

Universidade de Vigo



Métodos de detección de anisákidos en produtos de la pesca y su utilidad dentro del sector pesquero-alimentario

Métodos de detección de anisákidos en produtos da pesca e a súa utilidade dentro do sector pesqueiro-alimentario

*Methods for detection of anisakids in seafood products and their usefulness in the fisheries and food industry*

**Pedro Davila Piñón**

Julio 2021

Universidade de Vigo



**Facultad de Ciencias - Universidade da Coruña**

**Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigación Mariña  
(CIM), Universidade de Vigo**

Métodos de detección de anisákidos en productos de la  
pesca y su utilidad dentro del sector pesquero-alimentario

Métodos de detección de anisákidos en productos da pesca  
e a súa utilidade dentro do sector pesqueiro-alimentario

*Methods for detection of anisakids in seafood products  
and their usefulness in the fisheries and food industry*

**Pedro Davila Piñón**

Los **Drs. Raúl Iglesias Blanco** y **Manuel Becerra Fernández**, en calidad de tutores del trabajo, autorizan su presentación ante el correspondiente Tribunal Evaluador.

IGLESIAS  
BLANCO  
RAUL -  
Firmado digitalmente por  
IGLESIAS BLANCO  
RAUL - 36071506P  
Fecha: 2021.07.01

36071506P 02:18:47 +02'00'

Firma Tutor 1

BECERRA  
FERNANDEZ  
Z MANUEL -  
Firmado digitalmente  
por BECERRA  
FERNANDEZ MANUEL  
- 32820909R  
Fecha: 2021.07.02  
17:57:31 +02'00'

32820909R

Firma Tutor 2

# Índice

<b>1. Resumen/Resumo/Abstract</b>	1
<b>2. Introducción</b>	2
2.1. Aspectos fundamentales de la biología de los anisákidos	2
2.2. La anisakidosis humana: relevancia en nuestro entorno	6
2.3. Estrategias actuales para el control de la anisakidosis humana	10
<b>3. Objetivo</b>	11
<b>4. Metodología</b>	11
<b>5. Resultados y discusión</b>	12
5.1. Técnicas basadas en la detección visual de las larvas	13
5.1.1. <i>Inspección visual simple</i>	13
5.1.2. <i>Inspección al trasluz o a contraluz (candling)</i>	16
5.1.3. <i>Compresión-UV (UV-Press)</i>	18
5.1.4. <i>Digestión artificial</i>	20
5.1.5. <i>Otros métodos de detección visual</i>	22
5.2. Técnicas basadas en la detección de sustancias o componentes del parásito	23
5.2.1. <i>Técnicas de base inmunológica</i>	23
5.2.2. <i>Técnicas de base genética</i>	25
5.2.3. <i>Técnicas basadas en espectrometría de masas</i>	27
<b>6. Conclusiones</b>	28
<b>7. Bibliografía</b>	29

## 1. Resumen

Los nematodos de la familia Anisakidae son parásitos cosmopolitas que a lo largo de su ciclo biológico se desarrollan en crustáceos eufáusidos, peces y calamares, y mamíferos marinos. A nivel clínico, son causantes de anisakidosis, una enfermedad que se contrae al consumir pescado crudo o poco cocinado contaminado con estos parásitos y que, actualmente, podría considerarse la principal helmintosis humana en España. Sus manifestaciones clínicas pueden incluir desde síntomas leves y transitorios hasta importantes problemas digestivos y/o alérgicos. Para minimizar el problema, en la industria del sector pesquero-alimentario se están aplicando diversas técnicas destinadas a detectar y evitar la presencia de estos parásitos en los productos de la pesca antes de la comercialización, técnicas que están recogidas en la legislación y/o normas oficiales de aplicación. En este trabajo se presenta una revisión crítica sobre estos procedimientos consolidados, así como sobre una serie de nuevos métodos alternativos más sofisticados, centrando la discusión en su posible aplicabilidad a los controles rutinarios realizados en el sector.

**Palabras clave:** Anisákidos, anisakidosis, técnicas de detección, productos pesqueros, seguridad alimentaria.

### Resumo

Os nematodos da familia Anisakidae son parasitos cosmopolitas que ao longo do seu ciclo biolóxico desenvólvense en crustáceos eufáusidos, peces e luras, e mamíferos mariños. A nivel clínico, son causantes de anisakidosis, unha enfermidade que se contrae ao consumir peixe cru ou pouco cociñado contaminado con estes parásitos, e que, actualmente, podería considerarse a principal helmintosis humana en España. As súas manifestacións clínicas poden incluír desde síntomas leves e transitorios ata importantes problemas dixestivos e/ou alérxicos. Para minimizar o problema, na industria do sector pesqueiro-alimentario están a aplicarse diversas técnicas destinadas a detectar e evitar a presenza destes parasitos nos produtos da pesca antes da súa comercialización, técnicas que están recollidas na lexislación e/ou normas oficiais de aplicación. Neste traballo preséntase unha revisión crítica sobre estes procedementos consolidados, así como sobre unha serie de novos métodos alternativos máis sofisticados, centrando a discusión na súa posible aplicabilidade aos controis rutineiros realizados no sector.

**Palabras clave:** Anisákidos, anisakidosis, técnicas de detección, productos pesqueros, seguridad alimentaria.

## **Abstract**

Nematodes of the Anisakidae family are cosmopolitan parasites developing in euphausiid crustaceans, fish and squid, and marine mammals throughout their life cycle. At the clinical level, they cause anisakidosis, a disease that is contracted by consuming raw or undercooked fish contaminated with these parasites, and which is currently considered the main human helminthosis in Spain. Clinical manifestations can range from mild and transient symptoms to severe digestive and/or allergic problems. To minimize the problem, various techniques are being applied in the seafood industry to detect and prevent the presence of these parasites in fishery products before marketing. These techniques are included in the legislation and/or standards. This paper presents a critical review of these consolidated procedures, as well as a series of new, more sophisticated alternative methods, focusing the discussion on their possible applicability to routine controls carried out in the sector.

**Key words:** Anisakids, anisakidosis, detection techniques, fishery products, food safety.

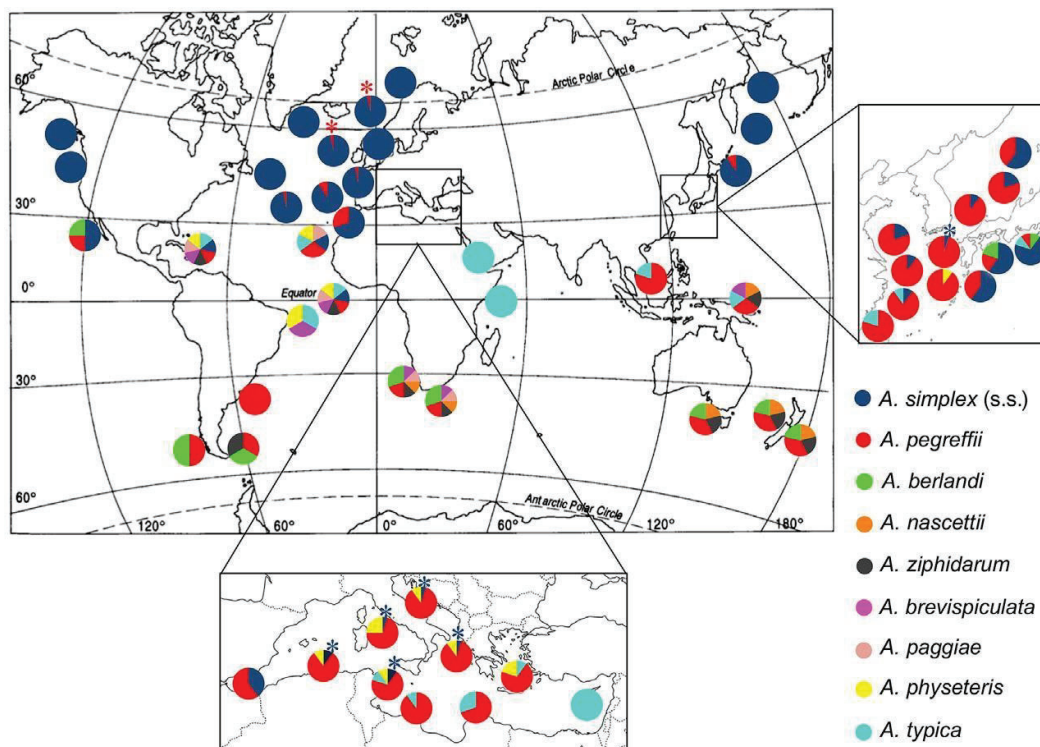
## **2. Introducción**

### **2.1. Aspectos fundamentales de la biología de los anisákidos**

Dentro del filo Nematoda se encuentra la familia Anisakidae, cuyos miembros más conocidos pertenecen a los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum* (Audicana *et al.* 2003; Mattiucci *et al.*, 2018). El género *Anisakis* presenta 9 especies que, mediante estudios moleculares, se han agrupado en 4 clados filogenéticos (Mattiucci *et al.*, 2017; Mattiucci *et al.*, 2018). El primero está compuesto por las especies crípticas *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* y *A. berlandi* formando el complejo *A. simplex* (s.l.); el segundo clado, incluye las especies *A. nasscettii* y *A. ziphidarum*. Por su parte el tercer clado está formado por *A. physeteris*, *A. brevispiculata* y *A. paggiae*, mientras el cuarto solo incluye a *A. typica*. Asimismo, en el caso del género *Pseudoterranova* se han identificado 6 especies crípticas, que forman parte del complejo *Pseudoterranova decipiens* (s.l.), y que incluyen *P. decipiens* (s.s.), *P. krabbei*, *P. bulbosa*, *P. azarasi*, *P. cattanii* y *P. decipiens* sp. E (Mattiucci *et al.*, 2017; Mattiucci *et al.*, 2018). Además de las especies

anteriormente mencionadas, en *Pseudoterranova* existen otras dos, *P. ceticola* y *P. kogiae*, que no pertenecen al complejo anterior (Torres *et al.*, 2007).

En cuanto a su distribución geográfica *A. simplex* y *A. pegreffii* parecen ser las especies con distribución más amplia (Figura 1) (Iglesias *et al.*, 2015; Mattiucci *et al.*, 2018). La primera se encuentra mayoritariamente entre los 35°N y el círculo polar Ártico, en aguas templadas o fría del océano Atlántico y del Pacífico (Iglesias *et al.*, 2015; Mattiucci *et al.*, 2018). Sin embargo, *A. pegreffii* es más abundante en el mar Mediterráneo, aunque también se puede encontrar en el Océano Atlántico y en el Pacífico entre los 35°N y los 55°S (Iglesias *et al.*, 2015; Mattiucci *et al.*, 2018). El solapamiento en la distribución de cada una de las especies de nematodos se debe a la enorme diversidad y distribución de los mamíferos marinos que parasitan, que es más amplia en *A. simplex* que en *A. pegreffii* y *A. physeteris* (Iglesias *et al.*, 2015; Mattiucci *et al.*, 2018). Por tanto, los nematodos anisákidos son cosmopolitas, encontrándose en aguas marinas de todo el planeta, y variando la especie en función de la zona de captura.



**Figura 1.** Distribución geográfica de las diferentes especies de *Anisakis* a nivel mundial. Figura tomada de Mattiucci *et al.* (2018).

Los miembros de la familia Anisakidae pueden causar **anisakidosis** en el ser humano, una **ictiozoonosis** asociada al consumo de pescado crudo o insuficientemente cocinado contaminado con las larvas de tercer estadio de estos nematodos (Ángeles-

Hernández *et al.*, 2020). Esta patología es clínicamente relevante debido a las manifestaciones clínicas de diversa severidad que pueden causar en los humanos (Ángeles-Hernández *et al.*, 2020). Su distribución es global, aunque mayoritariamente la infección se diagnostica en países del continente asiático como Japón y Korea, de Suramérica como Perú y Chile, y de Europa como Alemania, Francia, Italia, España y Países bajos, siempre asociada a las tradiciones gastronómicas basadas en la preparación de pescados crudos o semicrudos como el sushi, el sashimi, los boquerones en vinagre en España e Italia, o el arenque salado tradicional en regiones del norte (Ángeles-Hernández *et al.*, 2020). Esta zoonosis la causan generalmente especies como *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* y *P. decipiens* distinguiéndose, por tanto, entre **anisakiosis** y **pseudoterranovosis**, según el género implicado en la infección (Audicana *et al.*, 2003). Además, las larvas de *Anisakis* tipo II, que son propias de las especies *A. physeteris*, *A. brevispiculatta* y *A. paggiae*, pertenecientes al clado 3, han provocado también algunas infecciones que no han podido ser diagnosticadas específicamente. Por último, *Contracaecum* parece haber causado algún caso raro, pero la identidad exacta de las larvas no ha podido ser establecida (Audicana *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista económico, la presencia desagradable de anisákidos en diversas partes del pescado, además de suponer un riesgo sanitario potencial, impacta negativamente en su comercialización (Iglesias *et al.*, 2015). Las entidades oficiales como la FAO y la OMS, teniendo en cuenta diversos criterios clínicos, socioeconómicos, y de distribución geográfica, consideran que, de los 24 parásitos de transmisión alimentaria más relevantes a nivel mundial, *Anisakis* ocupa el puesto 17 en importancia global y el 4 en importancia económica (FAO/WHO, 2014). Adaptando ese estudio al territorio europeo, y considerando conjuntamente todas las especies de *Trichinella*, las posiciones serían la 7 y la 2, respectivamente (Bouwknegt *et al.*, 2018). Por este motivo, el control de estas zoonosis se centra en buscar medidas que permitan reducir o eliminar totalmente la presencia de larvas viables en el pescado o en sus derivados (Iglesias *et al.*, 2015).

A lo largo de su ciclo biológico, los nematodos de los géneros género *Anisakis* y *Pseudoterranova* pasan por 4 estadios larvarios y una fase adulta (machos y hembras), aunque en este último género el ciclo presenta algunas diferencias (Audicana *et al.*, 2003). En el caso de las especies de *Anisakis* la fase adulta y madurez sexual, la alcanzan generalmente en el estómago de cetáceos y en ocasiones en pinnípedos (focas, leones marinos o morsas). Las hembras son fecundadas por los machos, y ponen los huevos, que

pasan a las heces del hospedador y se liberan al agua, donde completan su desarrollo embrionario. El tiempo requerido para que los huevos eclosionen es variable y, durante este periodo todavía no está claro si ocurren una o dos mudas de la larva, que finalmente tras la eclosión da lugar a una larva de segundo o tercer estadio (L2 o L3). Esta L2 o L3, que circula libremente en el mar, puede ser ingerida por crustáceos eufáusidos, de forma directa o, tal vez, a través de la captura de copépodos que portan estas larvas. Este paso de maduración en el eufáusido es necesario para que la larva pueda infectar a los siguientes hospedadores (Audicana *et al.*, 2003). Por su parte, los peces teleósteos y los cefalópodos contribuyen a la diseminación del parásito, tras ingerir las larvas L3 cuando se alimentan de eufáusidos o de otros peces o cefalópodos más pequeños que estén contaminados (Audicana *et al.*, 2003). Finalmente, los mamíferos se infectan al alimentarse de teleósteos y cefalópodos contaminados, aunque también al alimentarse de *krill* como se ha observado en especies de ballenas filtradoras que solo se alimentan de crustáceos planctónicos (Audicana *et al.*, 2003). Tras la ingestión, las L3 penetran en la mucosa gástrica del hospedador definitivo y mudan dos veces, la primera en la que alcanzan el cuarto estadio larvario (L4) y la segunda que da lugar al estadio adulto (machos y hembras). El ciclo de estas especies es fundamentalmente demersal o pelágico y se puede observar en la Figura 2 (Audicana *et al.*, 2003; Mattiucci *et al.*, 2017).

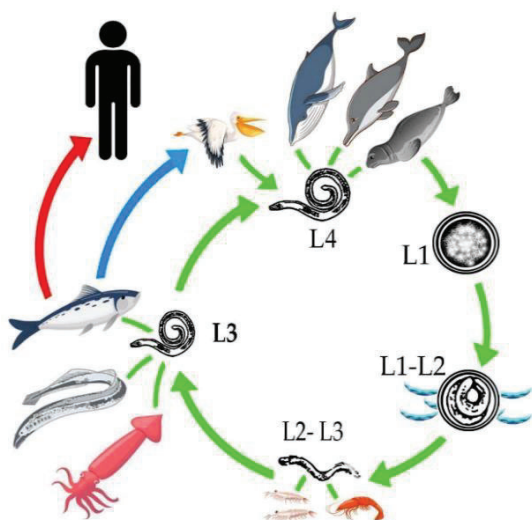


Figura 2: Ciclo de vida general de los anisakídeos. Tomada de Ángeles-Hernández *et al.*, 2020

El ciclo de vida de *P. decipiens* es similar al de *A. simplex*, aunque a diferencia de este, los hospedadores definitivos son exclusivamente **pinnípedos** (Audicana *et al.*, 2003). Sus larvas resultantes de la eclosión de los huevos son bentónicas y se encuentran en esta zona hasta que son ingeridas por hospedadores intermediarios (crustáceos mísidos o anfípodos gamáridos), a los que se podrían transmitir por copépodos. Cabe destacar, además, que los calamares no parecen infectarse con esta especie (Audicana *et al.*, 2003).

Los humanos y las aves se pueden infectar de forma accidental cuando comen pescado crudo o semicrudo contaminado con larvas L3 viables de estos nematodos (Audicana



*et al.*, 2003). Sin embargo, como nuestro organismo no es el ideal para este tipo de parásitos, los nematodos suelen morir durante las dos primeras semanas de infección y, por tanto, nunca alcanzan la madurez sexual (Iglesias *et al.*, 2015).

En general, las larvas L3 de anisákidos se encuentran encapsuladas en la musculatura y/o vísceras de los peces, aunque, bajo determinadas circunstancias, pueden activarse y moverse en la cavidad corporal (Audícana *et al.*, 2003). Esta distribución en la cavidad corporal o visceral y en la musculatura, así como en las diferentes partes de la musculatura, depende fundamentalmente de la especie de pescado y sobre todo del nematodo, ya que, hasta el momento, sólo se han encontrado larvas de *A. simplex* (s.s.) y *A. pegreffii* en la musculatura de los peces examinados (Mattiucci *et al.*, 2018). En el caso de *A. simplex*, la larva es blanca tirando a transparente y con un tamaño corporal de 20-30 milímetros de longitud (Audícana *et al.*, 2003; Buchmann y Mehrdana, 2016). Su forma es cilíndrica y en la parte anterior del cuerpo tiene un pequeño cilindro elongado blanquecino que se corresponde con el ventrículo (Audícana *et al.*, 2003). Por otro lado, *P. decipiens* es de color rojizo tirando a marrónáceo y es más grande que las larvas de *A. simplex*, con una longitud habitual de entre 4 y 5 cm en total y un ancho de entre 1 y 2 mm (Audícana *et al.*, 2003; Buchmann y Mehrdana, 2016). Su ventrículo es algo más pequeño, y en esa región presenta un ciego intestinal característico, que no tienen las larvas de *Anisakis* (Audícana *et al.*, 2003). Cuando las larvas de *Pseudoterranova* o *Anisakis* penetran en el pez, resultan encapsuladas por tejido de respuesta del hospedador, quedando en un estado de latencia que se mantiene muy probablemente mientras el pez está vivo (Buchmann y Mehrdana, 2016)

## **2.2. La anisakidosis humana: relevancia en nuestro entorno**

Como se ha comentado antes, las anisakidosis se pueden considerar anisakiosis o pseudoterranovosis dependiendo del género implicado en la infección (Audícana *et al.*, 2003). Se calcula que aproximadamente un 97% de las anisakidosis descritas en el mundo son anisakiosis y el 3% restantes son causadas por *Pseudoterranova* (Audícana *et al.*, 2003).

Aunque la infección puede cursar de forma leve o incluso subclínica, los casos que requieren asistencia médica se caracterizan normalmente por la presencia de manifestaciones digestivas (dolor abdominal, náuseas, vómitos diarrea, obstrucción intestinal, etc.) y/o alérgicas (urticaria, angioedema, e incluso choque anafiláctico)

(Audicana *et al.*, 2003; Iglesias *et al.*, 2015). El diagnóstico de estos casos, dependiendo de la sintomatología y de la localización de la larva (gástrica, intestinal o ectópica), se realiza en base a la anamnesis (ingesta de pescado crudo o semicrudo en los días u horas previas a la aparición de los síntomas) y a diversas pruebas de diagnóstico por imagen que incluyen endoscopia (permite la extracción de la larva si está en localización accesible), radiología, ecografía, y que pueden ir acompañadas de pruebas de base inmunológica para la detección de IgE y otros anticuerpos específicos del parásito. En algunos casos de infección intestinal, el diagnóstico se realiza mediante anatomía patológica, tras la resección del fragmento de intestino afectado (Audicana *et al.*, 2003; Iglesias *et al.*, 2015).

La infección de los humanos por estos parásitos causa una fuerte respuesta inmune humoral de tipo policlonal detectándose **IgA, IgG e IgM** (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2016). Además, se generan elevados niveles de anticuerpos **IgE**, lo que explica las reacciones alérgicas al ingerir pescado parasitado (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2016). En este sentido, hay que comentar que cuando la larva de *Anisakis* se asienta y muere en los tejidos del ser humano, induce una respuesta inmunitaria de tipo Th2 en la que predominan una serie de citoquinas (IL-4, IL-5, IL9 y IL-13) que favorecen la mastocitosis, la eosinofilia y la síntesis de IgE frente al parásito (Daschner *et al.*, 2012). En algunas personas diagnosticadas de alergia a *Anisakis*, los niveles de IgE en el suero pueden mantenerse detectables incluso tras 8 o 9 años del episodio alérgico (Carballeda-Sangiao *et al.*, 2016). Como consecuencia de esta elevada producción de IgE, estos anticuerpos se depositarían sobre la superficie de mastocitos y basófilos, quedando la persona sensibilizada frente al parásito (Daschner *et al.*, 2012). Por tanto, de acuerdo con los postulados de estos últimos autores, una persona podría resultar sensibilizada tras una primera infección (que podría ser subclínica o leve) y, posteriormente, una reinfección en un paciente sensibilizado permitiría a la larva liberar sus alérgenos a nivel de la submucosa activando la degranulación de los mastocitos e iniciando así la reacción alérgica (Daschner *et al.*, 2012). Esto unido a la elevada vascularización de esta capa del tracto digestivo, permitiría la entrada de los alérgenos en circulación posibilitando así la aparición de manifestaciones alérgicas del tipo de la urticaria, angioedema y/o choque anafiláctico (Daschner *et al.*, 2012).

Actualmente existen 14 alérgenos que han sido reconocidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), así como por la Unión Internacional de Sociedades

Inmunológicas (Iglesias *et al.*, 2015; Moneo *et al.*, 2017). En función de su procedencia, 3 alérgenos constituyen antígenos somáticos (Iglesias *et al.*, 2015). Otros 8 son antígenos excretados o secretados por el parásito, y finalmente otros 3 no tienen una procedencia y función conocida (Iglesias *et al.*, 2015). En pacientes con manifestaciones alérgicas frente al parásito, los alérgenos que se reconocen mayoritariamente (alérgenos principales), y, por tanto, los más importantes, son Ani s 7 (94-100%) y Ani s 1 (60-85%) (Iglesias *et al.*, 2015). En cuanto a Ani s 2 (paramiosina) y Ani s 3 (tropomiosina), el interés radica en que ambos son pan-alérgenos, y debido a su carácter conservado y ubicuo en la naturaleza, puede ser causa de **reacciones cruzadas** en pruebas de diagnóstico de alergia (Iglesias *et al.*, 2015). Estos alérgenos, así como otros de menor importancia, y algunas de sus características se pueden contemplar en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Alérgenos identificados hasta el momento en *Anisakis*. Tomada y modificada de Moneo *et al.* (2017).

Nombre	Tipo de alérgeno	Peso molecular (KDa)
<i>Ani s 1</i>	Excretado/secretado	24
<i>Ani s 2</i>	Somático	97
<i>Ani s 3</i>	Somático	41
<i>Ani s 4</i>	Excretado/secretado	9
<i>Ani s 5</i>	Excretado/secretado	15
<i>Ani s 6</i>	Excretado/secretado	15
<i>Ani s 7</i>	Excretado/secretado	139
<i>Ani s 8</i>	Excretado/secretado	15
<i>Ani s 9</i>	Excretado/secretado	14
<i>Ani s 10</i>	Somático	21
<i>Ani s 11</i>	Desconocido	27
<i>Ani s 12</i>	Desconocido	31
<i>Ani s 13</i>	Excretado/secretado	37
<i>Ani s 14</i>	Desconocido	24

A pesar de que algunos autores continúan sugiriendo que la existencia de alérgenos termoestables del parásito (termoestabilidad analizada por métodos diferentes a la provocación oral), podrían provocar cuadros alérgicos en personas previamente sensibilizadas frente al parásito (Moneo *et al.*, 2017), lo cierto es que todos los estudios de provocación oral realizados hasta el momento en pacientes diagnosticados de alergia a *Anisakis* han dado siempre resultados negativos (Daschner *et al.*, 2012; AECOSAN, 2016). Hay que hacer constar que, en este tipo de ensayos, que hoy en día se consideran

la prueba irrefutable de que un determinado alimento puede provocar alergia en una persona sensibilizada, los pacientes ingirieron larvas muertas por congelación (con o sin liofilización posterior) o, incluso, productos de excreción-secreción de la larva de *Anisakis*, que como se ve en la tabla 1, concentran la mayor parte los principales alérgenos del parásito (Daschner *et al.*, 2012; Iglesias *et al.*, 2015). Por tanto, a día de hoy, parece existir cada vez más consenso en la idea de que la alergia a *Anisakis* se considera una manifestación clínica causada por el contacto con la larva viva durante la reinfección de una persona previamente sensibilizada (Daschner *et al.*, 2012). Como consecuencia de ello, se consideran que no existen evidencias sólidas que demuestren que consumir trazas de *Anisakis* o larvas muertas en pescado fresco o ultracongelado debidamente cocinado pueda provocar alergia en personas sensibilizadas (AECOSAN, 2016)

En Europa, España, es el país con mayor incidencia de anisakiosis debido principalmente al consumo de boquerones en vinagre (Bao *et al.*, 2017a). Mediante un análisis cuantitativo de riesgos fundamentado en la importancia del boquerón en vinagre como agente causal de la anisakiosis en España, integrando las capturas de esta especie en nuestro país, los parámetros de infección por *Anisakis* que soporta este hospedador, el consumo de boquerones en vinagre por la población española, y el número medio de casos anuales de anisakiosis causados por el consumo de este plato, se ha estimado que el consumo de boquerones en vinagre podría estar causando entre 7700 y 8320 casos anuales en España (Bao *et al.*, 2017a). Asimismo, este parásito fue responsable de unas 130 hospitalizaciones al año entre 1997 y 2015, y teniendo en cuenta que se cree que solo un 1-2% de los casos de anisakiosis requieren hospitalización, estaríamos hablando de unos 6000 a 13000 casos/ año (10000 -21000 casos en los últimos años del estudio), lo que



**Figura 3.** Incidencia relativa de la anisakidosis en sus formas clínicas y subclínicas. Tomada de Herrador *et al.* (2018).

demuestra el infradiagnóstico de esta patología (Figura 3) (Herrador *et al.*, 2018; Bao *et al.*, 2019).

### 2.3. Estrategias actuales para el control de la anisakidosis humana

La prevención de esta patología está basada en un adecuado **tratamiento térmico** de los productos pesqueros, que permite matar las posibles larvas contenidas en el pescado (Adroher-Auroux y Benítez-Rodríguez, 2020). De acuerdo a los Reglamentos (CE) 853/2004 y (UE) 1276/2011 y el Real Decreto 1420/2006, los productos de la pesca susceptibles de estar contaminados con anisákidos se deben cocinar a una **temperatura superior a 60 °C durante más de un minuto**, o, si se van a consumir crudos o semicrudos (marinados, salazones suaves, ahumados en frío, etc.), congelarlos previamente a **-20 °C durante más de 24 h o a -35 °C durante más de 15 h**. Es muy importante matizar que las temperaturas anteriormente mencionadas se deben alcanzar, como especifica el Reglamento europeo, en la **totalidad del producto** antes de empezar a contar el tiempo señalado, ya que, de lo contrario, dependiendo del grosor de la pieza, estos protocolos podrían ser inefectivos. En este sentido, hay que señalar, además, que en el Reglamento (UE) 1276/2011 se establece como una posible excepción a la congelación obligatoria, el **pescado de acuicultura**, siempre y cuando haya sido criado a partir de embriones obtenidos en cautividad, haya sido alimentado exclusivamente con pienso libre de parásitos zoonóticos, y, o haya sido criado un entorno libre de parásitos viables, o el operador de la empresa alimentaria haya comprobado, mediante procedimientos aprobados por la autoridad competente, que no contiene parásitos zoonóticos. Además de lo comentado, estas normativas establecen que el consumidor debería estar debidamente informado, a través de un correcto etiquetado de los productos, o de su reflejo en los menús o cartas de los restaurantes, de que cualquier preparación elaborada a base de pescado crudo o semicrudo ha sido sometida a los tratamientos térmicos preceptivos para inactivar parásitos en estos productos. Por último, con el fin de controlar el nivel de aplicación de estas medidas por parte de los operadores de empresa alimentaria y restauradores, el Gobierno ha elaborado recientemente un nuevo *PNCOCA (Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria) 2021-2025* (MAPA, 2021), que incluye el **Programa 9** específico de *Anisakis* en el que se establecen los objetivos de este, así como el modo en que se organizará y gestionará el control oficial, y las medidas que se aplicarán en caso de detectar incumplimientos de dicho programa.

Otro aspecto importante que puede ayudar a minimizar la presencia del parásito en los productos pesqueros es la **evisceración postcaptura inmediata**, que evitaría la migración de las larvas desde las vísceras hacia la musculatura, durante el almacenamiento postcaptura del pescado (Adroher-Auroux y Benítez-Rodríguez, 2020). Este aspecto se recoge explícitamente en el Reglamento (CE) 853/2004, que establece que esta evisceración “si es posible, deberá practicarse lo más rápidamente posible tras la captura o el desembarque de los productos, lavándolos intensamente con agua potable o, a bordo de los buques, agua limpia inmediatamente después de esas operaciones”

Al margen de estas medidas de control, existen una serie de **métodos de inspección visual**, que se recogen en los Reglamentos (CE) 853/2004 y 2074/2005 y en diversas normas CODEX-STAN del Codex Alimentarius, que los operadores de empresa alimentaria deben poner en práctica para evitar la comercialización de productos de la pesca que estén claramente parasitados. Estos métodos tradicionales que se emplean para el control rutinario de los anisákidos y otros parásitos en productos de la pesca, junto con otras alternativas metodológicas más sofisticadas que permiten detectar no sólo las larvas de estos nematodos, sino también determinados componentes de estos parásitos en productos pesqueros serán abordados en profundidad en esta revisión.

### **3. Objetivo**

El principal objetivo de este trabajo, por tanto, fue **realizar de una revisión crítica de las principales técnicas que permiten la detección rutinaria de anisákidos en los productos de la pesca, y que se recogen en las diferentes normativas oficiales, así como otras técnicas más sofisticadas que han sido ensayadas, de momento, en estudios de tipo experimental.**

### **4. Metodología**

Para la búsqueda de la información inicial manejada en esta revisión se utilizaron Google Académico, Scopus y Pubmed, empleando las siguientes combinaciones de palabras clave:

- a. *(Anisakis or Pseudoterranova) and detection and methods*
- b. *(Anisakis or Pseudoterranova) and visual inspection*
- c. *(Anisakis or Pseudoterranova) and PCR and seafood*
- d. *(Anisakis or Pseudoterranova) and ELISA and seafood*

e. (*Anisakis* or *Pseudoterranova*) and digestion and pepsin

f. (*Anisakis* or *Pseudoterranova*) and UV-Press

Una vez hechas las búsquedas se descartaron para este trabajo todos los artículos en los que la detección del parásito se centraba en casos humanos y no en los productos de la pesca. Asimismo, tras la lectura de algunos trabajos seleccionados se eligieron otros que estaban contenidos entre sus referencias, y que fueron buscados en Google Académico.

Para la búsqueda de la legislación y normativas citadas en el trabajo se consultaron las páginas web de 1) la *European Food Safety Authority* (EFSA), 2) la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), y 3) el Codex Alimentarius, y una vez localizado el nº de la normativa, o se descargó directamente a través del enlace correspondiente, o se buscó específicamente en el navegador Firefox.

A la hora de valorar la utilidad de las diferentes técnicas para asegurar la inocuidad alimentaria y/o mejorar la calidad comercial de los productos pesqueros, se tuvieron en cuenta, entre otras consideraciones, 1) si la aplicación de la técnica implica la destrucción del producto final o no, 2) en caso de que sea destructiva, si podría ser aplicada a productos pesqueros diferentes al pescado comercializado entero o en fragmentos (p. ej. al surimi), 3) si la técnica requiere el análisis de una pequeña parte del producto, qué parte del producto se seleccionaría para analizar y hasta qué punto el análisis de la parte elegida aseguraría la ausencia del parásito en el resto del producto, 4) si la técnica permitiría la cuantificación de la infección o simplemente la detección de presencia/ausencia, y, finalmente, 5) si la implementación de la técnica a nivel de control rutinario sería necesaria o rentable. Para valorar este último punto se consideraron a) las evidencias actuales sobre la alergia a *Anisakis*, b) la legislación actual relativa al control de parásitos en los productos de la pesca y a los alérgenos alimentarios, c) las características de cada técnica y los costes de llevarla a cabo, y d) la facilidad y bajo coste de aplicación de los tratamientos térmicos empleados para inactivar las larvas presentes en el pescado antes del consumo.

## **5. Resultados y discusión**

Como se ha adelantado en la introducción de este trabajo, la preocupación por la presencia de parásitos en el pescado se ha incrementado considerablemente en los últimos

años, pues estos organismos constituyen un serio problema para el sector pesquero-alimentario. Esto se debe no sólo a la apariencia visual desagradable de muchos de ellos, sino, sobre todo, a que pueden ser una fuente importante de infección para el ser humano, como sucede en el caso de los anisákidos y, especialmente, en el caso de los miembros del género *Anisakis*, responsables de la mayor parte de casos de anisakiosis que se han descrito en el mundo hasta este momento (Mattiucci *et al.*, 2018).

A continuación, basándose en la revisión bibliográfica realizada, se describirán las principales técnicas desarrolladas para detectar estos nematodos, y se discutirá su eficacia y aplicabilidad al control rutinario de estos parásitos en los productos de la pesca. Algunas de estas técnicas ya están, o lo estarán próximamente, recogidas en las diferentes normativas de aplicación a este tipo de productos, mientras otras, sin embargo, han sido ensayadas hasta el momento sólo a nivel experimental. Para facilitar su exposición, se han agrupado las técnicas en dos categorías principales según la naturaleza de lo que detectan. Así, se ha distinguido entre **técnicas basadas en la detección visual de las larvas**, y **técnicas basadas en la detección de sustancias o componentes del parásito**, que incluirían ácidos nucleicos y proteínas.

## **5.1. Técnicas basadas en la detección visual de las larvas**

### **5.1.1. Inspección visual simple**

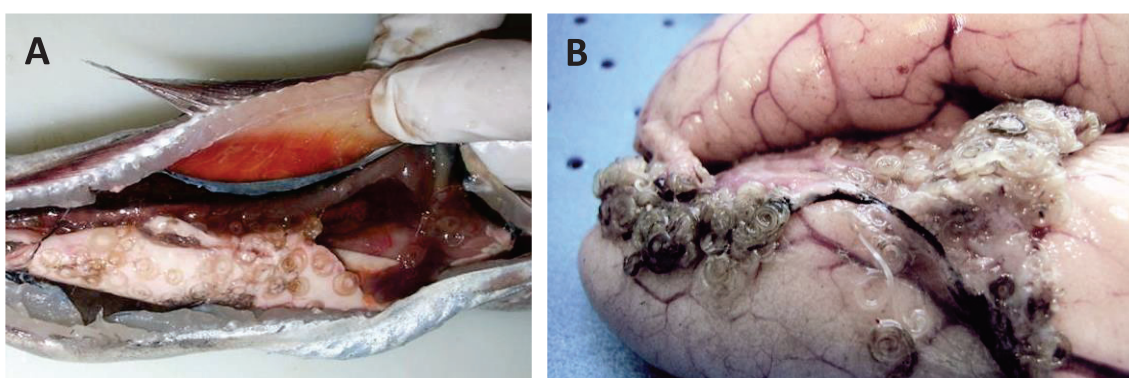
Esta técnica, que se recoge en los Reglamentos (CE) 853/2004 y 2074/2005, se basa en un *examen visual no destructivo* de los productos de la pesca que tiene por objetivo detectar *parásitos visibles* (parásitos que se diferencian perfectamente de los tejidos del pez por su tamaño, coloración y/o textura) en la cavidad abdominal del pescado, hígado y gónadas (huevas y lechazas) destinados a consumo humano. Este tipo de inspección, que puede ser realizada con o sin medio óptico de aumento, se debe aplicar a un número de muestras representativo de cada lote. Habitualmente, el personal cualificado la debe realizar de forma individual sobre cada pez, según procede a su evisceración manual y lavado de la cavidad, o, en el caso de filetes y rodajas, durante y tras el fileteado o corte de los mismos (Figura 4A). Sin embargo, cuando la evisceración de los peces se realice mecánicamente, el Reglamento (CE) 2074/2005 obliga a practicar un muestreo en el que se deben examinar al menos 10 ejemplares de cada lote. De forma similar, si el tamaño de los filetes o el proceso de fileteado impide realizar un análisis individual de las piezas, debe establecerse también el correspondiente plan de muestreo. Hay que resaltar, sin embargo, que en ninguna de las normativas citadas se especifica que el examen de la cavidad corporal de un pescado eviscerado incluya la retirada obligatoria del peritoneo que rodea la superficie interna de las ijadas o ventrescas, y que es negro en muchas especies, de ahí que esta práctica no se realice habitualmente. A pesar de ello y de que ralentizaría mucho el proceso de inspección visual, sobre todo en alta mar, la



incorporación obligatoria de este paso ayudaría a examinar superficialmente la musculatura ventral que rodea el paquete visceral, y que concentra la mayor parte de las larvas musculares de *Anisakis* y *Pseudoterranova* contenidas en el pescado, permitiendo al examinador tener una percepción más precisa de la parasitación real soportada por el producto a comercializar.

Atendiendo al Reglamento (CE) 853/2004, los operadores de empresa alimentaria deben evitar *la comercialización de productos de la pesca que estén claramente contaminados con parásitos visibles*. Prescindiendo de la subjetividad de esta norma, que no especifica qué se entiende por productos *claramente parasitados*, es obvio que cuando aparecen larvas (u otros parásitos) visibles durante la inspección visual, el personal implicado puede recurrir a la extracción de estos, al recorte y descarte de las zonas infectadas antes de la comercialización, o, incluso, al descarte de la pieza completa, si la parasitación visible es masiva. Lógicamente, el carácter no destructivo y poco exhaustivo de este tipo de inspección, que está pensada para evitar el deterioro del producto a comercializar, posibilita que un pescado pueda llegar al consumidor libre de parásitos visibles tanto en su superficie interna (cavidad corporal) como externa, pero conteniendo larvas de anisákidos embebidas en su musculatura, que sólo serían detectables tras un examen destructivo del producto. En ese caso, dependiendo de la carga parasitaria muscular, podríamos estar hablando de un pescado claramente contaminado con parásitos, aunque estos no serían detectables por el método de inspección visual no destructivo recogido en la normativa. En este sentido hay que señalar que, aunque no existen demasiados estudios que hayan evaluado la sensibilidad de esta técnica a la hora de detectar parasitación muscular, los estudios realizados por Huang (1990) demuestran que en especies como el jurel y la bacaladilla la inspección visual simple pasa por el alto entre el 45% y el 83% de las larvas musculares, detectando únicamente las larvas que están embebidas superficialmente en las ijadas. Al margen de esto, aunque se ha sugerido que el grado de parasitación detectado en el paquete visceral y cavidad corporal de un pez mediante inspección visual podría ser usado para predecir el nivel de infección muscular, Llarena-Reino *et al.* (2012) han demostrado que, al menos en especies como la caballa y bacaladilla, no parece haber una correlación positiva significativa entre ambos parámetros, lo que demuestra que esta técnica de detección no sólo no es útil para detectar las larvas musculares sino que tampoco puede ser usada como un indicador fiable de la parasitación muscular soportada por el pescado. Hay que señalar, por último, que la eficacia y precisión de la inspección visual para detectar estos nematodos en el paquete visceral y cavidad corporal del pescado dependerá principalmente del nivel de formación y experiencia del operario, tal y como han sugerido Levsen *et al.* (2005), pero también, y esto es muy importante, del rigor con la que éste realice el examen.

El caso de las huevas que se vayan a comercializar para consumo es diferente al de un pescado entero eviscerado, ya que en estos órganos las larvas se asientan en la superficie del producto, no habiendo, por tanto, larvas internas. Esta circunstancia posibilita una adecuada limpieza y extracción de las larvas de las huevas por parte de cualquiera de los operarios de la o las empresas que participan en su comercialización. Si se realiza cuidadosamente, esta limpieza podría permitir la comercialización de estos productos libres de parásitos. A pesar de ello, no es infrecuente encontrar en el mercado huevas de merluza con numerosas larvas de *Anisakis* sobre su superficie, que incumplirían, por tanto, la normativa europea (Figura 4B).



**Figura 4.** Apariencia de la cavidad corporal de un pez durante una inspección visual simple, antes de la evisceración manual del ejemplar (A), y de unas huevas de merluza compradas en una gran superficie (B). Nótese la presencia de las larvas de *Anisakis* encapsuladas en forma de espiral plano sobre el hígado del pez (A), y las huevas (B). Imágenes cedidas por el Prof. Raúl Iglesias.

Por todo lo expuesto, el método de inspección visual simple que se realiza actualmente sólo permite detectar las larvas encapsuladas (o libres) presentes sobre la superficie de las vísceras o de la pared interna de la cavidad (sobre el peritoneo), y algunas larvas que podrían estar parcialmente embebidas en la musculatura (con una parte del nematodo anclada en las ijadas y el resto saliendo hacia la cavidad corporal), aunque en este último caso, es difícil que se llegue a este nivel de precisión durante la práctica rutinaria que acompaña a la evisceración en alta mar o establecimientos en tierra firme. De esta manera, y si se realiza convenientemente, la inspección visual simple es útil para 1) evitar la presencia de anisákidos (y otros parásitos visibles) en la superficie de la cavidad corporal del pescado entero eviscerado o de las vísceras que van a ser comercializadas para consumo (p. ej. hígado de rape, huevas de merluza, etc.), y 2) minimizar la presencia de anisákidos musculares en filetes o rodajas, siempre y cuando las larvas no estén profundamente embebidas en la carne, en cuyo caso no serían detectables sin aplicar un método destructivo (p. ej. loncheado o *slicing* combinado con

examen al trasluz o *candling*, compresión combinada con examen al trasluz o con UV, etc.).

### **5.1.2. Inspección al trasluz o a contraluz (candling)**

En realidad, este *método no destructivo* se contempla en el Reglamento (CE) 2074/2005 como una modalidad de la inspección visual, aunque en este trabajo se ha considerado aparte porque su fundamento es muy diferente al de una inspección visual simple. En dicho reglamento, que debería establecer las condiciones óptimas en las que realizar esta técnica, tan sólo se explica, de forma muy resumida, en qué consiste el método indicando que se trata de la “*observación del pescado sostenido frente a una fuente luminosa en una habitación a oscuras para detectar parásitos*”, y que es aplicable a peces planos o filetes de pescado. Obviamente, esta información es del todo insuficiente para que las empresas que tengan que aplicarlo puedan ponerlo en práctica. Sin embargo, Bier *et al.* (2012) en el *FDA's Bacteriological Analytical Manual*, y las normas CODEX STAN CXS 165-1989, 190-1995 y 311-2013 del Codex Alimentarius, recogen o resumen las recomendaciones desarrolladas por Valdimarsson *et al.* (1985) para realizar esta técnica convenientemente. En base a estas fuentes podríamos decir que este método, en el que filetes de pescado de carne blanca, de 30 mm de grosor o menos y sin piel, son colocados sobre una lámina translúcida que tiene una fuente de luz por debajo, permite la detección de los parásitos como defectos más o menos opacos al paso de la luz. La placa sobre la que se colocan los filetes debería tener una superficie de al menos 30 x 60 cm, unos 5 mm de grosor, y una translucencia de 45%, mientras que la fuente de luz de debajo debería ser luz fría (temperatura de color de 4200 °K; p. ej. 2 tubos fluorescentes de al menos 20 w) y deberían dar una iluminancia de 1500 lux, medida a 30 cm por encima de la lámina. A este respecto, hay que señalar que las versiones en español de las 3 normas CXS citadas contienen un error de traducción importante, ya que indican textualmente lo siguiente “*Se examinará la unidad de muestra íntegra sin destruirla, colocando porciones adecuadas de la unidad de muestra descongelada sobre una lámina acrílica, de 5 mm de espesor y una translucidez del 45 por ciento, iluminada con una fuente luminosa de 1500 lux que esté situada encima de la lámina a una distancia de 30 cm*”. Esta última parte de la frase sitúa una fuente de luz de 1500 lux encima de la placa de transiluminación, lo que impediría realizar el examen de los filetes al trasluz. Al margen de esta apreciación, de acuerdo a estas normativas CXS, todas las unidades de muestreo en las que se detecten 2 o más parásitos encapsulados con un diámetro mayor de 3 mm, o un solo parásito no encapsulado y mayor de 1 cm de longitud, deberían considerarse defectuosas. Las normas incluyen también un plan de muestreo que incluye, según el tamaño del lote, el tamaño muestral a examinar y el número de aceptación, es decir, el número máximo de muestras defectuosas permitido a partir del cual el lote debería ser rechazado para su comercialización.



**Figura 5.** Proceso de inspección al trasluz (*candling*) llevado a cabo en una empresa dedicada a la comercialización de filetes de pescado sin piel. Imágenes tomadas de <https://carsoe.com/seafood-processing/products/candling-tables/>.

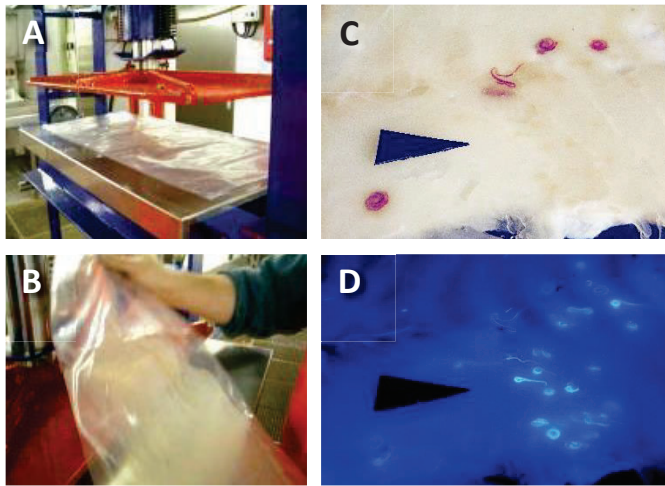
Si el examen al trasluz se realiza de forma rutinaria sobre cada filete (Figura 5), esta práctica permite la extracción manual de los nematodos visibles, sin son pocos, el recorte de las zonas del filete más infectadas, o, si las opciones anteriores no son viables desde el punto de vista comercial, el descarte completo del producto. La eficiencia de esta técnica para detectar larvas de anisákidos dependerá, lógicamente, del grosor del filete, pero también de la pigmentación y contenido graso de la carne y del grado de experiencia y rigor del examinador, tal y como han resaltado Adams *et al.* (1997), pero también del tipo de anisákido a detectar, ya que el mayor tamaño y coloración marrón-rojiza de las larvas de *Pseudoterranova* permite detectar estos nematodos con mayor facilidad que en el caso de las larvas de *Anisakis*, más pequeñas y menos pigmentadas. De hecho, el examen al trasluz fue inicialmente diseñado para buscar larvas de *Pseudoterranova* en filetes de bacalao (Valdimarsson *et al.*, 1985). A pesar de todo, en los estudios en que se ha intentado evaluar la eficacia de esta técnica se ha comprobado que en muchos casos las larvas de anisákidos, especialmente si están muy enterradas en el filete, pasan desapercibidas para el examinador. Así, en plantas de producción de Canadá la eficiencia del examen al trasluz permitió detectar un 33-93% de los filetes con una densidad de más de 3 larvas de *Pseudoterranova*/kg, eficacia que fue mejorada hasta el 95% tras cortar los filetes longitudinalmente en filetes de 13 mm de grosor (McClelland, 2002). Este proceso de loncheado (*slicing*) previo al examen, sin embargo, fue considerado inaceptable desde el punto de vista de la rentabilidad (se incrementa el coste del proceso) y de la aceptación comercial del producto final (el consumidor prefiere el filete entero) (McClelland, 2002). En estudios realizados sobre filetes de gallineta (*Sebastes* sp.), halibut de Alaska (*Atheresthas stomias*), platijas (Pleuronectidae) y bacalao de Alaska (*Gadus macrocephalus*), el examen al trasluz permitió detectar un 53-79% de los filetes infectados y un 43-76% de los anisákidos presentes en los filetes infectados, si bien los autores no desglosan la eficiencia del método por tipo de anisákido (Adams *et al.*, 1997). Posteriormente, Levsen *et al.* (2005) demostraron que el examen al trasluz no destructivo

sólo permitió detectar el 7-10% de las larvas de anisákidos presentes en filetes de arenque (*Clupea harengus*), bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), y caballa (*Scomber scombrus*), siendo la eficiencia observada similar para las tres especies.

Por tanto, y al igual que sucede en el caso de la inspección visual simple comentada en el apartado anterior, hay que considerar que, desde el punto de vista del Reglamento (CE) 853/2004, esta técnica puede permitir la comercialización de filetes sin parásitos visibles, lo cual no significa que el producto esté libre de parasitación, especialmente, en el caso de *Anisakis*, cuya presencia pasa desapercibida con mayor facilidad que en el caso de *Pseudoterranova*.

### 5.1.3. *Compresión-UV (UV-Press)*

Este *método destructivo*, desarrollado por Karl y Leinemann (1993) en base a estudios previos de Pippy (1970), se basa en el hecho de que las larvas de nematodos anisákidos, una vez muertas, emiten fluorescencia cuando se exponen a una luz UV de 365-366 nm. Inicialmente, el método fue probado sobre muestras de canal alimentario de peces y aplicando UV de 360 nm (Pippy, 1970), concluyéndose que, dado que la técnica no permitía detectar nematodos embebidos en los tejidos a más de 0,5 mm de profundidad, podría ser utilizada para detectar larvas encapsuladas superficialmente sobre las vísceras, el peritoneo o la cavidad corporal. Posteriormente, Karl y Leinemann (1993) adaptaron el método para poder ser aplicado al examen de la musculatura del pescado, y este fue optimizado posteriormente por Levsen y Lunestad (2010). Las etapas del método incluyen 1) el *fileteado* del pescado, la retirada de la piel, y la colocación de los filetes en el interior de una bolsa de plástico transparente, 2) el *prensado* de los filetes hasta un grosor de 1-2 mm con ayuda de una prensa (permite que la luz UV penetre en la musculatura y alcance las larvas, independientemente de la profundidad en la que se sitúen en el filete intacto), 3) la *congelación* de los filetes prensados a -18 °C durante al menos 12 h (asegura la muerte de las larvas, que es imprescindible para que estas emitan fluorescencia), y 4) el *examen con luz UV* de 366 nm de los filetes descongelados. De esta manera, las larvas se observan con fluorescencia azul (Figura 6), lo que facilita no sólo su detección sino también su cuantificación. Aunque no está del todo claro cuál puede ser el origen de esta fluorescencia, se ha sugerido que la lipofuscina, un pigmento asociado al envejecimiento derivado de la degradación de numerosas macromoléculas (proteínas, lípidos y carbohidratos) de origen metabólico diverso, o el ácido antranílico, un derivado del triptófano, podrían estar detrás de este fenómeno (Klapper *et al.*, 2021).



**Figura 6.** A. Prensa hidráulica empleada para comprimir un filete de pescado. B. Apariencia del filete tras la compresión. C. Filete de bacalao comprimido iluminado con luz natural. D. Mismo encuadre que en C, pero iluminado con luz UV de 366 nm. Nótese que en C destacan principalmente las larvas de *Pseudoterranova*, que, por su color y tamaño, son fácilmente detectables visualmente, mientras que en D se revelan con fluorescencia azul todas las larvas de *Anisakis* que están embebidas en la carne. Imágenes A y B tomadas de Tejada (2011). Imágenes C y D cedidas por el Prof. Raúl Iglesias.

Aunque la eficiencia de este método para detectar y contar las larvas presentes en la carne del pescado es óptima, su carácter destructivo dificulta, sin embargo, su aplicación rutinaria al control de la contaminación por anisákidos en los productos de la pesca. Esta es la razón por la que, hasta el momento, no haya sido incluido en ninguna de las normativas oficiales relacionadas. A pesar de ello, su elevada fiabilidad y sencillez han permitido su elección para diversos estudios de tipo epidemiológico destinados a conocer 1) el grado de parasitación muscular de una determinada especie en diferentes caladeros, información que podría ayudar a una hipotética selección de las capturas procedentes de caladeros donde la parasitación es menor, y 2) la distribución de las larvas en los diferentes sectores musculares (lomos, ijadas, colas) de una determinada especie (incluidos calamares), que podría servir de base para comercializar preferencialmente aquellas partes menos parasitadas (Levsen y Lunestad, 2010, Levsen y Maage, 2016; Levsen *et al.*, 2018; Cipriani *et al.*, 2018, 2021). Esta última aplicación implicaría, como es lógico, la separación previa de los diferentes compartimentos musculares a analizar.

En la actualidad, este método está siendo objeto de revisión para la publicación de un método ISO (ISO 23036-1) (Klapper *et al.*, 2021). Asimismo, en previsión de que esta metodología pueda ser implementada en un futuro para el análisis rutinario de los lotes de pescado destinados al consumo, mediante planes de muestreo adecuados, se han iniciado ya los correspondientes estudios interlaboratorios (*ring trials*). Dichos estudios han permitido comprobar que el método de compresión-UV, aplicado sobre filetes aplastados hasta 2 mm de grosor y congelados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante al menos 24 h, es sensible ( $\geq 94\%$ ) y específico (100%), y fácil de implementar técnicamente. A pesar de ello, los representantes de la industria de la pesca participantes en estos estudios opinan que el protocolo actual es difícil de aplicar de forma rutinaria debido a la demora en la obtención de resultados respecto al momento de la captura. En este sentido, se ha sugerido que otras combinaciones de tiempo y temperatura de congelación tal vez podrían solucionar estas

limitaciones (Gómez-Morales *et al.*, 2018). Sin embargo, al margen de lo comentado, hay que hacer notar que, si esta técnica fuese finalmente incorporada a las normativas europeas vigentes, y se aplicara el Reglamento (CE) 853/2004 de forma estricta en el sentido de considerar larvas visibles a las detectadas por este procedimiento, podría llegar a suponer, en algunas especies, la retirada del mercado de la mayor parte de lotes examinados. Así, si tenemos en cuenta los datos de parasitación muscular observados mediante esta técnica en 188 merluzas de 330-785 mm de longitud procedentes del Gran Sol (prevalencia del 100% y abundancia media de 247 larvas musculares por individuo; Pascual *et al.*, 2018), el análisis de una muestra representativa del lote estudiado hubiese demostrado la presencia de abundantes larvas visibles en todos los ejemplares. Asumiendo estas premisas, Rodríguez *et al.* (2018) comprobaron que el porcentaje de rechazo de diversos lotes de 9 especies de interés comercial basándose en la inspección visual simple oscilaría entre aproximadamente el 2 y el 100%, dependiendo del lote y especie analizado (21,3% en total), mientras que aplicando el método de compresión-UV oscilaría entre el 12 y el 100% (38,9% total), observándose un incremento en todos los lotes examinados, independientemente de la especie a la que pertenecían.

#### **5.1.4. Digestión artificial**

Este *método destructivo* fue inicialmente aplicado a la detección de larvas de nematodos en musculatura de peces planos por Jackson *et al.* (1981). Su fundamento se basa en someter la carne del pez a un procedimiento de digestión artificial que intenta reproducir las condiciones del estómago empleando una solución que contiene pepsina y HCl, y tras la digestión, recuperar las larvas que se liberan de la musculatura con ayuda de un tamiz en el que quedan retenidas. Las larvas obtenidas por este método se mantendrían perfectamente viables al final del proceso (Jackson *et al.*, 1981; Llarena-Reino *et al.*, 2013), ya que están especialmente adaptadas a sobrevivir a las condiciones gástricas de sus hospedadores definitivos. Aunque, al igual que en el caso del método anterior, su carácter destructivo ha hecho que esta técnica no se contemple como método de inspección en los Reglamentos (CE) 853/2004 y 2074/2005, su uso sí que se recoge en las normas CXS 244-2004 y CXS 311-2013 del Codex Alimentarius, aplicables a la producción de arenque y espadín salados, y de pescado ahumado, con sabor a humo o secado con humo, respectivamente. Hay que matizar, no obstante, que la aplicación exacta de esta técnica en estas dos normas no es la detectar la presencia de parásitos visibles en los productos afectados, objetivo que se consigue mediante la aplicación de inspección visual simple o al trasluz, sino la asegurar que no haya larvas viables en el producto final tras la aplicación del procesado correspondiente. No hay que olvidar que las larvas de anisákidos pueden resistir ciertos procesados de salazón y de ahumado, de ahí que los productos afectados por esas dos normas no deberían contener en ningún caso parásitos viables. En ambos casos la técnica de digestión recomendada incluiría las

siguientes etapas: 1) *desmenuzado* manual de los filetes, 2) *digestión* en una solución de pepsina al 0,5% (p/v) en HCl 0,063 M durante 1-2 h a 37 °C empleando un agitador magnético termostatzado (relación peso/volumen de 1/5, es decir, 1 L de solución por cada 200 g de carne), 3) aislamiento de las larvas mediante *tamizado* de la mezcla de digestión por un tamiz de 0,5 mm de malla (las larvas quedarían retenidas en el tamiz), y 4) *examen de la viabilidad* larvaria a la lupa (deben mostrar movimientos espontáneos visibles o inducible con ayuda de unas pinzas). Con respecto al protocolo recogido en estas normas, Llarena-Reino *et al.* (2013) han mostrado que puede ser mejorado mediante la utilización de pepsina líquida en lugar de en polvo, el uso de una relación peso de carne/volumen de solución de digestión de 1/10 en lugar de 1/5, y la homogeneización y compresión de las muestras antes de la digestión empleando un homogeneizador de palas.



**Figura 7.** Apariencia de las larvas de *Anisakis* que quedan retenidas en el tamiz tras pasar la mezcla resultante de la digestión artificial de la musculatura de un pez empleando pepsina líquida. Imágenes tomadas de Llarena-Reino *et al.* (2013).

A pesar de la finalidad de esta técnica recogida en estas dos normas CXS, este método destructivo ha sido aplicado en diversas ocasiones para estudiar la parasitación muscular soportada por el pescado, con fines idénticos a los perseguidos con la compresión-UV, y en algunos casos, con la intención también de comparar ambos métodos (Lunestad, 2003; Llarena-Reino *et al.*, 2012; Gómez-Morales *et al.*, 2018). En este sentido, sin embargo, hay que subrayar que en el estudio interlaboratorios realizado por Gómez-Morales *et al.* (2018) se ha demostrado que el método de digestión presenta prestaciones (precisión, sensibilidad y reproducibilidad) ligeramente inferiores a las observadas con el método de compresión-UV. Además, tanto en este estudio como en otro similar, se ha comprobado que en ocasiones se produce la fragmentación de algunas larvas, lo que puede llevar a un recuento erróneo de las mismas (Karl *et al.*, 2014; Gómez-Morales *et al.*, 2018). Estos resultados, unidos al elevado precio de la pepsina (según las normas CXS se debe emplear normalmente 1 L de solución de digestión por cada 200 g de pescado) y a la necesaria utilización de un agitador magnético por cada muestra de pescado que se quiere analizar, hacen que la compresión-UV sea la técnica de elección para los estudios de tipo



epidemiológico. Este último método, sin embargo, requiere que las larvas contenidas en el pescado sean previamente inactivadas por congelación para que éstas puedan emitir la fluorescencia que las hace detectables, aspecto que, a diferencia de la digestión artificial, convierte a esta técnica en una alternativa inaceptable para determinar viabilidad larvaria tras tratamientos de salazón, ahumado o marinado. Recientemente, no obstante, se ha demostrado que la digestión artificial puede matar un número significativo de larvas contenidas en productos que han sido sometidos a tratamientos de congelación inadecuados (Sánchez-Alonso *et al.*, 2021), de ahí que estos autores hayan alertado sobre la posibilidad de que este procedimiento pueda infraestimar el número de larvas viables presentes en un producto tratado. A pesar de estas posibles limitaciones, que deberían ser comprobadas con otros procesos de transformación diferentes a la congelación, la técnica de digestión artificial está siendo actualmente revisada para la publicación de la norma ISO correspondiente (ISO 23036-2) (Klapper *et al.*, 2021).

#### **5.1.5. Otros métodos de detección visual**

Aunque se han probado otras técnicas de imagen más sofisticadas y no destructivas como las tecnologías de *imagen hiperespectral (HSI)* y de *resonancia magnética (MRI)* para intentar detectar automáticamente larvas en los tejidos musculares del pescado (Sivertsen *et al.*, 2012; Bao *et al.*, 2017b), su aplicación al control rutinario de parásitos, y en concreto, de larvas de anisákidos en los productos de la pesca está todavía muy lejos de ser implementado.

En el primer caso, la tecnología HSI, que permite recoger múltiples bandas espectrales que van desde el rango ultravioleta hasta el infrarrojo de onda larga, se ha probado sobre filetes de bacalao en un escenario industrial. Los resultados revelan que el sistema desarrollado, si bien podría permitir el análisis automatizado de los filetes, arroja un 60% de falsas alarmas (porcentaje de filetes con al menos una falsa detección), especialmente en filetes que no han sido sometidos a la operación de recorte. Esto se debe probablemente a la presencia de algunos focos de sangre en los filetes, que, por su similitud espectral con las larvas marrón-rojizas de *Pseudoterranova*, confunden al sistema de detección. Además, la sensibilidad del sistema fue superior para los nematodos oscuros (seguramente *Pseudoterranova*) que para los pálidos (seguramente *Anisakis*), reduciéndose considerablemente, sobre todo en este último caso, cuando las larvas están embebidas a una profundidad superior a 6 mm (Sivertsen *et al.*, 2012).

En cuanto a la MRI, que se basa en el fenómeno de resonancia magnética nuclear, los resultados preliminares publicados por Bao *et al.* (2017b) apuntan a que esta tecnología podría ser empleada para detectar parasitación visceral y muscular por larvas de anisákidos, si bien en la actualidad, y como sugieren los propios autores del estudio, el coste del equipamiento y su mantenimiento es muy elevado, el tiempo necesario para

tomar las imágenes en sus diferentes cortes es elevado (varios minutos por pez), la cualificación técnica del personal es elevada, no puede aplicarse a productos de la pesca congelados (el agua contenida en los tejidos debe ser líquida).

Al margen de lo comentado, hay que resaltar que si estas tecnologías no destructivas, y especialmente la MRI, que permitiría la detección de larvas bien embebidas en la musculatura, evolucionaran lo suficiente como para poder ser aplicadas al control rutinario de los productos de la pesca, el mantenimiento de los criterios de calidad reflejados actualmente en el Reglamento (CE) 853/2004 podría suponer que, dependiendo del caladero y de la talla de los ejemplares, algunas especies como por ejemplo la merluza europea, que contiene una elevada parasitación muscular por *Anisakis* (Pascual *et al.*, 2018), serían retiradas del mercado con elevada frecuencia pues se considerarían productos claramente parasitados. Esta situación conduciría seguramente a la quiebra de la industria que se dedica mayoritariamente a esta pesquería.

## **5.2. Técnicas basadas en la detección de sustancias o componentes del parásito**

### **5.2.1. Técnicas de base inmunológica**

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida-lauril sulfato sódico (SDS-PAGE) seguida de inmunotransferencia o *immunoblotting* empleando un suero policlonal de conejo dirigido frente al alérgeno Ani s 4 permitió detectar menos de 1 ppm de este alérgeno de *Anisakis* en extractos de pescado preparados a partir de filetes de 10 g mediante homogeneización, sonicación, tratamiento con HCl, y centrifugación posterior (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010). En base a estos resultados, los autores del estudio apuntaron que este método podría ayudar a identificar productos de la pesca libres de alérgenos de *Anisakis*, que podrían ser consumidos con seguridad por personas sensibilizadas frente al parásito. De forma similar, Arilla *et al.* (2008) desarrollaron un método *ELISA sándwich* basado en la utilización de un anticuerpo monoclonal de captura dirigido frente al alérgeno Ani s 1 y un antisuero policlonal de conejo preparado frente al mismo alérgeno, empleado para reconocer el antígeno capturado. Este método permitió detectar la presencia de hasta 1,8 ng/mL de este alérgeno mayoritario de *Anisakis* en extractos o soluciones empleadas para realizar las pruebas cutáneas que se utilizan en el diagnóstico rutinario de la alergia a *Anisakis*. Aunque ese era el principal objetivo para el que fue diseñada esta técnica, los autores apuntaron que podría ser empleada también para determinar la presencia de *Anisakis* en productos de la pesca. Esta aplicación, sin embargo, no ha sido estudiada hasta el momento. De forma similar, Werner *et al.* (2011) desarrollaron también otro método *ELISA sándwich*, en este caso basado en el empleo de anticuerpos IgG purificados a partir de un suero policlonal de conejo anti-*Anisakis* tanto para la captura como para el reconocimiento de los antígenos del parásito capturados. En este caso, el método fue probado con extractos preparados a partir de muestras de 2 g

homogeneizadas y sometidas a extracción con tampón Tris-glicina seguida de centrifugación. El método fue capaz de detectar hasta 1,1 µg de antígenos de *Anisakis* por gramo de muestra, y de detectar antígenos de *Anisakis* en dos matrices procesadas comerciales (albóndigas de pescado y caballa en salsa de tomate) y en fragmentos de carne de bacalao a los que se añadieron antígenos de *Anisakis*, en el primer caso, y larvas, en el segundo. La finalidad de método según los autores era la de realizar controles para la detección del parásito en productos de la pesca frescos o procesados. Posteriormente, el mismo grupo de investigación extendieron el uso de este método a otras matrices y productos de la pesca, incluidas muestras de salmón y de otras especies procedentes de restaurantes de *sushi*, detectando sólo trazas del parásito en algunas de ellas (Fæste *et al.*, 2015). Por último, Kochanowski *et al.* (2020) han desarrollado también un procedimiento ELISA sándwich de diseño muy similar al descrito por los anteriores autores, pero que emplea un sistema de revelado quimioluminiscente en lugar de colorimétrico. Este método ha permitido detectar también la presencia de hasta 0,5 ng/mL de antígenos de *Anisakis* en los extractos de diversos productos de la pesca, incluidos pescados ahumados, salados, o sometidos a diversos procesados antes de su enlatado.

A pesar de las aparentes ventajas de estas técnicas de detección de base inmunológica existen una serie de condicionantes que limitan su aplicación en el control rutinario de anisákidos en productos de la pesca. El primero de ellos y, quizás el más importante, es que, como se ha dicho en la introducción de este trabajo, no existen a día de hoy evidencias clínicas sólidas que demuestren que el consumo de larvas muertas, o de trazas de estos parásitos, puedan reproducir el cuadro alérgico en personas diagnosticadas de alergia a *Anisakis* (Daschner *et al.*, 2012; Iglesias *et al.*, 2015; AECOSAN, 2016). Este aspecto, lógicamente, es clave puesto que la principal ventaja de estas técnicas sería, precisamente, la de permitir la detección de trazas del parásito en los productos de la pesca. En relación con las alergias de naturaleza alimentaria, además, hay que señalar que las normativas actuales relativas a la protección del consumidor se centran básicamente en asegurar que éste sea informado correctamente sobre los posibles alérgenos que puede contener cualquier alimento comercializado (Reglamento (UE) 1169/2011 y Real Decreto 126/2015). Desde esta perspectiva, si finalmente se demostrara que la ingestión de trazas de estos nematodos pudiera provocar alergia en personas sensibilizadas, bastaría con incluir en los envases de los productos de la pesca susceptibles de estar contaminados con el parásito, o en los platos de pescado que figuran en los menús de los restaurantes, una frase del estilo “puede contener trazas o alérgenos de *Anisakis*”. Esta información permitiría que el consumidor, en función de su situación, decidiera si correr el riesgo o no de consumir el producto, tal y como sucede con otros alimentos. Por ejemplo, en los envases de chocolate con leche se especifica que el producto puede contener trazas de

frutos secos para que las personas alérgicas a éstos últimos estén debidamente informadas antes del consumo.

En segundo lugar, todos los métodos de base inmunológica comentados requieren la homogeneización y/o extracción de la muestra, como paso previo para la obtención del extracto final a analizar. En consecuencia, la elección de la cantidad de muestra a ensayar es un aspecto importante a considerar. Así, si se quiere analizar un filete de pescado, y se decide seleccionar un fragmento pequeño del mismo para preparar el extracto, la obtención de un resultado negativo en estas pruebas no nos aseguraría la ausencia de trazas en el resto del producto que no ha sido estudiado, sobre todo, teniendo en cuenta que la distribución de las larvas o, incluso, la migración de las mismas en la musculatura, puede ser muy heterogénea. Por el contrario, si se decide homogeneizar todo el filete, se estaría destruyendo la totalidad del producto, con lo que estas técnicas no ofrecerían ninguna ventaja sobre los métodos de detección visual destructivos tratados con anterioridad (compresión-UV o digestión artificial), que, además de fiables, son más sencillos de realizar. Hay de matizar, sin embargo, que si en algún momento se hiciera obligatoria la detección de los alérgenos de *Anisakis* en los productos de la pesca, o si se requirieran controles oficiales para comprobar la presencia o ausencia de estas sustancias en estos productos, estas técnicas podrían tener una aplicación para el análisis de productos elaborados a base de pasta de pescado tipo surimi o, por ejemplo, patés de pescado, que pasan por un proceso de trituración y homogeneización previo y, que por tanto, podrían contener una distribución de las sustancias del parásito más homogénea que la materia prima intacta.

Por último, el tiempo de procesado, el precio de los reactivos, material y equipamiento, y la alta cualificación técnica necesarios para realizar este tipo de ensayos, supondría un gasto económico prácticamente inabordable para el sector pesquero-alimentario, especialmente, si se tiene en cuenta la naturaleza real de la alergia a *Anisakis* y que los pacientes alérgicos al parásito pueden controlar el problema fácilmente sometiendo el pescado a un tratamiento térmico efectivo antes de su consumo (p. ej. congelación y cocción adecuadas).

### **5.2.2. Técnicas de base genética**

López y Pardo (2010) diseñaron un *método de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real* (RT-PCR), basado en el uso de una sonda Taqman y cebadores dirigidos frente a un fragmento del gen que codifica la subunidad 2 de la citocromo *c* oxidasa mitocondrial de *Anisakis* (COII), que permitió detectar con éxito hasta una larva de *A. simplex* de 1 mg en 25 g de diferentes muestras de productos pesqueros (40 ppm). Este método reveló la presencia del parásito en diversos productos procesados tales como potitos para bebés que contenían merluza y conservas, croquetas, patés y platos

precocinados elaborados con bacalao, por lo que, en opinión de los autores, podría ser utilizado para minimizar la presencia de este parásito en productos procesados, evitando así la llegada de sus alérgenos al consumidor. De forma similar, Herrero *et al.* (2011) y Fang *et al.* (2011) desarrollaron otras variantes de esta técnica basadas en el uso de sondas Taqman y cebadores específicos de un fragmento del gen que codifica la subunidad 1 de la citocromo C oxidasa mitocondrial (COI) o de una región del espaciador transcrito interno 2 (ITS-2) del ADN ribosómico de la especie *A. pegreffii*, respectivamente. Estos métodos permitieron detectar hasta 1 ppm, en el primer caso, y la tercera parte de una larva de esta especie en una muestra de 30 mg de tejidos de peces, en el segundo. Posteriormente, se han probado otras variantes de la RT-PCR basadas en el uso del intercalador fluorescente SYBR Green en lugar de las sondas Taqman y de cebadores dirigidos frente al gen que codifica la COII (Godínez-González *et al.*, 2017). Este método, que permitió detectar de forma específica hasta 1,5 ng de ADN de *Anisakis* por gramo de producto, reveló la presencia de ácidos nucleicos de estos nematodos en gulas, palitos de cangrejo y croquetas. Recientemente, se ha intentado optimizar este procedimiento para poder cuantificar larvas de *Anisakis* en productos de la pesca, mediante el desarrollo de un modelo matemático descriptivo que correlaciona el valor del umbral del ciclo (*Ct*) obtenido en la RT-PCR con el número de larvas presentes en la muestra analizada (Godínez-González *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos, en opinión de estos autores, confirman que esta técnica podría ser usada para cuantificar la carga larvaria de *Anisakis* soportada por el pescado.

Los resultados de todos estos trabajos que, si el diseño es el adecuado, la sensibilidad y especificidad de la RT-PCR es excelente, y que su utilización puede permitir la detección y cuantificación del ADN de las diferentes especies del parásito en muy poco tiempo y de forma más sencilla que si se empleara una PCR convencional con o sin análisis de polimorfismos en los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (este análisis ha sido aplicado por Espiñeira *et al.*, 2010). Sin embargo, las limitaciones de estos procedimientos de base molecular a la hora de ser implantados en la industria pesquera como técnicas de control rutinario de anisákidos son similares a las comentadas con anterioridad para las pruebas de base inmunológica, y, por tanto, no las vamos a repetir aquí. Es verdad que en el hipotético caso de que se llegara a confirmar que la ingestión de trazas del parásito muerto puede producir alergia en el ser humano, esta técnica permitiría intuir (nunca confirmar) la posible presencia de alérgenos del nematodo en productos pesqueros elaborados a base de pescado triturado y, en muchos casos, tratados térmicamente (p. ej. *surimi* en sus diferentes presentaciones, patés, albóndigas, croquetas, etc.), en los que se partiría ya de una matriz parcial o totalmente homogeneizada a partir de la cual realizar la extracción del ADN. Sin embargo, como se comentó anteriormente, los operadores de empresa alimentaria implicados en la producción y comercialización

de estos productos podrían etiquetarlos debidamente para avisar al consumidor del posible riesgo de presencia de trazas del parásito, sin tener por qué analizar sistemáticamente la presencia de los alérgenos del nematodo en los productos, evidencia que, además, solo podría ser confirmada empleando técnicas de base inmunológica diseñadas para detectar específicamente la presencia de estas sustancias en esos alimentos (las pruebas de RT-PCR sólo confirman la presencia de ácidos nucleicos del parásito).

Al margen de la RT-PCR, Cammilleri *et al.* (2020) han ensayado recientemente un método de detección basado en la *técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle* o *LAMP* (del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*), obteniendo excelentes resultados de sensibilidad y especificidad y un límite de detección inferior al observado incluso con la RT-PCR. Esta técnica, que usa 6 cebadores (2 externos, 2 internos y 2 en bucle) y una ADN polimerasa termostable de *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*-ADN polimerasa) para amplificar la secuencia del ITS-2, permite realizar la reacción de amplificación a una temperatura constante de 65 °C y en tan solo 35 min, sin necesidad de un termociclador. Una vez más, los autores del trabajo proponen esta herramienta diagnóstica como una alternativa válida para prevenir la alergia a *Anisakis*, por lo que, a pesar de que esta metodología puede ser más barata y sencilla que la RT-PCR (no se necesita termociclador y el resultado de la amplificación podría detectarse incluso visualmente), sus principales limitaciones son similares a las explicadas para las otras técnicas inmunológicas y moleculares.

### **5.2.3. Técnicas basadas en espectrometría de masas**

Carrera *et al.* (2016) desarrollaron una estrategia basada en 1) la purificación y caracterización de los biomarcadores proteicos termoestables del parásito (*A. simplex* y dos especies del género *Pseudoterranova* diferentes) mediante *cromatografía de líquidos* combinada con *espectrometría de masas en tándem* (LC-MS/MS), que permitió seleccionar al alérgeno Ani s 9 como el mejor biomarcador proteico, 2) la digestión trípica del Ani s 9 acelerada por ultrasonidos focalizados de alta densidad (*HIFU*), que permitió seleccionar 4 péptidos biomarcadores, y 3) la monitorización de esos péptidos biomarcadores en extractos larvarios o en extractos de pescado contaminados a propósito con dichos péptidos mediante un sistema de LC-MS/MS de *monitorización de reacciones en paralelo* (*PRM*), que es más sensible y específico a la hora de cuantificar múltiples péptidos en muestras complejas que la monitorización de reacción seleccionada o múltiple (*SRM/MRM*). Esta estrategia permitió la detección de los péptidos biomarcadores de estos parásitos en productos de la pesca en menos de 2 h. Paralelamente, Fæste *et al.* (2016) han aplicado también otros dos variantes diferentes de LC-MS/MS (sin marcajes o *label-free*, y con marcaje con isótopos estables o *stable isotope-assisted*) para la detección de proteínas de *A. simplex*, demostrando que los

péptidos correspondientes a 1) la hemoglobina, que es un alérgeno principal del parásito (Ani s 13), y 2) unas proteínas denominadas SXP/RAL-2, que están contenidas en los productos de excreción-secreción que libera la larva y que están implicadas también en las reacciones alérgicas a *Anisakis* (Ani s 5, Ani s 8 y Ani s 9), son altamente específicos de este género y, por tanto, pueden ser utilizados como biomarcadores del parásito en estos procedimientos. Los métodos empleados por estos últimos autores permitieron detectar entre 2 y 10 µg/mL de estos péptidos en matrices de carne de salmón contaminada intencionadamente con larvas del nematodo.

Obviamente, los condicionantes y limitaciones antes comentadas, junto con la laboriosa preparación de la muestra, el elevado coste del equipamiento empleado, y la elevada cualificación técnica que debería tener el personal encargado de realizar estos análisis, hacen que la aplicación de estas técnicas al control rutinario de la presencia de anisákidos en productos de la pesca sea completamente inviable a día de hoy.

## 6. Conclusiones

1. Las técnicas de inspección visual no destructivas que se recogen actualmente en las normativas relativas al control de parásitos en los productos de la pesca pueden ayudar a evitar la comercialización de productos con anisákidos visibles, pero no aseguran la ausencia de estos parásitos zoonóticos y, en especial, de los del género *Anisakis*, en la totalidad del producto. En consecuencia, es muy importante que se continúen aplicando las medidas de control térmico (congelación o cocción) recomendadas para la inactivación de estos nematodos antes del consumo.
2. Las técnicas de detección visual destructivas, para las cuales se están desarrollando las correspondientes normas ISO, deberían ser las técnicas de elección para estudiar la abundancia y distribución de las larvas de anisákidos en la musculatura de las diferentes especies de peces y/o comprobar la eficacia larvicida de diferentes procesados empleados en la industria pesquero-alimentaria.
3. Teniendo en cuenta a) las evidencias clínicas actuales que demuestran que la ingesta de larvas de *Anisakis* muertas no es suficiente para reproducir el cuadro alérgico en personas previamente diagnosticadas de alergia al parásito, b) la legislación actual relativa al control de parásitos en el pescado, y c) la sofisticación y elevado coste de los procedimientos que permiten la detección de proteínas o ácidos nucleicos de los anisákidos, la aplicación de estas técnicas al control rutinario de estos nematodos en los productos de la pesca, no sólo resulta innecesaria, sino que supondría un coste inabordable para el sector.

## 7. Bibliografía

- Adams, A. M., Murrell, K. D., Cross, J. H. (1997). Parasites of fish and risk to public health. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 16: 652–660.
- Adroher-Auroux, F. J., Benítez-Rodríguez, R. (2020). Anisakiasis and Anisakis: an underdiagnosed emerging disease and its main etiological agents. *Res. Vet. Sci.* 132: 535-545. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.003>.
- AECOSAN (2016). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a la alergia a *Anisakis*. AECOSAN-2016-004. *Rev. Comité Científico* 24: 23-33.
- Ángeles-Hernández, J. C., Gómez-de Anda, F. R., Reyes-Rodríguez, N. E., Vega-Sánchez, V., García-Reyna, P. B., Campos-Montiel, R. G., Calderón-Apodaca, N. L., Salgado-Miranda, C., Zepeda-Velázquez, A. P. (2020). Genera and species of the Anisakidae family and their geographical distribution. *Animals* 10, 2374. <https://doi.org/10.3390/ani10122374>.
- Arilla, M.C., Ibarrola, I., Martínez, A., Monteseirín, J., Conde, J., Asturias, J.A. (2008). An antibody-based ELISA for quantification of Anisakis s 1, a major allergen from *Anisakis simplex*. *Parasitology* 135: 1–6.
- Audicana, M.T., Del Pozo, M.D., Iglesias, R., Ubeira, F.M. (2003). *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens*, En: Learmonth, R. y Milliotis, M.D. (Eds.). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. New York, NY: Marcel Dekker, pp. 613-636.
- Bao, M., Pierce, G. J., Pascual, S., González-Muñoz, M., Mattiucci, S., Mladineo, I., Cipriani, P., Bušelić, I., Strachan, N. J. C. (2017a). Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: Anisakiasis. *Sci. Reports*, 7, 43699. <https://doi.org/10.1038/srep43699>
- Bao, M., Strachan, N.J., Hastie, L.C., MacKenzie, K., Seton, H.C., Pierce, G.J. (2017b). Employing visual inspection and magnetic resonance imaging to investigate *Anisakis simplex* sl infection in herring viscera. *Food Control* 75: 40–47.
- Bao, M., Pierce, G. J., Strachan, N. J. C., Pascual, S., González-Muñoz, M., Levsen, A. (2019). Human health, legislative and socioeconomic issues caused by the fish-borne zoonotic parasite *Anisakis*: Challenges in risk assessment. *Trends Food Sci. Technol.*, 86,: 298-310. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.013>.
- Bier, J.W., Jackson, G.J., Adams, A.M., Rude, R.A (2012). Chapter 19: Parasitic Animals in Foods. En: *FDA's Bacteriological Analytical Manual (BAM)*, ed. 8. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-19-parasitic-animals-foods>.
- Bouwknegt, M., Devleeschauwer, B., Graham, H., Robertson, L. J., van der Giessen, J. W., The Euro-Fbp Workshop Participants (2018). Prioritisation of food-borne parasites in Europe, 2016. *Euro Surveill.* 23:pii=17-00161. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.17-00161>.
- Buchmann, K., Mehrdana, F. (2016). Effects of anisakid nematodes *Anisakis simplex* (s.l.), *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) and *Contracaecum osculatum* (s.l.) on fish and consumer health. *Food Waterborne Parasitol.*, 4, 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.07.003>.
- Cammilleri, G., Ferrantelli, V., Pulvirenti, A., Drago, C., Stampone, G., Del Rocio Quintero Macias, G., Drago, S., Arcoleo, G., Costa, A., Geraci, F. (2020). Validation of a commercial loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Anisakis* spp. DNA in processed fish products. *Foods* 9, 92. <https://doi.org/10.3390/foods9010092>.
- Carballeda-Sangiao, N., Rodríguez-Mahillo, A. I., Careche, M., Navas, A., Moneo, I., González-Muñoz, M. (2016). Changes over time in IgE sensitization to allergens of the fish parasite *Anisakis* spp. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 10(7), e0004864. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004864>.
- Carrera, M., Gallardo, J.M., Pascual, S., González, A.F., 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: 130-37.
- Cipriani, P., Palomba, L., Giulietti, L., Bao, M., Mattiucci, S., Levsen, A. (2021). *Anisakis simplex* (s.s.) larvae (Nematoda: Anisakidae) hidden in the mantle of European flying squid *Todarodes sagittatus*



- (Cephalopoda: Ommastrephidae) in NE Atlantic Ocean: Food safety implications. *Int. J. Food Microbiol.* 339: 109021. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109021>.
- Cipriani, P., Sbaraglia, G., Paoletti, M., Giulietti, L., Bellisario, B., Palomba, L., Bušelić, I., Mladineo, I., Nascetti, G., Mattiucci, S. (2018).** The Mediterranean European hake, *Merluccius merluccius*: detecting drivers influencing the *Anisakis* spp. larvae distribution. *Fish. Res.* 202: 79-89.
- CXS 165-1989.** Norma para bloques de filetes de pescado, carne de pescado picada y mezclas de filetes y de carne de pescado picada congelados rápidamente. Adoptada en 1989, revisada en 1995, enmendada en 2011, 2013 y 2014.
- CXS 190-1995.** Norma para filetes de pescado congelados rápidamente. Adoptada en 1995, enmendada en 2011, 2013 y 2014 y revisada en 2017.
- CXS 244-2004.** Norma para el arenque atlántico salado y el espadín salado. Adoptada en 2004. Enmendada en 2011, 2013, 2016, 2018.
- CXS 311-2013.** Norma para el pescado ahumado, pescado con sabor a humo y pescado secado con humo. Adoptada en 2013, enmendada en 2016, 2018.
- Daschner, A., Cuéllar, C., Rodero, M. (2012).** The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help? *Trends Parasitol.* 28: 9-15.
- 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.
- Fæste, C.K., Moen, A., Schniedewind, B., Anonsen, J.H., 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.
- Fæste, C.K., Plassen, C., Løvberg, K.E., 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.
- Fang, W., Liu, F., Zhang, S., Lin, J., Xu, S., Luo, D. (2011).** *Anisakis pegreffii*: A quantitative fluorescence PCR assay for detection *in situ*. *Exp. Parasitol.* 127:587-592.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). (2014).** Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites: Microbiological Risk Assessment. 23. Roma, 302 pp.
- Godínez-González, C., Roca-Geronès, X., Cancino-Faure, B., Montoliu, I., Fisa, R. (2017).** Quantitative SYBR green qPCR technique for the detection of the nematode parasite *Anisakis* in commercial fish-derived food. *Int. J. Food Microbiol.* 261: 89–94.
- Godínez-González, C., Roca-Geronès, X., Montoliu, I., Fisa, R. (2020).** Estimation of the number of *Anisakis* larvae in commercial fish using a descriptive model based on real-time PCR. *J. Sci. Food Agric.* DOI 10.1002/jsfa.10718.
- Gómez-Morales, M. A., Castro, C. M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.12.011>.
- Herrador, Z., Daschner, Á., Perteguer, M. J., Benito, A. (2019).** Epidemiological scenario of anisakidosis in Spain based on associated hospitalizations: the tip of the iceberg. *Clin. Infect. Dis.* 69: 69-76. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy853>
- 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.
- Huang, W. (1990).** Méthodes de recherche des larves d'anisakidés dans les poissons marins. Possibilités d'application à l'inspection des poissons commercialisés en région parisienne. *Réc. Méd. Vet.* 166: 895–900.
- Iglesias, R., Martínez Sernández, V., Ubeira, F.M. (2015).** Aspectos básicos que deberíamos saber sobre *Anisakis*. En: II Curso de Alergia Alimentaria de origen animal (ALORA): Crustáceos, Pescados,

- Anisakis* y Algas. Auspiciado por la Universidad de Cádiz (UCA), Clínica Dr. Lobatón y Campus de excelencia internacional del mar (CEIMAR). Cádiz, 2-3 de Octubre de 2015.
- Jackson, G. J., Bier, J. W., Payne, W. L., McClure, F. D. (1981).** Recovery of parasitic nematodes from fish by digestion or elution. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 912-914.
- Karl, H., Leinemann, M. (1993).** A fast quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products. *Archiv. für Lebensmittelhygiene* 44: 105-128.
- Karl, H., Ostermeyer, U., Bauer, H., Miller, A., Mohn, K., Müller-Hohe, E., Neuhaus, H., Pölzelbauer, C., Stumme, B., Walter, M., Wernusch, J., Werth, B.M., Wittmann, C. (2014).** Collaborative study for quantification of *Anisakis* larvae in spiked salmon fillets (*Salmo salar*) by a modified Codex digestion method. *J. für Verbraucherschutz und Leb.* 9, 359–365. <https://doi.org/10.1007/s00003-014-0907-7>.
- Klapper, R., Karl, H., Ostermeyer, U. (2021).** Intrinsic properties of anisakid nematode larvae as a potential tool for the detection in fish products. *Int. J. Food Microbiol.* 343: 109094. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109094>.
- Kochanowski, M., Rózycki, M., Dąbrowska, J., Karamon, J., Sroka, J., Antolak, E., Betcik, A., Cencek, T. (2020).** Development and application of novel chemiluminescence immunoassays for highly sensitive detection of *Anisakis simplex* proteins in thermally processed seafood. *Pathogens* 9: 777. doi:10.3390/pathogens9100777.
- Levsen, A., Lunestad, B. (2010).** *Anisakis simplex* third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh. *Vet. Parasitol.*, 171: 247-253.
- Levsen, A., Lunestad, B., Berland, B. (2005).** Low detection efficiency of candling as a commonly recommended inspection method for nematode larvae in the flesh of pacific fish. *J. Food Protect.* 68: 828-832.
- Levsen, A., Maage, A. (2016).** Absence of parasitic nematodes in farmed, harvest quality Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway - Results from a large scale survey. *Food Control*, 68: 25-29.
- Levsen, A., Svanevik, C.S., Cipriani, P., Mattiucci, S., Gay, M., Hastie, L.C., Bušelić, I., Mladineo, I., Karl, H., Ostermeyer, U., Buchmann, K., Højgaard, D.P., González, Á.F., Pascual, S., Pierce, G.J. (2018).** A survey of zoonotic nematodes of commercial key fish species from major European fishing grounds — Introducing the FP7 PARASITE exposure assessment study. *Fish. Res.* 202: 4-21.
- Llarena-Reino, M., González, A., Vello, C., Outeiriño, 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., Piñeiro, C., Antonio, J., Outeiriño, L., Vello, C., González, A., Pascual, S. (2013).** Optimization of the pepsin digestion method for anisakis inspection in the fishing industry. *Vet. Parasitol.* 191:276-283.
- 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.
- Lunestad, B.T. (2003).** Absence of nematodes in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *J. Food Prot.* 66: 122–124.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2021).** Programa 9. *Anisakis*. Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2021-2025. [https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/planes-estrategias/plan-nacional-de-control-de-la-cadena-alimentaria/doc\\_4\\_pncoca\\_2021\\_2025\\_espana\\_tcm30-560783.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/planes-estrategias/plan-nacional-de-control-de-la-cadena-alimentaria/doc_4_pncoca_2021_2025_espana_tcm30-560783.pdf).
- 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., 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. <https://doi.org/10.1017/S0022149X1700027X>.

- McClelland, G. (2002).** The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. *J. Parasitol.* 124: 183-203.
- Moneo, I., Carballeda-Sangiao, N., González-Muñoz, M. (2017).** New perspectives on the diagnosis of allergy to *Anisakis* spp. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 17: 27. <https://doi.org/10.1007/s11882-017-0698-x>
- Pascual, S., Rodríguez, H., Pierce, G. J., Hastie, L. C., González, A. F. (2018).** The NE Atlantic European hake: A neglected high exposure risk for zoonotic parasites in European fish markets. *Fish. Res.* 202: 69-78.
- Pippy, J. (1970).** Use of ultraviolet light to find parasitic nematodes *in situ*. *J. Fish. Res. Board Can.* 27: 963–965. <https://doi.org/10.1139/f70-107>.
- Real Decreto 126/2015,** de 27 de febrero, por el que se aprueba la norma general relativa a la información alimentaria de los alimentos que se presenten sin envasar para la venta al consumidor final y a las colectividades, de los envasados en los lugares de venta a petición del comprador, y de los envasados por los titulares del comercio al por menor. BOE 54: 1-10 (texto consolidado).
- 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. BOE 302/2006: 1-4.
- Reglamento (CE) N° 2074/2005** de la Comisión, de 5 de diciembre de 2005, por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y para la organización de controles oficiales con arreglo a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, se introducen excepciones a lo dispuesto en el Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos (CE) N° 853/2004 y (CE) N° 854/2004. DOUE. L338: 27-59.
- 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. DOUE. L139: 55-205.
- Reglamento (UE) N° 1169/2011** del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) no 1924/2006 y (CE) no 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) no 608/2004 de la Comisión. DOUE L304: 18-63.
- Reglamento (UE) N° 1276/2011** de la Comisión, de 8 de diciembre de 2011, que modifica el anexo III del Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente al tratamiento para matar parásitos viables en los productos de la pesca destinados al consumo humano. DOUE. L327: 39-41.
- Rodríguez, H., Abollo, E., González, Á.F., Pascual, S. (2018).** Scoring the parasite risk in highly-valuable fish species from southern ICES areas. *Fish. Res.* 202: 134-139.
- Rodríguez-Mahillo, A.I., Gonzalez-Munoz, M., de las Heras, C., Tejada, M., Moneo, I. (2010).** Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle. *Foodborne Pathog. Dis.* 7: 967–973.
- Sánchez-Alonso, I., Rodríguez, S., Tejada, M., Navas, A., González-Muñoz, M., Careche, M. (2021).** The artificial digestion method underestimates the viability of *Anisakis simplex* (s.l.) L3 present in processed fish products. *Food Waterborne Parasitol.* 23: e00121. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2021.e00121>.
- Sivertsen, A.H., Heia, K., Hindberg, K., Godtliebsen, F. (2012).** Automatic nematode detection in cod fillets (*Gadus morhua* L.) by hyperspectral imaging. *J. Food Eng.* 111: 675–681.
- Tejada, M. (2011).** Principales problemas causados por los parásitos de pescado. Advanced Course on quality and safety assesment of fish and fishery products. Derio, 17-21 octubre. Disponible en. [http://marexi.com/wordpress/wp-content/uploads/2017/02/ikomargarita\\_tejada\\_fish\\_fishery\\_products3.pdf](http://marexi.com/wordpress/wp-content/uploads/2017/02/ikomargarita_tejada_fish_fishery_products3.pdf).

- Torres, P., Jercic, M. I., Weitz, J. C., Dobrew, E. K., Mercado, R. A. (2007).** Human pseudoterranovosis, an emerging infection in Chile. *J. Parasitol.* 93, 440-443. <https://doi.org/10.1645/GE-946R.1>.
- Valdimarsson, G., Einarsson, H., King, F. J. (1985).** Detection of Parasites in Fish Muscle by Candling Technique. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68: 549-551. <https://doi.org/10.1093/jaoac/68.3.549>.
- Werner, M.T., Fæste, C.K., 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.