



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LARVAS DE
TERCER ESTADIO DE *ANISAKIS* SPP. (NEMATODA:
ANISAKIDAE) PARÁSITAS DE LA TRUCHA
ARCOÍRIS *ONCORHYNCHUS MYKISS* WALBAUM,
1792 DEL ESTADO DE OREGON, EUA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G A
P R E S E N T A :**

ZURYA DÍAZ GONZÁLEZ GÓMEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ALEJANDRO FRANCISCO OCEGUERA
FIGUEROA
2018**

Ciudad Universitaria, CDMX.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Díaz González
Gómez
Zurya
56 74 22 20
Universidad Nacional Autónoma
de México
Facultad de Ciencias
Biología
308254763

2. Datos del tutor.

Dr.
Alejandro Francisco
Oceguera
Figueroa

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Rosario
Mata
López

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
María Berenit
Mendoza
Garfias

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Alejandro Francisco
Oceguera
Figueroa

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
David
Osorio
Sarabia

7. Datos del sinodal 5

Dr.
Daniel Sokani
Sánchez
Montes

8. Datos del trabajo escrito

Identificación molecular de larvas
de tercer estadio de *Anisakis* spp.
(Nematoda: Anisakidae) parásitas
de la trucha arcoíris
Oncorhynchus mykiss Walbaum,
1792 del estado de Oregon, EUA.
60 p.
2018

“Memento Homo, quia pulvis es, et in pulverem reverteris”

Se calcula que las hormigas de la Tierra pesan lo mismo que la humanidad., si desaparecieran se produciría un fenómeno ligado a la extinción, mucho más dramático que el meteorito que acabó con los dinosaurios. En cambio, si se extinguiera la especie humana en términos ecológicos no pasaría nada.

Las personas no aportamos ya nada a los ecosistemas, sólo gastamos, somos los más grandes consumidores y sin embargo nadie nos consume.

¿Oh si?, es el latido de la vida, es el latido de Gaia.

El latido de Gaia, Gaia III

De todos los animales de la creación, el hombre es el único que bebe sin tener sed, come sin tener hambre y habla sin tener nada que decir. Por eso es mejor forjar el alma que amueblarla.

Prólogo, Finisterra ópera rock

Durante miles de años los seres humanos hemos podido disfrutar del mejor regalo que los dioses dieran jamás a ningún ser vivo: la brisa, el viento, el hermano Sol y la hermana Luna, campos y praderas donde ver crecer a nuestros hijos, amaneceres bañados con el perfume que estornudan las flores en primavera, puestas de sol decoradas con los sueños aún por conseguir y aunque parezca mentira, inteligencia. Pero el hombre blanco despreció aquel tesoro, y a medida que la vida le sonreía, él le contestaba dando patadas al destino.

Si alguien lee esta carta, no olvide que el fin de esta civilización se debió al egoísmo, codicia e incultura de la raza humana. Los hombres ya no somos mamíferos, el ser humano no se convirtió en depredador; la raza humana somos simplemente un virus, matamos, crecemos y nos multiplicamos.

Por eso nos extinguimos, por eso las aguas se tragaron nuestra civilización: la verdadera Atlántida éramos nosotros.

Y por eso dejo escrita esta nota, para formas de vida inteligente venideras. Cuando los hombres escupen al suelo... se escupen a sí mismos.

Atlantia, Gaia III

Cuanto más he de esperar,
cuánto más he de buscar,
para poder encontrar
la luz que sé que hay en mí.

He vivido en soledad
rodeado de multitud,
nunca he conseguido amar
pues no me quiero ni yo.

Cuando veas una estrella fugaz
guárdala en tu corazón,
es el alma de alguien que consiguió
dar a los suyos su amor.

Cuando oigas a un niño preguntar
por qué el sol viene y se va,
dile: porque en esta vida no hay
luz sin oscuridad.

Si eres capaz de devolver
con una sonrisa una traición,
si eres capaz de dar tu mano a quien
con la suya te señaló.

No eches raíces en un sitio, muévete
pues no eres un árbol, para eso tienes dos pies.
El hombre más sabio es el que sabe que su hogar
es tan grande como pueda imaginar.

El mejor día es en el que el alma
tiene hambre y sed.
No olvides lo aprendido, no dejes de comprender,
rodéate de buenos y tú lo parecerás.
Rodéate de sabios y algo en ti se quedará.



*Gracias a todos los que me han acompañado y a los que
seguirán conmigo por el camino de baldosas amarillas...*



	Página
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	2
a) Enfermedades parasitarias transmitidas por los alimentos.....	2
b) Ictiozoonosis causada por <i>Anisakis</i>	3
c) Phylum Nematoda.....	4
d) Familia Anisakidae Railliet y Henry, 1912.....	4
e) Características del género <i>Anisakis</i>	5
Morfología.....	5
Ciclo de vida.....	7
Clasificación.....	9
Distribución geográfica.....	10
Biología del hospedero (Trucha arcoíris).....	11
Ciclo de vida.....	11
Hábitat y distribución.....	12
g) Taxonomía molecular.....	13
h) Análisis filogenéticos.....	14
II. JUSTIFICACIÓN	16
III. OBJETIVO	17
a) General.....	17
b) Particular.....	17
IV. ÁREA DE ESTUDIO	18
a) Criadero Cedar Creek.....	18
V. MÉTODO	19
a) Recoleta de ejemplares	19
b) Procesamiento de los ejemplares.....	19
Análisis morfológico.....	19
Extracción de DNA, amplificación y secuenciación de los genes COI y COII.....	20
Edición, alineamiento y análisis de secuencias.....	21
Inferencia de árboles filogenéticos.....	22
Diversidad haplotípica.....	22
VI. RESULTADOS	23
a) Análisis morfológico.....	23
b) Morfometría.....	26
c) Análisis molecular.....	26
COI.....	26
COII.....	29
VII. DISCUSIÓN	31
VIII. CONCLUSIONES	34
IX. LITERATURA CITADA	35
X. ANEXOS	43

ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y ANEXOS

FIGURAS

Fig.	Página
1	Características morfológicas de larvas en estadio L3 de la familia Anisakidae..... 5
2	Características morfológicas de la larva en estadio L3 del género <i>Anisakis</i> 6
3	Diferencia entre dos larvas tipo I..... 6
4	Ciclo de vida de <i>Anisakis</i> spp..... 8
5	Fenograma con base en secuencias de ADNmt de COII del género <i>Anisakis</i> 9
6	Mapa de la distribución cosmopólita de las especies del género <i>Anisakis</i> 10
7	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Trucha arcoíris)..... 11
8	Ciclo de vida de la trucha arcoíris..... 12
9	Principales países productores de trucha arcoíris..... 12
10	Criadero Cedar Creek 18
11	Fotografías de microscopia óptica (40X) de <i>A. simplex</i> s.s..... 23
12	Fotografías de MEB de la región anterior de <i>A. simplex</i> s.s..... 24
13	Fotografías de MEB de la región posterior de <i>A. simplex</i> s.s..... 25
14	Cladograma de consenso estricto de COI..... 28
15	Cladograma de consenso estricto de COII..... 30

CUADROS

Cuadro	Página
1	Características de las matrices de COI y COII..... 21
2	Medidas morfométricas en mm obtenidas del anexo 6..... 26
3	Resultados del análisis de Haplotipos para COI..... 27
4	Análisis de Haplotipos realizado para COII..... 29

ANEXOS

Anexo	Página
1	Distribución mundial de las especies de <i>Anisakis</i> y sus hospederos definitivos..... 43
2	Análisis de BLAST para las secuencias de COI..... 45
3	Análisis de BLAST para las secuencias de COII..... 46
4	Lista de las secuencias obtenidas de GenBank para COI..... 46
5	Lista de las secuencias obtenidas de GenBank para COII..... 49
6	Medidas morfométricas de las L3..... 52

RESUMEN

Debido a la globalización en el consumo de pescado crudo en el mundo, principalmente en Japón y Norteamérica, se han incrementado los casos de anisakiasis -ictiozoonosis originada por la ingesta de larvas de tercer estadio (L3) de nematodos del género *Anisakis*-. Este género de nematodos pertenece a la familia Anisakidae y la clasificación e identificación de sus estadios larvales, es complicada debido a la ausencia de caracteres morfológicos que permitan distinguir a las especies. Para solventar esta dificultad, el uso de la taxonomía molecular (Secuencias de DNA) se ha popularizado, particularmente para la identificación a nivel de especie. En este estudio se colectaron L3 de *Anisakis*, parásitos de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el criadero Cedar Creek, en el estado de Oregón, EUA. Las larvas obtenidas fueron estudiadas bajo el microscopio óptico y con ayuda del microscopio electrónico de barrido, adicionalmente se tomaron datos morfométricos. Además, se realizaron análisis de secuencias de los genes mitocondriales Citocromo oxidasa subunidad I (COI) y subunidad II (COII) del ADN mitocondrial, debido a que estos presentan la variación suficiente para permitir diferenciar entre las especies de animales y presentan una mayor tasa de mutación en comparación con otros marcadores moleculares. Se hicieron análisis filogenéticos utilizando el criterio de parsimonia, también se calculó la diversidad haplotípica y se elaboraron redes haplotípicas. Para ambos marcadores, los árboles de consenso estricto tuvieron una topología similar en los cuales las secuencias aquí generadas se agruparon con las de *Anisakis simplex* sensu stricto, con una distancia genética baja y una alta diversidad haplotípica.

Palabras clave: *Anisakis simplex* s.s., L3, COI, COII, ictiozoonosis

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

a) Enfermedades parasitarias transmitidas por los alimentos

Debido a que la forma de vida parasitaria ha surgido en un elevado número de taxa de manera independiente, estimándose que esto ha ocurrido independientemente en 223 ocasiones dentro de los animales (Weinstein & Kuris, 2016), es por lo que los parásitos constituyen un grupo no monofilético cuya diversidad de especies no puede estimarse con precisión (Pérez-Ponce de León et al., 2001a). Los parásitos viven dentro o sobre otros organismos (hospederos) y a expensas de éstos. La diversidad de parásitos presentes en un hospedero depende de varios factores bióticos y abióticos interrelacionados, por lo que el estudio de la relación parásito-hospedero puede aportar una nueva dimensión al entendimiento de las interacciones ecológicas, los patrones de distribución y la compleja historia evolutiva de muchas regiones y biotas (Pérez-Ponce de León et al., 2001b). Los parásitos han estado relacionados con el hombre desde su origen y han mantenido una estrecha relación evolutiva, prueba de esto son los helmintos encontrados en los restos antropológicos que evidencian que las zoonosis han estado presentes en toda la historia humana (Sianto et al., 2009).

Las zoonosis se definen como las enfermedades que ocurren en los animales y son transmitidas al hombre en condiciones naturales (Palmer et al., 1998). Existen registros de que aproximadamente 380 especies de parásitos que causan zoonosis (Crompton & Savioli, 2006), de las cuales cerca de 200 son transmitidas al hombre a través del consumo de los alimentos (Bryan, 1982; Mead et al., 1999). Por ejemplo en los Estados Unidos, los parásitos que normalmente se adquieren por ingesta son protozoarios como *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*, cestodos como *Diphyllobothrium* spp. y *Taenia* spp., o nematodos como *Trichinella* spp., y *Anisakis* spp. (CDC, 2016; Quijada, 2005; Shaw, 1947; Tuemmers et al., 2015).

Dentro de las zoonosis adquiridas por la ingestión de alimentos, las causadas por el consumo de pescado crudo son denominadas ictiozoonosis, siendo particularmente relevantes debido a su importancia biológica, médica-veterinaria y económica (Pérez-Ponce de León et al., 2012; Quijada et al., 2005). Recientemente, el aumento en el consumo de pescado crudo a nivel mundial, en forma de ceviche o sushi (del japonés 鮨 o 寿司 traducido como “gobernar la felicidad”), ha propiciado un aumento en el número de casos de ictiozoonosis (Kishi, 2008; Matsumoto, 2007; Scholz et al., 2009). La mayoría de los casos de ictiozoonosis en humanos se han presentado principalmente en Japón, Europa y Norteamérica (Mattiucci y Nascetti, 2008); siendo la anisakiasis, causada por nematodos del género *Anisakis*, una de las parasitosis más comunes (Rojas et al., 2014).

b) Ictiozoonosis causada por *Anisakis*

Una de las principales ictiozoonosis provocada por nematodos es la anisakiasis o anisakiosis, que se origina a partir de la ingesta accidental de la larva de tercer estadio (L3) de diversas especies del género *Anisakis* (Quijada *et al.*, 2005). Estas larvas pueden encontrarse libres en el intestino y/o contenidas en la cavidad celómica, así como en las capas musculares epi e hipoaxiales de los peces (Measures, 2014). y al ser ingeridas accidentalmente por los seres humanos u otros hospederos no definitivos causan esta patología (Mattiucci *et al.*, 2013; Miyazaki, 1991). La anisakiasis humana se presenta en el tubo gastrointestinal en donde las larvas se adhieren a la pared del estómago o intestino (Abollo *et al.*, 1988; Mattiucci *et al.*, 2011; Measures, 2014). La infección puede presentarse de dos formas:

- No invasiva: es asintomática, ocurre cuando las larvas en estadio L3 migran hacia la parte superior del esófago y no logran adherirse a la pared de ningún órgano, esto causa pérdida de la vitalidad y las larvas mueren (Pufall *et al.*, 2012).
- Invasiva: ocurre cuando las larvas en estadio L3 se alojan en el tracto gastrointestinal provocando dolores abdominales, náuseas, vómitos (Pufall *et al.*, 2012) y ocasionalmente puede provocar la muerte del hospedero (Takabe *et al.*, 1998).

Se han realizado experimentos en los que se ha medido la susceptibilidad de peces anádromos o catádromos a las larvas de las distintas especies del género *Anisakis*, estudiando su localización dentro del cuerpo y la destrucción mecánica que provoca en el hospedero (Kuramochi *et al.*, 1996; Quiazon *et al.*, 2011; Smith & Wootten, 1978). En estos estudios se han encontrado larvas en casi todas las cavidades y órganos del aparato digestivo, principalmente en el hígado (Kagei, 1995). Los peces estudiados han tenido diferentes reacciones a la infección, que van desde parasitosis asintomáticas, sangrados y pérdida de vitalidad, hasta la atrofia de los órganos parasitados provocando la muerte del hospedero (Quiazon *et al.*, 2011; Smith & Wootten, 1978).

También se han medido las respuestas fisiológicas y la semiología causada por la anisakiasis en diferentes animales como osos pardos (Davey, 1971a; Smith, 1999; Smith & Wootten, 1978), nutrias marinas (Hoberg *et al.*, 1997; Margolis *et al.*, 1997), gatos (Huh *et al.*, 1993), aves marinas (Riley, 1972) y perros (Oshima, 1987), en los cuales las larvas rara vez alcanzan la madurez (Measures, 2014). Además se ha registrado la migración de las larvas por el tubo gastrointestinal causando contracciones y reacciones alérgicas en la zona de infección e inclusive obstrucciones ocasionando la muerte del hospedero (Wootten & Smith, 1975).

c) Phylum Nematoda

Uno de los los phylum con mayor diversidad es el Nematoda, ya que agrupa cerca de 25,000 especies descritas (De Ley & Blaxter, 2004), sin embargo se cree que existen más de 100,000 (Lambhead *et al*, 2003). Los nematodos de manera general se pueden describir como gusanos diocos, de cuerpo alargado, cilíndrico y sin segmentación, que incluyen especies de vida libre o parásita (Brusca & Brusca, 2005). La clasificación propuesta por Hodda (2007) sugiere que el phylum Nematoda se divide en tres clases:

- Clase Dorylaimia Inglis, 1983
- Clase Enoplia Pearse, 1942
- Clase Chromadorea Inglis, 1983

Dentro de la clase Chromadorea encontramos el orden Spirurida Railliet, 1914, que incluye seis subórdenes. La familia Anisakidae Railliet & Henry, 1912 se encuentra dentro del suborden Ascaridina Inglis, 1983 y la superfamilia Ascaridoidea Baird, 1853, la cual agrupa nematodos que son principalmente parásitos del tubo gastrointestinal de vertebrados.

d) Familia Anisakidae Railliet y Henry, 1912

La Familia Anisakinae está subdividida en las subfamilias: Anisakinea Chebaud, 1965 y Contracaecinea Mozgovoi y Shakhmatova, 1971; la primera incluye el género *Anisakis* Dujardin, 1845 y *Pseudoterranova* Krabbe, 1878, la segunda a los géneros *Contracaecum* Railliet y Henry, 1912, *Phocasaris* Höst, 1932 y *Galeicep* Railliet, 1916 (Anderson *et al.*, 1978; Mattiucci & Nascetti, 2008). Los adultos de la mayoría de las especies de la familia Anisakidae son parásitos definitivos del tubo alimenticio de mamíferos y aves marinas, excepto las especies del género *Galeicep* que tiene como hospedero definitivo a nutrias marinas.

Todos los géneros de la familia Anisakidae presentan ciclos de vida indirectos que involucran a varios hospederos intermediarios a diferentes niveles en las redes tróficas acuáticas así como hospederos definitivos endotérmicos (Nadler *et al.*, 2000).

Dentro de la familia Anisakidae, los géneros que tienen importancia zoonótica son: *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum* (Audicana *et al.*, 2002) que de manera general pueden diferenciarse entre si, con base en caracteres morfológicos del estadio L3, como se muestra en la (Fig. 1). Las especies del género *Anisakis* presentan un ventrículo pequeño y no presentan ciego intestinal, en cambio las especies de los géneros *Contracaecum*, *Phosocaris* y *Pseudoterranova* el ventrículo es grande y presentan ciego intestinal (Measures, 2014). Además pueden distinguirse por la forma y cantidad de espículas y papilas presentes en el cuerpo (Quiazon *et al.*, 2008).

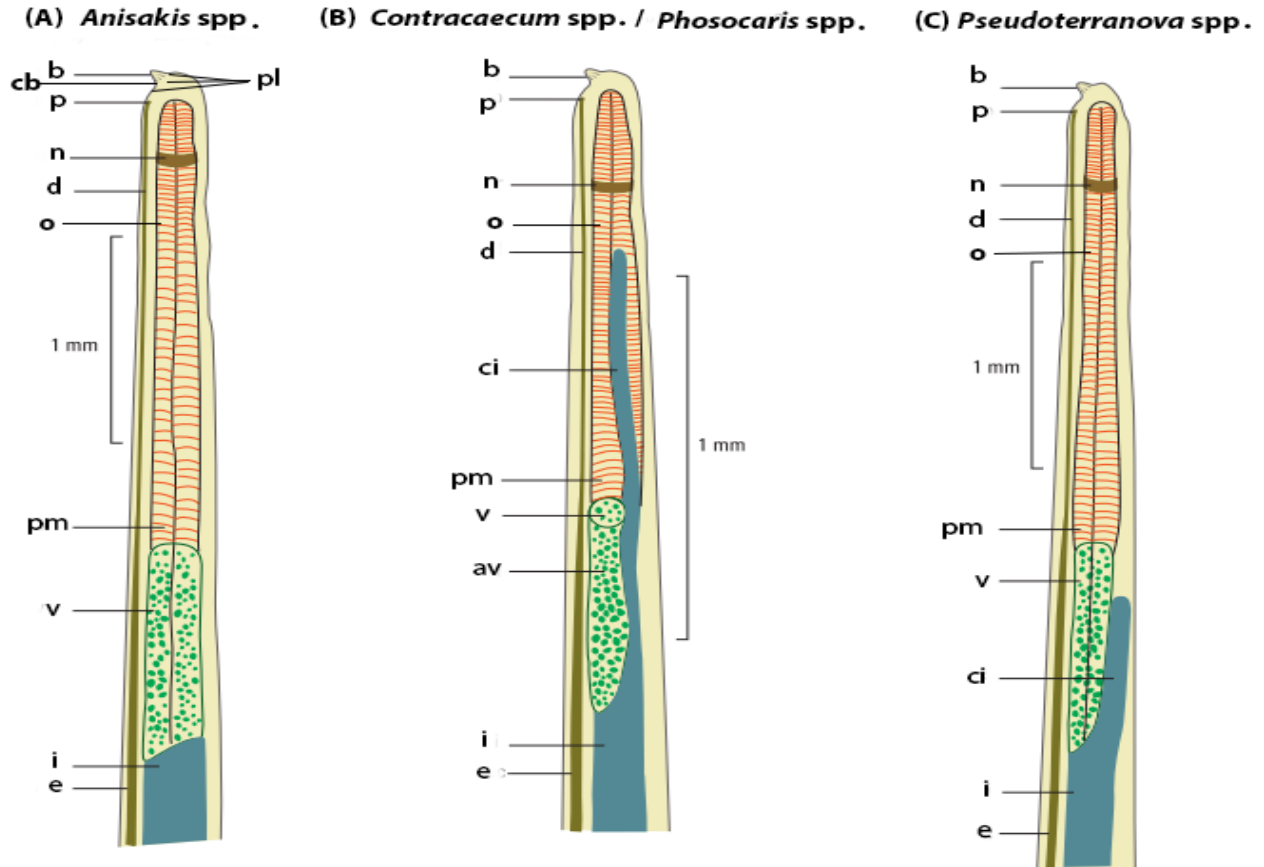


Fig. 1. Características morfológicas de larvas en estadio L3 con potencial zoonótico de la familia Anisakidae: (A) *Anisakis* spp., (B) *Contracaecum* spp. / *Phosocaris* spp. y (C) *Pseudoterranova* spp. Anillo nervioso (n), apéndice ventricular (av), boca (cb), canal excretor (e), ciego intestinal (ci), diente larvario (b), esófago (o), intestino medio (i), poro excretor (pm), porción muscular (pv), pseudolabios (pl), tubo excretor (d) y ventrículo (v). Modificado de Measures (2014).

e) Características del género *Anisakis*

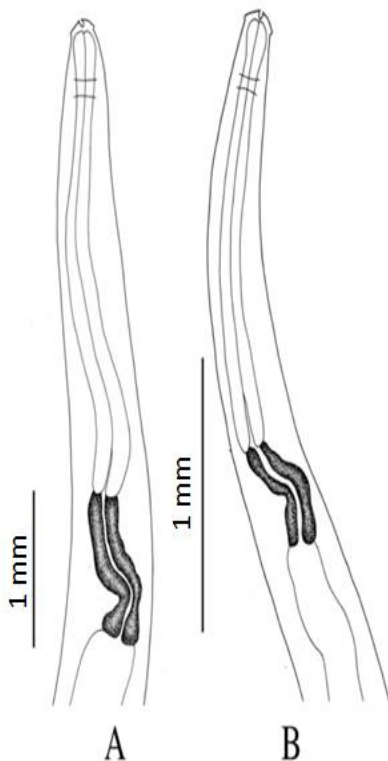
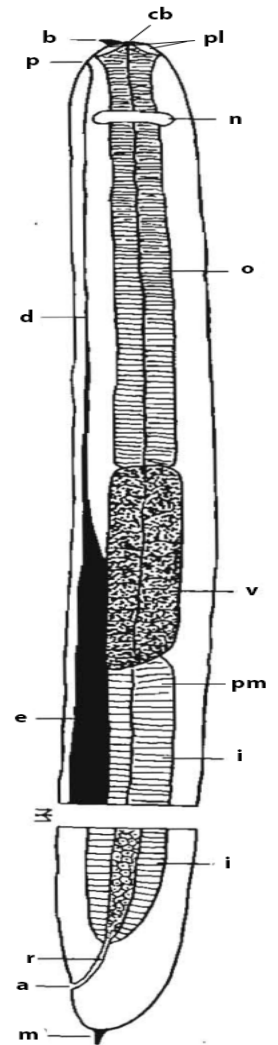
Morfología

Los nematodos adultos del género *Anisakis* miden de 4-20 cm de largo en la hembra y de 3-15 cm en el macho. Poseen tres labios alrededor de la abertura bucal, siendo el labio dorsal de mayor tamaño. Al igual que la L4, el borde interior de cada labio tiene una división poco profunda entre sus dos lóbulos que contienen dientes afilados en los márgenes interiores. El poro excretor se localiza entre los dos labios ventrolaterales y la vulva de la hembra se localiza en el tercio medio del cuerpo. El macho tiene dos espículas, una más corta que la otra (Anderson *et al.*, 1978; Miyazaki, 1991).

Las L3 y L4 de *Anisakis* spp., también pueden ser identificadas con base en los siguientes caracteres: presencia de mucrón en el extremo posterior cercano al ano, diente larvario junto al poro excretor localizados en el extremo anterior y ventrículo en la parte glandular del esófago. Aunque se ha sugerido que en las L3, caracteres como la longitud total o la presencia o ausencia de mucrón pueden ser usados para la identificación de las especies (Quiazon *et al.*, 2008), algunos autores prefieren restringir la identificación de las especies solo a los ejemplares adultos (Mattiucci *et al.*, 2002; Paggi *et al.*, 1998a).

Las L3 en el extremo anterior tienen un diente larvario del lado ventral de la cavidad bucal; la parte glandular del esófago en su extremo anterior se llama ventrículo y este es seguido por el intestino medio, la célula excretora, el recto, el ano y en el extremo posterior en algunas especies encontramos el mucrón. El tubo excretor finaliza en el poro excretor que se encuentra detrás del diente larvario (Fig. 2) (Miyazaki, 1991).

Fig. 2. Características morfológicas de la larva en estadio L3 del género *Anisakis*: (a) ano, (b) diente larvario, (cb) cavidad bucal, (d) tubo excretor, (e) canal excretor, (i) intestino medio, (m) mucrón, (n) anillo nervioso, (o) esófago, (p) poro excretor, (pl) pseudolabios, (pm) porción muscular, (r) recto, (v) ventrículo. Tomado de Miyazaki (1991).



Las L3 de las especies del género *Anisakis* se agrupan en Tipo I y II con base a la longitud del ventrículo (Fig. 3) y por la presencia o ausencia del mucrón (Murata, 2011). Las larvas de *Anisakis* Tipo I tienen una longitud ventricular más larga (0.65-1.5 mm) y presentan un mucrón, las larvas Tipo II presentan un ventrículo de 0.52-0.75 mm y carecen de mucrón.

Fig. 3. Diferencia entre dos larvas tipo I. La larva (L3) Tipo I a través de diferencias en la longitud del ventrículo entre *A. simplex* s.s. (A) que oscila entre 0.90-1.50mm y *A. pegreffii* (B) con un rango de 0.50-0.78mm. Tomado de Quiazon *et al.* (2008).

Ciclo de vida de *Anisakis*

Los adultos de las especies del género *Anisakis* son parásitos de tracto digestivo de mamíferos marinos. El ciclo de vida es indirecto con cuatro estadios larvarios e incluyen al menos un hospedero intermediario como invertebrados y peces (Murrell & Fried, 2007).

Los huevos de *Anisakis* spp., son expulsados con las heces del hospedero definitivo, los huevos contienen la larva I (L1) la cual muda a larva II (L2) con un recubrimiento de la muda, la L2 es una larva libre nadadora la cual es ingerida por crustáceos (primer hospedero intermediario), en estos pasa de su intestino a la cavidad celómica en donde madura de L2 a larva III (L3) inmaduras con muda. Posteriormente, el crustáceo infectado al ser ingerido por un segundo hospedero intermediario, como peces pequeños o cefalópodos, transfiere las larvas al nuevo hospedero en donde la L3 madura y se encapsula en la cavidad celómica o músculo esquelético, en esta fase se considera como larva en estado infectivo para el hospedero definitivo. El segundo hospedero es ingerido por el hospedero definitivo en el cual la L3 se desarrolla a L4 en su paso por el aparato del estómago al intestino anterior y después a adulto, o bien por un tercer hospedero (hospedero paraténico) en el que la larva se vuelve a enquistar como L3 (Bratney & Stenson, 1993, Klimpel *et al.*, 2008). En el hospedero definitivo, la larva muda a L4 y después a su estadio adulto estableciéndose en el aparato digestivo en donde se reproduce y vuelve a iniciar su ciclo de vida (Fig. 4) (Mattiucci & Nascetti, 2008; Miyazaki, 1991). Cabe destacar que las larvas L3 pueden ser ingeridas por algún hospedero accidental, sin embargo en estos las L3 no maduran a su estadio adulto y al enquistarse provocan en su hospedero la anisakiasis (Smith & Wootten 1978).

Las L2 de *Anisakis* spp. han sido reportadas en crustáceos principalmente euphasidos y en 25 especies de cefalópodos (Nagasawa & Moravec, 1995; Smith, 1971; Uspenskaya, 1963). Las L3 se han registrado en aproximadamente 200 especies de peces teleóstelos marinos y dulceacuícolas (Klimpel *et al.*, 2004; Oshima, 1972; Smith & Wootten, 1978). Los peces que mayormente parasitan son la sardina, bacalao, boquerón, arenque, salmón, abadejo, merluza, pescadilla, caballa, bonito, jurel, rape o anchoa (Mattiucci *et al.*, 1997, 2008).

Ciclo de vida de *Anisakis*

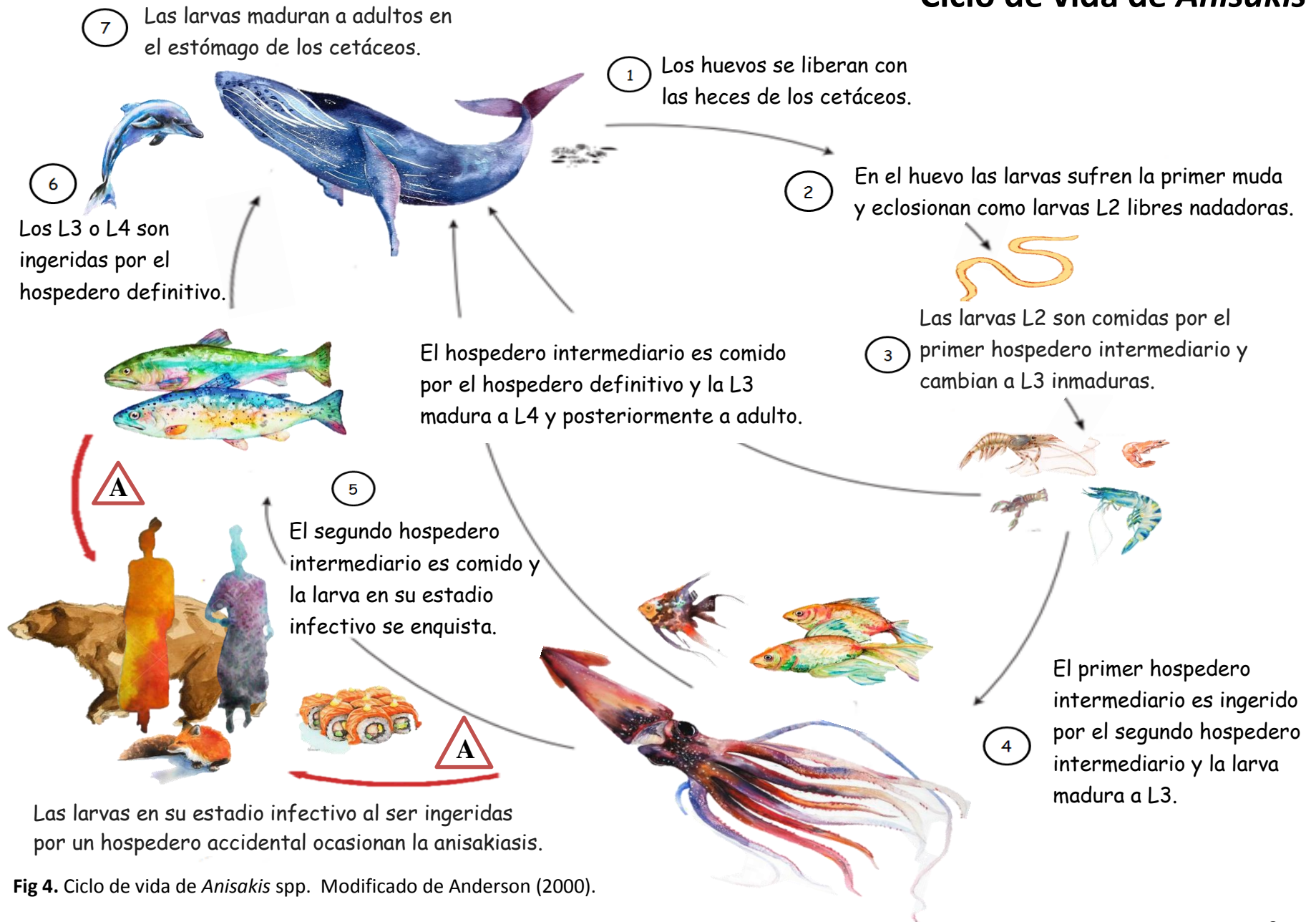


Fig 4. Ciclo de vida de *Anisakis* spp. Modificado de Anderson (2000).

Clasificación

Hasta el 2006, solo tres especies del género se consideraban válidas: *Anisakis simplex* Rudolphi, 1809, *Anisakis typica* Diesing, 1860 y *Anisakis physeteris* Baylis, 1923 (Davey, 1971b, Smith & Wootten, 1978). Sin embargo, estudios recientes que incorporan datos moleculares reconocen nueve especies (fig. 5) las cuales conforman dos grupos naturales denominados Tipo I y II (Mattiucci & Nascetti, 2008):

- *Anisakis simplex* s.s. Rudolphi, 1809
 - *Anisakis pegreffii* Campana-Rouget y Biocca, 1955
 - *Anisakis berlandi* Mattiucci et al., 2014 (antes del 2014 *A. simplex* C.)
 - *Anisakis typica* Diesing, 1860
 - *Anisakis ziphidarum* Paggi et al., 1998b
 - *Anisakis nascettii* Mattiucci et al., 2009 (antes del 2009 *Anisakis* sp. B)
- } Tipo I
- *Anisakis physeteris* Baylis, 1923
 - *Anisakis brevispiculata* Dollfus, 1966
 - *Anisakis paggiae* Mattiucci et al., 2005
- } Tipo II

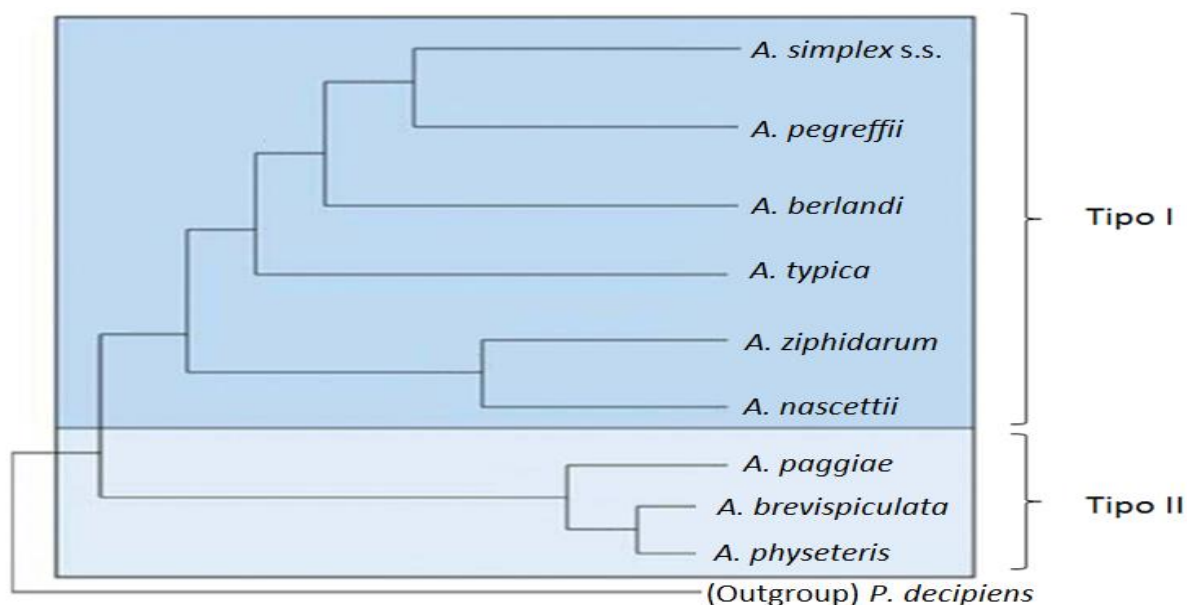


Fig. 5. Fenograma con base en secuencias de ADNmt de COII del género *Anisakis* obtenido a partir de Neighbor Joining (NJ) con el modelo de kimura dos parámetros (K2P). Modificado de in Mattiucci & Nascetti (2008).

Distribución geográfica

Las especies del género *Anisakis* presentan una distribución casi cosmopolita en prácticamente todos los océanos, siendo el trópico de Cáncer y de Capricornio donde se ha encontrado la mayor diversidad de especies. Las especies que pertenecen al Tipo I tienen una distribución geográfica más amplia y están presentes en todos los continentes, sin embargo las larvas Tipo II se distribuyen en el océano Atlántico e Índico. En el océano Pacífico se han registrado a las especies *A. pegreffii*, *A. berlandi* y *A. simplex* s.s., las dos últimas se distribuyen a lo largo del hemisferio Norte, siendo *A. simplex* s.s. la más ampliamente distribuida (Mattiucci *et al.*, 1989; Nascetti *et al.*, 1986) (Fig. 6).

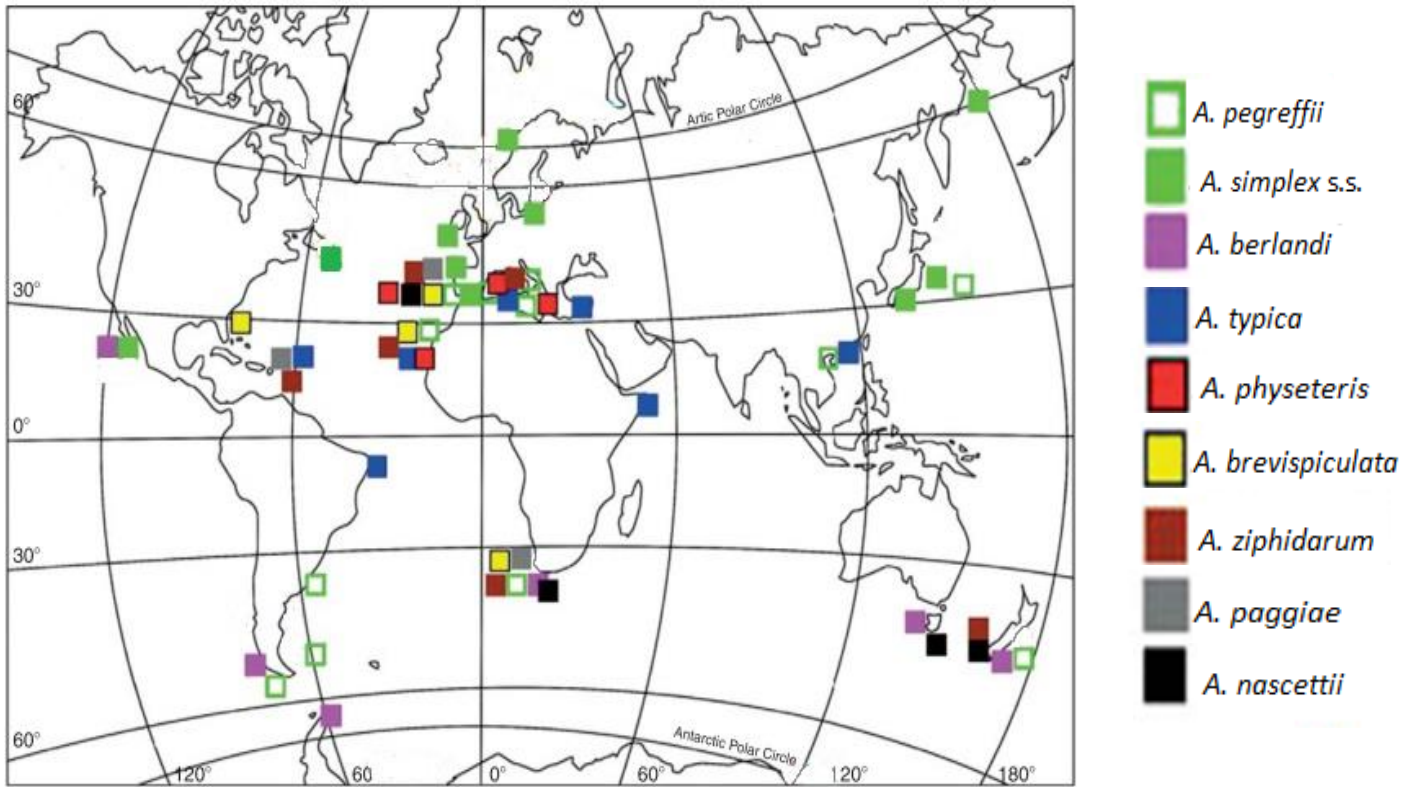


Fig. 6. Mapa en el que se señala la distribución cosmopolita de las especies del género *Anisakis*, en donde el cuadro verde oscuro representa a *Anisakis simplex* s.s. Modificado de Mattiucci y Nascetti (2006).

El medio marino exhibe pocas barreras físicas evidentes que limiten el flujo genético entre las poblaciones de peces, sin embargo, utilizando marcadores genéticos de parásitos del género *Anisakis*, se ha detectado que en estos existe diferenciación de poblaciones las cuales podrían ser reflejo de lo que ocurre con sus hospederos (Baldwin *et al.*, 2011). Mattiucci *et al.*, (2014) indica que estos parásitos también pueden usarse como biomarcadores para establecer la ruta de migración de las diferentes especies de peces e inclusive separar las especies de hospedero por el tipo de parásitos que contienen.

Biología del hospedero (Trucha arcoíris)



Dominio: Eukarya
Reino: Animalia
Phylum: Chordata
Clase: Actinopterygii Klein, 1885
Orden: Salmoniformes Bleeker, 1859
Familia: Salmonidae Cuvier, 1816
Subfamilia: Salmoninae Schinz, 1822
Género: *Oncorhynchus* Suckley, 1861
Especie: *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792

Uno de los hospederos intermediarios de *Anisakis* spp. más importantes debido a su capacidad para adaptarse y considerarse un pez de pesca deportiva y consumo, es la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Quiazon *et al.*, 2011; Wootten & Smith, 1975). Las truchas arcoíris se alimentan de invertebrados acuáticos; los organismos adultos incluyen en su dieta peces pequeños e inclusive huevos de su propia especie (Torres & Torres, 1991).

Fig. 7. *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoíris)

La trucha arcoíris presenta el cuerpo alargado o fusiforme, de color verde olivo a negro en el dorso y aperlado en el vientre, con colores longitudinales en los costados que asemejan un arcoíris y una banda roja característica a lo largo del cuerpo y puntos negros pequeños en lomo, costados, cabeza y aletas (Fig. 7). La coloración puede variar con el hábitat, tamaño, y condición sexual (Gall & Crandell, 1992).

Ciclo de vida

La trucha arcoíris es un pez de crecimiento rápido, resistente, tolerante a una amplia gama de ambientes y es capaz de ocupar muchos hábitats. Su longevidad máxima es de 11 años en cautiverio y de cuatro a seis años en la naturaleza en promedio.

En estado silvestre las truchas presentan filopatría, es decir que regresan de mar abierto a sus ríos de nacimiento en donde la mayoría de los peces desova sólo una vez en el periodo de enero a

mayo. Después de emerger del huevo el alevín de primera etapa se alimenta del saco vitelino hasta absorberlo totalmente. Los alevines con marcas parr (manchas redondeadas a lo largo de sus constados) se quedan en los ríos hasta alcanzar la talla juvenil y posteriormente viajan a mar abierto en donde permanecen y después de dos años los peces adultos regresan a desovar a los rios (Torres & Torres, 1991)) (Figura 8).

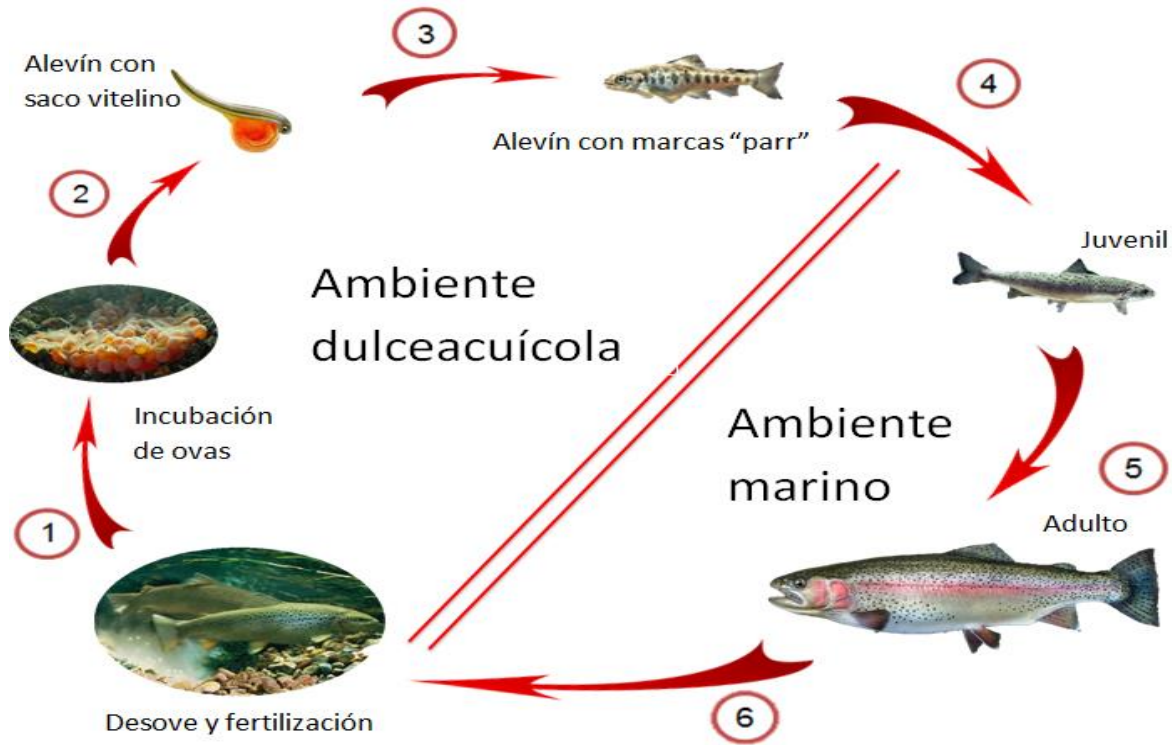


Fig. 8. Ciclo de vida de la trucha arcoíris.

Hábitat y distribución

La trucha arcoíris es originaria de América del Norte, sin embargo a partir de 1870 fue introducida para la acuicultura y la pesca recreativa en todos los continentes excepto en la Antártida (Fig. 9). Es un pez anádromo de aguas subtropicales a frías, habita en el fondo del mar y se llega a sumergir hasta 200 m. de profundidad. (Bromage & Cumaranatunga, 1988; Lotina & de Hormaechea, 1975; Torres & Torres, 1991).



Fig. 9. Principales países productores de trucha arcoíris (FAO, 2006)

Debido a su comportamiento migratorio relacionado con su reproducción, conducta agresiva al proteger su territorio y ser un consumidor generalista, esta especie ha sido incluida en la lista de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo (Lowe *et al.*, 2004).

g) Taxonomía molecular

La Taxonomía (del griego *ταξις* taxis= ordenamiento y *νομος* nomos= norma o regla) es el estudio teórico de la clasificación, incluyendo sus bases, principios, procedimientos y reglas. Algunos autores consideran que sistemática es sinónimo de taxonomía. En la actualidad la sistemática se practica dentro de una perspectiva filogenética, utilizando métodos basados en parsimonia y probabilísticos, con una relevancia creciente de los caracteres moleculares (Morrone, 2013).

Durante años la clasificación de la biodiversidad se llevó al cabo estudiando caracteres morfológicos, pero hoy en día la incorporación de herramientas de taxonomía molecular podrían permitir generar nuevas clasificaciones de las especies (López-Caballero *et al.*, 2013).

La taxonomía molecular es un complemento de la taxonomía clásica. Los análisis moleculares son de gran ayuda en general, pero en los siguientes casos han mostrado ser particularmente útiles:

- Si existen estadios de desarrollo o la presencia de un solo sexo que impidan el uso de claves taxonómicas (Hebert, 2003a).
- Ante taxones crípticos (Bickford *et al.*, 2007; Jarman & Elliott, 2000; Pfenninger & Schwenk, 2007).
- Cuando los organismos colectados se encuentran incompletos y esto no permite su adecuada determinación usando claves taxonómicas (Bucklin *et al.*, 1999; Trewick, 2000).
- Al tomar una muestra de contenido estomacal o de las excretas y se pretenda determinar las especies que han sido consumidas (Avisé, 2000; Hebert *et al.*, 2003b; Pompanon *et al.*, 2012).

Actualmente, el código de barras de la vida, término acuñado por Hebert *et al.*, (2003a), ha popularizado la utilización de datos moleculares en la taxonomía, su propuesta se basa en utilizar el gen de la subunidad I del Citocromo C Oxidasa (COI) para la identificación y delimitación de especies. Según los autores, el COI presenta la variación suficiente para permitir identificar a todas las especies animales, dado que este gen presenta una mayor tasa de mutación en comparación con otros marcadores moleculares. Hebert *et al.*, (2003a) señalan que el 98% de los pares de especies congénicas de animales analizados muestran una divergencia superior al 2%, lo que es suficiente para hacer una distinción efectiva para organismos de la mayoría de los phyla de invertebrados, sin

embargo Johns & Avise (1998) utilizan el citocromo B en especies de vertebrados estrechamente relacionados y demuestran una divergencia mayor al 2%. En nematodos, el gen COI ha sido ampliamente utilizado para investigar la variación interespecífica y la estructura poblacional (Blouin, 2002; Saccone *et al.*, 1999); sin embargo la subunidad II del Citocromo C Oxidasa (COII) podría ser más informativa, ya que muchos de los trabajos se han realizado con este marcador por lo cual su representación en las bases de datos moleculares es mayor (Kiewnick *et al.*, 2014).

Uno de los problemas del código de barras recae en la estandarización del uso de un solo gen mitocondrial (COI), dado que no en todos los grupos de seres vivos es igualmente útil, ya sea por su alta variación intraespecífica o bien porque en algunos grupos, como Cnidaria y Porífera, estas secuencias evolucionan lentamente, además existe un fenómeno llamado heteroplasma donde hay una fuga paternal de ADNmt provocando la presencia de más de un tipo de mitocondria en una sola especie lo que conduce a polimorfismos en los genes COI y COII que podrían afectar la utilización de estos marcadores (Kiewnick *et al.*, 2014).

h) Análisis filogenéticos

Los diferentes organismos que existen actualmente en la Tierra son resultado del proceso evolutivo. Los análisis filogenéticos que se emplean en la Sistemática permiten inferir esta historia a través de diagramas que indican las relaciones entre los taxones a diferentes niveles jerárquicos a los que se les denomina cladogramas. Estas inferencias están basadas de manera tradicional en el principio de parsimonia, la cual elige la hipótesis que requiere el menor número de pasos, reduciendo al mínimo la homoplasia (Lipscomb, 1998; Morrone, 2013).

Para calcular la cantidad relativa de homoplasia en un cladograma se utilizan los siguientes índices (Lipscomb, 1998):

- Índice de consistencia (CI). Mide el grado de homoplasia de los caracteres individuales o del árbol completo.

$$CI = \frac{\text{Total de cambios esperados en el caracter}}{\text{Número real de pasos en el árbol}} \times 100$$

Cuando este índice es 1 significa que no hay homoplasia y la calidad del cladograma es aceptable, pues presenta una correlación negativa con el número de caracteres y taxones,

es decir, mayor número de éstos implica menor CI. Por lo que no es útil para comparar árboles diferentes entre sí.

- Índice de retención (RI). Calcula la cantidad relativa de homoplasia requerida por un árbol, mide la cantidad esperada de sinapomorfías de un conjunto de datos.

$$RI = \frac{\text{Número máximo de pasos en el árbol} - \text{Número de cambios de estado en el árbol}}{\text{Número máximo de pasos en el árbol} - \text{Número de cambios de estados en los datos}} \times 100$$

RI es alto cuando los cambios de estado ocurren predominantemente en los nodos internos y bajo cuando los cambios están concentrados en ramas pertenecientes a taxones terminales. El RI tiene la ventaja de que no es sensible a los caracteres no informativos, autapomorfías o sinapomorfías.

Uno de los modelos que se emplean en el estudio de secuencias de DNA son los análisis de distancias genéticas que utilizan distintos modelos de sustitución, entre los cuales Kimura-2-Parámetros (K2P) es uno de los más populares. Este modelo considera diferente las tasas de cambio de transiciones y transversiones, tomando en cuenta que las tasas de sustitución no tienen variación entre sitios y asume que la frecuencia de los 4 nucleótidos son iguales (Kimura, 1980; Kress & Erickson, 2012).

Mediante el uso de secuencias de ADNmt se puede evaluar la diversidad haplotípica, un haplotipo es un conjunto de variaciones del ADN, que tienden a ser heredados juntos, Un haplotipo también se puede referir a una combinación de alelos o un conjunto de polimorfismos de un nucleótido sencillo (SNPs) que se encuentran en el mismo cromosoma (Avice, 2000; Birren & Green, 1997). Al realizar un análisis de la variación haplotípica se calcula el número de mutaciones o cambios de base que ha tenido un sitio en específico a nivel poblacional (Barrett *et al.*, 2005).

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Una de las ictiozoonosis más común causadas por nematodos es la anisakiasis, por lo que es importante detectar los diferentes hospederos intermediarios que son consumidos comercialmente y que podrían estar infectados por las larvas en estadio infectivo (L3) de *Anisakis*. En el estado de Oregón existen reportes de diferentes especies de este género, que parasitan diversos peces de consumo humano y pesca deportiva, debido a esto y al potencial zoonótico de las larvas de *Anisakis*, es importante detectar a tiempo un posible brote de anisakiasis por el hallazgo de larvas L3 en el cause vertiente del río de Cedar Creek.

Además la identificación y diferenciación de las larvas del género *Anisakis* a nivel de especie es problemática, ya que los caracteres morfológicos no son suficientes para distinguir entre estas y la interpretación de los caracteres puede ser ambigua. Por esto es necesario indagar si con la inclusión de caracteres moleculares se puede reconocer a las distintas especies del género.

La identificación a nivel específico de parásitos presentes en alimentos de consumo humano es prioritaria ya que con base en este conocimiento se pueden prevenir riesgos y sugerir medidas para mitigar posibles brotes. En este caso, los nemátodos presentes en la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* para consumo humano del criadero Cedar Creek, Oregón, no han sido identificados, lo cual pone a los consumidores de dicho alimento en riesgo potencial.

III. OBJETIVO

a) General

- Contribuir al conocimiento de los helmintos con potencial zoonótico, aplicando técnicas moleculares, en particular los que se obtienen por ingesta de pescado crudo.

b) Particular

- Identificar y caracterizar ejemplares en estadio de L3 del género *Anisakis* parásitas de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* recolectadas en el Estado de Oregón, EUA y determinar si estas pertenecen a una o más especies.

IV. ÁREA DE ESTUDIO

a) Criadero Cedar Creek

La granja piscícola de Cedar Creek, lugar de recolecta de los ejemplares estudiados en el presente trabajo, se localiza en el estado de Oregón, Estados Unidos de América, en la vertiente del litoral del Pacífico (Fig. 10) ($45^{\circ} 12' 57''\text{N}$, $123^{\circ} 50' 43'' \text{W}$) a 13 msnm. La principal actividad de Cedar Creek es la incubación de huevos, crianza y pesca del salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum, 1792) y la trucha arcoiris (*O. mykiss*). Tiene una extensión de 35.33 hectáreas y se encuentra adyacente a tres ríos que vertientes del río Nestucca (ODFW, 2016).



Fig. 10. Criadero Cedar Creek. Imágenes obtenidas de Google Earth, el ícono rojo indica su localización en el mapa.

V. MÉTODO

a) Recolecta de ejemplares

El 11 de febrero de 2014, el Dr. Jesús Hernández Orts recolectó 15 ejemplares de trucha arcoíris (3 machos y 12 hembras) en los cauces del río cercano al Criadero Cedar Creek, Oregón, EUA. Se extrajeron muestras representativas de los parásitos del mesenterio y musculatura esquelética. Ejemplares de nematodos se fijaron y conservaron en etanol al 70% para estudios morfológicos y alternativamente en etanol al 100% con la finalidad de obtener información molecular (secuencias de DNA).

b) Procesamiento de los ejemplares

- **Análisis morfológico**

Para la observación de los caracteres morfológicos y la obtención de datos merísticos, se seleccionaron 30 ejemplares de nematodos asignados preliminarmente por medio de la observación al microscopio al género *Anisakis*, los cuales se transparentaron con glicerina al 25% y 50% durante una semana cada una, glicerina al 75% por 10 días y posteriormente permanecieron un mes en glicerina al 100%. Cada uno de los individuos fue montado entre un portaobjetos y cubreobjetos, y se observó bajo el microscopio óptico Olympus CX40. Se tomaron las medidas merísticas con una reglilla (longitud total, ancho máximo, distancia del anillo nervioso al extremo anterior, distancia del poro excretor al extremo anterior, distancia del ano al extremo posterior, mucrón, longitud del esófago, ancho del esófago y longitud del ventrículo esofágico). Los datos obtenidos se analizaron y se realizaron gráficas de boxplots con el programa R statistics 3.4.0 (Ihaka & Gentleman, 1996).

Seis ejemplares fueron utilizados para la obtención de fotografías de microscopía electrónica de barrido (MEB). Estos ejemplares se deshidrataron en etanol gradual (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 96%) por 10 minutos cada uno, después se realizaron dos cambios en OH 100% durante 10 minutos y finalmente se deshidrataron a punto crítico con CO₂ con un desecador de la marca Emitech modelo K850. Las muestras fueron cortadas en tres secciones transversales y los extremos anterior y posterior de cada uno se montaron en portamuestras de aluminio adheridos mediante cintas de carbón. Las muestras se recubrieron con oro usando un metalizador de la marca QUORUM modelo Q150R ES. Finalmente las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido de la marca Hitachi SU1510. Dos ejemplares fueron observados en el microscopio óptico Olympus CX40 a 40X y se

fotografiaron los caracteres diagnósticos para observar la variación morfológica. Este trabajo se realizó en el Laboratorio Nacional de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad I del Instituto de Biología, UNAM. Ejemplares de referencia fueron depositados en la Colección Nacional de Helminthos (CNHE) del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (Números de catálogo 10450 y 10451).

- **Extracción de DNA, amplificación y secuenciación de los genes COI y COII.**

En un ambiente estéril, ejemplares asignados preliminarmente al género *Anisakis* se seccionaron en tres partes (región anterior, media y posterior) y se tomó la región media para realizar la extracción de DNA, de esta forma se mantuvieron los extremos del cuerpo intactos ya que en estos se encuentran los caracteres diagnósticos para la identificación taxonómica.

En el laboratorio de Sistemática molecular de Zoología (Laboratorio Nacional de Biodiversidad) del Instituto de Biología de la UNAM, se realizó el trabajo para el estudio molecular de las muestras de larvas de *Anisakis*, por lo que se digirieron muestras de tejido usando 10 µl de proteinasa K y buffer de lisis, dejando digerir el tejido por más de 12 horas a 56°C. La extracción y purificación de DNA se realizó siguiendo el protocolo del DNeasy Blood & Tissue Kit QIAGEN®. Se obtuvieron secuencias parciales de 629pb del gen de la subunidad I de la citocromo C oxidasa (COI) mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se emplearon los iniciadores o “primers” diseñados por Cross, *et al.* (2007) AnCO1-F, 5' - ATTTGGTCTTTGATCTGGTATGG - 3' y AnCO1-R, 5'-TGGCAGAAATAACATCCAACTAG- 3'. De igual manera se amplificó un fragmento de 1030pb del gen de la subunidad II de la citocromo C oxidasa (COII) utilizando los primers diseñados por Nadler y Hudspeth (2000) Cox2-210, 5' - CACCAACTCTTAAAATTATC - 3' y Cox2-211, 5' - TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTTYAT - 3'.

Cada tubo de PCR contenía 0.15 µl de Taq polimerasa, 3 µl de buffer 5X, 0.3 µl de cada uno de los primers y 2 µl de DNA, estos se llevaron a un volumen total de 15 µl con agua estéril. La reacción de amplificación para COI se realizó en un termociclador Arktik™ Thermal Cycler (TermoFisher Scientific) con el perfil térmico: 5 minutos a 94°C, seguidos de 40 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 54°C, 2:30 minutos a 72°C, con una extensión final de 5 minutos a 72°C. De la misma forma para cada tubo de reacción del COII se usó el perfil térmico: 4 minutos a 94°C seguidos de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 45°C, 50 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

Los productos de las PCR fueron enviados al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología de la UNAM para su secuenciación en un secuenciador de capilares 3730xl DNA Analyzer.

- **Edición, alineamiento y análisis de secuencias**

Los electrofenogramas de ambas direcciones se reconciliaron y editaron con el software Geneious 5.1.7 (Drummond *et al.*, 2012). Las 28 secuencias generadas del COI y 15 del COII se compararon mediante un análisis preliminar con la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Fecha de acceso 13/05/2016) para su asignación taxonómica así como para detectar posibles casos de contaminación o secuenciación del hospedero. Los resultados del BLAST se muestran en los Anexos 2 y 3.

Con las secuencias de DNA resultantes se realizaron dos matrices, una por gen (la primera incluyendo las secuencias obtenidas de COI de los organismos recolectados y otros miembros de la familia Anisakidae (Anexo 4) cuyas secuencias se obtuvieron de GenBank [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, Fecha de acceso 05/09/2016]), siguiendo el mismo procedimiento que la primera matriz, se construyó la segunda para el gen COII (Anexo 5), esto con el fin de comparar las secuencias generadas en el presente trabajo con los registros previos. Cada set de datos fue alineado utilizando el programa MUSCLE (Edgar, 2004): Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation a través de su interfase en línea (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) usando los parámetros definidos por *default*. Las características de las matrices resultantes se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características de las matrices de COI y COII.

Gen	Longitud total	Taxa	Caracteres constantes
COI	919	110	619
COII	632	99	384

Donde: Taxa= Número de terminales.

- **Inferencia de árboles filogenéticos**

Se realizó para cada matriz, el análisis bajo el principio de Parsimonia en el programa TNT (Goloboff *et al.*, 2008), usando una búsqueda tradicional con 100 réplicas y la adición aleatoria de taxones usando el método de bisección y reconexión de árboles (Tree-bisection-regrafting, TBR) para la perturbación de los árboles y búsqueda de árboles óptimos. Se obtuvieron valores de bootstrap mediante 100 seudorréplicas de búsqueda tradicional, además se calculó el índice de consistencia y de retención. Con ayuda del programa PAUP* 4.0 (Swofford, 2002) se calcularon las distancias genéticas pareadas para cada una de las matrices utilizando el modelo de sustitución de Kimura-2 parámetros (Kimura, 1980).

- **Diversidad haplotípica**

Se calculó la diversidad haplotípica para cada matriz de COI y COII en el programa DnaSP v. 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009), en el cual se analizaron las secuencias previamente alineadas para obtener la diversidad haplotípica y el número de haplotipos únicos para cada gen.

VI. RESULTADOS

Se revisaron 15 ejemplares de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* con una prevalencia del 100% de la larva (L3) del género *Anisakis*, sin embargo al no tomarse un censo total de los parásitos recolectados de cada ejemplar, no se pudo obtener la abundancia de *Anisakis*. Se colectaron un total de 117 nematodos enrollados en forma de espiral plana en el mesenterio y musculatura esquelética del hospedero, de los cuales 30 se utilizaron para MEB y morfometría, 30 para taxonomía molecular y el resto se depositaron en la CNHE.

a) Análisis morfológico

Las larvas presentan un cuerpo alargado, con extremos redondeados y sin segmentación. Tienen un color blanquecino y la cutícula es hialina (fig. 11A). En el extremo anterior se encuentra un diente larvario en forma piramidal cercano a la cavidad bucal (fig. 11B). El mucrón se localiza en el centro del extremo posterior del gusano cercano al ano (fig. 11C). La parte glandular del esófago en su extremo anterior se denomina ventrículo y no presenta ninguna invaginación del ciego intestinal (fig. 11D). Poseen un pseudolabio inferior (pl1) el cual es completo y largo a comparación de los dos pseudolabios laterales (pl2 y pl3) que son más pequeños y se encuentran rodeando al diente larvario (b), la cavidad bucal (cb) no presenta una base dentada (fig. 12). El poro excretor (p), en el cual finaliza el tubo excretor, se encuentra detrás del diente larvario (b). El mucrón (m) se localiza en el centro del extremo posterior del gusano cercano al ano (a) el cual no presenta ornamentaciones y la cutícula es estriada (fig. 13).

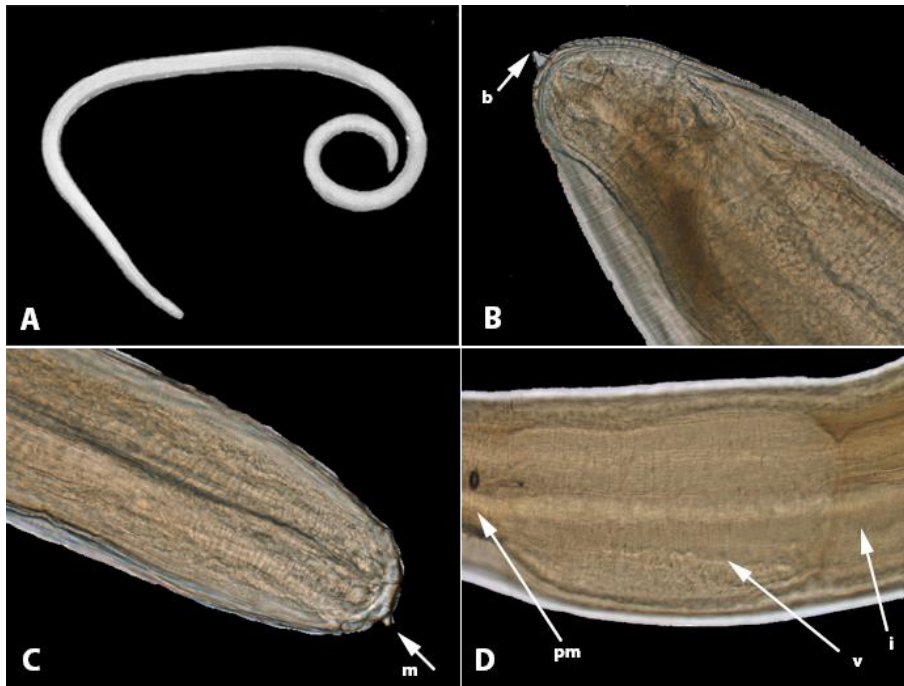


Fig. 11. Fotografías de microscopía óptica (40X) de *A. simplex* s.s., donde las flechas señalan: A= ejemplar completo, B= diente larvario (b), C= mucrón (m) y D= intestino (i), porción muscular (pm) y ventrículo (v).

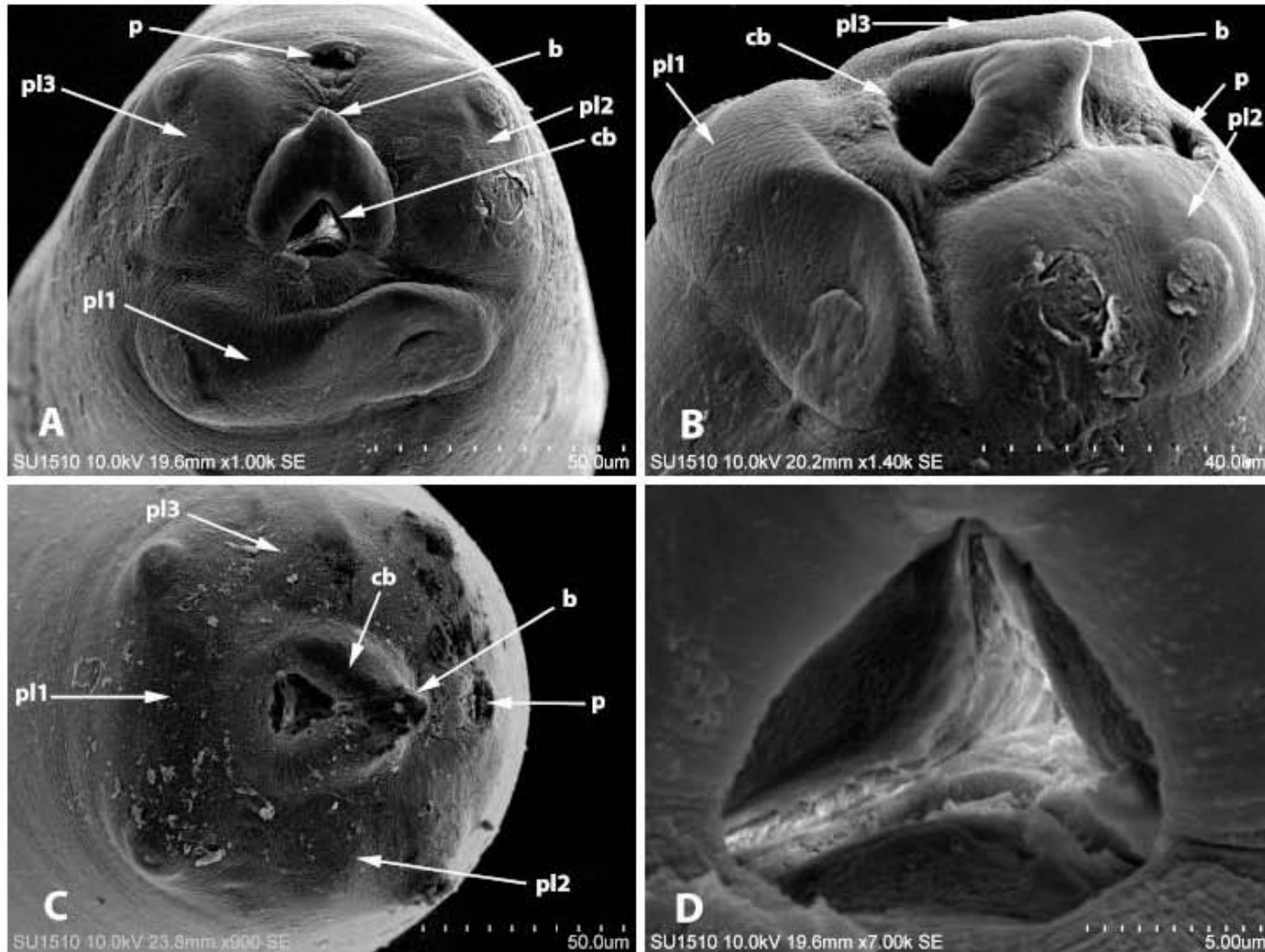


Fig. 12. Fotografías de MEB de la región anterior de *Anisakis simplex* s.s., en A, B y C se observan el pseudolabio inferior completo (pl1) debajo de la cavidad bucal (cb) y los dos pseudolabios laterales (pl2) y (pl3) que rodean el diente larvario (b) en forma piramidal y arriba de este el poro excretor (p). La foto D es un acercamiento a la cavidad bucal en la cual no se presenta una base dentada.

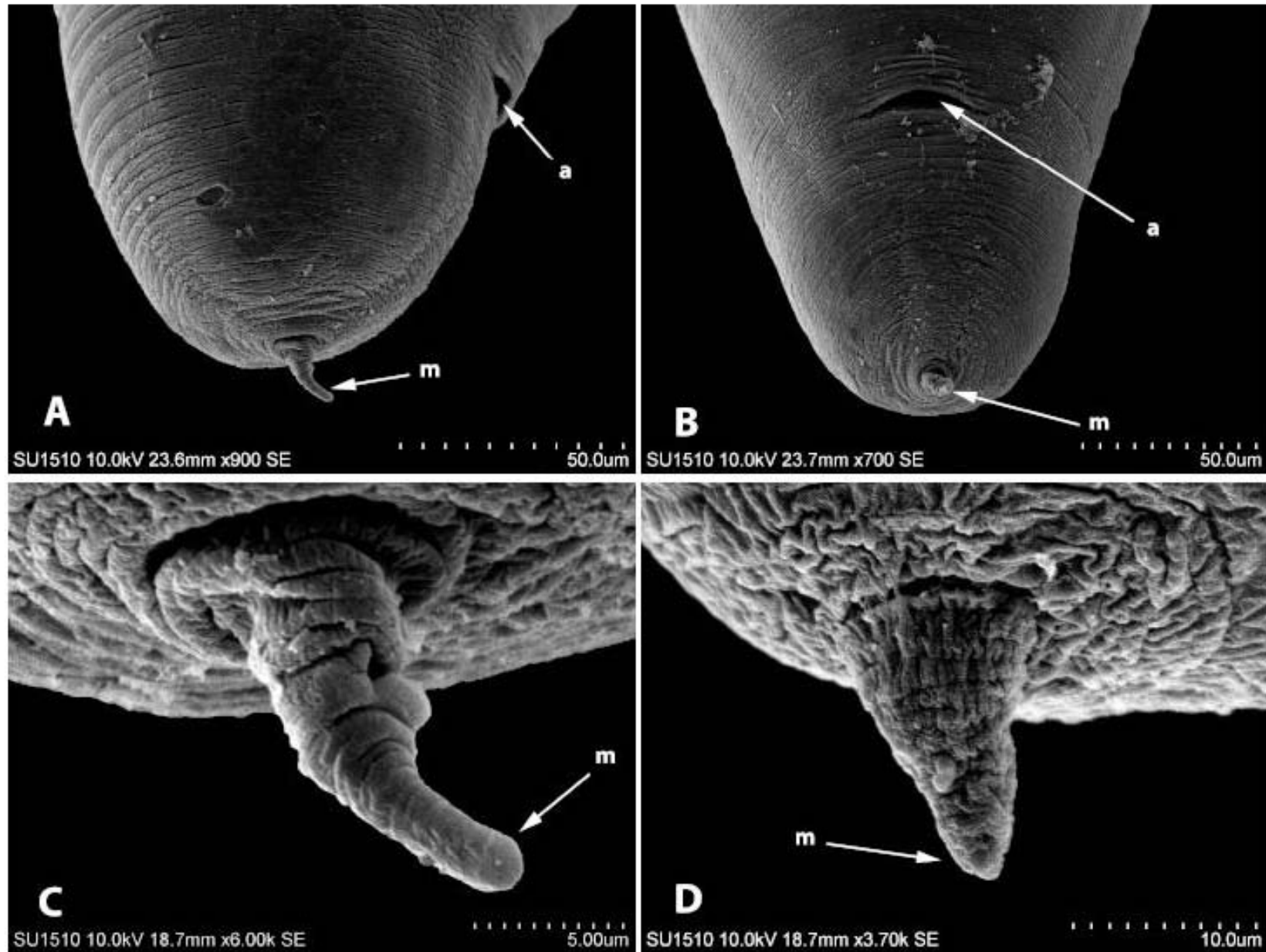


Fig. 13. Región posterior de *A. simplex* s.s., donde en A y B se observa el mucrón (m) en el centro del extremo posterior y el ano (a) sin ornamentaciones, C y D son un acercamiento al mucrón, el cual presenta variabilidad morfológica y una cutícula estriada.

b) Morfometría

Las medidas morfométricas del Anexo 6 se resumen en el Cuadro 2, en el que se observa el promedio, la talla máxima y mínima de los individuos, así como la desviación estándar y varianza de cada categoría. Para la identificación morfológica de *Anisakis simplex* s.s. se consideró el promedio de la longitud total= 26.47 mm y del ventrículo= 1.14 mm, los cuales se compararon con lo publicado en Quiazon *et al.* (2008).

Cuadro 2: Medidas morfométricas obtenidas del anexo 6 (en mm).

Medidas morfométricas de larvas de estadio L3 de <i>Anisakis simplex</i> s.s.											
	LT	AM	AN	PE	AP	M	LE	AE	LV	%LV-LE	%LT-LE
Promedio	26.470	0.480	0.260	0.090	0.030	0.015	23.039	0.384	1.144	5.119	86.846
MAX	32.000	0.621	0.620	0.146	0.055	0.020	28.790	0.501	1.410	10.949	89.969
MIN	12.000	0.364	0.080	0.050	0.010	0.009	9.590	0.191	0.836	3.651	79.917
DESVEST	4.200	0.061	0.134	0.021	0.011	0.005	3.905	0.071	0.152	1.264	1.734
VAR	17.637	0.004	0.018	0.000	0.000	0.000	15.247	0.005	0.023	1.599	3.008

Donde LT= longitud total, AM= ancho máximo, AN= distancia del anillo nervioso, PE= poro excretor, AP= ano al extremo posterior, M= mucrón, LE= longitud del esófago, AE= ancho del esófago, LV= longitud del ventrículo esofágico, %LV-LE= porcentaje de la longitud del ventrículo contra la longitud del esófago y %LT-LE= porcentaje de la longitud total del gusano contra la longitud del esófago.

c) Análisis molecular

COI

El análisis de BLAST asignó las 28 secuencias generadas en el presente estudio a la especie *A. simplex* s.s. con una identidad 99% (622pb). Solo tres individuos aparecieron más próximos con un 99% (603pb) a *A. typica*, con número de acceso KF356666.1, KF356666.1 y KF356666.1 (Anexo 2).

El análisis de máxima parsimonia dió como resultado 80 árboles igualmente parsimoniosos de 792 pasos (fig. 14), con un CI= 0.52 y RI= 0.86. El árbol de consenso estricto muestra a las secuencias generadas en este trabajo (señaladas con el acrónimo AZ) agrupadas con secuencias de *A. simplex* y *A. typica*. El grupo en el que se anidaron las muestras aquí generadas tiene un valor de bootstrap menor al 75%.

Con el modelo de K2P se obtuvo un cluster en el que se agrupan nuestras muestras señalado como *A. simplex* s.s. tiene una baja divergencia genética de 0.012% entre las distintas muestras y una distancia del 4% respecto a *A. pegreffii*, su grupo hermano.

De las 28 secuencias analizadas se encontraron 20 haplotipos únicos (Cuadro 3) y una alta diversidad haplotípica de 0.944%.

Cuadro 3. Resultados del análisis de Haplotipos para COI

Núm. De haplotipos	Diversidad haplotípica	Sitios variables	K
20	0.944	28	5.53

Donde: K= promedio de diferencias de los nucleótidos.

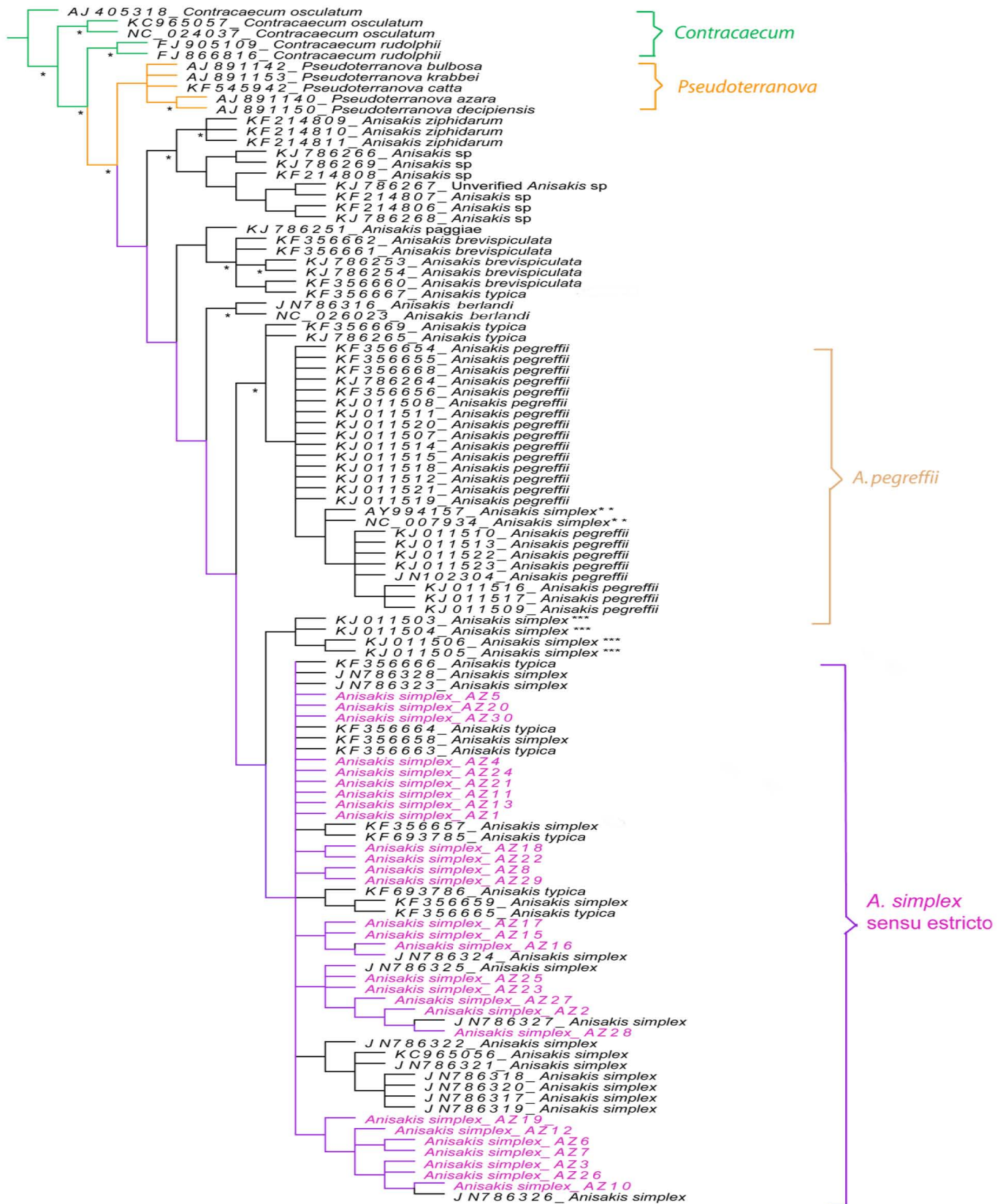


Fig. 14. Cladograma de consenso estricto de 80 árboles sin taxones excluidos obtenido por el método de máxima parsimonia para el gen COI, con un CI= 0.52 y un valor de RI= 0.86. En color rosa las secuencias obtenidas en este trabajo.

*clados con valor de bootstrap >75% **secuencias UNVERIFIED y ***secuencias de Sohn *et al.*, 2014.

COII

Se realizó un BLAST con las 15 secuencias obtenidas para COII, el cual identificó una similitud del 99% (1020pb), las secuencias de referencia se incluyen en el Anexo 3. El análisis de máxima parsimonia dió como resultado 10 árboles igualmente parsimoniosos de 824 pasos con un RI= 0.85 y un CI= 0.42. El árbol de consenso estricto (fig. 15) muestra que las secuencias de *A. simplex* s.s. incluyendo las generadas en el presente trabajo (*Anisakis_simplex_AZ*) forman un grupo monofilético y se presentan como grupo hermano de *A. simplex* y ambos cluster son grupo hermano de *A. pegreffii*. Las ramas del cladograma tienen un soporte de bootstrap con valores mayores al 75%.

Con el modelo de K2P se obtuvo una divergencia genética intraespecie de 0.02% entre las secuencias que conforman el cluster señalado como *A. simplex* s.s., que a su vez tienen una distancia genética del 4% con su grupo hermano *A. pegreffii*.

De las 15 secuencias generadas para COII, se obtuvieron 14 haplotipos únicos y una alta diversidad haplotípica de 0.990 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de haplotipos realizado para COII

Núm. De haplotipos	Diversidad haplotípica	Sitios variables	K
14	0.990	29	8.3619

Donde: K= promedio de diferencias de los nucleótidos.

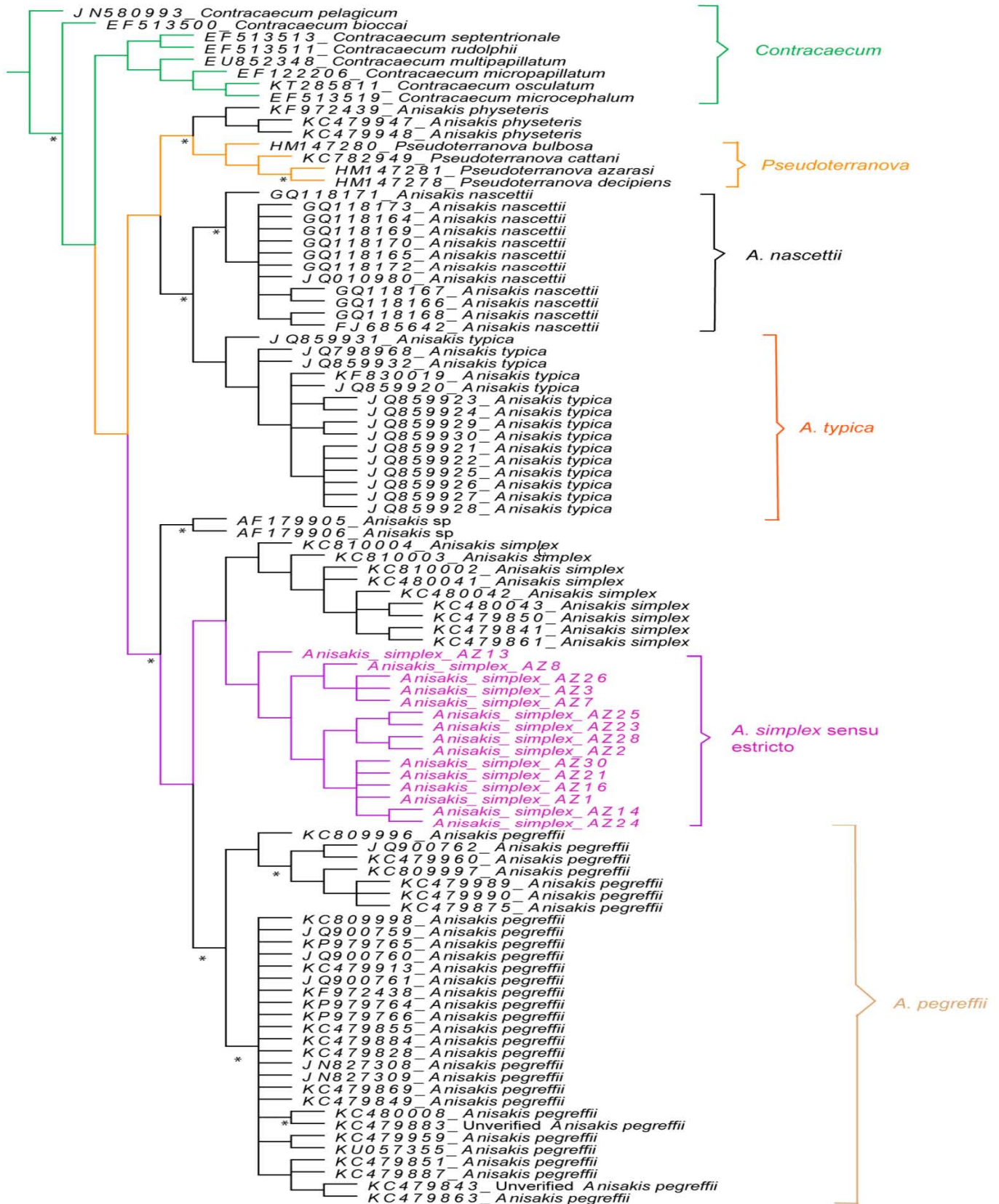


Fig. 15. Cladograma de consenso estricto de 10 árboles sin taxas excluidas obtenido por el método de máxima parsimonia obtenido por el método de parsimonia para el gen COII, con un CI= 0.42 y un valor de RI= 0.85. En color rosa las secuencias obtenidas en este trabajo y *clados con valor de bootstrap >75%.

VII. DISCUSIÓN

Tanto por la evidencia morfológica y los datos merísticos, así como por los análisis de distancias genéticas y filogenéticas que incluyen las secuencias de los nematodos recolectados de la musculatura de la trucha arcoíris con las secuencias generadas e identificadas por Mattiucci *et al.* (2014) y Sohn *et al.* (2014), se tiene evidencia de su pertenencia a una sola especie: *Anisakis simplex* s.s. El hallazgo de una sola especie de nematodo es sorprendente dada la amplitud de la dieta de la trucha arcoíris, aunado a las migraciones que realizan estos peces a lo largo del año y los registros de la distribución de la familia Anisakidae realizados por Kliks (1983), Myers (1979) y Shaw (1947) que mencionan varias especies encontradas en los ríos y costas del estado de Oregón. El hecho de que sólo se presente *A. simplex* s.s. en las muestras aquí analizadas puede indicar que existe mayor abundancia de este parásito y que, probablemente *A. simplex* s.s., se encuentra ampliamente distribuido en el hemisferio Norte y no ha sido afectado por fenómenos de aislamiento genético.

Todos los nematodos estudiados en el presente trabajo, poseen un diente larvario, mucrón y ventrículo sin invaginación del ciego intestinal, con lo que se comprobó que las L3 pertenecen a larvas Tipo I del género *Anisakis* (Miyazaki, 1991; Mattiucci & Nascetti, 2008; Measures, 2014). La determinación morfológica a nivel de especie en Quiazon *et al.* (2008) se realiza con base al largo total del gusano, la talla del ventrículo y la presencia o ausencia de un mucrón. La media del largo total de las L3 de los ejemplares aquí estudiados fue de 26.47 mm, con una desviación de 4.20 mm, una talla máxima de 32 mm y una mínima de 12 mm. En promedio el ventrículo midió 1.14 mm con una talla máxima de 1.41 mm y una mínima de 0.84 mm, estos datos coinciden con los reportados por Quiazon *et al.* (2008) por lo que se puede determinar que se trata de *Anisakis simplex* s.s.

Para ambos marcadores moleculares (COI y COII), las inferencias filogenéticas obtenidas mediante un análisis de máxima parsimonia dieron como resultado árboles en los que se presenta un clado que incluye a *A. simplex* s.s donde las secuencias generadas en este trabajo están señaladas en color rosa; la topología de ambos árboles es similar y *A. pregreffii* está como grupo hermano con valores altos de bootstrap (>85%). Sin embargo, aunque COI es el marcador por excelencia utilizado en el código de barras (Hebert, *et al.*, 2003b), Mattiucci y otros investigadores emplean frecuentemente el gen COII para este grupo de parásitos, por lo que COI no está bien representado en las bases de datos (p. ej. GenBank). Esto puede ocasionar una mala identificación si únicamente se emplea COI, por lo que es recomendable en este caso reafirmar la asignación de los individuos con secuencias de COII. En el árbol obtenido utilizando este marcador, las muestras aquí generadas aparecen mezcladas con muestras tanto de *A. simplex* s.s como de *A. typica*. Estas últimas son consideradas como malas identificaciones ya que asumimos que las muestras señaladas como KJ011506.1, KJ011505.1, KJ011504.1 y KJ011503.1, estudiadas por Sohn *et al.* (2014) son las validadas como *A. simplex* s.s.

Las 15 secuencias obtenidas para COII se agrupan en el mismo *cluster*, el cual es hermano de otras secuencias de *A. simplex* s.s., lo que confirma su pertenencia a esta especie. Además los resultados son equivalentes a los obtenidos por Mattiucci & Nascetti (2006) y Murata *et al.* (2011) para el mismo marcador molecular, donde *A. simplex* s.s. está como grupo hermano de *A. pegreffii* y tienen una topología compatible a lo representado en nuestro cladograma; con lo que se sustentan los resultados de este estudio y la topología obtenida del análisis de parsimonia. En el dendograma de Mattiucci & Nascetti (2008) se muestra la hipótesis filogenética de *Anisakis* spp. y sus hospederos definitivos, este análisis apoya de igual manera lo aquí obtenido y corresponde a la distribución geográfica de los hospederos y especies de *Anisakis* encontrados en el hemisferio Norte.

Los bajos valores de distancia genética (<1%) encontrados en las L3 colectadas, usando ambos marcadores, sugiere que todas ellas pertenecen a la misma especie: *A. simplex* s.s. Para el caso de COI se obtuvo un valor de 0.012% y para COII de 0.02%, lo que indica que COII tiene una tasa de sustitución más alta que COI, y muestra una mayor resolución para diferenciar poblaciones de esta especie. Es interesante notar la distancia genética que se encuentra entre nuestras muestras y las reportadas por Sohn *et al.* (2014) para el gen COI para *A. simplex* s.s., donde en promedio tiene una distancia de 2.41%, una distancia mínima de 1.05% y máxima de 3.74%; y para las muestras de COII para *Anisakis simplex* s.s. reportadas por Mattiucci *et al.*, 2014 (KC810004.1, KC810003.1 y KC810004.1), Blažeković *et al.*, 2015 (KC480041.1, KC480042.1 y KC480043.1) y Mladineo & Poljak, 2014 (KC479850.1 y KC479861.1) donde en promedio tienen una distancia de 2.90%, una distancia mínima de 1.46% y una máxima de 4.36%. Esto podría señalar que en la costa oeste de EUA existe posiblemente una población distinta a la de otras localidades del noroeste del Atlántico y de Japón, aunque es arriesgado afirmar debido a la migración dentro de las poblaciones y la distribución de las especies, que en un tiempo se podría dar una especiación.

Aunque el análisis de haplotipos se utiliza para inferir el grado de variación que existe dentro de un fragmento analizado de un gen en una población, decidimos emplearlo para detectar si existe deriva génica o migración dentro de la población. Nuestros resultados señalan una alta variación haplotípica que por lo reportado por Mladineo & Poljak (2014) sugiere que existe migración y se trata de una sola población atribuible a una única especie.

Para cada uno de los marcadores se obtuvo una alta diversidad haplotípica (ver Cuadro 3 y 4), esto indica que la población se encuentran en un punto estable y que con el muestreo realizado posiblemente se encontró representada la población dada la diversidad haplotípica que registra Mladineo & Poljak (2014); cabe mencionar que en el análisis de distancias NJ con el modelo de K2P

derivó que tanto COI y COII poseen una baja diversidad genética (Mattiucci *et al.*, 2009; Mladineo & Poljak, 2014), por lo que se pensaría que el número de haplotipos sería reducido, sin embargo esto no ocurrió debido a que no son variables dependientes y aunque la diversidad genética no sea grande, el cambio de bases o mutaciones dentro de las secuencias es alto y esto no implica necesariamente que se traten de individuos lejanos, sino que dentro de la población se encuentra un alto número de polimorfismos común en las especies de *Anisakis* y que sugiere eventos de migración (Mladineo & Poljak, 2014).

En el caso particular de la trucha arcoíris estudiada en el presente trabajo, al ser un pez anádromo, se puede considerar como un hospedero paraténico cuando migra a los ríos, porque en la mayoría de los casos estos peces son depredados por mamíferos que no son los hospederos definitivos de *Anisakis simplex* s.s. (Kennedy & Storer, 2000). Los seres humanos y otros animales, se consideran hospederos accidentales de las larvas de *Anisakis*, lo que implica que la L3 no logra madurar a adulto, pierde la oportunidad de reproducirse y por lo tanto pueden llegar a disminuir las poblaciones de parásitos debido a que las larvas no podrían parasitar a su hospedero definitivo como se ha registrado en Smith & Wootten (1978).

Debido a que existen registros de peces infectados por las larvas de *Anisakis* (Hauck *et al.*, 1977; Shields *et al.*, 2002), de adultos en los hospederos definitivos (Dailey & Stroud, 1978) en el estado de Oregón y que las truchas colectadas tuvieron una prevalencia del 100% de larvas de *Anisakis simplex* s.s. en estadio L3 y al ser reportadas por primera vez en los cauces que conectan con el Criadero de Cedar Creek, es importante alertar sobre la posibilidad de anisakiasis y la importancia de la preparación correcta de alimentos con base a pescado.

VIII. CONCLUSIONES

- Los datos morfométricos y la presencia de caracteres diagnósticos señalan que las muestras estudiadas corresponden a *A. simplex* s.s.
- Los análisis moleculares utilizando secuencias parciales de COI y COII señalan que los ejemplares estudiados pertenecen a *A. simplex* s.s.
- En ambos marcadores se obtuvo una baja diversidad genética y una alta diversidad haplotípica por lo que se concluye que se trata de una sola especie y se sugiere que existe migración dentro de la población.
- Al comparar los marcadores moleculares COI y COII se concluye que ambos son eficientes para la determinación taxonómica a nivel de especie de *Anisakis*, no obstante se detectaron mayores niveles de variación en el COII, por lo cual este marcador es más adecuado para estudios poblacionales.
- El uso del marcador molecular COII es adecuado para la identificación específica de las especies del género *Anisakis*, sin embargo sería bueno probar la eficacia de otro tipo de marcadores moleculares para la identificación taxonómica y aclarar la posición de las secuencias generadas en este trabajo en el cladograma.
- Se sugiere que los caracteres morfológicos y morfométricos son suficientes para identificar a nivel específico las especies del tipo I del género *Anisakis*, sin embargo se hace hincapié en el uso de marcadores moleculares para reafirmar su debida identificación.
- Las truchas arcoíris (*O. mykiss*), presentaron una prevalencia del 100% de larvas en estadio infectivo de *Anisakis simplex* s.s., aunado a los casos de anisakiasis en animales y humanos del estado de Oregón y a la capacidad zoonótica de las larvas de *Anisakis*, se recomienda la revisión de peces comerciales para evitar la anisakiasis.
- Se propone a la trucha arcoíris debido a sus características ecológicas como un hospedero paraténico.
- El presente trabajo representa el primer registro de *A. simplex* s.s. en trucha arcoíris en los cauces del río de Criadero de Cedar Creek, Oregón.

IX. LITERATURA CITADA

- ABOLLO, E., GESTAL, C., LÓPEZ, A., GONZÁLEZ, A. F., GUERRA, A., & PASCUAL, S. 1998. Squid as trophic bridges for parasite flow within marine ecosystems: the case of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae), or when the wrong way can be right. *South African Journal of Marine Science* **20**(1): 223-232.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, **215**(3): 403-410.
- ANDERSON, R.C. 2000. The superfamily Ascaridoidea. *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*: Oxon, United Kingdom. CABI Publishing pp. 267–314.
- ANDERSON, R. C., CHABAUD, A. G., WILLMOTT, S., & BUREAUX, C. A. 1978. CIH keys to the nematode parasites of vertebrates pp. 1-15
- AUDICANA, M. T., ANSOTEGUI, I. J., DE CORRES, L. F., & KENNEDY, M. W. 2002. *Anisakis simplex*: dangerous—dead and alive?. *Trends in parasitology* **18**(1): 20-25.
- AVISE, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- BALDWIN, R. E., REW, M. B., JOHANSSON, M. L., BANKS, M. A., & JACOBSON, K. C. 2011. Population structure of three species of *Anisakis* nematodes recovered from Pacific sardines (*Sardinops sagax*) distributed throughout the California Current System. *Journal of Parasitology* **97**(4): 545-554.
- BARRETT, J. C., FRY, B., MALLER, J. D. M. J., & DALY, M. J. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* **21**(2): 263-265.
- BICKFORD, D., LOHMAN, D. J., SODHI, N. S., NG, P. K., MEIER, R., WINKER, K., IGRAM, K. & DAS, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution* **22**(3): 148-155.
- BIRREN, B., & GREEN, E. D. (EDS.). 1997. *Genome analysis: a laboratory manual* (Vol. 4). CSHL Press pp. 223
- BLAXTER, M. L. 2003. Nematoda: genes, genomes and the evolution of parasitism. *Advances in Parasitology* **54**: 101-195.
- BLAŽEKOVIĆ, K., PLEIĆ, I. L., ĐURAS, M., GOMERČIĆ, T., & MLADINEO, I. 2015. Three *Anisakis* spp. isolated from toothed whales stranded along the eastern Adriatic Sea coast. *International journal for parasitology* **45**(1): 17-31.
- BLOUIN, M. S. 2002. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International journal for parasitology* **32**(5): 527-531.
- BRATTEY, J., & STENSON, G. B. 1993. Host specificity and abundance of parasitic nematodes (Ascaridoidea) from the stomachs of five phocid species from Newfoundland and Labrador. *Canadian Journal of Zoology* **71**(11): 2156-2166.

- BROMAGE, N., & CUMARANATUNGA, R. 1988. Egg production in the rainbow trout. In Recent advances in aquaculture. Springer Netherlands pp. 63-138.
- BRUSCA, R. C. & G. J. BRUSCA. 2005. Invertebrados. McGraw-Hill Interamericana. Madrid pp. 1005-1006.
- BRYAN, F. L. 1982. Diseases transmitted by foods:(a classification and summary).
- BUCKLIN, A., GUARNIERI, M., HILL, R. S., BENTLEY, A. M., & KAARTVEDT, S. 1999. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial COI sequence variation and competitive, species-specific PCR. In Molecular Ecology of Aquatic Communities. Springer Netherlands pp. 239-254.
- Cedar Creek Hatchery Plan. 2016. Program Management Plan. Oregon Department of Fish and Wildlife (ODFW). Oregon.
- CDC. 2016. Food. 29-11-16, de Centers for Disease Control and Prevention, Sitio web: <http://www.cdc.gov/parasites/food.html>
- CROMPTON, D. W. T., & SAVIOLI, L. 2006. Handbook of helminthiasis for public health. CRC Press. **1**: 10-22.
- CROSS, M. A., COLLINS, C., CAMPBELL, N., WATTS, P. C., CHUBB, J. C., CUNNINGHAM, C. O., HATFIELD, C. & MACKENZIE, K. 2007. Levels of intra-host and temporal sequence variation in a large CO 1 sub-units from *Anisakis simplex* sensu stricto (Rudolphi 1809) (Nematoda: Anisakidae): implications for fisheries management. Marine Biology **151**(2): 695-702.
- DAILEY, M., & STROUD, R. 1978. Parasites and associated pathology observed in cetaceans stranded along the Oregon coast. Journal of Wildlife Diseases **14**(4): 503-511.
- DAVEY, J. T. 1971a. A case of *Anisakis* sp. infection in a brown bear from Alaska. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **65**(4): 433-434.
- DAVEY, J. T. 1971b. A revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridata). Journal of Helminthology **45**(1): 51-72.
- DE LEY, P., & BLAXTER, M. 2004. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. Nematology monographs and perspectives **2**: 633-653.
- DE LEY, P., & BLAXTER, M. L. 2002. Systematic position and phylogeny. The biology of nematodes 1-30.
- DRUMMOND, A., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MENTJIES, P., & M., KEARSE. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics **28**(12): 1647-1649.
- EDGAR, R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic acids research **32**(5): 1792-1797.
- GALL, G. A. E. & CRANDELL, P. A. 1992. The rainbow trout. Aquaculture **100**:1-10.

- GOLOBOFF, P. A., FARRIS, J. S., & NIXON, K. C. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* **24**(5): 774-786.
- HAUCK, A. K., & MAY, E. B. 1977. Histopathologic alterations associated with *Anisakis* larvae in Pacific herring from Oregon. *Journal of Wildlife Diseases*, **13**(3): 290-293.
- HEBERT, P. D., CYWINSKA, A., & BALL, S. L. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**(1512): 313-321.
- HEBERT, P. D., RATNASINGHAM, S., & DE WAARD, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**(Suppl 1): S96-S99.
- HOBERG, E. P., HENNY, C. J., HEDSTROM, O. R., & GROVE, R. A. 1997. Intestinal helminths of river otters (*Lutra canadensis*) from the Pacific Northwest. *The Journal of parasitology* 105-110.
- HODDA, M. 2007. Phylum Nematoda. *Zootaxa*, **1668**(1): 265-293.
- HUH, S., SOHN, W. M., & CHAI, J. Y. 1993. Intestinal parasites of cats purchased in Seoul. *The Korean journal of parasitology* **31**(4): 371-373.
- IHAKA, R., & GENTLEMAN, R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics* **5**(3): 299-314.
- JARMAN, S. N., & ELLIOTT, N. G. 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae, 'living fossils' from the Triassic. *Journal of Evolutionary Biology* **13**(4): 624-633.
- JOHNS, G. C., & AVISE, J. C. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution* **15**(11): 1481-1490.
- KAGEI, N. 1995. A case of hepatic anisakiasis with a literal survey for extra-gastrointestinal anisakiasis. *Jpn J Parasitol* **44**: 346-351.
- KENNEDY, G. G., & STORER, N. P. 2000. Life systems of polyphagous arthropod pests in temporally unstable cropping systems. *Annual review of entomology* **45**(1): 467-493.
- KIEWNICK, S., HOLTERMAN, M., VAN DEN ELSEN, S., VAN MEGEN, H., FREY, J. E., & HELDER, J. 2014. Comparison of two short DNA barcoding loci (COI and COII) and two longer ribosomal DNA genes (SSU & LSU rRNA) for specimen identification among quarantine root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and their close relatives. *European journal of plant pathology* **140**(1): 97-110.
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* **16**(2): 111-120.
- KISHI, D. 2015. El sushi en Japón y en el mundo. *México y la Cuenca del Pacífico* **11**(32): 57-66.
- KLIKS, M. M. 1983. Anisakiasis in the western United States: four new case reports from California. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **32**(3): 526-532.

- KLIMPEL, S., KELLERMANN, E., & PALM, H. W. 2008. The role of pelagic swarm fish (Myctophidae: Teleostei) in the oceanic life cycle of *Anisakis* sibling species at the Mid-Atlantic Ridge, Central Atlantic. *Parasitology Research* **104**(1): 43-53.
- KLIMPEL, S., PALM, H. W., RÜCKERT, S., & PIATKOWSKI, U. 2004. The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). *Parasitology research* **94**(1): 1-9.
- KRESS, W. J., & ERICKSON, D. L. 2012. DNA barcodes: methods and protocols. Humana Press. 3-8.
- KURAMOCHI, T., MACHIDA, M., ARAKI, J., UCHIDA, A., KISHIRO, T., & NAGASAWA, K. 1996. Minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) are one of the major final hosts of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) in the northwestern North Pacific Ocean. *Report-International Whaling Commission* **46**: 415-420.
- LAMBSHEAD, P. J. D., BROWN, C. J., FERRERO, T. J., HAWKINS, L. E., SMITH, C. R., & MITCHELL, N. J. 2003. Biodiversity of nematode assemblages from the region of the Clarion-Clipperton Fracture Zone, an area of commercial mining interest. *BMC ecology* **3**(1): 1.
- LIBRADO, P., & ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**(11): 1451-1452.
- LIPSCOMB, D. 1998. Basics of cladistic analysis. George Washington University 75.
- LÓPEZ-CABALLERO, J., OCEGUERA-FIGUEROA, A., & LEÓN-RÉGAGNON, V. 2013. Detection of multiple species of human *Paragonimus* from Mexico using morphological data and molecular barcodes. *Molecular ecology resources* **13**(6): 1125-1136.
- LOTINA, R., & HORMAECHEA, M. 1975. Peces de mar y de río. Editorial Asauri pp. 12-15.
- LOWE, S., BROWNE, M., BOUDJELAS, S., & DE POORTER, M. 2004. 100 de las Especies Exóticas Invasoras más dañinas del mundo. The invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN).
- MARGOLIS, L., GROFF, J. M., JOHNSON, S. C., MCDONALD, T. E., KENT, M. L., & BLAYLOCK, R. B. 1997. Helminth parasites of sea otters (*Enhydra lutris*) from Prince William Sound, Alaska: comparisons with other populations of sea otters and comments on the origin of their parasites. *Journal-Helminthological Society Washington* **64**: 161-168.
- MATSUMOTO, H. 2007. The internationalization of sushi. *Food Culture* **15**: 2-6.
- MATTIUCCI, S., & NASCETTI, G. 2006. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite* **13**(2): 99-113.
- MATTIUCCI, S., & NASCETTI, G. 2008. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host—parasite co-evolutionary processes. *Advances in parasitology* **66**: 47-148.
- MATTIUCCI, S., CIPRIANI, P., WEBB, S. C., PAOLETTI, M., MARCER, F., BELLISARIO, B., GIBSON, D. I. & NASCETTI, G. 2014. Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *The Journal of parasitology* **100**(2): 199-214.

- MATTIUCCI, S., D'AMELIO, S., & ROKICKI, J. 1989. Electrophoretic identification of *Anisakis* sp. larvae (Ascaridida: Anisakidae) from *Clupea harengus* L. in Baltic Sea. *Parassitologia* **31**(1): 45-49.
- MATTIUCCI, S., FAZII, P., DE ROSA, A., PAOLETTI, M., MEGNA, A. S., GLIELMO, A., DE ANGELIS, M., COSTA, A., MEUCCI, C., CALVARUSO, V., SORRENTINI, I., PALMA, G., BRUSCHI, F. & SORRENTINI, I. 2013. Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. *Emerging infectious diseases* **19**(3): 496.
- MATTIUCCI, S., NASCETTI, G., CLANCHI, R., PAGGI, L., ARDUINO, P., MARGOLIS, L., BRATTEY, J., WEBB, S., D'AMELIO S., ORECCHIA, P. & BULLINI, L. 1997. Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex, with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *The Journal of parasitology* **83**(3): 401-416.
- MATTIUCCI, S., NASCETTI, G., DAILEY, M., WEBB, S. C., BARROS, N. B., CIANCHI, R., & BULLINI, L. 2005. Evidence for a new species of *Anisakis Dujardin*, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology* **61**(3): 157-171.
- MATTIUCCI, S., PAGGI, L., NASCETTI, G., PORTES SANTOS, C., COSTA, G., DI BEDITTO, A. P., RAMOS, R., ARGYROU, M., CIANCHI, R. & BULLINI, L. 2002. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis Dujardin*, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Systematic parasitology* **51**(3): 159-170.
- MATTIUCCI, S., PAOLETTI, M., BORRINI, F., PALUMBO, M., PALMIERI, R. M., GOMES, V., CASATI, A., & NASCETTI, G. 2011. First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infectious Diseases* **11**(1): 82.
- MATTIUCCI, S., PAOLETTI, M., & WEBB, S. C. 2009. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology* **74**(3): 199-217.
- MATTIUCCI, S., PAOLETTI, M., OLIVERO-VERBEL, J., BALDIRIS, R., ARROYO-SALGADO, B., GARBIN, L., NAVONE, G. & NASCETTI, G. 2008. *Contraecaecum bioccai* n. sp. from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* (L.) in Colombia (Nematoda: Anisakidae): morphology, molecular evidence and its genetic relationship with congeners from fish-eating birds. *Systematic Parasitology* **69**(2): 101-121.
- MEAD, P. S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L. F., BRESEE, J. S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P. M. & TAUXE, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases* **5**(5): 607.
- MEASURES, L.N. (2014). Anisakiosis and pseudoterranovosis: Reston, Va., U.S. Geological Survey Circular **1393**(2): 34.
- MIYAZAKI, I. (1991). An illustrated book of helminthic zoonoses (No. 62). Tokyo: International Medical Foundation of Japan 314-327.

- MLADINEO, I., & POLJAK, V. 2014. Ecology and genetic structure of zoonotic *Anisakis* spp. from Adriatic commercial fish species. *Applied and environmental microbiology* **80**(4): 1281-1290.
- MORRONE, J. J. 2013. Sistemática. Fundamentos, métodos, aplicaciones. UNAM, México DF.
- MURATA, R., SUZUKI, J., SADAMASU, K., & KAI, A. 2011. Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitology international* **60**(2): 193-198.
- MURRELL, K. D., & FRIED, B. (EDS.). 2007. Food-borne parasitic zoonoses: fish and plant-borne parasites. Springer Science & Business Media **11**(5): 185-207.
- MYERS, B. J. 1979. Anisakine nematodes in fresh commercial fish from waters along the Washington, Oregon and California coasts. *Journal of Food Protection* **42**(5): 380-384.
- NADLER, S. A., & HUDSPETH, D. S. 2000. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *Journal of Parasitology* **86**(2): 380-393.
- NADLER, S. A., D'AMELIO, S., FAGERHOLM, H. P., BERLAND, B., & PAGGI, L. 2000. Phylogenetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaris* Høst, 1932 (Nematoda [ratio] Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. *Parasitology* **121**(4): 455-463.
- NAGASAWA, K., & MORAVEC, F. 1995. Larval anisakid nematodes of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*) from the Sea of Japan. *The Journal of parasitology* 69-75.
- NASCETTI, G., PAGGI, L., ORECCHIA, P., SMITH, J. W., MATTIUCCI, S., & BULLINI, L. 1986. Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North-East Atlantic. *International Journal for Parasitology* **16**(6): 633-640.
- OSHIMA, T. (1972). *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. *Progress of medical parasitology in Japan* **4**: 305-393.
- PAGGI, L., MATTIUCCI, S., ISHIKURA, H., KIKUCHI, K., SATO, N., NASCETTI, G., CIANCHI, R. & BULLINI, L. 1998a. Molecular genetics in anisakid nematodes from the Pacific Boreal Region. In *Host response to International Parasitic Zoonoses*. Springer Japan. 83-107.
- PAGGI, L., NASCETTI, G., WEBB, S. C., MATTIUCCI, S., CIANCHI, R., & BULLINI, L. 1998b. A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae) from beaked whales (*Ziphiidae*): allozyme and morphological evidence. *Systematic Parasitology* **40**(3): 161-174.
- PALMER, S. R., SOULSBY, L., & SIMPSON, D. I. H. 1998. *Zoonoses: biology, clinical practice and public health control*. Oxford university press.
- PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G., & GARCÍA-PRIETO, L. 2001a. Los parásitos en el contexto de la biodiversidad y la conservación. *Biodiversitas* **34**: 11-15.
- PÉREZ-PONCE DE LEÓN, G., & GARCÍA-PRIETO, L. 2001b. Diversidad de helmintos parásitos de vertebrados silvestres de México. *Biodiversitas* **37**: 7-11.
- PFENNINGER, M., & SCHWENK, K. 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology* **7**(1): 121.

- POMPANON, F., DEAGLE, B. E., SYMONDSON, W. O., BROWN, D. S., JARMAN, S. N., & TABERLET, P. 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* **21**(8): 1931-1950.
- PUFALL, E. L., JONES-BITTON, A., MCEWEN, S. A., BROWN, T. M., EDGE, V. L., ROKICKI, J., K., KARPIEJ, A. S. PEREGRINE. & SIMARD, M. 2012. Prevalence of zoonotic Anisakid nematodes in Inuit-harvested fish and mammals from the eastern Canadian Arctic. *Foodborne pathogens and disease* **9**(11): 1002-1009.
- QUIAZON, K. M. A., YOSHINAGA, T., & OGAWA, K. 2011. Experimental challenge of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitology international* **60**(2): 126-131.
- QUIAZON, K. M. A., YOSHINAGA, T., OGAWA, K., & YUKAMI, R. 2008. Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitology International* **57**(4): 483-489.
- QUIJADA, J., LIMA DOS SANTOS, C., & AVDALOV, N. 2005. Enfermedades parasitarias por consumo de pescado. *Inc. Am. Latina* **24**: 1-10.
- ROJAS, A., LAMOTHE Y ARGUMEDO, M. F., & GARCÍA-PRIETO, L. 2014. Parasitosis transmitidas por el consumo de peces en México *Parasitosis. Ciencia* **65**(2): 83-87.
- SACCONI, C., DE GIORGI, C., GISSI, C., PESOLE, G., & REYES, A. 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* **238**(1): 195-209.
- SCHOLZ T., GARCÍA H. H., KUCHTA R. Y WICHT B. 2009. Update on the human broad tapeworm (genus *Diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clin. Microbiol.* **1**: 146-60.
- SHAW, J. N. 1947. Some parasites of Oregon wild life pp. 16
- SHIELDS, B. A., BIRD, P., LISS, W. J., GROVES, K. L., OLSON, R., & ROSSIGNOL, P. A. 2002. The nematode *Anisakis simplex* in American shad (*Alosa sapidissima*) in two Oregon rivers. *Journal of Parasitology*, **88**(5): 1033-1035.
- SIANTO, L., CHAME, M., SILVA, C. S., GONÇALVES, M. L., REINHARD, K., FUGASSA, M., & ARAÚJO, A. 2009. Animal helminths in human archaeological remains: a review of zoonoses in the past. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **51**(3): 119-130.
- SMITH, J. W. 1971. *Thysanoessa inermis* and *T. longicaudata* (Euphausiidae) as first intermediate hosts of *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridata) in the northern North Sea, to the north of Scotland and at Faroe. *Nature* **234**(5330): 478-478.
- SMITH, J. W. 1999. Ascaridoid nematodes and pathology of the alimentary tract and its associated organs in vertebrates, including man: a literature review. In *Helminthological Abstracts* **68**(2): 49-96.
- SMITH, J. W., & WOOTTEN, R. 1978. *Anisakis* and anisakiasis. *Advances in parasitology* **16**: 93-163.

- SOHN, W. M., KANG, J. M., & NA, B. K. 2014. Molecular analysis of *Anisakis* type I larvae in marine fish from three different sea areas in Korea. *The Korean journal of parasitology* **52**(4): 383-389.
- SWOFFORD, D. L. 2002. PAUP 4.0 b10. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Software distributed by Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- TAKABE, K., OHKI, S., KUNIHIRO, O., SAKASHITA, T., ENDO, I., ICHIKAWA, Y., SEKIDO, H., AMANO, T., NAKATANI, Y., SUZUKI, K. & SHIMADA, H. 1998. Anisakidosis: a cause of intestinal obstruction from eating sushi. *The American journal of gastroenterology* **93**(7): 1172-1173.
- TORRES-OROZCO, B., & TORRES-OROZCO, R. E. 1991. Los peces de México. AGT editor. México pp. 235
- TREWICK, S. A. 2000. Mitochondrial DNA sequences support allozyme evidence for cryptic radiation of New Zealand Peripatoides (Onychophora). *Molecular Ecology* **9**(3): 269-281.
- TUEMMERS, C., NUÑEZ, C., WILLGERT, K., & SERRI, M. 2015. Anisakiasis y Difilobotriasis. Ictiozoonosis de riesgo para la salud pública asociada al consumo del pescado crudo en Chile. *Revista de la Universidad del Zulia* **5**(11).
- USPENSKAYA, A. V. 1963. Parasite fauna of benthic crustaceans of the Barents Sea. Moscow–Leningrad: Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR.
- WEINSTEIN, S. B., & KURIS, A. M. 2016. Independent origins of parasitism in Animalia. *Biology letters* **12**(7): 324.
- WOOTTEN, R., & SMITH, J. W. 1975. Observational and experimental studies on the acquisition of *Anisakis* sp. larvae (Nematoda: Ascaridida) by trout in fresh water. *International journal for parasitology* **5**(3): 373-378.

X. ANEXOS

Anexo 1. Distribución mundial de las especies del género *Anisakis* y sus hospederos definitivos. Modificado de Measures (2014).

Especies del género <i>Anisakis</i>, su hospedero definitivo y su distribución geográfica			
Especies de <i>Anisakis</i>	Hospedero		Distribución geográfica
	Nombre científico	Nombre común	
<i>Anisakis berlandi</i>	<i>Globicephala melas</i>	Calderón común	Océano Atlántico suroriental (aguas costeras sudafricanas), Sureste del Océano Pacífico (aguas costeras de Nueva Zelanda)
	<i>Lissodelphis borealis</i>	Delfín septentrional sin aleta	Noroeste del Océano Pacífico
	<i>Mirounga angustirostris</i>	Elefante marino del norte	Noroeste del Océano Pacífico
	<i>Mirounga leonina</i>	Elefante marino del sur	Aguas subantárticas
	<i>Pseudorca crassidens</i>	Orca negra/ falsa orca	Noroeste del Océano Pacífico
<i>Anisakis brevispiculata</i>	<i>Kogia breviceps</i>	Cachalote pigmeo	Océano Atlántico (aguas costeras de Florida, ibéricas y africanas)
	<i>Kogia sima</i>	Cachalote enano	Mar Caribe
<i>Anisakis nascetti</i>	<i>Mesoplodon bowdoini</i>	Zifio de Andrew	Océano Pacífico Suroeste (aguas costeras de Nueva Zelanda)
	<i>Mesoplodon densirostris</i>	Zifio de Blainville	Océano Pacífico (Nueva Zelanda)
	<i>Mesoplodon layardii</i>	Zifio de Layard	Océano Pacífico Suroeste (aguas costeras de Nueva Zelanda)
	<i>Mesoplodon mirus</i>	Zifio de True	Océano Atlántico suroriental (aguas costeras sudafricanas)
<i>Anisakis paggiae</i>	<i>Kogia sima</i>	Cachalote enano	Océano Atlántico (aguas costeras de la Florida y Sudáfrica), Mar Caribe
<i>Anisakis pegreffii</i>	<i>Caperea marginata</i>	Ballena franca pigmea	Océano Atlántico suroriental (aguas costeras sudafricanas)
	<i>Delphinus delphis</i>	Delfín común	Océano Atlántico (aguas costeras ibéricas), Mar Mediterráneo Occidental
	<i>Globicephala melas</i>	Calderón común	Océano Pacífico suroriental (costa de Nueva Zelanda)
	<i>Monachus monachus</i>	Foca monje del Mediterráneo	Mar Mediterraneo
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Delfín listado	Mar Mediterraneo
	<i>Tursiops truncatus</i>	Delfín nariz de botella	Mar Mediterráneo Central y aguas costeras sudafricanas
<i>Anisakis physeteris</i>	<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalote	Mar Mediterraneo Central

<i>Anisakis simplex</i> sensu stricto	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Ballena Minke	Noreste del Océano Atlántico
	<i>Delphinus delphis</i>	Delfín común	Este del Océano Atlántico (aguas costeras ibéricas)
	<i>Delphinapterus leucas</i>	Beluga	Noroeste del Océano Atlántico
	<i>Globicephala melas</i>	Calderón común	Océano Atlántico (aguas costeras ibéricas y sudafricanas)
	<i>Lagenorhynchus albirostris</i>	Delfín de hocico blanco	Noreste del Océano Atlántico
	<i>Orcinus orca</i>	Orca	Océano Pacífico Noreste
	<i>Phocoena phocoena</i>	Marsopa común	Noreste del Océano Pacífico.
	<i>Pseudorca crassidens</i>	Orca negra/ falsa orca	Océano Pacífico Noreste
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Delfín listado	Este Océano Atlántico (aguas costeras ibéricas)
<i>Anisakis typica</i>	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Calderón tropical	Océano Atlántico (aguas costeras de Florida)
	<i>Stenella coeruleoalba</i>	Delfín listado	Mar Mediterráneo Oriental
	<i>Stenella attenuata</i>	Delfín manchado tropical	Océano Atlántico Noroeste (aguas costeras de Florida) y Mar Caribe.
	<i>Steno bredanensis</i>	Delfín de hocico estrecho	Mar Caribe
	<i>Sotalia fluviatilis</i>	Tucuxi	Océano Atlántico suroeste (aguas costeras brasileñas)
	<i>Sotalia guianensis</i>	Delfín costero	Océano Atlántico suroeste (aguas costeras brasileñas)
	<i>Stenella longirostris</i>	Delfín acróbata	Océano Atlántico suroeste (aguas costeras brasileñas)
	<i>Tursiops truncatus</i>	Delfín nariz de botella	Océano Atlántico (aguas costeras de Florida), Mar Caribe
<i>Anisakis ziphidarum</i>	<i>Mesoplodon bowdoini</i>	Zifio de Andrew	Océano Pacífico Suroeste (aguas costeras de Nueva Zelanda)
	<i>Mesoplodon densirostris</i>	Zifio de Blainville	Océano Atlántico suroriental (aguas costeras sudafricanas)
	<i>Mesoplodon europaeus</i>	Zifio de Gervais	Mar Caribe
	<i>Mesoplodon grayi</i>	Zifio de Gray	Océano Atlántico suroeste (aguas costeras brasileñas)
	<i>Mesoplodon layardii</i>	Zifio de Layard	Océano Atlántico suroriental (aguas costeras sudafricanas)
	<i>Mesoplodon mirus</i>	Zifio de True	Océano Atlántico suroeste (aguas costeras brasileñas)
	<i>Ziphius cavirostris</i>	Ballenato de Cuvier	Mar Mediterráneo Central, aguas costeras sudafricanas y Mar Caribe

Anexo 2. Análisis de Blast con el 99% de identidad para las secuencias de COI, obtenido de GenBank y su código de acceso.

Análisis de Blast para el gen COI			
Muestra	Especie	Valor de e	Código de acceso de GenBank
AZ1	<i>A. simplex</i>	99%	KF356658.1
AZ2			JN786327.1
AZ3			JN786328.1
AZ4			JN786328.1
AZ6			JN786328.1
AZ7			JN786328.1
AZ8			JN786328.1
AZ10			JN786326.1
AZ11			KF356658.1
AZ12			JN786328.1
AZ13			JN786328.1
AZ15			JN786324.1
AZ16			JN786324.1
AZ17			JN786324.1
AZ18			JN786328.1
AZ21			KF356658.1
AZ22			JN786328.1
AZ23			JN786325.1
AZ24			JN786324.1
AZ25			JN786325.1
AZ26	JN786328.1		
AZ27	JN786325.1		
AZ5	<i>A. typica</i>	99%	KF356666.1
AZ19			KF356666.1
AZ20			KF356666.1

Anexo 3. Análisis de Blast con el 99% de identidad para las secuencias de COII obtenido de GenBank y su código de acceso.

Análisis de Blast para el gen COII			
Muestra	Especie	Valor de e	Código de acceso a GenBank
AZ1	<i>A. simplex</i>	99%	JN786324.1
AZ13			JN786323.1
AZ14			JN786324.1
AZ16			JN786324.1
AZ2			JN786327.1
AZ21			JN786324.1
AZ23			JN786325.1
AZ24			JN786324.1
AZ25			JN786325.1
AZ26			AB517560.1
AZ28			JN786327.1
AZ3			AB517560.1
AZ30			JN786324.1
AZ7			AB517560.1
AZ8			AB517560.1

Anexo 4. Lista de las secuencias obtenidas de GenBank con especie y número de acceso, utilizadas para elaborar el árbol de máxima parsimonia de COI.

Secuencias obtenidas de GenBank para COI	
Especie	Acceso
Género <i>Pseudoterranova</i>	
<i>P. azarasi</i>	AJ891140.1
<i>P. bulbosa</i>	AJ891142.1
<i>P. cattani</i>	KF545942.1
<i>P. decipiens</i>	AJ891150.1
<i>P. krabbei</i>	AJ891153.1
Género <i>Contracaecum</i>	
<i>C. osculatum</i>	AJ405318.1
	NC_024037.1
	KC965057.1
<i>C. rudolphii</i>	FJ866816.1
	FJ905109.1

Género <i>Anisakis</i>	
<i>A. brevispiculata</i>	KJ786253.1
	KJ786254.1
	KF356660.1
	KF356662.1
	KF356661.1
<i>A. paggiae</i>	KJ786251.1
<i>A. pegreffii</i>	KF356655.1
	KF356654.1
	KF356656.1
	KJ011521.1
	KJ011512.1
	KJ011520.1
	KJ011511.1
	KJ011508.1
	KJ011518.1
	KJ011515.1
	KJ011514.1
	KJ011507.1
	KJ011519.1
	KJ011523.1
	KJ011522.1
	KJ011513.1
	KJ011510.1
	KJ011517.1
	KJ011516.1
	KJ011509.1
<i>A. simplex</i>	KF356657.1
	JN786328.1
	KF356659.1
	KF356658.1
	JN786324.1
	JN786323.1
	JN786326.1
	JN786327.1
	JN786325.1
	KJ011506.1
	KJ011505.1
	KJ011504.1
	KJ011503.1
	JN786322.1

<i>A. simplex</i>	JN786321.1
	KC965056.1
	JN786320.1
	JN786318.1
	JN786319.1
	JN786317.1
	NC_007934.1
	AY994157.1
	NC_026023.1
	JN786316.1
<i>A. typica</i>	KF693786.1
	KF693785.1
	KF356666.1
	KF356664.1
	KF356665.1
	KF356663.1
	KJ786265.1
	KF356669.1
	KJ786264.1
	KF356668.1
KF356667.1	
<i>A. ziphidarum</i>	KF214811.1
	KF214810.1
	KF214809.1
<i>Anisakis</i> sp.	KJ786269.1
	KJ786268.1
	KF214807.1
	KF214806.1
	KJ786267.1
	KF214808.1
	KJ786266.1

Los recuadros señalados en color gris pertenecen a las secuencias de Sohn *et al.*, 2014, las cuales se emplearon como referencia para determinar la pertenencia de las secuencias de COI generadas en este trabajo a *Anisakis simplex* s.s.. Mismas secuencias se encuentran resaltadas con *** en el árbol de máxima parsimonia de COI.

Anexo 5. Lista de las secuencias obtenidas de GenBank con especie y número de acceso, utilizadas para elaborar el árbol de máxima parsimonia de COII.

Secuencias obtenidas de GenBank para COII	
Especie	Acceso
Género <i>Pseudoterranova</i>	
<i>P. azarasi</i>	HM147281.1
<i>P. bulbosa</i>	HM147280.1
<i>P. cattani</i>	KC782949.1
<i>P. decipiens</i>	HM147278.1
Género <i>Contracaecum</i>	
<i>C. bioccai</i>	EF513500.1
<i>C. microcephalum</i>	EF122206.1
	EF513519.1
<i>C. multipapillatum</i>	EU852348.1
<i>C. osculatum</i>	KT285811.1
<i>C. pelagicum</i>	JN580993.1
<i>C. rudolphii</i>	EF513511.1
<i>C. septentrionale</i>	EF513513.1
Género <i>Anisakis</i>	
<i>A. nascettii</i>	GQ118171.1
	GQ118173.1
	GQ118164.1
	GQ118169.1
	GQ118170.1
	GQ118165.1
	GQ118172.1
	JQ010980.1
	GQ118168.1
	GQ118167.1
	GQ118166.1
	FJ685642.1
<i>A. pegreffii</i>	KC809996.1
	JQ900762.1
	KC479960.1
	KC809997.1
	KC479989.1
	KC479990.1
	KC479875.1
	KC809998.1
JQ900759.1	

<i>A. pegreffii</i>	KP979765.1
	JQ900760.1
	KC479913.1
	JQ900761.1
	KF972438.1
	KP979766.1
	KP979764.1
	KC479855.1
	KC479884.1
	KC479828.1
	JN827308.1
	JN827309.1
	KC479869.1
	KC479849.1
	KC480008.1
	KC479883.1
	KC479959.1
	KU057355.1
	KC479851.1
	KC479887.1
KC479843.1	
KC479863.1	
<i>A. physeteris</i>	KC479948.1
	KC479947.1
	KF972439.1
<i>A. simplex</i>	KC810004.1
	KC810002.1
	KC810003.1
	KC480041.1
	KC480042.1
	KC480043.1
	KC479850.1
	KC479841.1
	KC479861.1
<i>A. typica</i>	JQ859931.1
	JQ859922.1
	JQ859921.1
	JQ859924.1
	JQ859923.1
	JQ859929.1
	JQ859930.1

<i>A. typica</i>	JQ859928.1
	JQ859927.1
	JQ859926.1
	JQ859925.1
	JQ798968.1
	JQ859932.1
	JQ859920.1
	KF830019.1
<i>Anisakis</i> sp.	AF179906.1
	AF179905.1

Anexo 6. Medidas morfométricas en mm de las larvas en estadio L3 de *A. simplex* s.s.

Morfometría de las larvas en estadio L3 de <i>Anisakis simplex</i> s.s.											
AZ	LT	AM	AN	PE	AP	M	LE	AE	LV	%LV-LE	%LT-LE
1	26	0.47	0.16	0.10	0.05	0.01	22.29	0.39	1.14	5.11	85.73
2	23	0.39	0.14	0.09	0.04	0.02	19.66	0.31	1.09	5.54	85.48
3	30	0.56	0.08	0.05	0.03	0.01	26.42	0.39	1.05	3.97	88.07
4	26	0.45	0.11	0.11	0.04	0.02	22.48	0.35	1.18	5.25	86.46
5	26	0.51	0.21	0.10	0.03	0.01	23.01	0.25	0.84	3.65	88.50
6	22	0.54	0.29	0.10	0.02	0.01	18.73	0.46	1.11	5.93	85.14
7	12	0.43	0.14	0.08	0.02	0.02	9.79	0.31	1.05	10.73	81.58
8	28	0.56	0.36	0.10	0.05	0.01	24.36	0.43	1.31	5.38	87.00
9	32	0.49	0.45	0.11	0.03	0.02	28.14	0.46	1.33	4.73	87.94
10	30	0.51	0.62	0.10	0.02	0.02	26.12	0.46	1.41	5.40	87.07
11	24	0.41	0.41	0.06	0.02	0.02	20.98	0.32	1.05	5.00	87.42
12	26	0.43	0.43	0.08	0.03	0.01	22.36	0.34	1.35	6.04	86.00
13	28	0.47	0.54	0.07	0.01	0.02	24.33	0.40	1.03	4.23	86.89
14	27	0.51	0.32	0.08	0.02	0.01	23.36	0.43	1.31	5.61	86.52
15	25	0.47	0.49	0.08	0.03	0.02	21.83	0.38	1.09	4.99	87.32
16	26	0.49	0.17	0.12	0.02	0.02	22.34	0.44	1.22	5.47	85.92
17	27	0.45	0.18	0.08	0.04	0.02	23.19	0.35	1.26	5.45	85.89
18	25	0.45	0.18	0.09	0.04	0.02	22.02	0.35	1.01	4.57	88.08
19	32	0.43	0.21	0.14	0.04	0.01	27.8	0.36	1.35	4.86	86.88
20	32	0.49	0.23	0.15	0.02	0.01	28.79	0.43	1.16	4.02	89.97
21	23	0.41	0.20	0.10	0.05	0.02	19.74	0.32	0.96	4.89	85.83
22	30	0.45	0.18	0.08	0.03	0.02	26.38	0.35	1.07	4.06	87.93
23	30	0.45	0.28	0.11	0.04	0.01	26.83	0.40	1.07	3.99	89.43
24	31	0.62	0.25	0.09	0.02	0.01	27.31	0.36	1.39	5.10	88.10
25	26	0.45	0.19	0.06	0.03	0.01	22.68	0.49	1.29	5.67	87.23
26	28	0.54	0.18	0.07	0.02	0.01	24.34	0.46	1.09	4.49	86.93
27	28	0.47	0.25	0.09	0.04	0.02	24.14	0.46	1.18	4.88	86.21
28	29	0.62	0.24	0.08	0.05	0.02	25.57	0.50	1.07	4.19	88.17
29	19	0.36	0.15	0.09	0.02	0.02	16.54	0.19	0.84	5.05	87.05
30	23	0.45	0.21	0.10	0.03	0.01	19.85	0.36	1.01	5.07	86.30

Donde AZ= ejemplar, LT= longitud total, AM= ancho máximo, AN= distancia del anillo nervioso, PE= poro excretor, AP= ano al extremo posterior, M= mucrón, LE= longitud del esófago, AE= ancho del esófago, LV= longitud del ventrículo esofágico, %LV-LE= porcentaje de la longitud del ventrículo contra la longitud del esófago y %LT-LE= porcentaje de la longitud total del gusano contra la longitud del esófago.