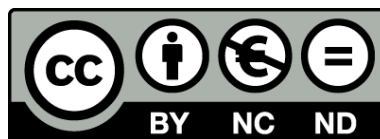




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**Desarrollo y Evaluación de técnicas de PCR  
en tiempo real para la detección y cuantificación  
de *Anisakis* (Nematoda, Anisakidae) en pescado  
y productos procesados**

Carla Godínez González



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO  
REAL PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *ANISAKIS*  
(NEMATODA, ANISAKIDAE) EN PESCADO Y PRODUCTOS  
PROCESADOS

Carla Godínez González  
Barcelona, 2019



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *ANISAKIS* (NEMATODA, ANISAKIDAE) EN  
PESCADO Y PRODUCTOS PROCESADOS

Memoria presentada por Carla Godínez González para optar al título de doctor por la  
Universitat de Barcelona

Directoras de la tesis: Roser Fisa Saladrigas e Isabel de Montoliu Sanllehy

Doctoranda: Carla Godínez González

Tutora: Roser Fisa Saladrigas

Carla Godínez González  
Barcelona, 2019





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, tengo que agradecer a mis directoras de tesis, Dras. Roser Fisa e Isabel de Montoliu de la sección de Parasitología del Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente, por la dedicación y apoyo que me han brindado, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección que han dado a las mismas, gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a esta facultad. Agradezco a la Dra. María Izquierdo, coordinadora del Programa de Doctorado en Alimentación y Nutrición por aceptarme como doctoranda y por su apoyo y orientación. Gracias al Dr. Daniel López Codina, docente e investigador de la Universidad Politécnica de Cataluña, por su asesoría matemática. Además, deseo expresar mi agradecimiento a las técnicas de laboratorio de Parasitología Roser Adalid, Silvia Tebar y Carmen Guillén; a Àngels Barceló, secretaria de Estudios de Doctorado de la Facultad; a Lucía Muñoz, secretaria de la Sección de Parasitología; así como al personal de la Unidad de Genómica del CCiTUB, especialmente a Elia Diestra, Amaya Amador y Ramón Seminago, por su apoyo profesional y humano. Agradezco también a todos mis compañeros de laboratorio Beatriz Cancino, Xavier Roca, Cristina Ballart, Anna Fernández, Magdalena Alcover y Diana Berenguer por compartir triunfos y sinsabores. Gracias a mi familia por el tiempo que me han concedido, un tiempo robado a la historia familiar. Gracias a mis amigos, que siempre me han acompañado en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión. Pero, sobre todo, gracias a Fanny Zamora, por su paciencia, comprensión y solidaridad con este proyecto; sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, esta tesis es también suya. A todos, muchas gracias.

*Y con ciencia se llenarán las cámaras  
de todo bien preciado y agradable.*

Proverbios 24:4

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos 2014 SGR 1214, 2018 SGR 1008 de la Generalitat de Catalunya y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (número de beca 383879).



Con todo mi ser y justo orgullo le entrego esta tesis a mi madre Carmen González Piña y a mi hermano Mauricio Godínez González.

A mi abuelita Martha Piña Zarazua.

A mis tías: Claudia, Cintya, Clara y Gris. A mis tíos: Marco y Javier.

A mis primos: Andrea, Marco, Eduardo, Távata, David, Rodrigo, Pamela, Maité y Rebeca.

A mis ángeles que están siempre ahí cuidándome: mi abuelito, mi estrella más grande, Carlos González Larraguivel, Juanita Zarazua, Eduardo Campos y Pepe Piña.

A mi buen consejo, Juan Hernández Ortiz.

A mis amigos, los de allá: Juan Capulín, Isis y las hermanas Benavides, y los de acá: Roser, Paul, Mary, Fernanda Carmela, Jessy y JuanCa.

A mi chaparrita, Fanny Zamora... *¿Dudas tú que el mar deje de llevar en su alma la sal?*

¡La vida ha sido suficientemente generosa al regalarme un tesoro como ustedes!



# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Aspectos generales de <i>Anisakis</i> .....	7
1.1.1 Clasificación taxonómica.....	7
1.1.2 Ciclo biológico.....	9
1.1.3 Identificación.....	11
1.1.4 Distribución geográfica.....	14
1.2 Importancia sanitaria.....	16
1.2.1 Epidemiología de la anisakiosis.....	16
1.2.2 Anisakiosis gástrica e intestinal.....	17
1.2.3 Anisakiosis alérgica.....	18
1.3 <i>Anisakis</i> en la cadena agroalimentaria.....	20
1.3.1 Presencia en pescado fresco y productos derivados.....	20
1.3.2 Control y prevención.....	22
1.4 Técnicas para la detección de <i>Anisakis</i> en pescado y productos derivados.....	25
1.4.1 Métodos basados en la inspección visual.....	25
1.4.2 Método por diferencia de conductividad.....	27
1.4.3 Métodos inmunológicos.....	27
1.4.4 Métodos proteómicos.....	28
1.4.5 Métodos moleculares.....	28
1.5 Tratamientos para la inactivación de larvas de <i>Anisakis</i> en el pescado.....	30
1.5.1 Congelación.....	30
1.5.2 Tratamiento térmico.....	30
1.5.3 Altas presiones.....	31
1.5.4 Electrocutión.....	31
II. OBJETIVOS.....	33
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
3.1 Aspectos generales helmintológicos.....	39

3.1.1 Pescados analizados y obtención de larvas de nematodos .....	39
3.1.2 Identificación morfológica de las larvas .....	39
3.2 Estandarización de técnicas SYBR Green qPCR para la detección y cuantificación de anisákidos .....	41
3.2.1 Larvas de nematodos .....	41
3.2.2 Matrices alimentarias .....	41
3.2.3 Métodos de extracción de ADN .....	41
3.2.4 Sistema binario: matriz alimentaria contaminada experimentalmente con larvas.....	42
3.2.5 PCR-RFLP .....	43
3.2.6 SYBR Green qPCR .....	43
3.2.7 Análisis estadístico .....	44
3.3 Detección y cuantificación de <i>Anisakis</i> en alimentos procesados mediante qPCR empleando SYBR Green y sondas TaqMan .....	45
3.3.1 Larvas de nematodos .....	45
3.3.2 Sistema binario: matriz alimentaria contaminada experimentalmente con larvas.....	45
3.3.3 Muestras de alimentos de pescado procesado .....	45
3.3.4 Extracción de ADN .....	46
3.3.5 QCYTCII SYBR Green qPCR .....	46
3.3.6 QCYTCII TaqMan qPCR.....	46
3.3.7 Análisis estadístico .....	47
3.4 Optimización de un modelo descriptivo basado en SYBR Green qPCR para la cuantificación de larvas de <i>Anisakis</i> en pescado .....	47
3.4.1 Larvas de <i>A. simplex</i> (s.l.) .....	47
3.4.2 Contaminación experimental de pescado y procesamiento de las muestras .....	47
3.4.3 Muestras de pescado comercial.....	48
3.4.4 Extracción de ADN .....	48
3.4.5 QCYTCII SYBR Green qPCR.....	48
3.4.6 Análisis estadístico.....	49
3.5 Estudio de la carga parasitaria de larvas de <i>Anisakis</i> en boquerones por inspección visual y aplicando el modelo descriptivo basado en SYBR Green qPCR .....	49
3.5.1 Pescado analizado .....	49
3.5.2 Inspección visual .....	49
3.5.3 Tratamiento de las muestras de pescado comercial.....	50
3.5.4 Extracción de ADN .....	50
3.5.5 Cuantificación molecular de larvas de <i>Anisakis</i> .....	50
3.5.6 Análisis estadístico.....	50

IV. RESULTADOS.....	51
4.1 Development of SYBR Green qPCR techniques for the detection and quantification of anisakid nematodes.....	53
4.1.1 Abstract .....	53
4.1.2 Background .....	54
4.1.3 Results .....	55
4.1.4 Discussion .....	62
4.2 Detection of <i>Anisakis</i> nematode parasites in commercial fish-derived food: quantitative SYBR Green and TaqMan qPCR techniques .....	66
4.2.1 Abstract .....	66
4.2.2 Background .....	67
4.2.3 Results .....	68
4.2.4 Discussion .....	72
4.3 Optimization of a descriptive model for <i>Anisakis</i> larval quantification in fish using SYBR Green PCR .....	75
4.3.1 Abstract .....	75
4.3.2 Background .....	76
4.3.3 Results .....	76
4.3.4 Discussion .....	81
4.4 Detection and quantification of <i>Anisakis</i> larvae in European anchovy ( <i>Engraulis encrasicolus</i> ) from the Northeast Atlantic: a comparison between a SYBR Green qPCR-based descriptive model and visual inspection .....	84
4.4.1 Abstract .....	84
4.4.2 Background .....	85
4.4.3 Results .....	85
4.4.4 Discussion .....	87
V. DISCUSIÓN GENERAL .....	89
VI. CONCLUSIONES .....	101
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	105
VIII. ANEXOS.....	127
ANEXO 1. International Journal of Food Microbiology 261 (2017) 89-94 .....	129
ANEXO 2. Journal of Agricultural and Food Chemistry 67 (2019) 11279-11280. ....	135
ANEXO 3. Annals of Nutrition and Metabolism 73, S2 (2018) 78.....	137





## RESUMEN

Los anisákidos del género *Anisakis* constituyen un grupo de nematodos de gran interés sanitario. Su distribución geográfica es muy amplia, parasitando a mamíferos marinos como hospedadores definitivos y en su forma larvaria a una gran diversidad de peces de consumo habitual como hospedadores paraténicos. El hombre actúa como hospedador accidental cuando ingiere pescado parasitado crudo o poco cocinado, pudiendo presentar patología gastrointestinal, además de reacciones alérgicas. Por todo ello, es importante desarrollar métodos de detección eficaces que permitan preservar la calidad e inocuidad del pescado y productos derivados.

Para la detección y cuantificación de anisákidos se optimizaron técnicas de SYBR Green qPCR, usando los cebadores ANIKIT y QCYTCII que amplifican un fragmento de ITS-1 y Cox-2, respectivamente; asimismo se ensayaron los cebadores QCYTCII con sonda TaqMan. Las larvas utilizadas en los ensayos de optimización fueron aisladas de pescado adquirido en comercios de Barcelona, bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) y rape (*Lophius piscatorius*) del Atlántico NE y jurel (*Trachurus trachurus*) del Mediterraneo Oeste (costa Catalana). Éstas fueron caracterizadas morfológicamente como larvas de tercer estadio (L3) de *Anisakis simplex* sensu lato (n=510), *Anisakis physeteris* (n=3), *Hysterothylacium* sp. (n=283) y *Pseudoterranova* sp. (n=1). Larvas del complejo *A. simplex* (s.l.) fueron analizadas por PCR-RFLP para identificar las especies gemelas *Anisakis simplex* sensu stricto (n=10) y *Anisakis pegreffii* (n=5).

Para el análisis molecular de las muestras, larvas, pescado y productos procesados, se optimizó el método de extracción de ADN comparando dos sistemas comerciales, Wizard Genomic DNA Purification y High Pure PCR Preparation Template, obteniéndose mayores concentraciones de ADN con el primer kit ( $P < 0.01$ ). Para los análisis de linealidad, reproducibilidad y sensibilidad de las metodologías de qPCR ensayadas, se construyó un sistema binario, contaminando experimentalmente una matriz alimentaria de derivados de pescado con larvas lisadas de *A. simplex* (s.l.), en concentraciones de  $1,36 \times 10^4$  a  $1,36 \times 10^{-3}$  ng de ADN de *Anisakis* por gramo de matriz. Los estudios de especificidad indicaron que los cebadores ANIKIT amplifican las larvas de *Anisakis* y *Pseudoterranova*, mientras que los cebadores QCYTCII fueron específicos para *Anisakis*. Ninguna de las técnicas empleadas amplificó *Hysterothylacium*. Los tres ensayos optimizados presentaron un comportamiento lineal desde  $1,36 \times 10^4$  a  $1,36 \times 10^{-1}$  ng de ADN de

*A. simplex* (s.l.) por gramo de matriz. El límite de detección mediante análisis PROBIT para ANIKIT y QCYTCII SYBR Green qPCR fue de 0,18 y 0,30 ng/g respectivamente, similar a 0,25 ng/g reportado por QCYTCII TaqMan qPCR, mostrando elevadas sensibilidades. Los resultados obtenidos indican que las técnicas desarrolladas son herramientas sensibles y robustas para la detección y cuantificación de *Anisakis* en productos a base de pescado.

Se seleccionó la técnica QCYTCII SYBR Green qPCR para estudiar la presencia de *Anisakis* en alimentos comerciales elaborados a partir de pescado por su sensibilidad, especificidad y simplicidad al no requerir sonda específica. Se estableció un límite de detección operativo de 1,5 ng de ADN de *Anisakis* por gramo de matriz, para aumentar la fiabilidad de los ensayos. Se analizaron un total de 180 muestras de gulas, croquetas, palitos de cangrejo y hamburguesas de 15 marcas comerciales. Se detectó ADN de *Anisakis* en 4/5 marcas de gulas, 1/3 de croquetas y 4/6 de palitos de cangrejo, y no se identificó en la única marca de hamburguesas estudiada. El análisis estadístico mostró diferencias significativas para los valores Cq hallados en las diferentes muestras de alimento, detectándose las mayores concentraciones de ADN de *Anisakis*, a nivel de trazas, en gulas y palitos de cangrejo ( $5,38 \pm 0,72$  y  $4,46 \pm 0,77$  ng/g).

Para estimar el número de larvas de *Anisakis* en pescado mediante QCYTCII SYBR Green qPCR, se desarrolló un modelo matemático descriptivo. Se contaminaron experimentalmente muestras de filetes de merluza (*Merluccius merluccius*) con diferente número de larvas de *A. simplex* (s.l.) (0-50) y se optimizó el tratamiento de lisis de la muestra, obteniéndose la mayor eficacia después de 90 min de incubación a 55°C. Se observó una relación logarítmica entre los valores Cq hallados y el número de larvas presentes en la muestra ( $R^2=0,9908$ ;  $CV=2,37\%$ ), que permitió obtener una función descriptiva ( $Cq = -1,529x + 24,109$ ) capaz de estimar el número de larvas. El modelo se validó con el estudio de la carga parasitaria de 25 bacaladillas del Atlántico NE, analizadas en paralelo por inspección visual, observándose una concordancia del 95%. Por otro lado, se aplicó sobre dos poblaciones de boquerones (*Engraulis encrasicolus*) del Atlántico NE, 30 de la costa de Portugal y 30 del Golfo de Vizcaya, utilizando en la mitad de los especímenes de cada zona el modelo descriptivo desarrollado para estimar el número de larvas presentes y en la otra mitad la inspección visual, sin encontrarse diferencias significativas ( $P=0,77$ ). Los resultados mostraron que la función descriptiva propuesta es un método aplicable para la cuantificación de las larvas de *Anisakis*.

## ABSTRACT

The nematodes of the *Anisakis* genus are parasites of great sanitary interest. Geographically widespread, their definitive hosts are marine mammals and in larval form they parasitize a great diversity of fish of habitual consumption. Humans act as accidental hosts when ingesting raw or undercooked parasitized fish, and may present gastrointestinal symptoms in addition to allergic reactions. Therefore, it is important to develop effective methods to detect *Anisakis* larvae to ensure the quality and safety of fish and derived products.

Molecular techniques based on qPCR were optimized for the detection and quantification of anisakid larvae, using ANIKIT and QCYTCII primers that amplify an ITS-1 and Cox-2 fragment, respectively; QCYTCII primers were also tested with a TaqMan probe. The larvae used in the optimization assays were isolated from fish purchased from stores in Barcelona: blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and monkfish (*Lophius piscatorius*) from the NE Atlantic Sea and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the Western Mediterranean Sea (Catalan coast). These were morphologically characterized as third stage larvae (L3) of *Anisakis simplex* sensu lato (n=510), *Anisakis physeteris* (n=3), *Hysterothylacium* sp. (n=283) and *Pseudoterranova* sp (n=1). Larvae of the complex *A. simplex* (s.l.) were analyzed by PCR-RFLP to identify the sibling species *Anisakis simplex* sensu stricto (n=10) and *Anisakis pegreffii* (n=5).

For the molecular analysis of the samples, larvae, fish and processed products, the DNA extraction method was optimized by comparing two commercial kits, Wizard Genomic DNA Purification and High Pure PCR Preparation Template, obtaining higher DNA concentrations with the former ( $P < 0.01$ ). For linearity, reproducibility and sensitivity analyses, a binary system was constructed by experimentally spiking a matrix of fish-derived food with lysed larvae of *A. simplex* (s.l.) at concentrations from  $1.36 \times 10^4$  to  $1.36 \times 10^{-3}$  ng of *A. simplex* (s.l.) DNA per gram of matrix. The specificity studies indicated that ANIKIT primers amplified the larvae of the *Anisakis* genus as well as those of *Pseudoterranova*, while the QCYTCII primers proved to be specific for *Anisakis* species. None of the techniques used amplified *Hysterothylacium*. The three optimized assays showed a linear behavior from  $1.36 \times 10^4$  to  $1.36 \times 10^{-1}$  ng of *A. simplex* (s.l.) DNA per gram of matrix. The limit of detection established after a PROBIT analysis for ANIKIT and QCYTCII SYBR Green qPCR was 0.18 and 0.30 ng/g, respectively, very similar

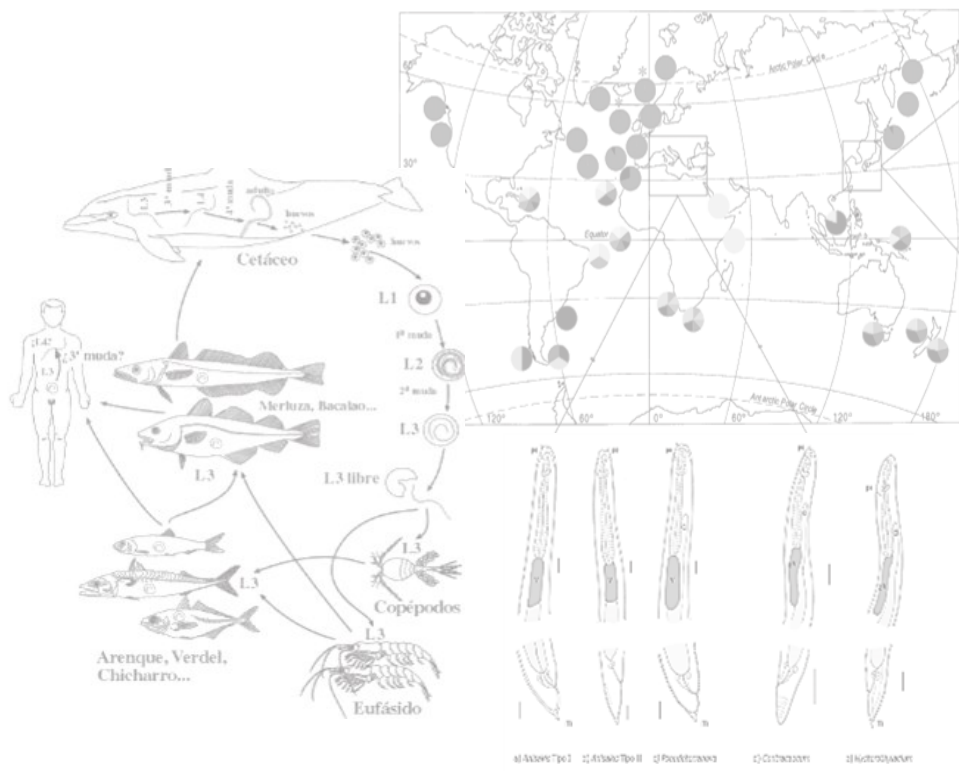
to the 0.25 ng/g obtained for TaqMan, showing high sensitivities. The obtained results indicate that the developed techniques are sensitive and robust tools for the detection and quantification of *Anisakis* in fish-derived food.

The QCYTCII SYBR Green qPCR technique was selected to study the presence of *Anisakis* in commercial fish-derived foods owing to its sensitivity and specificity, and its simplicity arising from not requiring a specific probe. An operative limit of detection of 1.5 ng of *Anisakis* DNA per gram of matrix was established to increase the reliability of the assays. A total of 180 samples of “gulas”, croquettes, crab sticks and hamburgers from 15 trademarks were analyzed. *Anisakis* DNA was detected in 4/5 of “gula”, 1/3 of croquette and 4/6 of crab stick brands and was not detected in the sole hamburger brand studied. The statistical analysis showed significant differences in Cq values among the different food samples, and the highest concentrations of *Anisakis* DNA (only at trace level) in “gulas” and crab sticks ( $5.38 \pm 0.72$  and  $4,46 \pm 0.77$  ng/g).

A descriptive mathematical model was developed based on the QCYTCII SYBR Green qPCR technique to estimate the number of *Anisakis* larvae in fish. Hake fillet samples (*Merluccius merluccius*) were experimentally contaminated with different numbers of *A. simplex* (s.l.) larvae (0-50). The lysis treatment of the sample was optimized, obtaining the highest efficacy after 90 min with incubation at 55 °C. A logarithmic relationship was observed between the Cq values found and the number of larvae present in the sample ( $R^2=0.9908$ ;  $CV=2.37\%$ ), which allowed us to obtain a descriptive function ( $Cq = -1.529x + 24.109$ ) able to estimate the number of larvae. This model was validated in the study of the parasitic load of 25 specimens of blue whiting from the NE Atlantic Ocean that were analyzed in parallel by visual inspection, resulting in an agreement of 95%. The descriptive model generated was applied to analyze NE Atlantic anchovies (*Engraulis encrasicolus*), 30 from the coast of Portugal and 30 from the Bay of Biscay. The number of larvae present in half the specimens from each zone was estimated by the descriptive model, and the other half were inspected visually, with no significant differences found ( $P=0.77$ ). The results showed that the proposed descriptive function is a suitable method for the quantification of *Anisakis* larvae.

# I. INTRODUCCIÓN

---





# I. INTRODUCCIÓN

El consumo de pescado forma parte de una dieta equilibrada, siendo un alimento muy completo que aporta diversos nutrientes de alto valor biológico. Sin embargo, el pescado y productos derivados podrían comportar la presencia de diferentes peligros biológicos como bacterias, virus y parásitos que podrían comprometer la salud de los consumidores. En la Unión Europea, durante el período 2014-2019, el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos informó 172 notificaciones de presencia de parásitos (RASFF, 2019). Entre los principales parásitos implicados, se encuentran las especies de *Anisakis*, conocidos por ser capaces de inducir patologías severas en humanos y por estar ampliamente distribuidos geográficamente en todos los continentes (Pampiglione et al., 2002). A diferencia de muchas otras enfermedades parasitarias comunes de los humanos, la anisakiosis no es un problema exclusivo de los países en desarrollo (Shamsi, 2014). En los últimos años, ha habido un aumento en los casos reportados debido principalmente a factores como la mejora de las técnicas de diagnóstico, la creciente demanda mundial de productos de la pesca y una creciente preferencia por alimentos crudos o ligeramente cocidos, lo que aumenta el riesgo de exposición (Bao et al., 2017).

## 1.1 Aspectos generales de *Anisakis*

### 1.1.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica seguida en el presente trabajo se ha basado en los criterios morfológicos y moleculares establecidos por Blaxter et al. (1998) y De Ley y Blaxter (2002, 2004). La familia Anisakidae comprende al menos 24 géneros, siendo los más conocidos por su importancia sanitaria *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*. Las diferencias en el ciclo biológico de las distintas subfamilias también se han tenido en cuenta en la clasificación taxonómica. En las últimas décadas, diversos autores defienden que la subfamilia Raphidascaridinae debería considerarse como una familia independiente, Raphidascarididae, diferenciándose morfológicamente de Anisakidae principalmente por la posición del poro



excretor, situado a la altura del anillo nervioso, y por la distribución de las papilas caudales de los machos (Nadler y Hudspeth, 2000; Pereira y Luque, 2017).

Filum: Nematoda Rudolphi, 1808

Clase: Cromodorea Inglis, 1983

Orden: Rabditida Chitwood, 1933

Suborden: Spirurina Railliet y Henry, 1915

Infraorden: Ascaridomorpha De Ley y Blaxter, 2002

Superfamilia: Ascaridoidea Baird, 1853

Familia: Anisakidae Railliet y Henry, 1912

Subfamilia: Anisakinae Railliet y Henry, 1912

Género: *Anisakis* Dujardin, 1845

Género: *Pseudoterranova* Mozgovi, 1951

Subfamilia: Contraecinae Mozgovi y Shakhmatova, 1971

Género: *Contraecum* Railliet y Henry, 1912

Familia: Raphidascarididae Hartwich, 1954

Subfamilia: Raphidascaridinae Hartwich, 1954

Género: *Hysterothylacium* Ward y Magath, 1917

Mediante un enfoque multigénico, incluyendo marcadores nucleares (ITS ADNr) y mitocondriales (genes *Cox-2* y *rrnS*) se ha realizado una identificación robusta de las especies incluidas hasta ahora en el género *Anisakis*. Hasta la fecha, se han identificado nueve especies (Figura 1), todas ellas se han caracterizado genéticamente y han sido aisladas reproductivamente (Mattiucci et al., 2001, 2017, 2018).

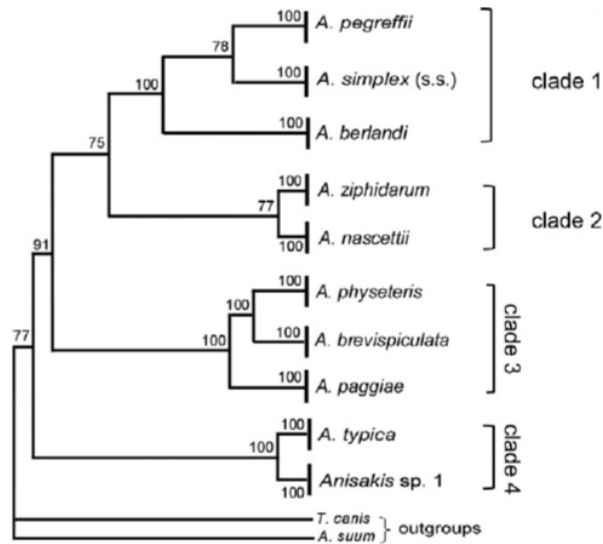


Figura 1. Árbol de consenso basado en la combinación de las secuencias mitocondriales (genes Cox-2 y *rrnS*) y nucleares (ITS rDNA) de *Anisakis* spp. (Mattiucci et al., 2018).

### 1.1.2 Ciclo biológico

Los anisákidos son nematodos parásitos de organismos marinos y presentan un ciclo biológico heteroxeno en el que participan hospedadores definitivos, albergantes de las formas adultas, y hospedadores intermediarios/paratónicos portadores de formas larvarias (Klimpel et al., 2004). Los cetáceos son los hospedadores definitivos de las especies de *Anisakis*, los pinnípedos de las de *Pseudoterranova*, las aves acuáticas piscívoras de *Contracaecum* y los peces los hospedadores definitivos de las especies del género *Hysterothylacium* (Anderson, 2000). En el ciclo de las especies de *Anisakis* (Figura 2), los adultos parasitan el estómago del hospedador definitivo, que son mamíferos marinos pertenecientes al orden Cetacea (ballenas, delfines, orcas, cachalotes, etc.). Después de la cópula con el macho, la hembra adulta libera los huevos fecundados, todavía no embrionados, al medio externo a través de las heces de los hospedadores definitivos. En el medio marino tiene lugar el desarrollo embrionario en el interior de los huevos, comprendiendo dos mudas, de larvas de primer estadio L1 a larvas de segundo estadio L2 y de L2 a larvas de tercer estadio L3 inmaduras. Estas larvas L3 están aún envueltas por la cutícula de la L2, que le proporciona la resistencia suficiente para sobrevivir libres en el medio marino, hasta 7 semanas a 5-7 °C o 3-4 semanas

a 13-18 °C. De este modo, las L3 permanecerán libres hasta ser ingeridas por pequeños crustáceos marinos que forman el Krill oceánico (fundamentalmente eufausidos, *Thysanoessa inermis*, *Thysanoessa longicaudata*, *Meganyctiphanes norvegica*), que actúan como hospedadores intermediarios y en los que las larvas pierden la vaina cuticular y migran al hemocele para completar su desarrollo. Mediante la cadena trófica, estos crustáceos constituyen el alimento de numerosas especies de peces teleósteos y cefalópodos que actuarán como hospedadores paraténicos o de transporte, en los que las larvas L3 atraviesan la pared del tracto digestivo y alcanzan la cavidad visceral. En esta etapa las larvas aumentan de tamaño pero no experimentan muda alguna, ni siquiera cuando peces o calamares infestados son ingeridos por peces de tamaño mayor, siendo la larva capaz de reinfestar a éstos últimos. Finalmente, cuando los hospedadores definitivos ingieren los peces, zooplancton o cefalópodos infestados, se producen la cuarta y quinta muda y evolucionan a nematodo adulto sexualmente maduro, diferenciándose en machos y hembras, con la consiguiente producción de huevos y el inicio de un nuevo ciclo.

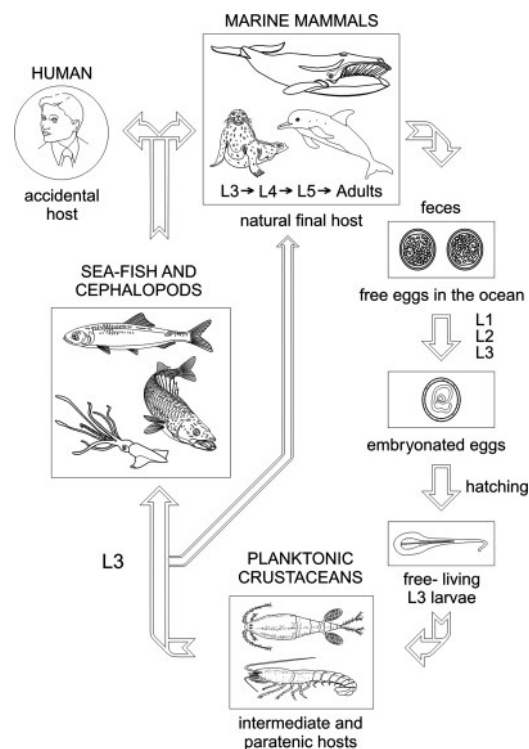


Figura 2. Ciclo biológico de *Anisakis simplex* (Audicana y Kennedy, 2008)

El ser humano actúa como un hospedador accidental al consumir pescado o cefalópodos infestados con larvas L3 crudos o con insuficiente tratamiento térmico. Las larvas no evolucionen al estado adulto y mueren a las pocas semanas. Sin embargo, se han reportado casos de evolución hasta L4, así como un estado de transición entre el tercer y el cuarto estado larvario (Koie et al., 1995; Audicana y Kennedy, 2008; Aibinu et al., 2019).

### 1.1.3 Identificación

#### Morfológica

Los anisákidos comparten los rasgos morfológicos comunes de todos los nematodos: cuerpo vermiforme, sección redondeada y falta de segmentación. Las larvas L3 de las especies de *Anisakis* son de color blanquecino, con un tamaño variable de entre 10 y 30 mm; en la región anterior presentan un diente prominente y el poro excretor que está situado entre las bases de los pseudolabios subventrales (Möller y Anders, 1986). El sistema digestivo es completo disponiendo de boca, esófago, intestino, que ocupa la mayor parte de la longitud de la larva, y ano (Pereira-Bueno, 1992). El esófago tiene dos porciones bien diferenciadas: una anterior muscular llamada proventrículo y otra posterior glandular denominada ventrículo (Osanz Mur, 2001). En el caso de las L3 de *Anisakis* se pueden diferenciar larvas de Tipo I, con el ventrículo largo y presencia de mucrón en el extremo caudal, y larvas de Tipo II con un ventrículo más pequeño y ausencia de mucrón (Berland, 1961, Anderson, 1992). Seis de las nueve especies descritas dentro del género *Anisakis* presentan larvas del primer tipo, tres de las cuales conforman el complejo *A. simplex* sensu lato, *A. simplex* sensu stricto, *A. pegreffii* y *A. berlandi*. En estas tres especies la unión del ventrículo al intestino se caracteriza por ser de forma oblicua a diferencia del resto de las especies de Tipo I, *A. typica*, *A. ziphidarum* y *A. nascettii* en las que esta unión es recta. En las larvas Tipo II la forma final de la cola puede cambiar según la especie, en el caso de *A. physeteris* la cola es larga, cónica y no posee espina al igual que en *A. brevispiculata*, aunque esta última tiene una cola más corta. En el caso de *A. paggiae* la cola es corta y presenta una pequeña espina (Murata et al., 2011). Por otro lado, la coloración y aspecto puede variar según el tipo de *Anisakis*, mientras las larvas de *Anisakis*

Tipo I suelen ser de color blanquecino, en la mayoría de las larvas Tipo II se puede apreciar una coloración rojiza y un aspecto más robusto (Ruíz Valero, 1991).

## **Molecular**

### *Electroforesis de Isoenzimas*

Las isoenzimas se han descrito como “diferentes variantes de la misma enzima que tienen idénticas funciones, catalizan la misma reacción química, aunque difieren en la secuencia de aminoácidos y peso molecular y/o carga eléctrica”. Desde su comienzo hasta la actualidad, el uso de isoenzimas ha permitido valorar el grado de diferenciación y establecer las relaciones genéticas entre las especies incluidas en cada género de la familia Anisakidae, así como caracterizar genéticamente estas especies. Los primeros estudios genéticos poblacionales del género *Anisakis* fueron realizados mediante este análisis electroforético de isoenzimas; Nascetti y colaboradores (1986) realizaron un estudio electroforético de 22 loci enzimáticos en el que se puso de manifiesto la variación genética entre especies del complejo *Anisakis simplex* procedentes del mar Mediterráneo y Atlántico Noreste. El estudio concluyó que se trataba de especies aisladas reproductivamente y que no existía flujo genético. El análisis de 3 loci SOD, ADK1 y Lap-1 mostraron alelos distintos según la especie, lo que permitió diferenciar de forma fiable las especies gemelas *A. simplex* y *A. pegreffii*. Desde las primeras aplicaciones de esta metodología, numerosos análisis se han llevado a cabo, contribuyendo en gran medida al conocimiento sobre la estructura genética de poblaciones de las especies de *Anisakis* en peces y mamíferos marinos de las aguas marinas y oceánicas (Mattiucci et al., 2009, 2015, 2017).

### *Métodos basados en ADN*

Las técnicas basadas en la detección de ADN también han sido ampliamente utilizadas para la identificación de especies de *Anisakis*, entre ellas la reacción en cadena de la polimerasa con análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP). Por medio de esta técnica se pueden analizar diferentes regiones del ADN, siendo la región ITS (espaciadores transcritos internos) la primera en ser estudiada. La ITS se encuentra entre las regiones que codifican la subunidad menor (18S) y la subunidad mayor (28S) del ARNr, y

están divididos en ITS-1 e ITS-2 y separados por el gen que codifica el 5.8S del ARNr. La región ITS es uno de los marcadores más utilizados para los análisis moleculares en nematodos debido a la facilidad de amplificación relacionada con el alto número de copias y a que son marcadores que evolucionan rápidamente entre especies relacionadas. El gen 5.8S se considera de evolución lenta, mientras que las regiones ITS-1 y ITS-2 son menos conservadas, presentando la ITS-1 más variabilidad que la ITS-2 (Mattiucci et al., 2018). La longitud de ITS-1 en *A. simplex* es 392 pares de bases (pb), con un contenido G+C de 46,4%, la del gen 5,8S es 157 pb y 51,6% de G+C, mientras que la longitud de ITS-2 es de 309 nucleótidos con 42,4% de G+C (Zhu et al., 1998). Los polimorfismos inferidos por PCR-RFLP de la región ITS han proporcionado un conjunto de marcadores nucleares para la identificación de especies del género *Anisakis* utilizando tres endonucleasas de restricción (*HhaI*, *HinfI* y *TaqI*) (D'Amelio et al., 2000). De esta manera, se han podido identificar seis especies diferentes de *Anisakis*: *A. pegreffii*, *A. simplex* (s.s.), *A. berlandi*, *A. typica*, *A. ziphidarum* y *A. physeteris*. Posteriormente, también se observaron patrones de restricción distintos para *A. brevispiculata* (Mattiucci et al., 2002), *A. paggiae* (Mattiucci et al., 2005) y *A. nascettii* (Mattiucci et al., 2009). Existen áreas geográficas donde se pueden encontrar las especies gemelas *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii* en el mismo hospedador, como en el Atlántico Nororiental o el Pacífico Noroccidental. Algunos autores han reportado la presencia de formas híbridas entre las dos especies gemelas (Meloni et al., 2011; Costa et al., 2016). La detección de formas híbridas entre las especies gemelas del complejo *A. simplex* (s.l.) se ha realizado principalmente por PCR-RFLP de la región ITS del ADNr. Más recientemente, Mattiucci et al. (2016) han sugerido utilizar más de un marcador para confirmar la existencia de híbridos, como el gen  $\alpha$ -1 del factor de elongación 1 (EF1  $\alpha$ -1).

El ADN mitocondrial también ha sido empleado para la identificación molecular debido a su estructura conservada y a su alta tasa evolutiva, además de estar presente en un elevado número de copias. Además, al tener herencia materna exclusivamente, sus genes son genéticamente independientes de los del núcleo careciendo de recombinación genética (Mattiucci et al., 2018). El genoma mitocondrial de *A. simplex* tiene una estructura circular con un tamaño de 13.916 pb y consta de 36 genes (Figura 3) de los cuales 12 codifican

proteínas, 22 son genes que codifican ARNt y dos son genes codificantes de ARNr, la secuencia mitocondrial completa es rica en A+T (71,2%) (Kim et al. 2006).

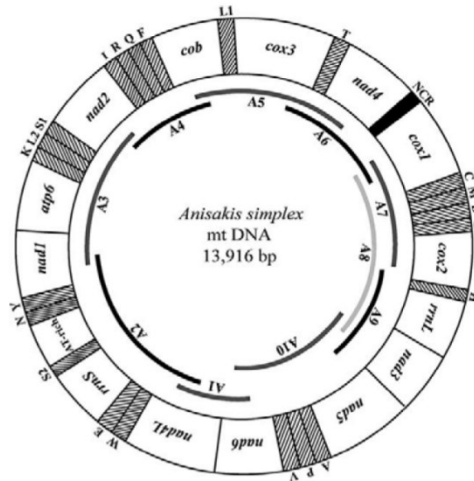


Figura 3. Representación circular del genoma mitocondrial de *A. simplex* (Kim et al., 2006)

El gen codificante de la enzima citocromo oxidasa subunidad II (Cox-2) es el marcador mitocondrial más ampliamente empleado en estudios filogenéticos. El análisis de las secuencias de este gen ha señalado la existencia de diferentes haplotipos dentro de las especies de *Anisakis*, poniendo de manifiesto variabilidad intraespecífica en las especies de este género (Ceballos-Mendiola et al., 2010; Abattouy et al., 2016). Entre las especies gemelas *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii*, se han detectado 11 diferencias fijas, siendo 10 transiciones y una transversión G/T en la posición 449 (Abattouy et al., 2016). Este método se ha utilizado para llevar a cabo estudios de filogenia y genética poblacional de *A. simplex* (s.l.) (Baldwin et al., 2011; Cavallero et al., 2011).

#### 1.1.4 Distribución geográfica

El género *Anisakis* comprende nueve especies diferentes, distribuidas alrededor de todo el mundo (Figura 4). La especie *A. simplex* (s.s.) está muy extendida entre el círculo polar Ártico y 30° de latitud norte que comprendería la costa de Japón, Canadá (Atlántico y Pacífico), norte de Islandia, Islas Faeroe, Noroeste de España, Mar de Noruega, Mar Báltico y Mar Mediterráneo. Por otra parte, *A. pegreffii* se encuentra principalmente en el mar

Mediterráneo, pero también en el Atlántico Noreste, considerándose su límite el Mar de Vizcaya (Mattiucci et al., 2018, 2019; Roca-Geronès et al., 2018); hacia el sur ha sido encontrada en las islas Malvinas, Nueva Zelanda, costas de Sudáfrica y Atlántico Sur. Los movimientos migratorios de los peces pelágicos desde el Atlántico al Mar de Alborán, hacen que *A. simplex* (s.s.) esté presente en las aguas del Mediterráneo (Mattiucci et al., 2007). De esta manera, se crean zonas simpátricas de *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii* a lo largo de las costas de la Península Ibérica, a excepción de la zona norte del Mediterráneo (Marques et al., 2006; Mattiucci et al., 2004), y también en aguas japonesas se han detectado zonas simpátricas de ambas especies (Umehara et al., 2006). En estas zonas, donde es frecuente encontrar infecciones mixtas, se han hallado genotipos híbridos entre *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii* (Suzuki et al., 2010; Hermida et al., 2012). Los nematodos adultos de estas especies han sido aislados de cetáceos de las familias Delphinidae y Phocoenidae, entre otras. Cabe destacar que muchos peces y cefalópodos de interés comercial actúan como hospedadores paraténicos de las larvas (Mattiucci y Nascetti, 2008; Kuhn et al., 2016; Mattiucci et al., 2018).

La especie *A. berlandi*, comprendida en el complejo *A. simplex* (s.l.), muestra un rango discontinuo, incluyendo las aguas del Pacífico en Estados Unidos, Chile y Nueva Zelanda, y la costa atlántica de Sudáfrica. Se ha aislado en el estado adulto en tres mamíferos de la familia Delphinidae y otras 3 especies de cetáceos, y en el estado larvario, en 11 especies de peces, cinco en coinfección con *A. pegreffii* (Mattiucci et al., 2018). El rango de *A. typica* está comprendido entre 35-40°N y 25°S en clima cálido y aguas tropicales, donde se ha encontrado en estado adulto en 13 especies de delfines, y en el cachalote de la familia Kogiidae, y en estado larvario en 34 especies de peces (Anshary et al., 2014; Quiazon, 2016). *A. nascetti* y *A. ziphidarum*, consideradas especies hermanas, se distribuyen en el océano Atlántico Este, cerca de las costas de Madeira y Marruecos, el Pacífico Occidental entre Nueva Zelanda y Australia, y la punta de Sudáfrica (Mattiucci et al., 2018).

Las especies *A. physeteris*, *A. paggiae* y *A. brevispiculata* presentan una distribución homogénea en el Océano Atlántico Central, y en el Mar Mediterráneo. Se han encontrado larvas en pocas especies de hospedadores intermediarios/paraténicos, *A. physeteris* en 16



especies de peces y 5 de cefalópodos, y *A. paggiae* y *A. brevispiculata* en 5-7 especies de peces (Mattiucci et al., 2018).

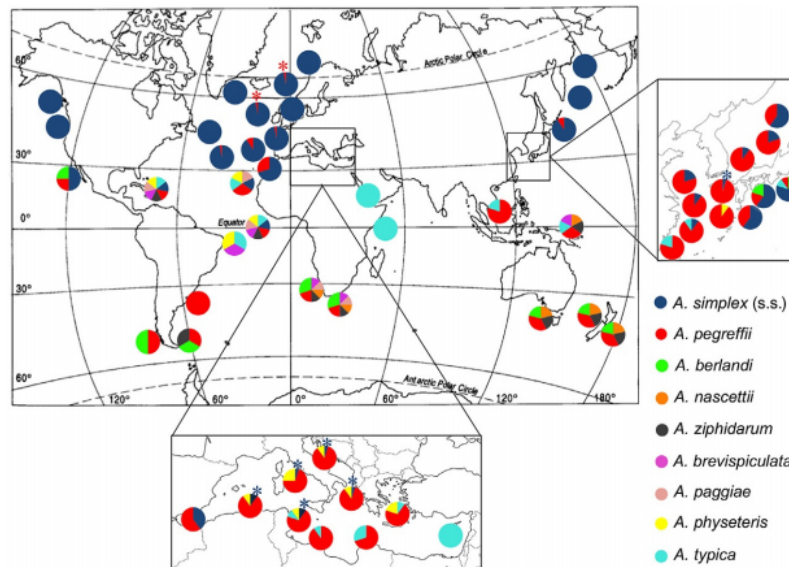


Figura 4. Mapa del mundo mostrando las áreas de distribución de las especies del género *Anisakis* (Mattiucci et al., 2018).

## 1.2 Importancia sanitaria

### 1.2.1 Epidemiología de la anisakiosis

La enfermedad en humanos constituye un problema de salud pública que ha aumentado su incidencia en los últimos años. El primer caso de anisakiosis humana fue descrito en un niño groenlandés en 1876, aunque la descripción completa de la enfermedad no tiene lugar hasta pasada la mitad del siglo XX en Holanda; Van Thiel et al. (1960) encontraron larvas de un nematodo en la pared intestinal de un paciente que padeció un cuadro abdominal agudo tras la ingesta de arenques crudos. La larva se identificó como *Eusutoma rotundatum* y puede considerarse como la primera vez que un ejemplar de *Anisakis simplex* fue identificado. En 1968 y con el desarrollo de la endoscopia gástrica, Namiki et al. (1970) fueron los primeros que extrajeron ejemplares de *A. simplex* de la pared gástrica de pacientes infestados. Posteriormente, se describieron casos de anisakiosis en Francia (Calvet et al., 1969) y Estados Unidos (Pinkus et al., 1975).

En general, los casos de anisakiosis han incrementado en todo el mundo, debido en parte, al desarrollo de diferentes métodos de diagnóstico y por otro lado al aumento de consumo de platos preparados con pescado crudo en los países occidentales. En 2012, se notificaron 20.000 casos en todo el mundo; en Europa, países como España, Italia, Alemania, Holanda y Francia son donde se detecta mayor número de casos asociados a larvas del género *Anisakis* (Audicana et al., 2002; Mattiucci et al., 2013). En otros países como Australia, Chile, Perú y Nueva Zelanda se han notificado casos relacionados con los géneros *Pseudoterranova* y, en menor medida, *Contracaecum* (Torres et al., 2007; Hochberg y Hamer, 2010; Shamsi y Butcher, 2011; Weitzel et al., 2015). Respecto al género *Hysterothylacium* está considerado como no patógeno, aunque se ha descrito un caso de infección en Japón (Yagi et al., 1996).

España es el segundo país después de Japón con mayor número de infestaciones por *Anisakis*. El primer caso de anisakiosis en este país fue publicado en 1991 por Arenal-Vera et al. (1991), a partir de esta fecha se han notificado otros muchos, tanto de infecciones como de reacciones de hipersensibilidad por el consumo de pescado crudo o poco cocinado. En lo que se refiere a la incidencia de la anisakiosis gastrointestinal, Repiso-Ortega et al. (2003), aportan 3,87 casos por cada 100.000 habitantes al año en Toledo, asociados básicamente al consumo de boquerones. La Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica ha realizado estudios epidemiológicos que estiman una frecuencia de alergia a *Anisakis* cercana al 20% de la población, aunque se conoce que hay una prevalencia de sensibilización asintomática, es decir pacientes con pruebas de alergia positivas a *Anisakis* sin síntomas al entrar en contacto con el parásito, de un 13% de los casos (Fernández de Corres et al., 2001).

### **1.2.2 Anisakiosis gástrica e intestinal**

#### **Anisakiosis gástrica**

Se trata de la localización más frecuente, representando el 95% de los casos (Kojima et al., 2013). La forma aguda se caracteriza por la presencia de dolor epigástrico intenso, que puede ir acompañado de náuseas, vómitos, diarreas y fiebre, y suele aparecer normalmente en las 12 primeras horas tras la ingestión (Takabayashi et al., 2014). Las manifestaciones clínicas son muy diversas y pueden confundirse con gastritis, úlcera péptica, colelitiasis e

incluso con tumor gástrico (Miura et al., 2010). En el caso de cronificación de la enfermedad, ocasiona síntomas inespecíficos y recidivantes similares a los del cuadro agudo, que pueden evolucionar durante largo tiempo, provocando tumores submucosos (Esteve et al., 2000). Aunque la mayoría de los casos de estos tumores gástricos comúnmente presentes en la submucosa se caracterizan por granuloma eosinofílico con edema, también pueden cursar con ulceración y hemorragia; un tiempo después de la retirada del parásito de la lesión, el tumor desaparece, de ahí que se conozcan con el nombre de “tumores fantasma” (Hiramatsu et al., 2004).

### **Anisakiosis intestinal**

En la forma aguda, la sintomatología suele aparecer en los primeros 2-3 días de la ingesta de pescado parasitado (Audicana y Kennedy, 2008) con afectación principal del íleon distal. Presenta un cuadro clínico de dolor abdominal difuso o tipo cólico, náuseas, vómitos y heces sanguinolentas. Esta forma puede simular una apendicitis, ileitis, diverticulitis, enfermedad inflamatoria intestinal, oclusión intestinal y síndrome tumoral, entre otros, y puede convertirse en una enfermedad crónica y originar granulomas, además de síntomas inespecíficos como dolor abdominal vago (Shimamura et al., 2016). Además, puede afectar al ritmo intestinal y provocar peritonitis, perforación u obstrucción por estenosis del segmento intestinal donde se asienta el parásito, además de úlceras con focos de hemorragia (Yasunaga et al., 2010). En algunos casos, puede producirse la invasión simultánea del estómago y el colon u otras zonas del intestino de un mismo individuo por diversas larvas de *Anisakis* (Kim et al., 2013).

### **1.2.3 Anisakiosis alérgica**

Los pacientes sensibilizados al parásito pueden presentar reacciones alérgicas de hipersensibilidad mediada por IgE. Los síntomas suelen presentarse entre quince minutos y seis horas después de haber estado en contacto con los alérgenos producidos por *Anisakis*. La manifestación clínica más frecuente es la aparición de urticaria leve que puede o no acompañarse de inflamación de labios y párpados (angioedema), hasta un cuadro grave de

anafilaxia con una urticaria grave, dificultad para respirar, y una bajada importante de la tensión arterial (Daschner et al., 2005; Nieuwenhuizen et al., 2006).

La anisakiosis gastroalérgica se caracteriza por un cuadro alérgico agudo mediado por IgE, acompañado de síntomas digestivos gástricos. El síntoma alérgico más frecuente es la urticaria y en menor grado el angioedema, la hipotensión arterial y el broncoespasmo. El tiempo de latencia para la sintomatología gastrointestinal es de 3 a 6 horas y para los síntomas alérgicos de 5 horas, pudiendo aparecer muchas horas después de la ingestión del pescado (Takabayashi et al., 2014).

Otro tipo de alergias producidas por los antígenos de *Anisakis* ocurren por la exposición a través de otras vías como la piel o el tracto respiratorio, dando lugar a síntomas como dermatitis, rinoconjuntivitis, asma, y manifestaciones reumáticas en forma de artralgias/artritis; principalmente se han indicado entre los profesionales que manipulan productos marinos tanto en la industria como en pescadería o restauración, pero también en no profesionales en contacto con pescado contaminado con los alérgenos del parásito (Nieuwenhuizen et al., 2006; Barbarroja-Escudero et al., 2018).

Las larvas de *Anisakis* presentan muchos componentes antigénicos con capacidad alérgica, los antígenos responsables se dividen en 3 categorías: somáticos, de excreción-secreción y de superficie. Moneo et al. (2017) caracterizan 14 antígenos procedentes de *A. simplex*, sus principales características se resumen en la Tabla 1. Los antígenos termoresistentes tienen una gran importancia en el campo de la seguridad alimentaria debido a que pueden mantenerse después de tratamientos agroindustriales como la congelación o el enlatado, por lo que podrían ser capaces de provocar manifestaciones alérgicas en individuos sensibilizados previamente (Rodríguez-Mahillo et al., 2010; Tejada et al., 2015). Estudios recientes describen un gran número de secuencias de alérgenos en el genoma de *Anisakis*, tanto propias como compartidas con otros organismos cuyo papel debe valorarse (Llorens et al., 2018).

Tabla 1. Principales características de las proteínas alergénicas de *Anisakis* (modificada de Moneo et al., 2017)

Nombre	Tipo de antígeno	Nombre Bioquímico	Peso molecular (kDa)	Prevalencia IgE (%)*	Características
Ani s 1	ES	Inhibidor serina proteasa	24	85	Presenta 18 residuos Cys. Termo-resistente
Ani s 2	Somático	Paramiosina	97	88	Responsable de reacciones cruzadas
Ani s 3	Somático	Tropomiosina	41	13	Termo-resistente Responsable de reacciones cruzadas
Ani s 4	ES	Inhibidor cisteina proteasa (cistatina)	9	27	Termo-resistente y resistente a pepsina Alto valor diagnóstico
Ani s 5	ES	Familia SXP/RAL-2	15	25	Termo-resistente Alto valor diagnóstico
Ani s 6	ES	Inhibidor serina proteasa	15	18	Termo-resistente y resistente a pepsina
Ani s 7	ES		139	94	Sin homología con otra proteína o alérgeno descrito
Ani s 8	ES	Familia SXP/RAL-2.	15	25	Presenta una similitud del 35% con Ani s 5 Termo-resistente
Ani s 9	ES	Familia SXP/RAL-2.	14	14	Termo-resistente
Ani s 10	Somático		21	39	Termo-resistente
Ani s 11	Desconocido		27	50	Desconocido
Ani s 12	Desconocido		31	57	Desconocido
Ani s 13	ES	Hemoglobina	37	64	Desconocido
Ani s 14	Desconocido		24	54	Desconocido

ES excretory/secretory allergens; \*Reactividad en pacientes sensibilizados

### 1.3 *Anisakis* en la cadena agroalimentaria

#### 1.3.1 Presencia en pescado fresco y productos derivados

Las principales zoonosis transmitidas por alimentos asociadas con el consumo de productos pesqueros se atribuyen mayoritariamente a los trematodos, cestodos y nematodos. Entre estos últimos, los parásitos del género *Anisakis* representan uno de los principales problemas de salud pública, ya que son capaces de inducir síntomas gastrointestinales y reacciones alérgicas en el hombre.

En el pescado, la mayoría de las larvas se encuentran en la cavidad visceral, pero también pueden estar presentes en la musculatura que rodea esta cavidad e incluso más profundamente en la parte dorsal del pescado, lo que representa un riesgo importante para la salud del consumidor. Se han descrito parasitaciones por *Anisakis* en numerosas especies de importancia comercial, tanto la prevalencia como la intensidad de parasitación son variables y dependen de varios factores como son: la especie de pescado, zona geográfica, época del año, migraciones y características individuales de cada especie. En Japón, el estornino (*Scomber japonicus*) ha mostrado un 100% de parasitación; en EEUU el 41,6% del pescado de interés comercial capturado en Boston, San Francisco y Los Ángeles presentó anisákidos (Marquardt, 2000). En Australia y el sur de Asia se han demostrado prevalencias del 100% en algunas especies como el pez chato tigre (*Neoplatycephalus richardsoni*), carite (*Scomberomorus commerson*) y barracuda (*Sphyræna forsteri*) (Shamsi et al., 2011; Jabbar et al., 2013). En Europa, el arenque y el bacalao del Atlántico tienen una prevalencia próxima al 100%, otras especies que presentan parasitaciones elevadas son la merluza (*Merluccius merluccius*) cuya prevalencia varía entre 12 y 100%, seguida de la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) con un 94%, el jurel (*Trachurus trachurus*) 76% y el besugo (*Pagellus bogaraveo*) 73%, mientras que en la caballa (*Scomber scombrus*) se reporta hasta el 52,6% (Levsen et al., 2005). En España, se han descrito prevalencias de infección en la mayoría de las especies de consumo habitual, mostrando un alto grado de infección el jurel, la bacaladilla y la merluza, con diferencias entre la zona atlántica y mediterránea; en el caso de la bacaladilla, la prevalencia de infección en el mar Mediterráneo varió entre 9-67%, frente al 80-100% en el Océano Atlántico (Madrid et al., 2012; Piras et al., 2014; Chía et al., 2010; Cipriani et al., 2015), o para la merluza, la capturada en el Atlántico presentó una prevalencia de 88% mientras que en la del Mediterráneo fue de 41% (Valero et al., 2006).

Al margen de la presencia de *Anisakis* en pescado fresco, también debe ser considerado el riesgo que representan para el consumidor los alimentos procesados elaborados con pescado, ya que existe la posibilidad de que, aunque la larva este inactiva después de haber sometido el pescado a distintos tratamientos, los alérgenos de la larva permanezcan y pueden producir episodios de alergia en aquellas personas que han sido previamente sensibilizadas. Se ha

detectado ADN de *Anisakis* en productos procesados como alimentos para bebés, surimi, palitos de pescado, atún enlatado, pescado salado y ahumado, paté y croquetas comprados en comercios de Italia (Mossali et al., 2010) y España (López y Pardo, 2010); además se han detectado proteínas de este parásito en caballa, sardinas y salmón enlatados, arenque en escabeche, palitos de cangrejo y barritas de pescado, comercializados en supermercados de Noruega (Faeste et al., 2015).

Por otro lado, la parasitación masiva por *Anisakis* en los peces puede causar pérdidas económicas cuando la morbilidad se relaciona con el crecimiento y la capacidad reproductiva de los peces hospedadores, produciendo pérdidas de peso y reducción de la fecundidad, lo que afecta significativamente a aquellas zonas cuya principal actividad es la pesca. Además, las lesiones provocadas por este parásito, como el síndrome “stomach cráter” encontrado en el bacalao del Atlántico y el síndrome “red-vent” en la musculatura de la zona de ventilación del salmón salvaje (Beck et al., 2008; Larrat et al., 2013), le confieren al pescado un aspecto desagradable dando lugar a la pérdida del valor comercial del producto. Las autoridades sanitarias estipulan que las partidas muy parasitadas deben ser desechadas, lo que comporta pérdidas económicas en el sector pesquero. Se ha estimado que la pérdida de valor comercial y el descarte de productos parasitados, causa una pérdida anual de 50 millones de dólares en el Atlántico Canadiense (McClelland, 2002).

### **1.3.2 Control y prevención**

En la cadena agroalimentaria se realizan acciones comunes en todos los eslabones enfocadas a la prevención y control del parásito *Anisakis* en pescado. Según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición es imprescindible que se lleven a cabo buenas prácticas en relación mantenimiento de temperatura, la inspección y la capacitación del personal (AESAN, 2011). Las prácticas durante la manipulación a bordo son de vital importancia, el tiempo que transcurre entre la captura y el eviscerado debe ser mínimo para reducir la probabilidad de que el parásito migre a la musculatura del pescado. Así, la evisceración en alta mar es una operación que recomienda la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos para proteger la salud del consumidor (FDA, 2011); sin embargo, es

importante someter las vísceras a un tratamiento de inactivación de las larvas antes de arrojarlas al mar, evitando que vuelvan a ingresar en la cadena trófica, lo que podría incrementar la carga parasitaria en nuevas capturas. También es recomendable congelar el pescado a bordo lo antes posible para inactivar las larvas y evitar la migración a la musculatura (Solas et al., 2009). En el caso de que no se realice la evisceración a bordo, es fundamental realizar un lavado de la cavidad abdominal una vez retirados los órganos internos del pescado, y se recomienda que si no es comercializado entero se elimine la musculatura hipoaxial (FDA, 2001). En la industria agroalimentaria, además de en la etapa de eviscerado, en las operaciones de filetado y recorte es donde se debe realizar la inspección visual del producto y la eliminación de parásitos. El transporte y el almacenamiento son puntos en la cadena de abastecimiento en los que se debe vigilar la higiene de las unidades empleadas y al mantenimiento de la cadena de frío. En el momento de la venta debe realizarse una limpieza más a fondo de la pieza, el profesional de pescadería debe limpiar y sanear de forma adecuada el pescado para evitar que pueda llegar parasitado a los clientes.

## **Legislación**

La legislación europea relativa al control de la presencia de *Anisakis* en el pescado y de su inactivación para la prevención sanitaria, recoge un amplio número de medidas que deben ser aplicadas a lo largo de la cadena de abastecimiento por todos los manipuladores de pescado.

### *Normativa Europea*

Como consecuencia de los casos crecientes de anisakiosis, la Unión Europea publicó en 1991 la Directiva 91/493/CEE en la que se especificaban ciertas medidas para reducir esta parasitosis. Dicha directiva se derogó en 2004 por el Reglamento (CE) núm. 853/2004 en el que establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. En este reglamento se detallan las normas sanitarias aplicables a los productos de la pesca en cuanto a la infestación por parásitos. Algunas de las especificaciones que recogen estas normas son las siguientes:



- Los operadores de empresa alimentaria deben garantizar que los productos de la pesca se hayan sometido a un examen visual con el fin de detectar los parásitos visibles antes de ser puestos en el mercado.
- No pondrán comercializarse en el mercado para uso humano los productos de la pesca que estén claramente infestados con parásitos.
- Los operadores de empresa alimentaria deben garantizar que: los productos destinados a consumir crudos y prácticamente crudos se sometan a un tratamiento de congelación (-20 °C en el interior del pescado, durante al menos veinticuatro horas). Los productos en escabeche (cuando este proceso no baste para matar las larvas) y las especies arenque, caballa, espadín y salmón salvaje del Atlántico o del Pacífico, cuando se traten mediante ahumado en frío (temperatura interior del pescado inferior a 60 °C) también deben someterse al tratamiento anterior. Como excepción, los operadores de empresa alimentaria no tienen que realizar el tratamiento exigido cuando los datos epidemiológicos disponibles indiquen que la zona de pesca de origen no presenta ningún peligro sanitario en lo que se refiere a la presencia de parásitos, y las autoridades competentes así lo autoricen.
- En el momento de la puesta en el mercado de estos productos, salvo cuando se suministren al consumidor final, deben ir acompañados de un documento del fabricante en el que se especifique el tipo de proceso al que han sido sometidos.

#### *Normativa aplicable en España*

- Real Decreto 1437/1992, de 27 de noviembre, por el que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura. Referente a los parásitos, determina que, tanto los pescados, como los productos derivados del pescado, habrán de pasar un control visual para detectar los posibles parásitos visibles y desecharlos. Por otra parte, se prohíbe la venta de los pescados o las partes de éstos que estén fuertemente parasitados. Finalmente, son los barcos factoría y las industrias dedicadas a la elaboración y preparación de los

productos de la pesca los responsables de realizar el control para garantizar el cumplimiento de dicha ley.

- Real Decreto 1420/2006, de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades. Se fija la obligatoriedad, para los establecimientos que sirven comida, de someter todos los pescados que se vayan a servir en crudo o casi crudos a un ciclo de congelación de 24 h a una temperatura igual o inferior a -20 °C. Esto incluye productos de la pesca que han sido sometidos a un proceso de ahumado en frío en el que la temperatura central del producto no ha sobrepasado los 60 °C. Igualmente estarán obligados a garantizar la congelación en las mismas condiciones si se trata de productos de la pesca en escabeche o salados, cuando este proceso no baste para destruir las larvas.

## **1.4 Técnicas para la detección de *Anisakis* en pescado y productos derivados**

### **1.4.1 Métodos basados en la inspección visual**

#### **Inspección visual simple**

Este método consiste en la búsqueda directa de las larvas en la superficie de las vísceras y en cortes de pescado de espesor menor de 5 mm. Se trata de un método no destructivo que no discrimina entre larvas vivas y muertas (Levsen et al., 2005). De acuerdo a lo establecido por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), las personas encargadas de los establecimientos en tierra firme y las personas cualificadas a bordo de los buques factoría determinarán la escala y la frecuencia de las inspecciones en función del tipo de productos de la pesca, su origen geográfico y el uso al que se destinan (FAO, 2016). Se deberá efectuar la inspección visual del pescado eviscerado observando la cavidad abdominal y los hígados, huevas y lechazas destinados al consumo humano. Según el sistema de evisceración que se utilice, la inspección visual deberá realizarse: a) de forma continua por el manipulador en el momento de la evisceración y el lavado, en caso de

evisceración manual; b) mediante muestreo realizado en un número representativo de muestras, no inferior a 10 peces por lote, en caso de evisceración mecánica (FDA, 2011).

### **Transiluminación (Candling)**

Es un método utilizado principalmente por empresas que llevan a cabo operaciones de recorte y fileteado para detectar parásitos en la musculatura de los pescados. Consiste en proyectar una fuente luminosa por la parte inferior del pescado, normalmente con ayuda de mesas iluminadas. La manera más simple de llevar a cabo este método es utilizar una caja de vidrio esmerilado o de pexiglás de unos 50 centímetros cuadrados con 6 milímetros de espesor. La parte interior ha de estar provista de dos tubos fluorescentes que proporcionen luz blanca. Después de fijar el filete de pescado (máximo 30 milímetros de grosor) sobre la caja, las larvas se ven como sombras oscuras en el músculo y se pueden extraer con pinzas y cuchillas. Aunque un examinador experto puede analizar hasta 300 filetes por hora, debido a la fatiga ocular, la eficiencia decae con el paso de las horas (Tejada et al., 2006; Solas et al., 2008).

### **Método de presión y fluorescencia**

El procedimiento consiste en hacer incidir luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm a una distancia de unos 10 cm sobre la superficie del pescado examinándolo por ambos lados; los filetes son sometidos a una presión previa con el fin de conseguir un espesor de 1-2 mm. Las larvas de *Anisakis* y *Pseudoterranova* se muestran de color fluorescente azulado, mientras que las de *Contracaecum* aparecen de color amarillo. En la detección de larvas de anisakidos por este método pueden interferir factores como la presencia de piel en la muestra, el contenido de grasa, y el nivel de experiencia del observador. El proceso es fácil, rápido y se pueden extraer las larvas; sin embargo, para una mayor eficacia requiere que se congele y descongele la muestra y es necesario un ambiente oscuro y la protección ocular para quien va a manipular los filetes bajo la luz (Yang et al., 2013).

### **Digestión artificial**

La técnica consiste en reproducir las condiciones físico-químicas del estómago de los mamíferos empleando una solución de pepsina y ácido clorhídrico a 37 °C para liberar las larvas de anisákidos del músculo u otros tejidos (Fraulo et al., 2014). Este método permite la recuperación de los parásitos vivos en pescado fresco, aunque también es posible la detección de larvas muertas en muestras congeladas. Sin embargo, si la cutícula de las larvas se daña debido a algún proceso como la congelación, puede dejar de ser estable a las condiciones de digestión y las larvas pueden ser digeridas, por lo que la tasa de recuperación puede reducirse (Rodríguez-Mahillo et al., 2008). Esta técnica es utilizada mayormente para estudios de prevalencia, abundancia e intensidad de la infestación por anisakidos en una especie concreta de pescado o zona geográfica específica, pero no se recomienda su uso para el cribado masivo.

#### **1.4.2 Método por diferencia de conductividad**

Es una técnica de detección de larvas basada en la diferencia de conductividad de éstas respecto al músculo del pescado. Los filetes de pescado se sujetan con una malla de nylon y se sumergen en una solución de conductividad eléctrica similar y se conducen a través de una cinta transportadora. En la parte superior de la cinta se colocan magnetómetros para medir el campo magnético e inspeccionan uno a uno los filetes transportados por la cinta. Cuando el pescado está infestado por parásitos, el magnetómetro detecta perturbaciones en el campo magnético. Aunque se trata de una técnica eficaz, tiene limitaciones, sobre todo en cuanto al equipamiento y que no permite la inspección de piezas de pescado con piel (Choudhury et al., 2002).

#### **1.4.3 Métodos inmunológicos**

Los métodos inmunológicos se basan en el uso de anticuerpos mono o policlonales, o bien recombinantes, que se unen a un antígeno específico. Tejada et al. (2008) han desarrollado un método que permite detectar y cuantificar alérgenos de *A. simplex* en músculo de pescado y productos procesados en el que los antígenos extraídos se detectan por IgG inmunoblot y

se cuantifican por dot-blot. Este método puede llegar a detectar *Anisakis* en cantidades inferiores a 1 ppm con tasas de recuperación mayores a un 65%, (Rodríguez-Mahillo et al., 2008). Por otro lado, Werner et al. (2011) han desarrollado un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando anticuerpos policlonales para la detección y cuantificación de proteína total de *Anisakis* con un límite de cuantificación de 1 mg de proteína por 1 kg de pescado y/o producto procesado. Estas técnicas tienen limitaciones relacionadas con la disponibilidad de los antígenos, y el desarrollo de los ensayos.

#### **1.4.4 Métodos proteómicos**

La cromatografía líquida – espectrometría de masas (LC-MS / MS) se ha introducido como un método para el análisis de peptidomas y proteomas. Por lo general, se aplica para detectar péptidos, objetivos previamente identificados, midiendo las transiciones iónicas específicas. Esta técnica se ha aplicado para la caracterización proteómica de *A. simplex* (Fæste et al., 2014) y para la detección cualitativa de proteínas de anisakidos en peces (Fæste et al., 2015). También se han desarrollado métodos semicuantitativos (nLC-nESI-Orbitrap-MS/MS) y de cuantificación absoluta (AQUA-LC-TripleQ MS/MS) para la detección de proteínas de *Anisakis* en pescado y productos procesados. Sin embargo, se ha reportado que sólo un limitado número de péptidos podría ser empleado para realizar los ensayos debido a las interferencias provocadas por la matriz de alimentos (Fæste et al., 2016). Recientemente, la espectrometría de masas con monitoreo de reacción en paralelo (PRM) también se ha utilizado para detectar biomarcadores de péptidos específicos de anisakidos en peces comúnmente consumidos (Carrera et al., 2016).

#### **1.4.5 Métodos moleculares**

El gran aumento en la disponibilidad de información de secuencias de ADN ha permitido el desarrollo de diferentes técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de *Anisakis*: PCR clásica, PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism), qPCR (PCR cuantitativa a tiempo real), PCR sequencing, Multiplex PCR, entre otras. La reacción de amplificación consiste básicamente en tres pasos, una

desnaturalización, la unión de los cebadores y una extensión por cada ciclo de amplificación. De los métodos mencionados, Espiñeira et al. (2010) han desarrollado un ensayo de PCR-RFLP que amplifica un fragmento de 218 pb de la región ITS-1, el cual se ha empleado para la detección de *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium* y *Contracaecum* en productos sometidos bajo condiciones controladas a diferentes tratamientos y contaminados experimentalmente. En la PCR-RFLP los productos de amplificación generalmente son visualizados mediante electroforesis con tinción fluorescente, sin que sea posible una cuantificación adecuada del ADN del parásito presente en la muestra. Por otro lado, la utilización de la metodología qPCR, que permite la cuantificación del ADN diana, junto a una elevada eficiencia de la técnica, ha pasado a ser una técnica de gran importancia en el campo de la inocuidad de alimentos debido a su rapidez, sensibilidad y especificidad (Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2013). Esta metodología qPCR utilizando sondas TaqMan ha sido utilizada por Herrero et al. (2011) desarrollando un ensayo que amplifica un fragmento de 176 pb del gen codificante de la Cox-1 en pescados procesados en planta piloto, y contaminados experimentalmente; el set sonda-cebadores empleado es capaz de amplificar ADN de *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Hysterothylacium* y *Contracaecum*. López y Pardo (2010) han optimizado una técnica que permite la amplificación de 96 pb del gen que codifica la Cox-2 de *Anisakis* y también han analizado productos contaminados experimentalmente, aunque en este caso las muestras eran diferentes alimentos comerciales. Mossali et al. (2010) han estandarizado una qPCR para la detección de *Anisakis* y *Pseudoterranova*, empleando el método de cuantificación relativa para el cual son necesarias dos parejas de cebadores y dos sondas específicas, la técnica ha sido aplicada en pescado y alimentos comerciales contaminados naturalmente. Todas las técnicas descritas anteriormente hacen uso de al menos una sonda específica, lo que representa un costo importante en el momento de desarrollar ensayos para el análisis de rutina de pescado y productos derivados. En este sentido, el uso de compuestos como el SYBR Green que emiten fluorescencia cuando se unen al ADN podría ser una alternativa más asequible, ya que permite realizar la metodología utilizando únicamente un par de cebadores específicos para llevar a cabo la detección. SYBR Green es un fluorocromo que se une al ADN de doble cadena y se excita con luz azul a una longitud de onda de 480 nm, la intensidad de la fluorescencia se incrementa

proporcionalmente a la concentración del ADN. Para un uso correcto del SYBR Green en la PCR cuantitativa es obligatorio verificar la especificidad de la señal, analizar la curva de fusión y comprobar que la señal de fluorescencia proviene de un solo producto de amplificación (Lutfalla y Uze, 2006).

## **1.5 Tratamientos para la inactivación de larvas de *Anisakis* en el pescado**

### **1.5.1 Congelación**

La eficacia de este tratamiento depende de varios factores como la temperatura, el tiempo de congelación, y la cantidad de grasa del pescado. La normativa europea recomienda que los peces y productos a base de ciertos pescados que se vayan a consumir crudos o prácticamente crudos deben alcanzar  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en todos los puntos y mantenerse a esa temperatura durante al menos 24 horas (Reglamento (CE) núm. 853/2004). Por otro lado, la FDA (2011) especifica congelación y almacenamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 7 días o congelación a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se solidifique y mantener a la misma temperatura durante 15 horas, o bien congelar a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que se solidifique y mantener a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Se considera que la congelación es el único punto crítico de control eficaz para prevenir la infección por nematodos cuando se aplica el sistema Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) a la obtención de determinados productos de la pesca. En el ámbito doméstico, deberá tenerse en cuenta la capacidad de congelación de los frigoríficos para hacer recomendaciones al consumidor acerca del tiempo que el pescado debe permanecer congelado antes de escabechar o marinar. Algunos autores señalan que para el frigorífico doméstico son necesarias 9 horas para alcanzar  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y al menos 60 horas para la inactivación total del parásito (Dong et al., 2000).

### **1.5.2 Tratamiento térmico**

La FDA (2001) considera que un tratamiento a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el centro del producto durante un minuto es suficiente para matar a las larvas siempre que se tengan en cuenta las características fisicoquímicas, de presentación y el sistema de calentamiento, ya que influyen en la transmisión del calor. La Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en

Alimentos (ICMSF, 1996) recomienda que debe alcanzarse 70 °C en el interior del pescado. De esta manera, los productos fritos, hervidos, ahumados en caliente, pasteurizados y cocinados al vacío son seguros desde el punto de vista de la inactivación del parásito. En cambio, no se consideran seguros los productos ahumados en frío, los cocinados en plancha y los sometidos a microondas. Para el pescado preparado a la plancha, se debe verificar que se encuentre totalmente cocinado por dentro y en caso de que se desee poco hecho se deberá realizar una congelación previa. Los aparatos de microondas tienen una capacidad de penetración limitada hasta cierta profundidad. Además, no producen un calentamiento homogéneo, pudiendo quedar dentro del pescado puntos fríos y puntos sobrecalentados (Tejada et al., 2006; Tejada, 2009). Respecto al uso de microondas, la FDA (2011) recomienda calentar al menos 15 segundos a 74 °C, cubriendo y rotando la pieza y finalmente reposar el alimento durante 2 minutos una vez cocinado.

### **1.5.3 Altas presiones**

El objetivo principal del tratamiento por altas presiones en pescado infestado, es producir la muerte de las larvas sin causar cambios en el músculo de pescado que alteren la apariencia y características del pescado crudo. En general la presurización favorece la muerte de la larva, sin embargo puede producir desnaturalización de las proteínas del pescado generando modificaciones intra e interproteínas. Las condiciones necesarias para producir la muerte de las larvas difieren según los estudios realizados, pero en todos los casos la presión aplicada es mayor de 200 MPa a tiempos de 1 minuto (Molina-García y Sanz, 2002; Dong et al., 2003; Vidaček et al., 2009).

### **1.5.4 Electrocutación**

En los barcos pesqueros uno de los métodos usados es someter los pescados capturados a una descarga eléctrica que destruye los parásitos. Cuando se trata de ejemplares grandes se hace de forma individual, mientras que en los ejemplares de menor tamaño puede hacerse de forma masiva practicando la electrocutación por inmersión del pescado en grandes recipientes con una disolución electrolítica. La intensidad aplicada puede variar según el tamaño o



características del pescado. Con este procedimiento se consigue la muerte de la larva de forma rápida y sencilla, quedando por tanto el pescado apto para el consumo (Bereciartua, 2003).

## **II. OBJETIVOS**

---





## II. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es desarrollar y aplicar métodos moleculares basados en la PCR en tiempo real (qPCR) para la detección y cuantificación de larvas de *Anisakis* en pescado y productos procesados a partir de pescado.

### Específicos

- Optimizar técnicas SYBR Green qPCR para la detección específica de *Anisakis* y comparar con metodologías basadas en el uso de sondas TaqMan.
- Evaluar la sensibilidad analítica de las técnicas qPCR ensayadas empleando una matriz alimentaria a base de derivados de pescado.
- Detectar y cuantificar *Anisakis* en diferentes tipos de alimentos comerciales derivados de pescado mediante las técnicas desarrolladas.
- Desarrollar un modelo matemático descriptivo basado en las técnicas qPCR que permita estimar el número de larvas presentes en pescado evaluando el grado de concordancia con la inspección visual.
- Determinar la aplicabilidad del modelo descriptivo para la cuantificación de larvas de *Anisakis* en pescado comercial.







### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos generales helmintológicos

##### 3.1.1 Pescados analizados y obtención de larvas de nematodos

Para la obtención de larvas de anisákidos se analizaron ejemplares de peces de consumo habitual adquiridos en comercios minoristas de Barcelona, la bacaladilla (*Micromessistius poutasou*) y el boquerón (*Engraulis encrasicolus*) del Atlántico Noreste, y el jurel (*Trachurus trachurus*) del Mediterráneo Oeste (costa Catalana). El pescado fue comprado fresco en tiendas minoristas en Barcelona. La disección de los pescados se realizó en fresco mediante un corte en la cara ventral, empezando por el ano y finalizando en la base de la cabeza. Tras una primera inspección visual de la cavidad visceral, así como del peritoneo por la posible presencia de larvas, se procedió a la extracción y separación de los órganos (hígado, estómago, intestino, ciegos pilóricos y gónadas) en cápsulas de Petri con suero fisiológico para su observación en fresco. En algunos especímenes de bacaladilla, la musculatura se dividió en tres porciones, anteroventral, anterodorsal y posterior, para ser analizadas separadamente. La observación de vísceras y músculo se realizó bajo la lupa binocular (Leica MZ6) con la ayuda de la luz de transmisión e incidente. Las larvas encontradas se aislaron en cápsulas de Petri con solución salina y se mantuvieron a 4 °C hasta su identificación morfológica y análisis molecular.

##### 3.1.2 Identificación morfológica de las larvas

La identificación morfológica de las larvas de nematodos halladas se realizó basándose en la anatomía de la parte anterior del aparato digestivo y del extremo caudal, siguiendo los criterios de Berland (1961), Petter y Maillard (1988) y Moravec (1994). En el género *Anisakis* se pueden distinguir larvas L3 de tipo I y de tipo II según Berland (1961), ambos tipos se diferencian básicamente en el aspecto del ventrículo, alargado en las primeras y corto en las segundas, y en la presencia o ausencia de mucrón, respectivamente. Las especies del complejo *A. simplex* (s.l.), se caracterizan por la unión oblicua esófago-intestino mientras



que en las especies restantes también de tipo I esta unión es recta. Las tres especies de *Anisakis* con larvas tipo II se diferencian entre ellas principalmente por la anatomía de la parte caudal, presentando *A. physeteris*, un extremo posterior más largo y acabado en forma cónica (Murata et al., 2011). La morfología de las larvas del género *Pseudoterranova* es muy similar a la de *Anisakis*, aunque de mayor tamaño y color amarillo-rojizo, diferenciándose por presentar además un ciego intestinal corto y la cola redondeada con mucrón. El género *Contracaecum* se caracteriza por la presencia tanto de ciego intestinal anterior como de apéndice ventricular proyectado hacia la parte posterior; presentan un ventrículo pequeño y esférico, la cola es cónica y sin mucrón. Finalmente, las larvas de *Hysterothylacium* se caracterizan por ser más pequeñas con un ventrículo apenas visible, con ciego intestinal y apéndice ventricular, así como presencia de mucrón terminal y con el poro excretor situado a la altura del anillo nervioso. En la Figura 5 se muestran las principales características morfológicas diferenciales de los cuatro géneros.

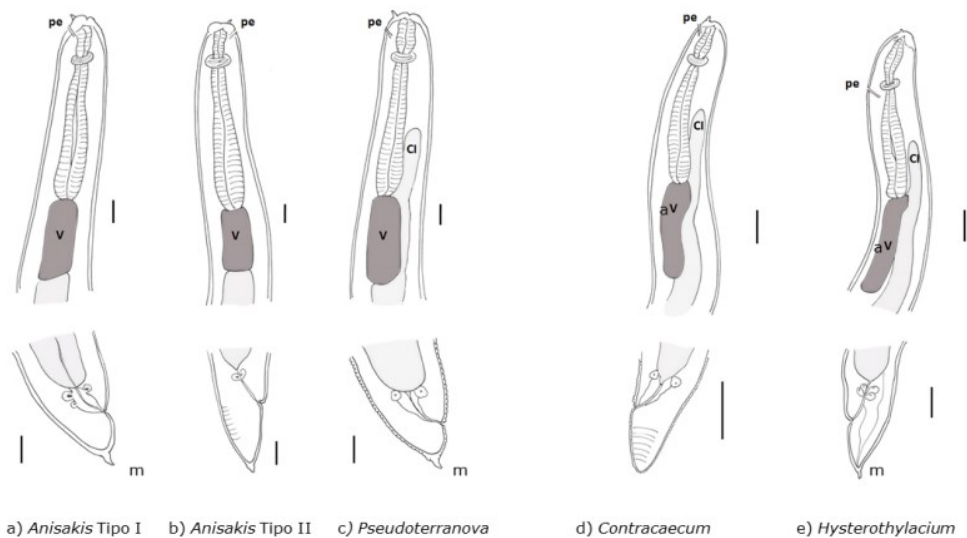


Figura 5. Extremo anterior, esófago y extremo posterior de larvas L3 de los principales géneros de la familia Anisakidae y del género *Hysterothylacium*. a) *Anisakis* Tipo I; b) *Anisakis* Tipo II; c) *Pseudoterranova*; d) *Contracaecum* y e) *Hysterothylacium*. pe: poro excretor, v: ventrículo, ci: ciego intestinal, av: apéndice ventricular, m: mucrón (Dibujos: A. Debenedetti, 2014, citado por Madrid, 2015).

## **3.2 Estandarización de técnicas SYBR Green qPCR para la detección y cuantificación de anisákidos**

### **3.2.1 Larvas de nematodos**

Para la obtención de larvas de de nematodos ascaridoideos de *Anisakis* e *Hysterothylacium*, 60 especímenes de bacaladilla del Atlántico Noreste (zona FAO 27.8) y 25 de jurel del Mediterráneo Oeste (costa Catalana) (zona FAO 31.1.1) fueron diseccionados como se describe en el subapartado 3.1.1 de aspectos generales helmintológicos. Adicionalmente, se identificó una larva de *Pseudoterranova* procedente de la musculatura de un rape (*Lophius piscatorius*) del Atlántico Noreste. Las larvas se aislaron y se caracterizaron morfológicamente y morfométricamente siguiendo los criterios indicados en el subapartado 3.1.2.

### **3.2.2 Matrices alimentarias**

Se estudiaron diferentes matrices alimentarias elaboradas con pescado procesado, incluyendo 2 marcas comerciales de gulas, 1 de croquetas, 1 de hamburguesas de pescado y 2 de palitos de cangrejo, para la evaluación de dos sistemas de extracción de ADN. De cada una de las marcas empleadas, se llevaron a cabo ocho extracciones independientes de ADN, dando un total de 16 de gulas, 8 de croquetas, 8 de hamburguesas y 16 de palitos de cangrejo estudiados para cada uno de los sistemas de extracción evaluados.

### **3.2.3 Métodos de extracción de ADN**

Para la extracción y purificación de ADN se compararon los sistemas comerciales Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) y High Pure PCR Preparation Template Kit (Roche Molecular Biochemical), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Para el primer kit de extracción, las muestras fueron homogeneizadas con 600 µl de solución de lisis nuclear (Promega) y 17,5 µl de proteinasa K (Roche Diagnostics) y se mantuvieron toda la noche en rotación a 350 rpm a 55 °C. El ADN fue separado por centrifugación y precipitación usando isopropanol (Sigma-Aldrich) y resuspendido en 100 µl de solución de rehidratación

(100 mM clorhidrato de trishidroximetilaminometano, Tris-HCl; 1 mM ácido etilendiaminotetraacético, EDTA, pH 8,0). Para el segundo kit, las muestras se homogeneizaron con 200  $\mu$ l de binding buffer (6 M guanidina-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100, pH 4,4) y 40  $\mu$ l de proteinasa K, manteniéndose toda la noche a 55 °C. Este kit utiliza una columna de purificación que incorpora una membrana de sílica donde se fija de manera selectiva el ADN que una vez purificado se eluyó en un volumen final de 200  $\mu$ l (10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Para todas las muestras, la concentración de ADN se midió por absorbancia a 260 nm y la calidad se determinó empleando el ratio de absorbancia 260/280 nm usando el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). En el caso de las larvas, la purificación se llevó a cabo a partir de larvas enteras previamente lavadas tres veces con solución tampón fosfato salino pH 7,2 (PBS) y conservadas en 200  $\mu$ l de PBS. Para el sistema binario y las muestras alimentarias empleadas se utilizaron 200  $\mu$ l del homogeneizado. Se efectuaron dos extracciones independientes por cada muestra. Los extractos de ADN se almacenaron a -20 °C hasta ser empleados en el análisis molecular.

### **3.2.4 Sistema binario: matriz alimentaria contaminada experimentalmente con larvas**

En el estudio de sensibilidad analítica y repetitividad de los ensayos SYBR Green qPCR se utilizaron matrices elaboradas con pescado procesado, concretamente palitos de cangrejo, que fueron contaminadas experimentalmente con larvas de *Anisakis*. Se lisaron 40 larvas L3 identificadas como *A. simplex* (s.l.) en 400  $\mu$ l de PBS con 40  $\mu$ l de proteinasa K (Roche Diagnostics) a 55 °C durante la noche. A partir de las larvas lisadas se prepararon diluciones en serie 1:10 usando PBS. Cada dilución se homogeneizó con 100 ml de PBS y una muestra de 25 g de matriz alimentaria constituyendo así el sistema binario. Se obtuvieron diferentes concentraciones desde  $1,36 \times 10^4$  a  $1,36 \times 10^{-3}$  ng de ADN de *A. simplex* (s.l.) por gramo de matriz, considerando que la concentración media de ADN de una sola larva fue de 85 ng/ $\mu$ l después del análisis de 30 especímenes. Este procedimiento se realizó 12 veces, realizando 2 extracciones de ADN empleando el sistema comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit, lo que resultó en 24 extracciones de ADN de cada concentración preparada. En total se emplearon 480 larvas de *A. simplex* (s.l.) para preparar las matrices de alimento.

### 3.2.5 PCR-RFLP

El estudio molecular molecular de las larvas morfológicamente caracterizadas como *Anisakis* mediante el estudio de la región ITS del ADNr permite llevar a cabo la identificación específica de las especies gemelas morfológicamente indiferenciables del complejo *A. simplex* (s.l.). Para la amplificación de la región entera ITS se realizó una PCR utilizando los cebadores NC5-forward (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') y NC2-reverse (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') (D'Amelio et al., 2000; Zhu et al., 1998). La reacción se llevó a cabo en un termociclador PTC- 200 DNA Engine (MJ Research) a una temperatura de hibridación de 55 °C realizando 30 ciclos. Se utilizó RedTaq polimerasa (Sigma) a una concentración de 0,05 U/μl, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, dNTP's (Ecogen) a 0,2 mM y los cebadores a 0,2 μM en un volumen final de 50 μl. Para comprobar la correcta amplificación de las muestras se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando 50 ml de tampón 1x SGTB (Grisp Research Solutions), 1 g de agarosa estándar (agarosa estandar media AG020, ECOGEN) y 5 μl de SYBR Safe DNA Gel Stain (S33102-Invitrogen) en una minicubeta (Sub-cell GT-Bio-Rad) a 150 V durante 30 minutos. Con el fin de observar el tamaño de los productos amplificados se añadió al gel un marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (pb) (EZ load 100 pb-1000 pb, Bio-Rad). La lectura de los productos amplificados se realizó con luz ultravioleta utilizando el sistema de análisis de imágenes Dragonfly Slite 140 / S (TDI). Las muestras amplificadas se digirieron utilizando la enzima de restricción *Hinf*I (New England Biolabs) a 37°C durante 90 minutos, añadiendo CutSmart buffer como indica la casa comercial. De los productos digeridos se realizó una electroforesis en gel de agarosa de alta resolución (AG0500, ECOGEN) al 2% utilizando las condiciones y reactivos descritos anteriormente, incrementando el tiempo de electroforesis a 45 minutos.

### 3.2.6 SYBR Green qPCR

Se optimizaron dos técnicas SYBR Green qPCR para la detección y cuantificación de ADN de anisakidos en las matrices alimentarias. La primera técnica amplifica un fragmento de la región ITS-1 empleando los cebadores ANIKIT forward (5'AACAACGGTGACCAATTTGG-3') y ANIKIT reverse

(5'GACGGTCCAGGCAGAAGCT-3') (Mossali et al., 2010). La segunda amplifica un fragmento del gen citocromo oxidasa subunidad II (Cox-2), usando la pareja de cebadores QCYTCII forward (5'AGTAAGAAGATTGAATATCAGTTTGGGA-3') y QCYTCII reverse (5' AAGTAAACTCAAAGAAGGCACCATC-3') (López y Pardo, 2010). Se utilizó 1 x SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics) 300 nM de cada cebador según la región amplificada y 2,5 µl de ADN en un volumen final de reacción de 10 µl. Las mezclas de reacción se prepararon en placas de 384 pocillos y las amplificaciones se realizaron en el termociclador LightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics, Alemania) con las siguientes condiciones térmicas: 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 1 minuto. El protocolo de análisis de la curva de fusión del producto fue de 95 °C durante 1 minuto, 40 °C durante 1 minuto, 65 °C durante 1 segundo y después un incremento de 1 °C/segundo hasta 95 °C durante 30 segundos. Se usó ADN de larvas de *A. simplex* (s.l.) como control positivo. Como controles negativos se utilizó agua de grado molecular, productos no marinos como carne de pollo y ternera, y musculatura de bacaladilla y jurel verificada previamente de ausencia de *Anisakis* por inspección visual. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Los resultados fueron expresados en ciclos de cuantificación (Cq). La especificidad se determinó comparando las temperaturas de fusión de los productos de amplificación de las muestras estudiadas con las del control positivo.

### 3.2.7 Análisis estadístico

Se utilizó una regresión lineal univariante para las pruebas de linealidad de las técnicas SYBR Green qPCR. La sensibilidad de las técnicas qPCR se estudió determinando el límite de detección (LOD) al 95% y 50% mediante un análisis PROBIT. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software SAS 9.4 (SAS Institute).

### **3.3 Detección y cuantificación de *Anisakis* en alimentos procesados mediante qPCR empleando SYBR Green y sondas TaqMan**

#### **3.3.1 Larvas de nematodos**

Para la optimización de los ensayos moleculares se emplearon larvas L3 de *A. simplex* (s.l.) (n=510), *A. physeteris* (n=3) y *Pseudoterranova* sp. (n=1) e *Hysterothylacium* sp. (n=10). Las larvas de *Anisakis* e *Hysterothylacium* se obtuvieron en especímenes de bacaladilla del Atlántico Noreste (zona FAO 27.8) y de jureles del Mediterraneo Oeste (costa Catalana (zona FAO 37.1.1) mientras que la larva de *Pseudoterranova* procedió de la musculatura de un rape procedente de Atlántico Noreste. En el ensayo de especificidad se usaron 10 larvas de *A. simplex* (s.s.), 5 de *A. pegreffii* y 3 de *A. physeteris* previamente identificadas mediante PCR-RFLP (subapartado 3.2.5).

#### **3.3.2 Sistema binario: matriz alimentaria contaminada experimentalmente con larvas**

El sistema binario constituido por la matriz alimentaria contaminada con larvas de *A. simplex* (s.l.) con concentraciones desde  $1,36 \times 10^4$  a  $1,36 \times 10^{-3}$  ng de ADN por gramo de matriz (subapartado 3.2.4) ha servido para llevar a cabo los ensayos de sensibilidad y reproducibilidad de las técnicas moleculares.

#### **3.3.3 Muestras de alimentos de pescado procesado**

Se estudiaron diferentes alimentos comerciales elaborados con pescado: palitos de cangrejo, gulas, croquetas y hamburguesas. Se compraron dos lotes comerciales de cada uno en diferentes tiendas minoristas. De acuerdo a las etiquetas de los fabricantes, los palitos de cangrejo y las gulas estaban elaborados con surimi, las hamburguesas contenían salmón y merluza, dos marcas de croquetas estaban elaborados con merluza, y en una la especie de pescado no estaba declarada. Las compras se transfirieron de inmediato al laboratorio y se guardaron en el refrigerador o congelador según lo recomendado por el fabricante hasta el análisis. Las marcas comerciales fueron asignadas con letras, de la A a la I, se analizaron 6 marcas de palitos de cangrejo (A, B, C, D, H e I), 5 de gulas (A, B, C, D y F), 3 de croquetas

(A, C y G) y una de hamburguesas (E). Las marcas A, B, D, E y H eran productos refrigerados, mientras que las marcas C, F, G e I eran alimentos congelados. Para el análisis molecular, se homogeneizaron 25 g del alimento comercial con 100 ml de PBS usando un Stomacher-400 (Seward) durante 30 minutos. Esta preparación de la muestra se realizó por triplicado. Posteriormente, se realizaron dos extracciones de ADN de cada homogeneizado de alimentos, obteniendo 6 extracciones de ADN de cada lote de producto, lo que resultó en 180 muestras analizadas.

### **3.3.4 Extracción de ADN**

Se empleó el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) siguiendo el protocolo descrito en el subapartado 3.2.3. Se efectuaron dos extracciones independientes por cada muestra.

### **3.3.5 QCYTCII SYBR Green qPCR**

Para la detección y cuantificación de ADN de *Anisakis* se empleó la técnica QCYTCII SYBR Green qPCR utilizando los cebadores QCYTCII-forward y QCYTCII-reverse previamente descrita en el subapartado 3.2.6. Todas las muestras se analizaron por duplicado, considerándose positivo un valor de  $C_q < 35$ .

### **3.3.6 QCYTCII TaqMan qPCR**

Se empleó la técnica QCYTCII TaqMan qPCR, utilizando los cebadores QCYTCII-forward y QCYTCII-reverse y la sonda específica CYTCII (5'-FAM-TTCCTACTTTAATTTTGGTTGCTC-MGB-3') (López y Pardo, 2010). El volumen de reacción se ajustó a 10  $\mu$ l con LightCycler 480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics) y 2,5  $\mu$ l de ADN. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador LightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics), programado para mantenerse a 50 °C durante 2 minutos, seguido de 95 °C durante 10 minutos y completar 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Todos los análisis se realizaron por duplicado, considerándose positivo un valor de  $C_q < 40$ .

### 3.3.7 Análisis estadístico

Se utilizó una regresión lineal univariante para la prueba de linealidad. La sensibilidad de las técnicas qPCR se estudió determinando el límite de detección (LOD) al 95% mediante un análisis PROBIT. Además, para las muestras de alimentos, se realizó un análisis de varianza univariado (ANOVA) con modelos mixtos (factores fijos: marca y tipo de alimento comercial; factor aleatorio: lote anidado en la marca). La regresión lineal, el análisis PROBIT y el ANOVA se llevaron a cabo con el software SAS 9.4 (SAS Institute).

## 3.4 Optimización de un modelo descriptivo basado en SYBR Green qPCR para la cuantificación de larvas de *Anisakis* en pescado

### 3.4.1 Larvas de *A. simplex* (s.l.)

Para optimizar el modelo se emplearon 570 larvas L3 que fueron identificadas morfológicamente como *A. simplex* (s.l.) (subapartado 3.1.2), procedentes de la disección de 30 especímenes de bacaladilla del Atlántico Noreste (zona FAO 27.8). Las larvas se mantuvieron en solución fisiológica a 4 °C hasta su uso.

### 3.4.2 Contaminación experimental de pescado y procesamiento de las muestras

Para la obtención del modelo matemático descriptivo-SYBR Green qPCR, las larvas identificadas como *A. simplex* (s.l.) se emplearon para contaminar experimentalmente filetes de merluza (*Merluccius merluccius*). Los filetes habían sido verificados como libres de *Anisakis* mediante inspección visual y SYBR Green qPCR. Se utilizaron muestras de 15 g de filete que se homogeneizaron con distinto número de larvas (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50) y 100 ml de solución de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 5 mM pH 8,0; dodecilsulfato sódico, SDS, al 0,2%; NaCl 200 mM; 80 mg/l de proteinasa K). Se optimizó el tratamiento de la muestra comparando tres ensayos: A) homogeneización mediante Stomacher-400 (Seward) durante 3 ciclos de 5 minutos sin incubación, B) homogeneización durante 3 ciclos de 5 minutos con incubación a 55 °C en agitación a 380 rpm durante 30 minutos; C) homogeneización durante 3 ciclos de 5 minutos con incubación a



55 °C en agitación a 350 rpm durante 90 minutos. Este procedimiento se realizó por duplicado en dos experimentos independientes.

### **3.4.3 Muestras de pescado comercial**

Se analizaron 25 especímenes de bacaladilla del Atlántico Noreste. Cada pescado fue dividido en cuatro partes: vísceras, musculatura anterodorsal, anteroventral y posterior. Cada una de las partes fue analizada por inspección visual (subapartado 3.1.1) y las larvas detectadas fueron cuantificadas e identificadas siguiendo los criterios morfológicos descritos en el subapartado 3.1.2. Posteriormente, para el estudio molecular, cada una de las partes del pescado analizadas por inspección visual fue homogeneizada junto con las larvas detectadas en las mismas empleando 100 ml de solución de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 5 mM pH 8,0; SDS al 0,2%; NaCl 200 mM; 80 mg/l de proteinasa K), en el caso de las vísceras se emplearon 50 ml de la solución de lisis. Para la homogenización de las muestras, se llevaron a cabo 3 ciclos de 5 minutos mediante Stomacher-400 (Seward).

### **3.4.4 Extracción de ADN**

La purificación del ADN se realizó a partir de 200 µl de homogeneizado de pescado empleando el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) y siguiendo las pautas descritas en el subapartado 3.2.3. Se realizaron dos extracciones de ADN independientes para cada homogeneizado.

### **3.4.5 QCYTCII SYBR Green qPCR**

Las muestras de pescado contaminadas experimentalmente y las muestras comerciales se analizaron mediante QCYTCII SYBR Green qPCR utilizando los cebadores QCYTCII-forward y QCYTCII-reverse (subapartado 3.2.6). Todas las muestras de analizaron por duplicado, considerándose positivo un valor de Cq <35.

### **3.4.6 Análisis estadístico**

Para desarrollar un modelo descriptivo que permita la cuantificación de larvas de *Anisakis*, se realizó una regresión lineal para los valores de Cq en función del número de larvas. Se aplicó un análisis de varianza univariado (ANOVA) para obtener diferentes grupos de valores de Cq asociados con un número determinado de larvas de *Anisakis* en las muestras contaminadas experimentalmente. Por otro lado, se llevó a cabo un análisis de Bland-Altman para evaluar la concordancia entre los dos métodos cuantitativos, visual y SYBR Green qPCR. Los límites de concordancia se calcularon utilizando la media y la desviación estándar de las diferencias entre las dos mediciones (Bland y Altman, 1999). Finalmente, se estudió la relación entre el número de larvas de *Anisakis* y las diferentes partes de los peces mediante un análisis de correspondencia simple. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SAS 9.4 (SAS Institute).

## **3.5 Estudio de la carga parasitaria de larvas de *Anisakis* en boquerones por inspección visual y aplicando el modelo descriptivo basado en SYBR Green qPCR**

### **3.5.1 Pescado analizado**

Se analizaron 60 ejemplares de boquerones del Atlántico Noreste procedentes de dos zonas, 30 de la costa de Portugal (zona FAO 27.9) y 30 del Golfo de Vizcaya (zona FAO 27.8). La mitad de cada lote se destinó para la cuantificación de larvas por inspección visual y la otra mitad para el estudio molecular.

### **3.5.2 Inspección visual**

Los boquerones analizados fueron diseccionados como se indica en el subapartado 3.1.1, y las larvas encontradas fueron identificadas morfológicamente siguiendo los criterios expuestos en el subapartado 3.1.2.

### **3.5.3 Tratamiento de las muestras de pescado comercial**

Los boquerones destinados a análisis molecular fueron homogenizados enteros, sin diseccionar, con 100 ml de tampón de lisis celular que contenía 100 mM Tris-HCl pH 8,0, EDTA 5 mM pH 8,0, SDS al 0,2%, NaCl 200 mM, 80 mg/l de proteinasa K (Roche Diagnostics), utilizando el Stomacher durante 3 ciclos de 5 minutos y se mantuvieron en agitación a 55 °C durante 90 minutos.

### **3.5.4 Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de 200 µl de homogenizado, empleando el kit comercial Wizard Genomic ADN Purification Kit (Promega) y siguiendo las instrucciones del fabricante, como se detalla en el subapartado 3.2.3.

### **3.5.5 Cuantificación molecular de larvas de *Anisakis***

Se utilizó la técnica QCYTCII SYBR Green qPCR específica para especies de *Anisakis*, que amplifica un fragmento del gen citocromo oxidasa subunidad II, empleando los cebadores QCYTCII-F y QCYTCII-R (subapartado 3.2.6). La cuantificación de larvas se realizó empleando el modelo descriptivo desarrollado y descrito en el capítulo de Resultados apartado 4.3, el cual permite extrapolar el número de larvas con base al valor Cq de la muestra.

### **3.5.6 Análisis estadístico**

La prueba no paramétrica U de Mann–Withney se empleó para detectar la relación entre el número de larvas cuantificadas por el método de detección visual y mediante el modelo descriptivo anteriormente mencionado, empleando el software SAS 9.4 (SAS INSTITUTE).





## IV. RESULTADOS

### 4.1 Development of SYBR Green qPCR techniques for the detection and quantification of anisakid nematodes

#### 4.1.1 Abstract

Fish are a source of beneficial nutrients for human health but may also contain parasites such as anisakids. As causative agents of gastrointestinal disorders and allergic reactions in humans, the presence of anisakid nematodes in fish requires control. In this work, two SYBR Green qPCR techniques, using primer sets ANIKIT and QCYTCII, which amplify a fragment of the ITS-1 and Cox-2, respectively, were optimized and compared for the detection and quantification of anisakid DNA in fish and fish-derived food. As these samples are complex matrices, specific protocols for sample preparation and DNA extraction were also developed. Commercial specimens of blue whiting (n=60), horse mackerel (n=25) and monkfish (n=1) were dissected to obtain nematode larvae, which were morphologically characterized. Flesh of *Anisakis*-free blue whiting and horse mackerel as well as meat of chicken and beef were used as negative controls. Two DNA extraction and purification procedures, the Wizard Genomic DNA Purification Kit and High Pure PCR Template Preparation Kit, were compared for DNA recovery and quality. Larvae of *Anisakis* species were identified molecularly by RFLP-PCR (ITS-1 region). The two SYBR Green qPCR techniques were studied for specificity, reproducibility and sensitivity. A binary system, consisting of a fish-derived food matrix experimentally spiked with *Anisakis simplex* (s.l.) larvae ( $1.36 \times 10^4$  to  $1.36 \times 10^{-3}$  ng of DNA of *A. simplex* (s.l.) per gram of food matrix) was constructed. A total of 1415 nematodes were morphologically identified as third-stage larvae (L3) of *A. simplex* (s.l.) (n=1128), *A. physeteris* (n=3), *Hysterothylacium* sp. (n=283) and *Pseudoterranova* sp. (n=1). The Wizard Genomic DNA Purification Kit provided the highest DNA concentrations for *Anisakis* larvae and the food matrix ( $P < 0.01$ ); quality was similar in both kits for all samples. RFLP-PCR allowed the identification of the sibling species of *A. simplex* (s.l.), *A. simplex* (s.s) (n=10) and *A. pegreffii* (n=5), and confirmed *A. physeteris* (n=3). Regarding specificity, amplification by ANIKIT primers was observed in *Pseudoterranova* and

*Anisakis*, whereas QCYTCII primers were specific for *Anisakis* species. No amplification was observed for *Hysterothylacium* using both primer sets. The two SYBR Green qPCR techniques showed similar levels of sensitivity and reproducibility, with a 95% limit of detection obtained for the ANIKIT and QCYTCII techniques of 0.18 ng (95%CI 0.08–0.98) and 0.30 ng (95%CI 0.15–1.50) of *Anisakis* DNA per gram of food matrix, respectively. These results suggest that the SYBR Green-based qPCR techniques constitute specific, sensitive and robust methods for the detection and quantification of anisakid DNA in fish and fish-derived products.

#### **4.1.2 Background**

Fish consumption is part of a balanced diet, as it is a complete food that provides nutrients of high biological value. Nevertheless, fish may contain intrinsic biological hazards, such as bacteria, viruses and parasites. Among these hazards, anisakids are parasites that have attracted increasing attention due to their implication as causative agents of human anisakiasis, a disease caused by the ingestion of raw or undercooked fish or squid containing third-stage larvae (Mattiucci and Nascetti, 2008). The gastrointestinal symptoms of the disease vary and may include nausea, diarrhea, vomiting, and severe epigastric pain. The allergic reactions elicited by larvae antigens could include urticaria, angioedema or anaphylactic shock (Audicana and Kennedy, 2008).

Furthermore, the presence of anisakid larvae in fish can reduce the commercial value of the product due to an unaesthetic appearance (Llarena-Reino et al., 2015). Food safety authorities stipulate that highly parasitized fish batches must be discarded, which would also cause economic losses (D'amico et al., 2014). In the fishing industry, food safety operators perform visual inspections of fish destined for human consumption to detect visible parasites and verify compliance of regulations; however, it has been reported that visual methods may have low efficiency (Llarena-Reino et al., 2012). Molecular approaches have gained prominence for accurate identification of anisakid species, several studies showing that the first and second internal transcribed spacer (ITS-1, ITS-2) and the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit II (Cox-2) gene are genetic markers useful for taxonomical classification of

these nematodes (Abattouy et al., 2016; D'Amelio et al., 2000; Mattiucci et al., 2009). More recently, real-time PCR (qPCR) using a primer/probe set has been applied to detect anisakids in fish (Herrero et al., 2011; Mossali et al., 2010), but the use of specific probes entails a significant cost for practical applications.

The quantitative capacity of qPCR methods with fluorescent dyes such as SYBR Green (Rodríguez-Lázaro and Hernández, 2013) could facilitate the detection and quantification of *Anisakis* larvae in fish and fish-derived food, avoiding the use of expensive labeled probes. Although DNA-based methods such as qPCR are highly specific, reproducible, and sensitive and have a high discriminatory power, they are strongly limited by the presence of inhibitors in food (Pizcata et al., 2019). In this work, two SYBR Green qPCR techniques, using primer sets ANIKIT and QCYTCII, which amplify a fragment of the ITS-1 and Cox-2, respectively, were optimized with a complex fish food-matrix for the detection and quantification of anisakid DNA in fish and fish-derived food.

#### 4.1.3 Results

##### Larval isolation and morphological identification

The parasitological analysis of 60 specimens of Northeast Atlantic blue whiting, 25 of West Mediterranean horse mackerel and one specimen of monkfish resulted in the isolation of 1,415 larvae, which were morphologically identified as *A. simplex* (s.l.), *A. physeteris*, *Hysterothylacium* sp. and *Pseudoterranova* sp. (Figure 6).

##### *A. simplex* (s.l.)

The morphological characteristics of the 1,128 larvae coincided with those of the third-stage (L3) larvae of *A. simplex* (s.l.). The body of this type of larvae was cylindrical in shape and measured 10.01–25.33 (16.41±3.24) mm in length and 0.26–0.62 (0.55±0.08) mm in width. The larvae were covered with a rigid cuticle that has an annular transverse striation. The pseudolips were inconspicuous, with a prominent boring tooth at the anterior end. The oesophagus had an anterior muscular part, which measured 1.38–2.27 (1.85±0.23) mm long and 0.10–0.27 (0.16±0.04) mm wide, and a glandular ventriculus, which measured 0.71–0.95



(0.83±0.13) mm long and 0.15-0.35 (0.27±0.04) mm wide, with an oblique oesophago-intestinal junction. The excretory pore was situated ventrally below the larval tooth. The tail was 0.05-0.12 (0.09±0.01) mm long and ended in a short mucron.

*A. physeteris*

Three larvae with morphological features corresponding to L3 larvae of *A. physeteris* were identified. The body measured 16.00–20.00 (18.33±2.08) mm in length and 0.49–0.75 (0.66±0.15) mm in width. These larvae showed a developed tooth in the apical region, with rudimentary lips and an excretory pore slightly below the mouth. The oesophagus was 1.55–2.20 (1.88±0.32) mm long and 0.18-0.21 (0.20±0.02) mm wide, and the short glandular ventriculus measured 0.52–0.78 (0.64±0.13) mm long and 0.29-0.36 (0.33±0.04) mm wide. The tail was slightly elongated, measuring 0.21-0.31 (0.25±0.05), conical in shape, and a mucron was absent.

*Hysterothylacium* sp.

A total of 283 L3 stage larvae of *Hysterothylacium* sp. were identified. Larval bodies measured 5.08-15.5 (10.71±2.51) mm in length and 0.10-0.38 (0.26±0.05) mm in width. The cephalic end was rounded. Rudimentary buccal lips and a non-prominent boring tooth were observed. The nerve ring was located 0.27–0.46 (0.35) mm from the anterior end. The excretory pore was located below the nerve ring. The muscular oesophagus was 0.36-1.20 (0.90±0.26) mm long and 0.06-0.14 (0.09±0.02) wide, followed by a relatively round ventriculus. The ventricular appendix was 0.34-0.81 (0.52±0.11) long and the intestinal caecum had a similar length, 0.29-0.80 (0.51±0.10). The tail was conically shaped and 0.19–0.21 (0.15±0.05) long, terminating in a mucron.

*Pseudoterranova* sp.

The single larva identified as *Pseudoterranova* sp. was dark red, with a length of 36 mm and maximum width of 0.92 mm. The lips were inconspicuous and possessed a boring tooth. The excretory pore was located between the subventral lips. The muscular oesophagus was 2.07 mm long followed by a glandular ventriculus 1 mm long and 0.43 mm wide. The intestinal

caecum was 0.8 mm long, extending anteriorly slightly further than the anterior margin of the ventriculus. The tail was bluntly rounded with a small mucron.

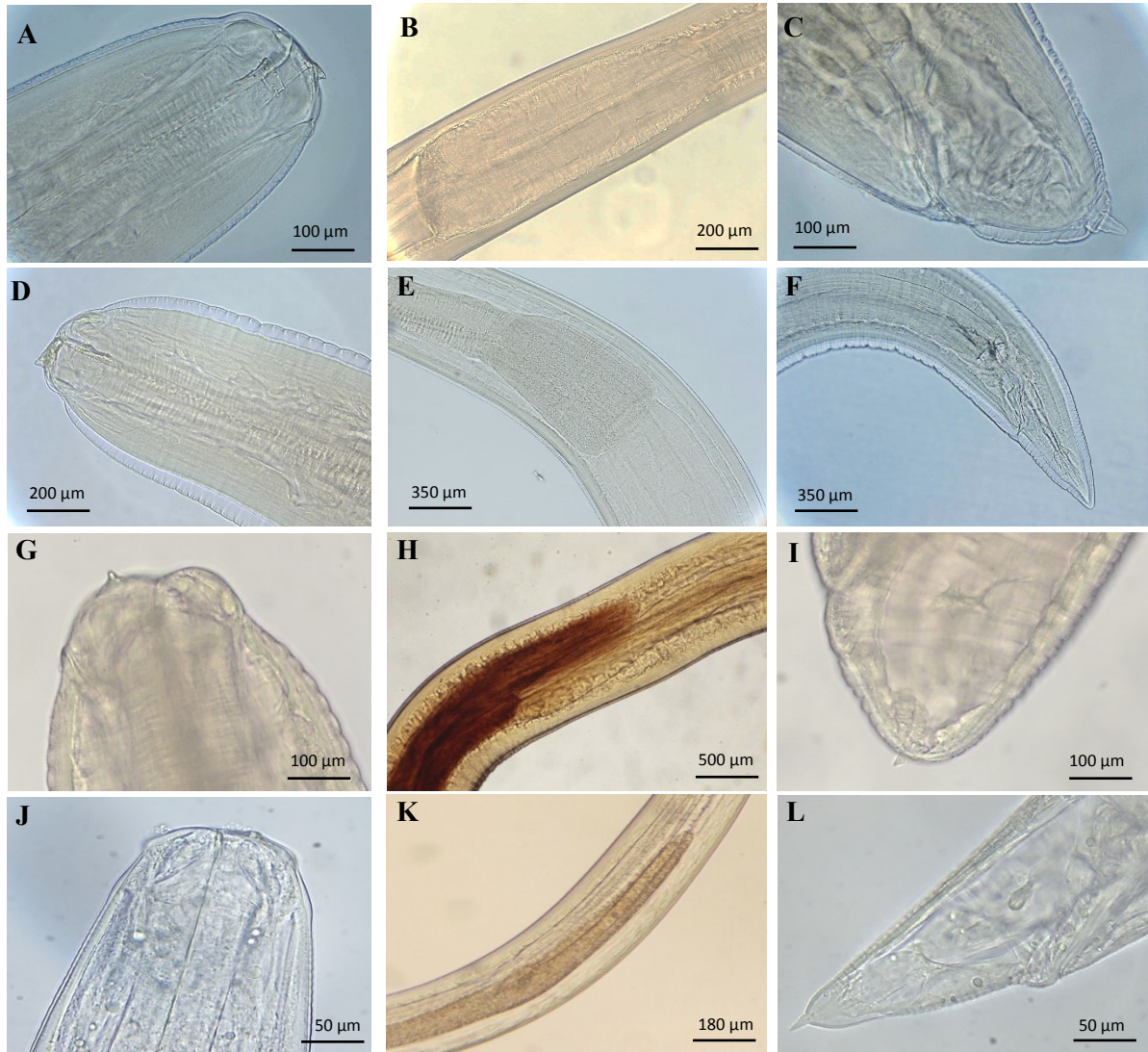


Figure 6. Microphotographs showing morphological features of L3 larvae. A-C, *A. simplex* (s.l.): A) anterior end showing the boring tooth; B) anterior part showing the oesophagus and ventricle; C) posterior end showing the terminal mucron. D-F, *A. physeteris*: D) anterior end showing the boring tooth; E) anterior part showing the oesophagus and ventricle; F) posterior end without a mucron. G-I, *Pseudoterranova* sp.: G) anterior end showing the boring tooth; H) anterior part showing the intestinal caecum and ventricle; I) posterior end showing the terminal mucron. J-L, *Hysterothylacium* sp.: J) anterior end showing the boring tooth; K) anterior part showing the intestinal caecum and ventricular appendix; L) posterior end showing the mucron.

### Evaluation of the performance of the DNA extraction methods

DNA extraction using the Wizard Genomic DNA Purification Kit and the High Pure PCR Template Preparation Kit was compared in *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae, as well as in fish-derived food samples such as “gulas”, crab sticks, croquettes and burgers. In *Anisakis* larvae, the highest DNA concentrations were obtained using the Wizard Genomic DNA Purification Kit ( $P<0.01$ ), while no differences were found between kits for *Hysterothylacium*; regarding DNA quality, no differences were observed between kits (Figure 7). In the analysis of 48 fish-derived food samples, the Wizard Genomic DNA Purification Kit provided the highest DNA concentrations, which ranged from 27 to 93 ng/ $\mu$ l, the crab sticks standing out, while the High Pure PCR Template Preparation Kit resulted in concentrations ranging from 18 to 26 ng/ $\mu$ l ( $P<0.01$ ). The quality of DNA samples extracted with both kits were similar (Figure 8). Based on these results, the Wizard Genomic DNA Purification Kit was chosen for extractions in subsequent studies.

### Molecular identification of *Anisakis* larvae

Restriction fragment analysis of the 15 *A. simplex* (s.l.) larvae studied by RFLP-PCR revealed two distinct banding patterns, which allowed the identification of the two sibling species *A. simplex* (s.s) ( $n=10$ ) (620, 250, 80 bp) and *A. pegreffii* ( $n=5$ ) (370, 300, 250 bp). The larvae of *A. physeteris* ( $n=3$ ) were also tested to confirm the species identification and showed the characteristic pattern (380, 290, 250 bp) (Figure 9).

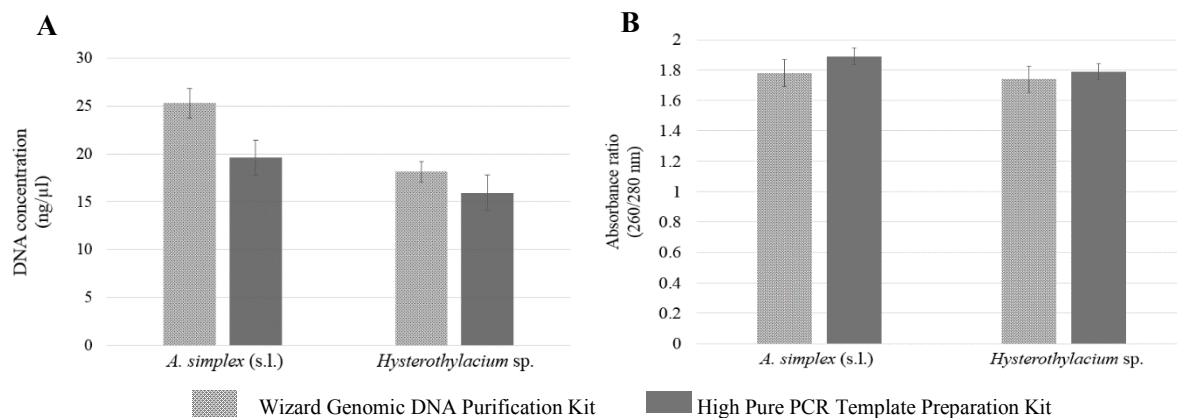


Figure 7. Average DNA concentration (A) and purity of DNA extraction (B) from larval specimens ( $n=10$ ) performed by two commercial DNA extraction kits.

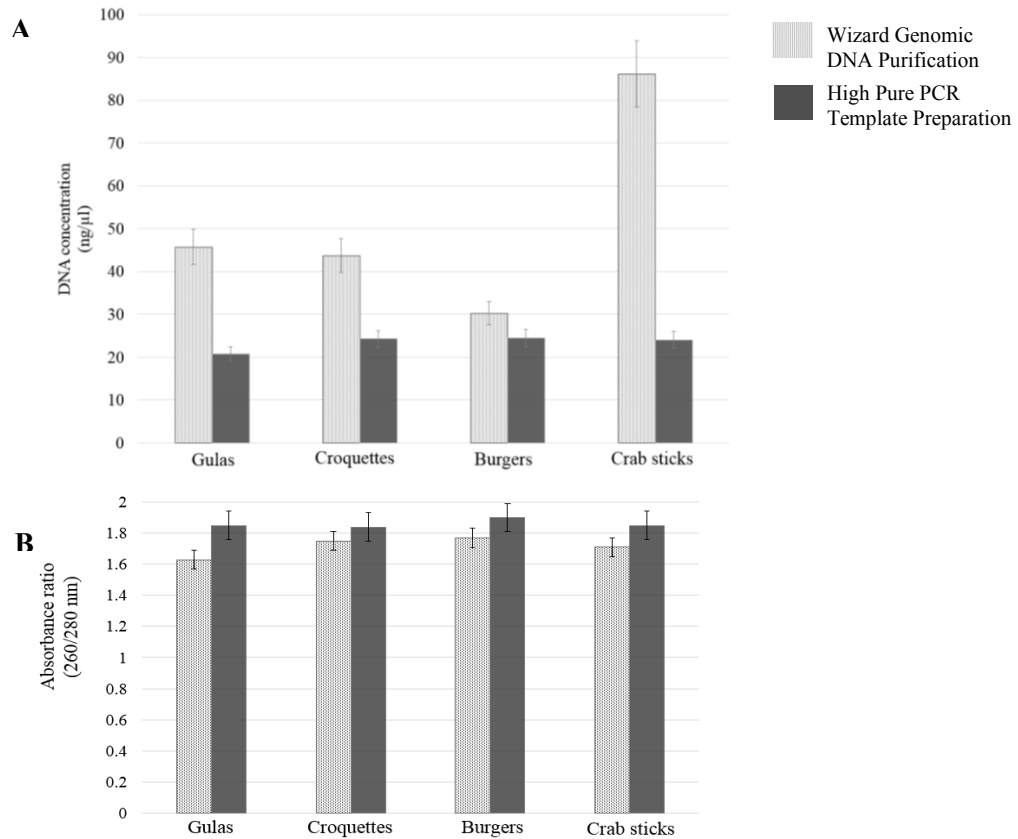


Figure 8. Average DNA concentration (A) and purity of DNA extraction (B) from fish-derived food: “gulas” (n=16), croquets (n=8), burgers (n=8) and crab sticks (n=16) performed by two commercial DNA extraction kits.

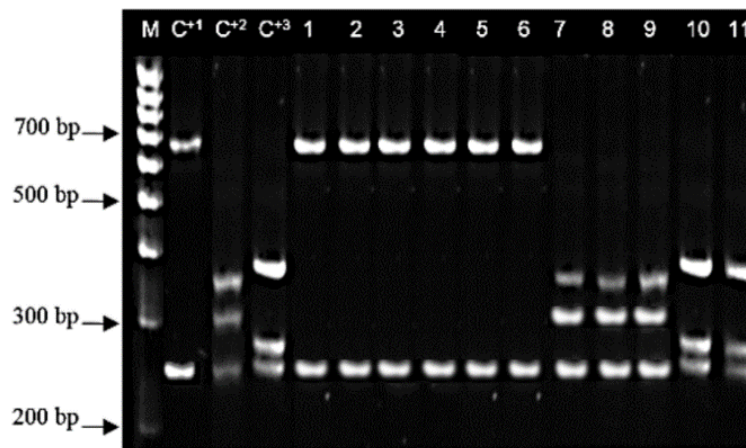


Figure 9. Restriction fragment length polymorphism patterns of the ITS region of the rDNA of *Anisakis* larvae using the *Hinf*I restriction enzyme. M: molecular ladder of 1000 bp, C<sup>+</sup>1: positive control of *A. simplex* (s.s.); C<sup>+</sup>2: positive control of *A. pegreffii*; C<sup>+</sup>3: positive control of *A. physeteris*; Lines 1-6: *A. simplex* (s.s.) (620, 250, 80 bp); Lines 7-9: *A. pegreffii* (370, 300, 250 bp); Lines 10-11 *A. physeteris* (380, 290, 270 bp).

### Setup of SYBR Green qPCR techniques

In the specificity assay, *Anisakis*-free blue whiting and horse mackerel flesh, chicken and beef meat, and molecular grade water were used as negative controls. In the analysis of these samples using both SYBR Green qPCR techniques (ANIKIT and QCYTCII), a C<sub>q</sub> value of 35 was obtained, which was considered a negative result (Table 2). With respect to nematode species, *Hysterothylacium* sp. did not amplify with either technique, while *Pseudoterranova* sp. was detected only by ANIKIT primers. A positive reaction was observed for the three analyzed species of *Anisakis*, *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* and *A. physeteris*, using both primer sets, although a higher C<sub>q</sub> value was obtained with QCYTCII for the last species. The melting temperature was 72 °C for ANIKIT and 76 °C for QCYTCII.

Table 2. Specificity results for the SYBR green qPCR techniques with ANIKIT and QCYTCII primers using larvae of different anisakid species and negative controls

Sample*	ANIKIT C <sub>q</sub> ±SD <sup>†</sup>	QCYTCII C <sub>q</sub> ±SD <sup>†</sup>
<i>Anisakis simplex</i> (sensu stricto) (n=10)	14.38±0.62	14.67±0.66
<i>Anisakis pegreffii</i> (n=5)	14.27±0.55	14.89±0.45
<i>Anisakis physeteris</i> (n=3)	14.67±0.04	21.46±0.29
<i>Pseudoterranova</i> sp. (n=1)	13.21±0.10	35.00±0.00
<i>Hysterothylacium</i> sp. (n=10)	35.00±0.00	35.00±0.00
Blue whiting	35.00±0.00	35.00±0.00
Horse mackerel	35.00±0.00	35.00±0.00
Chicken	35.00±0.00	35.00±0.00
Beef	35.00±0.00	35.00±0.00
Water molecular grade	35.00±0.00	35.00±0.00

C<sub>q</sub>, quantification cycle; <sup>†</sup> standard deviation; n, number of larvae

\*The C<sub>q</sub> values were measured in three independent experiments

To carry out linearity and sensitivity studies, a binary system was prepared consisting of a food matrix (crab sticks) experimentally spiked with *A. simplex* (s.l.) larvae, with concentrations from 1.36 x 10<sup>4</sup> to 1.36 x 10<sup>-3</sup> ng of *Anisakis* DNA per gram. In the linearity test, the amplification behavior showed a linear range for both SYBR Green qPCR techniques in the first six points, corresponding to logarithms of *Anisakis* DNA concentration from 1.36

$\times 10^4$  to  $1.36 \times 10^{-1}$  ng per gram of spiked food matrix. Efficiency was determined as 102.65% for the ANIKIT system and 96.84% for QCYTCII (Figure 10).

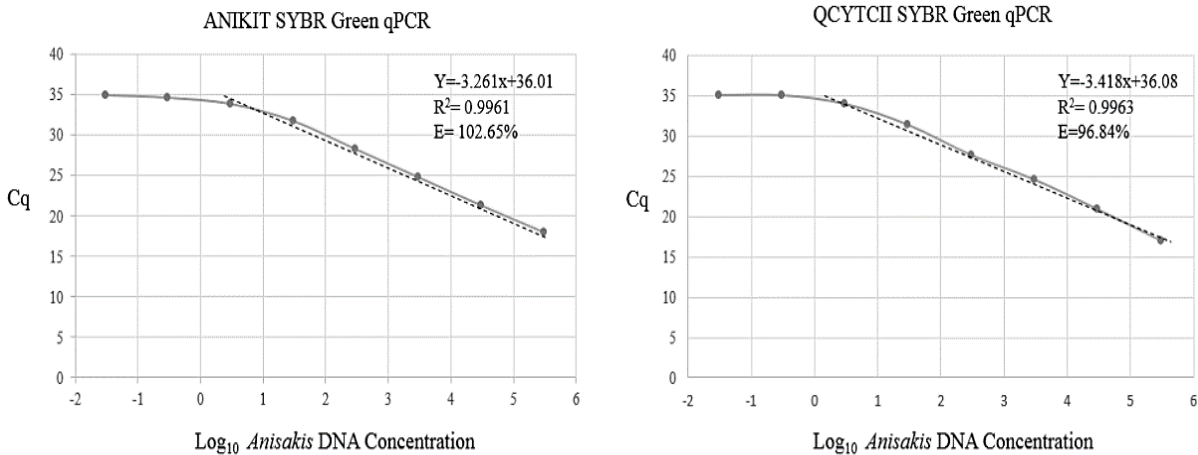


Figure 10. Standard curves constructed by plotting the mean Cq values with respect to the logarithm<sub>10</sub> of the *Anisakis* DNA concentrations (10-fold serial dilutions from  $1.36 \times 10^4$  to  $1.36 \times 10^{-3}$  ng per gram of binary system) in six independent experiments. The linear range (---), correlation coefficient ( $R^2$ ) and efficiency (E) are indicated.

For the reproducibility and analytical sensitivity analysis, each concentration of *Anisakis* DNA in the binary system was tested 24 times with both SYBR Green qPCR techniques. The low standard deviation values (0.11-0.82) indicated both techniques were highly reproducible. Regarding the sensitivity estimated by PROBIT analysis, the limit of detection (LOD) at 95% of confidence for the ANIKIT and QCYTCII techniques was found at 0.18 ng (95%CI 0.08–0.98) and 0.30 ng (95%CI 0.15–1.50) of *Anisakis* DNA per gram of food matrix, respectively. The 50% LOD was determined at 0.02 ng (95%CI 0.01–0.045) for ANIKIT and 0.03 ng (95%CI 0.018-0.067) for QCYTCII. Statistically, no differences were found in the LOD between the two SYBR Green qPCR techniques ( $P < 0.05$ ) (Figure 11).



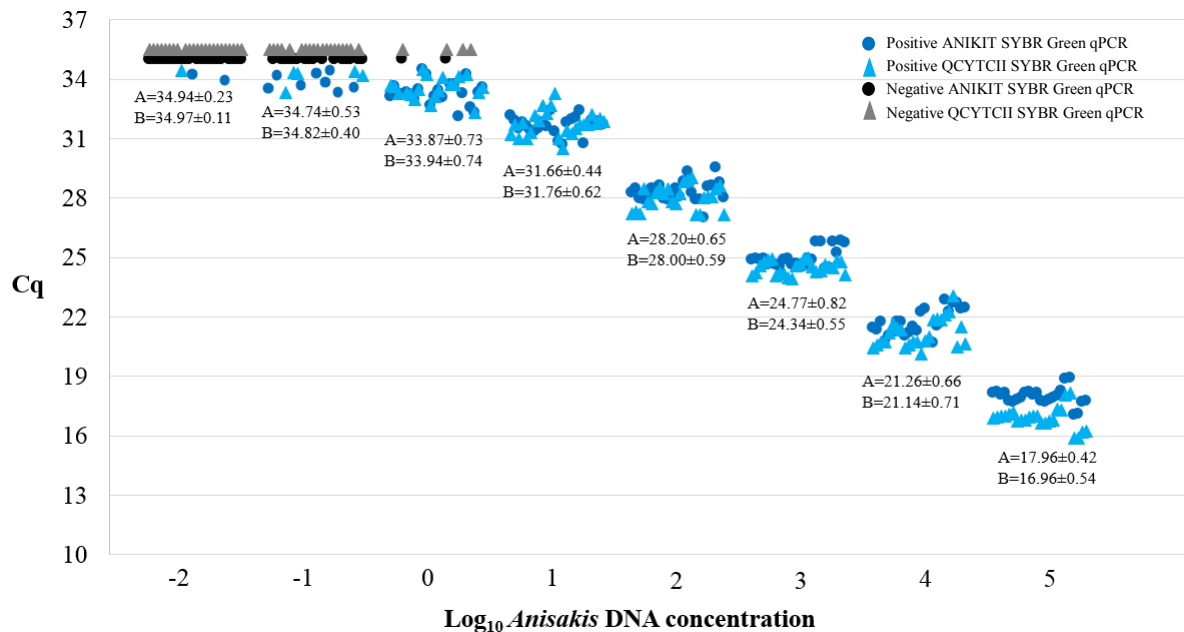


Figure 11. Amplification pattern constructed by plotting the Cq values with respect to the logarithm<sub>10</sub> of the *Anisakis* DNA concentrations (10-fold serial dilutions from  $1.36 \times 10^4$  to  $1.36 \times 10^{-3}$  ng per gram of food matrix). Each concentration was tested 24 times in duplicate. A, Mean Cq value  $\pm$  standard deviation for ANIKIT SYBR Green qPCR; B, Mean Cq value  $\pm$  standard deviation for QCYTCII SYBR Green qPCR.

#### 4.1.4 Discussion

Anisakids have been ranked by the Food and Agricultural Organization (FAO) and the World Health Organization (WHO) as foodborne parasites of global importance due to their public health, socioeconomic and trade impact (FAO and WHO, 2014). While most cases of human anisakiasis are caused by *Anisakis* species, the pathogenic potential of *Pseudoterranova* species has also been proved, although they seem to be less invasive and cause milder symptoms (Hochberg and Hamer, 2010). The prevention and control of these parasites throughout the food supply depend on the development and application of reliable detection and quantification methods.

In this study, two qPCR techniques using SYBR Green were set up to detect anisakid DNA in fish food. DNA extraction is a critical step in the development of reliable techniques, whose optimization relies on DNA purity and concentration (Di Pinto et al., 2007). In this

work, two DNA extraction methods were tested, and the Wizard Genomic DNA Purification Kit proved to be the most suitable for the analysis of fish-derived food matrices. This kit allowed the extraction of large quantities of high-quality DNA, and the 260/280 absorbance ratios showed the efficient removal of potential inhibitors that could interfere with subsequent downstream processing. Comparing the same kits as used in this study for the analysis of dry/fermented sausages, Djurkin-Kušec et al. (2015) obtained the highest DNA concentration using the High Pure PCR Template Kit, but the Wizard Genomic DNA Purification Kit provided the most satisfactory 260/280 absorbance ratio. In a study on raw beef meat products, Yalçinkaya et al. (2017) compared four commercial DNA extraction methods and obtained the highest concentration with the Wizard Genomic DNA Purification Kit, with a quality similar to our results. Similarly, Nesvadbová et al. (2010) reported that this kit offered the highest DNA yield and quality for the analysis of chicken-derived products.

Regarding the specificity of the SYBR Green qPCR techniques, ANIKIT primers were able to amplify the *Anisakis* and *Pseudoterranova* species studied, while QCYTCII primers showed specificity only for the detection of *Anisakis* species. The differences in specificity are related to the region amplified by each pair of primers. ANIKIT matches a fragment of the ITS-1, which is genetically similar in *Anisakis* and *Pseudoterranova* species (Mossali et al., 2010). On the other hand, QCYTCII amplifies a fragment of Cox-2, which is a region of consensus among *Anisakis* species and differs from the sequence of *Pseudoterranova* (Lopez and Pardo, 2010). Neither of the primers used amplified *Hysterothylacium*, which is a useful advantage, as this parasite is extremely prevalent in consumed fish (Angelucci et al., 2011; Pekmezci et al., 2013; Barcala et al., 2018). A high number of *Hysterothylacium* larvae were detected in our study: 283 vs 1,131 *Anisakis* larvae in 80 blue whiting and horse mackerel from Spanish coasts, which represents 20% of the total larvae recovered. Although *Hysterothylacium* is not considered pathogenic for humans, some studies have reported cross-reaction with *Anisakis* in immunological tests (Fernández-Caldas et al., 1998; Valero et al., 2003). In addition, *Hysterothylacium* larvae could be morphologically misidentified as



*Anisakis* if the visual inspection is performed by operators with a lack of parasitological experience.

In fishing grounds of southern Europe, the use of QCYTCII primers would be appropriate, as species of *Anisakis* are common in both the Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean, whereas species of *Pseudoterranova* have not been recorded (Mattiucci et al., 2004; 2007; 2008). Nevertheless, some studies have reported that *Anisakis* and *Pseudoterranova* species may coexist in several marine geographical locations, including in Brazil, England, Wales (Knoff et al., 2001; Moore, 2001), the Madeira Archipelago in Portugal (Costa et al., 2014), Chile (Torres et al., 2014), Australia (Shamsi, 2014), Argentina and Uruguay (Irigoitia et al., 2018). In polar waters, both in the Northern and Southern hemisphere, *Pseudoterranova* species have the highest prevalence (Mattiucci and Nascetti, 2008), so both ANIKIT and QCYTCII primers could be useful for specific detection in fish from these areas.

The two sibling species of the complex *A. simplex* (s.l.) presented the same amplification pattern by both qPCR methods, which is important as both *A. simplex* (s.s.) and *A. pegreffii* have been incriminated as pathological in humans (Mattiucci et al., 2018) and are commonly reported in commercial fish from European waters (Cipriani et al., 2015; Mattiucci et al., 2015; Piras et al., 2014). Both SYBR Green qPCR techniques showed a high analytical sensitivity, with very similar LODs, detecting less than 1 ng of *A. simplex* (s.l.) DNA per gram of matrix, as seen in the confidence intervals of the LODs. Also, the high reproducibility shown by both techniques ensures the reliability of the results obtained.

The optimized SYBR Green qPCR assays could represent a cost-effective alternative to the use of labeled probes, as only a pair of primers are necessary to carry out the amplification (Ponchel et al., 2003). The use of SYBR Green as a fluorescent dye has been tested for the detection of other foodborne pathogens by qPCR, as in the case of *Salmonella* spp. in raw milk and drinking water (Nam et al., 2005), *Vibrio vulnificus* in shellfish (Panicker et al., 2004) and *Shigella* spp. in different types of food samples (Mokhtari et al., 2013), obtaining specificity and sensitivity results similar to standard methods. In the present study, the melting curve analysis allowed the specific quantification of the targeted parasites, which is

important, as a correct use of SYBR Green requires verification of the specificity of the amplified signal. These results indicate that the optimized SYBR Green qPCR techniques, ANIKIT and QCYTCII, have a very similar performance and could be valid alternatives for anisakid monitoring in food matrices.

## 4.2 Detection of *Anisakis* nematode parasites in commercial fish-derived food: quantitative SYBR Green and TaqMan qPCR techniques

### 4.2.1 Abstract

The extensive presence of anisakids in fish for human consumption is a challenge for food safety and quality control. The aim of this study was to assess and compare the performance and efficiency of a QCYTCII SYBR Green and a TaqMan qPCR assay, targeting the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit II gene, for the detection and quantification of *Anisakis* DNA in processed fish by-products acquired in retail stores. Nematode third-stage larvae (L3) of *A. simplex* (s.s.) (n=10), *A. pegreffii* (n=5), *A. physeteris* (n=3), *Hysterothylacium* sp. (n=10) and *Pseudoterranova* sp. (n=1) were used in specificity assays. Analytical sensitivity and reproducibility were evaluated using a binary system consisting of fish-derived commercial food spiked with larvae of *A. simplex* (s.l.) ( $1.36 \times 10^4$  to  $1.36 \times 10^{-3}$  ng of DNA of *Anisakis* per gram of food matrix). Both assays proved to be specific for the three analyzed *Anisakis* species. After a PROBIT analysis, a limit of detection (LOD) of 0.30 ng ( $95\%CI$  0.15–1.50) of *A. simplex* (s.l.) DNA per gram of food matrix was found for SYBR Green qPCR, and a similar value of 0.25 ng/g ( $95\%CI$  0.12-1.35) was obtained for the TaqMan PCR assay. An operative LOD was set at 1.50 ng/g for the former and 1.35 n/g for the latter. SYBR Green qPCR was selected as a more cost-effective assay and used to quantify the *Anisakis* DNA concentration in fish-derived food samples acquired in retail stores, namely crab sticks, “gulas”, croquettes and burgers; a total of 180 food samples from 15 commercial brands were studied. *Anisakis* DNA was detected in 4 out of 5 “gula”, 1 out of 3 croquette and 4 out of 6 crab stick brands, whereas no DNA was identified in the sole burger brand studied. The analyzed surimi-based products, “gulas” and crab sticks, showed the highest *Anisakis* burden ( $5.86 \pm 0.69$  and  $4.68 \pm 0.73$  ng of *Anisakis* DNA per gram of food, respectively). Our results indicate that the optimized QCYTCII SYBR Green qPCR technique is an accurate and sensitive method that may improve detection of *Anisakis* in fresh and processed products.

#### 4.2.2 Background

The presence of *Anisakis* species in fish for human consumption is a public health problem due to their role in gastrointestinal infections and allergic reactions (EFSA, 2010). The clinical manifestations of gastro-intestinal anisakiasis, caused by living larvae, include epigastric pain, nausea, vomiting and diarrhea (Baird et al., 2014). Allergic reactions, caused by live and dead larvae, are characterized by urticaria, angioedema, bronchospasm and even anaphylactic shock (Audicana et al., 2002). The *A. simplex* proteome is complex and contains several proteins with allergenic potential; to date, more than fourteen types of *A. simplex* allergens have been described (Fæste et al., 2014). The major allergens are considered to be Ani s 1 and Ani s 7; however, minor allergens are also significant, as their thermo-resistance allows them to remain unchanged during food processing (Lee, 2016).

Due to the difficulties in preventing *Anisakis* contamination throughout the supply chain, as no maritime area can be presumed free of *Anisakis*, the presence of larvae in fishery products is considered a natural condition, with a “presumption of infection”, according to the European Food Safety Authority (EFSA, 2010). There is therefore an important need to develop simple and effective methods to ensure the quality and safety of fishery products. Food safety authorities currently recommend different analytical methods based on visual detection and identification of whole or large fragments of larvae in fish (Fraulo et al., 2014; Levsen et al., 2005; Yang et al., 2013). Such an approach is not suitable for determining the presence of the parasite in processed fish-based food products, due to the processing conditions their production usually entails.

New strategies for the fast detection of fish-borne parasites are molecular-based techniques that can also be applied to processed food products, regardless of thermal treatments, such as canning and freezing, or mechanical handling, such as sieving and chopping. PCR-based assays have been widely used for the taxonomic identification of larvae at the genus and species level (Chen et al., 2008; Zhu et al., 1998), but real-time PCR (qPCR) using specific probes has been applied only recently for anisakid detection in fish and fish-derived products (Herrero et al., 2011; Lopez and Pardo, 2010; Mossali et al., 2010).

In the present study, we compared performance and efficiency of two qPCR assays, SYBR Green and TaqMan, using QCYTCII primers targeting the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit II gene. The SYBR Green method was applied in different types of fish-derived food samples acquired in retail stores to detect and quantify the *Anisakis* DNA burden.

#### 4.2.3 Results

The SYBR Green qPCR assay was evaluated according to specificity, sensitivity and reproducibility and the results were compared with those obtained when a specific probe was used.

##### Specificity study

No amplification was detected in the blue whiting and horse mackerel flesh, chicken and beef meat, or in the molecular grade water analyzed. In the SYBR Green qPCR technique, all of these samples gave a Cq of 35, while a Cq of 40 was obtained in the TaqMan assay, and thus these values were considered negative. With regard to anisakid larvae, a positive reaction was detected in the three species of *Anisakis* studied using the SYBR Green qPCR, *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* and *A. physeteris*, with mean Cq values of 14.67, 14.89 and 21.46, respectively; the melting temperature (T<sub>m</sub>) point was at 76 °C. The TaqMan PCR assay gave the same results, with a uniform lateness of approximately two cycles. Larvae of the two other genera studied, *Pseudoterranova* and *Hysterothylacium*, were not amplified by either of the two techniques employed (Table 4).

##### Analytical sensitivity and reproducibility study

The analysis of the binary system consisting of fish-derived commercial food spiked with different concentrations of *A. simplex* (s.l.) DNA ( $1.36 \times 10^4$ - $1.36 \times 10^{-3}$  ng of DNA per gram of food matrix), using the SYBR Green and TaqMan qPCR assays in six independent experiments, showed a linear behavior from  $1.36 \times 10^4$  to  $1.36^{-1}$  ng of *A. simplex* (s.l.) DNA per gram, with an efficiency of 96.59% and 100.5%, respectively, as shown in Figure 11.

Table 4. QCYTCII SYBR Green qPCR and TaqMan qPCR results, expressed in Cq, obtained from different species of larvae and negative control samples

Sample	Cq± SD	
	SYBR Green qPCR	TaqMan qPCR
<i>Anisakis simplex</i> (s. s.) (10)	14.67±0.66	16.36±0.72
<i>Anisakis pegreffii</i> (5)	14.89±0.45	16.88±0.55
<i>Anisakis physeteris</i> (3)	21.46±0.29	23.07±0.16
<i>Hysterothylacium</i> sp. (10)	35.00±0.00	40.00±0.00
<i>Pseudoterranova</i> sp. (1)	35.00±0.00	40.00±0.00
Larvae-free blue whiting	35.00±0.00	40.00±0.00
Larvae-free horse mackerel	35.00±0.00	40.00±0.00
Chicken meat	35.00±0.00	40.00±0.00
Beef meat	35.00±0.00	40.00±0.00
Molecular grade water	35.00±0.00	40.00±0.00

Cq, mean quantification cycle value obtained after three independent experiments; SD, standard deviation; (), number of analyzed larvae

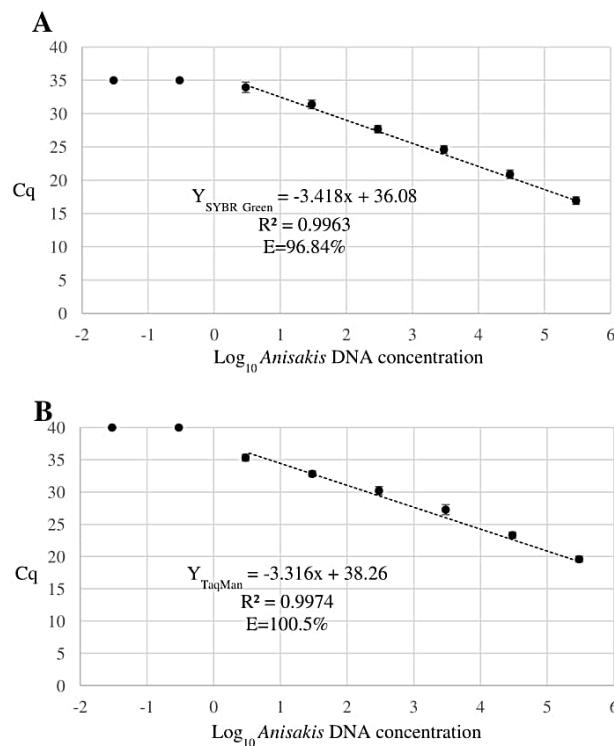


Figure 11. Representative amplification curves obtained by plotting the mean Cq values with respect to the logarithm<sub>10</sub> of the *Anisakis* DNA concentrations from 1.36 x10<sup>4</sup> to 1.36 x10<sup>-3</sup> ng of *A. simplex* (s.l.) DNA/g of food matrix with QCYTCII SYBR Green (A) and TaqMan qPCRs (B) in six independent experiments. The correlation coefficient R<sup>2</sup> and efficiency E are indicated.

Based on the PROBIT analysis carried out with the 24 DNA extracts for each *A. simplex* (s.l.) concentration per gram of food matrix, the 95% LOD of the SYBR Green qPCR technique (0.30 ng,  $95\%CI$  0.15–1.50) of *A. simplex* (s.l.) DNA per gram of food matrix closely matched that of the TaqMan PCR assay (0.25 ng/g,  $95\%CI$  0.12-1.35). An operative LOD was set at 1.50 (Cq= 31.75) and 1.35 (Cq= 33.07) ng of *A. simplex* (s.l.) DNA per gram of sample for SYBR Green and TaqMan qPCR, respectively, corresponding to the upper confidence limit, to increase the reliability of the assays. Low coefficients of variation were detected at all concentrations, indicating both methods were highly reproducible (Table 5).

Table 5. Sensitivity and reproducibility results of QCYTCH SYBR Green and TaqMan qPCR techniques applied to the food matrix with a known *A. simplex* (s.l.) DNA concentration

<i>Anisakis</i> DNA concentration (ng/g)	SYBR Green qPCR			TaqMan qPCR		
	Positive/ Tested*	Cq $\pm$ SD	CV (%)	Positive/ Tested*	Cq $\pm$ SD	CV (%)
1.36x10 <sup>4</sup>	24/24	16.96 $\pm$ 0.54	3.18	24/24	19.63 $\pm$ 0.73	3.75
1.36 x10 <sup>3</sup>	24/24	21.14 $\pm$ 0.71	3.40	24/24	23.10 $\pm$ 0.53	2.29
1.36 x10 <sup>2</sup>	24/24	24.34 $\pm$ 0.55	2.27	24/24	27.01 $\pm$ 0.71	2.64
1.36 x10 <sup>1</sup>	24/24	28.00 $\pm$ 0.59	2.13	24/24	30.14 $\pm$ 0.45	1.51
1.36	24/24	31.76 $\pm$ 0.62	1.97	24/24	33.07 $\pm$ 0.44	1.35
1.36 x10 <sup>-1</sup>	20/24	33.94 $\pm$ 0.74	2.19	21/24	35.56 $\pm$ 1.72	4.84
1.36x10 <sup>-2</sup>	5/24	34.82 $\pm$ 0.40	1.16	4/24	38.75 $\pm$ 2.21	5.70
1.36x10 <sup>-3</sup>	1/24	34.97 $\pm$ 0.11	0.32	3/24	39.34 $\pm$ 1.72	4.37

Cq, mean quantification cycle value; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

\*All qPCR analyses were performed in duplicate.

#### *Anisakis* DNA detection in fish-derived commercial food by SYBR Green qPCR

The SYBR Green qPCR technique was selected for the analysis of 180 samples of different commercial fish-derived food, including 5 brands of “gulas” (A, B, C, D and F), 1 of hamburgers (E), 3 of croquettes (A, C and G) and 6 of crab sticks (A, B, C, D, H and I). *Anisakis* DNA was detected in 60% ( $95\%CI$  52-67) of the analyzed brands: 4 out of 5 “gulas”, 1 out of 3 croquette and 4 out of 6 crab stick, whereas no DNA was identified in the sole burger brand studied. Data analysis showed significant differences ( $P<0.001$ ) in Cq and *Anisakis* DNA concentration in the analyzed food: the highest variability was found in crab sticks, and brand A stood out with a higher concentration (12.39 $\pm$ 1.45 ng of *Anisakis* DNA

per gram of food) than brands B, C and H and the negative brands C and I. Globally, the analysis of variance showed significant differences between the four types of analyzed food, “gulas” and crab sticks being the most positive with  $5.86 \pm 0.69$  and  $4.68 \pm 0.73$  ng of *Anisakis* DNA per gram of food, respectively. In the global analysis by brand, statistical differences were also found, with brand B standing out ( $10.26 \pm 3.43$  ng of *Anisakis* DNA per gram of food). For those food samples whose Cq value was higher than that of the operative LOD, the *Anisakis* DNA concentration was not quantified (Table 6).

Table 6. *Anisakis* DNA concentration in studied commercial fish-derived food detected by the QCYTCII SYBR Green qPCR assay

FACTOR	Cq*	<i>Anisakis</i> DNA concentration**
<b>Commercial Food x Brand</b> <sup>+</sup>		
Gulas x A	$28.98 \pm 0.25^a \#$	$5.82 \pm 0.36^a \#$
Gulas x B	$29.12 \pm 0.20^a$	$6.40 \pm 0.55^a$
Gulas x C	$29.65 \pm 0.20^a$	$5.90 \pm 0.71^a$
Gulas x D	$29.98 \pm 0.22^a$	$3.54 \pm 0.49^b$
Gulas x F	$35.00 \pm 0.24^b$	ND
Croquettes x A	$30.91 \pm 0.22^a$	$2.08 \pm 0.33^b$
Croquettes x C	$35.00 \pm 0.26^b$	ND
Croquettes x G	$35.00 \pm 0.24^b$	ND
Burgers x E	$35.00 \pm 0.24^b$	ND
Crab sticks x A	$28.18 \pm 0.20^c$	$12.39 \pm 1.45^c$
Crab sticks x B	$30.30 \pm 0.22^a$	$3.41 \pm 0.61^b$
Crab sticks x C	$35.00 \pm 0.24^b$	ND
Crab sticks x D	$29.51 \pm 0.24^a$	$7.85 \pm 0.27^a$
Crab sticks x H	$29.20 \pm 0.22^a$	$7.40 \pm 1.49^a$
Crab sticks x I	$35.00 \pm 0.24^b$	ND
<b>Global by Commercial Food</b>		
Gulas	$30.50 \pm 0.24^a \#$	$5.86 \pm 0.69^a \#$
Croquettes	$33.16 \pm 0.27^b$	NQ
Burgers	$35.00 \pm 0.24^c$	ND
Crab sticks	$31.24 \pm 0.25^a$	$4.68 \pm 0.73^a$
<b>Global by Brand</b>		
A	$29.41 \pm 1.27^a \#$	$7.17 \pm 3.74^a \#$
B	$29.68 \pm 0.30^a$	$10.26 \pm 3.43^b$
C	$32.43 \pm 0.37^b$	NQ
D	$29.66 \pm 1.35^a$	$5.91 \pm 2.01^a$
E	$35.00 \pm 0.24^c$	ND
F	$35.00 \pm 0.24^c$	ND
G	$35.00 \pm 0.24^c$	ND
H	$29.20 \pm 0.22^a$	$7.40 \pm 1.49^a$
I	$35.00 \pm 0.24^b$	ND

\*Cq, mean quantification cycle  $\pm$  standard error of the mean. \*\*Concentration mean values expressed in ng of *Anisakis* DNA per gram of food  $\pm$  standard error. ND, not detected; NQ, not quantified. <sup>+</sup>Six DNA extractions from each batch of product were performed and analyzed in duplicate. <sup>#</sup>Values with a distinct letter inside each factor are significantly different (Tukey-Kramer,  $P < 0.05$ )



#### 4.2.4 Discussion

In the last few years, real-time PCR assays have been developed and evaluated for the identification of a wide variety of microorganisms, with emphasis on the main foodborne pathogens with a substantial medical and economic impact. In the present study, a SYBR Green and a TaqMan qPCR technique were optimized and compared for *Anisakis* detection, using as a target region the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit II gene, which in anisakid genera is present in multiple copies and is highly conserved, yet with enough genetic variability (Kim et al., 2006; Lopez and Pardo, 2010). These methods allowed the detection and quantification of the three analyzed *Anisakis* species, without amplification of *Pseudoterranova* and *Hysterothylacium* larvae. The two sibling species, *A. simplex* (s.s.) and *A. pegreffii*, presented the same amplification behaviour, while *A. physeteris* was amplified with a two-log C<sub>q</sub> lateness, which could be related to the observed mismatches in the annealing zone of the primers (Lopez and Pardo, 2010). It may thus be assumed that other species of *Anisakis* such as *A. ziphidarum*, *A. typica*, *A. paggiae* and *A. brevispiculata* could also be detected by this technique, as only minor differences exist in the target sequence used (Lopez and Pardo, 2010). However, there could be slight differences in sensitivity, as we have observed in *A. physeteris*, which should be experimentally evaluated. The *Anisakis* specificity of the developed techniques is relevant, as it offers the advantage of differentiating *Anisakis* from the nonpathogenic *Hysterothylacium*, also highly prevalent in fish of habitual consumption (Angelucci et al., 2011).

Many food samples may contain substances that can interfere with or inhibit PCR assays, including fats, glycogen, polysaccharides, minerals, as well as enzymes (Powell, et al., 1994; Richards, 1999). Additionally, thermal treatment during industrial processes can cause DNA fragmentation and degradation, which could hinder DNA amplification (Hird et al., 2006). In this context, the small size of the target region chosen for amplification in the present study and its stability under the thermal conditions in food processing is a useful asset (Unselde et al., 1995). The application of the SYBR Green and TaqMan qPCR techniques to the food matrix experimentally contaminated with *A. simplex* (s.l.) DNA allowed a fast and sensitive detection of a very low *Anisakis* burden, resulting in an operative LOD of 1.50 and 1.35 ng

of *A. simplex* (s.l.) DNA per gram of food, respectively. The followed procedure, consisting of sample pretreatment, DNA extraction and qPCR, can therefore be considered as a robust and accurate technique for *Anisakis* detection in processed food. In our study, the specificity, sensitivity and reproducibility obtained in the application of the optimized assays in a food matrix indicate their applicability in the food industry. Furthermore, the optimized SYBR Green-qPCR technique presents the advantage of being a simpler and more cost-effective tool for routine food analysis, as it does not require the fluorescent-labeled target-specific probe. SYBR Green qPCR has been previously used for the detection of other trace contaminants in food matrices, also resulting in high sensitivities. D'Andrea et al. (2009) developed a SYBR Green PCR method allowing the detection of traces of hazelnut (10 mg per kg) in commercial foodstuffs; Prieto et al. (2014) reported a LOD for the detection of almond at a level of 1 mg per kg food.

In the present study, the analysis of 180 samples of different commercial fish-derived food products by the optimized SYBR Green qPCR allowed the detection of *Anisakis* DNA in 60% of the analyzed samples, in all cases at trace levels. Surimi-based products, like crab sticks and “gulas”, presented the highest *Anisakis* burden among the positive analyzed food; croquettes, elaborated mainly with hake, also contained DNA from this nematode, although at lower levels. Studies suggest that *A. simplex* (s.l.) is a hidden producer of allergic incidents associated with food (Anıbarro et al., 2007), as thermostable allergens can remain after processing operations (Rodríguez-Mahillo et al., 2010). The presence of *Anisakis* could be related to the fish species used as raw material in the elaboration of commercial products. For example, the most abundant fish used in surimi-based products are hake and blue whiting (Keskin and Atar, 2012; Pepe et al., 2007), which have shown high rates of infection and are considered the most commonly *Anisakis*-infected species in many reports (Chaligiannis et al., 2012; Pekmezci et al., 2014; Piras et al., 2014). Nonetheless, it should be taken into account that in industrial food processing the possible mixture of parasitized and anisakid-free fish in different proportions, the mechanical separation of muscle, and the washing steps could reduce the parasite burden present (Olivares et al., 2013, 2015).

The robustness, accuracy and limits of detection of the optimized QCYTCII SYBR Green and TaqMan qPCR assays indicate their suitability for *Anisakis* detection and quantification in highly processed fish-derived food, thus improving their quality control.

### 4.3 Optimization of a descriptive model for *Anisakis* larval quantification in fish using SYBR Green PCR

#### 4.3.1 Abstract

Seafood parasitation by larvae of *Anisakis* (Anisakidae) has been reported in most of the world's oceans and seas. The presence of these nematodes in commonly consumed fish represents a potential hazard for consumers, as they can cause gastrointestinal symptoms and allergic reactions. In the present work, the capacity of a SYBR Green qPCR assay to quantify the number of *Anisakis* larvae in commercial fish was evaluated by experimentally contaminating *Anisakis*-free hake fillet samples (15 g) with different numbers (0-50) of *A. simplex* (s.l.) third-stage larvae (L3), obtained from Northeast Atlantic blue whiting specimens. Molecular analysis was performed using the QCYTCII SYBR Green qPCR assay, which amplifies a fragment of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase II gene, and the results were expressed in Cq values. Analysis of the experimentally spiked fish samples revealed a logarithmic behavior of Cq values, which enabled the development of a descriptive mathematical model relating this value with the number of *Anisakis* larvae present ( $R^2=0.9908$ , CV=2.37%). In addition, anisakid parasitation of 25 fish specimens of Northeast Atlantic blue whiting was studied applying the described descriptive model and visual inspection in parallel. Correlation analysis of the results showed a high correspondence between both methods ( $R^2=0.9912$ ); according to the Bland-Altman analysis, 94% of the differences were within the limits of agreement (-4.98 and 6.68). These results indicate that the descriptive mathematical model-QCYTCII SYBR Green qPCR may be suitable for estimating *Anisakis* larvae in commercial fish due to its reliability, sensitivity and accuracy. By allowing the automation of quality control processes, it would improve the safety of fishery products and, consequently, the health of consumers.

### 4.3.2 Background

Humans are exposed to a variety of foodborne zoonoses through the food supply chain. Seafood parasitization by *Anisakis* larvae has been reported in most oceans and seas worldwide (D'amico et al., 2014). The presence of these parasites in fish is a potential hazard for consumers as they can provoke gastrointestinal symptoms and allergic reactions. Although *Anisakis* larvae mostly infect visceral organs, they can also penetrate the musculature and accumulate in edible parts of fish. The presence of these nematode larvae in fish flesh is important not only from the health point of view but also because of its economic implications, since it reduces fish quality and provokes consumer rejection (Cipriani et al., 2016). Visual inspection is currently mandatory in fish quality control and several types of techniques have been applied to improve the visual detection of these parasites, including candling, pressing, digestion and UV illumination (Gómez-Morales et al., 2018; Guardone et al., 2016; Levsen et al., 2005). Real-time PCR (qPCR) has been used to detect *Anisakis* DNA in experimentally inoculated fish (Lopez and Pardo, 2010) and naturally infested commercial fish samples, as well as in different types of commercial fish-derived food, providing highly sensitive results (Mossali et al., 2010). The aim of the present work was to design and evaluate the ability of a descriptive mathematical model based on the QCYTCII SYBR Green qPCR protocol to accurately quantify *Anisakis* larvae in commercial fish.

### 4.3.3 Results

#### Standardization of sample preparation

Three different treatments were used to prepare samples for QCYTCII SYBR Green qPCR: A) homogenization for 3 cycles of 5 minutes without incubation, B) homogenization for 3 cycles of 5 minutes with incubation at 55 °C shaking at 380 rpm for 30 minutes; C) homogenization for 3 cycles of 5 minutes with incubation at 55 °C for 90 minutes with shaking at 350 rpm. Molecular analysis indicated that the third protocol gave the best results, especially when the number of larvae was low ( $P < 0.01$ ). No significant differences were observed in  $C_q$  values among treatments when the number of larvae was greater than 10 ( $P = 0.57$ ) (Figure 13).

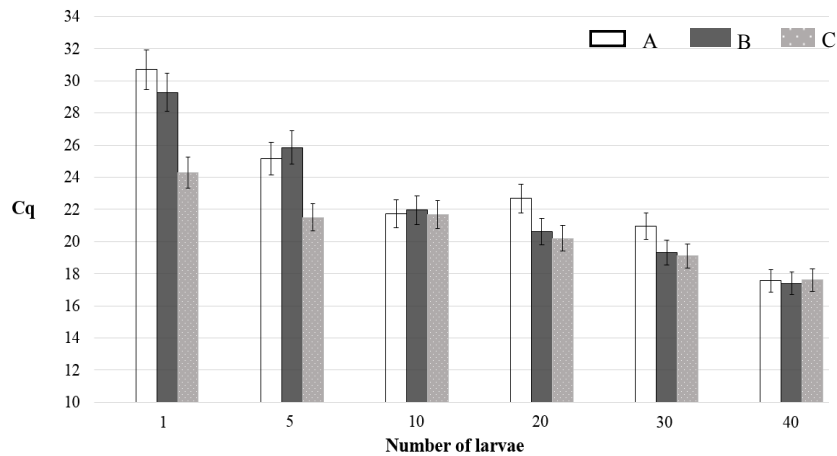


Figure 13. Mean Cq values for different number of larvae (1-40) after different sample preparation treatments: A) homogenization for 3 cycles of 5 minutes without incubation, B) homogenization for 3 cycles of 5 minutes with incubation at 55 °C for 30 minutes with shaking at 380 rpm; C) homogenization for 3 cycles of 5 minutes with incubation at 55 °C for 90 minutes with shaking at 350 rpm. All qPCR analyses were performed in duplicate.

#### QCYTCII SYBR Green qPCR *Anisakis* study on experimentally contaminated fish samples for the optimization of a descriptive model

The molecular analysis of experimentally spiked hake samples revealed a relationship between the number of *A. simplex* (s.l.) larvae present and the Cq values, with results ranging from 24.3 to 17.7, corresponding to 1 and 50 larvae, respectively. These findings allowed us to develop a descriptive function expressing the experimental results ( $Cq = -1.529x + 24.109$ ;  $R^2=0.9908$ ) (Figure 14). According to the analysis of variance of the Cq values, six distinct groups (A to F) related to the number of larvae were discernable ( $P<0.05$ ): group A, with a Cq of 35, corresponded to the absence of *Anisakis* larvae in the sample; group B corresponded to the presence of 1-3 larvae; group C, 4-10 larvae; group D, 11-25 larvae; group E, 26-40 larvae; and group F to more than 40 larvae. The assay precision, expressed as the coefficient of variation (CV), ranged from 0.95% to 2.37%, indicating the technique was highly reproducible (Table 7).

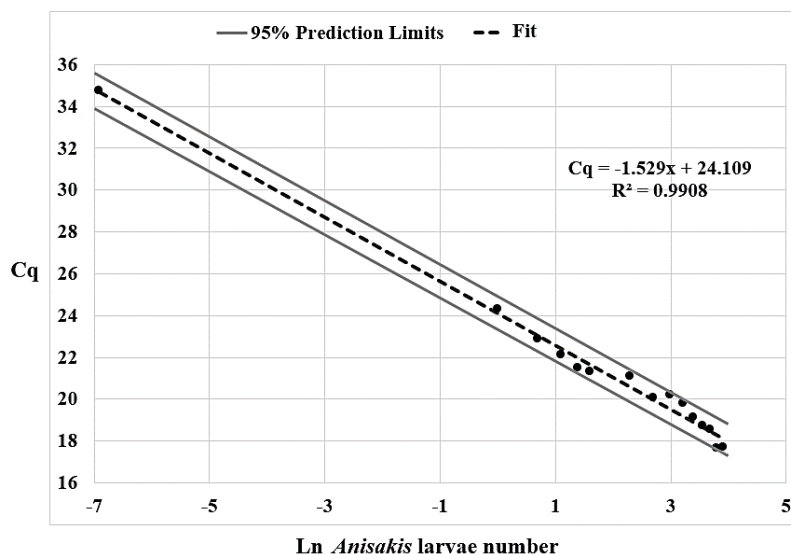


Figure 14. Descriptive function obtained by plotting the mean Cq values obtained by SYBR Green qPCR with respect to the number of *Anisakis* larvae (from 0 to 50), expressed as a natural logarithm (Ln), in experimentally contaminated fish samples. The correlation coefficient ( $R^2$ ) is indicated

Table 7. Results of QCYTCII SYBR Green qPCR applied to hake samples experimentally contaminated with determinate numbers of *Anisakis* larvae

Number of <i>Anisakis</i> larvae	Cq <sup>**†</sup> (95% CI)	CV (%)
0	35.0 (33.9-35.6) <sup>A</sup>	1.53
1	24.3 (23.4-25.2) <sup>B</sup>	2.37
2	22.9 (22.4-23.7) <sup>B</sup>	2.14
3	22.5 (22.3-22.7) <sup>B</sup>	0.97
4	21.4 (21.1-21.6) <sup>C</sup>	1.24
5	21.5 (21.3-21.9) <sup>C</sup>	1.41
10	21.7 (21.2-21.9) <sup>C</sup>	1.66
15	20.0 (19.7-20.3) <sup>D</sup>	2.05
20	20.2 (19.9-20.6) <sup>D</sup>	1.07
25	19.8 (19.7-20.1) <sup>D</sup>	0.95
30	19.1 (18.9-19.3) <sup>E</sup>	1.73
35	18.7 (18.4-19.0) <sup>E</sup>	0.96
40	18.5 (18.2-18.8) <sup>E</sup>	1.64
45	17.6 (17.2-17.9) <sup>F</sup>	1.55
50	17.7 (17.4-17.8) <sup>F</sup>	1.13

Cq, mean quantification cycle value; CI, confidence interval; CV, coefficient of variation. Letters A-F indicate the groups detected relating Cq values to a determinate number of larvae. \* Four DNA extractions were amplified by qPCR in duplicate. † Values with the same letter are not significantly different (Tukey,  $P < 0.05$ ).

Descriptive mathematical model-QCYTCII SYBR Green qPCR vs visual inspection in the analysis of commercial fish

The *Anisakis* load in the different parts of 25 Atlantic blue whiting specimens was studied in parallel by visual inspection and applying the descriptive mathematical model. The visual inspection resulted in the detection and identification of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae, coinfection being observed in three specimens and exclusive *Hysterothylacium* infection in two. A total of 834 *Anisakis* larvae were identified as *A. simplex* (s.l.), ranging from 0 to 112 with a mean intensity of 41.7 per fish. On the other hand, 29 *Hysterothylacium* sp. larvae were observed, ranging from 2 to 10 with a mean intensity of 5.8 larvae per fish infected with this parasite.

The molecular results expressed as the number of *Anisakis* larval equivalents calculated using the descriptive function (NLE) and the number of larvae observed by visual inspection (NLV) are indicated in Table 8. The molecular study of the distribution of the larvae in the analyzed blue whiting revealed that 68.2% (95%CI 65-71) of the *Anisakis* larvae were located at visceral organs, 23.5% (95%CI 21-27) at anteroventral musculature, 7.3% (95%CI 6-9) at anterodorsal musculature and 0.96% (95%CI 0.5-1.8) at posterior musculature. The estimated number of larval equivalents of *Anisakis* in each part of the fish was classified in the six groups based on the number of *Anisakis* larvae (A-F) previously described in Table 7. The visceral organs were the most parasitized: 16% (95%CI 6-35) of the samples corresponded to group D, 24% (95%CI 12-43) to group E and 20% (95%CI 9-39) to group F. The anteroventral musculature showed the greatest variability: 28% (95%CI 14-28) of the samples corresponded to group A, 28% (95%CI 14-28) to group B, 16% (95%CI 6-35) to group D, 12% (95%CI 4-29) to group C, and 16% (95%CI 6-35) to group E. The anterodorsal musculature contained a low estimated number of larvae: 68% (95%CI 48-83) of the samples were classified as group A and 24% (95%CI 12-43) as group B. The posterior musculature showed the lowest estimated larval presence, as *Anisakis* larvae were detected only in 24% (95%CI 12-43) of the samples belonging to group B (Table 8). The simple correspondence analysis confirmed the correlation of the posterior and anterodorsal musculature with groups A and B, and that of



visceral organs with groups D, E and F; however, no correspondence was found between the anteroventral musculature and any specific group  $\chi^2=134.53$ ,  $P<0.001$ ) (Figure 15).

Table 8. Comparison of the number of *Anisakis* larvae obtained by the descriptive function and visual inspection in the 25 naturally infected blue whiting analyzed and distribution of the different fish parts among the groups (A-F)

		Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F
<b>Visceral organs</b>	Cq±SD*	35.0±0.0	23.37±0.4	21.1±0.6	19.5±0.2	19.0±0.1	17.1±1.1
	NLE	0(0-0)	3(2-3)	(6-10) <sup>†</sup>	21(21-25)	29(27-33)	43(43-119)
	NLV	0(0-0)	2(2-3)	(8-11) <sup>†</sup>	23(22-24)	28(26-35)	45(45-112)
	Nº of fish	5	3	2	4	6	5
<b>Anteroventral musculature</b>	Cq±SD*	35.0±0.0	23.6±0.9	21.9±0.3	20.25±0.2	19.1±0.3	
	NLE	0(0-0)	1(1-3)	4(4-6)	15(12-15)	28(28-40)	
	NLV	0(0-0)	1(1-3)	4(3-5)	12(12-16)	26(25-39)	
	Nº of fish	7	7	4	3	4	
<b>Anterodorsal musculature</b>	Cq±SD*	35.0±0.0	23.5±0.3			19.3±0.02	
	NLE	0(0-0)	1(1-2)			(26-27) <sup>†</sup>	
	NLV	0(0-0)	1(1-2)			(25-28) <sup>†</sup>	
	Nº of fish	17	6			2	
<b>Posterior musculature</b>	Cq±SD*	35.0±0.0	23.9±0.6				
	NLE	0(0-0)	1(1-2)				
	NLV	0(0-0)	1(1-2)				
	Nº of fish	19	6				

Group A-F indicate the groups described by QCYTCH SYBR Green qPCR related to the number of larvae; NLE, number of *Anisakis* larval equivalents calculated using the descriptive function; NLV, number of larvae observed by visual inspection; Cq, mean quantification cycle value; SD, standard deviation. Number of larvae expressed as Mode (Range). Two DNA extractions from each sample were amplified by qPCR in duplicate;<sup>†</sup> Bimodal group.

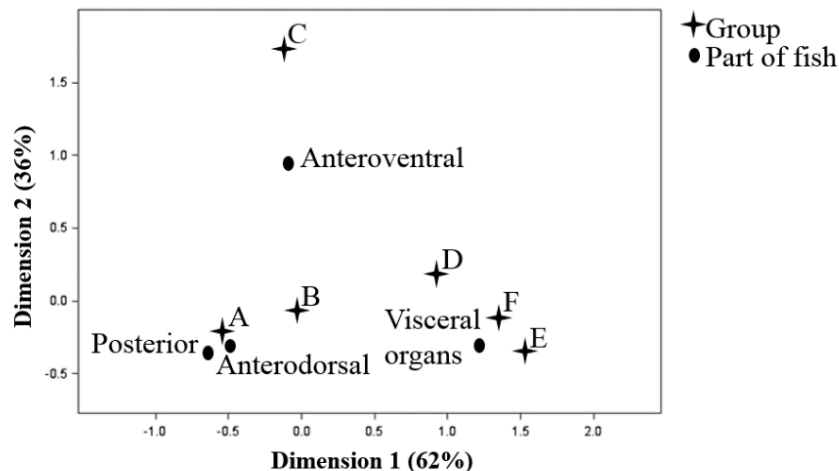


Figure 15. Correspondence analysis plot of the fish parts of the 25 naturally infected blue whiting specimens and the six groups (A-F) described by SYBR Green qPCR according to the number of larvae. The percentage of variability explained by each dimension is indicated in parenthesis.

The correlation analysis showed a high concordance between descriptive mathematical model and visual inspection regarding the number of larvae in the analyzed samples ( $R^2=0.9912$ ) (Figure 16A). Although experimentally the largest number of larvae tested was 50, in naturally infested fish the descriptive function was able to estimate a much larger number (up to 100) of larval equivalents. Furthermore, Bland-Altman analysis showed that 94% of the differences were within the limits of agreement (-4.98 and 6.68) (Figure 16B). In the two specimens of blue whiting infected only by *Hysterothylacium*, the Cq value for each fish part was 35, indicating that the presence of this nematode species did not interfere with the quantification of *Anisakis* larvae.

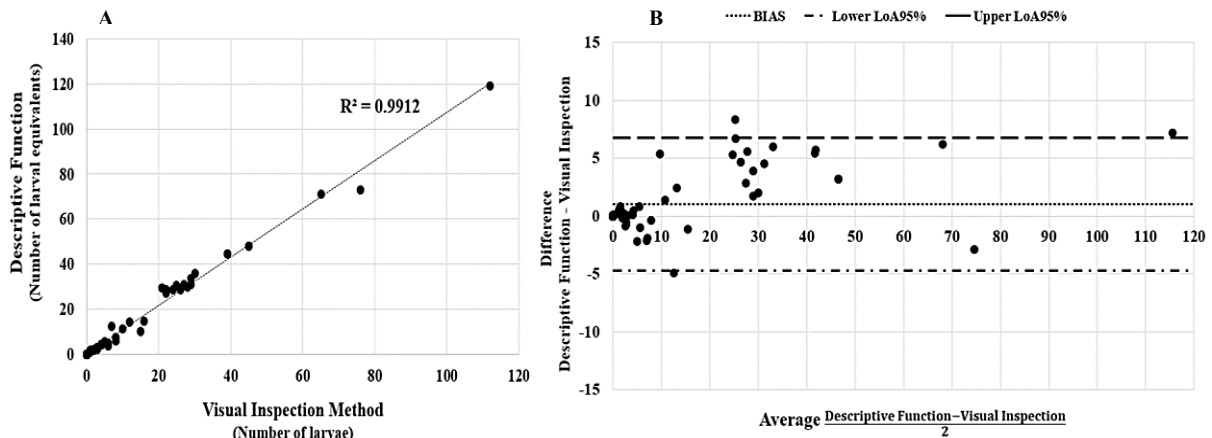


Figure 16. Correlation (A) and Bland–Altman (B) plots showing the concordance between the results obtained by the descriptive function and visual inspection for *Anisakis* larval quantification in the 25 naturally infected blue whiting analyzed. The correlation coefficient ( $R^2$ ) and 95% limits of agreement (LoA) are indicated.

#### 4.3.4 Discussion

The European Food Safety Authority reported approximately 20,000 clinical cases of anisakiasis worldwide up to 2010, with more than 90% from Japan (EFSA, 2010). The two sibling species *A. simplex* (s.s.) and *A. pegreffii* have been described as the main etiological agents of human anisakiasis and allergic reactions; however, some studies have reported the possible risk of invasive infection caused by *A. physeteris* and *A. paggiae* (Romero et

al., 2013). These data highlight the need to validate reliable techniques for the detection and quantification of *Anisakis* in consumed fish and fish-derived food and thus help prevent anisakiasis and allergic incidents. In this study, the molecular technique using the obtained descriptive function allowed an estimation of the number of larvae of *A. simplex* (s.l) in naturally infected fish, which would include the species *A. simplex* (s.s.) and *A. pegreffii*. Other species of *Anisakis* such as *A. physeteris* could also be detected by this qPCR technique, although its different amplification behaviour (Results 4.2.3) excludes it from the proposed descriptive function. However, it should be considered that the probability of detection of this species is low due to its absence or low prevalence in European waters (Mattiucci et al., 2018).

Sample preparation is of primordial importance in qPCR analysis to avoid loss of sensitivity and efficiency. In the present work, the incubation step, involving heat and rotation, ensured the complete lysis of *Anisakis* larvae and a homogeneous distribution in the fish sample, which ensured the recovery of a high DNA concentration. In fish-derived food, mechanical operations such as sieving, chopping and grinding result in larval rupture and homogenization in the food matrix (Olivares et al., 2013), so in such cases a sample incubation treatment may not be necessary.

In this study, the application of the obtained descriptive function allowed an accurate estimation of the number of *Anisakis* larvae in the analyzed blue whiting specimens, and the results were closely correlated with those obtained by visual inspection. This assay could reinforce or even replace visual inspection, in which the results may vary according to operator training and fatigue after examining a large number of fish, or because of lighting conditions and low standardization (Guardone et al., 2016; Llarena-Reino et al., 2012). The *Anisakis* specificity of the primers used ensures that the presence of larvae from other common species in the same area, such as the morphologically similar non-pathogenic *Hysterothylacium*, does not interfere with the results. Due to its high sensitivity, the method can detect *Anisakis* larvae that may go unnoticed in a visual inspection, particularly if parasites are located deep within the musculature (Stormo et al., 2007).

*Anisakis* larval prevalence and infection intensity in wild fish vary according to species, fishing area, season and individual characteristics of the fish. Blue whiting tend to accumulate *Anisakis* larvae in their visceral organs (Madrid et al., 2012), which were the most parasitized part of the fish in this study. However, larval migration to the flesh also constitutes an important source of infection, reflected in the high number of larvae detected in the anteroventral musculature. The parasitic load in the musculature decreases towards the posterior end of the fish, and the anterodorsal and posterior musculature are considered the safest parts for human consumption because of the absence or low number of larvae detected. Other studies using visual inspection have reported similar *Anisakis* larval distribution in this host species in specimens from different fishing areas (Chía et al., 2010; Cipriani et al., 2015; Gómez-Mateos et al., 2016), thus confirming the validity of the descriptive mathematical model-QCYTCII SYBR Green qPCR described for *Anisakis* quantification, regardless of the fish part or the number of larvae present.

Authorities in food safety and fishing facilities currently employ detection methods for *Anisakis* control; however, measurement scales of parasitic load have not been established, and rejection criteria and limits of detection have not been standardized for use by food handlers (FDA 2011). The descriptive function could be applied to optimize an automated molecular platform for the control of a large number of samples and batches of commercial fish, as well as fish-derived foods. Using molecular methods to classify batches of fish according to their parasitic load could orientate decision-making regarding usage, thus reducing the risk of accidental ingestion of *Anisakis* larvae. Finally, the descriptive function presented based on the QCYTCII SYBR Green qPCR assay has promise as a sensitive and accurate tool for measuring the *Anisakis* larval load in commercial fish, with potential application not only in the food industry but also in prevention programs for public health, helping to improve the safety and quality of fishery products and consumer protection.

#### **4.4 Detection and quantification of *Anisakis* larvae in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) from the Northeast Atlantic: a comparison between a SYBR Green qPCR-based descriptive model and visual inspection**

##### **4.4.1 Abstract**

In Europe, Spain is thought to have the highest incidence of anisakiasis, mainly because of the traditional consumption of anchovies marinated in vinegar. In the present work, two methods of *Anisakis* larval quantification were compared: visual inspection and a descriptive model based on the *Anisakis*-specific QCYTCII SYBR Green qPCR technique, which amplifies a fragment of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase II gene. European anchovies (*Engraulis encrasicolus*) from the Iberian Peninsula, caught off the coast of Portugal (n=30) and in the Bay of Biscay (n=30), were studied. In half of the specimens from each area, the parasitic load was determined by visual inspection and in the other half by the descriptive model. Using the descriptive model, 45 larvae of *Anisakis simplex* sensu lato were estimated in 30 fish specimens. In the visual inspection of the other 30 specimens, 48 larvae were morphologically identified as *A. simplex* (s.l.) and 237 as *Hysterothylacium* sp. *Hysterothylacium* larvae were not detected by the SYBR Green qPCR technique due to its *Anisakis* specificity. The percentage of parasitism for *A. simplex* (s.l.) detected in anchovies from the Bay of Biscay was 93.3% (95%CI 70.1-98.8) for visually inspected anchovies and 100% (95%CI 79.6-100) for the molecularly studied, observing overlaps in the confidence intervals, which were also found in the specimens from the coast of Portugal, 73.3% (95%CI 48.1-89.1) and 60% (95%CI 37.8-80.2). No significant differences were found between the number of *Anisakis* larvae detected in anchovies by the two methods (P=0.77). Nor were significant differences found between the number of *Anisakis* larvae in the two study areas, the coast of Portugal (P=0.64) and the Bay of Biscay (P=0.86). The results show that the descriptive function is an accurate, reliable and sensitive technique for the quantification of *Anisakis* larvae.

#### 4.4.2 Background

Fish is a healthy food with many beneficial qualities, such as a high protein and mineral content and low fat percentage; however, possible infection by parasites represents a health risk. Among these parasites, the nematodes of the genus *Anisakis* have become increasingly important in food safety because they have been identified as etiological agents of gastrointestinal symptoms and allergic reactions (EFSA, 2010). In Europe, Spain is considered to have the highest incidence of anisakiasis, mainly through the consumption of traditional “anchovies in vinegar” (Bao et al., 2017). Third-stage larvae (L3) of *Anisakis* have been reported in the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) of the Mediterranean Sea (Cavallero et al., 2015, Cipriani et al., 2016) and European Atlantic waters (Rello et al., 2009), although with a lower prevalence in the former. In current food safety practices, different techniques are performed for the detection of *Anisakis*, mainly based on visual inspection; however, these preventive measures are rarely applied in small fish sold whole without evisceration. It is important to develop techniques able to monitor a large number of samples in an automated run with the specificity, accuracy and reproducibility demonstrated by real-time PCR. In the present work, two methods of quantification of *Anisakis* larvae, visual inspection and a previously described descriptive model, were used to study the parasitic load of *Anisakis* larvae in anchovies from Atlantic waters to verify whether both methods are reliable and comparable.

#### 4.4.3 Results

Sixty European anchovy specimens were analyzed, 30 by visual inspection, and 30 by the descriptive model for the quantification of *Anisakis* larvae, and the results were compared. In the visually inspected anchovies (15 from the coast of Portugal and 15 from the Bay of Biscay), a total of 48 larvae were morphologically identified as *Anisakis simplex* sensu lato, 21 of which were detected in specimens from the Coast of Portugal and 27 in specimens from the Bay of Biscay. Other larvae (214) found in the analyzed fishes were morphologically identified as *Hysterothylacium* sp.: 23 originating from the coast of Portugal and 191 from the Bay of Biscay. Using the descriptive model, 45 *A. simplex* (s.l.) larvae were quantified in

the analyzed anchovies: 14 in anchovies from the Coast of Portugal and 31 from the Bay of Biscay. The *Anisakis* specificity of the QCYTCII SYBR Green qPCR technique precluded the detection of *Hysterothylacium* larvae. The percentage of parasitation for *A. simplex* (s.l.) detected in anchovies from the Bay of Biscay was 93.3% (95%CI 70.1-98.8) for visually inspected anchovies and 100% (95%CI 79.6-100) for that molecularly studied, observing overlays in the confidence intervals. In the specimens from the coast of Portugal, overlays were also observed in the percentage of parasitation when visual inspection and the descriptive model are compared 73.3% (95%CI 48.1-89.1) and 60% (95%CI 37.8-80.2), respectively (Table 9).

Table 9. Results of larval quantification in European anchovies using visual inspection and the descriptive model-QCYTCII SYBR Green qPCR

Fishing ground	Coast of Portugal		Bay of Byscay	
	Visual Inspection (n=15)	Descriptive model* (n=15)	Visual Inspection (n=15)	Descriptive model* (n=15)
<b>Parasitation <i>A. simplex</i> (s.l) (%)</b> (95%CI)	73.3 (48.1-89.1)	60.0 (37.8-80.2)	93.3 (70.1-98.8)	100 (79.6-100)
<b>Number of <i>A. simplex</i> (s.l) larvae</b>	21	14	27	31
<b><i>A. simplex</i> (s.l) mean intensity (95%CI)</b>	1.90 (0.82-2.98)	1.55 (0.90-2.20)	1.92 (1.34-2.50)	2.06 (1.14-2.98)
<b>Parasitation <i>Hysterothylacium</i> sp. (%)</b> (95%CI)	66.6 (41.7-84.8)	ND	93.3 (70.1-98.8)	ND
<b>Number of <i>Hysterothylacium</i> larvae</b>	23	ND	121	ND
<b><i>Hysterothylacium</i> sp. mean intensity</b> (95%CI)	2.3 (1.58-3.02)	ND	13.6 (5.97-21.23)	ND

CI, confidence interval; ND, non-detected; n, number of fish analyzed

\*All SYBR Green qPCR analysis were performed in duplicate

After comparing the results obtained by both quantification techniques, overlays were found in the confidence intervals of the mean intensity (Figure 17), which means that no significant differences were found between the number of *Anisakis* larvae detected by visual inspection and the number of larvae estimated using the descriptive function (P=0.77), neither in the anchovies from the coast of Portugal (P=0.65) nor in the specimens from the Bay of Biscay (P=0.86).

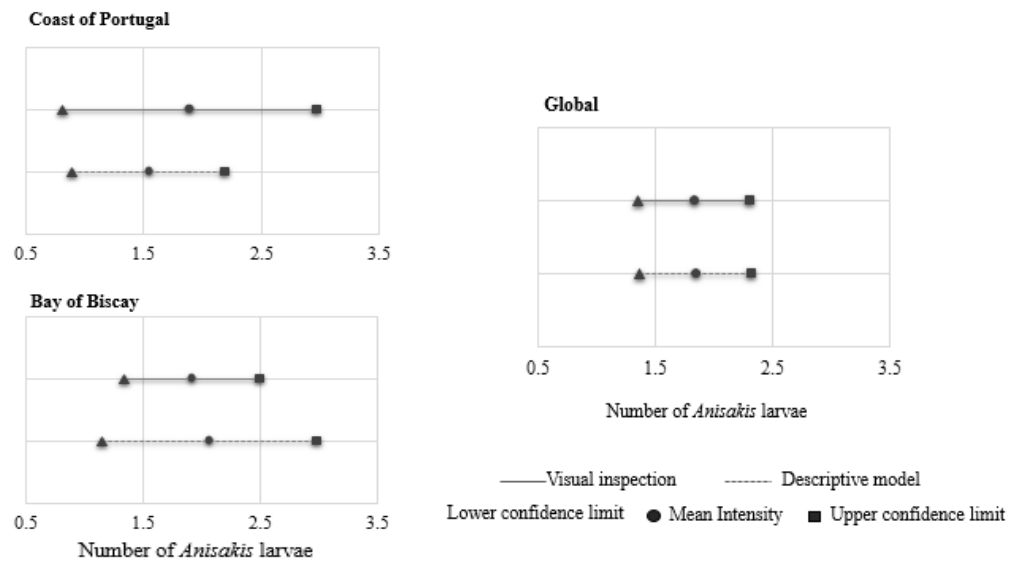


Figure 17. Confidence interval of the mean intensity for *Anisakis* larvae quantification in European anchovies analyzed using visual inspection and the descriptive model-QCYTCII SYBR Green qPCR

#### 4.4.4 Discussion

The reported parasitization of anchovies from European Atlantic waters by *Anisakis* larvae (Rello et al., 2009) represents a risk to consumers, as this fish is used to prepare traditional marinated and salted products in which the larvae could still be alive. Nematodes are described as highly resistant to the conditions created by traditional marinating methods, being able to survive for periods of a few days up to several weeks, depending on the concentration of salt, acetic acid and marinating times (Anastasio et al., 2016).

In the anchovies analyzed in this study, the nematode larvae detected by visual inspection and morphologically identified were *A. simplex* (s.l.) and *Hysterothylacium* sp. Both nematode species are commonly found in fishes and they have been previously isolated in blue whiting (*Micromesistius poutasou*) and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from Portuguese waters (Cruz et al., 2005, 2007) as well as in pouting (*Trisopterus luscus*) from the Bay of Biscay (Rello et al., 2008). By visual inspection, the mean intensity and the



percentage of parasitation of *A. simplex* (s.l.) in anchovies from the two fishing areas were similar, results that closely matched with those estimated using the descriptive model. The *Anisakis* specificity of the technique represents an advantage, as it avoids interference from *Hysterothylacium*, which can be highly prevalent and cause intense parasitation, as observed in specimens analyzed from the Bay of Biscay.

The analysis of small fish, such as sardines and anchovies, is important since they are usually sold without eviscerating, which could entail a risk to consumers, since larvae can migrate from the viscera to the flesh soon after fish death (Cipriani et al., 2016). The easily applicable protocol described, consisting of homogenization of whole fish without dissection, and posterior study by SYBR Green qPCR, could allow the implementation of an automatic, accurate, reliable and sensitive analysis platform able to process a large number of samples. The similarity of the results obtained with the mathematical model compared to the visual inspection suggests it has application in research, commercial and industrial fields.

## V. DISCUSIÓN GENERAL

---



---



## V. DISCUSIÓN GENERAL

El comercio internacional de productos alimenticios ha incrementado en los últimos años como resultado del crecimiento de la población mundial, un aumento en la producción de alimentos a gran escala y cambios en los gustos y preferencias de los consumidores. Actualmente, existe un mayor grado de conocimiento de los patógenos transmitidos por los alimentos, lo que ha traído como consecuencia un aumento en el interés respecto a la seguridad y calidad de los alimentos disponibles en el mercado, derivando en nuevos desafíos en términos de medidas de control de seguridad (Ruzante et al., 2010). Los parásitos transmitidos por los alimentos son un grupo muy diverso, cuya biología y vías de transmisión difieren entre sí (Trevisan et al., 2019). Debido a esta diversidad, las organizaciones FAO y OMS han elaborado una clasificación multicriterio para la gestión de riesgos de los parásitos transmitidos por los alimentos, centrándose en aquellos con mayor impacto a nivel mundial, el número de casos y su gravedad, la distribución global del parásito, así como su impacto socioeconómico (FAO y WHO, 2014). Uno de los grupos de parásitos que ha cobrado gran importancia debido a su impacto a nivel sanitario y comercial son precisamente los nematodos Anisakidae, especialmente las especies del género *Anisakis*.

Los nematodos anisákidos muestran un ciclo de vida complejo en el que intervienen mamíferos marinos como hospedadores definitivos y una amplia variedad de peces como hospedadores paraténicos o de transporte, los cuales albergan las larvas de tercer estadio (L3) responsables de la anisakiosis gastrointestinal y de reacciones alérgicas en humanos al consumir pescado crudo o curado (Nieuwenhuizen y Lopata, 2014; Shimamura et al., 2016). Las especies gemelas del complejo *A. simplex* (s.l.), *A. simplex* (s.s) y *A. pegreffii*, se describen como los principales agentes etiológicos de la anisakiosis. Por otro lado, las especies del género *Pseudoterranova* se han detectado en casos clínicos humanos, sobre todo en América del Sur (Eiras et al., 2018), y aunque raramente, especies del género *Contracaecum* se han identificado en algunos casos como causantes de anisakiosis (Shamsi y Butcher, 2011). Algunos estudios han reportado que existe un posible riesgo de infección invasiva causada por otras especies de *Anisakis* como *A. physeteris* y *A. paggiae* (Romero et

al., 2013). Sin embargo, estas especies no se han encontrado infectando el músculo de los peces de importancia comercial, por lo que el riesgo de infección para los humanos podría ser bajo (Mattiucci et al., 2004).

En este contexto, el desarrollo y optimización de técnicas analíticas adecuadas para la rápida detección e identificación de estos parásitos constituye un tema imprescindible para asegurar la inocuidad de los alimentos y la calidad agroalimentaria. La PCR en tiempo real (qPCR) se está utilizando cada vez más para la detección y cuantificación de parásitos transmitidos por alimentos, obteniendo una elevada sensibilidad como se ha visto en estudios sobre los protozoos *Toxoplasma gondii* en piezas de jamón serrano (Gómez-Samblas et al., 2015) y en muestras de carne (Marino et al., 2017), *Cryptosporidium parvum* y *Giardia duodenalis* en muestras de agua potable (Kumar et al., 2016), *Cyclospora cayetansensis* en muestras de cilantro y frambuesas (Murphy, 2017) y *Trypanosoma cruzi* en pulpa de acai y jugo de caña de azúcar en zonas endémicas del Brasil (Mattos et al., 2017). Existen pocos trabajos enfocados a la aplicación de qPCR para la detección y cuantificación de *Anisakis* en productos procesados derivados del pescado. López y Pardo (2010) optimizaron un ensayo TaqMan qPCR empleando únicamente ADN purificado de *Anisakis*. Mossali et al. (2010) y Herrero et al. (2011) para la estandarización de técnicas TaqMan qPCR utilizaron sistemas binarios constituidos por larvas y pescado crudo en diferentes proporciones. En ninguno de los casos anteriores se empleó una matriz alimentaria compleja, como productos procesados, cuyos componentes podrían alterar la eficiencia de los ensayos.

En el presente estudio se analizaron especímenes de bacaladilla del Atlántico Noreste y de jurel del Mediterráneo Oeste (costa catalana), especies de gran interés comercial debido a su alto consumo, en los que la presencia de larvas de *Anisakis* e *Hysterothylacium* ha sido ampliamente estudiada, detectándose elevadas prevalencias. La prevalencia y la intensidad de la infección en peces depende de diversos factores intrínsecos y extrínsecos como la especie, el área de captura, la temporada y las características individuales de cada ejemplar (Piras et al., 2014; Bao, et al., 2015; Molina-Fernández et al., 2015; Pierce et al., 2018). Es por ello que la bacaladilla y el jurel fueron seleccionados para aislar larvas de nematodos en cantidad suficiente para la optimización de las técnicas de qPCR. En el presente estudio se

aislaron 1.415 larvas de nematodos que fueron identificadas morfológica y morfométricamente como larvas L3 de *A. simplex* (s.l.) (n=1.128), *A. physeteris* (n=3) e *Hysterothylacium* sp. (n=283), así como una larva de *Pseudoterranova* sp. aislada en un rape del Atlántico. Mediante el uso de PCR-RFLP de larvas de *A. simplex* (s.l.) se identificó la presencia de las dos especies gemelas, *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii*. Estas dos especies son las mayormente reportadas en bacaladillas y jureles, destacando la presencia de *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii* en los ejemplares del Atlántico y *A. pegreffii* en los del Mediterraneo (Martín-Sánchez et al., 2005; Abattouy et al., 2014; Molina-Fernández et al., 2018).

Para la detección y cuantificación de anisákidos en matrices alimentarias, pescado y productos procesados se desarrollaron y optimizaron técnicas de qPCR, utilizando el fluoróforo SYBR Green y los cebadores ANIKIT y QCYTCII, evaluando además la técnica QCYTCII qPCR con sonda TaqMan. En estas metodologías moleculares, la extracción de ADN representa un paso crítico debido a que la concentración y pureza del ADN extraído son factores que pueden alterar la eficiencia de la amplificación (Sajali et al., 2018; Pizkata et al., 2019). En el presente estudio se compararon dos kits comerciales para la extracción de ADN de diferentes matrices alimentarias complejas como palitos de cangrejo, gulas, croquetas y hamburguesas de pescado, destacando el kit Wizard Genomic DNA Purification como el más adecuado dado la mayor concentración y pureza del ADN, que osciló entre 27-93 ng/ $\mu$ l. Los resultados obtenidos nos llevaron a seleccionar este sistema de extracción para realizar los análisis moleculares. Autores como Nesvadbová et al. (2010) y Yalçinkaya et al. (2017) compararon diferentes métodos detectando que este mismo kit era el más adecuado en productos procesados a base de carne de pollo y de ternera respectivamente. Sin embargo, Djurkin-Kušec et al. (2015), utilizando los dos kits analizados en nuestro estudio sobre salchichas fermentadas, encontraron mayores concentraciones de ADN con el kit High Pure PCR Template.

Los ensayos SYBR Green qPCR con los cebadores ANIKIT amplificaron el ADN de larvas de las tres especies de *Anisakis* y de *Pseudoterranova* con valores de amplificación expresados en Cq similares, mientras que la pareja de cebadores QCYTCII mostró especificidad para la detección de las especies de *Anisakis*, presentando *A. simplex* (s.s.) y *A.*

*pegreffii* el mismo patrón de amplificación. Un comportamiento similar para estas dos especies se observó empleando estos cebadores QCYTCII utilizando una sonda TaqMan, detectándose un retraso de dos ciclos de amplificación respecto al SYBR Green. Las larvas de *A. physeteris* mostraron un retraso de dos logaritmos respecto a las especies *A. simplex* (s.s) y *A. pegreffii* con los cebadores QCYTCII en SYBR Green qPCR y TaqMan qPCR, lo que estaría relacionado con pequeñas discordancias en la región de unión de los cebadores empleados. Estos resultados sugieren que la tercera especie del complejo *A. simplex* (s.l.), *A. berlandi*, de localización más focal en el hemisferio sur (Mattiucci et al., 2018), también podría ser detectada y cuantificada con la misma sensibilidad debido a la similitud genética entre las especies del complejo. Asimismo, se podría deducir que el resto de las especies descritas de *Anisakis*, *A. ziphidarum*, *A. nascettii*, *A. typica*, *A. paggiae*, y *A. brevispiculata*, también podrían ser detectadas ya que presentan diferencias mínimas en la secuencia en la zona de unión de los cebadores (López y Pardo, 2010). Sin embargo, estas especies no podrían ser cuantificadas empleando el protocolo presentado en este trabajo debido posiblemente a un diferente patrón de amplificación, haciendo necesarios nuevos estudios de validación de la sensibilidad y reproducibilidad.

Las diferencias en especificidad están relacionadas con la región amplificada por cada par de cebadores. ANIKIT amplifica un fragmento de la región ITS-1, que es genéticamente similar entre las especies *Anisakis* y *Pseudoterranova* (Mossali et al., 2010), mientras que los cebadores QCYTCII amplifican un fragmento de Cox-2, que constituye una región de consenso entre las especies de *Anisakis*, siendo muy diferente de la secuencia correspondiente a *Pseudoterranova* (López y Pardo, 2010). Por otro lado, ninguna de las técnicas utilizadas en el presente estudio amplificó las larvas de *Hysterothylacium*. Aunque las especies de este género son consideradas no patógenas para los humanos, su prevalencia es muy significativa en los peces de consumo habitual (Pekmezci et al., 2013; Barcala et al., 2018) y algunos estudios han sugerido que podría mostrar reacción cruzada con *Anisakis* en pruebas inmunológicas (Fernández-Caldas et al., 1998; Valero et al., 2003). Además, las larvas de *Hysterothylacium* podrían identificarse erróneamente como *Anisakis* por su similitud morfológica (Simsek et al., 2018) si la inspección visual no es realizada por operadores

expertos, pudiéndose desechar lotes de pescado que no representan un riesgo para el consumidor, incrementando así las pérdidas y los costos en el sector pesquero (Shamsi, 2014).

La sensibilidad y reproducibilidad de las técnicas SYBR Green y TaqMan se evaluó empleando un sistema binario compuesto de una matriz alimentaria de derivados de pescado contaminada experimentalmente con larvas de *A. simplex* (s.l.). El análisis PROBIT nos permitió obtener un límite de detección (LOD) de 0,18 ng ( $_{95\%}IC$  0,08–0,98) de ADN de *Anisakis* por gramo de matriz para ANIKIT SYBR Green qPCR y de 0,30 ng ( $_{95\%}IC$  0,15–1,50) para QCYTCII SYBR Green qPCR, este último similar a 0,25 ng/g ( $_{95\%}IC$  0,12–1,35) detectado con la QCYTCII TaqMan qPCR. Los bajos coeficientes de variación encontrados, así como las bajas desviaciones estándar indican que estas técnicas son altamente reproducibles. Las técnicas SYBR Green qPCR optimizadas sólo requieren un par de cebadores para realizar la detección y cuantificación de anisakidos, lo que representa una ventaja en cuanto a la relación costo-beneficio en el análisis rutinario debido a que este fluoróforo evita el uso de sondas marcadas que presentan un elevado coste económico. Es importante mencionar que para el uso correcto de SYBR Green es necesario verificar la especificidad de la señal amplificada. En este estudio el análisis de las temperaturas de fusión de las técnicas ANIKIT y QCYTCII qPCR, 72 y 76°C respectivamente, permitió asegurar la identificación específica, lo cual es importante cuando se trabaja con SYBR Green debido a que este fluoróforo se une con gran afinidad a cualquier estructura bicatenaria de ADN (Ririe et al., 1997; Monis et al., 2005; Rodríguez-Lázaro y Hernández, 2013).

La aplicación de la qPCR para la detección de parásitos en productos agroindustriales a base de pescado implica varios inconvenientes que pueden conducir a una subestimación de la carga parasitaria, así como a resultados falsos negativos (Anexo 2). Los alimentos procesados pueden contener sustancias que interfieren en los ensayos de PCR, como lípidos, glucógeno, polisacáridos, minerales y enzimas (Powell, et al., 1994; Richards, 1999). El uso de aditivos alimentarios puede afectar el rendimiento de la qPCR degradando las moléculas de ADN o las polimerasas, lo cual podría conducir a un retraso o inhibición del proceso de amplificación. En el presente trabajo, la optimización de las técnicas SYBR Green y TaqMan



qPCR empleando una matriz alimentaria contaminada experimentalmente permitió una detección rápida y sensible de una carga de *Anisakis* muy baja, resultando en un límite de detección 1,50 ng de ADN por gramo de alimento, incluso en presencia de diversos aditivos. Los procesos agroindustriales en los que se emplean altas temperaturas u operaciones mecánicas pueden causar degradación y/o fragmentación del ADN, causando ausencia o retraso en la formación de los productos de la qPCR (Lo y Shaw, 2018). En las qPCR optimizadas en el presente estudio, empleando los cebadores ANIKIT y QCYTCII, se eligieron regiones del genoma de *Anisakis* muy estables bajo condiciones térmicas (Unsel et al., 1995); además el pequeño tamaño de los fragmentos amplificados permite que los cebadores se unan a ADN extremadamente fragmentado, haciendo posible la aplicación de la técnica en alimentos altamente procesados sin pérdida de sensibilidad.

Los factores que afectan la sensibilidad de la qPCR no sólo están relacionados con el procesamiento de los alimentos, sino también con la naturaleza misma de los parásitos. A diferencia de otros patógenos, las formas parasitarias que se encuentran en pescado o carne, no se reproducen, por lo que el nivel de contaminación de los alimentos no se incrementará durante el procesamiento, transporte o almacenamiento; además, la posible distribución heterogénea de los parásitos en la matriz alimentaria y las bajas cargas parasitarias hacen necesario analizar grandes volúmenes de muestra (Klotz et al., 2017; Trevisan et al., 2019). En otros parásitos alimentarios, como es el caso de *T. gondii* en carne, se ha necesitado el uso de técnicas de concentración, como la captura magnética, para conseguir unos resultados adecuados, procesos que incrementan los tiempos y costos de los análisis (Algaba et al., 2017). En el presente estudio, mediante las técnicas SYBR Green y TaqMan qPCR optimizadas, la detección de *Anisakis* fue posible partiendo de una muestra de 25 g de alimento sin necesidad de emplear protocolos de concentración de ADN, simplificando la detección y cuantificación.

La aplicación de la técnica seleccionada QCYTCII SYBR Green qPCR permitió analizar diferentes alimentos comerciales elaborados con pescado como gulas, palitos de cangrejo, croquetas y hamburguesas, detectando ADN de *Anisakis* en el 60% de las 180 muestras analizadas, en todos los casos a niveles traza. Los productos elaborados con surimi como los

palitos de cangrejo y las gulas, comúnmente procesados a partir de merluza y bacaladilla, presentaron la mayor carga parasitaria ( $5.86 \pm 0.69$  y  $4.68 \pm 0.73$  ng/g, respectivamente); mientras que las croquetas, elaboradas principalmente con merluza, también contenían ADN de este nematodo, aunque a niveles más bajos. Son pocos los trabajos que reportan la detección de *Anisakis* en productos procesados. Mossali et al. (2010) analizaron por medio de TaqMan qPCR diversos productos comerciales como alimentos para bebés, surimi, palitos de pescado y atún enlatado detectando trazas de ADN de *Anisakis*, siendo los productos elaborados con surimi aquellos con la mayor concentración. López y Pardo (2010) también encontraron trazas de *Anisakis* en alimentos procesados como pescado salado y ahumado, paté, surimi, croquetas y productos enlatados.

En los productos procesados a base de pescado se puede encontrar músculo tamizado o pasta de pescado elaborada con diversos tipos de pescado como abadejo, platija, corvina, bacalao, caballa y merluza (Pepe et al., 2007; Giusti et al., 2017), algunas de estas especies han mostrado altos índices de parasitación por *Anisakis*. Durante el procesamiento agroindustrial, las operaciones mecánicas como el tamizado y el prensado pueden destruir las larvas, homogenizándolas con la matriz de alimento (Olivares et al., 2013), por lo que los métodos de inspección basados en la visualización de larvas (enteras o trozos) de *Anisakis*, podrían no ser adecuados para el análisis de productos procesados. Además, los antígenos termoresistentes pueden mantenerse después de tratamientos agroindustriales, pudiendo producir episodios de alergia en aquellas personas que han sido previamente sensibilizadas (Rodríguez-Mahillo et al., 2010; Tejada et al., 2015). Existen hallazgos que apoyan la hipótesis de que los alérgenos de *A. simplex* sólo interactúan con el sistema inmune del hospedador cuando el parásito los inocula en sus tejidos (Alonso-Gómez et al., 2004), por lo que resulta necesaria la ingestión de la larva viable para desencadenar una reacción alérgica. Sin embargo, otros autores han descrito individuos que refieren haber sufrido síntomas con alimentos congelados, enlatados o cocinados (Audicana, 2001; Audicana et al., 2002; Caballero y Moneo, 2004; Moneo et al., 2005; Armentia et al., 2006).

La eficacia y eficiencia de la inspección visual para la detección de anisákidos en el pescado puede estar condicionada por diversos factores como las condiciones de iluminación y el

nivel de entrenamiento del personal encargado del análisis. Aunado a lo anterior, no existen planes de muestreo ni límites de parasitación para aceptación/rechazo del producto oficialmente establecidos, lo que se traduce en que cada empresa o manipulador aplica sus propios criterios (Guardone et al., 2016; Llarena-Reino et al., 2012). En este trabajo se evaluó la capacidad de la técnica QCYTCII SYBR Green qPCR para determinar la carga parasitaria por *A. simplex* (s.l) mediante un ensayo experimental que permitió obtener un modelo matemático descriptivo que relaciona el número de larvas presentes con los valores Cq obtenidos. La precisión de la técnica, expresado como el coeficiente de variación, osciló entre 0,95-2,37%, indicando que la técnica es reproducible.

Para validar el modelo descriptivo basado en la técnica molecular QCYTCII SYBR Green qPCR obtenido en el presente estudio, éste se aplicó en el estudio de 25 especímenes de bacaladillas para estimar el número de larvas presentes, comparando los resultados en paralelo por inspección visual. En el análisis visual se identificaron un total de 834 larvas de *A. simplex* (s.l.) y 29 de *Hysterothylacium* sp. Al comparar estos resultados con los estimados aplicando el modelo descriptivo para *A. simplex* (s.l.), el análisis de Bland-Altman mostró que el 94% de las diferencias estaban dentro de los límites de concordancia (-4.98 y 6.68), indicando la elevada correlación entre ambas técnicas. Mediante ambos métodos se observó la distribución de las larvas de *Anisakis* en las diferentes partes del pescado, detectándose los mayores porcentajes en los órganos viscerales (68%) y en la musculatura anteroventral (23%), siendo baja o casi nula en la parte anterodorsal y posterior. El número de larvas en la musculatura disminuye hacia el extremo posterior del pescado, siendo la musculatura anterodorsal y posterior las partes más seguras para el consumo humano. Otros estudios han reportado una distribución larval similar en bacaladillas provenientes de diferentes áreas de captura (Chía et al., 2010; Madrid et al., 2012; Gómez-Mateos et al., 2016). La presencia importante de larvas en la musculatura anteroventral puede estar favorecida por la migración postmortem larvaria (Cipriani et al., 2015). El método molecular descrito facilitaría la detección de larvas que podrían pasar inadvertidas durante la inspección visual que se realiza en el control de la industria agroalimentaria, por encontrarse embebidas en la musculatura (Stormo, et al 2017).

El modelo matemático validado experimentalmente se aplicó para estudiar la carga parasitaria en 60 ejemplares de boquerones provenientes la costa de Portugal y del golfo de Vizcaya. La mitad de los ejemplares de cada zona se analizó por medio de inspección visual y el modelo descriptivo se aplicó en la otra mitad. Respecto a los especímenes de la costa de Portugal, 21 larvas fueron identificadas morfológicamente como *A. simplex* (s.l.) por inspección visual y mediante el modelo descriptivo se estimaron 14 larvas en los especímenes restantes, sin detectarse diferencias significativas ( $P=0,64$ ). De modo similar, en los ejemplares del Golfo de Vizcaya se identificaron 27 larvas de *A. simplex* (s.l.) frente a las 31 estimadas aplicando el modelo matemático ( $P=0,86$ ). El mayor porcentaje de parasitación por *A. simplex* (s.l.) se detectó en boquerones del Golfo de Vizcaya, 93.3% (95%IC 70.1-98.8) para los inspeccionados visualmente y 100% (95%IC 79.6-100) para los estudiados molecularmente, observándose superposiciones en los intervalos de confianza. Esta coincidencia porcentajes de parasitación detectados por ambos métodos también se encontró en los especímenes de la costa de Portugal, 73.3% (95%IC 48.1-89.1) y 60% (95%IC 37.8-80.2). El análisis de pescados pequeños, como la sardina y el boquerón, es de suma importancia ya que suelen venderse sin eviscerar, lo que favorece la migración de las larvas hacia la musculatura (Cipriani et al., 2016). Lo anterior podría comportar un riesgo a la salud de los consumidores, pues el boquerón es utilizado para preparar marinados o encurtidos, en los cuales las larvas de *Anisakis* podrían seguir vivas. Se ha reportado que los nematodos son altamente resistentes a las condiciones tradicionales de marinado, pudiendo sobrevivir durante períodos que varían de unos pocos días hasta varias semanas, dependiendo de la concentración de sal, ácido acético y tiempos de marinado (Sánchez-Monsalvez et al., 2005; Anastasio et al., 2016). Estos hallazgos están relacionados con el alto número de casos de anisakiosis relacionados con el consumo de boquerones en vinagre reportados en España (Alonso-Gómez et al., 2004; Repiso Ortega, 2003; Del Rey Moreno et al., 2008, 2013).

Las técnicas descritas en el presente trabajo podrían emplearse en la optimización de una plataforma molecular automatizada para el control de calidad de un gran número de muestras y lotes comerciales de pescado, sin depender del nivel de experiencia o de especialización de los operarios. Los resultados obtenidos con estas plataformas podrían orientar la toma de

decisiones respecto al uso que pretende darse a cada lote comercial de pescado y productos derivados, reduciendo así el riesgo de ingestión accidental de larvas de *Anisakis* y sus alérgenos. Finalmente, los resultados obtenidos indican que las técnicas qPCR desarrolladas son herramientas sensibles y precisas para la detección y cuantificación de *Anisakis* en productos frescos y procesados del pescado. Los protocolos de análisis tendrían una potencial aplicación en la industria alimentaria y en programas de prevención para la salud pública, ayudando a mejorar la seguridad y la calidad de los productos pesqueros y la protección del consumidor.

## **VI. CONCLUSIONES**

---



---



## VI. CONCLUSIONES

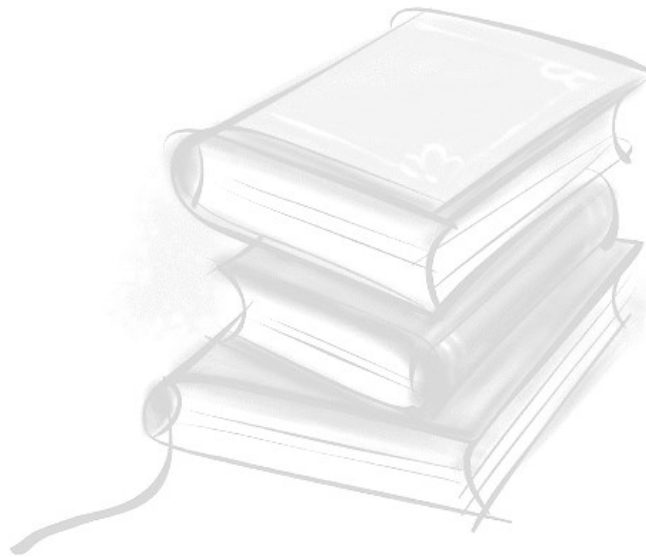
- Se optimizaron dos técnicas de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *Anisakis* en pescado y productos procesados, utilizando el fluoróforo SYBR Green y las parejas de cebadores ANIKIT y QCYTCII, que amplifican un fragmento de ITS-1 y de Cox-2, respectivamente. Además, se optimizó una técnica TaqMan qPCR empleando el segundo par de cebadores.
- Las técnicas que utilizan los cebadores QCYTCII se mostraron específicas para las especies de *Anisakis* ensayadas, *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii*, del complejo *A. simplex* (s.l.) y *A. physeteris*, si bien esta última presentó un patrón de amplificación diferente. La técnica ANIKIT SYBR Green qPCR amplificó además *Pseudoterranova* con patrones similares para todas las especies estudiadas. Ninguna de las técnicas ensayadas amplificó *Hysterothylacium*, cuyas larvas son frecuentes en el pescado comercial.
- Los métodos optimizados, empleando matrices alimentarias complejas a base de pescado, mostraron una elevada sensibilidad y reproducibilidad analítica. El límite de detección mediante análisis PROBIT para ANIKIT y QCYTCII SYBR Green qPCR fue de 0,18 y 0,30 ng de ADN de *A. simplex* (s.l.) por gramo de matriz, respectivamente, siendo el reportado por QCYTCII TaqMan qPCR de 0,25 ng/g.
- Para el análisis de alimentos comerciales derivados de pescado se seleccionó la técnica QCYTCII SYBR Green qPCR que permitió la detección de ADN de *Anisakis* en el 60% de las 180 muestras estudiadas de gulas, palitos de cangrejo, croquetas y hamburguesas, detectándose las mayores concentraciones, a nivel de trazas, en los dos primeros productos (5,38±0,72 ng y 4,46±0,77 ng de ADN/g, respectivamente).
- Se desarrolló un modelo matemático descriptivo ( $Cq = -1,529x + 24,109$ ) basado en la técnica QCYTCII SYBR Green qPCR que permite estimar el número de larvas de *Anisakis* presentes en pescado a partir de los valores Cq ( $R^2=0,99$ ; CV=2,37%).



- El modelo matemático descriptivo se validó en especímenes de bacaladilla, comparando el número de larvas estimadas con el número de larvas detectadas por inspección visual. El análisis de Bland-Altman mostró una concordancia del 94% entre ambos métodos.
- La aplicación de la función descriptiva en un grupo de ejemplares de boquerones del Atlántico Noreste permitió la estimación del número de larvas de *Anisakis* presentes. La fiabilidad de los resultados fue confirmada mediante la inspección visual de un segundo grupo de boquerones de la misma procedencia.
- Los resultados muestran la aplicabilidad de las técnicas moleculares ensayadas para la detección y cuantificación de *Anisakis* en pescado y productos derivados, ya sean frescos o altamente procesados, destacando la metodología basada en SYBR Green por ser menos costosa, haciendo la técnica más rentable para el análisis de alimentos.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---





## VII. BIBLIOGRAFÍA

Abattouy, N., López, A.V., Maldonado, J.L., Benajiba, M.H., Martín-Sánchez, J., 2014. Epidemiology and molecular identification of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in the horse mackerel *Trachurus trachurus* from northern Morocco. *J. Helminthol.* 88, 257–263.

Abattouy, N., Valero, A., Lozano, J., Barón, S.D., Romero, C., Martín-Sánchez, J., 2016. Population genetic analysis of *Anisakis simplex* s.l. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) from parapatric areas and their contact zone. *Parasite Epidemiol. Control* 1, 169–176.

AESAN, 2011. La alergia por *Anisakis* y medidas de prevención. Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia, en relación con los factores favorecedores de la aparición de alergia a *Anisakis*, así como de las medidas de prevención aplicables. [Disponible en [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/ANISAKIS\\_ALERGIA.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/ANISAKIS_ALERGIA.pdf)]

Aibinu, I.E., Smooker, P.M., Lopata, L. 2019. *Anisakis* nematodes in fish and shellfish-from infection to allergies. *Int. J. Parasitol.* 9, 384–393.

Algaba, I.G., Geerts, M., Jennes, M., Coucke, W., Opsteegh, M., Cox, E., Dorny, P., Dierick, K., De Craeye, S., 2017. A more sensitive, efficient and ISO 17025 validated magnetic capture real time PCR method for the detection of the archetypal *Toxoplasma gondii* strains in meat. *Int. J. Parasitol.* 13, 875-884.

Alonso-Gómez, A., Moreno-Ancillo, A., López-Serrano, M.C., Suárez de Parga, J.M., Daschner, A., Caballero, M.T., Barranco, P., Cabañas, R., 2004. *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitizes the gastrointestinal tract. *J. Parasitol. Res.* 93, 5, 378-384.

Anastasio, A., Smaldone, G., Cacace, D., Marrone, R., Voi, A.L., Santoro, M., Pozio, E. 2016. Inactivation of *Anisakis pegreffii* larvae in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) by salting and quality assessment of finished product. *Food Control* 64, 115-119.

Anderson, R.C., 1992. Nematodes parasites of vertebrates, their development and transmission. Wallingford, Oxon, CAB International. 518p.

Anderson, R.C., 2000. The superfamily Ascaridoidea. In: Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission. R. C. Anderson (Eds.) Wallingford, UK: CAB International, 267-350.

Angelucci, G., Meloni, M., Merella, P., Sardu, F., Madeddu, S., Marrosu, R., Petza, F., Salati, F., 2011. Prevalence of *Anisakis* spp. and *Hysterothylacium* spp. larvae in teleosts and cephalopods sampled from waters of Sardinia. *J. Food Prot.* 74, 1769–1775.

Anibarro, M., Seoane, B., Mugica, F., 2007. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 17, 168–172.

Anshary, H, Sriwulan, Freeman, MA, Ogawa, K., 2014. Occurrence and molecular identification of *Anisakis* Dujardin, 1845 from marine fish in southern Makassar Strait, Indonesia. *Korean J. Parasitol.* 52, 9–19.

Arenal-Vera, J.J., Marcos Rodríguez, J.L., Borrego Pindado, M.H., Bowakin Did, W., Castro Lorenzo, J., Blanco Álvarez, J.I., 1991. Anisakiasis como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico: primer caso en la literatura médica. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 79, 355-8.

Armentia, A., Martín-Gil, F.J., Pascual, C., Martín-Esteban, M., Callejo, A., Martínez, C., 2006. *Anisakis simplex* allergy after eating chicken meat. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 16, 258-63.

Audicana, M.T., Kennedy, M.W., 2008. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 360–379.

Audicana, M.T., Ansotegui, I.J., de Corres, L.F., Kennedy, M.W., 2002. *Anisakis simplex*: dangerous dead and alive? *Trends Parasitol.* 18, 20-25.

Baird, F.J., Gasser, R.B., Jabar, A., Lopata, A.L., 2014. Food borne anisakiasis and allergy. *Mol. Cell. Probes* 28, 167–174.

Baldwin, R.E., Rew, M.B., Johansson, M.L., Banks, M.A., Jacobson, K.C., 2011. Population structure of three species of *Anisakis* nematodes recovered from pacific sardines (*Sardinops sagax*) distributed throughout the California current system. *J. Parasitol.* 97, 4, 545-554.

Bao, M., Roura, A., Mota, M., Pascual, S., 2015. Macroparasites of allis shad (*Alosa alosa*) and twaite shad (*Alosa fallax*) of the western Iberian Peninsula Rivers: ecological, phylogenetic and zoonotic insight. *Parasitol. Res.* 114, 3721–3739.

Bao, M., Pierce, G.J., Pascual, S., González-Munõz, M., Mattiucci, S., Mladineo, I., Cipriani, P., Bušelić, I., Strachan, N.J.C., 2017. Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis. *Sci. Rep.* 7, 1–17.

Barbarroja-Escudero, J., Asúnsolo-Del-Barco, A., Sánchez-González, M., Rodríguez-Rodríguez, M., Alvarez-Mon, M., 2018. Heterogeneous predisposing factors and etiology in uvula edema patients. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 29, 4, 280-286.

- Barcala, E., Ramilo, A., Ortega, N., Picó, G., Abollo, E., Pascual, S., Muñoz, P., 2018. Occurrence of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in commercial fish from Balearic Sea (Western Mediterranean Sea). *Parasitol. Res.* 117, 4003–4012.
- Beck, M, Evans, R, Feist, S.W., Stebbing, P., Longshaw, M., Harris, E., 2008. *Anisakis simplex* sensu lato associated with red vent syndrome in wild adult Atlantic salmon (*Salmo salar*) in England and Wales. *Dis. Aquat. Organ.* 82, 61–5.
- Bereciartua, J., 2005. Procedimiento para eliminar parásitos del pescado. Patente N° ES 2 213 486 B1. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Berland, B., 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia* 2, 1–50.
- Bland, J.M., Altman D.G., 1999. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res.* 8, 135–160.
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K., 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71–75.
- Caballero, M.L., Moneo, I., 2004. Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *J. Parasitol. Res.*, 93, 3, 248-251.
- Calvet, J.P., Zuckman, P., Texier, J., 1969. Parasitic allergic eosinophilic granuloma of the ileum. *Mem. Acad. Chir.* 95, 648–51.
- Carrera, M., Gallardo, J. M., Pascual, S., González A., Medina, I., 2016. Protein biomarker discovery and fast monitoring for the identification and detection of Anisakids by parallel reaction monitoring (PRM) mass spectrometry. *J. Proteomics* 142, 130–137.
- Cavallero, S., Nadler, S. A., Paggi, L., Barros, N.B., D'Amelio, S., 2011. Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from Southeastern Atlantic coasts of USA, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Parasitol. Res.* 108, 4, 781-792.
- Cavallero, S., Magnabosco, C., Civettini, M., Boffo, L., Mingarelli, G., Buratti, P., Giovanardi, O., Fortuna, C.M., Arcangeli, G., 2015. Survey of *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. in sardines and anchovies from the North Adriatic Sea. *Int. J. Food Microbiol.* 200, 18–21.
- Ceballos-Mendiola, G., Valero, A., Polo-Vico, R., Tejada, M., Abattouy, N., Karl, H., De las Heras, C., Martín-Sánchez, J., 2010. Genetic variability of *Anisakis simplex* s.s. parasitizing European hake (*Merluccius merluccius*) in the Little Sole Bank area in the Northeast Atlantic. *Parasitol. Res.* 107, 1399–1404.

Chaligiannis, I., Lalle, M., Pozio, E., Sotiraki, S., 2012. Anisakidae infection in fish of the Aegean Sea. *Vet. Parasitol.* 184, 362–366.

Chen, Q., Yu, H.Q., Lun, Z.R., Chen, X.G., Song, H.Q., Lin, R.Q., Zhu, X.Q., 2008. Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodes with zoonotic potential. *Parasitol. Res.* 104, 79–84.

Chía, N., Romero, M.C., Polo-Vico, R., Gómez-Mateos, M., Abattouy, N., Valero, A., 2010. Estudio epidemiológico de *Anisakis* tipo I en la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) del noroeste de España. *Ars Pharm.* 51, 829–834.

Choudhury, G., Jenks, W., Wikswo, J., Bublitz, C., 2002. Effects of parasite attributes and injected current parameters on electromagnetic detection of parasites in fish muscle. *J. Food Sci.* 67, 9, 3381-3387.

Cipriani, P., Smaldone, G., Acerra, V., D'Angelo, L., Anastasio, A., Bellisario, B., Palma, G., Nascetti, G., Mattiucci, S., 2015. Genetic identification and distribution of the parasitic larvae of *Anisakis pegreffii* and *A. simplex* (s.s.) in European hake *Merluccius merluccius* from the Tyrrhenian Sea and Spanish Atlantic coast: implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 198, 1-8.

Cipriani, P., Acerra, V., Bellisario, B., Sbaraglia, G.L., Cheleschi, R., Nascetti, G., Mattiucci, S., 2016. Larval migration of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy, *Engraulis encrasicolus*: implications to seafood safety. *Food Control* 59, 148–157.

Costa, G., Chada, T., Melo-Moreira, E., Cavallero, S., D'Amelio, S., 2014. Endohelminth parasites of the leafscale gulper shark, *Centrophorus squamosus* (Bonnatere, 1788) (Squaliformes: Centrophoridae) of Madeira Archipelago. *Acta Parasitol.* 59, 316–322.

Costa, A., Cammilleri, G., Graci, S., Buscemi, M.D., Vazzana, M., Principato, D., Giangrosso, G., Ferrantelli, V., 2016. Survey on the presence of *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii* hybrid forms in Central-Western Mediterranean Sea. *Parasitol. Int.* 65, 6, 696–701.

Cruz, C., Vaz, A., Saraiva, A., 2005. Larval anisakids from horse mackerel in Portugal. *Helminthologia* 42, 3-7.

Cruz, C., Barbosa, C., Saraiva, A., 2007. Distribution of larval anisakids in blue whiting off Portuguese fish market. *Helminthologia* 44, 21–24.

Daschner, A., Vega de la Osada, F., Pascual, C., 2005. Allergy and parasites reevaluated: wide-scale induction of chronic urticaria by the ubiquitous fish nematode *Anisakis simplex* in an endemic region. *Allergol. Immunopathol.* 33, 1, 31-37.

D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, C.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanço, M., Paggi, L., 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Parasitol.* 30, 2, 223-226.

D'amico, P., Malandra, R., Costanzo, F., Castigliero, L., Guidi, A., Gianfaldoni, D., Armani, A., 2014. Evolution of the *Anisakis* risk management in the European and Italian context. *Food Res. Int.* 64, 348-362.

D'Andrea, M., Coisson, J.D., Travaglia, F., Garino, C., Arlorio, M., 2009. Development and validation of a SYBR-Green I real-time PCR protocol to detect hazelnut (*Corylus avellana* L.) in foods through calibration via plasmid reference standard. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11201–11208.

De Ley, P., Blaxter, M.L., 2002. Systematic position and phylogeny. In: *The Biology of Nematodes*. D.L. Lee (ed.), London, Taylor and Francis, pp. 1–30.

De Ley, P., Blaxter, M.L., 2004. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. In: *Nematology monographs and perspectives*. Cook, R. Hunt, D. (ed.), Brill Publishing, Leiden-Boston, pp 633-653.

Del Rey Moreno, A., Valero López, A., Gómez Pozo, B., Mayorga Mayorga, C., Hernández Quero, J., Garrido Torres Puchol, M.L., Torres Jaén, M.J., Lozano Maldonado, J., 2008. Utilidad de la anamnesis y de las técnicas inmunológicas en el diagnóstico de la anisakidosis en pacientes con abdomen agudo. *Rev. Esp. Enfermedades Dig.* 100, 146–152.

Del Rey Moreno, A., Doblas Fernández, J., Oehling De Los Reyes, H., Hernández Carmona, J.M., Pérez Lara, F.J., Marín Moya, R., Galeote Quecedo, T., Mata Martín, J.M., Garrido Torres Puchol, M.L., Oliva Muñoz, H., 2013. Acute abdomen, anisakidosis and surgery: Value of history, physical examination and non-immunological diagnostic procedures. *J. Med. Med. Sci.* 4, 63–70.

Di Pinto, A., Forte, V., Guastadisegni, M. C., Martino, C., Schena, F. P., Tantillo, G., 2007. A comparison of DNA extraction methods for food analysis. *Food Control* 18, 76–80.

Directiva 91/493/CEE del Consejo de 22 de Julio de 1991 por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros. *Diario Oficial* nº L 268/15 del 24/09/91.

Djurkin-Kušec I., Radišić Ž., Komlenić M., Kušec G., 2015. Comparison of commercial DNA kits and traditional DNA extraction procedure in PCR detection of pork in dry/fermented sausages. *Agriculture* 21, 199–203.



Dong, F., Cook, A., Herwig, R., 2003. High hydrostatic pressure treatment of finfish to inactivate *Anisakis simplex*. J. Food Protect. 66, 1924-1926.

EFSA, 2010. Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), European Food Safety Authority (EFSA). EFSA J. 8, 4, 1543-1634.

Eiras, J.C., Pavanelli, G.C., Takemoto, R.M., Nawa, Y., 2018. Fish-borne nematodiasis in South America: neglected emerging diseases. J. Helminthol. 92, 649-654.

Espiñeira, M., Herrero, B., Vieites, J.M., Santaclara, F.J., 2010. Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR-RFLP of ITS-1 region. Food Control 21, 1051-1060.

Esteve, C., Resano, A., Díaz-Tejeiro, P., Fernández-Benítez, M., 2000. Eosinophilic gastritis due to *Anisakis*: a case report. Allergol. Immunopathol. 28, 21-23.

FAO, 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224p.

FAO, WHO, 2014. Multicriteria-based Ranking for Risk Management of Food-borne Parasites. Rome. [Disponible en <http://www.who.int/iris/handle/10665/112672>].

Fæste, C., Jonscher, K., Dooper, M., Egge-Jacobsen, W., Moen, A., Daschner, A., Egaas, E., Christians, U., 2014. Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. EuPa Open Proteom. 4, 140-155.

Fæste, C., Plassen, K.E., Løvberg, A., Moen, A., Egaas, E., 2015. Detection of proteins from the fish parasite *Anisakis simplex* in Norwegian farmed salmon and processed fish products. Food Anal. Methods 8, 1390-1402.

Fæste, C., Moen, A., Schniedewind, B., Anonsen, J., Klawitter, J., Christians, U., 2016. Development of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for the quantitation of *Anisakis simplex* proteins in fish, J. Chromatogr. A. 1432, 58-72.

Fernández-Caldas, E., Quirce, S., Marañón, F., Díez Gómez, M. L., Gijón Botella, H., López Román, R., 1998. Allergenic cross-reactivity between third stage larvae of *Hysterothylacium aduncum* and *Anisakis simplex*. J. Allergy Clin. Immunol. 101, 4, 554-555.

Fernández de Corres, L., Del Pozo, M.D., Aizpuru, F., Buendía, E., 2001. Prevalencia de la sensibilización a *Anisakis simplex* en tres áreas españolas, en relación a las diferentes tasas de consumo de pescado. Relevancia de la alergia a *Anisakis simplex*. Alergol. Inmunol. Clin. 16, 337-346.

FDA, 2001. Processing parameters needed to control pathogens in cold smoked fish. *J. Food Prot.* 66, 5, S1055-S1133.

FDA, 2011 Fish and fishery products hazards and controls guidance. Chapter 5: Parasites, pp 91-98. [Disponibile en: <http://www.fda.gov/downloads/GuidanceDocuments/Seafood/>]

Fraulo, P., Morena, C., Costa, A., 2014. Recovery of anisakid larvae by means of chloro-peptic digestion and proposal of the method for the official control. *Acta Parasitol.* 59, 629–634.

Giusti, A., Armani, A., Sotelo, C.G., 2017. Advances in the analysis of complex food matrices: species identification in surimi-based products using Next Generation Sequencing technologies. *PLoS One* 12,10, e0185586.

Gómez-Mateos, M., Valero, A., Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J., 2016. Molecular epidemiology and risk factors for *Anisakis simplex* (s.l.) infection in blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in a confluence zone of the Atlantic and Mediterranean: differences between *A. simplex* (s.s.) and *A. pegreffii*. *Int. J. Food Microbiol.* 232, 111–116.

Gómez-Morales, M.A., Martínez Castro, C., Lalle, M., Fernández, R., Pezzotti, P., Abollo, E., Pozio, E., 2018. UV-press method versus artificial digestion method to detect Anisakidae L3 in fish fillets: comparative study and suitability for the industry. *Fish. Res.* 202, 22-28.

Gómez-Samblas, M., Vílchez, S., Racero, J.C., Fuentes, M. V., Osuna, A., 2015. Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial “Serrano” ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food Microbiol.* 46, 107–113.

Guardone, L., Malandra, R., Costanzo, F., Castigliero, L., Tinacci, L., Gianfaldoni, D., Guidi, A., Armani, A., 2016. Assessment of a sampling plan based on visual inspection for the detection of anisakid larvae in fresh anchovies (*Engraulis encrasicolus*). A first step towards official validation? *Food Anal. Methods* 9, 1418-1427.

Hermida, M., Mota, R., Pacheco, C.C., 2012. Infection levels and diversity of anisakid nematodes in blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, from Portuguese waters. *Parasitol. Res.* 110, 1919–28

Herrero, B., Vieites, J.M., Espiñeira, M., 2011. Detection of anisakids in fish and seafood products by real-time PCR. *Food Control* 22, 933–939.

Hiramatsu, K., Kamiyamamoto, S., Ogino, H., Sotomura, Y., Konishi, K., Miwa, A., Demashi, H., Noda, Y., 2004. Case report: a case of acute gastric anisakiasis presenting with malignant tumor-like features: a large gastric vanishing tumor accompanied by local lymph node swelling. *Dig. Dis. Sci.* 49, 965–969.

Hird, H., Chisholm, J., Sánchez, A., Hernández, M., Goodier, R., Schneede, K., Boltz, C., Popping, B., 2006. Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Addit. Contam.* 23, 645–650.

Hochberg, N.S., Hamer, D.H. 2010. Anisakidosis: perils in the deep. *Clin. Infect. Dis.* 51, 7, 806-812.

ICMSF, 1996. *Microorganisms in Foods 5. Microbiological specifications of food pathogens.* Blackie Academic & Professional. London, 514 p.

Irigoitia, M., Braicovich, P., Lanfranchi, A., Farber, M.D., Timi, J.T., 2018. Distribution of anisakid nematodes parasitizing rajiform skates under commercial exploitation in the Southwestern Atlantic. *Int. J. Food Microbiol.* 267, 20-28.

Jabbar, A., Fong, R.W., Kok, K.X., Lopata, A.L., Gasser, R.B., Beveridge, I., 2013. Molecular characterization of anisakid nematode larvae from 13 species of fish from Western Australia. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 3, 247- 253.

Keskin, E., Atar, H.H., 2012. Molecular identification of fish species from surimi-based products labeled as Alaskan pollock. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 811–814.

Kim, K.H., Eom, K.S., Park, J.K., 2006. The complete mitochondrial genome of *Anisakis simplex* (Ascaridida: Nematoda) and phylogenetic implications. *Int. J. Parasitol.* 36, 319–328.

Kim, S.H., Park, C.W., Kim, S.K., Won, S., Park, W.K., Kim, H.R., Nam, K.W., Lee, G.S., 2013. A case of anisakiasis invading the stomach and the colon at the same time after eating anchovies. *Clin. Endosc.* 46, 293–296.

Klimpel, S., Palm, H.W., Ruckert, S., Piatkowski, U., 2004. The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (Northern North Sea). *Parasitol. Res.* 94, 1–9.

Klotz, C., Šoba, B., Skvarč, M., Gabriël, S., Robertson, L.J., 2017. A European network for food-borne parasites (Euro-FBP): meeting report on 'Analytical methods for food-borne parasites in human and veterinary diagnostics and in food matrices'. *Parasit. Vectors* 10, 1, 559.

Knoff, M., Carmona de São Clemente, S., Magalhães Pinto, R., Corrêa Gomes, D., 2001. Nematodes of elasmobranch fishes from the southern coast of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 81–87.

Koie, M., Berland, B., Burt, M., 1995. Development to third-stage larva occurs in eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 52, Suppl 1, 134-139.

- Kojima, G., Usuki, S., Mizokami, K., Tanabe, M., Machi, J., 2013. Intestinal anisakiasis as a rare cause of small bowel obstruction. *Am. J. Emerg. Med.* 31, 1422.e1-2.
- Kumar, T., Majid, M.A.A., Onichandran, S., Jaturas, N., Andiappan, H., Salibay, C.C., Hazel, A. L., Tabo, H., Tabo, N., Dungca, J.Z., Tangpong, J., Phiriyasamith, S., Yuttayong, B., Polseela, R., Do, B.N., Sawangjaroen, N., Tan, T.-C., Lim, Y.A.L., Nissapatorn, V., 2016. Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia: towards an integrated water detection system. *Infect. Dis. Poverty* 5, 3.
- Kuhn, T., Hailer, F., Palm, H.W., Klimpel, S., 2013. Global assessment of molecularly identified *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts. *Folia Parasitol.* 60, 123–134.
- Larrat, S., Bouchard, F., Séguin, G., Lair, S., 2013. Relationship between red vent syndrome and anisakid larvae burden in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Wildl. Dis.* 49, 229–34.
- Lee, W.J., Seo, D.J., Oh, H., Jeon, S.B., Jung, D., Choi, C., 2016. Simultaneous detection and prevalence of allergens in *Anisakis* species isolated from marine fishes. *J. Food Prot.* 79, 789-94.
- Levsen, A., Lunestad, B.T., Berland, B., 2005. Low detection efficiency of candling as a commonly recommended inspection method for nematode larvae in the flesh of pelagic fish. *J. Food Prot.* 68, 828–832.
- Llarena-Reino, M., González, A.F., Vello, C., Outeirino, L., Pascual, S., 2012. The accuracy of visual inspection for preventing risk of *Anisakis* spp. infection in unprocessed fish. *Food Control* 23, 54–58.
- Llarena-Reino, M., Abollo, E., Rigueira, M., Rodríguez, H., Pascual, S., 2015. Horizon scanning for management of emerging parasitic infections in fishery products. *Food Control* 49, 49–58.
- Llorens, C., Arcos, S.C., Robertson, L., Ramos, R., Futami, R., Soriano, B., Ciordia, S., Careche, M., González-Muñoz M., Jiménez-Ruiz, Y., Carballeda-Sangiao, N., Moneo, I., Albar, J.P., Blaxter, M., Navas, A., 2018. Functional insights into the infective larval stage of *Anisakis simplex* s.s., *Anisakis pegreffii* and their hybrids based on gene expression patterns. *BMC Genomics* 19, 1, 592.
- Lo, Y.T., Shaw, P.C., 2018. DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food Chem.* 240, 767–774.
- López, I., Pardo, M.A., 2010. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Anisakis simplex* parasite as a food-borne allergen source in seafood products. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1469–1477.

Lutfalla, G., Uze, G., 2006. Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments. *Methods Enzymol.* 410, 386-400.

Madrid, E., 2015. Estudio de anisákidos en pescado fresco expedido en supermercados de València y análisis del riesgo de adquirir anisakidosis asociado a su consumo. Tesis Doctoral. Universitat de Valencia.

Madrid, E., Galán-Puchades, M.T., Fuentes, M.V., 2012. Risk analysis of human anisakidosis through the consumption of the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, sold at Spanish supermarkets. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 934-938.

Marino, A.M.F., Percipalle, M., Giunta, R.P., Salvaggio, A., Caracappa, G., Alfonzetti, T., Reale, S., 2017. Development and validation of a real-time PCR assay for the detection of *Toxoplasma gondii* DNA in animal and meat samples. *J. Vet. Diag. Invest.* 29, 203-207.

Marquardt, W.C., 2000. Anisakiosis. In: *Parasitology and vector biology*. W.C. Marquardt, R. S. Demaree y R. B. Grieve (Eds.), San Diego, Academic Press, pp. 442-444.

Marques, J.F., Cabral, H.N., Busi, M., D'Amelio, S., 2006. Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes of the Portuguese coast. *J. Helminthol.* 80, 47-51.

Martín-Sánchez, J., Artacho-Reinoso, M.E., Díaz-Gavilán, M., Valero López, A., 2005. Structure of *Anisakis simplex* s.l. populations in a region sympatric for *A. pegreffii* and *A. simplex* s.s.: absence of reproductive isolation between both species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 141, 155-162.

Mattiucci, S., Nascetti, G., 2008. Advances and trends in the molecular systematics of *Anisakis* nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite coevolutionary processes. *Adv. Parasitol.* 66, 47-148.

Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Abollo, E., Webb, S., Pascual, S., Cianchi, R., Bullini, L., 2001. Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *Int. J. Parasitol.* 31, 9-14.

Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Portes Santos, C., Costa, G., Di Benedicto, A., Ramos, R., Argyrou, M., Cianchi, R., Bullini, L., 2002. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.* 51, 159-170.

Mattiucci, S., Abaunza, P., Ramadori, L., Nascetti, G., 2004. Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *J. Fish Biol.* 65, 495-510.

- Mattiucci, S., Nascetti, G., Dailey, M., Webb, S.C., Barros, N.B., Cianchi, R., Bullini, L., 2005. Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Syst. Parasitol.* 61, 157–171.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Damiano, S., Nascetti, G., 2007. Molecular detection of sibling species in anisakid nematodes. *Parassitologia.* 49, 147-153.
- Mattiucci, S., Farina, V., Campbell, N., MacKenzie, K., Ramos, P., Pinto, A.L., Abaunza, P., Nascetti, G., 2008. *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fish. Res.* 89, 146-151.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Webb, S., 2009. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Syst. Parasitol.* 74, 199-217.
- Mattiucci, S., Fazii, P., De Rosa, A., 2013. Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 496–509.
- Mattiucci, S., Cimmaruta, R., Cipriani, P., Abaunza, P., Bellisario, B., Nascetti, G., 2015. Integrating *Anisakis* spp. parasites data and host genetic structure in the frame of a holistic approach for stock identification of selected Mediterranean Sea fish species. *Parasitology* 142, 90–108.
- Mattiucci, S., Acerra, V., Paoletti, M., Cipriani, P., Levsen, A., Webb, S.C., Canestrelli, D., Nascetti, G., 2016. No more time to stay “single” in the detection of *Anisakis pegreffii*, *A. simplex* (s. s.) and hybridization events between them: a multi-marker nuclear genotyping approach. *Parasitology* 143, 998-1011.
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Paoletti, M., Levsen, A., Nascetti, G., 2017. Reviewing biodiversity and epidemiological aspects of anisakid nematodes from the North-East Atlantic Ocean. *J. Helminthol.* 91, 422–439.
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Levsen, A., Paoletti, M., Nascetti, G., 2018. Molecular epidemiology of *Anisakis* and anisakiasis: an ecological and evolutionary road map. *Adv. Parasitol.* 99, 93–263.
- Mattiucci, S., Bello, E., Paoletti, M., Webb, S.C., Timi, J.T., Levsen, A., Cipriani, P., Nascetti, G., 2019. Novel polymorphic microsatellite loci in *Anisakis pegreffii* and *A. simplex* (s.s.) (Nematoda: Anisakidae): implications for species recognition and population genetic analysis. *Parasitology* 146, 1387–1403.

- Mattos, E.C., Meira-Strejevitch, C.D.S., Marciano, M.A.M., Faccini, C.C., Lourenço, A.M., Pereira-Chiocola, V.L., 2017. Molecular detection of *Trypanosoma cruzi* in acai pulp and sugarcane juice. *Acta Trop.* 176, 311–315.
- McClelland, G., 2002. The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. *Parasitology* 124, Suppl, S183–S203.
- Meloni, M., Angelucci, G., Merella, P., Siddi, R., Deiana, C., Orru, G., Salati, F., 2011. Molecular characterization of *Anisakis* larvae from fish caught off Sardinia. *J. Parasitol.* 97, 908–914.
- Miura, T., Iwaya, A., Shimizu, T., Tsuchiya, J., Nakamura, J., Yamada, S., Miura, T., Yanagi, M., Usuda, H., Emura, I., Takahashi, T., 2010. Intestinal anisakiasis can cause intussusception in adults: an extremely rare condition. *World J. Gastroenterol.* 16, 1804–1807.
- Mokhtari, W., Nsaibia, S., Gharbi, A., Aouni, M., 2013. Real-time PCR using SYBR green for the detection of *Shigella* spp. in food and stool samples. *Mol. Cell. Probes* 27, 53-59.
- Möller, H., Anders, K., 1986. Nematelminthes. In: Diseases and parasites of marine fishes. Möller, V. (Ed.). Kiel. Alemania. pp. 165-178.
- Molina-Fernández, D., Malagón, D., Gómez-Mateos, M., Benítez, R., Martín-Sánchez, J., Adroher, F.J., 2015. Fishing area and fish size as risk factors of *Anisakis* infection in sardines (*Sardina pilchardus*) from Iberian waters, southwestern Europe. *Int. J. Food Microbiol.* 203, 27–34.
- Molina-Fernández, D., Rubio-Calvo, D., Adroher, F.J., Benítez, R., 2018. Molecular epidemiology of *Anisakis* spp. in blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in Eastern waters of Spain, Western Mediterranean Sea. *Int. J. Food Microbiol.* 282, 49–56.
- Molina-García, A., Sanz, P., 2002. *Anisakis simplex* larvae killed by high hydrostatic processing. *J. Food Protect.* 65, 383-388.
- Moneo, I., Caballero, M.L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, I., Rodríguez-Pérez R., Silva, A., 2005. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res.* 96, 285–289.
- Moneo, I., Carballeda-Sangiao, N., González-Muñoz, M., 2017. New perspectives on the diagnosis of allergy to *Anisakis* spp. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 17, 5, 27-37.
- Monis, P.T., Giglio, S., Saint, C.P., 2005. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal. Biochem.* 340, 24–34.

- Moore, A.B.M., 2001. Metazoan parasites of the lesser-spotted dogfish *Scyliorhinus canicula* and their potential as stock discrimination tools. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 81, 1009–1013.
- Moravec, F., 1994. Parasitic nematodes of freshwater fishes of Europe. Academia, Prague, 473 p.
- Mossali, C., Palermo, S., Capra, E., Piccolo, G., Botti, S., Bandi, C., D'Amelio, S., Giuffra, E., 2010. Sensitive detection and quantification of anisakid parasite residues in food products. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 391–397.
- Murata, R., Suzuki, J., Sadamasu, K., Kai, A., 2011. Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitol. Int.* 60, 2, 193-198.
- Murphy, H.R., Lee, S., da Silva, A.J., 2017. Evaluation of an improved U.S. Food and Drug administration method for the detection of *Cyclospora cayentanensis* in produce using real-time PCR. *J. Food Prot.* 80, 7, 1133-1144.
- Nadler, S.A., Hudspeth, D.S., 2000. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J. Parasitol.* 86, 380–393.
- Nam, H.M., Srinivasan, V., Gillespie, B.E., Murinda, S.E., Oliver, S.P., 2005. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 161-171.
- Namiki, M., Morooka, T., Kawauchi, H., Veda, N., Sekiya, C., Nakagawa, K., 1969. Endoscopic observation of *Anisakis* larvae in the stomach and some interesting findings. *Gastroenterol. Endosc.* 12, 302.
- Nascetti, G., Paggi, L., Orechia, P., Smith, J.W., Mattiucci, S., Bullini, L., 1986. Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *Int. J. Parasitol.* 16, 6, 633–640.
- Nesvadbová, M., Knoll, A., Vašátková, A., 2010. Selection of the most suitable method for the extraction of DNA from foods and feeds for species identification. *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendel. Brun.* 2, 169–174.
- Nieuwenhuizen, N.E., Lopata, A.L., 2014. Allergic Reactions to *Anisakis* Found in Fish. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 14, 8, 455.
- Nieuwenhuizen, N.E., Lopata, A.L., Jeebhay, M.F., Herber, D.R., Robins, T.G., Brombacher, F., 2006. Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1098–105.



Olivares, F., Heras, C. De, Teresa, M., Tejada, M., 2013. Effect of the mechanical separation of muscles on the retention and viability of *Anisakis* larvae during the production of surimi. *Ecol. Appl.* 12, 2, 133-139.

Olivares, F., González-Muñoz, M., Carballeda-Sangiao, N., Rodríguez-Mahillo, A., Careche, M., de las Heras, C., Navas, A., Tejada, M., 2015. Removal of *Anisakis simplex* allergens from infected fish during the washing step of surimi production. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2626–2631.

Osanz Mur, A.C., 2001. Presencia de larvas de anisákidos (Nematoda: Ascaridoidea) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.

Pampiglione, S., Rivasi, F., Criscuolo, M., De Benedittis, A., Gentile, A., Russo, S., Testini, M., Villan, M., 2002. Human anisakiasis in Italy: a report of eleven new cases. *Pathol. Res. Pract.* 198, 429–434.

Panicker, G., Myers, M.L., Bej, A.K., 2004. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 498-507.

Pekmezci, G.Z., Bolukbas, C.S., Gurler, A.T., Onuk, E.E., 2013. Occurrence and molecular characterization of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) from *Merlangius merlangus euxinus* and *Trachurus trachurus* off the Turkish coast of Black Sea. *Parasitol. Res.* 112, 1031–7.

Pekmezci, G.Z., Onuk, E.E., Bolukbas, C.S., Yardimci, B., Gurler, A.T., Acici, M., Umur, S., 2014. Molecular identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes collected in Turkish waters. *Vet. Parasitol.* 201, 82–94.

Pepe, T., Trotta, M., Di Marco, I., Anastasio, A., Bautista, J.M., Cortesi, M.L., 2007. Fish species identification in surimi-based products. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3681–3685.

Pereira Bueno, J.M. 1992. Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiosis. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Dirección General de Salud Pública. 64 p.

Pereira, F.B., Luque, J.L., 2017. An integrated phylogenetic analysis on ascaridoid nematodes (Anisakidae, Raphidascarididae), including further description and intraspecific variations of *Raphidascaris (Sprentascaris) lanfrediae* in freshwater fishes from Brazil. *Parasitol. Int.* 1, 898-904.

Petter, A.J., Maillard, C., 1988. Larves d'Ascarides parasites de Poissons en Méditerranée occidentale. *Bull. Mus. Hist. Nat.* 10, 347-369.

Pierce, G.J., Bao, M., Mackenzie, K., Dunser, A., Giuliotti, L., Cipriani, P., Mattiucci, S., Hastie, L., 2018. Ascaridoid nematode infection in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and whiting (*Merlangius merlangus*) in Northeast Atlantic waters. *Fish. Res.* 202, 122-133.

Pinkus, G.S., Coolidge, C., Little, M.D., 1975. Intestinal anisakiasis. First case report from North America. *Am. J. Med.* 59, 114–20.

Piras, M.C., Tedde, T., Garippa, G., Virgilio, S., Sanna, D., Farjallah, S., Merella, P., 2014. Molecular and epidemiological data on *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in commercial fish caught off Northern Sardinia (Western Mediterranean Sea). *Vet. Parasitol.* 203, 237–240.

Piskata, Z., Servusova, E., Babak, V., Nesvadbova, M., Borilova, G., 2019. The quality of DNA isolated from processed food and feed via different extraction procedures. *Molecules* 24, 1-10.

Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S.M., Cobaret, V., Puisieux, A., Mighell, A., Roninson, P., Iglehearn, C., Isaacs, J., Markham, A., 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 3, 18.

Powell, H.A., Gooding, C.M., Garrett, S.D., Lund, B.M., McKee, R.A., 1994. Protease inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 59–61.

Prieto, N., Iniesto, E., Burbano, C., Cabanillas, B., Martínez, Y., Pedrosa, M.M., Rovira, M., Rodríguez, J., Muzquiz, M., Crespo, J.F., Cuadrado, C., Linacero, R., 2014. Detection of almond allergen coding sequences in processed foods by real-time PCR. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5617–5624.

Quiazon, K., 2016. *Anisakis* Dujardin, 1845 infection (Nematoda: Anisakidae) in pygmy sperm whale *Kogia breviceps* Blainville, 1838 from west Pacific region off the coast of Philippine archipelago. *Parasitol. Res.* 115, 3663–8.

RASSF. 2019. RASSF Portal-notification list. European Commission. [Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=notificationsList&StartRow=1>].

Real Decreto 1437/92 de 27 de noviembre, por el que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura. Boletín Oficial del Estado, N° 11 de 13/01/93.

Real Decreto 1420/2006 de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades. Boletín Oficial del Estado, N° 302 de 19.12.06.

Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Diario Oficial n° L 139/55 de 29/05/2004.

Repiso Ortega, A., Alcántara Torresa, C., González de Frutos, T., de Artaza Varasa, R., Rodríguez Merlo, J., Valle Muñoz, J.L., Martínez Potenciano, J.L., 2003. Anisakiasis gastrointestinal. Estudio de una serie de 25 pacientes. Gastroenterol. Hepatol. 26, 341–346.

Rello, F.J., Valero, A., Adroher, F.J., 2008. Anisakid parasites of the pouting (*Trisopterus luscus*) from the Cantabrian Sea coast, Bay of Biscay, Spain. J. Helminthol. 82, 287–291.

Rello, F.J., Adroher, F.J., Benítez, R., Valero, A., 2009. The fishing area as a possible indicator of the infection by anisakids in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) from Southwestern Europe. Int. J. Food Microbiol. 129, 277–281.

Richards, G.P., 1999. Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. J. Food Prot. 62, 691–697.

Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal. Biochem. 245, 2, 154–160.

Roca-Geronès, X., Fisa, R., Montoliu, I., 2018. Biogeography of *Anisakis* (Anisakidae) and *Hysterothylacium* (Rhaphidascaerididae) nematode species in consumed fish. Recent Adv. Pharm. Sci. 8, 95–118.

Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, R., 2013. Real-time PCR in food science: Introduction. Curr. Issues Mol. Biol. 15, 25-38.

Rodríguez-Mahillo, A.I., Gonzalez-Munoz, M., Moneo, I., Solas, M.T., Mendizabal, A., de las Heras, C., Tejada, M., 2008. Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion. J. Food. Prot. 71, 2578-2581.

Rodríguez-Mahillo, I., Gonzalez-Muñoz, M., De las Heras, C., Moneo, I., 2010. Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle. Foodborne Pathog. Dis. 7, 8, 967-973.

Romero, M., Valero, A., Navarro-Moll, M.C., Martín-Sánchez, J., 2013. Experimental comparison of pathogenic potential of two sibling species *Anisakis simplex* (s.s.) and *Anisakis pegreffii* in Wistar rat. Trop. Med. Int. Health 18, 979–984.

Ruíz Valero, J., Valero, A., Adroher, F.J., Ortega, J.E., López-Grande, F., 1991. Presencia de ascáridos en peces comerciales de frecuente consumo humano en Granada. I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidental-Europeas de Parasitología-ICASEP I, Compendio de Resúmenes de las Comunicaciones Presentadas, Valencia, 65 p.

Ruzante, J.M., Davidson, V.J., Caswell, J., Fazil, A., Cranfield, J.A.L., Henson, S.J., Anders, S.M., Schmidt, C., Farber, J.M., 2010. A multifactorial risk prioritization framework for foodborne pathogens. *Risk Anal.* 30, 724–742.

Sajali, N., Wong, S.C., Hanapi, U.K., Abu Bakar Jamaluddin, S., Tasrip, N.A., Mohd Desa, M.N., 2018. The Challenges of DNA Extraction in Different Assorted Food Matrices: a Review. *J. Food Sci.* 83, 10, 2409-2414.

Sánchez-Monsálvez, I., De Armas-Serra, C., Martínez, J., Dorado, M., Sánchez, A., Rodríguez-Caabeiro, F., 2005. A new procedure for marinating fresh anchovies and ensuring the rapid destruction of *Anisakis* larvae. *J. Food Prot.* 68, 1066-1072.

Shamsi S., 2014. Recent advances in our knowledge of Australian anisakid nematodes. *Int. J. Parasitol. Par.* 3, 178–187.

Shamsi, S., Butcher, A.R., 2011. First report of human anisakidosis in Australia. *Med. J. Aust.* 194, 4, 199-200.

Shamsi, S., Eisenbarth, A., Saptarshi, S., Beveridge, I., Gasser, R.B., Lopata, A.L., 2011. Occurrence and abundance of anisakid nematode larvae in five species of fish from southern Australian waters. *Parasitol. Res.* 108, 927–934

Shimamura, Y., Muwanwella, N., Chandran, S., Kandel, G., Marcon, N., 2016. Common symptoms from an uncommon infection: gastrointestinal anisakiasis. *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2016, 5176502

Simsek, E., Ciloglu, A., Yildirim, A., Pekmezci, G.Z., 2018. Identification and Molecular Characterization of *Hysterothylacium* (Nematoda: Raphidascarididae) larvae in bogue (*Boops boops* L.) from the Aegean Sea, Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 24 (4), 525-530.

Solas, M., García, M., De las Heras, C., Rodríguez-Mahillo, A., González-Muñoz M., Moneo, I., Mendizábal, A., Tejada, M., 2009. *Anisakis simplex* antigens in fresh and frozen-thawed muscle of anchovies in vinegar. *Food Sc. Tech. Int.*, 15, 2, 139-148.

Stormo, S., Sivertsen, A., Heia, K., Nilsen, H., Elvevoll, E., 2007. Effects of single wavelength selection for anisakid roundworm larvae detection through multispectral imaging. *J. Food Prot.* 70, 8, 1890-1895.

Suzuki, J., Murata, R., Hosaka, M., Araki, J., 2010. Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 88–93.

Takabayashi, T., Mochizuki, T., Otani, N., Nishiyama, K., Ishimatsu, S., 2014. Anisakiasis presenting to the ED: clinical manifestations, time course, hematologic tests, computed tomographic findings, and treatment. *Am. J. Emerg. Med.* 32, 1485–1489.

Tejada, M., 2009. *Anisakis*: efecto de los tratamientos dados al pescado en las larvas y en sus alérgenos. *Alim. Nutri. Salud* 16, 3, 71-83.

Tejada, M., Solas, M., Navas, A., Mendizábal, A., 2006. Effect of freezing and different heat treatments on *Anisakis* larvae: preliminary study. In: *Seafood research from fish to dish quality, safety and processing of wild and farmed fish*. Luten, J.B., Jacobsen, C., Bekaert, K., Sæbø, A., Oehlenschläger, J. (Eds), Wageningen Academic Publishers, pp, 309-316.

Tejada, M., Moneo, I., Rodríguez-Mahillo, A.I., González-Muñoz, M., Solas, M.T., 2008. Patente española: método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos destinados al consumo humano o animal. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Nº de solicitud: P200803495. Número de publicación: 2340978.

Tejada, M., Olivares, F., De las Heras, C., Careche, M., Solas, M., García, M., Fernández, A., Mendizábal, A., Navas, A., Rodríguez-Mahillo, I., González-Muñoz, M., 2015. Antigenicity of *Anisakis simplex* (s.s.) L3 in parasitized fish after heating conditions used in the canning processing. *J. Sci. Food. Agric.* 95, 922–927.

Torres, A.P., Jercic, M.I., Weitz, J.C., Dobrew, E.K., Mercado, R.A., 2007. Human Pseudoterranovosis, an emerging infection in Chile. *J. Parasitol.* 93, 2, 440-443.

Torres, P., Puga, S., Castillo, L., Lamilla, J., Miranda, J.C., 2014. Helminths, myxozoans and microsporidians in muscles of commercialised fresh fish and their importance as potential risk for human health in the city of Valdivia, Chile. *Arch. Med. Vet.* 46, 83-92.

Trevisan, C., Torgerson, P., Robertson, L., 2019. Foodborne Parasites in Europe: present status and future trends. *Trends Parasitol.* 35, 9, 695-703.

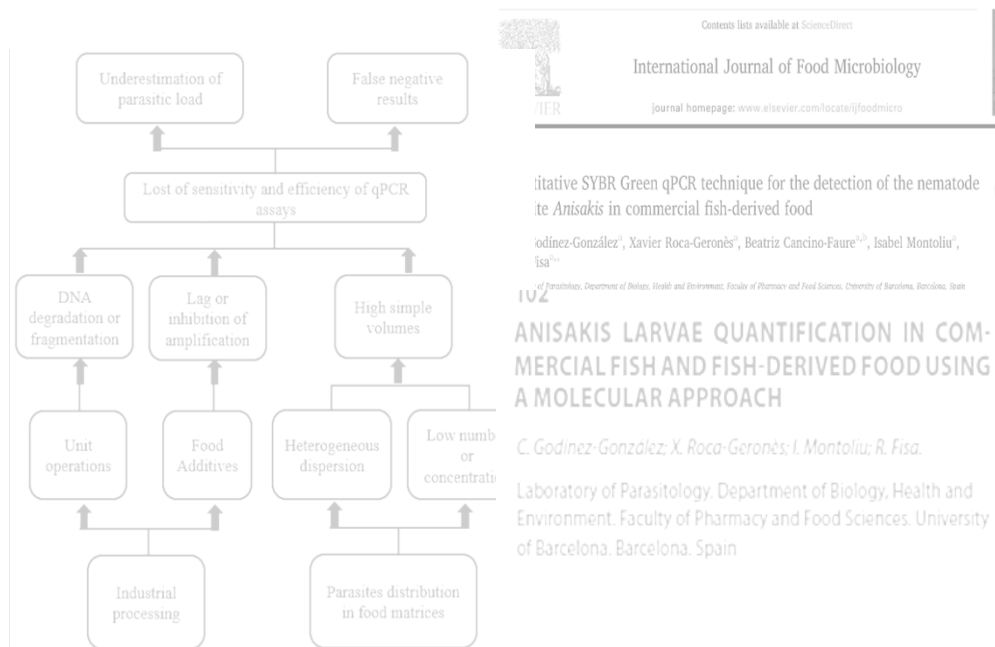
Umehara, A., Kawakami, Y., Matsui, T., Araki, J., Uchida, A., 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitol. Int.* 55, 267– 71.

Unsel, M., Brandt, P., Hiesel, R., 1995. Identification of the species origin in highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *Genome Res.* 4, 241–243.

- Valero, A., Terrados, S., Díaz, V., Reguera, V., Lozano, J., 2003. Determination of IgE in the serum of patients with allergic reactions to four species of fish-parasite Anisakids. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 13, 94–98.
- Valero, A., Paniagua, M.I., Hierro, I., Díaz, V., Valderrama, M.J., Benítez, R., Adroher, F.J., 2006. Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the Mediterranean coasts of Andalucía (southern Spain). *Parasitol. Int.* 55, 1–5.
- Van Thiel, P.H., Kuipers, F.C., Rosman, R.T., 1962. A nematode parasitic to herring causing acute abdominal syndromes in man. *Trop. Geogr. Med.* 2, 97–113.
- Vidaček, S., De las Heras, C., Solas, M., Rodríguez-Mahillo, A., Tejada, M., 2009. Effect of high hydrostatic pressure on mortality and allergenicity of *Anisakis simplex* L3 and on muscle properties of infested hake. *J. Sci. Food Agric.* 89, 13, 2228–2235.
- Weitzel, T., Sugiyama, H., Yamasaki, H., Ramírez, C., Rosas, R., Mercado, M., 2015. Human infections with *Pseudoterranova cattani* nematodes, Chile. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1874–1875.
- Werner, M.T., Fæste, C., Levsen, A., Egaas, E., 2011. A quantitative sandwich ELISA for the detection of *Anisakis simplex* protein in seafood. *Eur. Food Res. Technol.* 232, 157–166.
- Yagi, K., Nagasawa, K., Ishikura, H., Nagasawa, A., Sato, N., Kikuchi, K., Ishikura, H., 1996. Female worm *Hysterothylacium aduncum* excreted from human: a case report. *Jpn. J. Parasitol.* 45, 12–23.
- Yalçınkaya, B., Yumbul, E., Mozioglu, E., Akgoz, M., 2017. Comparison of DNA extraction methods for meat analysis. *Food Chem.* 221, 1253–1257.
- Yang, X., Nian, R., Lin, H., Duan, C., Sui, J., Cao, L., 2013. Detection of anisakid larvae in cod fillets by UV fluorescent imaging based on principal component analysis and gray value analysis. *J. Food Prot.* 76, 1288–92.
- Yasunaga, H., Horiguchi, H., Kuwabara, K., Hashimoto, H., Matsuda, S., 2010. Clinical features of bowel anisakiasis in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 1, 104–105.
- Zhu X., Gasser R.B., Podolska M., Chilton N. 1998. Characterization of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 28, 1911–1921.



# VIII. ANEXOS



Quantitative SYBR Green qPCR technique for the detection of the nematode *Anisakis* in commercial fish-derived food

C. Godínez-González<sup>a</sup>, Xavier Roca-Geronès<sup>a</sup>, Beatriz Cancino-Faure<sup>a,b</sup>, Isabel Montoliu<sup>a</sup>, R. Fisa<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Parasitology, Department of Biology, Health and Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

## ANISAKIS LARVAE QUANTIFICATION IN COMMERCIAL FISH AND FISH-DERIVED FOOD USING A MOLECULAR APPROACH

C. Godínez-González; X. Roca-Geronès; I. Montoliu; R. Fisa.

Laboratory of Parasitology, Department of Biology, Health and Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain





## ANEXO 1. International Journal of Food Microbiology 261 (2017) 89-94

International Journal of Food Microbiology 261 (2017) 89-94



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)

## Quantitative SYBR Green qPCR technique for the detection of the nematode parasite *Anisakis* in commercial fish-derived food



Carla Godínez-González<sup>a</sup>, Xavier Roca-Geronès<sup>a</sup>, Beatriz Cancino-Faure<sup>a,b</sup>, Isabel Montoliu<sup>a</sup>, Roser Fisa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Parasitology, Department of Biology, Health and Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Laboratory of Microbiology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Catholic University of Maule, Talca, Chile

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Anisakis*  
 qPCR  
 SYBR Green  
 Food matrix  
 Commercial fish-derived food

### ABSTRACT

The extensive presence of anisakids in fish for human consumption has become a problem of food safety and quality. The aim of this study was to develop and assess the performance of a quantitative SYBR Green qPCR assay for the detection and quantification of *Anisakis* DNA in fish by-products. L3 nematode larvae of *A. simplex* (s.L.) (n = 510), *A. physeteris* (n = 3), *Hysterothylacium* sp. (n = 10) and *Pseudoterranova* sp. (n = 1), isolated from blue whiting, horse mackerel and monkfish, were used for the optimization of the molecular assay. In addition, molecularly typed larvae of *A. simplex* (s.s.) (n = 10) and *A. pegreffii* (n = 5) of the complex *A. simplex* (s.L.) were used for the specificity assay. Primers targeting the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II gene (COII) were selected. Analytical sensitivity and reproducibility were evaluated in a food matrix consisting of commercial fish-derived food spiked with larvae of *A. simplex* (s.L.). The assay proved to be specific for the three analyzed *Anisakis* species. A high reproducibility and sensitivity was detected, with a 95% limit of detection (LOD) of 0.30 ng (95%CI 0.15–1.50) of *A. simplex* (s.L.) DNA per gram of food matrix and an operative LOD of 1.50 ng after a PROBIT analysis. The assay was applied to study the presence of *Anisakis* in four types of processed commercial food, namely crab sticks, "gulas", croquettes and burgers. Overall, 180 food samples from 15 commercial brands were studied, detecting *Anisakis* DNA in over half of them. The analyzed surimi-based products, "gulas" and crab sticks, showed the highest *Anisakis* burden (5.86 ± 0.69 and 4.68 ± 0.73 ng of *Anisakis* DNA per gram of food, respectively). Our results indicate that the optimized SYBR Green qPCR technique is an accurate and sensitive method that may improve detection of *Anisakis* in fresh and processed products.

### 1. Introduction

International trade in food products has grown rapidly as a result of expanding urbanization, an increase in large-scale food production and changes in consumer tastes and preferences. In addition, greater knowledge of foodborne pathogens has heightened the concern of consumers and authorities about the safety and quality of food available in the marketplace, and has presented new challenges in terms of safety control measures (Ruzante et al., 2010).

The presence of anisakids in fish for human consumption has become a public health problem due to their role in gastrointestinal infections and allergic reactions (EFSA, 2010). These nematodes display a complex life cycle in the marine ecosystem, their hosts including a broad variety of commonly consumed fish, which transport the third-stage larvae (L3) responsible for human anisakiosis after accidental

ingestion (Nieuwenhuizen and Lopata, 2014). Species of *Anisakis*, widespread among many fish species and geographical locations (Farjallah et al., 2008), are described as the main etiological agents, particularly two molecularly characterized sibling species of the complex *A. simplex* (*sensu lato*): *A. simplex* (*sensu stricto*) and *A. pegreffii*. Species of *Pseudoterranova* have also been involved in clinical cases, mainly in North and South America (Hochberg and Hamer, 2010; Torres et al., 2007), while species of *Contracaecum* have been rarely associated with the human disease (Shamsi and Butcher, 2011). Although *Hysterothylacium* species, very frequent in edible fish, have been described as the causative agent in one non-invasive clinical case (Yagi et al., 1996), it is currently accepted as non-pathogenic for humans (Angelucci et al., 2011).

Due to the difficulties in the prevention of *Anisakis* contamination throughout the food supply chain, as no maritime area can be presumed

\* Corresponding author at: Laboratory of Parasitology, Department of Biology, Health and Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Av. Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona, Spain.  
 E-mail address: [rfisa@ub.edu](mailto:rfisa@ub.edu) (R. Fisa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.012>

Received 28 February 2017; Received in revised form 12 May 2017; Accepted 15 May 2017

Available online 16 May 2017

0168-1605/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

free of *Anisakis*, the presence of larvae in fishery products is considered a natural condition, with a “presumption of infection”, according to the European Food Safety Authority (EFSA, 2010). There is therefore an important need to develop simple and effective methods to ensure the quality and safety of fishery products. Food safety authorities currently perform different analytical methods for anisakid detection in fish: non-destructive techniques such as candling and the use of ultraviolet light, or destructive methods such as artificial digestion. These methods are based on visual detection and identification of whole or large fragments of larvae in fish (Fraulo et al., 2014; Levsen et al., 2005; Yang et al., 2013) and are therefore not suitable for determining the presence of the parasite in processed fish-based food products, due to the mechanical and temperature conditions that the production of this type of food usually entails.

Molecular methods, mainly based on real time PCR methodology (qPCR), are being increasingly applied for pathogen detection and quantification in fresh and processed food due to their high sensitivity, specificity and speed, being efficient even with damaged material. Bacteria such as *Salmonella* spp. (Malorny et al., 2004) and *Listeria monocytogenes* (O’Grady et al., 2008), and parasites like the protozoa *Toxoplasma gondii* (Gomez-Sambias et al., 2015), *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* (Kumar et al., 2016) have been detected in different food and water samples by qPCR using specific labeled probes. More recently, fluorescent dyes such as SYBR Green qPCR have been used for food pathogen analysis as an economical alternative to the use of specific probes. SYBR Green has proved to be a sensitive and specific method for the identification of different microorganisms, including Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat (Brusa et al., 2015) and emetic *Bacillus cereus* in a variety of food, such as hamburger, cow milk or vegetable salad (Ueda et al., 2013).

PCR-based assays have been widely used for the taxonomic identification of larvae at the genus and species level (Chen et al., 2008; Zhu et al., 1998), but qPCR has been applied only recently for anisakid detection in fish and fish-derived products (Herrero et al., 2011; Lopez and Pardo, 2010; Mossali et al., 2010). In the present study, a SYBR Green qPCR-based assay was developed for the detection and quantification of *Anisakis* DNA and evaluated in a food matrix for direct use in fish by-products. The qPCR technique was applied in different types of fish-derived food samples acquired in retail stores to detect and quantify the *Anisakis* DNA burden.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Nematode larval material

L3 of anisakid species, *A. simplex* (s.l.) (n = 510), *A. physeteris* (n = 3) and *Pseudoterranova* sp. (n = 1) and L3 of the raphidascaridid *Hysterothylacium* sp. (n = 10) were used for the optimization of the molecular assay. Larvae were isolated from commonly consumed fish purchased in retail stores in Barcelona. *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae were obtained from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and horse mackerel (*Trachurus trachurus*) specimens, and *Pseudoterranova* from a monkfish (*Lophius piscatorius*). To isolate the larvae, the body cavity and belly flaps of fish were examined by visual inspection, and internal organs were observed under a stereomicroscope. Larvae were identified morphologically (Koié, 1993; Petter and Maillard, 1988) and stored in physiological solution until DNA extraction. For specific identification, 15 *A. simplex* (s.l.) larvae were typed by PCR-RFLP of the ITS region (D’Amelio et al., 2000) as *A. simplex* (s.s.) (n = 10) and *A. pegreffii* (n = 5).

### 2.2. Food matrix

For analytical sensitivity and repeatability studies, samples of commercial fish-derived food spiked with larvae of *Anisakis* were prepared as follows. 40 *A. simplex* (s.l.) larvae were lysed in 400  $\mu$ L of

phosphate buffer solution (PBS, pH = 7.2) with 40  $\mu$ L of proteinase K (Roche Diagnostics, Spain) at 55 °C overnight. From the lysed larvae, ten-fold serial dilutions were prepared using PBS, and each dilution was homogenized with a sample of 25 g of verified anisakid-free crab sticks and 100 mL of PBS. As a result, different concentrations ranging from  $1.36 \times 10^4$  to  $1.36 \times 10^{-3}$  ng of *A. simplex* (s.l.) DNA per gram of processed food were obtained, calculating the mean DNA concentration of a single larva as 85 ng/ $\mu$ L after the analysis of 30 specimens. This procedure was performed 12 times, carrying out 2 DNA extractions in each case, which resulted in 24 DNA extractions from each *Anisakis* concentration per gram of processed food.

### 2.3. Food samples

Different commercial fish-derived food products were studied: 6 brands of crab sticks, 5 of “gulas”, 3 of croquettes, and 1 of burgers; two commercial batches of each one were bought in different retail stores. According to the manufacturers’ labels, the crab sticks and “gulas” were surimi-based, the burgers were salmon- and hake-derived, two brands of croquettes were described as hake products, and in one the fish species was undeclared. The purchases were immediately transferred to the laboratory and kept in the fridge or freezer as recommended by the manufacturer until analysis. All the analyzed commercial brands were assigned with letters from A to I; brands A, B, D, E and H were refrigerated products, while brands C, F, G and I were frozen foods. Twenty-five grams of the commercial fish-derived food were homogenized with 100 mL of PBS using a Stomacher-400 (Seward, UK) for 30 min. This sample preparation was carried out in triplicate. Afterwards, two DNA extractions were performed from each food homogenate, obtaining 6 DNA extractions from each batch of product, which resulted in 180 analyzed samples.

Verified larvae-free flesh of blue whiting and horse mackerel, as well as non-seafood products such as chicken and beef were used as extraction negative controls (ENCs) in the molecular assays. Flesh samples of 200 mg were processed for DNA extraction in triplicate in all cases.

### 2.4. DNA extraction

Genomic DNA was isolated and purified from anisakid larvae specimens, the food matrix, food samples and ENCs using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Spain), according to the manufacturer’s instructions with some modifications. Before DNA extraction, a volume of 200  $\mu$ L of a single larva in PBS or food homogenate was mixed with 600  $\mu$ L of Nuclei Lysis Solution and 17.5  $\mu$ L of 20 mg/mL Proteinase K (Roche Diagnostics, Spain) and incubated overnight at 55 °C. DNA was separated by precipitation and centrifugation, purified using ethanol at 70% (Sigma-Aldrich, Spain), and resuspended in the rehydration solution (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). The DNA concentration was measured by absorbance at 260 nm using a ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA). DNA extracts were stored at –20 °C until molecular analysis.

### 2.5. SYBR Green qPCR technique

A quantitative SYBR Green qPCR technique, targeting a small fragment of 96 pb of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II gene (COII), was developed using primers QCYTCII forward (5'-AGTAA-GAAGATTGAATATCAGITTTGGTGA-3') and QCYTCII reverse (5'-AAGTAA- ACTCAAAGAAGGCACCATC-3') (Lopez and Pardo, 2010). The reaction mixture, a total of 10  $\mu$ L, contained 1  $\times$  SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics, Spain), 300 nM of each QCYTCII primer and 2.5  $\mu$ L of DNA as the template. All reaction mixtures were prepared in 384 optical well plates and amplifications were run in the LightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics, Germany) with the following thermal conditions: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min,

followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 65 °C for 1 min. The product melting curve analysis protocol was 95 °C for 1 min, 40 °C for 1 min, 65 °C for 1 s and then an increase of 1 °C/s to 95 °C for 30 s. All analyses were performed in duplicate.

Molecular biology-grade water (Sigma-Aldrich, Spain) and ENC were used as negative controls and DNA extracted from *A. simplex* (*s.L.*) larvae as the positive control. A standard curve was constructed with ten-fold serial dilutions of *A. simplex* (*s.L.*) DNA from  $1.36 \times 10^4$  to  $1.36 \times 10^{-3}$  ng/g of processed food. Results were expressed in quantification cycle (Cq) values, that is the point at which fluorescence is first detected above the baseline, which is inversely correlated to the initial amount of sample DNA (Bustin et al., 2009). The parasitic load of every sample was calculated using the standard curve with the Light-Cycler 480 software by the second derivative maximum method.

### 2.6. TaqMan qPCR technique

A TaqMan qPCR previously described (Lopez and Pardo, 2010), using both QCYTII primers and the specific probe CYTII (5'-FAM-TTCCTACTTTAATTTGGTTGCTC-MGB-3'), was performed with slight modifications. The reaction volume was adjusted at 10 µL with Light-Cycler 480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics, Spain) and 2.5 µL of DNA as the template. Amplifications were carried out in the thermocycler LightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics, Germany), programmed to hold at 50 °C for 2 min, followed by 95 °C for 10 min, and to complete 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The amplification controls were the same as indicated in the SYBR Green qPCR technique. All analyses were performed in duplicate. The qPCR was considered positive when the Cq was < 40.

### 2.7. Statistical analysis

A univariate linear regression model was adjusted for the linearity test. The sensitivity of the qPCR techniques was obtained by determining the limit of detection (LOD) at 95% by a PROBIT analysis. Additionally, for the food samples, univariate analysis of variance (ANOVA) was performed with mixed models (fixed factors: brand and type of commercial food; random factor: batch nested in brand). Linear regression, PROBIT analysis and ANOVA were carried out with the SAS 9.4 software (SAS Institute, USA).

## 3. Results

### 3.1. SYBR Green qPCR optimization

The SYBR Green qPCR assay was evaluated according to specificity, sensitivity and reproducibility. To ensure the correct performance of the method, results were compared with those obtained in parallel with a TaqMan specific probe.

#### 3.1.1. Specificity study

No amplification was detected in any ENCs or in the molecular grade water analyzed by the SYBR Green qPCR technique. In all of these samples a Cq of 35 was obtained, and thus this value was considered negative. With regard to *Anisakis* larvae, a positive reaction was detected in the three species studied, *A. simplex* (*s.s.*), *A. pegreffii* and *A. physeteris*, with mean Cq values of 14.67, 14.89 and 21.46, respectively, and low standard deviations in all cases; the melting temperature (Tm) point was found at 76 °C. Larvae of the two other genera studied, *Pseudoterranova* and *Hysterothylacium*, were not amplified (Table 1). The TaqMan PCR assay showed the same results for all larvae studied, with a uniform lateness of approximately two cycles in the three *Anisakis* species, and no amplification in any ENCs (Table 1).

#### 3.1.2. Analytical sensitivity and reproducibility study

The analysis of the food matrix with different concentrations of *A.*

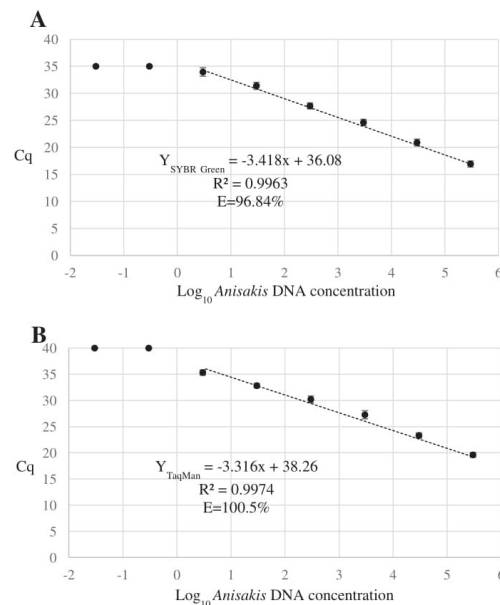
**Table 1**  
SYBR Green qPCR and TaqMan qPCR results, expressed in Cq, obtained from different species of larvae and negative control samples.

Sample	Cq ± SD	
	SYBR Green qPCR	TaqMan qPCR
<i>Anisakis simplex</i> ( <i>s.s.</i> ) (10)	14.67 ± 0.66	16.36 ± 0.72
<i>Anisakis pegreffii</i> (5)	14.89 ± 0.45	16.88 ± 0.55
<i>Anisakis physeteris</i> (3)	21.46 ± 0.29	23.07 ± 0.16
<i>Hysterothylacium</i> sp. (10)	35.00 ± 0.00	40.00 ± 0.00
<i>Pseudoterranova</i> sp. (1)	35.00 ± 0.00	40.00 ± 0.00
Larvae-free blue whiting	35.00 ± 0.00	40.00 ± 0.00
Larvae-free horse mackerel	35.00 ± 0.00	40.00 ± 0.00
Chicken meat	35.00 ± 0.00	40.00 ± 0.00
Beef meat	35.00 ± 0.00	40.00 ± 0.00
Molecular grade water	35.00 ± 0.00	40.00 ± 0.00

Cq, mean quantification cycle value obtained after three independent experiments; SD, standard deviation; ( ), number of analyzed larvae.

*simplex* (*s.L.*) DNA ( $1.36 \times 10^4$ – $1.36 \times 10^{-3}$  ng of DNA per gram of processed food), using the SYBR Green qPCR assay in six independent experiments, showed a linear behavior from  $1.36 \times 10^4$  to  $1.36$  ng of *A. simplex* (*s.L.*) DNA per gram of food matrix, with an efficiency of 96.59%; similar linearity was observed with the TaqMan qPCR assay with the same food matrix, as shown in Fig. 1.

The PROBIT analysis carried out with the 24 DNA extracts for each *A. simplex* (*s.L.*) concentration per gram of food matrix allowed us to achieve the 95% LOD of the SYBR Green qPCR technique at 0.30 ng (95%CI 0.15–1.50) of *A. simplex* (*s.L.*) DNA per gram of food matrix (Cq = 33.64), close to the 95% LOD detected by the TaqMan PCR assay (0.25 ng of *A. simplex* (*s.L.*) DNA per gram of food matrix, 95%CI



**Fig. 1.** Representative amplification curves obtained by plotting the mean Cq values with respect to the logarithm<sub>10</sub> of the *Anisakis* DNA concentrations from  $1.36 \times 10^4$  to  $1.36 \times 10^{-3}$  ng of *A. simplex* (*s.L.*) DNA per gram of food matrix with SYBR Green (A) and TaqMan qPCRs (B) in six independent experiments. The correlation coefficient R<sup>2</sup> and efficiency E are indicated.



**Table 2**  
Sensitivity and reproducibility results of SYBR Green and TaqMan qPCR techniques applied to the food matrix with a known *A. simplex* (s.L.) DNA concentration.

<i>Anisakis</i> DNA concentration (ng/g)	SYBR Green qPCR			TaqMan qPCR		
	Positive/tested <sup>a</sup>	Cq ± SD	CV (%)	Positive/tested <sup>a</sup>	Cq ± SD	CV (%)
1.36 × 10 <sup>4</sup>	24/24	16.96 ± 0.54	3.18	24/24	19.63 ± 0.73	3.75
1.36 × 10 <sup>3</sup>	24/24	21.14 ± 0.71	3.40	24/24	23.10 ± 0.53	2.29
1.36 × 10 <sup>2</sup>	24/24	24.34 ± 0.55	2.27	24/24	27.01 ± 0.71	2.64
1.36 × 10 <sup>1</sup>	24/24	28.00 ± 0.59	2.13	24/24	30.14 ± 0.45	1.51
1.36	24/24	31.76 ± 0.62	1.97	24/24	33.07 ± 0.44	1.35
1.36 × 10 <sup>-1</sup>	20/24	33.94 ± 0.74	2.19	21/24	35.56 ± 1.72	4.84
1.36 × 10 <sup>-2</sup>	5/24	34.82 ± 0.40	1.16	4/24	38.75 ± 2.21	5.70
1.36 × 10 <sup>-3</sup>	1/24	34.97 ± 0.11	0.32	3/24	39.34 ± 1.72	4.37

Cq, mean quantification cycle value; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

<sup>a</sup> All qPCR analyses were performed in duplicate.

0.12–1.35). An operative LOD was set at 1.50 ng of *A. simplex* (s.L.) DNA per gram of sample (Cq = 31.74), corresponding to the upper confidence limit, to increase the reliability of the SYBR Green assay. Low coefficients of variation were detected at any concentration, indicating high reproducibility for both methods (Table 2).

### 3.2. *Anisakis* DNA detection in fish-derived commercial food by SYBR Green qPCR

Application of the optimized SYBR Green qPCR method in the different analyzed commercial fish-derived food allowed the detection of *Anisakis* DNA in 4 out of 5 brands of “gulas”, 1 out of 3 of croquettes and 4 out of 6 of crab sticks, whereas no DNA was identified in the sole burger brand studied (Table 3). Data analysis showed significant differences ( $P < 0.001$ ) in Cq and *Anisakis* DNA concentration in the analyzed food: the highest variability was found in crab sticks, and brand A stood out with a higher concentration ( $12.39 \pm 1.45$  ng of *Anisakis* DNA per gram of food) than brands B, C and H and the negative brands C and I. Globally, the analysis of variance showed significant differences between the four types of analyzed food, “gulas” and crab sticks being the most positive with  $5.86 \pm 0.69$  and  $4.68 \pm 0.73$  ng of *Anisakis* DNA per gram of food, respectively. In the global analysis by brand, statistical differences were also found, with brand B standing out ( $10.26 \pm 3.43$  ng of *Anisakis* DNA per gram of food). For those food samples whose Cq value was higher than the operative LOD of the technique, the *Anisakis* DNA concentration was not quantified (Table 3).

## 4. Discussion

Anisakids are widely distributed in fish in the vast majority of fishing areas (EFSA, 2010) and *A. simplex* (s.L.) is considered a major biohazard, representing 33% of the reported food alerts in the European Union (Kleter et al., 2009). This highlights the need to optimize profitable and reliable *Anisakis* detection systems in fish and fish products in order to ensure food quality and protect consumer health.

In the last few years, real-time PCR assays have been developed and evaluated for the identification of a wide variety of microorganisms, with emphasis on the main foodborne pathogens with a substantial medical and economic impact. In the present study, a SYBR Green qPCR technique was optimized for *Anisakis* detection, using as a target region the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II gene, which is present in multiple copies and highly conserved, yet with enough genetic variability among anisakid genera (Kim et al., 2006; Lopez and Pardo, 2010). This method allowed detection and quantification of the three analyzed *Anisakis* species, without amplification of *Pseudoterranova* and *Hysterothylacium* larvae. The two sibling species, *A. simplex* (s.s.) and *A. pegreffii*, presented the same amplification behavior, while *A. physeteris* was amplified with a two-log lateness, which could be related to the few observed mismatches in the annealing zone of the

**Table 3**  
*Anisakis* DNA concentration in studied commercial fish-derived food detected by the SYBR Green qPCR assay.

Factor	Cq <sup>a</sup>	<i>Anisakis</i> DNA concentration <sup>**</sup>
Commercial food × brand <sup>†</sup>		
Gulas × A	28.98 ± 0.25 <sup>a#</sup>	5.82 ± 0.36 <sup>#</sup>
Gulas × B	29.12 ± 0.20 <sup>a</sup>	6.40 ± 0.55 <sup>a</sup>
Gulas × C	29.65 ± 0.20 <sup>a</sup>	5.90 ± 0.71 <sup>a</sup>
Gulas × D	29.98 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.54 ± 0.49 <sup>b</sup>
Gulas × F	35.00 ± 0.24 <sup>b</sup>	ND
Croquettes × A	30.91 ± 0.22 <sup>a</sup>	2.08 ± 0.33 <sup>b</sup>
Croquettes × C	35.00 ± 0.26 <sup>b</sup>	ND
Croquettes × G	35.00 ± 0.24 <sup>b</sup>	ND
Burgers × E	35.00 ± 0.24 <sup>b</sup>	ND
Crab sticks × A	28.18 ± 0.20 <sup>c</sup>	12.39 ± 1.45 <sup>c</sup>
Crab sticks × B	30.30 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.41 ± 0.61 <sup>b</sup>
Crab sticks × C	35.00 ± 0.24 <sup>b</sup>	ND
Crab sticks × D	29.51 ± 0.24 <sup>a</sup>	7.85 ± 0.27 <sup>a</sup>
Crab sticks × H	29.20 ± 0.22 <sup>a</sup>	7.40 ± 1.49 <sup>a</sup>
Crab sticks × I	35.00 ± 0.24 <sup>b</sup>	ND
Global by commercial food		
Gulas	30.50 ± 0.24 <sup>a#</sup>	5.86 ± 0.69 <sup>#</sup>
Croquettes	33.16 ± 0.27 <sup>b</sup>	NQ
Burgers	35.00 ± 0.24 <sup>c</sup>	ND
Crab sticks	31.24 ± 0.25 <sup>a</sup>	4.68 ± 0.73 <sup>a</sup>
Global by brand		
A	29.41 ± 1.27 <sup>a#</sup>	7.17 ± 3.74 <sup>#</sup>
B	29.68 ± 0.30 <sup>a</sup>	10.26 ± 3.43 <sup>b</sup>
C	32.43 ± 0.37 <sup>b</sup>	NQ
D	29.66 ± 1.35 <sup>a</sup>	5.91 ± 2.01 <sup>a</sup>
E	35.00 ± 0.24 <sup>c</sup>	ND
F	35.00 ± 0.24 <sup>c</sup>	ND
G	35.00 ± 0.24 <sup>c</sup>	ND
H	29.20 ± 0.22 <sup>a</sup>	7.40 ± 1.49 <sup>a</sup>
I	35.00 ± 0.24 <sup>b</sup>	ND

<sup>a</sup> Cq, mean quantification cycle ± standard error of the mean.

<sup>\*\*</sup> Concentration mean values expressed in ng of *Anisakis* DNA per gram of food ± standard error; ND, not detected; NQ, not quantified.

<sup>†</sup> Six DNA extractions from each batch of product were performed and analyzed in duplicate.

<sup>#</sup> Values with distinct letter inside each factor are significantly different (Tukey-Kramer,  $P < 0.05$ ).

primers (Lopez and Pardo, 2010). It may thus be assumed that other species of *Anisakis* such as *A. ziphidarum*, *A. typica*, *A. paggiae* and *A. brevispiculata* with also minor differences in the target sequence used (Lopez and Pardo, 2010), could also be detected by this technique. However, it would be expected to detect slight differences in sensitivity, as we have observed in *A. physeteris*, which should be experimentally evaluated. The assay was optimized using the two sibling species of the complex *A. simplex* (s.L.), as these are responsible for the majority of human anisakiosis cases described in the literature. As an example, in Japan, where the consumption of raw fish is popular, the most prevalent species, *A. simplex* (s.s.), has been identified as the main

causative agent (Umehara et al., 2007). In contrast, in Mediterranean countries such as Italy, where marinated and/or raw fish are a culinary tradition, several cases of human anisakiosis have been linked to *A. pegreffii*, which is the most abundant species in this region (Cavallero et al., 2012). The *Anisakis* specificity of the developed technique is relevant as represents an advantage to differentiate *Anisakis* from the nonpathogenic *Hysterothylacium* that is also found in high prevalence in fish of habitual consumption (Angelucci et al., 2011).

Many food samples may contain certain substances that can interfere with or inhibit PCR assays, including fats, glycogen, polysaccharides, minerals, as well as enzymes (Powell et al., 1994; Richards, 1999). Additionally, thermal treatment during industrial processes can cause DNA fragmentation and degradation, which could hinder the DNA amplification (Hird et al., 2006). In this context, the small size of the target region chosen for amplification in the present study and its stability under the thermal conditions in food processing represents an advantage (Unselde et al., 1995). The application of the optimized SYBR Green qPCR to the food matrix experimentally contaminated with *A. simplex* (s.L.) DNA allowed a fast and sensitive detection of a very low *Anisakis* burden, resulting in an operative LOD of 1.50 ng of *A. simplex* (s.L.) DNA per gram of food. The followed procedure, consisting of sample pretreatment, DNA extraction and qPCR, can therefore be considered as a robust and accurate technique for *Anisakis* detection in processed food. In our study, the specificity, sensitivity and reproducibility obtained in the application of the assay in a food matrix indicate its applicability in the food industry. Furthermore, the optimized SYBR Green-qPCR technique gave similar results to the TaqMan probes studied in parallel, with the advantage of being a simpler and more cost-effective tool for routine food analysis, since it does not require the fluorescent-labeled target-specific probe. SYBR Green qPCR has been previously used for the trace detection of other contaminants in food matrices, also resulting in high sensitivities. D'Andrea et al. (2009) developed a SYBR Green PCR method allowing the detection of traces of hazelnut (10 mg/kg) in commercial foodstuffs; Prieto et al. (2014) reported a LOD for the detection of almond at a level of 1 mg/kg food.

In the present study, the analysis of different commercial fish-derived food products by the optimized SYBR Green qPCR allowed the detection of *Anisakis* DNA in 60% of the analyzed samples, in all cases at trace levels. Surimi-based products, like crab sticks and “gulas”, presented the highest *Anisakis* burden among the positive analyzed food; croquettes, elaborated mainly with hake, also contained DNA from this nematode, although at lower levels. The presence of *Anisakis* could be related to the fish species used as raw material in the elaboration of the commercial products. For example, the most abundant fish used in surimi-based products are hake and blue whiting (Keskin and Atar, 2012; Pepe et al., 2007), which have shown high rates of infection and are considered the most commonly *Anisakis*-infected species in many reports (Chaligiannis et al., 2012; Pekmezci et al., 2014; Piras et al., 2014). Nonetheless, it should be taken into account that in industrial food processing the possible mixture of parasitized and anisakid-free fish in different proportions, the mechanical separation of muscle, and the washing steps could reduce the parasite burden in fish (Olivares et al., 2013, 2015). Among the few reports of *Anisakis* detection in processed food samples, only Mossali et al. (2010) have analyzed naturally contaminated commercial foodstuffs such as baby food, surimi, fish sticks and canning tuna. As in our case, they detected traces of *Anisakis*, surimi also being the product with the highest DNA concentration of this parasite. Other authors have reported the detection of *Anisakis* DNA in experimentally contaminated food samples subjected to different processes, including canning, smoking, freezing, frying, cooking, salting and drying, and traces of this parasite were also detected, regardless of the type of industrial treatment applied to the sample (Herrero et al., 2011).

The robustness, accuracy and limits of detection of the developed SYBR Green qPCR technique indicate its suitability for *Anisakis* detec-

tion and quantification in fresh and highly processed fish by-products, thus improving their quality control.

#### Funding

This work was supported by the Generalitat de Catalunya 2014 SGR Project (1241) and CONACYT-Becas México scholarship number 383879.

#### Acknowledgements

The authors thank Lucy Brzoska for her invaluable advice on the English preparation of the manuscript.

#### References

- Angelucci, G., Meloni, M., Merella, P., Sardu, F., Madeddu, S., Marrosu, R., Petza, F., Salati, F., 2011. Prevalence of *Anisakis* spp. and *Hysterothylacium* spp. larvae in teleosts and cephalopods sampled from waters of Sardinia. *J. Food Prot.* 74, 1769–1775.
- Brusa, V., Galli, L., Linares, L.H., Ortega, E.E., Lirón, J.P., Leotta, G.A., 2015. Development and validation of two SYBR green PCR assays and a multiplex real-time PCR for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat. *J. Microbiol. Methods* 119, 10–17.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publications of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Cavallero, S., Ligas, A., Bruschi, F., D'Amelio, S., 2012. Molecular identification of *Anisakis* spp. from fishes collected in the Tyrrhenian Sea (NW Mediterranean). *Vet. Parasitol.* 187, 563–566.
- Chaligiannis, I., Lalle, M., Pozio, E., Sotiraki, S., 2012. Anisakidae infection in fish of the Aegean Sea. *Vet. Parasitol.* 184, 362–366.
- Chen, Q., Yu, H.Q., Lun, Z.R., Chen, X.G., Song, H.Q., Lin, R.Q., Zhu, X.Q., 2008. Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodes with zoonotic potential. *Parasitol. Res.* 104, 79–84.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, C.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanço, M., Paggi, L., 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Parasitol.* 30 (2), 223–226.
- D'Andrea, M., Coisson, J.D., Travaglia, F., Garino, C., Arlorio, M., 2009. Development and validation of a SYBR-Green I real-time PCR protocol to detect hazelnut (*Corylus avellana* L.) in foods through calibration via plasmid reference standard. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11201–11208.
- EFSA, 2010. Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), European Food Safety Authority (EFSA). *EFSA J.* 8 (4), 1543–1634.
- Farjallah, S., Busi, M., Mahjoub, M.O., Slimane, B.B., Paggi, L., Said, K., D'Amelio, S., 2008. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitol. Int.* 57, 430–436.
- Fraulo, P., Morena, C., Costa, A., 2014. Recovery of anisakid larvae by means of chloroform digestion and proposal of the method for the official control. *Acta Parasitol.* 59, 629–634.
- Gomez-Sambas, M., Vilchez, S., Racero, J.C., Fuentes, M.V., Osuna, A., 2015. Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial “Serrano” ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food Microbiol.* 46, 107–113.
- Herrero, B., Viettes, J.M., Espiñeira, M., 2011. Detection of anisakids in fish and seafood products by real-time PCR. *Food Control* 22, 933–939.
- Hird, H., Chisholm, J., Sanchez, A., Hernandez, M., Goodier, R., Schneede, K., Boltz, C., Poppinga, B., 2006. Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Addit. Contam.* 23, 645–650.
- Hochberg, N.S., Hamer, D.H., 2010. Anisakidosis: Perils in de deep. *Clin. Infect. Dis.* 51 (7), 806–812.
- Keskin, E., Atar, H.H., 2012. Molecular identification of fish species from surimi-based products labeled as Alaskan pollock. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 811–814.
- Kim, K.H., Eom, K.S., Park, J.K., 2006. The complete mitochondrial genome of *Anisakis simplex* (Ascaridida: Nematoda) and phylogenetic implications. *Int. J. Parasitol.* 36, 319–328.
- Kleter, G.A., Prandini, A., Filippi, L., Marvin, H.J.P., 2009. Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by the European Community's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) during a four-year period. *Food Chem. Toxicol.* 47, 932–950.
- Koie, M., 1993. Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Zool.* 71, 1289–1296.
- Kumar, T., Majid, M.A.A., Onichandran, S., Jaturas, N., Andiappan, H., Salibay, C.C., Hazel, A.L., Tabo, H., Tabo, N., Dungca, J.Z., Tangpong, J., Phiriyasamith, S., Yuttayong, B., Polseela, R., Do, B.N., Sawangjareon, N., Tan, T.-C., Lim, Y.A.L.,

- Nissapatorn, V., 2016. Presence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water samples from Southeast Asia: towards an integrated water detection system. *Infect. Dis. Poverty* 5, 3.
- Levsen, A., Lunestad, B.T., Berland, B., 2005. Low detection efficiency of candling as a commonly recommended inspection method for nematode larvae in the flesh of pelagic fish. *J. Food Prot.* 68, 828–832.
- Lopez, I., Pardo, M.A., 2010. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Anisakis simplex* parasite as a food-borne allergen source in seafood products. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1469–1477.
- Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Martin, A., Helmuth, R., Bunge, C., 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7046–7052.
- Mossali, C., Palermo, S., Capra, E., Piccolo, G., Botti, S., Bandi, C., D'Amelio, S., Giuffra, E., 2010. Sensitive detection and quantification of anisakid parasite residues in food products. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 391–397.
- Nieuwenhuizen, N.E., Lopata, A.L., 2014. Allergic reactions to *Anisakis* found in fish. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 14, 455.
- O'Grady, J., Sedano-Balbás, S., Maher, M., Smith, T., Barry, T., 2008. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. *Food Microbiol.* 25, 75–84.
- Olivares, F., Heras, C. De, Teresa, M., Tejada, M., 2013. Effect of the mechanical separation of muscles on the retention and viability of *Anisakis* larvae during the production of surimi. *Ecol. Appl.* 12 (2), 133–139.
- Olivares, F., González-Muñoz, M., Carballeda-Sangiao, N., Rodríguez-Mahillo, A., Careche, M., de las Heras, C., Navas, A., Tejada, M., 2015. Removal of *Anisakis simplex* allergens from infected fish during the washing step of surimi production. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2626–2631.
- Pekmezci, G.Z., Onuk, E.E., Bolukbas, C.S., Yardimci, B., Gurler, A.T., Acici, M., Umur, S., 2014. Molecular identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes collected in Turkish waters. *Vet. Parasitol.* 201, 82–94.
- Pepe, T., Trotta, M., Di Marco, I., Anastasio, A., Bautista, J.M., Cortesi, M.L., 2007. Fish species identification in surimi-based products. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3681–3685.
- Petter, A.J., Maillard, C., 1988. Larves d'Ascarides parasites de Poissons en Méditerranée occidentale. *Bull. Mus. Hist. Nat.* 10, 347–369.
- Piras, M.C., Tedde, T., Garippa, G., Virgilio, S., Sanna, D., Farjallah, S., Merella, P., 2014. Molecular and epidemiological data on *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in commercial fish caught off northern Sardinia (western Mediterranean Sea). *Vet. Parasitol.* 203, 237–240.
- Powell, H.A., Gooding, C.M., Garrett, S.D., Lund, B.M., McKee, R.A., 1994. Protease inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 59–61.
- Prieto, N., Iniesto, E., Burbano, C., Cabanillas, B., Martinez, Y., Pedrosa, M.M., Rovira, M., Rodriguez, J., Muzquiz, M., Crespo, J.F., Cuadrado, C., Linacero, R., 2014. Detection of almond allergen coding sequences in processed foods by real time PCR. *J. Agric. Food Chem.* 62, 5617–5624.
- Richards, G.P., 1999. Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. *J. Food Prot.* 62, 691–697.
- Ruzante, J.M., Davidson, V.J., Caswell, J., Fazil, A., Cranfield, J.A.L., Henson, S.J., Anders, S.M., Schmidt, C., Farber, J.M., 2010. A multifactorial risk prioritization framework for foodborne pathogens. *Risk Anal.* 30, 724–742.
- Shamsi, S., Butcher, A.R., 2011. First report of human anisakidosis in Australia. *Med. J. Aust.* 194 (4), 199–200.
- Torres, A.P., Jercic, M.L., Weitz, J.C., Dobrew, E.K., Mercado, R.A., 2007. Human Pseudoterranovosis, an emerging infection in Chile. *J. Parasitol.* 93 (2), 440–443.
- Ueda, S., Yamaguchi, M., Iwase, M., Kuwabara, Y., 2013. Detection of emetic *Bacillus cereus* by real-time PCR in foods. *Biocontrol Sci.* 18, 227–232.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A., 2007. Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitol. Int.* 56, 211–215.
- Unsel, M., Brandt, P., Hiesel, R., 1995. Identification of the species origin in highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences. *Genome Res.* 4, 241–243.
- Yagi, K., Nagasawa, K., Ishikura, H., Nagasawa, A., Sato, N., Kikuchi, K., Ishikura, H., 1996. Female worm *Hysterothylacium aduncum* excreted from human: a case report. *Jpn. J. Parasitol.* 45, 12–23.
- Yang, X., Nian, R., Lin, H., Duan, C., Sui, J., Cao, L., 2013. Detection of anisakid larvae in cod filets by UV fluorescent imaging based on principal component analysis and gray value analysis. *J. Food Prot.* 76, 1288–1292.
- Zhu, X., Gasser, B., Podolska, M., Chilton, B., 1998. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 28, 1911–1921.

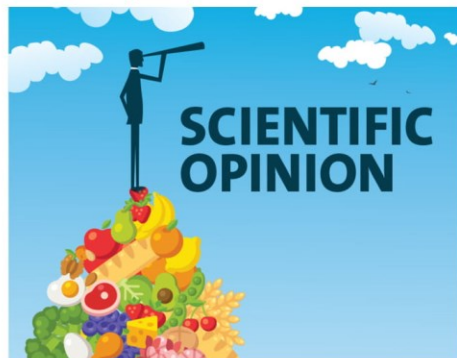


## ANEXO 2. Journal of Agricultural and Food Chemistry 67 (2019) 11279-11280.

### Importance of Using Complex Matrices in the Standardization of Molecular Techniques for the Control of Foodborne Parasites

Carla Godínez-González,<sup>1</sup> Xavier Roca-Geronès, Isabel Montoliu, and Roser Fisa\*

Laboratory of Parasitology, Department of Biology, Health and Environment, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Avinguda de Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona, Spain



The incidence of foodborne parasites has increased considerably in the last few decades as a result of rapid globalization and changes in eating habits. Foodborne parasites are a highly diverse group, with variable biology and transmission pathways, and they tend not to produce symptoms immediately after infection. In contrast with other pathogens, the dissemination form of these parasites, such as cysts/oocysts of protozoa and helminth eggs, and the forms found in fish/meat do not reproduce in water or food, and the food contamination level will therefore not increase during processing, transport, or storage. To protect consumer health, the rapid detection and identification of parasites is an imperative issue in food safety and quality control.<sup>1</sup> The real-time polymerase chain reaction (qPCR) method is being increasingly applied to detect parasites in food and water because of its quantification ability, good limit of detection, specificity, sensitivity, rapidity, easy automation, and capacity to process large amounts of samples.

However, the use of this technique for parasitological analysis in agroindustrial products has several drawbacks, summarized in Figure 1, potentially leading to an underestimation of the parasitic load and false negative results. The presence of food additives may affect the qPCR performance at different levels by binding and degrading the nucleic acids or polymerases, which could inhibit or delay the amplification process, affecting efficiency and sensitivity. In addition, the high temperatures and mechanical operations during food processing could cause degradation and fragmentation of the nucleic acid molecules, leading to a lack of qPCR products.<sup>2</sup> Furthermore, the heterogeneous distribution of the parasites in the food matrix and low parasitic loads make it necessary to analyze large volumes of sample. As a result, DNA isolation

and concentration schemes may be necessary, although these protocols can cause significant loss of sample and affect the sensitivity of molecular techniques.

The nematodes of the genus *Anisakis* have attracted attention in the field of public health because their third-stage larvae have been identified as causative agents of gastrointestinal symptoms and allergic reactions in humans. Distributed worldwide, these parasites are found in many fish species of commercial interest. Complex matrices were used to standardize a SYBR Green qPCR technique for the quantification of *Anisakis* in fish and fish-derived food, not only to address the aforementioned analytical drawbacks but also to provide data on the real performance of the developed method. Using the experimental matrix, it was possible to verify that the developed assay could detect and quantify a concentration as low as 1.50 ng of *Anisakis simplex* (s.l.) DNA per gram of food, even in the presence of several food additives. This optimized method is therefore suitable for application in raw fish as well as in industrial products, such as croquettes, hamburgers, crab sticks, and gulas. Also, the small size of the target region and its stability under thermal food processing allows for extremely fragmented DNA to be annealed, thereby permitting the analysis of highly processed samples without the loss of sensitivity.<sup>3</sup>

The presence of Apicomplexa protozoa, such as *Cyclospora cayatanensis* or *Toxoplasma gondii*, in food matrices is also a public health problem. The intestinal parasite *C. cayatanensis* causes a diarrheal illness in humans and has been linked to several outbreaks traced back to fresh produce imported from developing regions of Latin America. Although qPCR-based techniques have been standardized for the detection of this parasite in fresh or raw products, including a U.S. Food and Drug Administration method, the protocol needs to be modified when analyzing prepared dishes containing multiple ingredients and additives that could act as transmission vehicles. Almeria et al.<sup>4</sup> refined a qPCR method to analyze prepared dishes, such as coleslaw, and established optimal washing conditions for the recovery of *C. cayatanensis* oocysts. Emulsification of the high amount of fat in the industrial dressing substantially improved the detection rate.

In the case of *T. gondii*, practically all warm-blooded animals are at risk of infection and different stages of this parasite have been detected in several kinds of food matrices. Most human infections are asymptomatic, but severe complications may occur in immunocompromised patients or after congenital infection. Gómez-Samblas et al.<sup>5</sup> used sequence-specific

Received: September 9, 2019

Published: October 3, 2019

Downloaded via UNIV DE BARCELONA on November 7, 2019 at 01:39:41 (UTC).  
See <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> for options on how to legitimately share published articles.



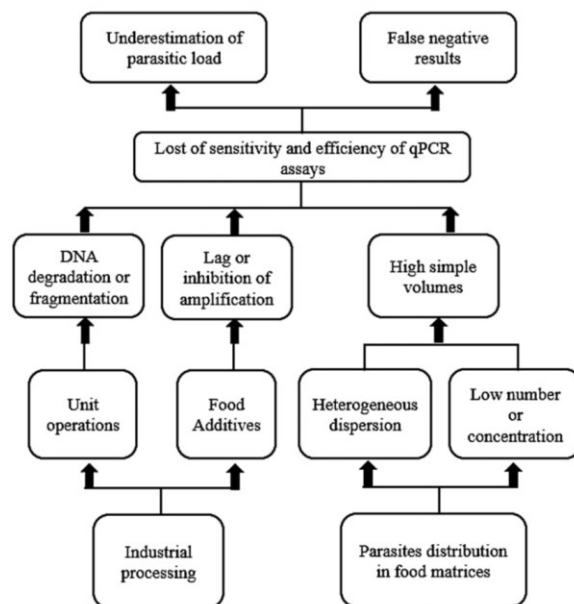


Figure 1. Drawbacks in the optimization of qPCR assays for parasitological control in food.

magnetic capture for DNA extraction to optimize a qPCR technique suitable for application in food matrices. This protocol allows for the separation of nucleic acids from the sample and the removal of contaminants or salts that may limit amplification. The method increases the probability of *T. gondii* detection by enabling the analysis of large size samples of meat and derivative products. Another advantage is that qPCR coupled to magnetic capture has a lower false-negative rate compared to commercial DNA extraction kits.

Parasite detection in food by qPCR analysis faces several challenges, including high sample volumes, low contamination levels, and the presence of inhibitory substances, which all need to be taken into account when designing diagnosis assays. Prior testing with food matrices is therefore essential to ensure that qPCR-based methods are sufficiently sensitive, specific, efficient, and robust for the detection and quantification of foodborne parasites and, thus, suitable for application in protocols for outbreak investigations, surveillance activities, or routine safety controls in industry.

#### AUTHOR INFORMATION

##### Corresponding Author

\*E-mail: rfisa@ub.edu.

##### ORCID

Carla Godínez-González: 0000-0003-2399-9665

##### Funding

This work was supported by the Generalitat de Catalunya 2017 SGR Project Grant 1008 and CONACYT-Becas México Scholarship 383879.

#### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Lucy Brzoska for her invaluable advice on the English preparation of the manuscript.

#### REFERENCES

- (1) Klotz, C.; Šoba, B.; Skvarč, M.; Gabriél, S.; Robertson, L. J. A European network for food-borne parasites (Euro-FBP): Meeting report on 'Analytical methods for food-borne parasites in human and veterinary diagnostics and in food matrices'. *Parasites Vectors* **2017**, *10* (1), 559.
- (2) Lo, Y. T.; Shaw, P. C. DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food Chem.* **2018**, *240*, 767–774.
- (3) Godínez-González, C.; Roca-Geronès, X.; Cancino-Faure, B.; Montoliu, I.; Fisa, R. Quantitative SYBR Green qPCR technique for the detection of the nematode parasite *Anisakis* in commercial fish-derived food. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *261*, 89–94.
- (4) Almeria, S.; da Silva, A. J.; Blessington, T.; Cloyd, T. C.; Cinar, H. N.; Durigan, M.; Murphy, H. R. Evaluation of the U.S. Food and Drug Administration validated method for detection of *Cyclospora cayentanensis* in high-risk fresh produce matrices and a method modification for a prepared dish. *Food Microbiol.* **2018**, *76*, 497–503.
- (5) Gomez-Sambblas, M.; Vilchez, S.; Racero, J. C.; Fuentes, M. V.; Osuna, A. Quantification and viability assays of *Toxoplasma gondii* in commercial "serrano" ham samples using magnetic capture real-time qPCR and bioassay techniques. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 107–113.

## ANEXO 3. Annals of Nutrition and Metabolism 73, S2 (2018) 78

**ANISAKIS LARVAE QUANTIFICATION IN COMMERCIAL FISH AND FISH-DERIVED FOOD USING A MOLECULAR APPROACH***C. Godínez-González; X. Roca-Geronès; I. Montoliu; R. Fisa.*

Laboratory of Parasitology. Department of Biology, Health and Environment. Faculty of Pharmacy and Food Sciences. University of Barcelona. Barcelona. Spain

**Introduction:** The presence of *Anisakis* in fish has become a food safety problem. Anisakiosis is caused by larva ingestion in raw or undercooked fish. Furthermore, *Anisakis* species are recognized as causative agents of allergic reactions, elicited by proteins from live and dead larvae. To develop reliable detection methods to ensure consumer health is of paramount importance.

**Objectives:** To optimize a mathematical model to estimate the number of larvae of *Anisakis* species in fish and fish-derived food by a specific qPCR assay.

**Methods:** *Anisakis*-free hake fillets (15 g) were experimentally contaminated with different numbers of *A. simplex* larvae (1-50). DNA was extracted from 200 µl of food homogenate in duplicate. Molecular analysis was performed using a SYBRGreen qPCR assay (cytochrome c oxidase II gene). Results were expressed in Cq values. The method was applied to analyze the edible part of 42 blue whiting fish in parallel with visual inspection and microscopic identification. Commercial fish-derived food, including 5 brands of gulas, 6 of crab sticks and 3 of croquettes, were also analyzed.

**Results:** Molecular results of experimentally spiked samples showed a logarithmic relation between Cq values and the number of larvae. A mathematical model was obtained, allowing the detection of larval traces and the quantification of 1-35 larvae ( $R^2=0.9504$ ,  $CV=3.62\%$ ). Regarding blue whiting fish, the number of larvae estimated by the mathematical model corresponded to that detected by visual inspection ( $r=0.92$ ). Bland-Altman analysis showed a 95% agreement between both methods. In fish-derived food, less than one larva was detected in 80% of crab sticks, 66% of gulas and 33% of croquettes.

**Conclusions:** The optimized technique could be applied for *Anisakis* detection and quantification in fish and fish-derived food, regardless of the industrial processing, improving automation of routine food safety and quality control.

**Conflict of interest:** Authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements:** 2018-SGR-1008-GeneralitatCatalunya and CONACYT-Mexico.

**Key words:** *Anisakis* / qPCR / seafood / food safety.

