

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
POSTGRADO EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Presencia de parásitos (Nematoda: Anisakidae) en peces de agua dulce destinados al consumo humano en Costa Rica y Guatemala.

SUSTENTANTE

LUIS FELIPE CHOC MARTÍNEZ

“CAMPUS BENJAMÍN NUÑEZ”

HEREDIA

Marzo, 2018

Tesis sometida a consideración del tribunal Examinador del Postgrado en Ciencias Veterinarias Tropicales para aspirar al grado académico de *Magister Scientiae* en Enfermedades Tropicales

Presencia de parásitos (Nematoda: Anisakidae) en peces de agua dulce destinados al consumo humano en Costa Rica y Guatemala.

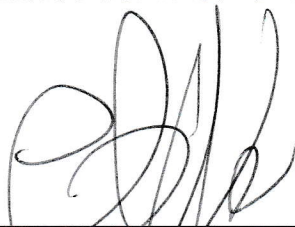
SUSTENTANTE

LUIS FELIPE CHOC MARTÍNEZ

Tesis presentada para aspirar al grado académico de *Magister Scientiae* en
Enfermedades Tropicales

Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Postgrado
de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

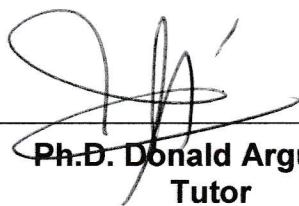
Miembros del Tribunal Examinador



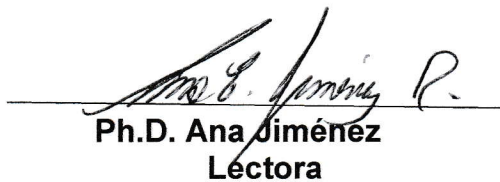
Caterina Guzmán Verri
Representante del Consejo Central de Postgrado



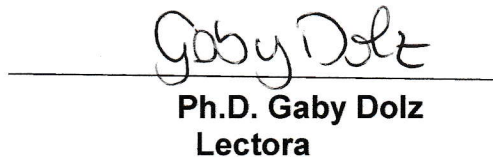
M.Sc. Silvia Argüello Vargas
Representante del PCVET



Ph.D. Donald Arguedas
Tutor



Ph.D. Ana Jiménez
Léctora



Ph.D. Gaby Dolz
Léctora



Luis Felipe Choc Martínez
Sustentante

RESUMEN GENERAL:

Los nemátodos de la familia Anisakidae incluyen tres géneros de importancia clínica con una comprobada capacidad de causar infecciones accidentales en el ser humano por consumo de productos pesqueros. Los géneros *Anisakis* sp. y *Pseudoterranova* sp. han sido los más estudiados, encontrándose principalmente en hospedadores de ambientes acuáticos marinos, mientras que el género *Contracaecum* sp. es de reporte reciente y se ha aislado tanto de hospedadores acuáticos de agua dulce y salada, como de aves piscívoras.

En la primera parte del estudio se reporta la presencia de *Contracaecum multipapillatum*, aislado de peces de los géneros *Parachromis* sp. (Guapotés), *Rhamdia* sp. (Barbudos) y *Hoplias* sp. (Guabinas), peces de importancia comercial y nutricional en Costa Rica y Guatemala donde la pesca artesanal es la principal actividad pesquera. Este nemátodo había sido reportado anteriormente en peces de Sudamérica y Norteamérica, mientras que en Centroamérica únicamente se tenían sospechas de su presencia, por lo que este reporte representa el primero en la región, basado en diagnóstico morfológico y confirmativo molecular, para determinar su presencia.

Las características morfológicas de las fases larvianas que infectaban los peces recolectados tanto de Guatemala como de Costa Rica son compatibles con miembros de la familia Anisakidae. La presencia de un diente apical en el extremo cefálico y un mucrón en el extremo caudal confirma la presencia de larvas del tercer estadio (L3). Internamente se observó la presencia de ciego paraesofágico, ventrículo y apéndice ventricular, por lo que se identificaron como *Contracaecum* sp.

El análisis filogenético incluyó la amplificación de las regiones ITS 1 5.8S e ITS 2 28S de ADN nuclear ribosomal y del gen COX II de ADN mitocondrial que arrojaron secuencias compatibles con nemátodos reportados en GenBank como *Contracaecum multipapillatum*, proveniente de estudios desarrollados en California y Grecia con valores de Bootstrap de 100%. Todas las secuencias obtenidas en Centroamérica se ubican en un segmento común, que demostró una estrecha

similitud entre las secuencias obtenidas de los nemátodos de la región, comparadas con las secuencias de otros nemátodos identificados en otras regiones del mundo.

La segunda parte del estudio consistió en determinar la prevalencia de *C. multipapillatum* tanto para Costa Rica como Guatemala, además de determinar los porcentajes de infección para cada uno de los sitios de muestreo, la intensidad de infección y sitio de ubicación anatómica de L3 en los peces infectados, así como correlacionar la presencia de infección con parámetros fisicoquímicos del medio ambiente.

Se recolectaron 214 peces en 6 ríos del Cantón de Cañas, Guanacaste, Costa Rica y 203 peces en Izabal, Guatemala. Un total de 36 peces (16.8%) resultaron infectados en Costa Rica y 51 (25.1%) en Guatemala. El género de pez más afectado en ambas regiones fue *Parachromis* sp. con un total de 25 peces infectados en Costa Rica (prevalencia de 17.5%) y 23 peces infectados en Guatemala (prevalencia de 29.5%). Se observó una marcada tendencia de las L3 para ubicarse en órganos viscerales (21 – 22%) y muy poca para ubicarse en tejido muscular (2 – 3.7%). En cuanto al grado de infección, la menor cantidad de nemátodos infectando un pez fue de 1 y 2 siendo estos de menor peso y longitud; mientras que peces más grandes presentaron mayores grados de infección siendo de 12 a 14 nemátodos por pez, observándose en estos un mayor peso y longitud, comprobándose una relación directa entre el tamaño de pez y grado de infección parasitaria.

Los parámetros fisicoquímicos del agua mostraron que la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto en agua se encontraron dentro de los límites aceptables para el desarrollo de organismos saludables en los sitios de muestreo con presencia de peces infectados por *C. multipapillatum*. No se observó asociación entre los niveles de parámetros fisicoquímicos y la susceptibilidad de peces a infección, sin embargo, en los ríos donde los peces capturados fueron negativos a infección los rangos de oxígeno fueron menores a los límites normales.

No se descarta la posibilidad de la influencia del oxígeno sobre la presencia o ausencia de nemátodos dado que se han reportado efectos de factores

ambientales sobre el ciclo de vida del género *Contracaecum*, cuya población de hospedadores intermediarios puede fluctuar por un medio ambiente desfavorable para la vida, no así la población de estos nemátodos que de acuerdo a estudios previos (Mancinni et al. 2013) se ha comprobado que poseen una alta capacidad adaptativa a condiciones ambientales extremas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen del Rosario, por tantas bendiciones recibidas que me permitieron cumplir una meta más en mi vida.

A mi hermana Carmen Choc, por su apoyo incondicional, confianza y sabios consejos, en los momentos de mayor oscuridad.

Al Programa Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por darme la oportunidad de crecer profesionalmente, por su apoyo financiero que fue fundamental para la realización de mis estudios de maestría y de este trabajo de investigación.

A la Dra. Gaby Dolz, por su apoyo incondicional, por brindarme su tiempo, asesoría y consejos para la realización de la Maestría y abrirme las puertas de los laboratorios de Zoonosis y Entomología, para llevar a feliz término este trabajo de investigación.

A la Dra. Ana Jiménez por sus enseñanzas y consejos, por su tiempo, asesoría y apoyo al abrirme las puertas del laboratorio de Parasitología de la UNA, para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Dr. Donald Arguedas, por su tiempo, apoyo y consejos. Por abrirme las puertas de LARED para la ejecución de este trabajo de investigación.

A la MSc. Ruth Castro por su tiempo y paciencia. Por sus valiosos consejos, enseñanzas y asesoría en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Juan José Romero Zúñiga, por sus consejos y enseñanzas a lo largo de la maestría y sus valiosos aportes para el desarrollo estadístico de la presente investigación.

Al Dr. Rolando Wer por su apoyo y asistencia en el desarrollo del trabajo de campo en Guatemala, básicos para que esta investigación pudiera llevarse a cabo.

Al Dr. Manuel Rodríguez Zea, por su valioso apoyo y asistencia en el trabajo de laboratorio y abrimme las puertas de la Unidad de Parasitología de la FMVZ-USAC, para poder desarrollar esta investigación.

A la Dra. Jackeline Escobar, por su apoyo al abrimme las puertas del laboratorio de la Unidad de Microbiología de la FMVZ-USAC, para poder llevar a cabo el trabajo de laboratorio de esta investigación en Guatemala.

A la Licda. Mercedes Barrios, del Centro de Estudios Conservacionistas (CECON), de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC. Por su importante apoyo y confianza, que fueron valiosos y básicos para que el trabajo de campo en la región de Izabal pudiese llevarse a cabo.

Al personal de campo de CECON y CONAP por su valiosa asistencia técnica en el desarrollo del trabajo de campo en el lago de Izabal y Río Dulce.

A Fabian Mejías, María Fernanda Arias y Elizabeth Ordoñez, por su amistad, asistencia técnica y colaboración, valiosos para la realización del trabajo de campo en los ríos de Cañas, Guanacaste.

A los Dres. Ludwig Figueroa (Unidad de Parasitología, FMVZ-USAC), Wilson Valdés y Luis Morales (Unidad de Salud Pública, FMVZ-USAC) por su amistad, apoyo y consejos para poder llevar a cabo este logro académico.

Al Dr. Carlos Camey Rodas, (Secretario General de la Universidad de San Carlos de Guatemala) por su apoyo y ánimos para que diera este paso en mi vida académica y profesional.

A mis amigos y compañeros de estudios, Eunice Víquez, Alex Varela, Josué Colindres, Víctor Álvarez, Nelson Peña y Ramsés Alfaro, por su apoyo y momentos de amistad vividos a lo largo de este tiempo.

DEDICATORIA

A mis padres:

Gabriela Martínez de Choc y José Luis Choc Soto. Gracias por darme la vida, ser mi apoyo constante y darme todo su amor. Por ser mi fuente de inspiración. Sin ustedes no estaría donde estoy.

A mis hermanas:

Sandra Carolina y Carmen Yolanda, por su apoyo y amor a lo largo de mi vida. Gracias por ayudarme a ser una mejor persona y un mejor profesional.

A mis sobrinos:

Andrea, Karen y Manuel. Por todo su amor y los momentos más felices de mi vida.

A la memoria de Zoila Judith Ortiz (QEPD):

Una gran madre y amiga, ejemplo de bondad y solidaridad. Gracias por sus consejos y hacer de mí una mejor persona.

INDICE

Resumen General	iv
Agradecimientos	vii
Dedicatoria	ix
Índice de Cuadros	xii
Índice de Figuras	xii
Introducción General	xv
Referencias Bibliográficas	xxvii
Artículo 1	
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Metodología	
2.1 Áreas de estudio	5
2.2 Población y tamaño de muestra	6
2.3 Recolección y transporte de muestras	7
2.4 Identificación de peces, necropsia y extracción de nemátodos	7
2.5 Preparación de muestras para diagnóstico	7
2.6 Identificación por microscopía óptica	7
2.7 Identificación por microscopía electrónica	8
2.8 Análisis molecular	8
3. Resultados	9
4. Discusión de Resultados	14
5. Conclusiones	17
6. Recomendaciones	18
7. Referencias Bibliográficas	18

Artículo 2	
Resumen	22
Abstract	23
1. Introducción	23
2. Metodología	
2.1 Áreas de estudio	25
2.2 Tamaño de muestra	25
2.3 Recolección de datos y peces	26
2.4 Análisis parasitológico	26
2.5 Análisis estadístico	26
3. Resultados	27
4. Discusión de Resultados	31
5. Conclusiones	34
6. Recomendaciones	35
7. Referencias Bibliográficas	35
Discusión General	38
Conclusiones Generales	43
Recomendaciones Generales	44

INDICE DE CUADROS

Artículo I

Cuadro 1 12

Características morfológicas de L3 de *Contracaecum multipapillatum* en peces de agua dulce de Guanacaste, Costa Rica e Izabal, Guatemala.

Artículo II

Cuadro 1 28

Prevalencia de *C. multipapillatum* en peces de Guanacaste, Costa Rica e Izabal, Guatemala.

Cuadro 2 29

Parámetros fisicoquímicos observados en los sitios de muestreo de Guanacaste, Costa Rica e Izabal, Guatemala.

Cuadro 3 30

Intensidad de infección por L3 en peces colectados en Guanacaste, Costa Rica (A) e Izabal, Guatemala (B).

Cuadro 4 31

Infección por L3 en vísceras de peces de Guanacaste, Costa Rica (A) e Izabal, Guatemala (B).

INDICE DE FIGURAS

Artículo I

Figura 1. 5

Mapa de ubicación geográfica de los sitios de recolecta de peces en el cantón de Cañas, Guanacaste, Costa Rica.

Figura 2. 6

Mapa de ubicación geográfica de los sitios de recolecta de peces en el departamento de Izabal, Guatemala.

Figura 3 10

L3 de *C. multipapillatum* visualizadas por microscopía óptica. (A) DA. Diente Apical L. Labio (B) DA. Diente apical E. Esófago CP. Ciego Paraesofágico (C) E. Esófago V. Ventrículo AV. Apéndice Ventricular I. Intestino (D) M. Mucrón

Figura 4 11

L3 de *C. multipapillatum* visualizadas por MEB. (A) DA. Diente apical B. Boca L. Labios PL. Papilas Labiales (B) M. Mucrón

Figura 5 13

Análisis de fragmento de ADN mitocondrial ITS1 5.8S – ITS2 28S mediante PCR. **MM** Marcador molecular (1kb). **n** = 14 larvas identificadas. **1–6**. L3 de Guanacaste, Costa Rica. **7–14**. L3 de Izabal, Guatemala. **C+** Control positivo **C-** Control negativo

Figura 6 13

Árbol filogenético del fragmento ITS1 5.8S – ITS2 28S (327pb) del género *Contracaecum*, *Pseudoterranova* y *Anisakis* (Familia Anisakidae), generado por Inferencia Bayesiana (BI). Los primeros números de las ramas representan valores de Bootstrap de máxima verosimilitud (ML) y probabilidad posterior bayesiana sobre 10,000,000 de repeticiones. Las secuencias obtenidas en el presente estudio y las de referencia para *Contracaecum* sp., aparecen en sombra azul. Las abreviaturas CRC y GTM corresponden a Costa Rica y Guatemala, respectivamente.

Figura 7

14

Amplificación de región COX II de ADN ribosomal mediante PCR. **MM** Marcador molecular (1kb). **n** = 14 larvas identificadas. **1-6**. L3 de Guanacaste, Costa Rica. **7-14**. L3 de Izabal, Guatemala. **C+** Control positivo **C-** Control negativo

Figura 8

15

Árbol filogenético de una región parcial del gen mitocondrial COX II (472pb) de los géneros *Contracaecum*, *Pseudoterranova* y *Anisakis* (Familia Anisakidae), generado por Inferencia Bayesiana (BI). Los primeros números de las ramas representan valores de Bootstrap de máxima verosimilitud (ML) y probabilidad posterior bayesiana sobre 10,000,000 de repeticiones. Las secuencias obtenidas en el presente estudio y las de referencia para *Contracaecum multipapillatum*, aparecen en sombra azul. Las abreviaturas CRC y GTM corresponden a Costa Rica y Guatemala, respectivamente.

Introducción General

Epidemiología

Los nemátodos de la familia Anisakidae, ocasionan la enfermedad conocida como anisakidosis, esta familia incluye tres géneros importantes: *Anisakis*, *Contracaecum* y *Pseudoterranova*. Una especie importante identificada mediante el uso de técnicas moleculares fue *Anisakis simplex*, esta especie es la más estudiada; mientras que otras especies de los géneros *Contracaecum* y *Pseudoterranova* han demostrado su potencial zoonótico en estudios recientes (Abebe y Traunspurger, 2006; Klimpel y Palm, 2011).

La distribución de estos nemátodos es mundial y su especificidad parasitaria es muy amplia, por lo que pueden parasitar gran variedad de especies de peces, principalmente peces marinos. Su presencia se ha reportado en el mar Mediterráneo en el año 2014, en el mar del Japón en el año 2012, y en Brasil, en el año 2013. Estudios recientes también han descrito la presencia de anisakidos en peces de agua dulce de Colombia, México y Brasil (Cuadro 1). Estos parásitos muestran una gran variedad de hospedadores intermediarios, que incluyen a crustáceos, pulpos y peces, mientras que el ser humano es un hospedador accidental (Abebe y Traunspurger, 2006; Klimpel y Palm, 2011; Carvallho et al. 2014).

Anisakis sp. ha sido reportado en Latinoamérica en países como Argentina, Brasil, Colombia, Chile, México, Perú y Venezuela. Los primeros estudios desarrollados por Martínez et al. (2004) en México y Martins et al. (2005) en Brasil, determinaron una prevalencia del 40% de *Contracaecum* sp. en peces del género *Chapalichthys* (Pintitos) y 80% en peces de los géneros *Hoplerythrinus* (Boconas) y *Hoplias* (Guabinas), respectivamente. La presencia de *Anisakis*, *Contracaecum*, y *Terranova* en peces del género *Cynoscion guatucupa* (Pescadillas) comercializados en Río de Janeiro, fue descrito por Fontanelle et al. (2013). Por su lado, Mancinni et al. (2014), describieron la presencia del género *Contracaecum* en peces de los géneros *Hoplias* y *Rhamdia* en lagunas de agua dulce de Argentina; mientras que el estudio desarrollado por Gómez del Prado (2011) en Baja California correlacionó infección humana con hábitos y formas de consumo de productos pesqueros, al

Cuadro 1. Distribución y prevalencia de nemátodos anisákidos presentes en peces de diferentes cuerpos de agua en América Latina.

Parásito	Hospedador	Nombre común	Cuerpo de agua, país	Prevalencia (%)	Muestra total	Referencia
<i>Anisakis</i> sp.	<i>Trichiurus lepturus</i>	Pez sable	Rio de Janeiro, Brasil	20.31	64	Novo, et al. 2012
<i>Anisakis</i> sp.	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescadilla	Rio de Janeiro, Brasil	10	30	Fontenelle et al. 2013
<i>Anisakis</i> sp.	<i>Mugil liza</i> <i>Mugil curema</i>	Lebranche Lisa	Anzoátegui, Venezuela	5.61	913	Maniscalchict et al., 2015
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Chapalichthys encaustus</i>	Pintito	Lago Chapala, México	40	50	Martínez et al., 2004
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> <i>Hoplias malabaricus</i>	Bocona Guabina	Maranhao, Brasil Rio Amazonas, Brasil	80	18	Martins et al., 2005
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Salminus affinis</i>	Rubio	Rio Sinú Rio San Jorge, Colombia	93	45	Pardo et al., 2007
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Hoplias malabaricus</i>	Guabina	Laguna Ciénaga Grande, Colombia	100	45	Pardo et al., 2008
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Mugil curema</i>	Lisa	Baja California, México	89.6	58	Valles, 2011
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescadilla	Rio de Janeiro, Brasil	6.6	30	Fontanelle et al. 2013
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Odontesthes bonariensis</i> <i>Rhamdia quelen</i> <i>Pimelodus albicans</i> <i>Hoplias malabaricus</i> <i>Oligosarcus jenynsii</i>	Pejerrey Bagre negro Bagre blanco Guabina Pez dientudo	Córdoba, Argentina	68 87 73 87	1402	Mancinni et al. 2014
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Sciades proops</i>	Bagre	Rio Japaratus, Brasil	23	126	Carvalho et al., 2014
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i> <i>Hoplias malabarius</i>	Bocona Guabina	Rio Igarapé Fortaleza, Brasil	57	63	Milhomen y Tavares, 2015
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Mugil curema</i> <i>Mugil liza</i>	Lisa Lebranche	Anzoátegui, Venezuela	84.39	913	Maniscalchict et al., 2015

Parásito	Hospedador	Nombre común	Cuerpo de agua, país	Prevalencia (%)	Muestra total	Referencia
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Chirostoma jordani</i> <i>Goodea atripinnis</i>	Charal Tiro	Lago Xochimilco, México	0.7	277	García et al., 2016
<i>Contracaecum</i> sp.	<i>Piaractus brachypomus</i>	Pez chato	Río Amazonas, Brasil	32	34	Brito y Tavares, 2016
<i>Hysterothylacium</i> sp.	<i>Trichiurus lepturus</i>	Pez sable	Rio de Janeiro, Brasil	51.56	64	Novo, et al. 2012
<i>Hysterothylacium</i> sp.	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescadilla	Rio de Janeiro, Brasil	83.3	30	Fontanelle et al. 2013
<i>Pseudoterranova</i> sp.	<i>Cynoscion guatucupa</i>	Pescadilla	Rio de Janeiro, Brasil	13.3	30	Fontanelle et al. 2013
<i>Pseudoterranova</i> sp.	<i>Mugil curema</i> <i>Mugil liza</i>	Lisa Lebranche	Anzoátegui, Venezuela	10	913	Maniscalchict et al., 2015

evaluar la sobrevivencia de L3 de *Contracaecum* en platillos de carne de pescado preparados de diversas maneras y con diversos ingredientes. Estudios recientes realizados en Brasil, México y Perú, reportan prevalencias variables desde el 3% en México (García et al. 2016) hasta un 85% en Perú (Chiclla y Davies, 2016).

Morfología

El tamaño de los individuos adultos varía según el género entre 1 a 4 cm en el caso de machos y 1 a 3 cm en las hembras. La diferenciación taxonómica en la fase de Larva 3 (L3), se basa en la identificación de estructuras en la parte anterior y posterior del espécimen. Los individuos adultos se diferencian de las fases larvarias previas por perder la estructura llamada mucrón una vez desarrollado el quinto estadio larvario (Fagerholm, 1989; Borges et al. 2012; Nagasawa, 2012).

El estadio L3 es el más frecuentemente descrito, dada su importancia en la transmisión al ser humano. En microscopía óptica muestra un esófago recto, el cual se continúa con un ventrículo esofágico. En el esófago existen diferencias morfológicas que permiten la diferenciación entre los diferentes géneros de anisákidos. *Anisakis* sp. posee un ventrículo esofágico liso sin apéndices (Figura 1A), *Pseudoterranova* sp. posee un ventrículo esofágico con un ciego paraesofágico, (Figura 1B) y *Contracaecum* sp. posee un ventrículo esofágico con apéndice ventricular (Figura 1C).

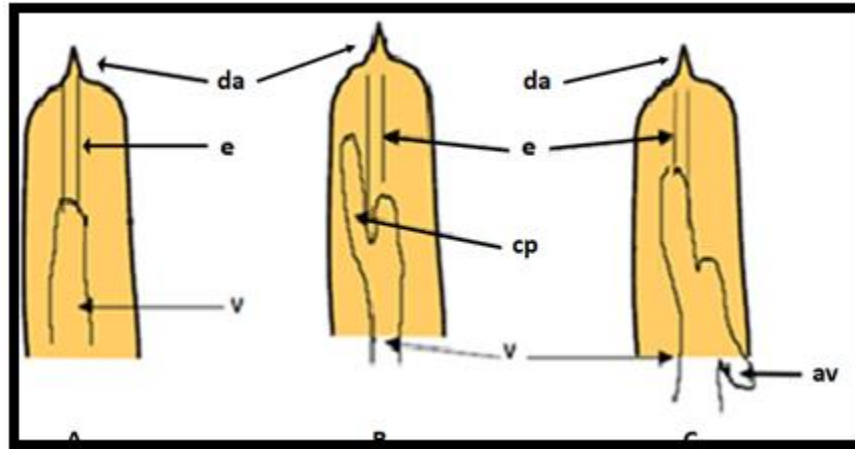


Figura 1. Diagnóstico diferencial morfológico de la familia Anisakidae. A: *Anisakis* sp. B: *Pseudoterranova* sp. C: *Contracaecum* sp. da= diente apical e= esófago cp= ciego paraesofágico ci= ciego intestinal i= intestino v= ventrículo av= apéndice ventricular.

Tomado de Fernandez, S. (2009)

En el extremo caudal se observa un recto rodeado de tres glándulas rectales (dos dorsales y una ventral), las cuales son características del tercer estadio larvario, sin embargo, éstas no siempre son visibles en microscopía óptica (Figura 2) (Smith, 1983; Fagerholm, 1989; Nagasawa, 2012).

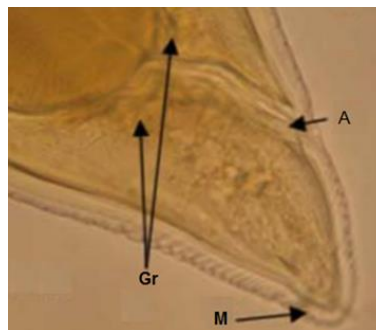


Figura 2. Extremo caudal familia Anisakidae. Gr= Glándulas rectales A= Ano M= Mucrón

Tomado de Pardo, S. et al. (2008)

La visualización de la L3 por microscopía electrónica muestra en el extremo anterior una boca triangular con procesos bilobados, junto a un diente apical en la región ventral. Posee tres labios, uno dorsal, ligeramente más grande que los dos

subventrales, cada labio posee dos papilas anteriores y una posterior, además de dos lóbulos con aproximadamente 30 a 50 estructuras dentiformes alineadas y un poro excretor ventral (Figura 3A y 3B) (Fagerholm, 1989; Nagasawa, 2012).

Al final de la cola se observa una estructura de función desconocida llamada mucrón, el cual es rudimentario en los primeros estadios larvales. (Figura 3C y 3D) En las hembras se observa la vulva a la mitad del cuerpo o ligeramente posterior, mientras que los machos poseen dos espículas, la espícula izquierda mide 4 mm y la derecha ligeramente menor en tamaño, poseen un ano rodeado de papilas anales (Figura 4E) (Fagerholm, 1989; Smith, 1983).

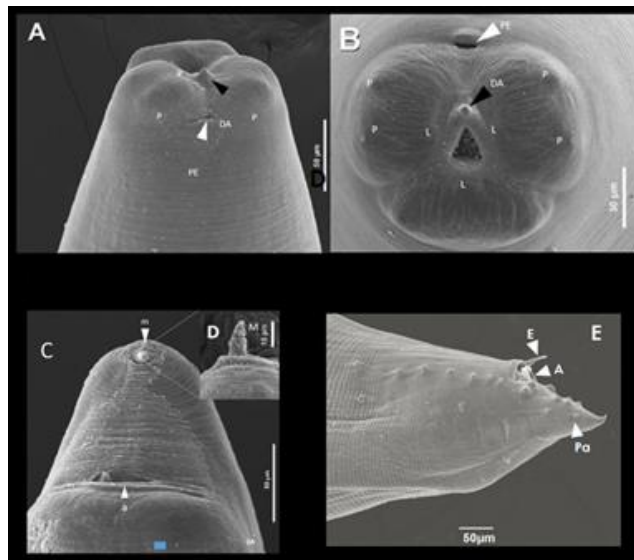


Figura 3. Descripción morfológica mediante microscopía electrónica de la familia Anisakidae (4A) Extremo anterior (P= Papila PE= Poro Excretor DA= Diente apical); (4B) Extremo anterior (P= Papilas PE= Poro Excretor DA= Diente Apical L= Labios); (4C) Extremo caudal (a= ano m= mucrón); Figura (4D) Vista en detalle de mucrón (M= Mucrón); Figura 4E: Extremo caudal de macho (Pa= Papilas anales E= Espícula A= Ano

Tomado de Hernández. et al. (2013).

Ciclo de vida

El ciclo evolutivo de la familia Anisakidae es muy complejo. Se inicia con la liberación de huevos por el hospedador definitivo en el medio acuático, donde se desarrollarán los primeros tres estadios larvarios (L1, L2, L3). Los huevos eclosionan liberando la L3 que es ingerida por diversos crustáceos, los cuales a su vez serán depredados por peces y cefalópodos, que actúan como hospedadores intermediarios. Este estadio permanecerá en tejidos viscerales y musculares por varios años, hasta que un mamífero marino o un ave (hospedadores definitivos) actúen como depredador del hospedador intermediario, ingiriendo la larva (Figura 4) (Hacha y Zyfres, 2003; D' Amelio et al. 2012; Romero y Valero, 2014).

Una vez dentro del hospedador definitivo, la larva se adhiere a la pared gástrica y del duodeno donde muda al cuarto estadio larvario (L4) y finalmente a adulto (L5), ocurriendo la reproducción sexual y liberación de huevos, para completar el ciclo de vida (Figura 4).

En los géneros de anisákidos presentes en agua dulce se desconocen aún los hospedadores que participan en el ciclo evolutivo (Figura 4) (Hacha y Zyfres, 2003; D' Amelio et al. 2012; Romero et al. 2014).

El ser humano resulta ser un hospedador accidental, al ingerir carne de peces cruda o semi cocinada infectada con larvas de *Anisakis* sp., *Pseudoterranova* sp., y *Contracaecum* sp. en tercer estadio larvario (Klimpel y Palm, 2011; Ramanan et al. 2013).

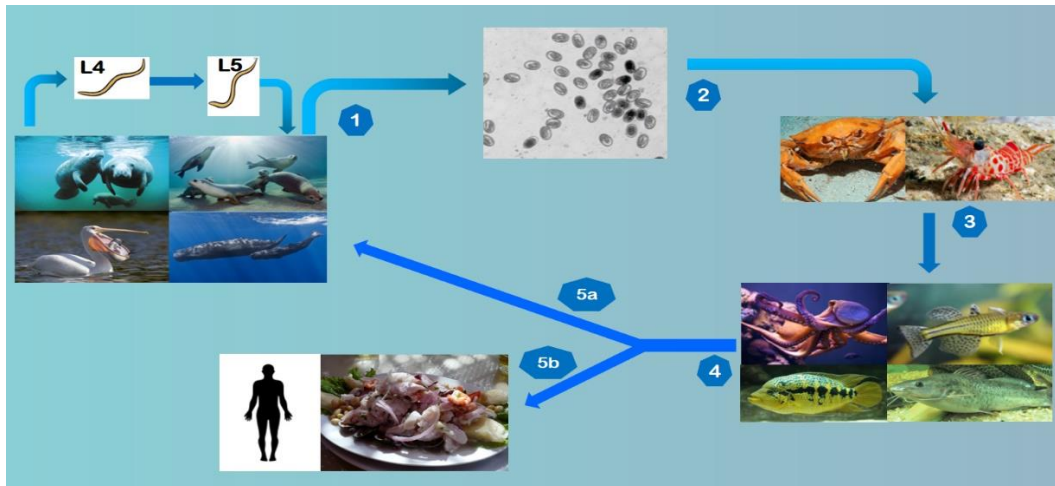


Figura 4. Ciclo de vida de la Familia Anisakidae: 1 y 2: Liberación de huevos por hospedadores definitivos y formación de L1, L2 y L3; 3: Las larvas eclosionadas son ingeridas por hospedadores invertebrados artrópodos; 4: infección de diferentes hospedadores intermediarios peces y desarrollarán los estadios larvales L4 y L5 (adultos). 5a. El ciclo se completa con la depredación de hospedadores intermediarios por los hospedadores definitivos. 5b. Infección de hospedadores accidentales humanos por ingestión de carne de pescado cruda o semi cocinada.

Diagnóstico

Las técnicas de microscopía nos permiten amplificar detalles de muestras de tejidos de diverso tipo que generalmente no son distinguibles a la vista del ojo humano. En el estudio de nemátodos las técnicas microscópicas permiten la observación de especímenes delgados, o bien, tratados con técnicas que permiten el adelgazamiento de sus estructuras externas con el fin de aumentar el contraste de la imagen y poder observar con detalle las estructuras internas que permiten su caracterización taxonómica (Amelinckx et al. 2008).

Mediante microscopía óptica se logran identificar anisákidos a nivel de género mediante características estructurales, para ello se colocan los especímenes en un portaobjetos, aplicando una gota de solución de Hoyer para aclaramiento del espécimen, dejándose actuar de 30 a 60 minutos máximo, antes de poder observar el espécimen al microscopio e identificar sus estructuras internas

características, es una técnica altamente sensible pero muy subjetiva. (Amelinckx et al. 2008)

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB), provee información sobre morfología y características de la superficie del espécimen, su nivel de detalle de las características observadas es superficial, es el más utilizado en parasitología para la identificación de estructuras anatómicas que permiten la identificación taxonómica de nemátodos (Amelinckx et al. 2008).

La imagen generada por el MEB permite observar en forma detallada los detalles estructurales externos del espécimen bajo análisis y así lograr su identificación taxonómica (Amelinckx et al. 2008).

El diagnóstico molecular por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se considera una técnica altamente sensible y específica para la identificación de especies de anisákidos. (D' Amelio et al. 2007; Borges et al. 2012; Fontanelle et al. 2013).

El análisis molecular busca la identificación de especies de Anisakidos mediante la amplificación de ADN ribosomal (ADNr) de las regiones del Espaciador de Transcripción Interna **ITS-1 5.8S** e **ITS-2 28S**, que pueden ser comparados con patrones de secuencias descritos para los diferentes géneros (Zhu et al. 2000; D' Amelio et al. 2007; Borges et al. 2012; Diaz, 2015; Anshary et al. 2014).

Otros fragmentos de ADN muy utilizados en la identificación de anisákidos son los genes mitocondriales de la Citocromo Oxidasa II (**COX II**). El ADN mitocondrial (ADNmt) es una estructura circular compuesta por 37 genes, este es un marcador lineal que permite el estudio filogenético de poblaciones por su presencia de herencia materna en loci genéticamente independientes, a diferencia de los genes del núcleo que presentan recombinación genética en su herencia parental (Mattiucci y Nascetti, 2006; Borges et al. 2012; D' Amelio et al. 2012).

Enfermedad en el ser humano

Después de que el ser humano ingiere las fases L3, éstas pueden provocar diversos cuadros clínicos, dependiendo de la respuesta inmune de la persona

infectada. Se puede presentar una enfermedad aguda gástrica o intestinal, la cual se produce por la penetración de la larva en la pared estomacal pocas horas después del consumo de carne infectada, el cuadro se caracteriza por vómitos y dolor de estómago y puede complicarse con una fase extraintestinal por migración de la larva hacia diversos órganos y tejidos; y una fase crónica o gastro-alérgica que se caracteriza por reacciones alérgicas de intensidad variable en piel hasta procesos asmáticos (Hacha y Zyfres, 2003; Romero et al. 2014; Lim et al. 2015).

Las larvas ubicadas en la pared del estómago forman granulomas eosinofílicos con centros ulcerosos de 1 a 6 cm de diámetro, la porción anterior del nemátodo ingresa a la submucosa, donde es rodeado por fibrina e infiltración celular masiva, lo que provoca que el granuloma crezca y engrose la mucosa y submucosa del estómago. Algunas lesiones pueden perforar la pared, entonces la larva penetra la cavidad abdominal, pudiendo migrar hacia diferentes regiones provocando signos clínicos variables, que se confunden con gastritis ulcerativas (Ramanan et al. 2013; Romero et al. 2014; Lim et al. 2015).

Las reacciones alérgicas asociadas con el consumo de pescado pueden presentarse de dos formas: ya sea producidas por secreción o excreción de antígenos cuando la larva viva infecta al ser humano, o bien sin participación de las larvas, debido a la acumulación de toxinas producidas por antígenos cutáneos de restos de tejidos de nemátodos presentes en la musculatura de los peces. Se han identificado diferentes antígenos; sin embargo, los más importantes son las toxinas *Ani S1* y *Ani S7*, íntimamente ligadas a respuestas inmunes mediadas por IgE que se manifiestan como urticaria, angioedema, diarrea, broncoespasmo, asma y shock anafiláctico (Gonzalez et al. 2010; Lim et al. 2015).

Tratamiento, control y profilaxis:

En casos de Anisakidosis aguda, cuando la larva se localiza en estómago o duodeno la técnica endoscópica puede resultar muy efectiva, extrayendo el parásito por medio de un fórceps de biopsia junto a un fibroscopio. Si la larva se ubica en una región inaccesible para el fibroscopio se procederá a un tratamiento quirúrgico por medio de laparatomía y resección de la zona afectada, el mismo procedimiento

se realiza en la presentación extradigestiva, principalmente cuando se producen obstrucciones intestinales por adherencias a tumores inflamatorios (Fernández, 1999) (Pérez et. al. 2015).

En casos de reacción de hipersensibilidad inmediata al nemátodo, el tratamiento se basa en antihistamínicos y corticosteroides parenterales e incluso adrenalina. Cuando la reacción de hipersensibilidad se debe a las toxinas del nemátodo, se recomienda evitar el consumo de carne de pescado incluso cocinada, debido a que estas toxinas son termoestables (Fernández, 1999).

En cuanto a los fármacos antihelmínticos para tratamiento específico frente a anisakidos, ninguno ha mostrado una eficacia verdadera. Se ha utilizado tiabendazol en casos de obstrucción intestinal muy grave, el uso de ivermectina y albendazol por vía oral ha mostrado evoluciones favorables principalmente albendazol, por lo que se ha convertido en el tratamiento de elección en muchos casos, incluso recomendado por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), aunque no es aceptado oficialmente por la FDA, para el tratamiento de anisakidosis (Fernández, 1999).

Se han desarrollado investigaciones, utilizando extractos de plantas naturales *in vitro*, con el fin de probar su eficacia frente a *Anisakis*, destacándose la hoja de *Perilla frutescens*, en la medicina tradicional china, que además se utiliza como condimento de pescado crudo, se ha observado que produce letalidad del 100% en larvas luego de 24 horas, comprobándose además que en las regiones de China donde se utiliza esta planta como condimento, la prevalencia de anisakidosis es menor (Fernández, 1999).

El control y prevención de la anisakidosis se basa en evitar la ingesta de carne de pescado cruda o insuficientemente cocinada. En países europeos las normativas sobre esta enfermedad exigen congelar el pescado a -20°C por 24 horas, mientras que en Estados Unidos la legislación exige congelar el pescado a -23°C por tres días. En España se recomienda la evisceración precoz del pescado para evitar la migración de larvas hacia la musculatura, las normativas de inocuidad de alimentos indican que se debe cocinar el pescado por 10 minutos a 60°C. En el

caso del pescado salado, ahumado o marinado, se recomienda colocarlo por 51 días en vinagre, previo a su comercialización y consumo. Es importante mencionar que el cocimiento en horno de micro ondas no afecta las larvas (Fernández, 1999).

En Japón se ha estudiado el efecto vermícida de productos aditivos de su comida tradicional, principalmente gingerol, soganol y polvo de rábano picante con salsa de soya. Estos compuestos producen reducción en la motilidad de las larvas, sin embargo, los resultados de estos estudios no son concluyentes sobre su capacidad vermícida para el control de las larvas previo al consumo de carne de pescado cruda (Fernández, 1999).

Referencias Bibliográficas

- Abebe, E. y Traunspurger, W. (2006). *Freshwater Nematodes: Ecology and Taxonomy*. London: CAB International.
- Amelinckx, S., van Dyck, D., van Landuyt, J., y van Tendeloo, G. (2008). *Handbook of Microscopy, Applications in Materials Science, Solid-State Physics, and Chemistry, Handbook of Microscopy: Applications in Materials Science, Solid-State Physics, and Chemistry. Methods II*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.
- Anshary, H., Freeman, M., y Ogawa, K. (2014). Occurrence and Molecular Identification of *Anisakis* Dujardin, 1845 from Marine Fish in Southern Makassar Strait, Indonesia. *Korean Journal of Parasitology*, 52(1), 9 - 19. doi:10.3347/kjp.2014.52.1.9
- Borges, J., Gullo, L., Helena, C., Cassiano, M., y Claudia, P. (2012). Morphological and Molecular Diagnosis of Anisakid Nematode Larvae from utlassfish (*Trichiurus lepturus*) off the Coast of Rio de Janeiro, Brazi. *Plos One*, 7(7), 1-14. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3392247/pdf/pone.0040447.pdf>
- Carvalho, P., Takemoto, R., Melo, C., V, J., y Madi, R. (2014). Structure of the parasite infracommunity of *Sciades proops* from the Japarutuba River Estuary, Sergipe, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), 906 - 913. doi:10.1590/1519-6984.02514
- Chiclla, A., y Davies, T. (2015). Infection of *Contraecaecum* sp. larvae (Nematoda: Anisakidae) in tilapia *Oreochromis niloticus* of Perú. *The Biologist*, 13(2), 418-427. Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/295912410>
- D'Amelio, S., Cavallero, S., Dronen, N., Barros, N., y Paggi, L. (2011). Two new species of *Contraecaecum* Railliet y Henry 1912 (Nematoda: Anisakidae), *C. fagerholmi* n. sp. and *C. rudolphii* F from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* in the northern Gulf of Mexico. *Systemic Parasitology*, 81, 1-16. doi:10.1007/s11230-011-9323-x
- D'Amelio, S., Barros, N., Ingrosso, S., Fauquier, D., Russo, R., y Paggi, I. (2007). Genetic characterization of members of the genus *Contraecaecum* (Nematoda: Anisakidae) from fish-eating birds from west-central Florida, USA, with evidence of new species. *Parasitology Cambridge University Press*, 137, 1041 - 1051. doi:10.1017/S003118200700251X

- Díaz, B. (2015). *Análisis genético de parásitos Anisakisen pescados del GCantábrico*. Oviedo: Universidad de Oviedo.
- Fagerholm, H. (1989). Intra-specific variability of the morphology in a single population of the seal parasite *Contraecaecum osculatum* (Rudolphi) (Nematoda, Ascaridoidea), with a redescription of the species. *Zoologica Scripta*, 18(1), 33 - 41.
- Fernández, S. (1999). *Sensibilización a Anisakissimplex en Málaga. Estudio en pacientes con urticaria aguda recidivante*. Málaga: Universidad de Málaga.
- Fontenelle, G., Knoff, M., Nunes, N., Silva, L., y Carmona, S. (2013). Nematodes of zoonotic importance in *Cynoscion guatucupa* (Pisces) in the state of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitología*, 22(2), 281- 284.
- García, M., Salguero, G., García, L., Osorio, D., y Perez, G. (2016). Endohelminths of some species of fishes from Lake Xochimilco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(4), 1360-1364. doi:10.1016/j.rmb.2016.06.018
- Gonzalez, M., Rodriguez, A., y Moneo. (2010). Different Th1/Th2 responses to *Anisakissimplex* are related to distinct clinical manifestations in sensitized patients. *Parasite Immunology*, 67 - 73. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01162.x
- Hacha, P., y Szyfres, B. (2003). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Parasitoses* (Vol. III). Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud.
- Hernández, J., Aznar, F., Blasco, I., García, N., Villora, M., Crespo, E., . . . Montero, F. (2013). Description, microhabitat selection and infection patterns of sealworm larvae (*Pseudoterranova decipiens* species complex, nematoda: ascaridoidea) in fishes from Patagonia, Argentina. *Parasites y Vectors*, 1-15. Obtenido de <http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/252>
- Klimpel, S., y Palm, H. (2011). Anisakid Nematode (Ascaridoidea) Life Cycles and Distribution: Increasing Zoonotic Potential in the Time of Climate Change? *Progress in Parasitology*, 211 - 223. doi:10.1007/978-3-642-21396-0_11
- Lim, H., Jung, B., Cho, J., Yooyen, T., Shin, E., y Yil, J. (2015). Molecular Diagnosis of Cause of Anisakiasis in Humans, South Korea. *Emerging Infectious Diseases journal - CDC*, 21(2), 342 - 344. doi:10.3201/eid2102.140798

- Mancini, M., Biolé, F., Salinas, V., Guagliardo, S., Tanzola, R., y Morra, G. (2014). Prevalence, intensity and ecological aspects of *Contracaecum* sp. (Nematode, Anisakidae) in freshwater fish of Argentina. *Neotropical Helminthology*, 111 - 122.
- Martínez, A., Salgado, G., y Aguilar, R. (2004). Helminth Parasites of Chapalichthyis encaustus (Pisces: Goodeidae), an endemic freshwater fish from Lake Chapa, Jalisco, México. *The Journal of Parasitology*, 90(4), 889-890. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/3286350>
- Martins, M., Onoka, E., y Fenerick, J. (2005). Larval *Contracaecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Osteichthyes: Erythrinidae) of economic importance in occidental marshlands of Maranhão, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 51 - 59. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.026
- Mattiucci, S., y Nascetti, G. (2006). Molecular systematics, Phylogeny and Ecology of Anisakid nematodes of the Genus *Anisakis*(Dujardin, 1845): An update. *Parasite journal*, 99-113. doi:10.1051/parasite/2006132099
- Nagasawa, K. (2012). The biology of *Contracaecum osculatum* sensu lato and *C. osculatum* A (Nematoda: Anisakidae) in Japanese waters: a review. *Biosphere, Sci*, 51, 61 - 69.
- Pardo, S., Zumaque, A., Noble, H., y Suárez, H. (2008). *Contracaecum* sp (Anisakidae) en el pez *Hoplias malabaricus*, capturado en la Ciénaga Grande de Lórica, Córdoba. *Revista MVZ Colombia*, 13(2), 1304 - 1314.
- Perez, J., R, R., Ballesteros, A., Zuloaga, J., Fernandez, B., Arias, J., y Caballero, M. (2015). Previous Exposure to the Fish Parasite *Anisakis* as a Potential Risk Factor for Gastric or Colon Adenocarcinoma. *Medicine*, 94(40), 1-7. doi:10.1097/MD.0000000000001699
- Ramanan, P., Blumberg, A., Mathison, B., y Prittd, B. (2013). Parametrial Anisakidosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3430–3434. Obtenido de <http://jcm.asm.org/>
- Romero, M., Valero, A., Navarro, M., Hierro, I., Barón, S., y Martín, J. (2014). Experimental demonstration of pathogenic potential of *Anisakisphyseteris* and *Anisakispaggiæ* in Wistar rats. *Parasitology Research*, 113(12), 4377-4386. doi:10.1007/s00436-014-4113-4

- Smith, J. (1983). *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea): Morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. *Journal of Helminthology*, 57, 205 - 224.
- Zhu, X., D'Amelio, S., Paggi, L., y Gasser, R. (2000). Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contraecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Parasitology Research*, 86, 677 - 683.

ARTICULO 1

Caracterización morfológica y molecular de *Contracaecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakidae) en Costa Rica y Guatemala

Resumen

Los nemátodos de la familia Anisakidae incluyen tres géneros de importancia clínica, capaces de causar infecciones accidentales en el ser humano por consumo de productos pesqueros. Los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova* han sido los más estudiados, encontrándose principalmente en hospedadores de ambientes acuáticos marinos; mientras que el género *Contracaecum* es de reporte reciente, y se ha aislado tanto de hospedadores acuáticos de agua dulce como de agua salada, como también de aves piscívoras.

El presente estudio reporta la presencia de *Contracaecum multipapillatum* de peces de los géneros *Parachromis* (Guapotes), *Rhamdia* (Barbudos) y *Hoplias* (Guabinas), peces de importancia comercial y nutricional en Costa Rica y Guatemala, donde la pesca artesanal es la principal actividad. Este nemátodo había sido reportado anteriormente en peces de Sudamérica y Norteamérica, mientras que en Centroamérica únicamente se tenían sospechas de su presencia, por lo que este reporte representa el primero en la región, basado en diagnóstico morfológico y confirmativo molecular.

Las características morfológicas de las fases larvianas que infectaban los peces recolectados, tanto de Guanacaste, Costa Rica como de Izabal, Guatemala, son compatibles con miembros de la familia Anisakidae. La presencia de un diente apical en el extremo cefálico y un mucrón en el extremo caudal confirma la presencia de larvas del tercer estadio (L3). Internamente se observó la presencia de ciego paraesofágico, ventrículo y apéndice ventricular, por lo que se identificaron como *Contracaecum* sp.

El análisis filogenético incluyó la amplificación de las regiones ITS 1 5.8S e ITS 2 28S de ADN nuclear ribosomal y del gen COX II de ADN mitocondrial, que arrojaron secuencias compatibles con nemátodos reportados en GenBank como *C.*

multipapillatum encontrados en aves de California y Grecia con una similitud del 97%. Todas las secuencias obtenidas en Centroamérica se ubican en un segmento común, que demostró una alta relación entre los nemátodos de la región, comparados con los identificados en otras regiones del mundo.

Palabras Clave: Anisakidae, *Contracaecum multipapillatum*, caracterización morfológica, caracterización molecular, Costa Rica, Guatemala

Abstract

The Anisakidae family nematodes include three genera of clinical importance, for their proven ability to cause accidental infections in humans due to the consumption of fish products. The *Anisakis* and *Pseudoterranova* genera have been the most studied, being found mainly in hosts of marine aquatic environments, while the genus *Contracaecum* is from recent report, isolated from both aquatic freshwater and saltwater hosts and piscivorous birds.

The present study reports the presence of *Contracaecum multipapillatum*, infecting fish of the genera *Parachromis*, *Rhamdia* and *Hoplias*, which are of commercial and nutritional importance in two regions of Central America where artisanal fishing is the main activity. This nematode had previously been reported in South America and North America, while in Central America there were only suspicions of presence. This report represents the first of its kind in the region, based on microscopic and confirmatory molecular diagnosis.

The morphological characteristics of the larval stages infecting the fish such as an apical tooth at the cephalic end and a mucron at the caudal end confirmed the presence of the third instar larvae (L3) of the Anisakidae family. Internally, the presence of paraesophageal cecum, ventricle and ventricular appendix was observed, identifying the parasite as *Contracaecum* sp.

The phylogenetic analysis included the amplification of the ITS 1 5.8S and ITS 2 28S regions of ribosomal nuclear DNA and the COX II gen of mitochondrial DNA that produced sequences similar to sequences of nematodes reported in GenBank as *C. multipapillatum* in birds from California and Greece with similarities

of 97%. All sequences obtained from *C. multipapillatum* in Central America were in a common segment, showing a high relationship between them, compared with those identified in other regions of the world.

Key words: Anisakidae, *Contraecum multipapillatum*, morphological characterization, molecular characterization, Costa Rica, Guatemala

1. Introducción

A pesar de ser conocidos desde mediados del siglo XX, los nemátodos anisákidos han cobrado auge en los últimos años, debido a los efectos que poseen las infecciones por estos nemátodos para la salud humana. Las regiones donde más estudios se han desarrollado han sido en países europeos del Mar Mediterráneo (Matiucci et al. 2009) y en países del Lejano Oriente, principalmente China, Korea y Japón (Nagasawa, 2012).

Actualmente existen tres géneros de importancia médica en los anisákidos, *Anisakis* sp., *Pseudoterranova* sp. y *Contraecum* sp. Estos tres géneros han demostrado ser capaces de infectar accidentalmente y provocar alteraciones a la salud del ser humano y de utilizar una gran variedad de peces de diferentes regiones del mundo como hospedadores intermediarios, destacando *Contraecum* sp. como el género que ha sido localizado en la mayor variedad de ambientes acuáticos (D'Amelio et al. 2007; Fontenelle et al. 2013).

La identificación de las especies de estos nemátodos a menudo es problemática, debido a que morfológicamente son muy similares, y las características observadas por distintas técnicas de microscopía únicamente permiten la diferenciación a nivel de género, por lo que se hace necesaria la identificación a nivel de especie por métodos moleculares y análisis filogenético. (Hernández et al. 2013).

La correcta identificación de las especies de estos nemátodos y la determinación de sus características filogenéticas nos permitirá comprender mejor su ciclo de vida y su comportamiento poblacional, tomando en cuenta las dinámicas ecosistémicas de las regiones donde es considerado endémico. Además, las

implicaciones que conlleva su identificación para la explotación artesanal de especies de peces y de otros organismos acuáticos de importancia alimenticia y comercial, permitirá evaluar la posibilidad de riesgos para la salud humana, tomando en cuenta que esta actividad carece de procesos estandarizados de inocuidad de alimentos.

Contracecum multipapillatum, una de las especies de importancia zoonótica dentro de los anisákidos, ocasiona la enfermedad conocida como Contracecosis. En Latinoamérica existen escasos reportes que comprueban la capacidad infectiva para el ser humano, los reportes se circunscriben a hallazgos clínicos esporádicos, principalmente en países de Sudamérica como Perú (Barriga et al.1999), Brasil (Amato et al.2006) y Chile (Jofré et al. 2008), donde los hallazgos no incluyen diagnósticos confirmativos, que demuestren la veracidad del reporte o de las especies implicadas en la infección. En México, los hallazgos han sido indirectos (detección de anticuerpos) (Salazar et al. 2012).

El diagnóstico y detección de *C. multipapillatum* en infecciones humanas se basa en signos clínicos compatibles con antecedentes de consumo de carne de pescado cruda o insuficientemente cocinada, principalmente en países donde su prevalencia es alta, por lo que el apoyo diagnóstico por endoscopía para la extracción de la larva y su posterior identificación constituyen la principal herramienta diagnóstica de Contracecosis.

La distribución de *C. multipapillatum* es mundial, se ha reportado tanto en peces como en aves piscívoras de distintos cuerpos de agua de Irán en el continente asiático (Shamsi et al. 2010), en lagos de Egipto en África (Younis et al. 2017) y en aguas del mar Mediterráneo en las costas de Grecia y España (Matiucci et al. 2010). En América del Norte se ha reportado su presencia en California (Nadler et al. 2000) y en Florida (D'Amelio et al. 2011), mientras que en Sudamérica existen reportes no confirmados en Brasil (Martins et al. 2005), Colombia (Pardo et al. 2007), Argentina (Mancinni et al. 2014) y Perú (Serrano et al. 2017).

En el caso de Centroamérica, pescadores en zonas de pesca artesanal han reportado a investigadores sobre la presencia de nemátodos en peces (Wer y

colaboradores, comunicación personal), por lo que el objetivo de este estudio fue establecer la presencia y confirmar el diagnóstico de especies de nemátodos anisákidos colectados de peces de los géneros *Parachromis* (Guapotes), *Rhamdia* (Barbudos) y *Hoplias* (Guabinas), mediante técnicas moleculares.

2. Metodología

2.1. Áreas de estudio

Se recolectaron peces en seis ríos de la provincia de Guanacaste, Costa Rica, entre los meses de abril y mayo de 2017 durante el verano y en cinco puntos del Lago de Izabal y Río Dulce, del departamento de Izabal, Guatemala, en el mes de julio del año 2017 durante el invierno, todos ellos cercanos a comunidades que practican la pesca artesanal.

Los ríos, en los cuales se desarrolló el muestreo en Guanacaste fueron: El Canal Interno de la Finca de la Universidad Técnica Nacional (UTN), Río Duque, Río Paso Hondo, Río Cañas, Río Higuerón y Río Abangares, todos dentro del cantón de Cañas. Los sitios de muestreo seleccionados en Izabal fueron puntos de pesca cercanos a las comunidades El Estor y Mariscos, ambos dentro del Lago de Izabal; y las comunidades Río Dulce, El Higuerito y Cayo Piedra, situadas dentro de la cuenca de Río Dulce.

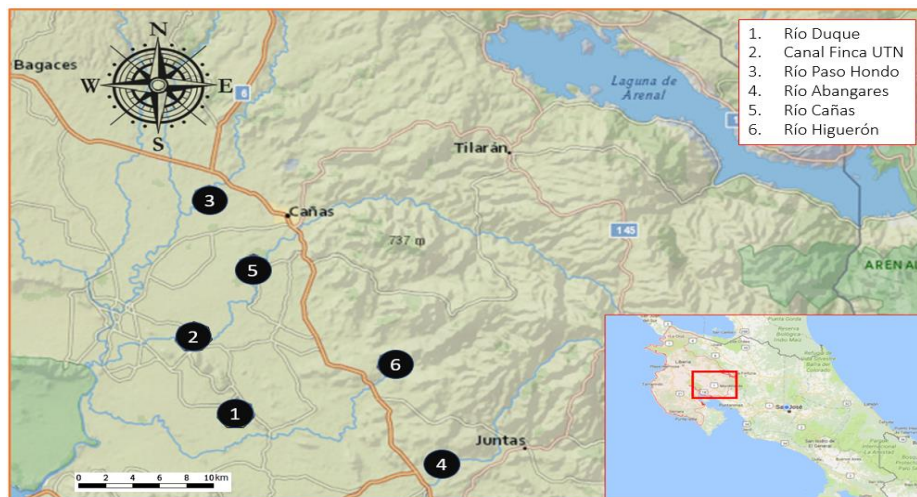


Figura 1. Mapa de ubicación geográfica de los sitios de recolecta de peces del cantón de Cañas, Guanacaste, Costa Rica.

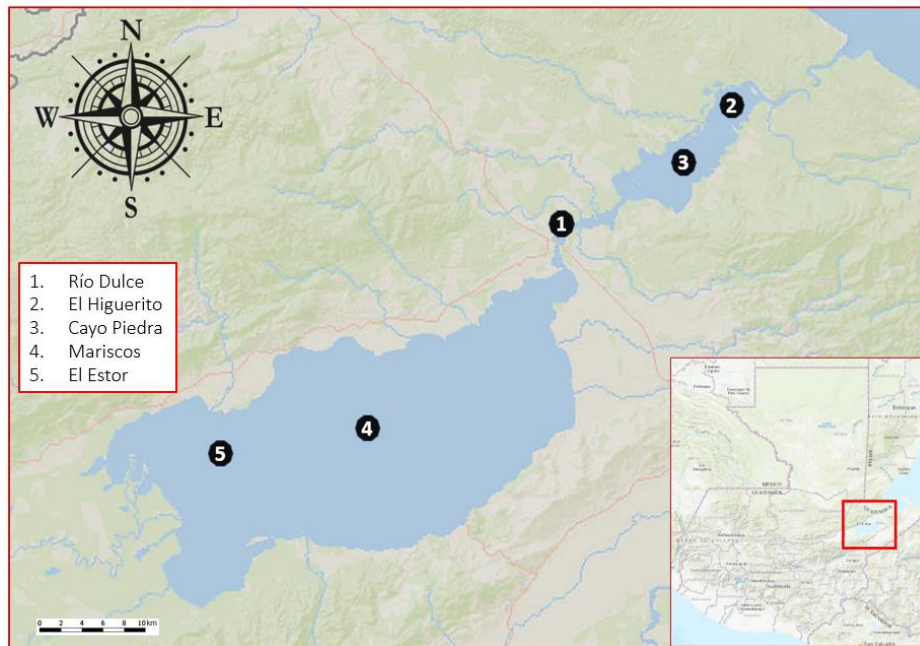


Figura 2. Mapa de ubicación geográfica de los sitios de recolecta de peces en el departamento de Izabal, Guatemala.

2.2. Población y tamaño de muestra

Para establecer la presencia de la infección del parásito en peces se calculó el tamaño de muestra con el programa WinEpiscope para población infinita con un nivel de confianza del 95% y una prevalencia esperada del 3%, basada en estudios anteriormente desarrollados en otras regiones de Latinoamérica, con características similares a las áreas de estudio de la presente investigación. La muestra óptima para establecer la presencia de infección fue de 99 peces por cada región de estudio.

La prevalencia de la infección se estimó basada en una confianza del 95% y un error aceptado del 7.5%, la prevalencia estimada fue de 31% sobre una población infinita, siendo la muestra óptima para determinar la prevalencia de infección de 147 peces por cada región de estudio, siendo esta la muestra mínima total a recolectar.

2.3. Recolecta y transporte de la muestra

Se recolectaron 214 peces mediante pesca artesanal en los seis ríos del cantón de Cañas y 203 peces en el lago de Izabal y la Cuenca del Río Dulce, para un total de 417 peces. Se recolectaron tres tipos de peces: *Parachromis* sp. (Guapotes), *Rhamdia* sp. (Barbudo) y *Hoplias* sp. (Guabinas). Los peces recolectados se transportaron en frío al Laboratorio de Parasitología de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional (UNA) en Costa Rica y al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, (FMVZ), Universidad de San Carlos (USAC) en Guatemala, para su posterior análisis.

2.4 Identificación de peces, necropsia y extracción de nemátodos

De cada pez se tomaron datos de peso y tamaño y se identificó taxonómicamente su género, seguidamente se realizó una necropsia buscando larvas en órganos viscerales y musculatura axial.

2.5. Preparación de muestras para diagnóstico

Del total de peces recolectados se extrajeron 103 larvas del tercer estadio (L3) en Guanacaste y 135 larvas en Izabal. Seguidamente, todas las larvas extraídas se sometieron a digestión artificial con pepsina 1.5%, ácido clorhídrico 0.8% (concentración al 25%), con agitación constante a 42°C, hasta lograr la liberación de las larvas de los tejidos.

Las L3 se dividieron en dos grupos; el primer grupo compuesto por 118 L3 se colocó en medio fijador (10 ml Formaldehido 10%, 20 ml Glutaraldehido 25%, Base de agua 70 ml) para su identificación por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). El segundo grupo de 120 L3 se preservó en alcohol al 70% destinadas para su identificación por microscopía óptica y diagnóstico confirmativo molecular.

2.6. Identificación por microscopía óptica

Las larvas recolectadas en alcohol al 70% se colocaron en un portaobjetos y se les agregó 5 gotas de solución de Hoyer dejándose reposar por 30 minutos. Se

colocaron en microscopio óptico a 40X, observándose la presencia, posición y relación de estructuras internas características de las fases larvianas de nemátodos anisákidos, tales como ciego paraesofágico, esófago, ventrículo y apéndice ventricular, además de estructuras externas específicas como la presencia de un diente apical y un mucrón. La identificación se realizó de acuerdo con las claves morfológicas desarrolladas por Smith (1983), Pardo et al. (2008) y Hernández et al. (2013).

2.7. Identificación por microscopía electrónica

Las larvas preservadas en solución fijadora se lavaron en solución salina (0.9%) y agua destilada por 30 minutos y se introdujeron en el microscopio electrónico de barrido (Hitachi TM3000) para observar características morfológicas externas propias de las L3 de anisákidos, como forma y presencia de tres labios definidos y un diente apical en el extremo cefálico, y la presencia del mucrón en el extremo caudal, basados en las claves morfológicas desarrolladas por Hernández et al. (2013).

2.8. Análisis molecular

Para la extracción de ADN de las larvas se utilizó el kit Dneasy® Blood and Tissue (QIAGEN 2006), siguiendo las instrucciones del protocolo proporcionado por el fabricante. Se amplificó el segmento de 519 pb del gen mitocondrial de la Citocromo Oxidasa 2 (**COX2**) según el protocolo descrito por D'Amelio et al. (2011) utilizando los iniciadores 211F (5'-TTT TCT AGT TAT ATA GAT TGR TTY AT-3') y 210R (5'-CAC CAA CTC TTA AAA TTA TC-3') con las siguientes modificaciones en su metodología: Se utilizó templado de ADN (0.8 – 1.6 μ M), iniciadores en concentración 8 μ M y Master Mix 0.6 μ M (DreamTaq, Thermofisher®). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se desarrolló mediante el siguiente procedimiento: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, amplificación de 34 ciclos que incluyeron desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a

46°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 90 segundos, y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Además se amplificó un segmento de 850pb del fragmento de ADN ribosómico compuesto por la región **ITS1, 5.8S** e **ITS2, 28S**, descrito por D'Amelio et al. (2011) usando los iniciadores NC5F (5'- GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA AGG ATC ATT-3') y NC2R (5' TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3') con las siguientes modificaciones: templado de ADN (0.8 – 1.6 µM), iniciadores en concentración 8 µM y Master Mix 0.6 µM (DreamTaq, Thermofisher®). Para el PCR se siguió el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, amplificación de 30 ciclos que incluyeron desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 52°C por 40 segundos y extensión a 72°C por 75 segundos, seguidos luego de una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Tanto para la amplificación de las regiones ITS 1 gen 5.8S – ITS 2 gen 28S, como para la amplificación del gen COX II se utilizaron controles positivos obtenidos de ADN extraído de nemátodos anteriormente colectados, el cuál fue amplificado y secuenciado previamente durante la estandarización del experimento. Los productos obtenidos del PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, observándose bandas de 519 pb para el gen COXII y bandas de 850 pb para la región ITS1 5.8S – ITS2 28S.

Los productos finales de PCR fueron purificados y secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con BioEdit® y se compararon con secuencias almacenadas en Gen Bank, posteriormente se evaluaron las relaciones filogenéticas de las especies diagnosticadas, utilizando Análisis Bayesiano por medio del programa Mr.Bayes®.

3. Resultados

Por medio de microscopía óptica se determinó que las L3 extraídas de los tres géneros de peces bajo estudio, tanto de Guanacaste como de Izabal, correspondieron al género *Contraecaecum*.

La longitud media de las larvas analizadas por microscopía óptica fue de 17 mm, las estructuras observadas en el extremo cefálico correspondieron a un diente apical de 0.02 a 0.025 mm de longitud (Figura 3A) a lo largo del tercio anterior de la larva se observó un esófago recto (3–3.2 mm) acompañado por un ciego paraesofágico de 2 a 2.5 mm de longitud (3B), tanto esófago como ciego paraesofágico desembocaron en un ventrículo al final del tercio anterior que midió 0.1 mm, desde el cual se extendió en dirección ventral y caudal un apéndice ventricular de 0.4 mm de longitud y en dirección media caudal el tubo intestinal (Figura 3C). En el extremo ventral caudal se observó el orificio anal y en el extremo final caudal una estructura terminal aguda conocida como mucrón que midió de 0.04 a 0.05 mm de longitud (3D). Las características morfológicas de la microscopía óptica de las L3 encontradas en Guanacaste y en Izabal se resumen en el Cuadro 1.

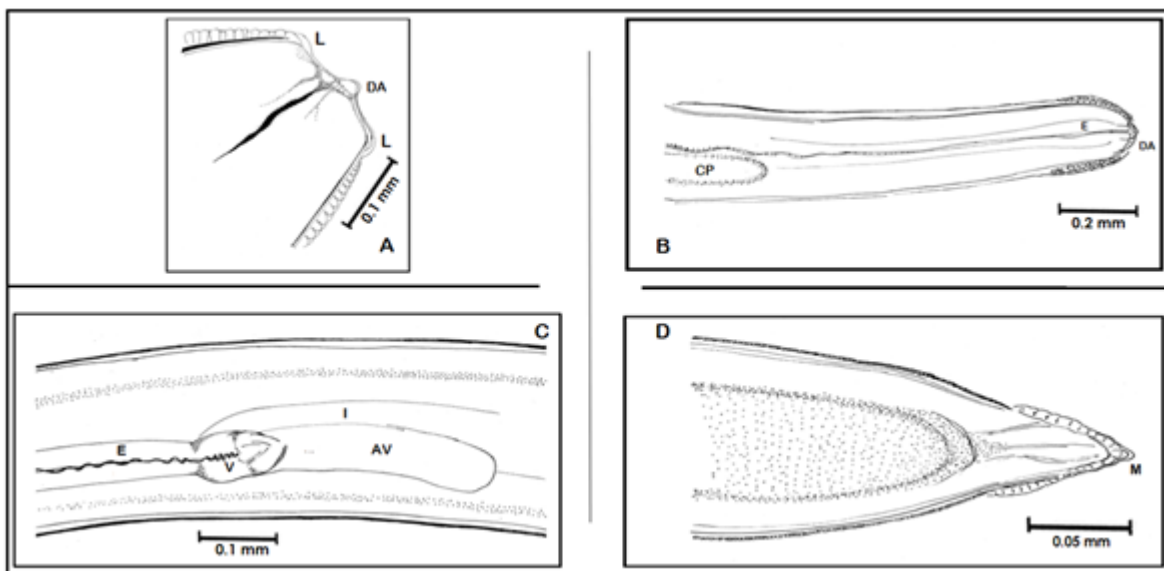


Figura 3. Esquema de L3 de *C. multipapillatum* visualizadas por microscopía óptica. **A.** Diente Apical (DA), Labio (L). **B.** Diente apical (DA), Esófago (E), Ciego Paraesofágico (CP). **C.** Esófago (E), Ventrículo (V), Apéndice Ventricular (AV), Intestino (I). **D.** Mucrón (M).

Por medio de MEB se observaron en detalle las características estructurales de las larvas. Se observó un diente apical situado en el centro del extremo cefálico acompañado ventralmente por el orificio bucal, ambas estructuras estaban rodeadas

por tres labios en cuyos extremos laterales se observaron papilas labiales, dos por cada labio y seis en total (Figura 4A). A lo largo del cuerpo de la larva se observó la cutícula de consistencia rugosa y en el extremo caudal medio el mucrón (Figura 4B). Las características morfológicas de L3 de Guanacaste y de Izabal observadas en la microscopía electrónica se resumen en el Cuadro 1.

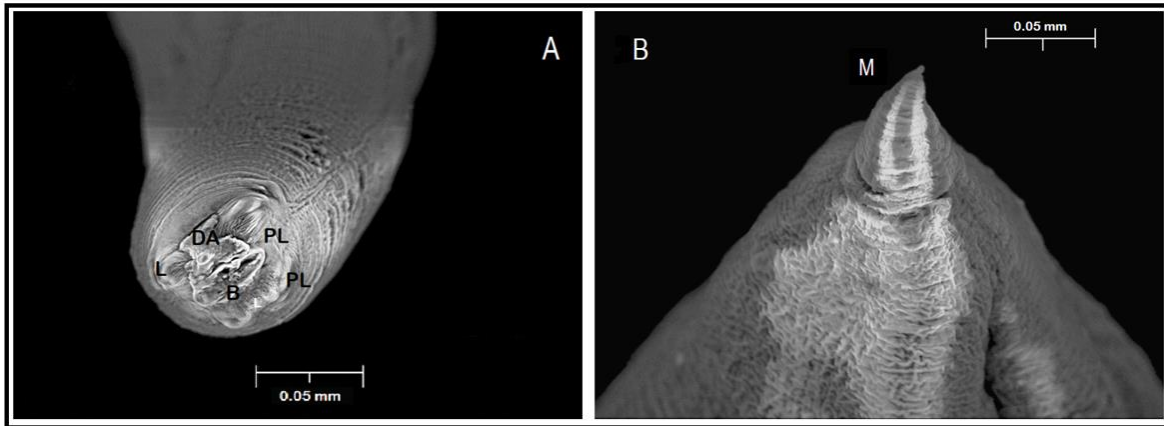


Figura 4. Larva 3 de *C. multipapillatum* visualizadas por MEB. **A.** Diente apical (DA), Boca (B), Labios (L), Papilas Labiales (PL). **B.** Mucrón (M).

Un total de 14 L3, seis provenientes de Guanacaste, Costa Rica y ocho de Izabal, Guatemala, se sometieron a PCR y secuenciación. El producto de la amplificación de la región ITS (ITS1-gen 5.8S - ITS2-gen 28S) de las 14 larvas se muestra en la Figura 5. Las secuencias obtenidas variaron de los 477 pb a los 541 pb y pertenecieron únicamente al fragmento ITS1 5.8S, mostrando una identidad nucleotídica de un 88-92% con una muestra del género *Contraecaecum* colectada de *Tilapia nilotica* y procedente de Egipto (Genbank KX580603), de acuerdo con el análisis del algoritmo BLAST.

Posteriormente, el análisis filogenético por inferencia bayesiana del fragmento secuenciado confirmó que las secuencias obtenidas se agrupan en un taxón perteneciente a *C. multipapillatum*, mostrando un valor de Bootstrap de 74% con relación a la secuencia obtenida de peces de Australia (KC437338) (Figura 6).

Cuadro 1. Características morfológicas de L3 de *C. multipapillatum* en peces de agua dulce de Guanacaste, Costa Rica e Izabal, Guatemala.

Código	País	Hospedador	Datos biométricos		Características microscopía óptica (mm)							Características microscopía electrónica (mm)	
			P (g)	L (cm)	L	DA	E	CP	V	AV	M	DA	M
Abangares 1	CRC	<i>Parachromis</i> sp.	17.8	10.5	14	0.025	3.2	2	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
Abangares 2	CRC	<i>Hoplias</i> sp.	58.3	18.5	20	0.02	3	2	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
Cañas 1	CRC	<i>Parachromis</i> sp.	149.8	21.5	20	0.02	3	2.5	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
Cañas 2	CRC	<i>Rhamdia</i> sp.	78.5	20.0	15	0.02	3	2	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
Higuerón 1	CRC	<i>Parachromis</i> sp.	93.0	19.0	18	0.02	3.1	2.5	0.1	0.4	0.04	0.02	0.05
Higuerón 2	CRC	<i>Rhamdia</i> sp.	69.9	20.0	15	0.02	3	2	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
El Estor 1	GTM	<i>Rhamdia</i> sp.	156.5	32.0	12	0.02	3	2	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
El Estor 2	GTM	<i>Parachromis</i> sp.	78.3	19.0	15	0.025	3	2.5	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
Río Dulce 1	GTM	<i>Rhamdia</i> sp.	260.0	40.0	18	0.025	3.1	2	0.1	0.4	0.04	0.02	0.05
Río Dulce 2	GTM	<i>Parachromis</i> sp.	78.0	18.0	22	0.02	3	2	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
Mariscos	GTM	<i>Rhamdia</i> sp.	1045.0	48.0	17	0.02	3	2	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
El Higuerito 1	GTM	<i>Rhamdia</i> sp.	156.5	32.0	19	0.025	3	2	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
El Higuerito 2	GTM	<i>Parachromis</i> sp.	78.3	19.0	18	0.02	3	2.2	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05
Cayo Piedra	GTM	<i>Rhamdia</i> sp.	273.0	33.0	20	0.025	3	2	0.1	0.4	0.05	0.02	0.05

P: Peso; L: Longitud; DA: Diente Apical; E: Esófago; CP: Ciego Paraesofágico; V: Ventrículo; AV: Apéndice Ventricular; M: Mucrón.

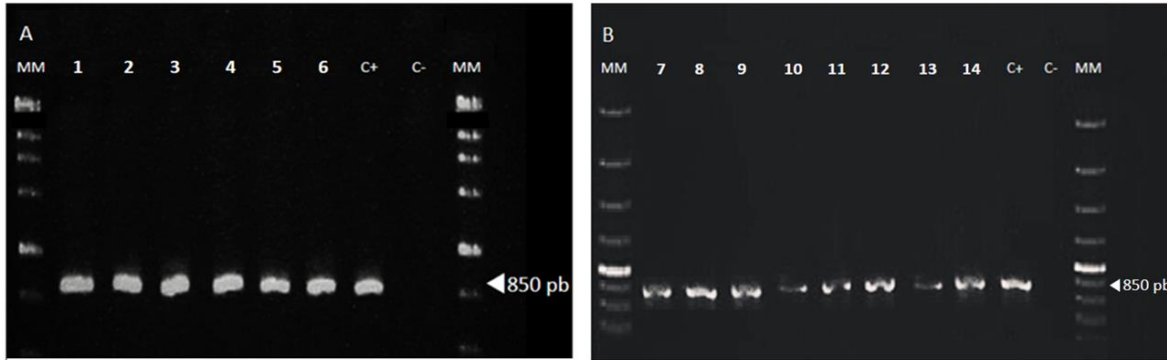


Figura 5. Fragmento ADN mitocondrial ITS1-Gen 5.8S – ITS2-Gen 28S. **A.** MM: Marcador molecular (1kb), 1–6: L3 de Guanacaste, Costa Rica, C+ Control Positivo, C- Control negativo. **B.** MM: Marcador molecular (1kb), 7–14: L3 de Izabal, Guatemala, C+ Control positivo C- Control negativo.

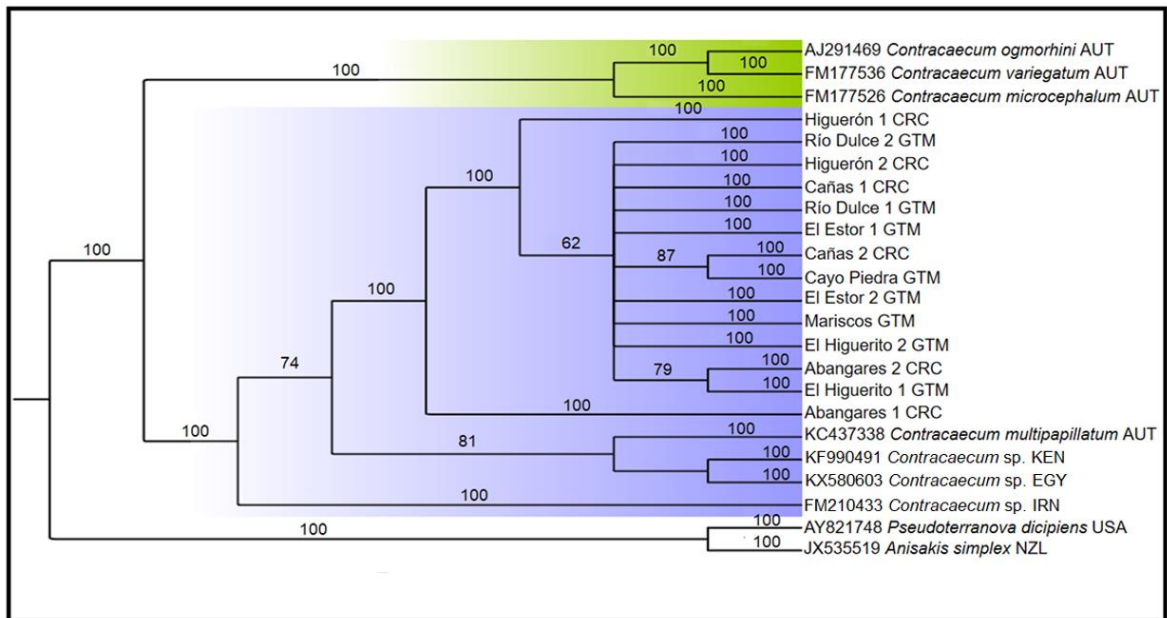


Figura 6. Cladograma del fragmento ITS1 5.8S – ITS2 28S (327pb) de los géneros *Contracaecum*, *Pseudoterranova* y *Anisakis*, generado por Inferencia Bayesiana (BI). Los primeros números de las ramas representan valores de Bootstrap de máxima verosimilitud y probabilidades posteriores de análisis bayesiano expresados como porcentajes sobre 10,000,000 de repeticiones. Las secuencias obtenidas en el presente estudio y las de referencia para *C. multipapillatum* y *Contracaecum* sp. aparecen en sombra azul. Las abreviaturas CRC y GTM corresponden a Costa Rica y Guatemala, respectivamente.

La amplificación del gen COX II (Figura 7) y su posterior secuenciación determinó que las L3 de los sitios de muestreo de Costa Rica y Guatemala pertenecen a la especie *C. multipapillatum*. El análisis del algoritmo BLAST reveló que las secuencias presentan distintos porcentajes de identidad nucleotídica con

varias secuencias encontradas en aves piscívoras (*Pelecanus crispus*), procedentes de Estados Unidos (AF 179910) y Grecia (EU 852344).

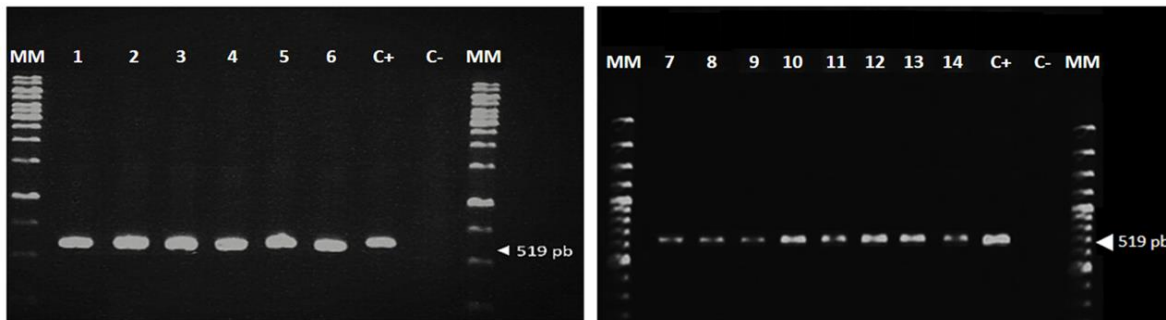


Figura 7. Región COX II ADN ribosomal MM Marcador molecular (1kb). n = 14 larvas identificadas. 1-6. L3 de Guanacaste, Costa Rica. 7–14. L3 de Izabal, Guatemala. C+ Control positivo C- Control negativo

Asimismo, el análisis filogenético de las secuencias del gen COX II muestra un grupo bien definido de las L3, donde únicamente las muestras de El Higuerito 1 y El Estor 1 de Guatemala se separan del resto, aunque mantienen un valor de bootstrap del 100%. También se observó una estrecha relación (valor de Bootstrap 100%) con secuencias de *C. multipapillatum* de Estados Unidos (AF 179910) y Grecia (EU 852344), y una asociación más distante con otras especies de *Contracaecum* (Figura 8).

4. Discusión

Este estudio constituye el primer reporte confirmado mediante diagnóstico molecular de *C. multipapillatum* para Guanacaste, Costa Rica y para Izabal, Guatemala en peces de agua dulce, los cuales son de importancia comercial y alimenticia para estas dos regiones de Centroamérica. El hallazgo de estos nemátodos se suma a los reportes realizados en otras regiones de América, por Salgado et al. (2004) que encontraron especies de *Contracaecum* sp. en Guapotes, García et al. (2016) en Pez tiro (*Goodea atrippins*) de cuerpos de agua dulce de México, Pardo et al. (2007) en Guabinas de Colombia y Maniscalchit et al. (2015) en Guabinas de Venezuela. A nivel mundial destacan los hallazgos de *C.*

poseía una cutícula rugosa, lo que concuerda con lo reportado por Hernández et al. (2013). En contraste, la microscopía óptica permitió determinar estructuras anatómicas externas, como la presencia de diente apical en el extremo cefálico y un mucrón en la parte terminal del extremo caudal, previamente descritas (Matiucci et al. 2010, Nagasawa 2012), identificando estas larvas como pertenecientes al estadio L3 de nemátodos anisákidos en peces de Guanacaste e Izabal, confirmando la descripción de Smith (1983) que describe a diferentes especies de peces como hospedadores intermediarios de esta familia de nemátodos.

El diagnóstico molecular de la región ITS identificó los especímenes hasta el nivel de género, al comparar las secuencias obtenidas con las almacenadas en la base de datos GenBank por medio del algoritmo BLAST. Las secuencias obtenidas en el presente trabajo fueron de un menor tamaño a lo esperado (~500 pb de 850), y pertenecieron al gen 5.8S, que es una región más conservada y en consecuencia insuficiente para realizar una identificación a nivel de especie con el algoritmo BLAST. Sin embargo, en el análisis filogenético bayesiano, tanto las muestras de este estudio como las secuencias de especies de *Contracaecum* de Kenia (KF990491), de Egipto (KX580603) y de Irán (FM210433), con las que se observó mayor similitud, se agruparon con la secuencia de *C. multipapillatum* (KC437338) de Australia con un 100% de relación filogenética. De manera que, a pesar de la longitud de nuestras secuencias es posible utilizar la región ITS para separar especies, siempre que exista suficiente información de los extremos ITS1 e ITS2 en la comparación, debido a que representan sitios de mayor variabilidad como lo reporta Zhu et al. (1998).

Por su parte, el gen COX II permitió una identificación más exacta de las secuencias obtenidas en el presente estudio, las cuales al ser comparadas con las secuencias almacenadas en GenBank por medio del algoritmo BLAST, fueron compatibles con *C. multipapillatum*. Esto quedó confirmado en el análisis de inferencia bayesiana, que mostró altos valores de Bootstrap y alta probabilidad posterior bayesiana con las secuencias de referencia de California (AF179910) y Grecia (EU852344), agrupando todos los especímenes en un solo grupo como *C.*

multipapillatum. Los resultados mostraron altos valores de asociación (90 a 100%), por lo que la precisión filogenética nos permite confirmar los resultados obtenidos con el fragmento ITS 1- 5.8S. Nuestros resultados difieren de lo indicado por D'Amelio et al. (2011) y Cavallero et al. (2011), que reportan una excelente capacidad del identificar especies de parásitos con el gen COX II, e incluso determinar características intraespecíficas. Además, establecieron una baja capacidad para determinar relaciones filogenéticas inter específicas, debido a que en sus estudios observaron valores bajos de Bootstrap al evaluar similitudes entre individuos de diferentes especies, algo que no sucedió en el presente estudio, donde estos valores fueron altos y confiables.

Podemos concluir entonces, que no existe mayor variabilidad entre las secuencias encontradas y las características morfológicas evaluadas de los nemátodos, independientemente de la región de donde procedían (Costa Rica o Guatemala). Sería importante desarrollar estudios en otros países Centroamericanos para determinar si las características son similares en toda la región.

5. Conclusiones

- Se reportan por primera vez en Centroamérica fases infectivas de *C. multipapillatum* en peces de agua dulce (Guapote, Barbudo, Guabina) capturados mediante pesca artesanal.
- No se encontró diferencia significativa entre las características morfológicas de las larvas 3 de *C. multipapillatum* identificadas mediante diagnóstico microscópico, independientemente del género de pez que infectaron o de la región geográfica en la cual fueron encontrados.
- El análisis filogenético confirmó alta similitud entre las secuencias de ADN de los especímenes identificados en Centroamérica con los reportados en Grecia y California, USA.

6. Recomendaciones

- Alertar a las autoridades de salud pública, así como a la población expuesta por consumo de productos pesqueros artesanales sobre la presencia de *C. multipapillatum* en Barbudos, Guapotes y Guabinas de las dos regiones de Centroamérica donde se desarrolló el presente estudio.
- Desarrollar estudios que permitan identificar otros géneros y especies de la familia Anisakidae que se encuentren infectando peces, tanto en cuerpos de agua continentales y oceánicos de otras regiones de Centroamérica.
- Realizar estudios de caracterización de nemátodos en crustáceos, aves y otros géneros de peces, sospechosos de integrar el ciclo de vida de *C. multipapillatum* en Centroamérica, con el fin de establecer la importancia de su papel en el ciclo de vida del nemátodo y el riesgo que pueden representar para la salud humana.

7. Referencias Bibliográficas

- Barriga, J., Salazar, F., y Barriga, E. (1999). Anisakiasis: Presentación de un caso y revisión bibliográfica. *Gastroenterología Perú*, 317-323.
- Cavallero, S., Nadler, S., Paggi, L., Barros, N., y D'Amelio, S. (2011). Molecular characterization and phylogeny of anisakid nematodes from cetaceans from southeastern Atlantic coasts of USA, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Parasitology Research*, 781-792. doi:10.1007/s00436-010-2226-y
- D'Amelio, S., Barros, N., Ingrosso, S., Fauquier, D., Russo, R., y Paggi, I. (2007). Genetic characterization of members of the genus *Contraecum* (Nematoda: Anisakidae) from fish-eating birds from west-central Florida, USA, with evidence of new species. *Parasitology Cambridge University Press*, 1041 - 1051. doi:10.1017/S003118200700251X
- D'Amelio, S., Cavallero, S., Dronen, N., Barros, N., y Paggi, L. (2012). Two new species of *Contraecum* Railliet y Henry 1912 (Nematoda: Anisakidae), *C. fagerholmi* n. sp. and *C. rudolphii* F from the brown pelican *Pelecanus occidentalis* in the northern Gulf of Mexico. *Systemic Parasitology*, 81, 1–16. doi:10.1007/s11230-011-9323-x

- Fontenelle, G., Knoff, M., Nunes, N., Silva, L., y Carmona, S. (Abril - Junio de 2013). Nematodes of zoonotic importance in *Cynoscion guatucupa* (Pisces) in the state of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Parasitología Veterinaria*, 22(2), 281-284. doi:10.1590/S1984-29612013005000019
- García, M., Salguero, G., García, L., Osorio, D., y Perez, G. (2016). Endohelminths of some species of fishes from Lake Xochimilco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(4), 1360-1364. doi:10.1016/j.rmb.2016.06.018
- García, M., Salguero, G., García, L., Osorio, D., y Perez, G. (2016). Endohelminths of some species of fishes from Lake Xochimilco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(4), 1360-1364. doi:10.1016/j.rmb.2016.06.018
- Hernández, J., Aznar, F., Blasco, I., García, N., Vilora, M., Crespo, E., . . . Montero, F. (2013). Description, microhabitat selection and infection patterns of sealworm larvae (*Pseudoterranova decipiens* species complex, nematoda: ascaridoidea) in fishes from Patagonia, Argentina. *Parasites & Vectors*, VI(252), 1-15.
- Jofré, L., Neira, P., Nohemí, I., y Cerva, J. (2008). Pseudoterranovosis y sushi. *Revista Chilena de Infectología*, 200-206.
- Amato, J., Monteiro, C., y Amato, S. (2006). *Contraecum rudolphii* Hartwich (Nematoda, Anisakidae) from the Neotropical Cormorant, *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin) (Aves, Phalacrocoracidae) in southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1284-1289.
- Mancinni, M., Biolé, F., Salinas, V., Guagliardo, S., Tanzola, R., y Morra, G. (Enero-Junio de 2014). Prevalence, Intensity and Ecological aspects of *Contraecum* sp. (Nematode: Anisakidae) in freshwater fish of Argentina. *Neotropical Helminthology*, 8(1), 111-122. Obtenido de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/neohel/v8n1/pdf/a10v8n1.pdf>
- Maniscalchi, M., Lemus, D., Marcano, Y., Edgar, N., Marianella, Z., y Narváez, N. (2015). Larvas anisakidae en peces del género mugil comercializados en mercados de la región costera nor-oriental e insular de Venezuela. *Saber*, 27(1), 30-38. Obtenido de <http://www.scielo.org.ve/pdf/saber/v27n1/art05.pdf>
- Martins, M., Onoka, E., y Fenerick, J. (2005). Larval *Contraecum* sp. (Nematoda: Anisakidae) in *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Osteichthyes: Erythrinidae) of economic importance in occidental marshlands of Maranhão, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 51 - 59. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.026

- Mattiucci, S., Paoletti, M., Consuegra, A., y Nascetti, G. (2010). *Contraecum gibsoni* n. sp. and *C. overstreeti* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from the Dalmatian pelican *Pelecanus crispus* (L.) in Greek waters: genetic and morphological evidence. *Systemic Parasitology*, 207-224.
- Nadler, S., D' Amelio, S., Fagerholm, H., Berland, B., y Paggi, L. (2000). Phylogenetic relationships among species of *Contraecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaris* Hüst, 1932 (Nematoda:Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. *Parasitology*, 455-463.
- Nagasawa, K. (2012). The biology of *Contraecum osculatum* sensu lato and *C. osculatum* A (Nematoda: Anisakidae) in Japanese waters: a review. *Biosphere, Sci*, 51, 61 - 69.
- Otachi, E., Szostakowska, B., Jirsa, F., y Fellner, C. (2015). Parasite communities of the elongate tigerfish *Hydrocynus forskahlii* (Cuvier 1819) and redbelly tilapia *Tilapia zillii* (Gervais 1848) from Lake Turkana, Kenya: influence of host sex and size. *Acta Parasitologica*, 9-20.
- Pardo, S., Mejía, K., Navarro, Y., y Atencio, V. (2007). Prevalence and Abundance of *Contraecum* sp. of Rubio Salminus affinis in Sinu and San Jorge Rivers morfological description. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1), 887-896.
- Pardo, S., Zumaque, A., Noble, H., y Suarez, H. (2008). *Contraecum* sp (ANISAKIDAE) en el pez *Hoplias malabaricus*, capturado en la ciénaga grande de Lorica, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 13(2), 1304-1314.
- Salazar, M., María, d. C., y Valle, A. (2012). Presencia de anticuerpos anti-*contraecum multipapillatum* (S.L) como método diagnóstico de contracecosis en la población de La Paz, BCS., México. *The Biologist*.
- Salgado, G., Pineda, R., García, L., y Lopez, S. (2004). Parásitos de peces dulceacuícolas. En J. Bueno, *Biodiversidad del Estado de Tabasco* (págs. 93-114). México DF: S y G Editores S.A. de C.V.
- Serrano, E., Quispe, M., Hinojosa, E., y Placencia, L. (2017). Detección de Parásitos en Peces Marinos Destinados al Consumo Humano en Lima Metropolitana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 160-168.
- Shamsi, S., y Meshgi, A. (2010). Morphological and genetic characterisation of selected *Contraecum* (Nematoda: Anisakidae) larvae in Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 356-361.
- Smith, J. (1983). *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea): Morphology and morphometry of larvae from euphausiids and

fish, and a review of the life-history and ecology. *Journal of Helminthology*, 57, 205 - 224.

Younis, A., Saad, A., y Jihan, M. (2017). The occurrence of *Contraecum* sp. larvae (Nematoda: Anisakidae) in four teleostean species from Lake Nasser, Egypt: morphological and molecular studies. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 1-13.

Zhu, X., D'Amelio, S., Paggi, L., y Gasser, R. (2000). Assesing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contraecum* osculatum complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Parasitology Research*, 86, 677 - 683.

**Prevalencia de *Contracaecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakidae)
en peces de aguas continentales de
Guanacaste, Costa Rica e Izabal, Guatemala**

RESUMEN

Contracaecum multipapillatum (Nematoda: Anisakidae) posee un ciclo de vida que incluye a peces como hospedadores intermediarios, mamíferos marinos y aves como hospedadores definitivos, y al ser humano como hospedador accidental por consumo de carne de pescado cruda o semi cocinada, ocasionando Contracecosis. Este riesgo para la salud humana hace importante determinar la prevalencia, así como la intensidad de infección y ubicación anatómica en peces de aguas continentales destinados al consumo humano mediante pesca artesanal.

Se recolectaron 214 peces en 6 ríos del Cantón de Cañas, Guanacaste, Costa Rica y 203 peces en el Lago de Izabal y Río Dulce, del departamento de Izabal, Guatemala. Se recolectaron 36 peces infectados en Guanacaste y 51 en Izabal. Se recolectaron 103 larvas del tercer estadio (L3) en Guanacaste y 135 larvas en Izabal. Se tomaron parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, pH y oxígeno disuelto en agua) en los sitios de pesca para determinar su asociación a la susceptibilidad de los peces a infección.

La prevalencia de infección para Guanacaste fue de 16.8% y 25.1% para Izabal, se observó mayor afinidad de L3 por órganos viscerales (22.4% en Guanacaste – 25.12% en Izabal) y menor por tejido muscular (2% en Guanacaste – 0.98% en Izabal). La intensidad de infección fue de 1 y 2 nemátodos por pez en peces pequeños; y 12 a 14 nemátodos por pez en peces más grandes. No se observó asociación entre los parámetros fisicoquímicos del agua y la susceptibilidad de peces a infección.

Palabras clave: Anisakidae, *Contracaecum multipapillatum*, pesca artesanal, Costa Rica, Guatemala

Abstract

Contracaecum multipapillatum (Nematoda: Anisakidae) has a life cycle that includes fish as intermediate hosts, marine mammals and birds as definitive hosts and humans as an accidental host for consumption of raw or semi-cooked fish meat, causing Contracecosis. This risk to the human health makes it important to determine the prevalence, as well as the intensity of infection and anatomical location in inland waters fish destined for human consumption through artisanal fishing.

214 fish were collected in 6 rivers of Cantón de Cañas, Guanacaste, Costa Rica and 203 fish in Lago de Izabal and Río Dulce, in Izabal, Guatemala. 36 infected fish were collected in Guanacaste and 51 in Izabal. Were collected 103 larvae of the third stage (L3) in Guanacaste and 135 larvae in Izabal. Physicochemical parameters of the water (temperature, pH and oxygen dissolved in water) were taken at the fishing sites to determine their association with the susceptibility of the fish to infection.

The prevalence of infection for Guanacaste was 16.8% and 25.1% for Izabal, higher affinity of L3 was observed in visceral organs (22.4% in Guanacaste - 25.12% in Izabal) and lower in muscle tissue (2% in Guanacaste - 0.98% in Izabal). Infection intensity was 1 and 2 nematodes per fish in small fish; and 12 to 14 nematodes per fish in larger fish. No association was observed between the physicochemical parameters of the water and the susceptibility of fish to infection.

Key words: Anisakidae, *Contracaecum multipapillatum*, artisanal fishing, Costa Rica, Guatemala

1. Introducción

Los nematodos de la familia Anisakidae comprende a los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*, que han cobrada importancia por su capacidad de producir infecciones zoonóticas por consumo de carne de pescado cruda o insuficientemente cocinada. La especie *Contracaecum multipapillatum*, posee un

ciclo de vida que se desarrolla en ambientes acuáticos parasitando a diferentes especies de crustáceos en sus primeras fases larvianas y a peces en su tercer estadio larvario, siendo esta la fase infectante para los hospederos definitivos constituidos por aves piscívoras, en las que se da la reproducción sexual y liberación de huevos hacia el medio ambiente acuático iniciando un nuevo ciclo de vida.

El género *Contracaecum* ha sido reportado en cíclidos del género *Oreochromis* sp. (Tilapia) y *Parachromis* sp. (Guapotes) en México y Perú (Salgado et al. 2004 y Chiclla et al 2015), mientras que Mancinni et al. (2014) reportaron prevalencias de *Contracaecum* spp. del 70% y 87% en *Hoplias* spp. (Guabinas) y *Rhamdia* spp. (Barbudos) de Argentina, y Manischalchi et al. (2015) establecieron prevalencias de 83.6% en peces del género *Mugil* spp. (Lisas) de Venezuela, siendo estos los únicos reportes en América Latina de hallazgos de *C. multipapillatum* en peces destinados al consumo humano.

Los reportes que asocian los nemátodos anisákidos con infecciones accidentales en el ser humano son también escasos en Latinoamérica. En Perú (Serrano et al. 2008) se confirmó la infección por nemátodos de los géneros *Anisakis* y *Pseudoterranova*, mientras que en Argentina (Menghi et al. 2001) se ha reportado la zoonosis sin determinar el género y especie de anisákido involucrado. Aunque la capacidad infectiva de *Contracaecum* spp. no ha sido confirmada en seres humanos debido a la ausencia de reportes de infecciones específicas, si ha sido comprobada experimentalmente en modelos animales en México (Vidal et al. 1994).

La infección en el ser humano es conocida como Contracecosis y clínicamente produce tres cuadros clínicos característicos que se desarrollan según la capacidad de la larva de superar la respuesta inmune del ser humano. El primer cuadro es el cuadro gastroalérgico que inicia con vómitos y diarrea acompañados de dolor agudo por penetración de la larva infectiva en la mucosa gástrica o duodenal. La migración extraintestinal de la larva ocasiona el cuadro crónico o gastro-alérgico, caracterizado por reacciones alérgicas en piel o en tracto respiratorio que se manifiestan como procesos asmáticos (Hacha y Zyfres, 2003; Romero et al. 2014; Lim et al. 2015).

Debido al reciente hallazgo y confirmación de la presencia de *Contracaecum multipapillatum* en peces comerciales de Guanacaste, Costa Rica e Izabal, Guatemala, cobra importancia conocer y determinar los factores que influyen en la presencia de estos nemátodos en determinadas poblaciones de peces y el riesgo que pueden representar para la salud humana, por lo que este estudio planteó como objetivo determinar la prevalencia de infección del parásito en peces de consumo humano (Guapotes, Barbudos y Guabinas) en distintos sitios de pesca artesanal de Guanacaste y Guatemala, determinar la ubicación de la larva 3 (L3) en los peces y correlacionar su presencia con parámetros fisicoquímicos del medio ambiente acuático.

2. Metodología

2.1. Áreas de estudio

Se recolectaron peces en seis ríos de la provincia de Guanacaste, Costa Rica, y cinco puntos del Lago de Izabal y Río Dulce, del departamento de Izabal, Guatemala, todos ellos cercanos a comunidades que practican pesca artesanal.

Los ríos en los cuales se desarrolló el muestreo en Guanacaste fueron el Canal Interno de la Finca de la Universidad Técnica Nacional (UTN), los ríos Duque, Paso Hondo, Cañas, Higuerón y Abangares, todos ubicados en el cantón de Cañas. Los sitios de muestreo seleccionados en Izabal fueron puntos de pesca cercanos a las comunidades de El Estor y de Mariscos, ambos dentro del Lago de Izabal; y las comunidades de Río Dulce, El Higuerito y Cayo Piedra, situadas dentro de la cuenca de Río Dulce (Cuadro 1).

2.2 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra para determinar la presencia (nivel de confianza 95%, prevalencia esperada 3%) y la prevalencia (nivel de confianza 95%, error aceptado 7.5%, prevalencia esperada 31%) de la infección se calculó mediante el programa WinEpiscope, utilizando parámetros para población infinita. Se obtuvo un tamaño de muestra a analizar de 99 peces y 147 peces por región, para determinar

presencia y prevalencia, respectivamente. Sin embargo, se recolectaron 214 peces en Guanacaste y 203 peces en Izabal para un total de 417 peces.

2.3 Recolecta de datos y peces

Previo a la captura de los peces se tomaron parámetros fisicoquímicos del medio ambiente acuático (pH, temperatura y oxígeno) por medio de una sonda multiparamétrica en cada sitio de pesca y se tomaron las coordenadas con equipo de georreferenciación.

Luego se procedió a capturar tres tipos de peces mediante pesca artesanal: *Parachromis* sp., (Guapote) *Rhamdia* sp. (Barbudo) y *Hoplias* sp. (Guabina). Los peces se transportaron en frío para su posterior análisis.

En el laboratorio se tomaron datos biométricos (peso y tamaño) de cada pez y se identificaron taxonómicamente a nivel de género, se realizó necropsia buscando larvas de diferentes especies de parásitos anisákidos en órganos viscerales y musculatura axial. Para establecer la intensidad de infección por región anatómica se colocaron los nemátodos extraídos en cajas de Petri, y se realizó el conteo del número de larvas extraídas por pez y por ubicación (vísceras o músculo).

2.4 Análisis parasitológico

Las larvas extraídas (90 de Guanacaste y 133 de Izabal) se sometieron a digestión artificial en pepsina 1.5%, ácido clorhídrico 0.8% (concentración al 25%), en agitación constante a 42°C hasta lograr la liberación de las larvas de los tejidos, y se preservaron en alcohol al 70% para su diagnóstico por microscopía óptica y técnicas moleculares como se describió previamente (Wer y colaboradores, comunicación personal).

2.5. Análisis estadístico

Se identificaron las zonas de muestreo con presencia de peces infectados y se estableció la prevalencia de infección por estadística descriptiva. Se determinó la infección por nemátodos en peces, los géneros de peces infectados, la ubicación

anatómica (musculo, vísceras) de las larvas y los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura y oxígeno) entre los sitios de pesca, para determinar si existían diferencias significativas mediante el programa Win epi®. Para ello se calcularon los valores de Chi² para prueba de dos colas o prueba corregida de Yates en muestras de tamaño no proporcional.

3. Resultados

Las L3 recolectadas se identificaron como pertenecientes al género *Contracaecum* mediante microscopía electrónica y se confirmaron mediante microscopía óptica y análisis molecular como *C. multipapillatum*. Se estableció una prevalencia de infección de un 16.8% (36/214) en peces de Guanacaste y 25.1% (51/203) en peces de Izabal. Los sitios con presencia de peces infectados en Guanacaste fueron los ríos Abangares, Cañas e Higuerón, mientras que, en Izabal, de encontraron peces infectados con larvas de *C. multipapillatum* en todos los sitios muestreados. El porcentaje de infección en peces de los sitios de muestreo tanto de Guanacaste como de Izabal se desglosa en el Cuadro 1.

La prueba corregida de Yates no determinó diferencias significativas entre los tres sitios de muestreo de Guanacaste con presencia de peces positivos ($P > 0.05$), mientras que para Izabal se determinó una diferencia significativa entre Cayo Piedra y los demás sitios de muestreo ya que se encontraron menos peces positivos con relación a la cantidad de peces recolectados ($P < 0.05$).

Los parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, pH, oxígeno) en los sitios con presencia de peces infectados no mostraron diferencias significativas, tanto con la prueba corregida de Yates como con el cálculo de Chi² ($P > 0.05$), mientras que los sitios en los que no se encontraron peces infectados destacaron por sus bajos niveles de oxígeno disuelto en agua (<4 ppm) a diferencia de los sitios con peces infectados, que presentaron niveles normales de oxígeno (Cuadro 2).

En Guanacaste la mayor proporción de peces infectados fue del género *Parachromis* sp. en el río Abangares (29.4%), y del género *Rhamdia* sp. en el río Higuerón (45.4%). Por su parte en Izabal la mayoría de los peces infectados fue del

género *Parachromis* sp. en Río Dulce (41.5%) y del género *Rhamdia* sp. (36.4%) en el sitio de Mariscos (Cuadro 1). No se determinó diferencias significativas entre infección por *C. multipapillatum* y género de pez ($P>0.05$).

La mayor intensidad de infección determinada en los peces de Guanacaste fue de 14 larvas por pez en un espécimen del género *Parachromis* con peso de 148.8 g y longitud de 24 cm; mientras que en Izabal la mayor intensidad de infección se observó en un pez del género *Rhamdia* con peso de 260 g y 40 cm de longitud, que poseía un total de 12 larvas. Además, se recolectó un pez del género *Hoplias* con una intensidad de infección de 4 larvas (Cuadro 3).

Cuadro 1. Prevalencia de *C. multipapillatum* en peces de Guanacaste, Costa Rica e Izabal, Guatemala.

Sitio de muestreo Guanacaste	<i>Rhamdia</i> sp.	<i>Parachromis</i> sp.	<i>Hoplias</i> sp.	Total	Coordenadas	
	%(+/total)	% (+/total)	% (+/total)	% (+/total)	N	O
Río Duque	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/0)	0 (0/2)	10.3170	-85.1469
Canal UTN	0 (0/0)	0 (0/2)	0 (0/0)	0 (0/2)	10.3249	-85.1530
Río Paso Hondo	0 (0/20)	0 (0/26)	0 (0/0)	0 (0/46)	10.4211	-85.1508
Río Abangares	0 (0/1)	29.4 (5/17)	100 (1/1)	31.6 (6/19)	10.2536	-85.0114
Río Cañas	13.5 (5/37)	17.0 (8/47)	0 (0/0)	15.5 (13/84)	10.3815	-85.1128
Río Higuierón	45.4 (5/11)	24 (12/50)	0 (0/0)	27.9 (17/61)	10.3504	-85.0684
TOTAL	14.3 (10/70)	17.5 (25/143)	100 (1/1)	16.8 (36/214)		

Sitio de Muestreo Izabal	<i>Rhamdia</i> sp.	<i>Parachromis</i> sp.	<i>Hoplias</i> sp.	Total	Coordenadas	
	%(+/total)	% (+/total)	% (+/total)	% (+/total)	N	O
Río Dulce	33.3 (7/21)	41.5 (17/41)	0 (0/0)	38.7 (24/62)	15.6601	-89.0027
El Higuierito	18.2 (6/33)	20 (2/10)	0 (0/0)	18.6 (8/43)	15.7644	-88.8498
Cayo Piedra	6.4 (2/31)	0 (0/0)	0 (0/0)	6.4 (2/31)	15.7303	-88.8847
Mariscos	36.4 (12/33)	0 (0/0)	0 (0/0)	36.4 (12/33)	15.4884	-89.1757
El Estor	14.3 (1/7)	14.8 (4/27)	0 (0/0)	14.7 (5/34)	15.4900	-89.2898
TOTAL	22.4 (28/125)	29.5 (23/78)	0 (0/0)	25.1 (51/203)		

Cuadro 2. Parámetros fisicoquímicos observados en los sitios de muestreo de Guanacaste, Costa Rica e Izabal, Guatemala.

Sitio de Muestreo Guanacaste	Temperatura (°c)	pH (6.5 – 8)	Oxígeno (5 – 14 mg/l)	Presencia de infección		TOTAL
				Positivos	Negativos	
Río Duque	25.9	7.4	2.9	0	2	2
Canal Finca UTN	27.7	7.2	2.7	0	2	2
Río Paso Hondo	27.7	7.3	2.7	0	46	46
Río Abangares	30.1	8.3	4.9	6	12	19
Río Cañas	28.3	7.5	6.6	13	71	84
Río Higuerón	28.1	7.4	6.1	17	44	61
TOTAL				36	178	214

Sitio de Muestreo Izabal	Temperatura (°c)	pH (6.5 – 8)	Oxígeno (5 – 14 mg/l)	Presencia de Infección		TOTAL
				Positivos	Negativos	
Río Dulce	30.4	7.9	6.5	24	38	62
El Higuerito	30.9	8.5	7.0	8	35	43
Cayo Piedra	31.0	8.8	7.0	2	29	31
Mariscos	30.5	8.6	6.6	12	21	33
El Estor	30.2	10.5	6.5	5	29	34
TOTAL				51	152	203

Se observaron larvas enquistadas en vísceras de los 36 peces infectados recolectados en Guanacaste, incluyendo el único pez del género *Hoplias* procedente del río Abangares, mientras que solamente un espécimen perteneciente al género *Parachromis* proveniente del río Higuerón (3%), mostró larvas enquistadas en la fascia muscular celómica. En Izabal también se observaron larvas enquistadas en vísceras de todos los peces infectados, mientras que dos de estos peces (un *Rhamdia* y un *Parachromis*) también mostraron larvas enquistadas en la fascia muscular celómica (Cuadro 4). Se estableció una marcada preferencia de las L3 de *C. multipapillatum* por vísceras y no por musculatura, tanto en los peces de Guanacaste como de Izabal ($P < 0.05$).

Cuadro 3. Intensidad de infección por L3 en peces colectados en Guanacaste, Costa Rica (A) e Izabal, Guatemala (B).

A

Número de L3	<i>Rhamdia sp.</i>	<i>Parachromis sp.</i>	Total	Peso	Longitud
	% (+/total)	% (+/total)	% (+/total)	Media (g)	Media (cm)
1	13.9 (5/36)	22.2 (8/36)	36.1 (13/36)	66.7	17.5
2	2.8 (1/36)	13.9 (5/36)	16.7 (6/36)	119.8	19.0
3	5.6 (2/36)	13.9 (5/36)	19.4 (7/36)	77.8	17.5
4	2.8 (1/36)	8.3 (3/36)	13.9 (5/36)	82.8	19.1
5	0 (0/36)	2.8 (1/36)	2.8 (1/36)	77.4	18.0
6	2.8 (1/36)	2.8 (1/36)	5.6 (2/36)	72.3	18.2
9	0 (0/36)	2.8 (1/36)	2.8 (1/36)	93.0	19.0
14	0 (0/36)	2.8 (1/36)	2.8 (1/36)	148.8	24.0
Total	27.8 (10/36)	69.4 (25/36)	100 (36/36)		
Media				92.32	19.04

B

Número de L3	<i>Rhamdia sp.</i>	<i>Parachromis sp.</i>	Total	Peso	Longitud
	% (+/total)	% (+/total)	% (+/total)	Media (g)	Media (cm)
1	9.8 (5/51)	3.9 (2/51)	13.7 (7/51)	214.9	28.4
2	39.2 (20/51)	17.6 (9/51)	58.7 (29/51)	212.9	27.8
3	11.8 (6/51)	3.9 (2/51)	15.7 (8/51)	233.2	29.2
4	2 (1/51)	0 (0/0)	2 (1/51)	265.0	30.0
5	5.9 (3/51)	0 (0/0)	5.9 (3/51)	304.0	32.7
7	2 (1/51)	0 (0/0)	2 (1/51)	1045.0	48.0
8	2 (1/51)	0 (0/0)	2 (1/51)	280.0	35.0
12	2 (1/51)	0 (0/0)	2 (1/51)	260.0	40.0
Total	74.5 (38/51)	25.5 (13/51)	100 (51/51)		
Media				351.87	33.89

Cuadro 4. Infección por L3 en vísceras de peces de Guanacaste, Costa Rica (A) e Izabal, Guatemala (B).

A

Sitio de Muestreo	Víscheras		TOTAL
	<i>Rhamdia</i> sp. % (n+/n total)	<i>Parachromis</i> sp. % (n+/n total)	
Abangares	0 (0/0)	100 (5/5)	33 (5/5)
Cañas	100 (5/5)	100 (8/8)	100 (13/13)
Higuerón	100 (5/5)	92 (11/12)	100 (17/17)
TOTAL	100 (10/10)	96 (24/25)	100 (35/35)

B

Sitio de Muestreo	Víscheras		TOTAL
	<i>Rhamdia</i> sp. % (n+/n total)	<i>Parachromis</i> sp. % (n+/n total)	
El Estor	100 (1/1)	100 (4/4)	100 (5/5)
Río Dulce	100 (7/7)	100 (17/17)	100 (24/24)
Mariscos	100 (12/12)	0 (0/0)	100 (12/12)
El Higuerito	100 (6/6)	100 (2/2)	100 (8/8)
Cayo Piedra	100 (2/2)	0 (0/0)	100 (2/2)
TOTAL	100 (28/28)	100 (23/23)	100 (1/51)

4. Discusión

Las prevalencias de L3 de *C. multipapillatum* determinadas en Guanacaste (16.8%) e Izabal (25.1%) fueron menores a las reportadas en regiones de similar latitud tropical en Latinoamérica (Pardo et al. 2007 y 2008; Martínez et al. 2004; García et al. 2016), estos estudios realizados en Argentina, Colombia y México analizaron géneros diferentes de peces a los estudiados en el presente trabajo, lo que podría explicar la diferencia entre las prevalencias determinadas en Guanacaste e Izabal, con respecto a los demás trabajos. Pardo et al. (2007 y 2008) mencionan la capacidad de infección de *Contracaecum* sp para afectar a distintas especies de peces como un factor clave para explicar la diferencia de prevalencias entre diferentes huéspedes, en el presente estudio no se determinó estadísticamente esta afinidad específica o una mayor susceptibilidad de alguna de las especies de peces estudiadas a la infección con *C. multipapillatum*, sin embargo se observó en ambas regiones de estudio una mayor prevalencia en *Parachromis* sp., con respecto a *Rhamdia* sp., factor que al no ser concluyente debe ser investigado en futuros trabajos.

Las diferentes prevalencias detectadas en Centroamérica se pueden deber a características del medio ambiente, que son diferentes entre las dos regiones donde se desarrolló el estudio. Según García et al. (2016), existe una relación entre la variabilidad de la prevalencia de helmintos con las características locales del medio ambiente, las cuales al ser óptimas favorecen la presencia y abundancia de los hospederos tanto intermediarios como definitivos para dar continuidad al ciclo de vida de nemátodos como *Contracaecum* spp. Esto concuerda con lo observado en los sitios muestreados con presencia de peces infectados en Guanacaste, que presentaron como característica común, un medio ambiente asociado a la presencia de bosque seco tropical y de zonas semi urbanas ubicadas en las cuencas de los ríos, mientras que en Izabal la característica común eran medios ambientes que variaban entre la presencia de bosque tropical húmedo y plantas acuáticas como tul en la mayoría de los sitios de muestreo y grandes zonas urbanas en otros sitios, favoreciendo la presencia de determinadas especies de aves piscívoras cuyas densidades poblacionales mayores o menores podrían influir en el aumento o disminución del ciclo evolutivo de *Contracaecum multipapillatum* y por consiguiente en sus rangos de prevalencia.

Estos datos de prevalencia en ambas regiones son el primer reporte de infección de la especie *Contracaecum multipapillatum* infectando a peces de los géneros *Parachromis*, *Rhamdia* y *Hoplias* en Latinoamérica. Hasta la fecha solamente se había reportado la presencia de *Contracaecum* a nivel de género, sin determinar la especie en *Parachromis* sp (Salgado et al. 2004) en México, y en los peces *Astronotus* sp en Brasil (Azevedo et al, 2007) y *Oreochromis* sp en Perú (Chiclla et al, 2015 y Serrano et al. 2015)

Las altas prevalencias en algunos de los puntos de muestreo de Guatemala pueden deberse a su cercanía a zonas urbanas y cercanía con puntos de comercialización de peces. En esos sitios, los hábitos relacionados con limpieza y eliminación de vísceras de peces hacia el río podrían influir en la presencia de mayor cantidad de alimento para la fauna acuática local, y por consiguiente mayor exposición de peces depredadores como *Rhamdia* sp. y *Parachromis* sp. a vísceras

contaminadas con L3. Esto concuerda con las observaciones de Gea (2015), que determinó estos hábitos en puntos de pesca de alta mar y observó una relación directa entre la evisceración y eliminación de contenidos contaminados con nemátodos al medio ambiente acuático y el aumento de prevalencias y carga parasitaria por anisákidos en peces de los sitios donde se realizaba esta actividad.

En contraste, los sitios con bajas prevalencias del parásito en peces fueron aquellos en los que se establecieron niveles de oxígeno inferiores a 2 ppm, el cual es un valor debajo de lo considerado como óptimo (5 a 14 mg/l) para el adecuado desarrollo de un ecosistema, (Boyd, 2015). Según Huizinga (1967) y Borges et al. (2012), un bajo nivel de oxígeno podría provocar migraciones de crustáceos copépodos, hospederos primarios de *C. multipapillatum* a otros ecosistemas acuáticos con condiciones fisicoquímicas más favorables, disminuyendo así su presencia y posible ingestión por peces y disminuyendo posibilidad de infección.

La menor cantidad de larvas por pez se determinó en Guanacaste, donde los peces mostraron menor peso y longitud en comparación con los peces de Izabal, que reportaron un mayor peso y longitud, detectándose una mayor cantidad de larvas en estos peces. Esto concuerda con los reportes de Hamman (1999) y Pardo et al. (2008), que correlacionaron una alta intensidad de infección con una mayor edad, peso y talla de peces en *Serrasalmus spilopleura* (Pirañas) y en *Hoplias malabaricus* (Guabinas) respectivamente, indicando que los peces más grandes poseen hábitos alimenticios más voraces, y por consiguiente, poseen una mayor predisposición a ser infectados por *Contracaecum*. Esta característica la comparten *Parachromis* sp., *Rhamdia* sp., y *Hoplias* sp., según los datos aportados por Bussing (1998), que reportan su naturaleza voraz y depredadora.

También se observó, una alta tendencia de *C. multipapillatum* por ubicarse formando quistes en órganos viscerales, mientras que la cantidad de quistes adheridos en musculatura fue muy escasa, estos resultados son similares a los hallados por Pardo et al. (2008) y Hernández et al. (2013), los cuales reportaron una baja afinidad de las L3 de *Contracaecum* sp. por adherirse a tejido muscular, y una fuerte tendencia a la formación de quistes en órganos viscerales, además de una

baja capacidad de migración desde vísceras hacia musculatura una vez que el pez ha muerto. Esto es importante, pues determina la capacidad infectiva de las larvas para el ser humano al momento de consumir productos pesqueros.

El presente estudio reporta por primera vez la presencia de *Contracaecum* sp, un nemátodo zoonótico en peces de agua dulce de las regiones de la provincia de Guanacaste, Costa Rica y del departamento de Izabal, Guatemala, donde son comercializados artesanalmente y constituyen una fuente básica de alimentación para poblaciones cercanas a ríos y lagos. La presencia del nemátodo zoonótico en Centroamérica debe de alertar a los profesionales de la Salud para tomar en cuenta la *Contracecosis* como diagnóstico diferencial en casos clínicos donde los antecedentes incluyan hábitos de consumo de carne de pescado cruda o semicocinada. La ausencia de protocolos diagnósticos puede estar provocando un sub diagnóstico de la enfermedad en el ser humano y se recomienda implementar políticas de prevención enfocadas a crear buenos hábitos de limpieza y cocina de platillos a base de carne de pescado y así prevenir infecciones accidentales.

5. Conclusiones

- La prevalencia de *C. multipapillatum* en peces *Parachromis* sp., *Rhamdia* sp., y *Hoplias* sp. fue de 16.8% para Guanacaste, Costa Rica y de 25.1% para Izabal, Guatemala.
- No se estableció diferencia significativa en la preferencia de infección de *C. multipapillatum* por un determinado género de pez, pero si se observó una mayor tendencia de peces infectados del género *Parachromis* sp.
- Se determinó la preferencia de ubicación de L3 de *C. multipapillatum* en órganos viscerales y menor tendencia por ubicarse en tejido muscular en peces recién capturados.

- No se determinó una asociación entre las características fisicoquímicas del agua de los sitios muestreados con peces infectados y la presencia de infección por *C. multipapillatum* en estos peces.

6. Recomendaciones

- Divulgar los resultados de los estudios realizados sobre presencia de infección de anisákidos en peces de consumo humano, con el fin de promover buenas prácticas de limpieza de productos de pesca y adecuada preparación de alimentos que incluyan carne de pescado cruda o semicocinada entre la población humana.
- Investigar la presencia de infección en población humana que consume peces infectados en Cañas, Guanacaste e Izabal, Guatemala.
- Establecer por medio de nuevos estudios, el ciclo de vida de *C. multipapillatum* y los organismos que participan en éste como hospedadores intermediarios y definitivos en la región Centroamericana.
- Promover estudios en otras regiones de Centroamérica para evidenciar si existe presencia de nemátodos anisákidos, que se encuentren afectando a poblaciones de peces destinadas a consumo humano.

7. Referencias Bibliográficas

- Borges, J., Gullo, L., Helena, C., Cassiano, M., y Claudia, P. (2012). Morphological and Molecular Diagnosis of Anisakid Nematode Larvae from utlassfish (*Trichiuruslepturus*) off the Coast of Rio de Janeiro, Brazil. *Plos One*, 7(7), 1-14. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3392247/pdf/pone.0040447.pdf>
- Boyd, C. E. (2015). *Water Quality: An Introduction* (Segunda ed.). Londres, Inglaterra: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-17446-4

- Bussing, W. (1998). *Peces de aguas continentales de Costa Rica*. San José: Universidad de Costa Rica.
- Chiclla, A., y Tantas, D. (2015). Infection of *Contraecum* sp. larvae (NEMATODA: ANISAKIDAE) in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) of Perú. *The Biologist*, 13(2), 419-427.
- D'Amelio, S., Cavallero, S., Dronen, N., Barros, N., y Paggi, L. (2012). Two new species of *Contraecum* Railliet y Henry 1912 (Nematoda: Anisakidae), *C. fagerholmi* n. sp. and *C. rudolphii* F from the brown pelican *Pelecanus* Adoi:10.1007/s11230-011-9323-x
- García, M., Salguero, G., García, L., Osorio, D., y Perez, G. (2016). Endohelminths of some species of fishes from Lake Xochimilco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(4), 1360-1364. doi:10.1016/j.rmb.2016.06.018
- Gea, B. (2015). *Análisis genético de parásitos Anisakis en pescados del Cantábrico*. Oviedo: Universidad de Oviedo. Obtenido de http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/32094/6/TFM_BetsabeGeaDiaz.pdf
- Hamann, M. (1999). Aspectos ecológicos de la relación parasitaria entre larvas de *Contraecum* sp. (Nematoda, Anisakidae) y *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1860 (Pisces, Characidae) en poblaciones naturales del nordeste argentino. *Boletín Chileno de Parasitología*, LIV(3).
- Hernández, J., Aznar, F., Blasco, I., García, N., Vilora, M., Crespo, E., . . . Montero, F. (2013). Description, microhabitat selection and infection patterns of sealworm larvae (*Pseudoterranova decipiens* species complex, nematoda: ascaridoidea) in fishes from Patagonia, Argentina. *Parasites y Vectors*, VI(252), 1-15.
- Huizinga, H. W. (1967). The life cycle of *Contraecum multipapillatum* (von Drasche, 1882) Lucker, 1941 (Nematoda: Heterochelidae). *The Journal of Parasitology*, 53(2), 368-375. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/3276593>
- Mancinni, M., Biolé, F., Salinas, V., Guagliardo, S., Tanzola, R., y Morra, G. (Enero-Junio de 2014). Prevalence, Intensity and Ecological aspects of *Contraecum* sp. (Nematode: Anisakidae) in freshwater fish of Argentina. *Neotropical Helminthology*, 8(1), 111-122. Obtenido de <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/neohel/v8n1/pdf/a10v8n1.pdf>

- Maniscalchi, M., Lemus, D., Marcano, Y., Edgar, N., Marianella, Z., y Narváez, N. (2015). Larvas anisakidae en peces del género mugil comercializados en mercados de la región costera nor-oriental e insular de Venezuela. *Saber*, 27(1), 30-38. Obtenido de <http://www.scielo.org.ve/pdf/saber/v27n1/art05.pdf>
- Martínez, A., Salgado, G., y Aguilar, R. (2004). Helminth Parasites of Chapalichthyis encaustus (Pisces: Goodeidae), an endemic freshwater fish from Lake Chapa, Jalisco, México. *The Journal of Parasitology*, 90(4), 889-890. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/3286350>
- Olivero, J., Baldiris, R., Güette, J., Amparo, B., Mercado, J., y Arroyo, B. (2006). *Contracaecum* sp. infection in *Hoplias malabaricus* (moncholo) from rivers and marshes of Colombia. *Veterinary Parasitology*, 90-97.
- Pardo, S., Mejía, K., Navarro, Y., y Atencio, V. (2007). Prevalence and Abundance of *Contracaecum* sp. of Rubio Salminus affinis in Sinu and San Jorge Rivers morfological description. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1), 887-896.
- Pardo, S., Zumaque, A., Noble, H., y Suarez, H. (2008). *Contracaecum* sp (ANISAKIDAE) en el pez *Hoplias malabaricus*, capturado en la ciénaga grande de Lórica, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 13(2), 1304-1314.
- Salgado, G., Pineda, R., García, L., y Lopez, S. (2004). Parásitos de peces dulceacuícolas. En J. Bueno, *Biodiversidad del Estado de Tabasco* (págs. 93-114). México DF: S y G Editores S.A. de C.V.
- Serrano, E., Tantalean, M., Quispe, M., y Casas, G. (2008). Presencia de larvas de *Contracaecum* sp. (Nematoda, Anisakidae) en el pez *Astronotus ocellatus*, destinado al consumo humano en Loreto, Peru. *Salud y Tecnología Veterinaria*, 31-34.
- Smith, J. (1983). *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809, det. Krabbe, 1878) (Nematoda: Ascaridoidea): Morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. *Journal of Helminthology*, 57, 205 - 224.
- Vidal, V., Sarabia, David, y Robin, O. (1994). Experimental Infection of *Contracaecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakidae) from Mexico in the domestic cat. *Journal of Parasitology*, 576-579

Discusión general

Este estudio constituye el primer reporte confirmado mediante diagnóstico molecular de *C. multipapillatum* para Guanacaste, Costa Rica y para Izabal, Guatemala en peces de agua dulce, los cuales son de importancia comercial y alimenticia para estas dos regiones de Centroamérica. El hallazgo de estos nemátodos se suma a los reportes realizados en otras regiones de América, por Salgado et al. (2004) que encontraron especies de *Contracaecum* sp. en Guapotes, García et al. (2016) en Pez tiro (*Goodea atrippins*) de cuerpos de agua dulce de México, Pardo et al. (2007) en Guabinas de Colombia y Maniscalchit et al. (2015) en Guabinas de Venezuela. A nivel mundial destacan los hallazgos de *C. multipapillatum* de Yaunis et al. (2017) en *Oreochromis niloticus* (Tilapia) de Egipto y de Shamsi et al. (2010) en diversos peces de Irán.

La identificación del género de las L3 se realizó mediante la observación de características anatómicas internas por microscopía óptica, se determinó la presencia de ciego paraesofágico, ventrículo y apéndice ventricular, estructuras compatibles con el género *Contracaecum* sp. Dichas características morfológicas concuerdan con las reportadas en los estudios desarrollados por Matiucci et al. (2010) y Nagasawa (2012).

El diagnóstico morfológico de *C. multipapillatum* por medio de MEB permitió observar en el extremo cefálico un diente apical en posición central junto a la apertura bucal, ambas estructuras se encontraban rodeadas por un labio dorsal y dos labios ventrales y un poro excretor en posición ventral. El resto del cuerpo poseía una cutícula rugosa, lo que concuerda con lo reportado por Hernández et al. (2013). En contraste, la microscopía óptica permitió determinar estructuras anatómicas externas, como la presencia de diente apical en el extremo cefálico y un mucrón en la parte terminal del extremo caudal, previamente descritas (Matiucci et al. 2010, Nagasawa 2012), identificando estas larvas como pertenecientes al estadio L3 de nemátodos anisákidos en peces de Guanacaste e Izabal, confirmando la descripción de Smith (1983) que describe a diferentes especies de peces como hospedadores intermediarios de esta familia de nemátodos.

El diagnóstico molecular de la región ITS identificó los especímenes hasta el nivel de género, al comparar las secuencias obtenidas con las almacenadas en la base de datos GenBank por medio del algoritmo BLAST. Las secuencias obtenidas en el presente trabajo fueron de un menor tamaño a lo esperado (~500 pb de 850), y pertenecieron al gen 5.8S, que es una región más conservada y en consecuencia insuficiente para realizar una identificación a nivel de especie con el algoritmo BLAST. Sin embargo, en el análisis filogenético bayesiano, tanto las muestras de este estudio como las secuencias de especies de *Contracaecum* de Kenia (KF990491), de Egipto (KX580603) y de Irán (FM210433), con las que se observó mayor similitud, se agruparon con la secuencia de *C. multipapillatum* (KC437338) de Australia con un 100% de relación filogenética. De manera que, a pesar de la longitud de nuestras secuencias es posible utilizar la región ITS para separar especies, siempre que exista suficiente información de los extremos ITS1 e ITS2 en la comparación, debido a que representan sitios de mayor variabilidad como lo reporta Zhu et al. (1998).

Por su parte, el gen COX II permitió una identificación más exacta de las secuencias obtenidas en el presente estudio, las cuales al ser comparadas con las secuencias almacenadas en GenBank por medio del algoritmo BLAST, fueron compatibles con *C. multipapillatum*. Esto quedó confirmado en el análisis de inferencia bayesiana, que mostró altos valores de Bootstrap y alta probabilidad posterior bayesiana con las secuencias de referencia de California (AF179910) y Grecia (EU852344), agrupando todos los especímenes en un solo grupo como *C. multipapillatum*. Los resultados mostraron altos valores de asociación (90 a 100%), por lo que la precisión filogenética nos permite confirmar los resultados obtenidos con el fragmento ITS 1- 5.8S. Nuestros resultados difieren de lo indicado por D'Amelio et al. (2011) y Cavallero et al. (2011), que reportan una excelente capacidad del identificar especies de parásitos con el gen COX II, e incluso determinar características intraespecíficas. Además, establecieron una baja capacidad para determinar relaciones filogenéticas inter específicas, debido a que en sus estudios observaron valores bajos de Bootstrap al evaluar similitudes entre

individuos de diferentes especies, algo que no sucedió en el presente estudio, donde estos valores fueron altos y confiables.

Podemos concluir entonces, que no existe mayor variabilidad entre las secuencias encontradas y las características morfológicas evaluadas de los nemátodos, independientemente de la región de donde procedían (Costa Rica o Guatemala). Sería importante desarrollar estudios en otros países Centroamericanos para determinar si las características son similares en toda la región.

C. multipapillatum es un nemátodo perteneciente a la familia Anisakidae, cuyos miembros se han asociado frecuentemente a la producción de zoonosis accidentales por consumo de pescado en distintas regiones del mundo. En la región Centroamericana este estudio constituye el primer reporte confirmado de estos nemátodos en especies de peces de agua dulce que son comercializados artesanalmente y que a su vez constituyen una fuente básica de alimentación para poblaciones cercanas a ríos y lagos.

Las prevalencias de L3 de *C. multipapillatum* determinadas en Guanacaste (16.8%) e Izabal (25.1%) fueron menores a las reportadas en regiones de similar latitud tropical en Latinoamérica (Pardo et al. 2007 y 2008; Martínez et al. 2004; García et al. 2016), estos estudios realizados en Argentina, Colombia y México analizaron géneros diferentes de peces a los estudiados en el presente trabajo, lo que podría explicar la diferencia entre las prevalencias determinadas en Guanacaste e Izabal, con respecto a los demás trabajos. Pardo et al. (2007 y 2008) mencionan la capacidad de infección de *Contracaecum*. sp para afectar a distintas especies de peces como un factor clave para explicar la diferencia de prevalencias entre diferentes huéspedes, en el presente estudio no se determinó estadísticamente esta afinidad específica o una mayor susceptibilidad de alguna de las especies de peces estudiadas a la infección con *C. multipapillatum*, sin embargo se observó en ambas regiones de estudio una mayor prevalencia en *Parachromis* sp., con respecto a *Rhamdia* sp., factor que al no ser concluyente debe ser investigado en futuros trabajos.

Las diferentes prevalencias detectadas en Centroamérica se pueden deber a características del medio ambiente, que son diferentes entre las dos regiones donde se desarrolló el estudio. Según García et al. (2016), existe una relación entre la variabilidad de la prevalencia de helmintos con las características locales del medio ambiente, las cuales al ser óptimas favorecen la presencia y abundancia de los hospederos tanto intermediarios como definitivos para dar continuidad al ciclo de vida de nemátodos como *Contracaecum* spp. Esto concuerda con lo observado en los sitios muestreados con presencia de peces infectados en Guanacaste, que presentaron como característica común, un medio ambiente asociado a la presencia de bosque seco tropical y de zonas semi urbanas ubicadas en las cuencas de los ríos, mientras que en Izabal la característica común eran medios ambientes que variaban entre la presencia de bosque tropical húmedo y plantas acuáticas como tul en la mayoría de los sitios de muestreo y grandes zonas urbanas en otros sitios, favoreciendo la presencia de determinadas especies de aves piscívoras cuyas densidades poblacionales mayores o menores podrían influir en el aumento o disminución del ciclo evolutivo de *Contracaecum multipapillatum* y por consiguiente en sus rangos de prevalencia.

Estos datos de prevalencia en ambas regiones son el primer reporte de infección de la especie *Contracaecum multipapillatum* infectando a peces de los géneros *Parachromis*, *Rhamdia* y *Hoplias* en Latinoamérica. Hasta la fecha solamente se había reportado la presencia de *Contracaecum* a nivel de género, sin determinar la especie en *Parachromis* sp (Salgado et al. 2004) en México, y en los peces *Astronotus* sp en Brasil (Azevedo et al, 2007) y *Oreochromis* sp en Perú (Chiclla et al, 2015 y Serrano et al. 2015)

Las altas prevalencias en algunos de los puntos de muestreo de Guatemala pueden deberse a su cercanía a zonas urbanas y cercanía con puntos de comercialización de peces. En esos sitios, los hábitos relacionados con limpieza y eliminación de vísceras de peces hacia el río podrían influir en la presencia de mayor cantidad de alimento para la fauna acuática local, y por consiguiente mayor exposición de peces depredadores como *Rhamdia* sp. y *Parachromis* sp. a vísceras

contaminadas con L3. Esto concuerda con las observaciones de Gea (2015), que determinó estos hábitos en puntos de pesca de alta mar y observó una relación directa entre la evisceración y eliminación de contenidos contaminados con nemátodos al medio ambiente acuático y el aumento de prevalencias y carga parasitaria por anisákidos en peces de los sitios donde se realizaba esta actividad.

En contraste, los sitios con bajas prevalencias del parásito en peces fueron aquellos en los que se establecieron niveles de oxígeno inferiores a 2 ppm, el cual es un valor debajo de lo considerado como óptimo (5 a 14 mg/l) para el adecuado desarrollo de un ecosistema, (Boyd, 2015). Según Huizinga (1967) y Borges et al. (2012), un bajo nivel de oxígeno podría provocar migraciones de crustáceos copépodos, hospederos primarios de *C. multipapillatum* a otros ecosistemas acuáticos con condiciones fisicoquímicas más favorables, disminuyendo así su presencia y posible ingestión por peces y disminuyendo posibilidad de infección.

La menor cantidad de larvas por pez se determinó en Guanacaste, donde los peces mostraron menor peso y longitud en comparación con los peces de Izabal, que reportaron un mayor peso y longitud, detectándose una mayor cantidad de larvas en estos peces. Esto concuerda con los reportes de Hamman (1999) y Pardo et al. (2008), que correlacionaron una alta intensidad de infección con una mayor edad, peso y talla de peces en *Serrasalmus spilopleura* (Pirañas) y en *Hoplias malabaricus* (Guabinas) respectivamente, indicando que los peces más grandes poseen hábitos alimenticios más voraces, y por consiguiente, poseen una mayor predisposición a ser infectados por *Contracaecum*. Esta característica la comparten *Parachromis* sp., *Rhamdia* sp., y *Hoplias* sp., según los datos aportados por Bussing (1998), que reportan su naturaleza voraz y depredadora.

También se observó, una alta tendencia de *C. multipapillatum* por ubicarse formando quistes en órganos viscerales, mientras que la cantidad de quistes adheridos en musculatura fue muy escasa, estos resultados son similares a los hallados por Pardo et al. (2008) y Hernández et al. (2013), los cuales reportaron una baja afinidad de las L3 de *Contracaecum* sp. por adherirse a tejido muscular, y una fuerte tendencia a la formación de quistes en órganos viscerales, además de una

baja capacidad de migración desde vísceras hacia musculatura una vez que el pez ha muerto. Esto es importante, pues determina la capacidad infectiva de las larvas para el ser humano al momento de consumir productos pesqueros.

El presente estudio reporta por primera vez la presencia de *Contracaecum* sp, un nemátodo zoonótico en peces de agua dulce de las regiones de la provincia de Guanacaste, Costa Rica y del departamento de Izabal, Guatemala, donde son comercializados artesanalmente y constituyen una fuente básica de alimentación para poblaciones cercanas a ríos y lagos. La presencia del nemátodo zoonótico en Centroamérica debe de alertar a los profesionales de la Salud para tomar en cuenta la Contracecosis como diagnóstico diferencial en casos clínicos donde los antecedentes incluyan hábitos de consumo de carne de pescado cruda o semicocinada. La ausencia de protocolos diagnósticos puede estar provocando un sub diagnóstico de la enfermedad en el ser humano y se recomienda implementar políticas de prevención enfocadas a crear buenos hábitos de limpieza y cocina de platillos a base de carne de pescado y así prevenir infecciones accidentales.

Conclusiones generales

- Se reportan por primera vez en Centroamérica fases infectivas de *C. multipapillatum* en peces de agua dulce (Guapote, Barbudo, Guabina) capturados mediante pesca artesanal.
- No se encontró diferencia significativa entre las características morfológicas de las larvas 3 de *C. multipapillatum* identificadas mediante diagnóstico microscópico, independientemente del género de pez que infectaron o de la región geográfica en la cual fueron encontrados.
- El análisis filogenético confirmó alta similitud entre las secuencias de ADN de los especímenes identificados en Centroamérica con los reportados en Grecia y California, USA.

- La prevalencia de *C. multipapillatum* en peces *Parachromis* sp., *Rhamdia* sp., y *Hoplias* sp. fue de 16.8% para Guanacaste, Costa Rica y de 25.1% para Izabal, Guatemala.
- No se estableció diferencia significativa en la preferencia de infección de *C. multipapillatum* por un determinado género de pez, pero si se observó una mayor tendencia de peces infectados del género *Parachromis* sp.
- Se determinó la preferencia de ubicación de L3 de *C. multipapillatum* en órganos viscerales y menor tendencia por ubicarse en tejido muscular en peces recién capturados.
- No se determinó una asociación entre las características fisicoquímicas del agua de los sitios muestreados con peces infectados y la presencia de infección por *C. multipapillatum* en estos peces.

Recomendaciones generales

- Alertar a las autoridades de salud pública, así como a la población expuesta por consumo de productos pesqueros artesanales sobre la presencia de *C. multipapillatum* en Barbudos, Guapotes y Guabinas de las dos regiones de Centroamérica donde se desarrolló el presente estudio.
- Desarrollar estudios que permitan identificar otros géneros y especies de la familia Anisakidae que se encuentren infectando peces, tanto en cuerpos de agua continentales y oceánicos de otras regiones de Centroamérica.
- Realizar estudios de caracterización de nemátodos en crustáceos, aves y otros géneros de peces, sospechosos de integrar el ciclo de vida de *C. multipapillatum* en Centroamérica, con el fin de establecer la importancia de su papel en el ciclo de vida del nemátodo y el riesgo que pueden representar para la salud humana.

- Divulgar los resultados de los estudios realizados sobre presencia de infección de anisákidos en peces de consumo humano, con el fin de promover buenas prácticas de limpieza de productos de pesca y adecuada preparación de alimentos que incluyan carne de pescado cruda o semicocinada entre la población humana.
- Investigar la presencia de infección en población humana que consume peces infectados en Cañas, Guanacaste e Izabal, Guatemala.
- Establecer por medio de nuevos estudios, el ciclo de vida de *C. multipapillatum* y los organismos que participan en éste como hospedadores intermediarios y definitivos en la región Centroamericana.
- Promover estudios en otras regiones de Centroamérica para evidenciar si existe presencia de nemátodos anisákidos, que se encuentren afectando a poblaciones de peces destinadas a consumo humano.