

Original

# *Anisakis physeteris* y *Pseudoterranova decipiens* en el pez *Mugil Curema* comercializado en Tumaco, Colombia

Jennifer Castellanos G<sup>1,2\*</sup>  Ph.D; Rubén Mercado P<sup>3</sup>  Ph.D; Sebastián Peña F<sup>3</sup>  M.Sc;  
María Carolina Pustovrh R<sup>1</sup>  Ph.D; Liliana Salazar M<sup>1</sup>  M.Sc.

<sup>1</sup>Universidad del Valle, Facultad de Salud, Departamento de Morfología, Grupo de Investigación en Tejidos Blandos y Mineralizados, Cali – Colombia.

<sup>2</sup>Unidad Central del Valle, Facultad de Ingeniería, Tuluá, Colombia.

<sup>3</sup>Universidad de Chile, Facultad de Medicina, Unidad Docente de Parasitología, Santiago, Chile.

Correspondencia: [jenniffer.castellanos@correounivalle.edu.co](mailto:jenniffer.castellanos@correounivalle.edu.co)

Recibido: Octubre 2019; Aceptado: Febrero 2020; Publicado: Mayo 2020.

## RESUMEN

**Objetivo.** Identificar nematodos de la familia Anisakidae en el pez de consumo *Mugil curema*. **Materiales y métodos.** Para este estudio, se recolectaron 16 peces Lisa (*M. curema*) del puerto de Tumaco, una ciudad en la costa colombiana del Pacífico. La identificación morfológica de las larvas se realizó mediante taxonomía clásica y se calculó el porcentaje de infestación de larvas. Para la identificación molecular, se realizó una PCR múltiple con cebadores para las especies *Anisakis physeteris*, *Pseudoterranova decipiens*, *Anisakis simplex* sensu stricto, *Contracaecum osculatum*, *Hysterothylacium aduncum* y *Anisakis pegreffii*. **Resultados.** La revisión taxonómica permitió la identificación de larvas de tipo II del género *Anisakis* y larvas del género *Pseudoterranova*. Las larvas se aislaron principalmente del intestino, donde se encontró que el 94% de los peces estaban parasitados por nematodos anisakidos. La PCR multiplex permitió la identificación de la especie *A. physeteris* (Larva tipo II) y *P. decipiens*. **Conclusiones.** Este estudio es el primer reporte de nematodo Anisakidae en Tumaco, Colombia. Estos resultados proporcionan una justificación convincente para un estudio adicional sobre la familia Anisakidae en Colombia, como un problema de salud pública.

**Palabras clave:** Parásitos, alimentación humana, pesca artesanal, zoonosis. (*Fuente: Tesaurio ambiental para Colombia*).

## ABSTRACT

**Objective:** Identification nematodes Anisakidae family in *Mugil curema* fish. **Materials and methods:** For this study, 16 Lisa fish (*Mugil curema*) were obtained from the port of Tumaco, a city on the Colombian Pacific coast. Morphological identification of larvae was made by classical taxonomy and the percentage of larval infestation was calculated. For molecular identification, a multiplex PCR was carried out with primers for six species, *Anisakis physeteris*, *Pseudoterranova decipiens*, *Anisakis simplex* sensu stricto, *Contracaecum osculatum*, *Hysterothylacium aduncum* and *Anisakis pegreffii*.

### Como citar (Vancouver).

Castellanos GJA, Mercado PR, Peña FS, Pustovrh RM, Salazar ML. *Anisakis physeteris* y *Pseudoterranova decipiens* en el pez *Mugil Curema* comercializado en Tumaco, Colombia. Rev MVZ Córdoba. 2020; 25(2):e1781. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1781>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

*simplex sensu stricto*, *Contraecaecum osculatum*, *Hysterothylacium aduncum* and *Anisakis pegreffii*. **Results:** The taxonomic revision enabled the identification of type II larvae of the genus *Anisakis* and larvae of the genus *Pseudoterranova*. The larvae were isolated mainly from the intestine, where it was found that 94% of the fish were parasitized by anisakid nematodes. The multiplex PCR enabled the identification of the species *A. physeteris* (Larva type II), and *P. decipiens*. **Conclusions:** This study is the first report of nematode Anisakidae on Tumaco, Colombia. These results provide a compelling justification for further study into the Anisakidae family in Colombia, as a public health problem

**Keywords:** Parasites, human feeding, artisanal fishing, zoonoses. (Source: *Tesaurio agropecuario para Colombia*).

## INTRODUCCIÓN

El Pacífico colombiano, territorio continental, comprendido entre los límites fronterizos de la república de Panamá, en el norte, y Ecuador, en el sur, y entre el Océano Pacífico y la Cordillera Occidental, abarca una extensión aproximada de 71.000 km<sup>2</sup> (1). En la zona costera de esta región tienen jurisdicción los departamentos de Chocó, Valle del Cauca, Cauca y Nariño (1). Más del 90% de los 650.000 habitantes son afrodescendientes y se concentran en los cascos urbanos de los municipios de Buenaventura, Tumaco y Bahía Solano, donde también se congregan las principales actividades portuarias y comerciales de la región (1). Tumaco, ubicado al oeste del departamento de Nariño, limita con la república del Ecuador y tiene una población de 199.659 habitantes (DANE, Colombia, 2015). Las principales actividades económicas en Tumaco son la agricultura, la pesca y el turismo.

El puerto de Tumaco es considerado el segundo más importante en la costa del Pacífico en Colombia después del puerto de Buenaventura; para el año 2013, la exportación del atún entero en Tumaco fue U\$8.045.375 (2). Para esta región, el producto de la pesca es una de las principales fuentes de alimento proteico, estos productos son una fuente principal de proteínas para la población de la costa del Pacífico, un alimento que se ha promovido debido a los beneficios protectores para la salud que han identificado diferentes estudios, como en la prevención de enfermedades cardiovasculares (3,4,5,6). Sin embargo, el consumo de productos mínimamente procesados (crudo, semi crudo, en sushi, salazón, marinado) se pueden asociar a diferentes afecciones, causadas principalmente por la presencia de parásitos en los peces (3,7). Los nematodos de la familia Anisakidae son los de mayor importancia en salud pública, al ser los responsables de la anisakidosis, una enfermedad zoonótica reportada en las poblaciones costeras

de los cinco continentes (7,8,9,10,11,12,13,14), causada principalmente por los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova*, ocasionando cuadros gástricos, alérgicos o gastroalérgicos (15).

De las especies que conforman la familia Anisakidae, *A. simplex* es la especie que cuenta con el mayor número de registros de anisakiasis humana con cuadros alérgicos (16). Sin embargo, desde el año 2015 varias investigaciones han demostrado que *A. simplex* no es una sola especie, sino un complejo de tres especies hermanas, *A. simplex sensu stricto*, *A. simplex C* y *A. pegreffii*, quienes no presentan diferencias morfológicas entre sí, por lo que es necesario para su identificación realizar diagnóstico diferencial de ADN (17).

En Colombia estos patógenos son desconocidos por la mayoría del personal de salud, razón por la cual, puede existir un subregistro de la enfermedad (3,18).

En América, solo se conocen reportes de anisakidosis en Chile y Perú (10,19), mientras en Colombia, aunque no se han descrito casos de anisakidosis en humanos, investigaciones realizadas en el Mar Caribe y en Buenaventura han registrado la presencia *Contraecaecum* sp. y *Anisakis* sp. en peces de consumo (14,20,21). Aun que es importante destacar que la identificación taxonómica se ha realizado solo a nivel de género, por lo que es necesario profundizar en una caracterización a nivel de especie que permita conocer los anisakidos que circulan en aguas marítimas de Colombia para establecer una relación con las posibles enfermedades que pueden ocasionar.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue realizar la identificación a nivel de especie de las larvas de anisakidos encontradas en el pez de consumo *M. curema* de Tumaco; una especie de importancia económica para la región, siendo una de las principales fuentes de proteína para la

población y que en los últimos años ha reportado altos índices de captura por pesca artesanal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio.** Las muestras fueron colectadas en el puerto pesquero de Tumaco, en el departamento de Nariño, Colombia.

**Muestreos.** Los peces fueron suministrados por pescadores de la región; luego de almacenarse y etiquetarse se conservaron en nevera con hielo para su traslado. La revisión parasitológica se realizó en el Laboratorio de Histología en la Facultad de Salud de la Universidad del Valle en Cali, Colombia.

Las muestras obtenidas fueron revisadas en músculos y vísceras en búsqueda de nematodos anisakidos. Los parásitos obtenidos se colocaron en cajas de Petri con agua destilada; posteriormente se fijaron en formalina caliente al 4% (v/v) e inmediatamente se transfirieron a alcohol 96% (v/v) hasta su identificación por taxonomía y biología molecular.

**Identificación morfológica de nematodos.** Los nematodos fueron aclarados en soluciones graduales de glicerina. La observación de las estructuras internas se realizó bajo un microscopio óptico con cámara clara incorporada (Leica DM750). Se identificaron los nematodos de la familia Anisakidae hasta nivel de género. Los nematodos se fotografiaron con magnificaciones de 40x, 100x y 400x (Application Suite LAS V 3.8). Posteriormente, los anisakidos fueron separados por características morfológicas, contados, y se calculó el porcentaje de infección.

**Extracción de ADN.** Las larvas fueron cortadas en tres piezas. Se realizó la extracción individual de cada parte media de los nematodos utilizando el kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se eluyó en tampón de elución que se mantuvo a -20°C hasta su uso.

**Identificación por PCR convencional para larvas de la familia Anisakidae.** Para la PCR convencional, se utilizaron cebadores específicos forward diseñados para seis especies de anisakidos (22): *Anisakis physeteris* (Baylis, 1923) APY (5'-GGCTGGTTGATGAACTGTTG-3'), *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878) PD (5'-CGAGTACTTTTTATGGTCGTGAAGT-3'),

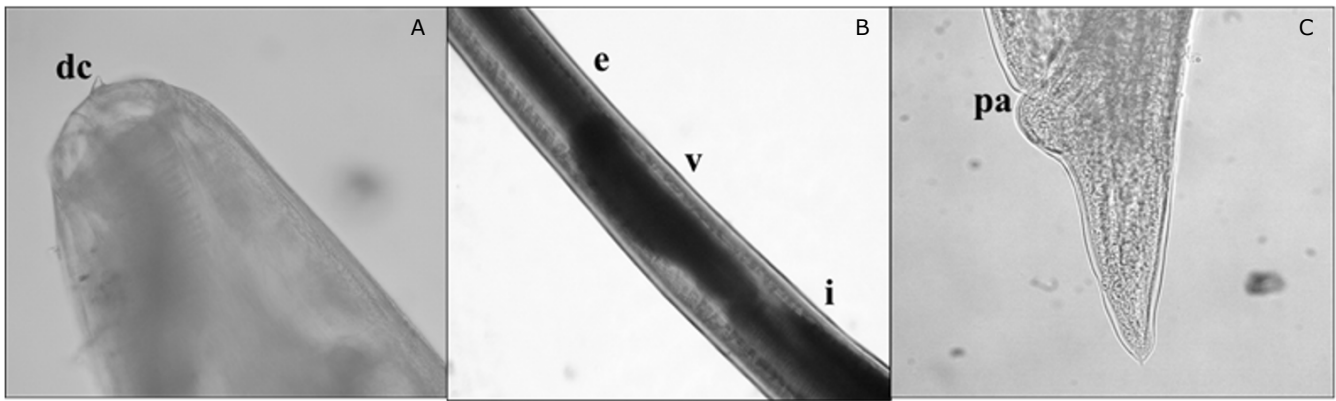
*Anisakis simplex* sensu stricto (Rudolphi, 1809) AC (5'-GACATTGTTATTTTCATTGTATGTGTTGAAAATG-3'), *Contracaecum osculatum* (Rudolphi, 1802) COS (5'-TGATATGCTTGAAAGGCAGG-3'), *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) HAD (5'-GCCTTCCATATGCGCGTATA-3') y para *Anisakis pegreffii* (Campana-Rouget & Biocca, 1955) se utilizaron dos cebadores APE1 (5'-GAGCAGCAGCTTAAGGCAGAGGC-3') y APE2 (5'-GAGCAGCAGCTTAAGGCAGATGC-3'). Como cebador reverse se utilizó uno de tipo universal B (5'-GCCGGATCCGAATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCT-3') (Integrated DNA Technologies, USA).

**Identificación por PCR multiplex.** Se realizaron las PCRs, utilizando un volumen final de reacción 25µl: 9.38 µl de agua grado PCR; 2.5 µl de buffer PCR (10X HotMaster™ Taq 10X Reaction Buffer, 5PRIME, USA); 0.63 µl de mezcla de dNTPs (0.2 mM c/u 10mM dNTPs RBC Bioscience, USA), 1 µl por cada cebador específico (2 ng/µl), 0.5 µl de enzima polimerasa (5 U/µl HotMaster™ Taq DNA Polymerase, 5PRIME, USA) y ADN genómico (5 µl). El programa del termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA) consistió en 30 ciclos de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación a 52°C durante 30 s, extensión a 72°C durante 45 s, y una extensión final a 72°C durante 7 min. Todos los productos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, USA) visualizado por tinción con Gel-Red® (Biotium Inc., USA). Como control positivo se utilizó ADN genómico de larvas L3 de *A. simplex*, *A. pegreffii* y *P. decipiens*, suministradas por el Dr. Hiroshi Yamasaki del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Tokyo, Japón.

Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Revisión de Ética con Animales en Experimentación de la Universidad del Valle. Numero de Referencia 004-015.

## RESULTADOS

Se colectaron un total de 16 peces lisa (*M. curema*) de los cuales 15 se encontraban parasitados por nematodos anisakidos, para un porcentaje de infección del 94%. Las características morfológicas permitieron la identificación de los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova*, ambos de la familia Anisakidae, siendo el género *Anisakis* con un 90%, el más representativo.



**Figura 1.** Larva (L3) tipo II de la familia *Anisakidae*.

**A.** Extremo anterior, dc: diente cuticular. (40x) **B.** Parte media, e: esófago, v: ventrículo, i: intestino (20x). **C.** Extremo posterior con terminación cónica, pa: poro anal (40x).

Al microscopio óptico se lograron identificar larvas del género *Anisakis* en estadio (L3) con morfología de larva tipo II, larvas presentaron características propias del género *Anisakis*, como el color blanquecino con estrías transversales cuticulares a lo largo de todo el cuerpo más pronunciadas en el extremo posterior, con una boca bien formada compuesta por tres labios rodeando el diente cuticular (Figura 1A), el ventrículo se observó alargado con una unión directa al intestino y organización recta a lo largo del eje longitudinal del nematodo (Figura 1B) y con un extremo posterior en terminación cónica y ausencia de mucrón (Figura 1C).

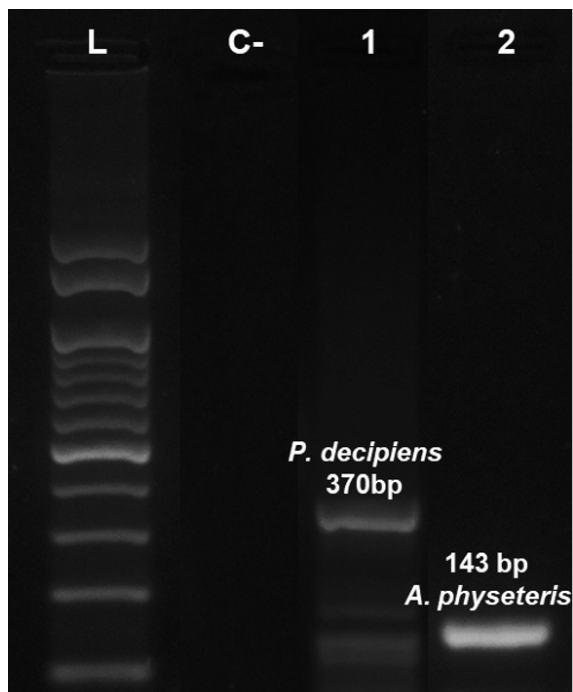
La identificación por PCR múltiplex permitió identificar las especies *A. physeteris* y *P. decipiens* parasitando el pez *M. curema*. Los partidores específicos fueron capaces de detectar *P. decipiens* con un producto de amplificación de peso esperado de 370 pb, y *A. physeteris* con un peso de 143 pb (Figura 2).

## DISCUSIÓN

El pez Lisa (*M. curema*), de la familia Mugilidae se distribuye ampliamente en el Océano Pacífico, desde la costa de California en los Estados Unidos hasta el sur de Chile (22). Esta especie habita en aguas costeras y estuarinas; por su tipo de alimentación, varios autores la han clasificado como detritívora, iliófaga, herbívora, omnívora y fitófaga (23), comportamientos alimentarios que favorecen las infecciones por parásitos y es así como los Mugílidos constituyen la familia de peces con mayor número de reportes de anisakidos (17,21,22,23,24,25,26).

En el presente estudio hemos confirmado la presencia de larvas de tercer estadio (L3) de nematodos anisakidos en este tipo de pez capturado en aguas del Pacífico Colombiano; los peces presentaron un alto porcentaje de infección para nematodos de la familia Anisakidae. Las larvas L3 de *Anisakis* son consideradas el agente etiológico de la anisakiasis humana causada por el consumo de peces o mariscos poco cocidos e infestados por nematodos anisakidos (27).

La identificación de las larvas L3 fue realizada con base en las características estructurales del ventrículo y la forma de la porción terminal de las larvas (28). Estas mismas características morfológicas fueron observadas en otros estudios



**Figura 2.** Identificación molecular de nematodos anisakidos por PCR Multiplex. Línea L: marcador de peso molecular de 100 pb. Line 1: 370 bp, *P. decipiens* (*M. curema*). Line 2: 143 bp, *A. physeteris* (*M. curema*).

usando microscopia de luz, y confirmados por microscopía electrónica de barrido (SEM) (27,29,30).

Estudios recientes de anisakidos en peces del género *Mugil* en Colombia, en el año 2017 nuestro grupo registró nematodos del género *Anisakis* en peces de consumo en el Océano Pacífico (14,20,21); por otro lado, en la costa del Caribe Colombiano, se encontraron los géneros *Contracaecum* y *Pseudoterranova* en el pez *M. incilis* comercializado en aguas de la bahía de Cartagena en el Océano Atlántico (23,25,31); sin embargo, en estas investigaciones las larvas de anisakidos solo fueron identificadas a nivel de género, por lo que este estudio constituye la primera identificación a nivel de especie de los nematodos anisakidos presentes en peces de consumo en la costa Pacífica colombiana.

Para la identificación de las especies de anisakidos se han desarrollado varios métodos tales como, PCR-RFLP, la secuencia del gen rRNA o ADN mitocondrial. Estas técnicas se han utilizado con éxito para la identificación de especies hermanas de *A. simplex*. No obstante, requieren de equipo altamente especializado y de materiales y reactivos de alto costo; por lo tanto, para alcanzar el objetivo propuesto en esta investigación, se desarrolló la PCR multiplex propuesta por Umehara et al (22) la cual fue adaptada para la identificación de diferencias de larvas de anisakidos, una alternativa a los métodos convencionales. Esta técnica puede ser utilizada en regiones que cuenten con laboratorio básico de biología molecular y así realizar un diagnóstico rápido de alta sensibilidad y especificidad para el reconocimiento de las especies de anisakidos, principalmente en muestras donde las larvas han sido cortadas o deterioradas y no es posible la identificación a nivel de género mediante características morfológicas. Este método permitió identificar los nematodos *A. physeteris*, y *P. decipiens* parasitando el pez *M. curema*; sin embargo, se debe tener en cuenta que el uso de otras técnicas moleculares como la secuenciación pueden confirmar o variar estos resultados, ya que estos parásitos son un complejo de especies y su taxonomía cambia constantemente.

Identificar además del género, la especie de anisakido, en este caso *A. physeteris* y *P. decipiens*, posibilitan una mejor aproximación diagnóstica en los casos de infecciones de sistema gastrointestinal. Estudios previos

reportados en Chile, Venezuela y en Perú, demostraron la presencia de *P. decipiens* en lisa (*M. curema*) asociados a casos de anisakidosis y la misma especie (*P. decipiens*) en el pez *Mugil* sp. fue relacionada a casos de infección gástrica en Chile (3,8,10,19,24,32,33).

La distribución geográfica de los anisakidos está bien documentada; siendo el género *Anisakis* el más prevalente en el Mediterráneo y *Pseudoterranova* en el Atlántico nororiental. Sin embargo, no se conocen registros para el norte del Océano Pacífico (34,35), por lo tanto, estos resultados constituyen el primer reporte de las especies *A. physeteris* y *P. decipiens* en Colombia, contribuyendo de esta forma a complementar los estudios de distribución geográfica de estos nematodos a nivel mundial (34,35).

Con la confirmación de anisakidos en peces de consumo de Tumaco es importante llamar la atención sobre los factores de riesgo que tiene esta población frente a esta parasitosis poco reconocida por el personal de salud, ya que la pesca artesanal es la mayor fuente de alimentos y ocupa el tercer puesto como su fuente de ingresos. Factores como la condición de pobreza crítica con déficits en el sistema de salud, una tasa de analfabetismo del 16%, la falta de sistemas de acueducto y alcantarillado en los hogares de los pescadores contribuyen a los bajos niveles de higiene en estas poblaciones, afectando tanto su propia salud como los niveles de higiene en el manejo de los peces (36).

Al analizar la producción a gran escala, se deben garantizar instalaciones de procesamiento higiénicas selladas con servicios de muelle adecuados y sistemas de enfriamiento en el puerto de Tumaco para garantizar el envío higiénico de los productos de la pesca al interior del país. Si no se proporciona esta infraestructura, se favorece la supervivencia de los parásitos patógenos, como las larvas de anisakidos (14). Es probable que las prácticas antihigiénicas se reflejen en el registro de enfermedades para el departamento del Valle del Cauca en 2016, donde las enfermedades documentadas transmitidas por alimentos específicamente asociadas con el consumo de pescado y mariscos fueron del 3.5% (1). Sin embargo, ciertamente hay un subregistro significativo en relación con las causas específicas de muchas enfermedades gastrointestinales.

Apoyados en el presente estudio y en reportes anteriores para Colombia se hace evidente la necesidad de que las entidades de Salud en conjunto con la industria pesquera elaboren planes de capacitación, diagnóstico y planes de prevención para el control de enfermedades relacionadas con anisakidos en la región costera del Pacífico colombiano.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

### Agradecimientos

A COLCIENCIAS (Departamento de Ciencia, Tecnología e Innovación - Convocatoria 567), los pescadores del puerto de Tumaco, el laboratorio de Histología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. A la Agencia de Cooperación Internacional de Chile y la beca Alianza del Pacífico por los fondos para que Jenniffer Castellanos realizara estudios de biología molecular en la Universidad de Chile. Al Dr. Hiroshi Yamasaki, del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Tokio, Japón, por donar controles para la biología molecular y al Dr. Shozo Ozaki, de Virginia Commonwealth University, por compartir su experiencia en parasitología

## REFERENCES

1. Cobos-Otalora AJ, Caro Galvis N, Daiz Fahrenberger A, et al. La pesca artesanal en el norte del Pacífico colombiano: Un horizonte ambivalente. Diaz Merlano JM, Guillot Illidge L, Velandia Diaz MC, (eds). Colombia; Editora 3 Ltda: 2016. Available from: [http://marviva.net/sites/default/files/documentos/la\\_pesca\\_artesanal\\_final\\_web.pdf](http://marviva.net/sites/default/files/documentos/la_pesca_artesanal_final_web.pdf)
2. Camara de Comercio. Estudios Economicos - Municipio de Tumaco Nariño. Promotora de desarrollo rural Tumaco; 2015. 1 - 33p. Available from: <http://www.cctumaco.org/descargas/category/42-boletines-anuales.html?download=1428:estudios-economicos-2015-sic>
3. Tuemmers C, Nuñez C, Willgert K, Serri M. Anisakiasis y Difilobotriasis . Ictiozoonosis de riesgo para la salud pública asociada al consumo del pescado crudo en Chile. Rev la Univ del Zulia. 2014; 5(11):27–39. URL Disponible en: <https://issuu.com/revistadelauniversidaddelzulia/docs/rev-luz-11-5-2014-completa> I
4. Kris-Etherton PM, Richter CK, Bowen KJ, Skulas-Ray AC, Jackson KH, Petersen KS, et al. Recent Clinical Trials Shed New Light on the Cardiovascular Benefits of Omega-3 Fatty Acids. Methodist Deakey Cardiovasc J. 2019; 15(3):171–8. <https://doi.org/10.14797/mdcj-15-3-171>
5. Yu E, Malik VS, Hu FB. Reprint of: Cardiovascular Disease Prevention by Diet Modification: JACC Health Promotion Series. J Am Coll Cardiol. 2018; 72(23):2951–63.: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.10.019>
6. Lăcătușu CM, Grigorescu ED, Floria M, Onofriescu A, Mihai BM. The mediterranean diet: From an environment-driven food culture to an emerging medical prescription. Int J Environ Res Public Health. 2019; 16(6):1-16. <https://doi.org/10.3390/ijerph16060942>
7. Maniscalchi-Badaoui MT, Lemus-Espinoza D, Marcano Y, Nounou E, Zacarias M, Narvaez N. Larvas Anisakidae en peces del genero *Mugil* comercializados en mercados de la region costera nor-oriental e insular de Venezuela. Saber, Univ Oriente, Venez. 2015; 27(1):30–38. URL Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-01622015000100005](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622015000100005)

8. Torres-Frenzel P, Torres P. Anisakid Parasites in Commercial Hake Ceviche in Southern Chile. *J Food Prot.* 2014; 77(7):1237–1240. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-538>
9. Valle J, Lopera E, Sánchez ME, Lerma R, Ruiz JL. Spontaneous splenic rupture and *Anisakis* appendicitis presenting as abdominal pain: a case report. *J Med Case Rep.* 2012; 6:114 <https://doi.org/10.1186/1752-1947-6-114>
10. Weitzel T, Sugiyama H, Yamasaki H, Ramirez C, Rosas R, Mercado R. Human infections with *Pseudoterranova cattani* nematodes, Chile. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(10):1874–1875. <https://doi.org/10.3201/eid2110.141848>
11. Colombo F, Cattaneo P, Castelletti M, Bernardi C. Prevalence and Mean Intensity of Anisakidae Parasite in Seafood Caught in Mediterranean Sea Focusing on Fish Species at Risk of Being Raw-consumed. A Meta Analysis and Systematic Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015; 56(9):1405–1416. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.755947>
12. Isabel M, Azevedo N Di, Iñiguez AM. Nematode parasites of commercially important fish from the southeast coast of Brazil : Morphological and genetic insight. *Int J Food Microbiol.* 2018; 267:29–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.014>
13. Detha AIR, Wuri DA, Almet J, Riwu Y, Melky C. First report of *Anisakis* sp. in *Epinephelus* sp. in East Indonesia. *J Adv Vet Anim Res.* 2018; 5(1):88–92. <http://doi.org/10.5455/javar.2018.e241>
14. Castellanos JA, Santana-Piñeros AM, Mercado R, Peña S, Pustovrh C, Cruz-Quintana Y. Presence of anisakid larvae in commercial fishes landed in the Pacific coast of Ecuador and Colombia. *Infectio.* 2018; 22(4):206–212. <http://dx.doi.org/10.22354/in.v22i4.739>
15. Prester L. Seafood Allergy, Toxicity, and Intolerance: A Review. *J Am Coll Nutr.* 2016; 35(3):271–283. <https://doi.org/10.1080/07315724.2015.1014120>
16. Anadon AM, Romaris F, Escalante M, Rodriguez E, Garate T, Cuellar C. The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156(3):471–478. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03919.x>
17. Cipriani P, et al. Genetic identification and distribution of the parasitic larvae of *Anisakis pegreffii* and *Anisakis simplex* (s.s.) in European hake *Merluccius merluccius* from the Tyrrhenian Sea and Spanish Atlantic coast: Implications for food safety. *Int J Food Microbiol.* 2015; 198:1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.019>
18. Castellanos JA, Santana-piñeros AM, Mercado R, Peña S. Presence of anisakid larvae in commercial fishes landed in the Pacific coast of Ecuador and Colombia. *Infectio.* 2018; 22(4):206–212. <http://dx.doi.org/10.22354/in.v22i4.739>
19. Cabrera R. Anisakiasis outbreak by anisakis simplex larvae associated to Peruvian food in Spain. *Rev Esp Enfermedades Dig.* 2010; 102(10):610–611. <https://doi.org/10.4321/S1130-01082010001000011>
20. Castellanos JA, Tangua AR, Salazar L. Anisakidae nematodes isolated from the flathead grey mullet fish (*Mugil cephalus*) of Buenaventura, Colombia. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2017; 6:265–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.08.001>
21. Castellanos JA, Tangua AR, Mercado R, Salazar L. First reporting of *Anisakis* sp. in the *Armed Snook* fish (*Centropomus armatus*) caught and commercialized in Buenaventura, Colombia. *Infectio.* 2018; 22(3):136–140. <https://doi.org/10.22354/in.v22i3.724>
22. Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitol Int.* 2008; 57(1):49–53. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.08.003>

23. Bustos-Montes D, Santafé-Muñoz A, Grijalba-Bendeck M, Jáuregui A, Franco-Herrera A, Sanjuan-Muñoz A. Bioecología de la lisa (*Mugil incilis* Hancock) en la bahía de Cispatá, Caribe colombiano. Bol Invest Mar Cost. 2012; 41(2):447–461. <http://boletin.invemar.org.co/index.php/boletin/article/view/96>
24. Maniscalchi Badaoui MT, Lemus-Espinoza D, Marcano Y, Nounou E, Zacarías M, Narváez N. Larvas Anisakidae en peces del género *Mugil* comercializados en mercados de la región costera nor-oriental e insular de Venezuela. Saber, Univ Oriente, Venez. 2015; 27(1):30–38. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-01622015000100005](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622015000100005)
25. Ruiz L, Vallejo A. Parámetros de infección por nematodos de la familia Anisakidae que parasitan la lisa (*Mugil incilis*) en la Bahía de Cartagena (Caribe colombiano). Intropica. 2013; 8(1):53–60. <http://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/732>
26. Olivero V J, Arroyo S B, Manjarrez P G. Parasites and hepatic histopathological lesions in lisa (*Mugil incilis*) from totumo mash, north of colombia. Rev MVZ Cordoba. 2013; 18(1):3288–3294. <https://doi.org/10.21897/rmvz.190>
27. Morsy K, Badr AM, Abdel-Ghaffar F, Deeb S El, Ebead S. Pathogenic potential of fresh, frozen, and thermally treated *Anisakis* spp. Type II (L3) (Nematoda: Anisakidae) after oral inoculation into wistar rats: A histopathological study. J Nematol. 2017;49(4):427–36. <https://journals.flvc.org/jon/article/view/105495> [PMC5770291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35770291/)
28. Murata R, Suzuki J, Sadamasu K, Kai A. Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. Parasitol Int. 2011; 60(2):193–198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.02.008>
29. Borges JN, Cunha LFG, Santos HLC, Monteiro-Neto C, Santos CP. Morphological and molecular diagnosis of anisakid nematode larvae from cutlassfish (*Trichiurus lepturus*) off the coast of Rio de Janeiro, Brazil. PLoS One. 2012; 7(7):e40447. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040447>
30. Molina-Fernández D, Adroher FJ, Benítez R. A scanning electron microscopy study of *Anisakis physeteris* molecularly identified: from third stage larvae from fish to fourth stage larvae obtained in vitro. Parasitol Res. 2018; 117(7):2095–103. DOI: [10.1007/s00436-018-5896-5](https://doi.org/10.1007/s00436-018-5896-5)
31. Olivero VJ, Caballero-Gallardo K, Arroyo-Salgado B. Nematode infection in fish from Cartagena Bay, North of Colombia. Vet Parasitol. 2011; 177(1–2):119–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.016>
32. Bracho-Espinoza H, Molina JD, Pirona M, Milagro C. Nematodos de la Familia Anisakidae en productos de la pesa, faja contera medano blanco, estado Falcon, Venezuela. Rev Cient FCV-LUZ. 2013; 23(2):163–167. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95926276011>
33. Espinoza-Bracho H. Prevalence of parasitism by *Anisakis* in a sample of fish caught in coastline of the Golfete of Coro, Venezuela. Sci J Public Heal. 2014; 2(6):513–515. <http://dx.doi.org/10.11648/j.sjph.20140206.12>
34. Kuhn T, García-Màrquez J, Klimpel S. Adaptive radiation within marine anisakid nematodes: A zoogeographical modeling of cosmopolitan, zoonotic parasites. PLoS One. 2011; 6(12):e28642. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028642>
35. Quiazon KMA, Yoshinaga T, Ogawa K. Distribution of *Anisakis* species larvae from fishes of the Japanese waters. Parasitol Int. 2011; 60(2):223–226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.03.002>
36. Kleter GA, Prandini A, Filippi L, Marvin HJP. Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by the European Community 's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) during a four-year period. Food Chem Toxicol. 2009; 47(5):932–950. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.12.022>