



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

SEMINARI DE RECERCA
FACULTAT DE FARMÀCIA I
CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

SEMINARI N° 12
21 NOVEMBRE 2017

Biogeografia de les espècies d'anisàkids (Nematoda) presents en peixos de consum habitual

Xavier Roca Geronès

Dra. Isabel de Montoliu Sanllehy

Dra. Roser Fisa Saladrigas

Secció de Parasitologia, Departament de
Biologia, Sanitat i Medi Ambient

CLASSIFICACIÓ TAXONÒMICA DELS ANISÀKIDS

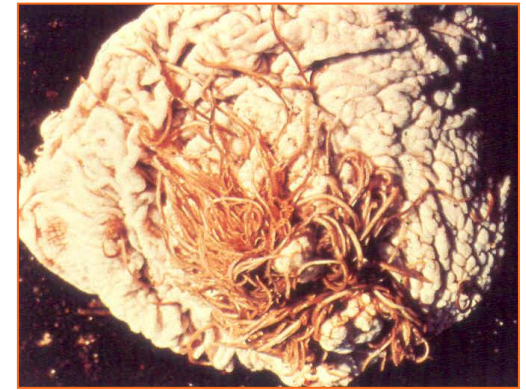
- Phylum NEMATODA

Classe Secernentea

Ordre Ascaridida

Superfamília Ascaridoidea

Família Anisakidae

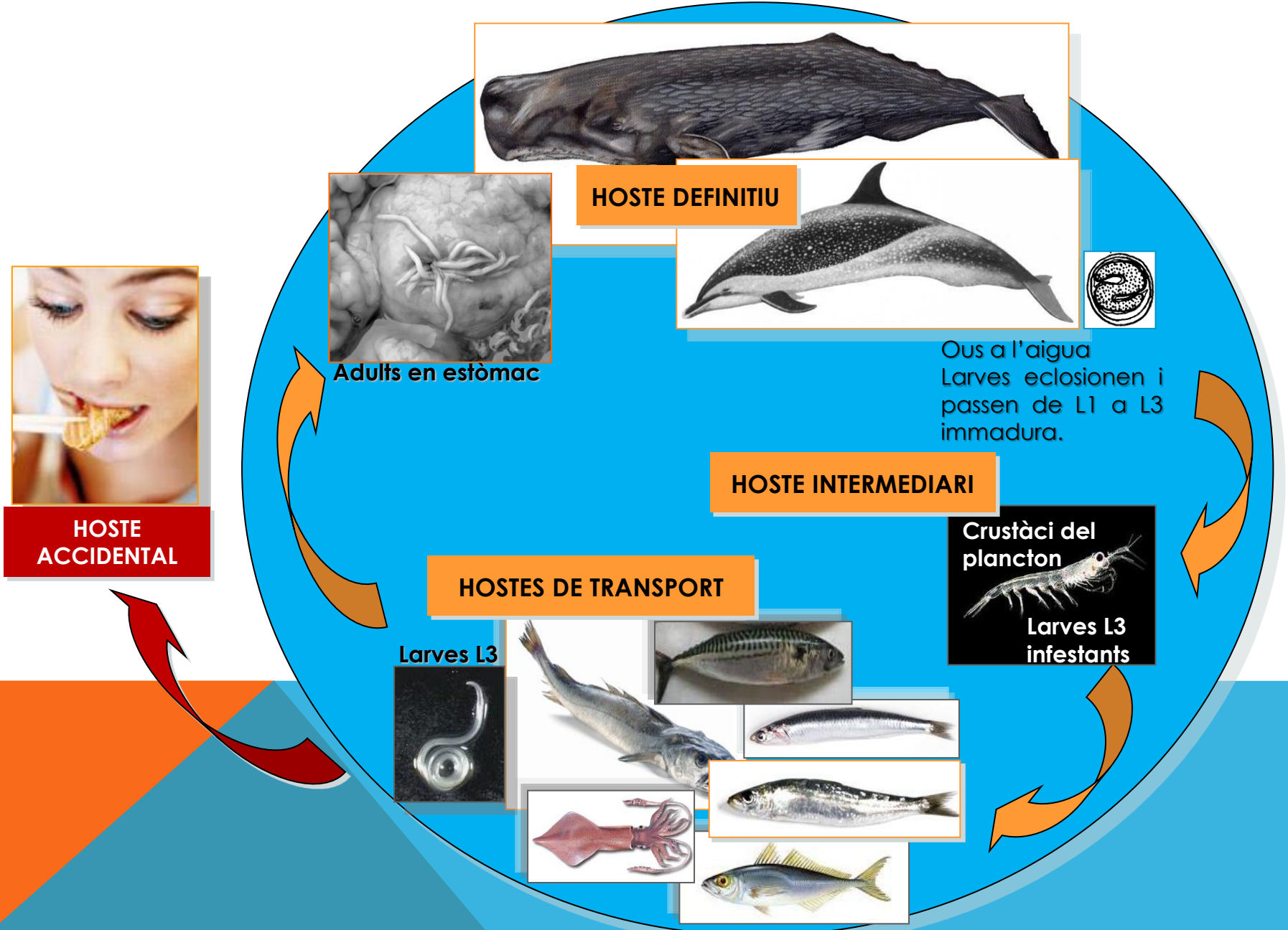


Mamífers marins { Gènere *Anisakis* Dujardin, 1845
Mamífers marins { Gènere *Pseudoterranova* Krabbe, 1878
Aus piscívores { Gènere *Contracaecum* Railliet y Henry, 1913

Família Raphidascarididae

Peixos teleostis { Gènere *Hysterothylacium* Ward y Magath, 1917

CICLE BIOLÒGIC ANISAKIS SIMPLEX



INCIDÈNCIA DE L'ANISAKIOSI

Principals espècies causants:

- *Anisakis simplex*
- *Pseudoterranova decipiens*

Primer cas a Europa,
Holanda (1960)



Primer cas a Estats
Units (1975)



Primer cas a
Espanya (1991)



90% dels casos
documentats a Japó

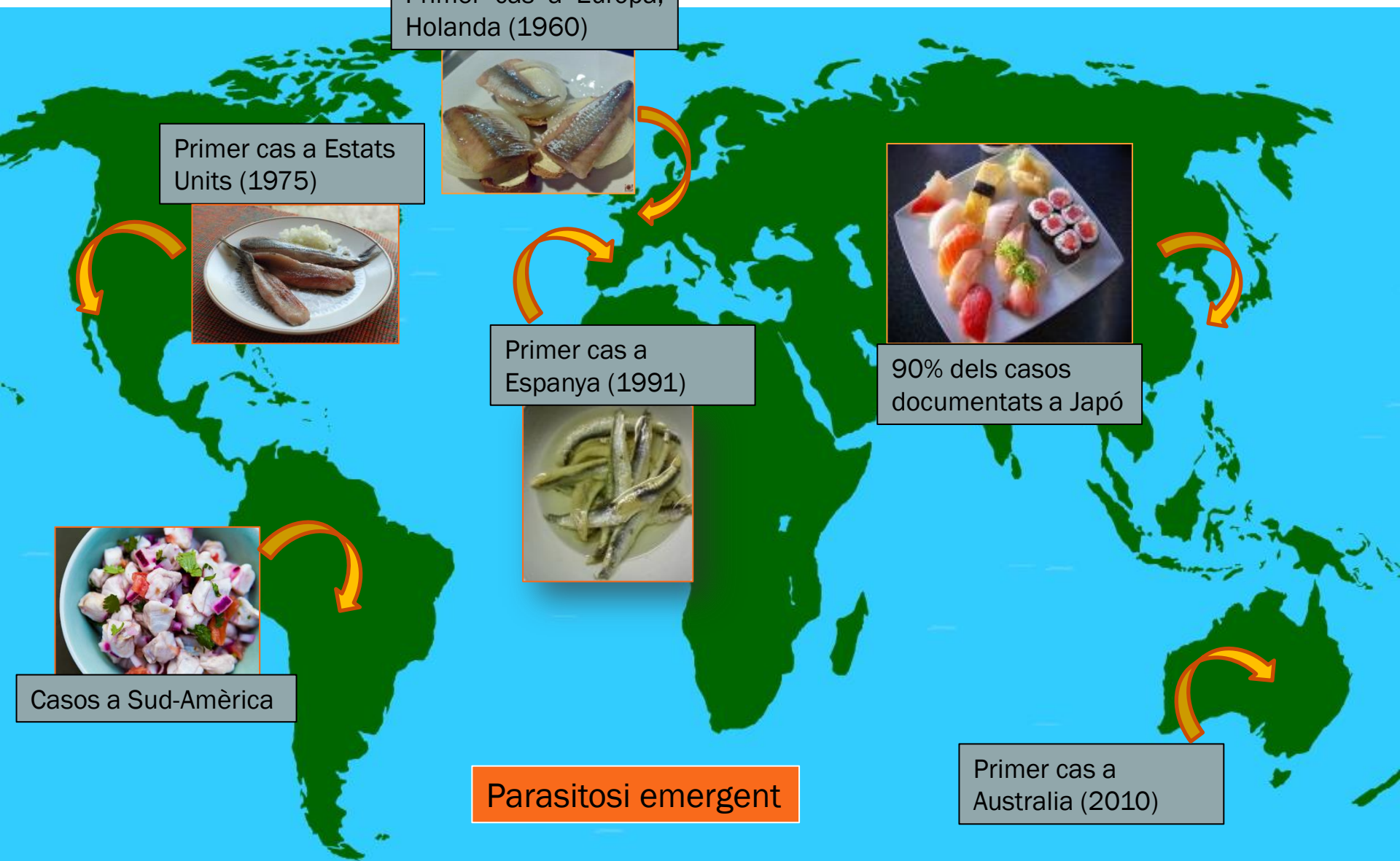


Casos a Sud-Amèrica



Parasitosi emergent

Primer cas a
Australia (2010)



SIMPTOMATOLOGIA DE L'ANISAKIOSI HUMANA

GASTRO-INTESTINAL:

■ Gàstric

- 6-12h després de la ingestió
- Dolor abdominal, nàusees, vòmits
- Extracció mecànica de la larva

■ Intestinal

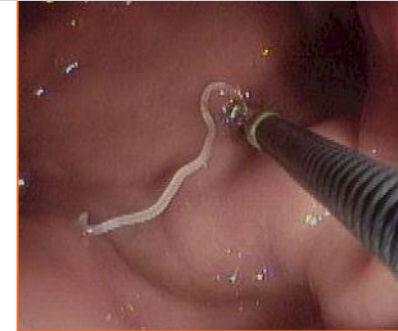
- 48-72h després de la ingestió
- Reaccions inflamatòries severes
- Extracció quirúrgica

REACCIONS AL·LÈRGIQUES

- Urticària, angioedema, anafilaxi
- Detecció d'anticossos IgE



Secció transversal d'una larva d'*Anisakis* a la submucosa de la paret intestinal



ESPÈCIES DE PEIX I CEFALÒPODES DE CONSUM PARASITATS PER ANISÀKIDS

Gadiformes	Merlucciidae	Merluza, pescadilla (<i>Merluccius</i> sp)
	Gadidae	<u>Bacalao</u> (<i>Gadus morhua</i>), merlán, liba, bacalada (<i>Merlangius merlangius</i>), <u>bacaladilla</u> (<i>Micromesistius poutassou</i>), <u>abadeio</u> (<i>Pollachius pollachius</i>), carbonero (<i>Pollachius virens</i>), <u>faneca</u> (<i>Trisopterus luscus</i>), capellán (<i>Trisopterus minutus capelanus</i>), brótola (<i>Phycis</i> sp), maruca (<i>Molva molva</i>), bertorella (<i>Molva blennoides</i>), palo (<i>Molva dipterygia</i>)
Perciformes	Scombridae	Caballa, verdel (<i>Scomber scombrus</i>)
	Serranidae	Cabra (<i>Serranus cabrilla</i>), serrano (<i>Serranus scriba</i>)
	Mullidae	<u>Salmonete de fango</u> (<i>Mullus barbatus</i>), salmonete de roca (<i>Mullus surmuletus</i>)
	Sparidae	Besugo (<i>Pagellus cantabricus</i>), pargo (<i>Sparus pagrus</i>), boga de mar (<i>Boops boops</i>)
	Thunnidae	Atún (<i>Thunnus thynnus</i>), melva (<i>Auxis thazard</i>)
	Carangidae	<u>Jurel</u> , chicharro (<i>Trachurus trachurus</i>), palometa blanca (<i>Trachynotus glaucus</i>)
	Bramidae Trichiuridae	Palometa, japuta, besugo negro (<i>Brama brama</i>) Pez sable (<i>Trichiurus lepturus</i>)
Clupeiformes	Salmonidae	Salmón (<i>Salmo salar</i>)
	Clupeidae	<u>Sardina</u> (<i>Sardina pilchardus</i>), <u>arenque</u> (<i>Clupea harengus</i>)
	Engraulidae	<u>Boquerón</u> (<i>Engraulis encrasicolus</i>)
Pleuronectiformes	Pleuronectidae	Platija (<i>Platichthys flessus</i>), solla de altura (<i>Pleuronectes platessa</i>), fletán (<i>Hippoglossoides</i> sp)
	Soleidae	Lenguado (<i>Solea vulgaris</i>)
	Scophthalmidae	<u>Rodaballo</u> (<i>Scophthalmus maximus</i>), gallo (<i>Lepidorhombus</i> sp)
Escorpeniformes	Scorpaenidae	Gallineta (<i>Helicolenus dactylopterus</i>), cabracho (<i>Scorpaena scrofa</i>)
	Triglidae	Rubio (<i>Trigloporus lastoviza</i>)
Bericiformes	Berycidae	Palometa roja (<i>Beryx decadactylus</i>)
Lophiiformes	Lophiidae	<u>Rape</u> (<i>Lophius piscatorius</i>)
Anguilliformes	Congridae	<u>Congrio</u> (<i>Conger conger</i>)
Dibranchia	Loliginidae	Calamar (<i>Loligo vulgaris</i>)
	Octopodidae	Pulpo (<i>Octopus vulgaris</i>)
	Sepiidae	Sepia (<i>Sepia</i> sp)

Anisakis spp. En totes les espècies

Pseudoterranova spp. —

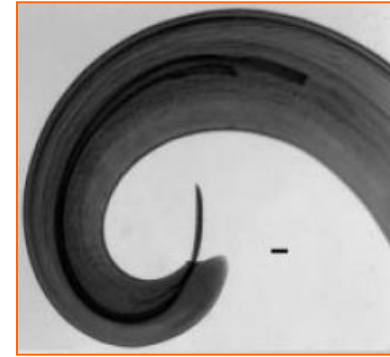
Contracaecum spp. —

Hysterothylacium spp. —

IDENTIFICACIÓ D'ESPÈCIES D'ANISÀKIDS

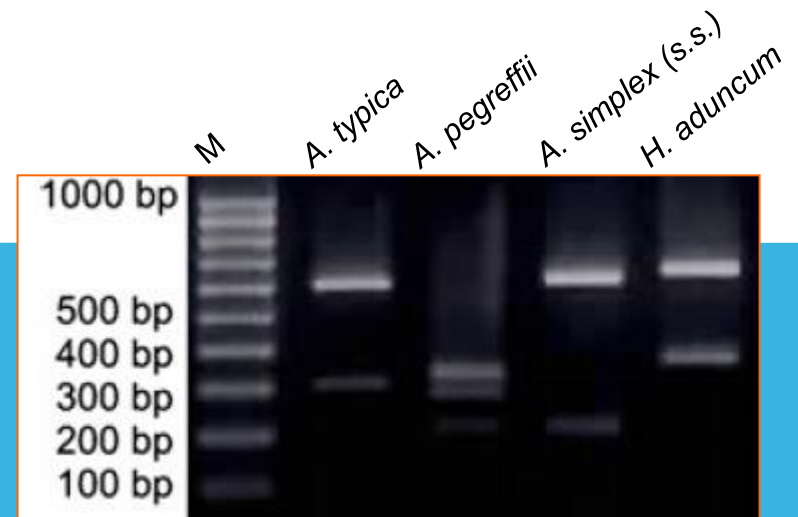
Criteris morfològics

- A nivell d'adult: papil·les caudals i espícules (mascles)
posició vulva (femelles)
- A nivell larvari: anatomia del tracte digestiu superior (esòfag y ventricle);
regió caudal



Mètodes moleculars

- Estudi d'aloenzims MAE (*Multilocus allozyme eletrophoresis*)
- PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) de la regió ITS
- PCR-SSCP (*Single strand conformational polymorphism*) de la regió ITS
- PCR i seqüenciació del DNA:
 - Regió ITS-1 i ITS-2
 - Cytochromoxidasa b mitocondrial (mtDNA cytb)
 - Cytochromoxidasa 2 mitocondrial (mtDNA cox2)



PCR-RFLP utilitzant *HinfI*

ESPÈCIES D'ANISAKIS

Tipus I (mucró caudal)

- *A. simplex* (s.l.) (*sensu latum*): delfínids de l'hemisferi Nord i Sud

Complex d'espècies:

- *A. simplex* (s.s.) (*sensu stricto*): Atlàntic Nord principalment
 - *A. pegreffii*: Mediterrani principalment
 - *A. berlandi*: regions australs i Pacífic boreal
- *A. typica*: delfínids de climes càlids (Atlàntic i Mediterrani)
 - *A. ziphidarum*: balenes (Ziphiidae) del Mediterrani i Atlàntic Sud-Est



Tipus II (absència mucró caudal)

- *A. physeteris*: catxalots (Atlàntic i Mediterrani)
- *A. brevispiculata*: catxalots pigmeus (Sud-Àfrica i Atlàntic Nord-Est)
- *A. paggiae*: catxalots pigmeus (Mediterrani i Atlàntic)



ESPÈCIES DE *PSEUDOTERRANOVA*

■ *P. decipiens*

Complex d'espècies que parasita pinnípedes a tot el món:

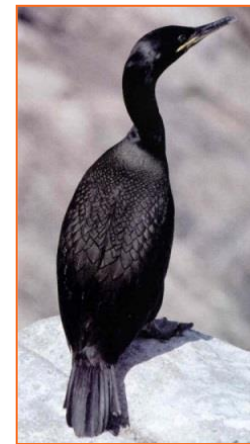
- *P. decipiens* (s.s.). Afegir hostes Àrtic i subàrtic, Atlàntic Nord-Est i Pacífic
- *P. krabbei*. Foca comú i gris. Atlàntic Nord-Est
- *P. bulbosa*. Foca barbuda. Mar de Noruega i Barents, Atlàntic Nord-Oest i mar de Japó
- *P. azarasi*. Lleó marí. Costes del Pacífic (Japó)
- *P. cattani*. Lleó marí. Costes Xilenes



ESPÈCIES DE CONTRACAECUM

Paràsits de pinnípedes i aus piscívores

- ***C. osculatum***. Complex de 5 espècies, tres àrtiques (*C. osculatum* A, *C. osculatum* B i *C. osculatum* C) i 2 antàrtiques (*C. osculatum* D i *C. osculatum* E)
- *C. ogmorhini*. Complex de 2 espècies, *C. ogmorhini* (s.s.) a la regió Austral i *C. margolisi* a la regió Boeral
- Altres espècies:
 - *C. osculatum baicalensis*, *C. radiatum* i *C. mironga*



ESPÈCIES D'*HYSTEROOTHYLACIUM*

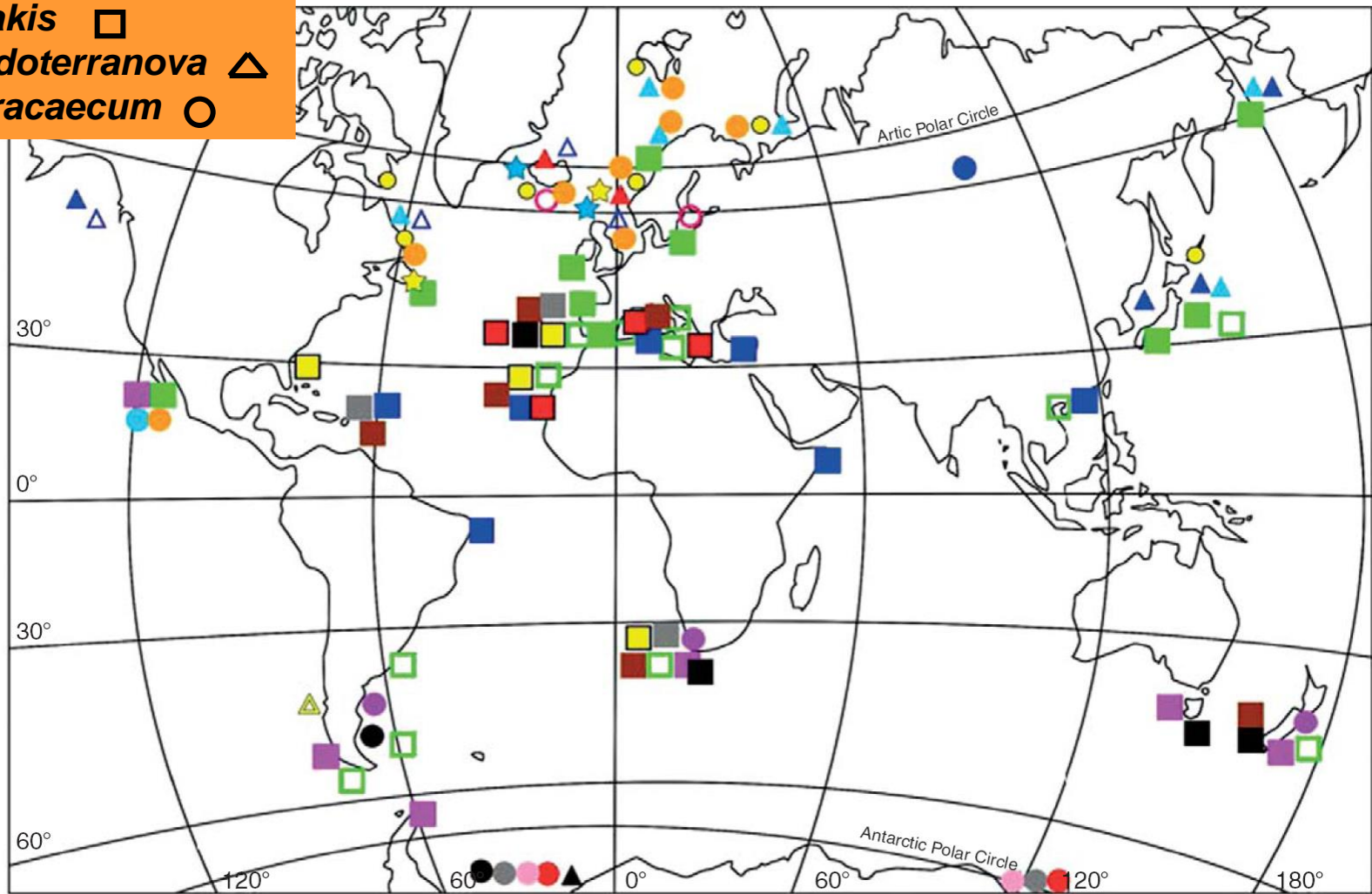
Els adults són paràsits de peixos teleostis

- *H. aduncum*. Principalment peixos clupeids a l'Atlàntic Nord
- Altres espècies, sobretot a l'Atlàntic.
 - *H. gadi*, *H. rigidum*, *H. cornutum*, *H. fabri*. (Mediterrani)
 - *H. haze* (Japó)




DISTRIBUCIÓ GEOGRÀFICA D'ESPÈCIES D'ANISAKIDS

Anisakis □
Pseudoterranova △
Contraecum ○



- *A. pegreffii* □ *A. simplex* (s.s.) □ *A. simplex* C □ *A. typica* □ *A. physeteris* □ *A. brevispiculata* □ *A. ziphidarum* □ *A. paggiae* □ *Anisakis* sp.
- *C. osculatum* (s.s.) ● *C. osculatum* A ● *C. osculatum* B ● *C. o. baicalensis* ● *C. osculatum* D ● *C. osculatum* E ● *C. radiatum* ● *C. mirounga* ● *C. ogmorhini* (s.s.) ● *C. margolisii*
- △ *P. decipiens* (s.s.) ▲ *P. krabbei* ▲ *P. bulbosa* ▲ *P. azarasi* ▲ *P. decipiens* E ▲ *P. cattani*
- ★ *Ph. phocae* ★ *Ph. cystophorae*

ESTUDI DELS ANISAKIDS EN PEIXOS DE CONSUM HABITUAL AL NOSTRE ENTORN

- Prevalença i intensitat de parasitació
 - Distribució de les larves a les diferents parts del peix
 - Caracterització morfològica i molecular
- 

PEIXOS ESTUDIATS

- *Trachurus trachurus* (Perciformes, Carangidae)



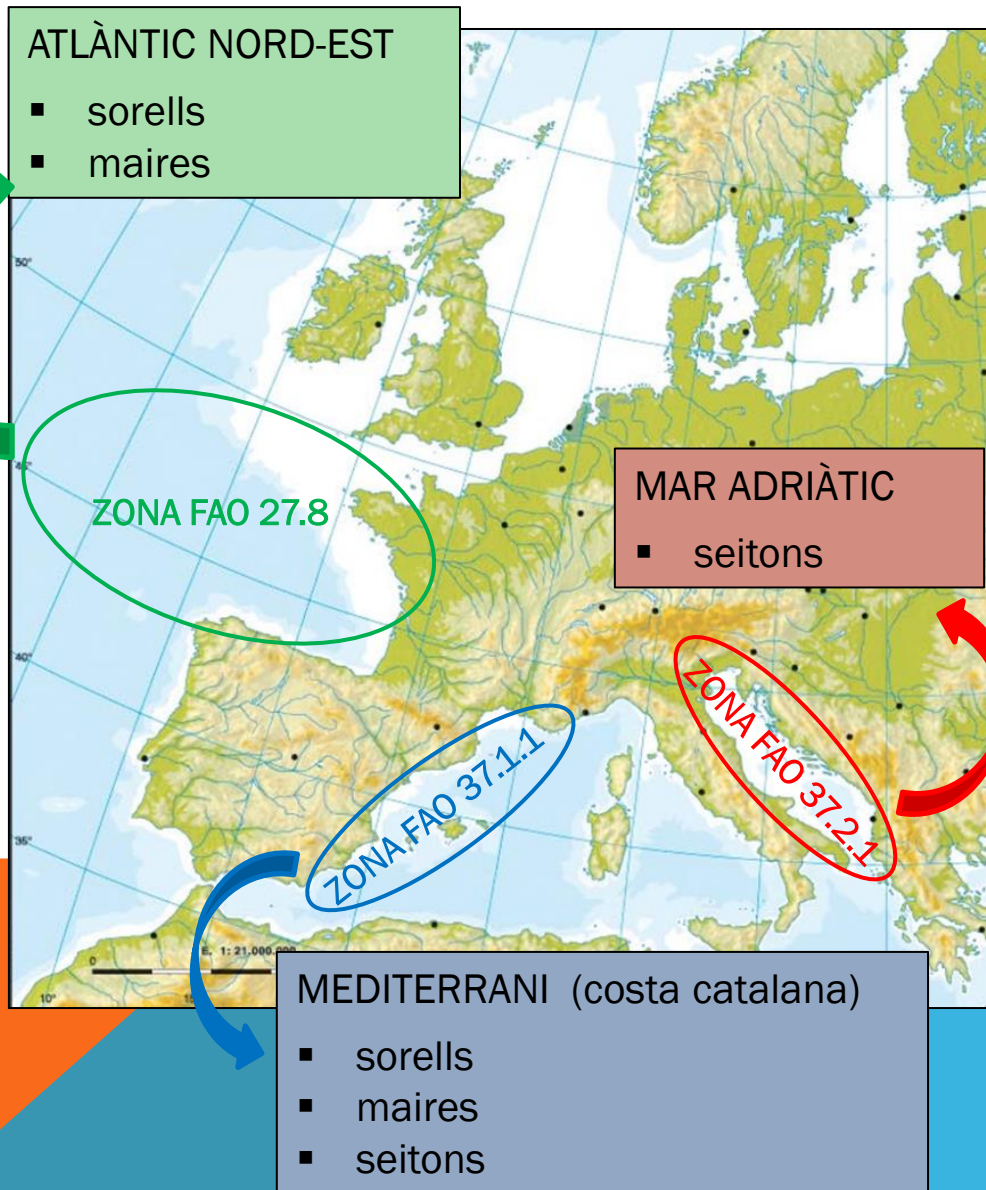
- *Micromesistius poutassou* (Gadiformes, Gadidae)



- *Engraulis encrasicolus* (Clupeiformes, Engraulidae)



PROCEDÈNCIA DEL PEIX ESTUDIAT



Adquisició en mercats i comerços de Barcelona



ESPÈCIES D'ANISÀKIDS DETECTADES

Gènere *Anisakis*:

- *A. simplex* (s.l.) / larves de tercer estadi (L3)
- *A. physeteris* / larves de tercer estadi (L3)

Gènere *Hysterothylacium*:

- *H. aduncum* / larves de tercer estadi (L3)
- *H. fabri* / larves de quart estadi (L4)



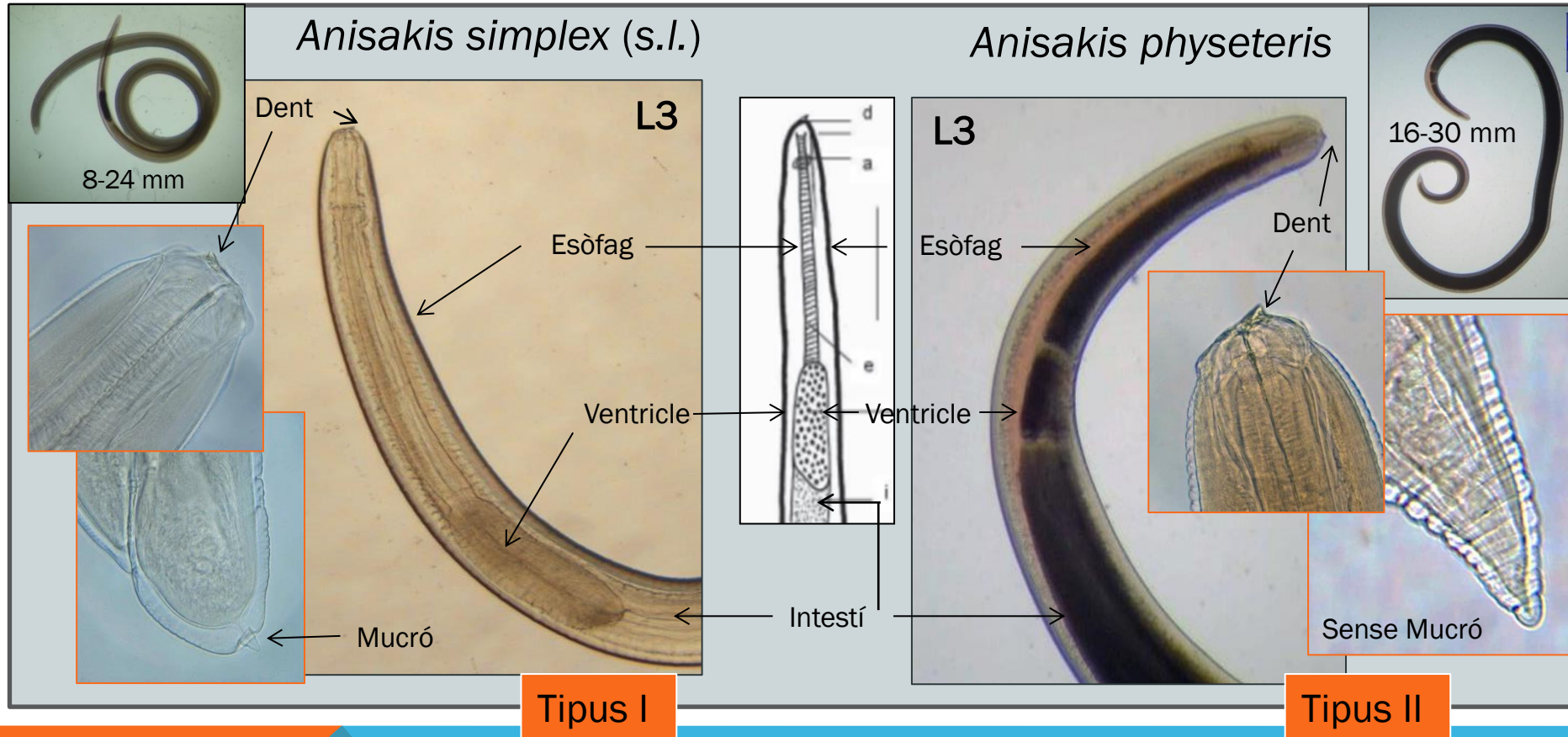
Larva d'*Anisakis* L3

Aïllament larves:

- Dissecció en fresc
- Digestió enzimàtica



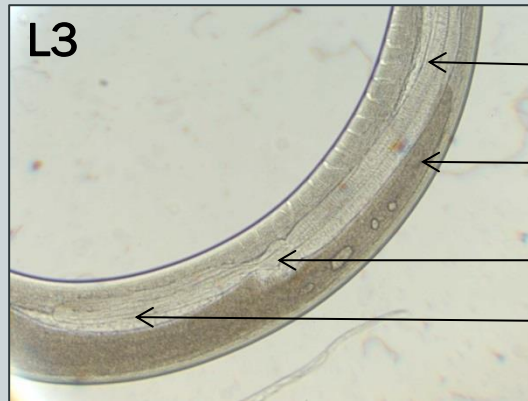
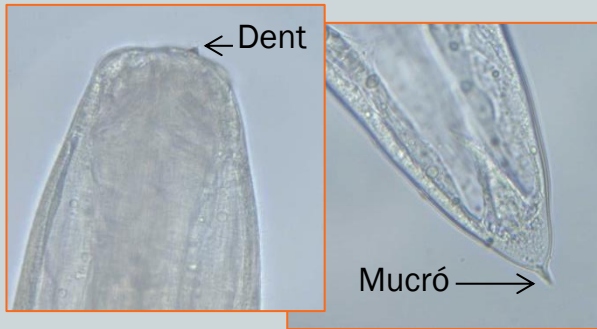
CARACTERITZACIÓ MORFOLÒGICA DE LARVES D'ANISAKIS



Observació al microscopi
Clarificació amb lactofenol

CARACTERITZACIÓ MORFOLÒGICA DE LARVES D'*HYSTEROETHYLACIUM*

Hysterothylacium aduncum

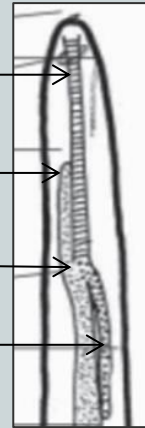


Esòfag

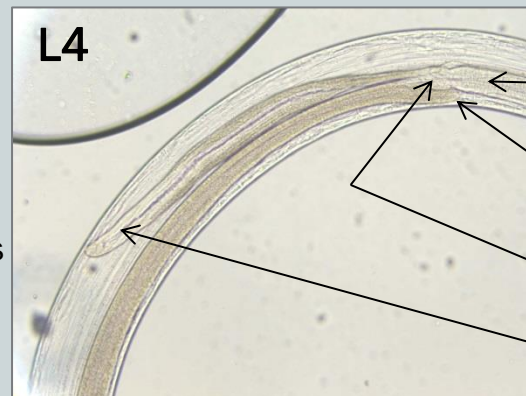
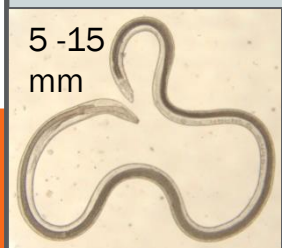
Cec intestinal

Ventricle

Apèndix ventricular



Hysterothylacium fabri

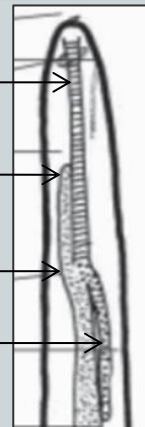


Esòfag

Cec intestinal

Ventricle

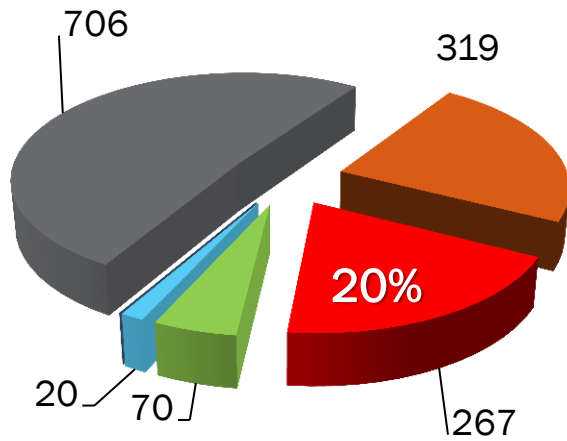
Apèndix ventricular



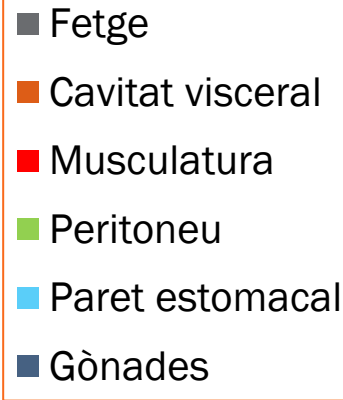
Observació al microscopi
Clarificació amb lactofenol

LOCALITZACIÓ DE LES LARVES D'*ANISAKIS SIMPLEX* (S.L.) EN EL PEIX

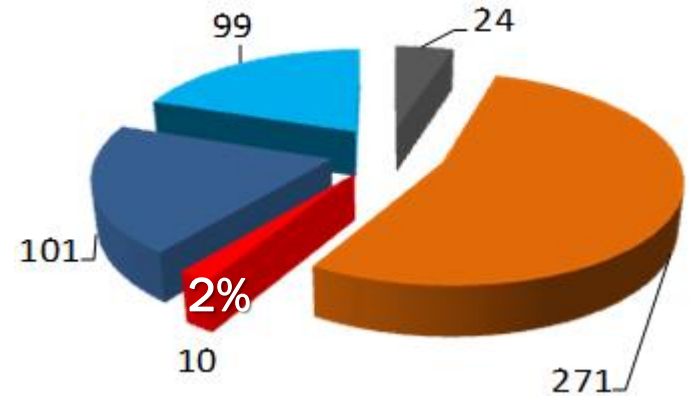
Maire Atlàntic



Número de larves detectades

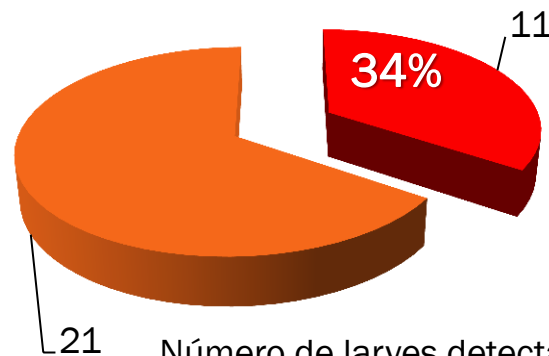


Sorell Atlàntic



Número de larves detectades

Seitó Adriàtic



Número de larves detectades

CULTIU *IN VITRO* DE LARVES L3

Medi de cultiu: RPMI-1640 + SBF (20% v/v) + pepsina (0,25% p/v); pH 4

Anisakis simplex (s.l)

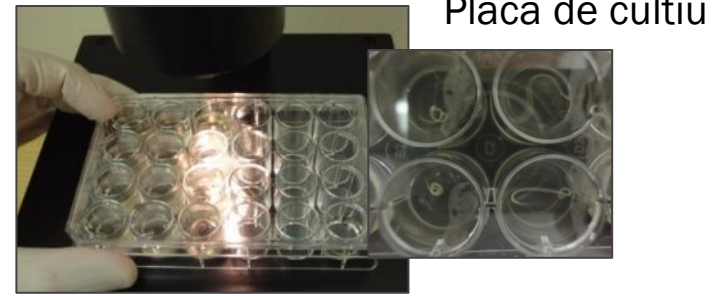
Condicions de cultiu: 37°C i 5% CO₂
Obtenció larves L4



Muda al medi



Llavis



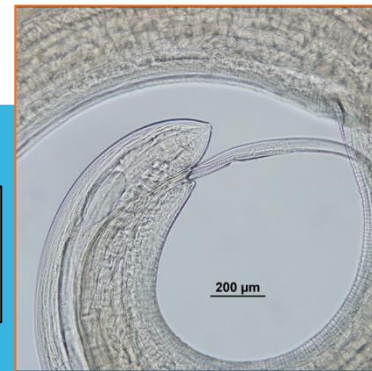
Placa de cultiu

Hysterothylacium aduncum

Condicions de cultiu: 13°C
Obtenció larves L4 i adults



Extrem caudal amb cactus



Mascle amb espícula



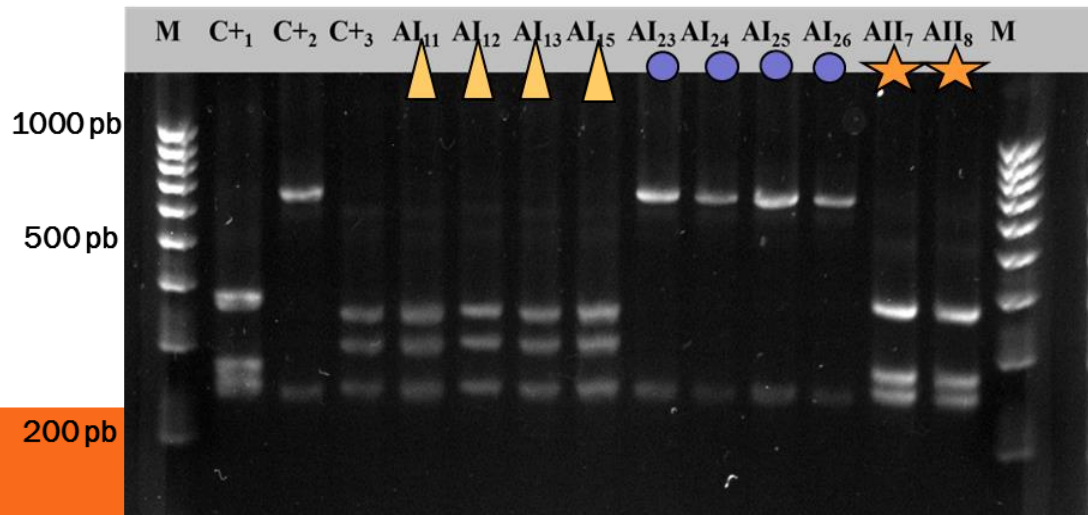
Femella: úter amb ous

Estudi morfomètric de larves *Anisakis*
Estudi de morfotips de larves *Hysterothylacium*

IDENTIFICACIÓ ESPECÍFICA DE LARVES D'ANISAKIS

PCR-RFLP de la regió ITS-1 i ITS-2 del DNA ribosomal

- Larves L3 d'*Anisakis* procedents de diferents localitats i peixos, i de cultiu *in vitro*
 - *Anisakis simplex* (s.l.) L3 i L4
 - *Anisakis physeteris* L3



A. simplex (s.l.):

● *A. simplex* (s.s.)
(620, 250, 80 pb)

▲ *A. pegreffii*
(370, 300, 250 pb)

★ *A. physeteris*
(380, 290, 270 pb)

PCR-RFLP; patrons en gel d'agarosa amb l'enzim *HinfI*

DISTRIBUCIÓ D'ESPÈCIES D'ANISAKIS EN PEIXOS I ZONES GEOGRÀFIQUES ESTUDIATS

- *Anisakis simplex* (s.s.)
- ▲ *Anisakis pegreffii*
- ▲ *Híbrids A. simplex* (s.s.)/ *A.pegreffii*
- ★ *Anisakis physeteris*

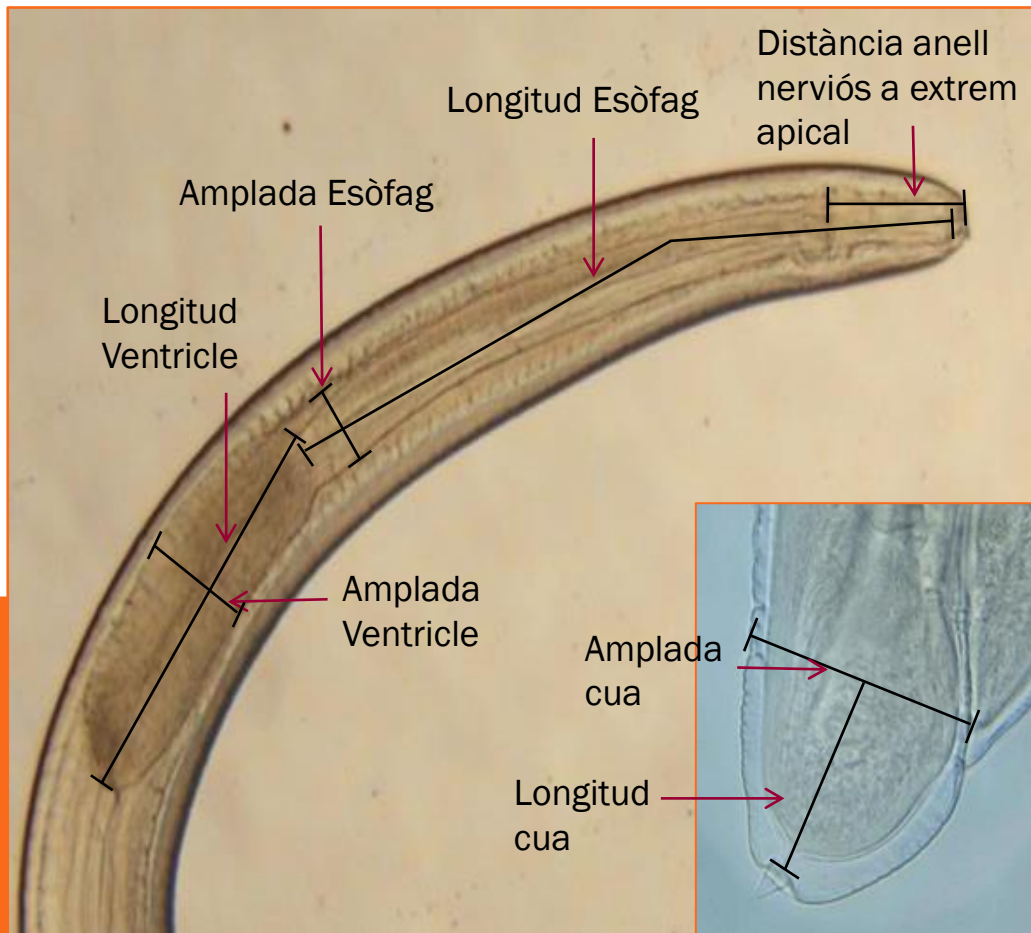


Zona
d'hibridació

ESTUDI MORFOMÈTRIC DE LARVES D'ANISAKIS

A. pegreffii - *A. simplex* (s.s.)

- L3 (maires Atlàntic)
- L4 obtingudes per cultiu *in-vitro*



Principals paràmetres morfomètrics

- Longitud total
- Amplada màxima
- Longitud i amplada
 - Esòfag
 - Ventricle
- Distància anell nerviós a extrem apical
- Extrem caudal: Longitud i amplada

ANÀLISI MORFOMÈTRICA DE LARVES L3 I L4

A. pegreffii - *A. simplex* (s.s.)

	L3		L4	
	<i>A. pegreffii</i> (n= 45)	<i>A. simplex</i> (s.s.) (n= 29)	<i>A. pegreffii</i> (n= 24)	<i>A. simplex</i> (s.s.) (n= 45)
	Mitjana	Mitjana	Mitjana	Mitjana
Longitud total	16,97	17,70	22,60	22,98
Amplada màxima	0,45	0,45	0,51	0,51
Distància anell nerviós extrem apical	0,26	0,26	0,41	0,40
Longitud Ventricle	0,87	0,92	0,86	0,94
Amplada Ventricle	0,26	0,25	0,25	0,21
Longitud Esòfag	1,78	1,97	2,55	2,64
Amplada Esòfag	0,14	0,14	0,20	0,20
Longitud Cua	0,09	0,09	0,13	0,14
Amplada cua	0,13	0,13	0,15	0,16
Longitud Esòfag/ Longitud total(%)	10,7	11,25	11,48	11,87
Longitud Ventricle/ Longitud total(%)	5,2	5,25	3,82	4,15
Longitud Esòfag/ Longitud Ventricle	2,1	2,14	3,02	2,87
Longitud Ventricle/ Amplada Ventricle	3,3	3,73	3,48	4,46

DISCRIMINACIÓ MORFOMÈTRICA

A. pegreffii - *A. simplex* (s.s.)

- Model Lineal Generalitzat (GLM), utilitzant regressió logística binària
- Paràmetres morfomètrics com a predictors d'una funció discriminant
- Les dues espècies poden ser diferenciades amb una probabilitat del 78,4% per a larves L3 i del 82,6% per a larves L4

ESTUDI DE MORFOTIPS DE LARVES D'*HYSTEROETHYLACIUM*

- Es coneixen 16 tipus de morfotips larvaris distribuïts mundialment
- Principals estructures morfològiques estudiades: llavis/dent; relació apèndix ventricular/cec intestinal; extrem caudal (mucró/cactus)

H. fabri (L3)

Morfotip III

H. fabri (L4)

Morfotip IV

H. aduncum (L3)

Morfotip VIII

H. aduncum (L4)

Morfotip IX

IDENTIFICACIÓ ESPECÍFICA DE LARVES D'*HYSTEROETHYLACIUM*

PCR-Següenciació de la regió ITS-1 i ITS-2 del DNA ribosomal

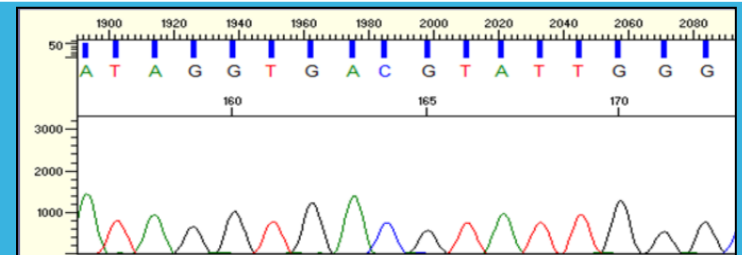
ITS-1 431 pb  *Hysterothylacium aduncum*
ITS-2 347 pb

ITS-1 438 pb  *Hysterothylacium fabri* ??
ITS-2 343 pb

- Confirmació de la presència d'*H. aduncum* al Mediterrani i l'Atlàntic Nord-Est
- Descripció de morfotips a les regions estudiades

```
>ITS-1
Type III (MF693070) ATCGAGCTAAGACGAAAAGTCTCCGAACGTGCATGCCTTCCATATGCGCGTATACGTGAGCCGCACA
Type IV (MF693071) .....
Type IV (MF693072) .....
Type VIII (MF693073) .....T.....
Type VIII (MF693074) .....T.....
Type VIII (MF693075) .....T.....
Type VIII (MF693076) .....T.....
Type VIII (MF693077) .....T.....
Type VIII (MF693078) .....T.....
Type IX (MF693079) .....T.....
```

Alineació de l'inici de la seqüència ITS-1 de diferents morfotips



Lectura de la regió ITS-1 utilitzant el programa Clustal X