fase larvaria se encuentran en el tracto digestivo de aves piscívoras, los huevos son depositados en un medio acuático junto con las heces del hospedero. Los huevos se desarrollan al primer estadio larvario aproximadamente en 5 días en una temperatura de 21°C, esta larva muda en el huevo a la segunda etapa dentro de 5 a 7 días. Después de un periodo de incubación en el medio acuático las larvas salen mediante movimientos ondulatorios. Las larvas del segundo estadio (L2) presenta un ciclo de vida libre manteniendo la primera muda cuticular como una funda protectora, hasta ser ingerida por copépodos que se infectan al ser penetrados en el hemocele, el segundo estadio larvario no muda al tercer estadio, muestra un ligero aumento de tamaño y el desarrollo parcial del apéndice ventricular. Cuando peces planctófagos ingieren los copépodos infectados, las larvas penetran la cavidad del cuerpo y migran a una variedad de órganos internos, donde se encapsulan y otros peces por depredación llegan a infectarse del tercer estadio hasta llegar



a aves piscívoras donde mudan al cuarto estadio y después a su fase adulta y se completa su ciclo de vida. Desde estos últimos hospederos intermediarios, las larvas pueden llegar al hombre (hospedero accidental) que aparece en el ciclo por ingerir pescado semi-cocido o ligeramente marinado.

En este trabajo en las muestras de sedimento y de la columna de agua no se encontraron invertebrados infectados por la larva L3, el primer hospedero intermediario de anisákidos no se ha descrito naturalmente en invertebrados, sin embargo, se han realizado varias infecciones experimentales, Koe y Fagerholm (1995) desarrollaron el ciclo de vida *In vitro* de *C. osculatum* donde menciona que los peces pequeños alcanzan a comer las larvas que se encuentran en vida libre, pero indican que los crustáceos como copépodos Calanoideos, nauplios y larvas de Cirripedia cypris pueden actuar como hospederos paraténicos, ya que son ingeridos por peces .

Mosgovoy et al. (1968) *In: Dziekońska-Rynko y Rokicki (2007)* estudiaron el ciclo de vida de *C. rudolphii*, donde trabajaron con numerosos invertebrados (crustáceos, oligoquetos y moluscos), pero sólo lograron infectar a copépodos y larvas de libélulas y concluyeron que los copépodos son hospederos paraténicos, mientras que las larvas de libélulas de los géneros *Coenagrion* y *Agrion* sirven como hospederos intermediarios. No lograron infectar a cormoranes con copépodos Ciclopoides y peces infectados experimentalmente, sin embargo, Bartlett (1996) *In Dziekońska-Rynko y Rokicki (2007)* menciona que los copépodos y anfípodos pueden ser hospederos paraténicos, mientras que los peces son hospederos intermediarios ya que pueden llegar a comerse las larvas que están en el estadio de vida libre. Esto podría ser una de las posibilidades por las cuales el



primer hospedero intermediario no se encontró en los invertebrados del sedimento y de la columna de agua revisados. Tomando en cuenta que larvas L3 de *Contracaecum* sp. se han encontrado en peces juveniles de *M. cephalus* y *M. curema* y considerando el ciclo de vida de los mugílidos que corresponde en dos fases: la primera es la existencia pelágica de las larvas recién eclosionadas que se alimentan del plancton, predominantemente microcústáceos en mar abierto, habría la posibilidad de que en esta fase se infectaran, (Smith 1983 *In*: Pereira-Blanco 1997) menciona que larvas de *A. simplex* son más frecuentes en los eufúsidos, hospederos intermediarios que viven a 100-200 m de profundidad que en los que habitan en aguas superficiales costeras, por lo que existe la posibilidad de que el primer hospedero sea un invertebrado y se encuentre estas zonas. Sin embargo, la segunda etapa del ciclo comprende la existencia estuarina de los juveniles en crecimiento hasta alcanzar la madurez sexual, la alimentación en esta fase cambia a ser herbívoros e iliofagos alimentándose principalmente de diatomeas, cianofitas e incluso clorofíceas (Anabe-Bandes, 2005). Lo que nos sugiere que durante esta etapa *M. curema* ingiere las larvas del segundo estadio larvario y, en éste, mudar al tercer estadio. Pero en las muestras de sedimento no se encontraron huevos o larvas del segundo estadio de *C. multipapilatum* s. l. lo que nos puede indicar que se encuentren en zonas más profundas y por lo tanto, el lugar de muestreo, la zona intermareal, no fue el adecuado o bien la técnica empleada para la separación del sedimento y obtención de los invertebrados no fue apropiado. Considerando que los huevos miden alrededor de 65 por 58 μ y la larva L2 miden aproximadamente 362 por 13 μ (Huizinga, 1967) y pudieron pasar fácilmente por la malla empleada.



Recapitulando, si la preparación de la carne de pescado y su exposición al limón o vinagre es de 8 a 10 horas, y considerando que la supervivencia de la larva L3 en estos medios es mayor a un día, y aunque provocan a la larva lesiones severas similares a las causadas por el aceite de citronela que es recomendado por Da Silva-Justino y Antunes-Barros (2008) como un tratamiento eficaz para *Contraecaecum* sp. ya que inducen la ruptura cuticular, desintegración de la pared intestinal y algunas proyecciones de los órganos hacia la parte exterior del nemátodo formando protuberancias evidentes después de cada hora de exposición en el aceite. Y en comparación con los efectos provocados a la larva de *C. multipapillatum* s. l. por los medios empleados en este estudio, que fueron ligeros en relación con el tiempo en el que estuvieron expuestos, considerando que las lesiones necesarios para afectar la viabilidad de la larva es necesario un daño penetrante a la cutícula externa, para que los elementos digestivos puedan actuar rápidamente reduciendo a fragmentos a los nematodos, ya que está le confiere resistencia necesaria para sobrevivir a los ácidos y enzimas digestivas de mamíferos (Adams *et al.*, 1999). Por lo que la tasa de mortalidad de la larva de *C. multipapilatum* s. l. en los medios utilizados en este estudio como tratamientos alternativos nos indica que en la exposición en limón o vinagre probablemente no se vean afectadas en el caso de la ingestión accidental, por lo que es favorable su cocimiento a altas temperaturas o congelación por más de una semana para su consumo.



CONCLUSIONES

La lisa *M. curema* del Estero de Zacatecas y Balandra de La Paz BCS presentan altas prevalencias e intensidad promedio de parasitismo por la larva L3 de *C. multipapillatum s.l.*, siendo el músculo- columna vertebral e intestino los órganos con mayor abundancia.

La supervivencia máxima (42 y 26 días) de las larvas L3 de *C. multipapillatum s. l.* expuestas a los diferentes medios culinarios, fue en vinagre al 4% tanto en temperatura ambiente como en refrigeración respectivamente.

Los medios de jugo de limón y vinagre presentaron las lesiones más ligeras (desprendimiento de cutícula de la hipodermis y alteraciones en la organización de las células musculares), tomando en cuenta que la supervivencia mínima en jugo de limón en temperatura ambiente es de tres días y en temperatura de refrigerador es de cuatro días y en vinagre al 4% es de 11 días en ambas temperaturas.

El cocimiento en estufa convencional y microondas a temperaturas de 70° a 93°C (2 a 10 min) y en congelación a temperaturas de -20 a -30°C por más de una semana provocaron la muerte definitiva de la L3, presentando lesiones más severas (desprendimiento de la cutícula de la hipodermis, desorganización de las células musculares y del intestino, y el ensanchamiento de la luz intestinal). Tomando en cuenta que murieron de 2 a 10 min de exposición al calor se consideran que son medios favorables para no adquirir la anisakidosis.

Los efectos en el tegumento de las larvas causadas por la exposición en los diferentes medios de cocimiento observadas en el MEB corresponden a la



separación de los pliegues que conforman el collar, descarapelamiento y ruptura de la cutícula e invaginación de los labios y quemaduras.

El efecto en el tegumento de las larvas L3 de *C. multipapillatum s.l.* observados en el MEB fueron más drásticos en el extremo anterior provocando lesiones en los pliegues cuticulares del collar e invaginación de los labios en los diferentes medios utilizados, por lo que esta zona es más débil en relación a las otras partes del cuerpo, pero sobre todo en limón y cocimiento.

Las observaciones en el MEB del extremo posterior de las larvas L3 de *C. multipapillatum s.l.* en los diferentes medios de cocimiento y vinagre al 4% mostraron lesiones de quemaduras.

La mejor medida de prevención para no adquirir la anisakidosis es evitar el consumo de pescado crudo o semi-cocinado ya que son medios culinarios que no acaban con la supervivencia de la Larva L3 de *C. multipapillatum s.l.* Otra forma sería consumir pescado congelado de -20 a -30 °C por más de una semana o cocinarlo a más de 70°C.

Con los métodos empleados no se encontró el primer hospedero intermediario en invertebrados de las muestras de sedimento y de la columna de agua, probablemente los invertebrados actúen como hospederos parátenicos y las lisas juveniles adquieran a la larva L2 cuando están en la etapa de vida libre y muden a L3 formando parte del ciclo como primeros hospederos intermediarios.



RECOMENDACIONES

La población de La Paz, Baja California Sur, consume frecuentemente lisas *M. curema* y *M. cephalus*, siendo peces que muestran altas prevalencias e intensidad promedio de *C. multipapillatum* s. l. lo que incrementa la posibilidad de adquirir la Anisákidosis por la ingestión accidental de la larva y tomando en cuenta que la tasa de supervivencia en limón y vinagre es mayor a un día, es necesario que el consumo de la carne de pescado sea bien cocinada a altas temperaturas de 70 a 93°C y durante 5 min. mínimo o bien haberla mantenido en congelación a temperaturas de -20 a -30°C por más de una semana para asegurar la muerte de las larvas.

Es necesario realizar un estudio que demuestre si existen infecciones de *C. multipapillatum* s. l. en México debido a que sus síntomas son confundidas con otras enfermedades gastrointestinales.

Se recomienda alertar a las autoridades de sanidad para difundir a la comunidad de La Paz BCS las medidas preventivas para evitar la infección accidental de *C. multipapillatum* s. l. y otras especies del mismo género y de la familia Anisakidae que posiblemente se encuentren en productos de consumo humano.

Se recomienda experimentar posible viabilidad de la larva L3 de *C. multipapillatum* s. l. con infecciones en animales de laboratorio.

Debido a que no se ha registrado el primer hospedero intermediario natural se recomienda llevar a cabo un estudio donde se realice la infección experimental *in vivo* de *C. multipapillatum* s. l. con organismos zooplácticos para conocer a quiénes utiliza como primeros hospederos intermediarios.



Además es fundamental realizar un estudio donde se revisen lisas juveniles para conocer si corresponden al segundo estadio larvario.

También realizar muestreos de zooplancton y sedimento en zonas más profundas y revisar algas de zonas estuarinas considerando que los huevos o la segunda fase larvaria se encuentren entre éstas y las lisas al ser herbívoras se infecten por esta vía.



LITERATURA CITADA

- Anabe-Bandes, V., S. I. Selgrado, M. Ríos y H. Salas. 2005. Nemátodos de la familia Anisakidae en el pescado fresco que se expende para el consumo humano en Caracas, Venezuela. *Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"* 36 (2): 21-29.
- Anderson, R.C. 2000. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. CABI Publishing 2nd edition. London. 650pp.
- Antunes-Barros, L., C. Oliveira-Sigarini y P. Rodrigues-Pinto. 2008. Resistência de larvas de *Contracaecum* sp., a baixas temperaturas. *Revista Brasileira de Ciencia Veterinaria* 15 (3): 143-145.
- Adams, A. M., LL. Lleja, K. Jinneman, J. Beeh, G. A. Yuen y M. M. Wekwll. 1994. Anisakid parasites, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in sushi and sashimi from Seattle área restaurants. *Journal of Food Protection* 57: 311-317.
- Arreola-Lizárraga, J.A. y E. González-Navarro. 1996. Composición, abundancia y distribución de larvas de peces en La Ensenada de La Paz, BCS., México. *Revista de Investigación Científica. Serie Ciencias del Mar. UABCS* 7 (1-2): 23-39.
- Bush, A. O., K. D. Lafferty, J. M. Lotz y A. W. Shostak. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology* 83(4): 575-583.
- Cabrera, R. y M. P. Trillo-Altamirano. 2004. Anisakidosis: ¿una zoonosis parasitaria marina desconocida o emergente en el Perú?. *Gastroenterología* 24: 335-342.



- Castro-Aguirre, J.L., H. Espinosa Pérez y J.J. Schmitter-Soto. 1999. Ictiofauna Estuarino-Lagunar y Vicaria de México. Serie Biotecnológicas. Limusa. México. 705pp.
- Da Silva-Justino, C.H. y L. Antunes-Barros. 2008. In vitro evaluation of the resistance of the *Contraecum* sp. larvae (Railliet & Henry, 1912) (Nematoda: Anisakidae), to the essential oil of citronella (*Cymbopogon* sp.) (Poaceae). *Revista Brasileira de Ciencia Veterinaria* 15 (3): 122-125.
- Deardorff, T.L. y R.M. Overstreet. 1980. *Contraecum multipapillatum* (*C. Robustum*) from fishes and birds in the Northern Gulf of Mexico. *Journal Parasitology* 66 (5): 853-856.
- Dziekońska-Rynko, J. y J. Rokicki. 2007. Life cycle of the nematode *Contraecum rudolphii* Hartwig, 1964 (sensu lato) from northern Poland under laboratory conditions. *Helminthologia* 44 (3): 95-102.
- Flores-Chávez, S., A. Romero-Baylón y D. Martínez-Aguilar. 2009. Tecnología de clasificación fina de mineral metálico y no metálico. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial* 12(1): 27-31.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. *Instituto de Geografía, UNAM*. México. 220 pp.
- Gómez del Prado Rosas, M.C., L. Iglesias, F.J. Adroher y A. Valero. 2008. *Contraecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) parásito de lisas ¿riesgo potencial en la salud pública de La Paz, B.C.S? .1er. Congreso Peruano de Helminthología e Invertebrados Afines – encuentro internacional “New approaches about Neotropical Helminthology”. 30 de octubre-01 de noviembre de 2008. Lima, Perú.



- González-Zamorano, P., E. Serviere-Zaragoza, E.F. Balart, A. Mazariegos, J.L. León- de la Luz, R. Domínguez-Cadena, J. Ramírez, L. Campos y C. Dawes. 2005. Estructura, cobertura y producción de hojarasca del manglar Zacatecas, B.C.S. CIBNOR. Taller sobre manglares de la Península. Noviembre 3 y 4 de 2005. CIBNOR. La Paz, B.C.S. México.
- Harrison, F.W. y E. E. Ruppert. 1991. Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 4 Aschelminthes. Wiley-Liss. 424pp.
- Hartwich G. 1974. CIH keys to the Nematode Parasites of Vertebrates No.2 Keys to General of the Ascaridoidea. (Eds. Anderson, R. C., A. G. Chabaud, S. Willmott. Commonwealth Agricultural Bureaux. England. 15pp.
- Hierro, I., A. Valero y M.C. Navarro. 2006. In vivo larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L₃ larvae of *Anisakis simplex* s.l. *Phytomedicine* 13: 527-531.
- Huizinga, H.W. 1967. The life cycle of *Contraecum multipapillatum* (von Drasche, 1882) Lucker, 1941 (Nematoda: Heterochelidae). *The Journal of Parasitology* 53 (2): 368-375.
- Jofré, L., P. Neira, I. Noemí y J.L. Cerva. 2008. Pseudoterranovosis y sushi. *Revista Chilena de Infectología* 25 (3): 200-206.
- Koie, M. y H.P. Fagerholm. 1995. The life cycle of *Contraecum osculatum* (Rudolphi, 18021 sensu stricto (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in view of experimental infections. *Research Parasitology* 81: 481-489.
- López-Serrano, M., A. Alonso-Gómez, A. Moreno-Ancillo, A. Daschner y J. Suárez de Parga. 2000. Anisakiasis gastro-alérgica: Hipersensibilidad



- inmediata debida a parasitación por *Anisakis simplex*. *Alergología e Inmunología Clínica* 15: 230-236.
- Navone, G.J., J.A. Etchegoin y F. Cremonte. 2000. *Contraecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakidae) from *Egretta alba* (Aves: Ardeidae) and comments on other species of this genus in Argentina. *Journal Parasitology* 86 (4): 807-810.
- Mattiucci S., J. Olivero, M. Paoletti, B. Arroyo, G. Nascetti. 2006. Genetic evidence for new species of *Contraecum* (Nematoda, Anisakidae) parasites of the brown pelican, *Pelecanus occidentalis*, from Columbia: genetic relationships between congeners and larval identification. 11th International Congress of Parasitological Associations, 6th–11th August, Glasgow Scotland. (Abstract).
- Mattiucci, S. y G. Nascetti. 2008. Advances and Trends in the Molecular Systematics of Anisakid Nematodes, with implications for their Evolutionary Ecology and Host-Parasite Co-evolutionary Processes. En: *Advances in Parasitology*, Rollinson, D. y S. I. Hay (Ed). Elsevier. 301 pp.
- Mattiucci, S., M. Paoletti, A. C. Solorzano, G. Nascetti. 2010. *Contraecum gibsoni* n. sp. And *C. overstreeti* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from the Dalmatian pelican *Pelecanus crispus* (L.) in greek waters: genetic and morphological evidence. *Systematic Parasitology* 75: 207-224.
- Nadler, S. A., S. D'Amelio, M. D. Dailey, L. Paggi, S. Siu y J. A. Sakanari. 2005. Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova* and *Contraecum* from Northern Pacific marine mammals. *Journal of Parasitology* 91 (6): 1413-1429.



- Olivero-Verbel, J. y R. Baldiris-Avila. 2008. Parásitos en peces colombianos: Están enfermando nuestros ecosistemas? Universidad de Cartagena. Colombia 122pp.
- Osanz-Mur, A. C. 2001. Presencia de larvas de Anisákidos (Nematoda: Ascaridoidea) em pescado de consumo capturado em La zona pesquera de Tarragona. Tesis de Doctorado Universidad Autónoma de Barcelona Facultad de Veterinaria. España. 142 pp.
- Oshima, T. 1972. *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. Meguro Parasitological Museum, Tokyo. Japan. 604pp.
- Pedrin-Avilés, S., G. Padilla-Arredondo, E. Díaz-Rivera, L., Sirkin y R. Stuckenrath. 1992. Estratigrafía del pleistoceno superior-holoceno en el área de la laguna costera de balandra, estado de B.C.S. *Instituto de Geología* 9 - 2: 170-175.
- Perez-Iñigo, C. 1976. Parasitología. Hermann Blume. España. 422pp.
- Pereira-Blanco, J. M. 1992. Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la Anisakiosis. Casa Ambrosio Rodríguez, S.A. España. 52pp.
- Pereira-Lima, J. y P. G. Delgado. 1961. Diagnosis of Strongyloidiasis: importance of Baermann's Method. *American Journal of Digestive Diseases* 6 (9): 899-904
- Plomozo-Lugo, T. 2010. Propuesta para la regionalización de la pesca ribereña en el Golfo de California. Tesis de licenciatura Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, BCS, México. 80pp.
- Quijada, J., C. A. Lima dos Santos y N. Avdalov. 2005. Enfermedades parasitarias por consumo de pescado. Incidencia en América Latina. *Infopesca Internacional* 24: 16-23.



- Rello-Yubero, F.J., F.J. Adroher-Auroux, A. Valero-López. 2004. Anisákidos 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.
- Salinas-González, F., O. Zaytsev y V. Makarov. 2003. Formación de la estructura termohalina del agua en la bahía de La Paz de verano a otoño. *Ciencias Marinas* 29 (1): 59-65.
- Salazar-Bermúdez, M. A. 2011. Estudio de la estructura antigénica de la larva L3 de *Contracaecum multipapillatum* (*sensu lato*). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México. 59pp
- Salgado-Maldonado, G. y Barquín-Álvarez. 1978. *Floridosentis elongatus* Ward, 1953 y *Contracaecum* sp. parásitos de *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México Serie Zoología* 49(1): 71-82.
- Schaum, E., y Müller, W. 1967. Die *Heterocheilidiasis*. Eine Infektion des Menschen mit Larven von Fisch-Ascariden. *Deutsche Medizinische Wochenschrifts* 92: 2230-2233.
- Sherman, I. W., V. G. Sherman. 1970. The invertebrates: function and form. Macmillan Publishing Co., Inc. U.S.A 334pp.
- Shamsi S., R. Gasser, I. Beveridge y A. A. Shabani. 2008. *Contracaecum pyripapillatum* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) and a description of *C. multipapillatum* (von Drasche, 1882) from the Australian pelican, *Pelecanus conspicillatus*. *Parasitology Research* 103: 1031-1039.



- Shamsi, S., R. Norman, R. Gasser y I. Beveridge. 2009. Redescription and genetic characterization of selected *Contracaecum* spp. (Nematoda: Anisakidae) from various hosts in Australia.
- Thiengo, S.C., S.B. Santos, J.J. Vicente y R. Magalhaes Pinto. 2000. Ocurrence of *Contracaecum* sp. Larvae (Nematoda, Anisakidae) in *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828) (Mollusca, Gastropoda, Anyllidae) in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 178-179.
- Torres, M., M. Canales, M. Concha, X. Cofre y P. Téllez. 2000. Un caso de Anisakiosis en un adulto. *Parasitología al Día* 24 (3-4): 109-111.
- Valles-Ríos, M.E., G. Ruíz-Campos y L. Galavíz-Silva. 2000. Prevalencia e intensidad parasitaria en *Mugil cephalus* (Pisces: Mugilidae), del Río Colorado, Baja California, México. *Revista de Biología Tropical* 48 (2-3): 495-501.
- Vidal-Martínez, V.M., D. Osorio-Sarabia y R.M. Ovestreet. 1994. Experimental infection of *Contracaecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakinae) from Mexico in the domestic cat. *Journal Parasitology* 80 (4): 576-579.
- Wharton, D.A., M.L. Hassall y O. Aalders. 2010. *Anisakis* (Nematoda) in some New Zealand inshore fish. *Journal of Marine and Freshwater Research* 33 (4): 643-648.
- Yamaguti, S. 1961. *Systema Helminthum* vol. III The Nematodes of Vertebrates. Interscience Publishers Inc. England. 1261pp.