



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSTGRADO

EVALUACIÓN DE UNA TÉCNICA DE
PCR CONVENCIONAL PARA LA
DETECCIÓN MOLECULAR DE
PARÁSITOS ANISÁKIDOS EN TRES
LÍQUIDOS DE ESCURRIDO DE
CONSERVAS DE CABALLA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

MILENE ANITA VILLALOBOS CACHAY

LIMA – PERÚ

2019

ASESOR DE TESIS:

PhD. Mg. MV. Marcos Enrique Serrano Martínez

CO-ASESOR DE TESIS:

Dr. MV. Luis Antonio Llancó Albornoz

DEDICATORIA

A mis padres Silmer y Lupe

A mis abuelos Juan, Juana y Rosa.

A Franquito

AGRADECIMIENTOS

A Franquito por su amor y apoyo incondicional.

A Andreíta por sus consejos, recomendaciones y gran apoyo.

A mis compañeros de maestría: Carmen, Tania, Lucero, Carlos, Armando y

Fernando por su cariño, consejos y soporte.

A mis asesores Marcos Enrique y Luis por su guía, paciencia y la dedicación de su

tiempo durante la ejecución del presente trabajo.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La presente investigación fue financiada por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) Maestría en Sanidad Acuicola en la Universidad Peruana Cayetano Heredia- Convenio N° 230-2015-FONDECYT- Esquema Financiero EF 023 “Programa de Maestría en Universidades Peruanas”.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	Pag.01
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	Pag.03
3. MARCO TEÓRICO	Pag.04
3.1.Taxonomía de los Anisákidos	
3.2.Características morfológicas de los Anisákidos	
3.3.Ciclo biológico de los Anisákidos	
3.4.Efecto del tratamiento térmico sobre los Anisákidos	
3.5.Métodos de detección de Anisákidos usuales en peces y conservas.	
3.5.1. Transiluminación o Candling	
3.5.2. Detección por luz ultravioleta	
3.5.3. Pruebas de inmunodetección	
3.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
3.5.4.1. Protocolo de extracción de ADN por el método del Bromuro de Cetil Trimetil Amonio (CTAB)	
3.5.4.2. Gen Citocromo oxidasa II (COX II)	

4. JUSTIFICACIÓN DE ESTUDIO **Pag.12**

5. OBJETIVOS **Pag.13**

5.1. Objetivo general

5.2. Objetivos específicos

6. METODOLOGÍA **Pag.14**

6.1. Diseño de estudio y tamaño de muestra.

6.2. **FASE A:** Extracción, amplificación y visualización del ADN de controles positivos.

6.2.1. Controles positivos

6.2.2. Extracción y purificación del ADN de los controles positivos.

6.2.3. Amplificación del ADN de los controles positivos (gen Citocromo Oxidasa COX II).

6.2.4. Electroforesis y visualización en el gel de Agarosa.

6.3. **FASE B:** Extracción, amplificación y visualización de ADN de Anisákidos en conservas de pescado.

6.3.1. Colecta de Parásitos Anisákidos de peces comerciales

6.3.2. Preparación de conservas de caballa inoculadas artificialmente con Anisákidos previamente colectados.

6.3.3. Extracción del ADN mediante protocolo CTAB aplicado en conservas de pescado inoculadas con Anisákidos

6.3.3.1. Variante del método de extracción: Experimentación en el líquido de escurrido.

6.3.4. Determinación de los criterios de rendimiento de la prueba utilizada: Sensibilidad

6.4. **FASE C:** Extracción, amplificación y visualización de ADN en conservas de pescado inoculadas con otros parásitos

6.4.1. Colecta de otros parásitos

6.4.2. Preparación de conservas de caballa inoculadas artificialmente con otros parásitos y otros peces y sin inocular.

6.4.3. Extracción, amplificación y electroforesis

6.4.4. Determinación de los criterios de rendimiento de la prueba utilizada: Especificidad

- 7.1. Resultados de la Extracción de ADN de controles positivos
- 7.2. Resultados de la Extracción de ADN de conservas inoculadas con Anisákidos.
 - 7.2.1. Resultados de la Pruebas de extracción de ADN probado en el sobrenadante y precipitado de la muestra.
 - 7.2.2. Resultados de la Amplificación con variante
 - 7.2.3. Resultados de la Determinación de Criterios de rendimiento del presente estudio.

8. DISCUSIÓN	Pag.43
9. RECOMENDACIONES	Pag.52
10. CONCLUSIONES	Pag.53
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pag.54

LISTA DE CUADROS

Cuadro 01. Plan de Elaboración de conservas inoculadas y no inoculadas alineados a los objetivos de la investigación y al tamaño de muestra.

Cuadro 02. Parásitos y peces utilizados en la determinación de la especificidad analítica del ensayo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 01. Número de Anisákidos colectados de peces comerciales.

Tabla 02. Diseño de Elaboración de Conservas Inoculadas y no Inoculadas.

Tabla 03. Cebadores A 211 y A 210 Nadler y Husdpeth (2000).

Tabla 04. Plan de determinación de distintas proporciones de pescado- parásito.

Tabla 05. Diseño de elaboración de conservas inoculadas con otros parásitos y peces y conservas no inoculadas.

Tabla 06. Concentración y pureza de ADN extraído de Anisákidos utilizados como controles positivos

Tabla 07. Concentración y pureza de ADN extraído del líquidos sobrenadante y precipitado de conservas de pescado inoculadas con Anisákidos.

Tabla 08. Tabla de datos para el cálculo de sensibilidad diagnostica y especificidad diagnóstica en la detección de Anisákidos en Conservas de Caballa en Aceite Inoculadas y No Inoculadas con Anisákidos.

Tabla 09. Tabla de datos para el cálculo de sensibilidad y especificidad diagnósticas en la detección de Anisákidos en Conservas de Caballa en Salsa de Tomate Inoculadas y No Inoculadas con Anisákidos.

Tabla 10. Tabla de datos para la especificidad analítica en la detección de Anisákidos en Conservas de Caballa en Agua Inoculadas y No Inoculadas con Anisákidos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Esquema de trabajo para la FASE A del trabajo.

Figura 02. Esquema para la FASE B del trabajo.

Figura 04. Esquema para la FASE C del trabajo.

Figura03. Flujo de Elaboración de las conservas de caballa.

LISTA DE FOTOS

Foto 01. Anisákidos colectados de Peces comerciales preservados en Alcohol al 70 %.

Foto 02. Filetes de caballa siendo procesados para la elaboración de las conservas

Foto 03. Filetes de caballa siendo inoculados con Anisákidos para la elaboración de las conservas

Foto 04. Detección de Anisákidos en conservas inoculadas a partir de distintos líquidos de gobierno diferencias entre la primera y segunda amplificación.

Foto 05. Determinación de la sensibilidad diagnóstica en conservas inoculadas con Anisákidos.

Foto 06. Determinación de especificidad analítica en conservas inoculadas con otros parásitos distintos a los Anisákidos.

RESUMEN

En nuestro país, la detección de Anisákidos en productos hidrobiológicos, causadores de graves alergias alimentarias desde niños hasta ancianos, los análisis sensoriales resultan ser no muy efectivos debido a que la visualización de los parásitos en la conserva de pescado es dificultoso, debido a esto es necesario evaluar técnicas moleculares para detección de los Parásitos Anisakidos en conservas del pescado.

Para el presente trabajo se elaboraron conservas inoculadas artificialmente con parásitos Anisákidos provenientes de peces de consumo. El ADN genómico total se extrajo a partir del líquido de gobierno de la conserva, escurrido después de la homogenización vigorosa del contenido de la conserva y utilizando el protocolo CTAB modificado. Para la detección se realizó un PCR doble amplificación, que tuvo como blanco una región del gen citocromo c oxidasa subunidad II (COXII) de 629bp de tamaño. En total se evaluaron 48 conservas parasitadas (inoculados), 48 negativos (sin inocular) y 48 inoculados con otros parásitos, determinándose que la sensibilidad diagnóstica de la prueba fue de 100% para las conservas cuyo líquido de gobierno fueron aceite y salsa de tomate comercial y de 93.75% en el caso de las conservas en agua. El protocolo tuvo 100% de especificidad analítica y diagnóstica.

Palabras claves: Anisákidos, conservas de pescado, PCR.

ABSTRACT

In our country, the detection of Anisakids in hydrobiological products, causes of food allergies between children and old people, a physical-sensory analysis is carried out, which are not very effective and work, because in fish preserves the visualization of parasites are difficult, because they are a homogenized product. From the above, there is a need to use a molecular technique for the detection of anisakids in these products. For this, preserves artificially inoculated with parasites of origin of the consumption fish were elaborated. The total genomic DNA was extracted from the conservation management liquid, after the vigorous homogenization of the conservation content and the use of the modified CTAB protocol. For the detection a double amplification PCR was carried out, which took place as target a region of the cytochrome c oxidase subunit II (COXII) gene of 629 bp in size. A total of 48 parasitized preserves (inoculated), 48 negatives (without inoculation) and 48 inoculated with other parasites were evaluated, determining that the diagnostic sensitivity of the test was 100% for preserves of 93.75% in the case of preserves in water. The protocol had 100% analytical and diagnostic specificity.

Keywords: Anisakids, canned fish

1. INTRODUCCIÓN

El 17 de noviembre del 2017 SANIPES dio una Alerta sanitaria internacional a la Autoridad Sanitaria de la República Popular China (AQSIQ), al haberse detectado presencia de parásitos (nematodos anisákidos) en un lote de conservas de entero de caballa en salsa de tomate que contaba con certificado sanitario emitido por dicha autoridad (comunicado SANIPES N°026-2017). La alerta sanitaria se emitió debido a que las conservas de caballa con Anisákidos podrían poner en riesgo a quienes consuman estos productos, basándose en estudios que demostraban que algunas proteínas de los Anisákidos mantienen ciertas propiedades alergénicas aún después de un tratamiento térmico por presentar antígenos termorresistentes (Caballero y Moneo, 2004; Moneo *et al.*, 2005). Hay que tomar en cuenta que es necesario que exista una infestación inicial en estómago o intestino del hombre con una larva viva (L3) del Anisákido, para que el cuerpo del hospedero pueda sintetizar IgE y se desencadenen los síntomas alérgicos en una posterior interacción hombre-parásito debido a que las enzimas proteasas e inhibidores de proteasas que secreta la larva al invadir al hospedero actúan como alérgenos (Moneo *et al.*, 2000b). De estas proteasas la más importante es la llamada Ani 4 por su gran potencial alergénico, estudios de esta proteasa por inmunodetección en productos de pescado congelado, surimi y conservas demostraron que, aunque los niveles Ani 4 en conservas son bajos su sola presencia residual implica un riesgo para pacientes previamente sensibilizados con la larva viva de Anisakis (Olivares, 2013). Debido a esto surge la necesidad de evaluar una técnica de detección molecular de Anisákidos a partir de distintos líquidos de escurrido, lo que permitiría contribuir a la búsqueda de

mejores propuestas que prevención de las enfermedades causadas por alimentos contaminados.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Perú es necesario la evaluación de nuevas técnicas de detección molecular de Anisákidos en conservas de pescado (las cuales resultan ser muestras complejas debido a que han sido sometidas a altas temperaturas y el ADN en éstas condiciones se encuentra degradado), pues hasta el momento solo se cuenta con un ensayo de “Detección de materias extrañas”, para conservas de pescado, el cual se basa en pruebas físico sensoriales no tan eficaces (Wootten y Cann, 2001).

Es importante que estas técnicas resuelvan el problema de tomar varias muestras de un mismo envase y es por lo que se plantea tomar como referencia de estudio las diferentes presentaciones de conservas de pescado, como grated en diferentes salsas, aderezos y líquidos de gobierno y poder detectar la presencia del parásito en los líquidos de gobierno.

3. MARCO TEÓRICO

Los nemátodos pertenecientes a la familia Anisakidae son ascaroideos que parasitan peces y mamíferos marinos pero que pueden acabar siendo zoonóticos cuando son consumidos por el hombre en estado crudo. La familia Anisakidae comprende alrededor de 24 géneros, siendo los más conocidos *Anisakis*, *Phocascaris*, *Contracecum*, *Phocanamea* tomando en cuenta que el género *Anisakis* es el más grande responsable de parasitosis y alergia alimentaria de peces (Audicana *et al.*, 2002; Audicana y Kennedy, 2008).

Con respecto a prevalencias, aproximadamente 2000 casos de Anisakiasis al año se reportan en Japón, siendo España el que lo sigue con unos 500 casos por año (Panel on Biological Hazards, 2010). En Perú son 8 los casos reportados de Anisakiasis en humanos hasta el 2004 (Cabrera *et al.*, 2004).

3.1. Taxonomía

Se calcula que otros géneros de la familia son de poca importancia, aunque es necesario evaluar su incidencia especialmente en lo que concierne a sensibilización a alérgenos, a continuación, la clasificación sugerida por Smith y Wootten (1978):

Phylum: Nematelminthes

Clase: Nematoda

Orden: Ascáride

Familia: Anisakidae

3.2. Características morfológicas de los Anisákidos

Las larvas de *Anisakis simplex* son de cuerpo ahusado, sin segmentación y puntiagudo en los extremos, miden entre 15-30 mm de largo y 0,6 -0,10 mm de diámetro y se caracterizan por ser de color blanquecino (Smith, 1983).

Cuentan con un sistema digestivo completo. Poseen la cavidad oral triangular con un diente perforador para fijarse en su hospedero (Möller y Anders, 1986).

3.3.Ciclo biológico de los Anisákidos

Según Smith (1983), el ciclo biológico empieza en el estómago del hospedero definitivo, el cual es un mamífero marino, siendo las hembras las que liberan huevos de unos 50 μ m aproximadamente. A estos se les denomina estadio larvario (L1) las cuales embrionan tras incubarse y luego son liberados al mar en las heces del hospedador definitivo.

Es en el mar donde este parásito muda en 2 ocasiones, de (L1) muda a (L2) y luego de (L2) a (L3) (Koie *et al.*, 1995). Tomando en cuenta que la (L3) permanece con la cutícula de L2 la cual le otorga la resistencia necesaria para sobrevivir a merced del mar (Smith, 1971).

Las larvas son devoradas por pequeños crustáceos son hospedadores intermediarios de los Anisákidos.

El estadio L3, es considerado como el estadio infectivo, es consumido por peces o moluscos y cuando los hospedadores definitivos los ingieren se produce el cuarto estadio larvario L4 y quinta muda a nematodo adulto sexualmente maduro (Gómez *et al.*, 1998).

3.4.Efecto del tratamiento térmico sobre los Anisákidos

La temperatura de 60°C durante 1 minuto en el centro térmico es suficiente para matar cualquier larva presente en un producto hidrobiológico (Bier, 1976). Sin embargo, en estudios realizados en larvas aisladas se ha observado que el tiempo necesario para producir la letalidad del 100% de las larvas debe ser superior a este (Vidaček *et al.*, 2010). Se debe tener en cuenta que aunque se produzca la muerte de las larvas, se ha detectado la presencia de antígenos termo-resistentes en las condiciones de calentamiento más extremas estudiadas, inclusive si las larvas se encontraban congeladas antes de aplicar el tratamiento de calor, lo que sugiere que productos sometidos a tratamientos térmicos podrían ser no seguros para pacientes previamente sensibilizados a las proteasas de *A. simplex* (Vidaček *et al.*, 2009; 2010; 2011; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010).

3.5.Métodos de detección de Anisákidos usuales en peces y conservas.

3.5.1. Transiluminación o Candling

Este método suele utilizarse para la detección de parásitos en filetes que se observan sobre una superficie translúcida iluminada con luz blanca por la zona inferior (Karl y Leinemann, 1993). Según Huang (1990), este se utiliza en la industria procesadora para detectar larvas que pueden estar localizadas en el interior del músculo hasta una profundidad de 5-6 mm; pero si el filete

es muy grueso (mayor a 1cm) sólo se pueden detectar larvas de *Pseudoterranova decipiens*.

Se considera que la eficacia del método tiende a disminuir debido a la fatiga ocular de los operarios (Wootten y Cann, 2001). Al tratarse de un método no automatizado, en la industria es considerado como un cuello de botella ya que reduce la velocidad de procesado y retrasa la producción; asimismo, puede dar lugar al crecimiento de microorganismos y a una degradación enzimática del producto (Bublitz y Choudhury, 1992). Esta técnica tiene baja eficacia y según Levsen *et al.* (2005) solamente se detecta entre el 7 y 10% de las larvas que se encuentran en los filetes infestados.

3.5.2. Detección por luz ultravioleta

En este método se utiliza luz ultravioleta con una longitud de onda de aproximadamente 366 nm (Pippy, 1970). El proceso corresponde en proyectar luz ultravioleta aproximadamente a unos 10 cm de la superficie del filete realizando el examen por ambos lados. Se pueden diferenciar las larvas de Anisákidos cuando muestran un color fluorescente azulado, y las larvas de *Contraecaecum* por reflejarse de color amarillo. En el caso de las larvas que son congeladas previamente emiten fluorescencia intensa mientras que en larvas vivas no hay emisión de fluorescencia (Tejada *et al.*, 2006b).

3.5.3. Pruebas de inmunodetección

Mediante pruebas de inmunodetección con pepsina se determinó que el tratamiento térmico de esterilización el cual produjo un descenso en los antígenos de Anisákidos, incluyendo a los alérgenos resistentes a los cambios de temperatura o termorresistentes, aunque en todas las muestras se detectó antigenicidad residual (Olivares, 2013).

Un estudio utilizando pruebas de Inmunodetección de IgE específica (*immunoblotting*) para determinar la prevalencia de sensibilización a *A.simplex*. en España tomando como referencia la influencia geográfica permitieron concluir que la sensibilización no ocurre por la ingesta de pescado sino por la parasitación activa debida al hábito de consumo de pescado crudo. (Moneo *et al.*, 2000b).

3.5.4. **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tipo convencional es un método rápido y específico para la detección e identificación de los parásitos del pescado (Martín-Sánchez *et al.*, 2005).

Un estudio de análisis genético del género *Anisakis* en el Cantábrico mediante la secuenciación de una porción del Gen Mitocondrial del Citocromo Oxidasa II (COXII) reportó la presencia de tres especies *A. simplex*, *A. pegreffi* y *Hysterothylacium aduncum* en un total de 7 especies de peces (Gea, 2015) todos estos estudios fueron hechos en pescado fresco y congelado.

Estudios de detección de Anisákidos en diversos productos hidrobiológicos, para la cual se realizó mediante Reacción en Cadena de la polimerasa a

través del estudio de los Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción conocido como “ PCR–RFLP” a través de la región del Internal transcribed spacer 1 (ITS-1) demostraron que se puede lograr la correcta amplificación del ADN en el caso más extremo de degradación de ADN como en el tratamiento térmico aplicado a los productos enlatados. (Espineira *et al.*, 2010).

Un ensayo de PCR en tiempo real dirigida a la Subunidad I de la Citocromo Oxidasa (COI) se desarrolló permitiendo la detección simultánea de las especies de Anisákidos más importantes en peces y productos hidrobiológicos como por ejemplo alimentos enlatados, siendo una propuesta altamente sensible y fácilmente adaptable en el diagnóstico molecular de rutina laboratorios. (Herrero *et al.*, 2011).

Un estudio para la detección de Anisákidos en hígados de bacalao frescos y conservas de hígado de bacalao utilizando PCR mediante las regiones *Internal transcribed spacer I* (ITS-1), 5.8S ribosomal RNA (5.8S rRNA), *Internal transcribed spacer II* (ITS-2), permitieron identificar alta presencia *A.simplex* y *P.decipiens* en hígados frescos, y menores presencia de estos parásitos en hígados enlatados o en conservas, lo cual según concluye el autor podrían indicar el éxito de las medidas preventivas del procesamiento industrial . (Klapper *et al.*, 2018).

3.5.4.1. Protocolo de extracción de ADN por el método del Bromuro de Cetil Trimetil amonio (CTAB)

Es uno de los más utilizados en la detección de Anisákidos en productos hidrobiológicos tal como se evidencia en los trabajos de (Españeira *et al.*, 2010) y (Herrero *et al.*, 2011). Este método se utiliza para extraer ADN de plantas y alimentos derivados de vegetales y se emplea el Bromuro de Cetil Trimetil amonio (CTAB) que es la sustancia adecuada para procesar tejidos con una alta concentración de polisacáridos y polifenoles. Este protocolo fue desarrollado por Murray y Thompson en 1980 y publicado hasta 1987 por Wagner y sus colaboradores (Wagner *et al.* 1987). En el presente trabajo para la extracción de ADN de controles positivos y muestras se empleó en base a las recomendaciones para la extracción y purificación de ADN (Alejos *et al.*, 2015), la cual fue adaptada para ser usada en el líquido de escurrido de las conservas cuya modificación se detalla en el apartado de materiales y métodos, así como en resultados.

3.5.4.2.Gen Citocromo oxidasa II (COX II).

La subunidad II de la citocromo oxidasa es un componente clave de la cadena de transporte de electrones en el proceso de la respiración aeróbica. El contenido de bases A+T de esta secuencia es muy alto, como ocurre en otras secuencias mitocondriales de nemátodos, a pesar de esto la secuencia de aminoácidos de la citocromo oxidasa II (COX II) se muestra conservada. Esta secuencia se ha utilizado para el estudio de la

estructura genética de poblaciones de los Anisákidos (Valentini
et al., 2006).

4. JUSTIFICACIÓN DE ESTUDIO

Si bien en la conserva de pescado el parásito *Anisakis* está muerto y ya no es más infectivo, se ha demostrado la presencia de proteasas con potencial alergénico aún después de haber pasado por un tratamiento térmico, lo que sugiere que las conservas podrían ser no seguras para los consumidores previamente sensibilizados a estos parásitos.

Como son escasos los trabajos de investigación donde se evalúen técnicas de detección de Anisákidos a partir de líquidos de gobierno de Conservas de Pescado, y al ser esta una muestra de fácil obtención, surge la oportunidad de demostrar la presencia de estos parásitos, sometidos a condiciones extremas de degradación debido al proceso de esterilizado, desde los líquidos de gobierno escurridos: agua, aceite y salsa de tomate comercial.

La detección de Anisákidos en líquidos de gobierno mediante una técnica de PCR tendrá la ventaja de ser fácil acceso pues no será necesario tomar varias muestras de un solo envase, tal como se propone en otras metodologías de PCR a partir de muestras de tejido, donde se corre el riesgo de analizar una parte que no esté contaminada, dando resultados falsos negativos. Esto se solucionaría con la homogenización de toda la muestra del envase desde el líquido de gobierno.

Se espera que la información generada sirva de base para la validación de métodos de detección y control de calidad de lotes.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

a. Objetivo general

- Evaluar una técnica de detección molecular de PCR convencional de parásitos Anisákidos a través de 3 distintos líquidos de gobierno (agua, aceite y salsa de tomate) en conservas de caballa contaminadas artificialmente mediante los criterios de rendimiento de sensibilidad y especificidad.

b. Objetivos específicos

- Determinar la sensibilidad diagnóstica de la técnica utilizada.
- Determinar el sensibilidad analítica de la técnica utilizada.
- Determinar la especificidad analítica de la técnica utilizada frente a otros parásitos de peces.
- Determinar la especificidad diagnóstica de la técnica utilizada frente muestras negativas.

6. METODOLOGÍA

6.1. Diseño de estudio y tamaño de muestra.

Esta investigación es aplicada de tipo experimental-prospectivo que incluye manipulación de las variables (inoculación de parásitos) en condiciones controladas, uno de los primeros pasos fue determinar el número de muestra.

El tamaño de muestra se determinó mediante el Programa WinEpi 2.0 (Working in Epidemiology) a través del cálculo de estimación de proporciones el cual para una población desconocida de conservas de pescado con un nivel de confianza del 90% y un margen de error de 10% y una proporción esperada del 94%, nos dio un total de 16 muestras (conservas de caballa). En base a este tamaño muestral se procedió a elaborar un plan de elaboración de conservas inoculadas y no inoculadas alineados a los objetivos de la investigación y al tamaño de muestra (Ver Cuadro 01).

Cuadro 01. Plan de Elaboración de conservas inoculadas y no inoculadas alineados a los objetivos de la investigación y al tamaño de muestra.

	Presentación	Presentación	Presentación	
	Conservas de	Conservas de	Conservas de	Tamaño de
	Caballa en Aceite	Caballa en Agua	Caballa en Salsa	muestras
			de tomate	
Determinar la				16 conservas x
sensibilidad	Inoculadas con	Inoculadas con	Inoculadas con	presentación
diagnóstica	Anisákidos	Anisákidos	Anisákidos	muestras positivas

Determinar la especificidad analítica	Inoculadas con otros parásitos y porciones de otros peces	Inoculadas con otros parásitos y peces	Inoculadas con otros parásitos y peces	16 conservas x presentación muestras negatividad
Determinar la especificidad diagnóstica	Sin inocular	Sin inocular	Sin inocular	16 conservas x presentación muestras negativos
TOTAL				144 conservas en total

En base a este plan y con motivo de mejorar el entendimiento de los objetivos, pasos y actividades de la presente investigación se planteó un diseño de investigación que consta de tres FASES para el alineamiento con los objetivos específicos que se plantean en la investigación.

6.2. FASE A: Extracción, amplificación y visualización de controles positivos.

En esta fase se trabajaron los pasos de extracción, amplificación y visualización del ADN de las muestras que servirán como controles positivos (Anisákidos enteros) cuyo objetivo era de evaluar la validez del método de detección en condiciones de degradación del ADN.

Se trabajó siguiendo los pasos del siguiente esquema y líneas abajo se puede tener el detalle de la descripción de cada paso.

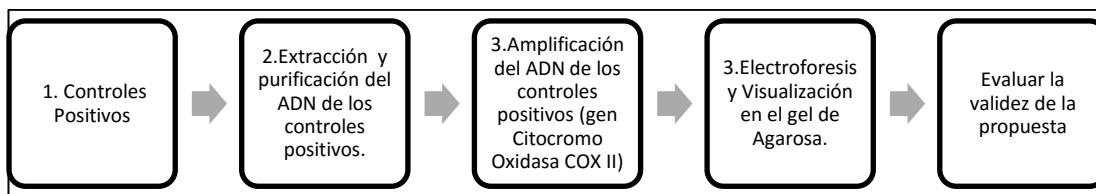


Figura 01. Esquema de trabajo para la FASE A del trabajo

6.2.1. Controles positivos

Como controles positivos para el PCR se emplearon Anisákidos que hacen parte del Repositorio del Laboratorio de Parasitología FAVEZ-UPCH, previamente identificados mediante claves taxonómicas (Anderson *et al.*, 2009) y a través del secuenciamiento del gen citocromo oxidasa II (COX II), los cuales corresponden a un trabajo en paralelo de secuenciamiento y filogenia de Parásitos Anisákidos en el Mar Peruano a cargo de otra investigación paralela. En nuestro estudio se corroboró la identidad del parásito mediante la visualización de un amplicón del tamaño esperado (629 pb). El objetivo de controles positivos es el de evaluar la validez del método de detección mediante la visualización en el gel de agarosa.

6.2.2. Extracción y purificación del ADN de los controles positivos.

En el presente trabajo para la extracción de ADN de controles positivos y muestras se realizó en base a las recomendaciones dadas por (Alejos *et al.*, 2015). Antes de proceder a la extracción de ADN de los controles positivos (los cuales estaban preservados en Alcohol al 70%), los parásitos fueron lavados con agua destilada por aproximadamente dos horas para retirar el alcohol en exceso.

Se pesaron 300 mg de individuos de Anisákidos en balanza de precisión (Mettler Toledo-España) y extrajo el ADN mediante el protocolo CTAB-Bromuro de Cetil Trimetil amonio (Rogers & Bendich, 1985), con ligeras modificaciones que incluyeron homogenización vigorosa de los parásitos mediante el uso de un mortero, durante 10 minutos aproximadamente. Luego se colocaron estos parásitos triturados en un tubo Eppendorf y se adicionó 1 mL de CTAB 2X (ver anexo1), precalentado a 60 °C, se mezcló por inversión e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de 10 minutos a 0°C. A continuación, se adicionó 10 µL de proteinasa K (Promega, USA) (10 mg/µL), mezcló por inversión e incubó a 65°C por 25 minutos para luego incubar durante 5 min a 0°C. La etapa de separación de componentes celulares con fenol y cloroformo, así como la de precipitación del ADN no fueron modificadas. Finalmente, se rehidrató el ADN en 50 µL de buffer Tris10Mm EDTA1Mm(buffer TE 1X).

La cantidad y calidad del ADN extraído se evaluó en equipo Nano Drop TM Espectrofotómetro ND-10 (Thermo Scientific), luego se hicieron diluciones con agua libre de nucleasas hasta alcanzar una concentración de 150 ng/µL. Estos ADN se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior como controles positivos.

6.2.3. Amplificación del ADN de los controles positivos (gen Citocromo Oxidasa COX II).

Se amplificó el gen citocromo c oxidasa subunidad II (COX II) por PCR en base a las recomendaciones de (Gea, 2015), usando los cebadores A211 (5'-

TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT-3') y A210 (5'-CACCAACTCTTAAAATTATC-3') descritos por Nadler y Husdpeth (2000), que generan un amplicón de 629 pb.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, 150ng de ADN, conteniendo 0.4 uM de cada cebador, 1X de GoTaq® G2 Green Master 2X (el cual contiene 3mM MgCl₂) ,completando la solución final con agua ultrapura. Los tiempos de amplificación fueron: 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 47 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 72 °C durante 10 min. En todos los PCR se usó agua ultra pura libre de nucleasas como control negativo (Promega-USA).

6.2.4. Electroforesis y visualización en el gel de Agarosa.

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa con TAE al 1%, a 90 V durante 1 h, teñidos con 5 mg/mL de bromuro de etidio (Sigma-USA), visualizados bajo luz ultravioleta en transiluminador. Como marcador de peso molecular se utilizó el 1kb DNA Ladder (Promega-Brasil).

6.3. FASE B.-Extracción, amplificación y visualización de ADN de Anisákidos en conservas de pescado.

En esta fase se detallan los pasos para poder extraer, purificar y amplificar el ADN de Anisákidos que han sido inoculados artificialmente en la preparación de conservas de pescado y por lo tanto han sido sometidos a las condiciones más

extremas de degradación del ADN. Se detallan las variantes de protocolos sugeridos en otras investigaciones las cuales sirvieron de base para el desarrollo de la presente investigación.

Se trabajó siguiendo los pasos del siguiente esquema:

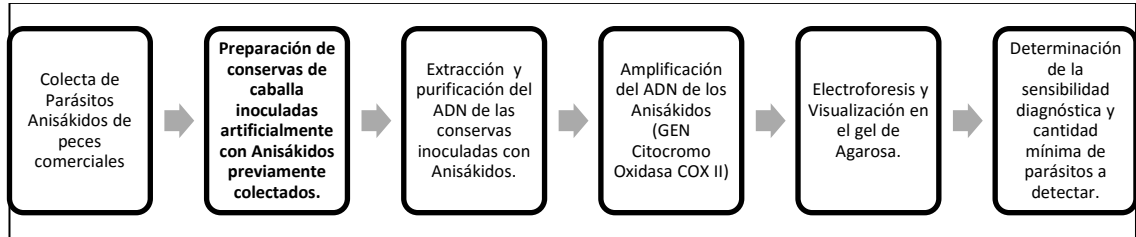


Figura 02. Esquema para la FASE B del trabajo

6.3.1. Colecta de Parásitos Anisákidos de peces comerciales

Los Anisákidos en estadio (L3) fueron colectados mediante necropsia de estómago y vísceras de pescados de consumo humano directo comercializados en el terminal pesquero del Callao-Perú (Ver Tabla 01). Las larvas de Anisákidos (L3) (240 larvas aproximadamente) se aislaron e identificaron mediante evaluación taxonómica, utilizando estereoscopio, y luego conservados en alcohol al 70 % para su uso.

Tabla 01. Número de Anisákidos colectados de peces comerciales

		Número de
Nombre científico de los Peces	Familia	Anisákidos colectados

<i>Sarda chiliensis chiliensis</i>	Scombridae	16
<i>Scomber japonicus peruanus</i>	Scombridae	40
<i>Trachurus picturatus murphyi</i>	Carangidae	164
<i>Mugil cephalus</i>	Mugilidae	13
<i>Hemilutianus macrophthatmus</i>	Serranidae	7
TOTAL		240

Antes de proceder a la inoculación artificial de los parásitos y de la preparación de las conservas, los parásitos fueron lavados con agua destilada por aproximadamente dos horas para retirar el alcohol en exceso.

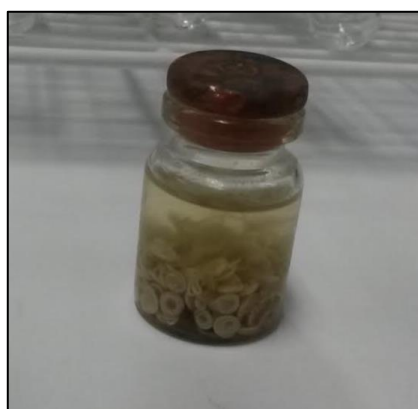


Foto 01. Anisákidos colectados de Peces comerciales preservados en Alcohol al 70 %.

6.3.2. Preparación de conservas de caballa inoculadas artificialmente con Anisákidos previamente colectados.

Las conservas se prepararon con “caballa” (*Scomber japonicus peruanus*), adquirida en mercados locales.



Foto 02. Filetes de caballa siendo procesados para la elaboración de las conservas

Después de los procesos de lavado, corte y eviscerado los peces fueron analizados mediante el método de transiluminación para asegurarse de que los filetes carezcan de parásitos y, bajo estrictos parámetros de bioseguridad, fueron inoculados con especímenes de Anisákidos colectados e identificados previamente.



Foto 03. Filetes de caballa siendo inoculados con Anisákidos para la elaboración de las conservas

En envases de vidrio con tapa rosca hermética, se colocó 50 g de pescado (83.39% del peso total del producto), 10 mL de líquido de gobierno (16.6 % del peso total del producto), siendo los líquidos agua, aceite y salsa de

tomate comercial y 5 individuos Anisákidos (30 mg aproximadamente), tal como se aprecia en el Cuadro 01.

Tabla 02. Diseño de Elaboración de Conservas Inoculadas y no Inoculadas

Diseño de Elaboración de Conservas Inoculadas y no Inoculadas	Conservas de Caballa en Aceite inoculadas con Anisákidos	Conservas de Caballa en Agua inoculadas con Anisákidos	Conservas de Caballa en Salsa de tomate inoculadas con Anisákidos
Caballa	50 g	50 g	50 g
Líquido de gobierno	10 mL Aceite comercial	10 mL Agua	10 mL Salsa de Tomate comercial
Anisákidos	5 individuos (30 mg)	5 individuos (30 mg)	5 individuos (30 mg)

El flujo de la elaboración de las conservas incluyó las etapas de Eviscerado y corte del pescado, inoculación de parásitos (como modelo experimental), envasado, precocción, enfriado, esterilización de las conservas y finalmente el almacenamiento de la conservas.

El precocido se realizó sometiendo los envases a baño María, durante 10 minutos. Cada envase se etiquetó (tipo de producto, fecha, peso, inoculación o control, líquido de gobierno) y esterilizó en autoclave (121 °C, 15 atmósferas, por 55 minutos) (Olivares, 2013).

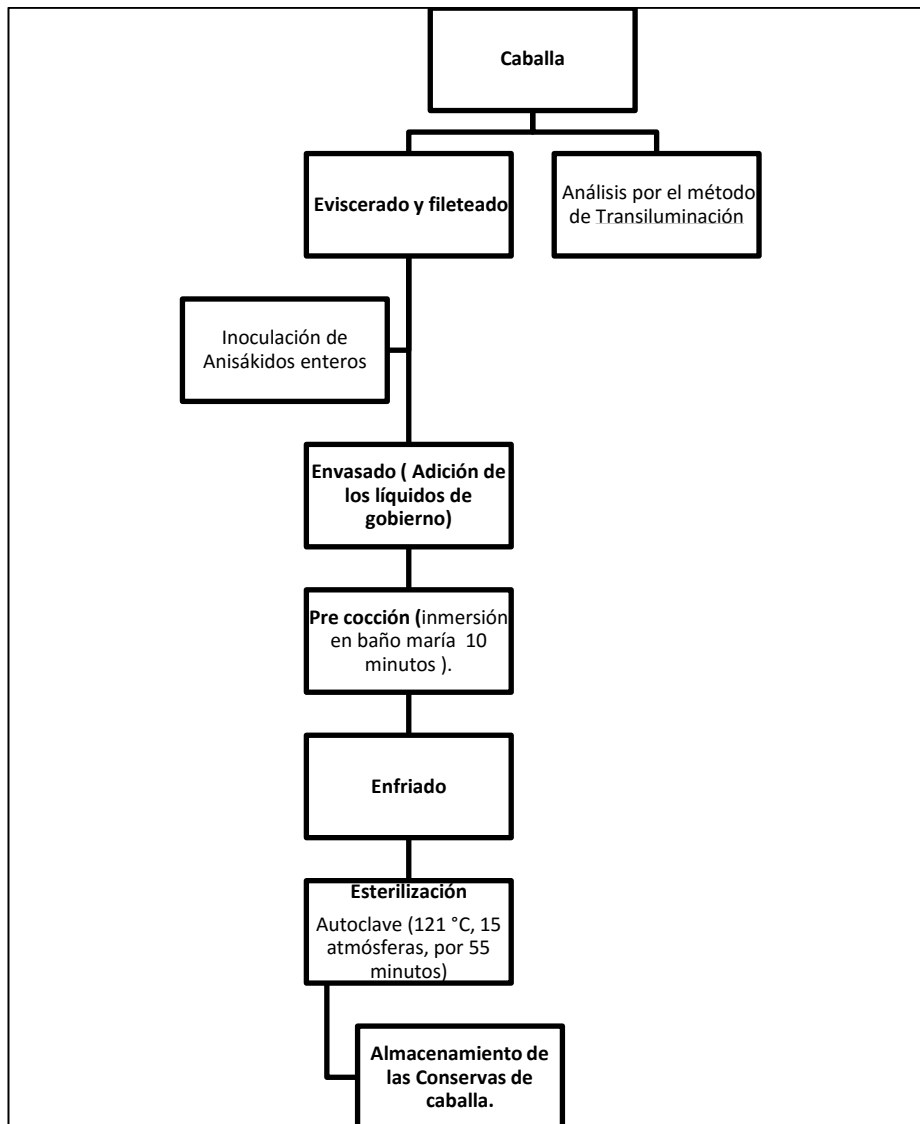


Figura 03. Flujo de Elaboración de las conservas de caballa

Se elaboró un total de 48 conservas inoculadas con larvas de Anisákidos, en detalle se elaboraron 16 conservas de caballa con larvas de Anisákidos en agua, 16 conservas de caballa con larvas de Anisákidos en aceite y 16 conservas de caballa con larvas de Anisákidos en salsa de tomate comercial con el objetivo de obtener una sensibilidad mínima esperada del 95%.

6.3.3. Extracción del ADN mediante protocolo CTAB aplicado en conservas de pescado inoculadas con Anisákidos

Para todos los pasos de extracción y purificación del ADN de las muestras y controles se utilizó la metodología tradicional de CTAB recomendada por Alejos *et al.* (2015), con ligeras modificaciones, las cuales se detallan en cada punto.

Para la extracción y purificación del ADN de las muestras fue necesario previamente esterilizar morteros, pistilos, tubos para microcentrífuga y puntas para micropipetas. En el presente trabajo preparamos con anticipación las soluciones a utilizar para la extracción del ADN (Ver Anexo 1).

Se extrajo el ADN de las muestras de conservas previamente descritas, a partir del líquido escurrido, producto de la homogenización de la conserva en su totalidad (agua, aceite y salsa de tomate).

Hubo una modificación del Protocolo tradicional CTAB, recomendado por Alejos *et al.* (2015), en donde en vez de pulverizar la muestra con nitrógeno líquido se realizó la homogenización vigorosa de todo el contenido de la unidad (conserva de pescado) mediante el uso de un mortero, durante 20 minutos aproximadamente (debido a que el parásito se encuentra distribuido heterogéneamente en la conserva).

Dado que el objetivo de nuestro trabajo era extraer el ADN a partir del homogenizado de la conservas de caballa y para asegurar su recuperación

por el método propuesto, se realizaron los ensayos que se detallan a continuación.

6.3.3.1. Variante del método de extracción: Experimentación en el líquido de escurrido.

Para extraer el líquido de escurrido se invirtieron los morteros conteniendo la mezcla de la conserva homogenizada en un ángulo de 45° por aproximadamente 10 minutos , en esta etapa se procedió a realizar un pequeño experimento en el cual se sometió este líquido de escurrido a una centrifugación de 10,000 rpm por 10 minutos con el objetivo de verificar si era en el sobrenadante o el precipitado el que contenía mejor calidad y cantidad de ADN (una vez terminado el proceso de extracción), una vez finalizado el proceso de experimentación se determinó la fase que contenía mejor concentración y calidad de ADN (Ver Resultados), esto se pudo evaluar en equipo NanoDrop™ Espectrofotómetro ND-10 (Thermo Scientific, Alemania).

A diferencia del protocolo (Alejos *et al.*, 2015) donde se utilizaban 100 mg de tejido muestras se utilizó 300 µL del centrifugado de los líquidos de escurrido (Ver resultados para mayor detalle de este paso) en un tubo Eppendorf y se adicionó 1 mL de CTAB 2X, precalentado a 60 °C, se mezcló por inversión e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de 10 minutos a 0°C.

A continuación, se adicionó 10 μL de proteinasa K (Promega, USA) (10 mg/ μL), mezcló por inversión e incubó a 65°C por 25 minutos para luego incubar durante 5 min a 0°C y consistió en agregar 600 μL de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1) y se agitó por inversión. Luego se centrifugó a 10,000 rpm a 8 °C, por 12 min. Después de recuperar con cuidado 200 μl del sobrenadante y ponerlo en un tubo para microcentrífuga nuevo de 1.5 mL. Se agregó 50 μl de acetato de amonio 10 M y se mezcló por inversión varias veces. Luego se agregó 500 μL de isopropanol frío (a -20 °C) y se mezcló por inversión varias veces. Se mantuvo la mezcla a -20°C durante 2 h, para favorecer la precipitación de ADN y luego se centrifugó a 10,500 rpm a 8 °C, por 5 min. Finalmente, se rehidrató en 50 μL de buffer TE 1X, la cantidad y calidad del ADN extraído se evaluó en equipo Nano Drop TM Espectrofotómetro ND-10 (Thermo Scientific) y se almacenó a -80 °C hasta su posterior uso.

6.3.4. Variación en la Amplificación del ADN

Durante la etapa de amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) se procedió a realizar los primeros ensayos de amplificación del ADN de los Anisákidos en base a las recomendaciones de (Gea, 2015) con algunas variantes en cuanto al número de etapas de amplificación (las cuales se detallan en los resultados de esta investigación).

Se amplificó el gen citocromo c oxidasa subunidad II (COX II) por PCR, usando los cebadores A211 y A210, descritos por Nadler y Husdpeth (2000), que generan un amplicón de 629 pb.

Tabla 03. Cebadores A 211 y A 210 Nadler y Husdpeth (2000)

GEN	F (A211)	R(A210)
COX II	5'-TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT-3'	5'-CACCAACTCTTAAAATTATC-3'

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Thermo Scientific, USA), conteniendo en un volumen final de 25 µL, 150ng de ADN, conteniendo 0.4 uM de cada cebador, 1X de GoTaq® G2 Green Master 2X (el cual contiene 3mM MgCl₂) ,completando la solución final con agua ultrapura. Como control positivo se empleó el ADN de los especímenes de Anisákidos de la colección del Laboratorio de Parasitología FAVEZ-UPCH y como control negativo agua libre de nucleasas (Promega, USA).

Los tiempos de amplificación fueron: 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 47 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 72 °C durante 10 min.

Como variante a las recomendaciones de Gea (2015), luego de la primera amplificación por PCR, 3 µL del producto final fueron utilizados como molde para una segunda reacción (doble amplificación) (Ver en resultados para más información sobre esta variación del protocolo). Se usaron los

mismos cebadores que en la primera PCR: A211 (5'-TTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT-3') y A210 (5'-CACCAACTCTTAAAATTATC-3'), descritos anteriormente. Los tiempos de amplificación fueron los mismos: 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 47 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa de acuerdo a las especificaciones del apartado 6.2.4

6.3.5. Determinación de los criterios de rendimiento de la prueba utilizada: Sensibilidad

La sensibilidad diagnóstica de la prueba fue determinada mediante la detección positiva de las 48 conservas inoculadas con parásitos en los tres líquidos de gobierno (aceite, salsa de tomate y agua) y mediante la fórmula de cálculo de sensibilidad diagnóstica recomendada por (Fernández *et al.*, 2003).

Sensibilidad diagnóstica

$$= \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}} \times 100$$

En el presente trabajo se determinó la sensibilidad analítica (límite de detección) a través del método de diluciones seriadas de ADN de Anisákidos que fueron sometidos a las mismas condiciones de transformación de las conservas de pescado.

Además se determinó distintas proporciones pescado–parásito elaborando conservas de (50 g) inoculadas con distinto número de parásitos (1-5) individuos, de 6 mg cada uno, aproximadamente y fue distribuido de acuerdo al plan de determinación de distintas proporciones de pescado-parásito. Ver (Tabla 04).

Tabla 04. Plan de determinación de distintas proporciones de pescado- parásito.

Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
1 parásito	2 parásitos	3 parásitos	4 parásitos	5 parásitos
entero	entero	entero	entero	entero
50 g de	50 g de	50 g de	50 g de	50 g de
caballa	caballa	caballa	caballa	caballa

6.4. FASE C. Extracción, amplificación y visualización de ADN en conservas de pescado inoculadas con otros parásitos

Para determinar que no exista reacción cruzada (especificidad analítica), se analizaron muestras contaminadas con otros parásitos distintos a los Anisákidos. Asimismo, para determinar la denominada especificidad diagnóstica se prepararon conservas de caballa sin inocular.

En esta fase se detallan los pasos para poder determinar la especificidad analítica y diagnóstica que incluye la colecta de otros parásitos y peces para su posterior inoculación en la elaboración de las conservas, extracción, amplificación y

visualización del ADN de las muestras. Se trabajó siguiendo los pasos del siguiente esquema:



Figura 04. Esquema para la FASE C del trabajo

6.4.1. Colecta de otros parásitos

Los parásitos fueron colectados mediante necropsia de estómago y vísceras de pescados de consumo humano directo comercializados en el terminal pesquero del Callao-Perú (Cuadro 02). Los parásitos se aislaron e identificaron mediante evaluación de características taxonómicas utilizando estereoscopio, y luego conservados en alcohol al 70 % para su uso.

Cuadro 02. Parásitos y peces utilizados en la determinación de la especificidad analítica del ensayo.

Nombre científico	Familia	Organismos
<i>Diphyllobothrium pacificum</i>	Diphyllobothriidae	Céstodos
<i>Hepatoxylon trichiuri</i>	Sphyriocephalidae	Céstodos
<i>Tentacularia coryphaenae</i>	Tentaculariidae	Céstodos
Nybelinia sp	Tentaculariidae	Céstodos

<i>Rhadinorhynchus</i> sp	Rhadinorhynchidae	Acantocephalos
<i>Sarda chiliensis chiliensis</i>	Scombridae	Peces
<i>Trachurus picturatus murphyi</i>	Carangidae	Peces
<i>Mugil cephalus</i>	Mugilidae	Peces
<i>Thunnus albacares</i>	Scombridae	Peces

Adicionalmente a ello antes de la inoculación en las conservas se procedió a coleccionar 30 mg de tejidos de otros peces (distintos al de caballa) con la finalidad de inocularlos y evaluar si había reacción cruzada con estos peces.

6.4.2. Preparación de conservas de caballa inoculadas artificialmente con otros parásitos y otros peces y sin inocular.

En frascos de vidrio con tapa rosca hermética, se colocó 50 g de pescado (83.39% del peso total del producto), 10 mL de líquido de gobierno (16.6 % del peso total del producto), siendo el líquido agua y 30 mg aproximadamente de otros parásitos y tejidos de otros peces, tal como se aprecia en la Tabla 05.

El flujo de la elaboración de las conservas fue exactamente igual al flujo de preparación de las conservas de caballa inoculadas con Anisákidos las cuales fueron detalladas líneas arriba.

Tabla 05. Diseño de elaboración de conservas inoculadas con otros parásitos y peces y conservas no inoculadas

Diseño de Elaboración de Conservas Inoculadas con otros parásitos y no Inoculadas	Conservas de Caballa en Agua inoculadas con otros parásitos y peces	Conservas de caballa sin inocular
Caballa	50 g	50 g
Líquido de gobierno	10 mL Agua	10 mL Agua
Otros parásitos y peces	(30 mg)	0 individuos

6.4.3. Extracción, amplificación y electroforesis

La extracción del ADN se realizó según apartado 6.3.3.1.

La etapa de amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) se procedió a realizar según apartado 6.3.4. La electroforesis y visualización en el gel de agarosa se realizó según apartado 6.2.4.

6.4.4. Determinación de los criterios de rendimiento de la prueba utilizada: Especificidad

Para determinar que no exista reacción cruzada (especificidad analítica), se analizaron muestras contaminadas con otros parásitos distintos a los Anisákidos (ver Cuadro 02). Para la determinación de los parámetros de

sensibilidad diagnóstica, especificidad analítica y diagnóstica, los datos obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva utilizando programa Excel y mediante la siguiente fórmula de trabajo (Fernández *et al.*, 2003).

$$\text{Especificidad diagnóstica} = \frac{\text{Verdaderos blancos}}{\text{Verdaderos blancos} + \text{Falsos Positivos}} \times 100$$

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia tal como figura en la Constancia 004.02.19 con la categoría de Exento.

7. RESULTADOS

7.1. Resultados de la Extracción de ADN de controles positivos

Las extracciones de ADN, de los controles positivos mediante homogenización del tejido crudo de los parásitos conservados rindieron valores de concentración de ADN superiores a los 800 ng/ μ L y de un factor A260/A280 mayor a 1.8, luego se hicieron diluciones seriadas con agua libre de nucleasas hasta alcanzar una concentración de 150 ng/ μ L la cual permiten obtener amplificadores nítidos y del tamaño esperado en la etapa de revelado del gel de agarosa.

Estos controles positivos fueron utilizados para verificar la visualización de los amplicones en el gel de agarosa en comparación con los controles blancos (Mix de PCR + Agua en remplazo del ADN) y las muestras de conserva que se analizaron.

Tabla 06. Concentración y pureza de ADN extraído de Anisákidos utilizados como controles positivos

N°	MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/ μ L)	FACTOR A 260/ A 280
1	Anisákidos crudos	904.3	1.85
2	al 70% de Alcohol utilizados como	894.5	1.87
3	controles positivos	857.1	1.95
4		804.5	1.86

5		959.1	1.8
---	--	-------	-----

7.2.Resultados de la Extracción de ADN de conservas inoculadas con Anisákidos.

7.2.1. Resultados de la extracción de ADN probado en el sobrenadante y precipitado de la muestra.

Tal como se describió anteriormente en el Apartado (4.2.3.1.), se realizó un experimento en el cual se sometió este líquido de escurrido a una centrifugación de 10,000 rpm por 10 minutos con el objetivo de verificar si era en el sobrenadante o el precipitado el que contenía mejor cantidad de ADN, una vez finalizado el proceso de experimentación se determinó que el sobrenadante de la muestra (líquido de escurrido) era el que contenía mejor concentración y calidad de ADN.

Tabla 07. Concentración y pureza de ADN extraído del líquidos sobrenadante y precipitado de conservas de pescado inoculadas con Anisákidos.

N°	Concentración de ADN	Sobrenadante		Precipitado	
	Muestra	(ng/μL)	Factor a 260/ A 280	(ng/μL)	Factor a 260/ A 280
1	Líquido de escurrido de	208.6	1.55	15.8	1.5
2	conservas de caballa	162.7	1.94	5.88	1.42

3	inoculada con	364.5	1.47	29.9	1.32
4	Anisákidos	267.2	1.85	18.2	1.52
5		305.6	1.9	8.6	1.43

Las extracciones de ADN realizadas a partir de 300 μ L del sobrenadante del líquido de escurrido producto de la homogenización vigoriza de las conservas inoculadas con parásitos, rindieron valores de concentración de ADN mucho menores a la de los controles positivos y los valores del factor A260/A280 también fueron menores y éstas son detalladas en el Anexo 2.

7.2.2. Resultados de la Amplificación con variante

Para el proceso de amplificación se experimentó repeticiones con sólo un proceso de amplificación en las cuales, durante el proceso de visualización en el gel de agarosa, no se pudieron observar las bandas. En base a estos resultados se resolvió realizar una segunda amplificación utilizando 3 μ L del producto del primer PCR, utilizándose los mismos cebadores que en la primera PCR: A211 (5'-TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT-3') y A210 (5'-CACCAACTCTTAAAATTATC-3'), descritos anteriormente. Los tiempos de amplificación fueron los mismos: 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 47 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 72 °C durante 10 min. Con esta segunda amplificación se pudo observar bandas que evidenciaban la presencia de Anisákidos en estas muestras. Junto a las muestras de ADN de las conservas de pescado se amplificaron muestras

blanco, conteniendo un volumen final de 25 μ L, 1 μ L de cada cebador, 12.5 μ L de GoTaq® G2 Green Master ,7.5 μ L de agua ultrapura y 3 μ L de agua ultrapura en reemplazo del ADN molde.



Foto 04. Detección de Anisákidos en conservas inoculadas a partir de distintos líquidos de gobierno diferencias entre la primera y segunda amplificación. Agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio. 1kb: Marcador de peso molecular;(1) Control positivo;(2) Blanco, (3) Primera amplificación de Conserva de pescado en Aceite; (4) Primera Amplificación de Conserva de pescado en Agua (5) Primera amplificación de Conserva de pescado en salsa de tomate. (6) Segunda amplificación de Conserva de pescado en Aceite; (7) Segunda amplificación de Conserva de pescado en agua; (8) Segunda amplificación de Conserva de pescado salsa de tomate.

7.2.3. Resultados de la determinación de Criterios de rendimiento del presente estudio.

La sensibilidad diagnóstica de la prueba fue determinada mediante la detección positiva de las 48 conservas inoculadas con parásitos en los tres líquidos de gobierno (aceite, salsa de tomate y agua) donde se determinó un 100% de sensibilidad diagnóstica para las conservas en aceite y en salsa de

tomate, tal como se puede evidenciar en las (Tabla 08) y (Tabla 09) y en sus respectivos cálculos matemáticos.

La especificidad diagnóstica del protocolo fue del 100 %, basado a partir de la no detección de amplificadores de ADN en controles negativos (conservas de pescado que no estaban inoculada con parásitos Anisákidos).

Tabla 08. Tabla de datos para el cálculo de sensibilidad diagnóstica y especificidad diagnósticas en la detección de Anisákidos en Conservas de Caballa en Aceite Inoculadas y No Inoculadas con Anisákidos.

Nivel de confianza %: 95%			
Conservas de Caballa en Aceite		Verdadero diagnóstico	
		Inoculados	No inoculados
Prueba evaluada	Positivos	16	0
	Negativos	0	16

$16 / (16+0) \times 100 = 100$ % de sensibilidad diagnóstica de la prueba evaluada de conservas en aceite inoculadas con Anisákidos.

$16 / (16+0) \times 100 = 100$ % de especificidad diagnóstica de la prueba evaluada de conservas en aceite no inoculadas con ningún parásito.

Tabla 09. Tabla de datos para el cálculo de sensibilidad y especificidad diagnósticas en la detección de Anisákidos en Conservas de Caballa en Salsa de Tomate Inoculadas y No Inoculadas con Anisákidos.

Nivel de confianza % : 95%			
Conservas de Caballa en Salsa de tomate		Verdadero diagnóstico	
		Inoculados	No inoculados
Prueba	Positivos	16	0
evaluada	Negativos	0	16

$16 / (16+0) \times 100 = 100 \%$ de sensibilidad diagnóstica de la prueba evaluada de conservas en Salsa de Tomate inoculadas con Anisákidos.

$16 / (16+0) \times 100 = 100 \%$ de especificidad diagnóstica de la prueba evaluada de conservas en Salsa de Tomate no inoculadas con ningún parásito.

Sólo en un caso de la conserva en agua se obtuvo un resultado falso negativo, dando una sensibilidad final de 93.75 con este líquido de gobierno.

Tabla 10. Tabla de datos para la especificidad analítica en la detección de Anisákidos en Conservas de Caballa en Agua Inoculadas y No Inoculadas con Anisákidos.

Nivel de confianza %:		95%
Conservas de Caballa en Agua	Verdadero diagnóstico	

		Inoculados	No inoculados
Prueba evaluada	Positivos	15	0
	Negativos	1	16

$15 / (15+1) \times 100 = 93.75 \%$ de sensibilidad diagnóstica de la prueba evaluada de conservas en Agua inoculadas con Anisákidos.

$16 / (16+0) \times 100 = 100 \%$ de especificidad diagnóstica de la prueba evaluada de conservas en Agua no inoculadas con ningún parásito.

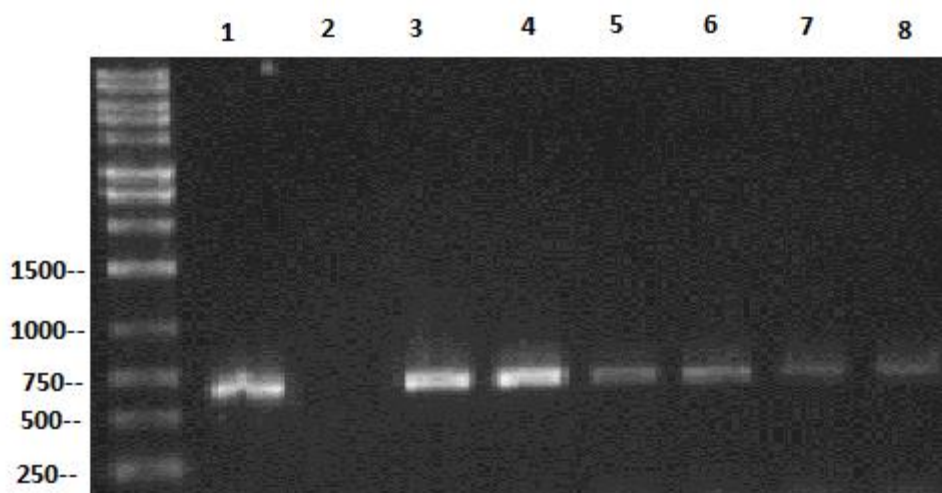


Foto 05. Determinación de la sensibilidad diagnóstica en conservas inoculadas con Anisákidos. Agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio. 1kb: Marcador de peso molecular; (1) Control positivo;(2) Blanco(3) Conserva de pescado en aceite inoculada con Anisákidos(I)(4) Conserva de pescado en aceite inoculada con Anisákidos (II); (5)Conserva de pescado en agua inoculada con Anisákidos (I); (6)Conserva de pescado en agua inoculada con Anisákidos (II); (7)Conserva de pescado en salsa de tomate inoculada con Anisákidos (I)(8)Conserva de pescado en salsa de tomate inoculada con Anisákidos (II).

Se determinó la sensibilidad analítica mediante una muestra de 5 parásitos Anisákidos que fueron sometidos a 121°C durante 55 minutos fue utilizada

para realizar las diluciones de ADN, para esto la muestra tuvo una concentración inicial de ADN de 346.5 ng/μL y una factor de absorbancia de 1.47 y se procedió a realizar diluciones seriadas de acuerdo al siguiente cuadro, de donde se determinó que la técnica evaluada en esta investigación puede detectar hasta 91.125 ng/μL lo que equivale a 1.25 individuos de Anisákidos.

364.5	182.25	91.125	45.5	23.2
ng/ul	ng/ul	ng/ul	ng/ul	ng/ul
Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

Tal como se describió en el apartado de materiales y métodos en el presente trabajo se determinó distintas proporciones pescado – parásito realizando conservas de (50 g) inoculadas con distinto número de parásitos (1-5) individuos, de 6 mg cada uno, aproximadamente. La presente prueba pudo detectar hasta 1 parásito (6 mg) por cada 50 000 mg de pescado.

La especificidad analítica del protocolo propuesto en este estudio fue del 100% para los tres líquidos de gobierno propuestos, basados a partir de la no detección de amplificadores de ADN de diferentes especies de peces y parásitos que no pertenecían a la familia Anisakidae Ver (Foto 06). En (Cuadro 02) se especifica los parásitos y peces que fueron usados para las pruebas de especificidad de la prueba.

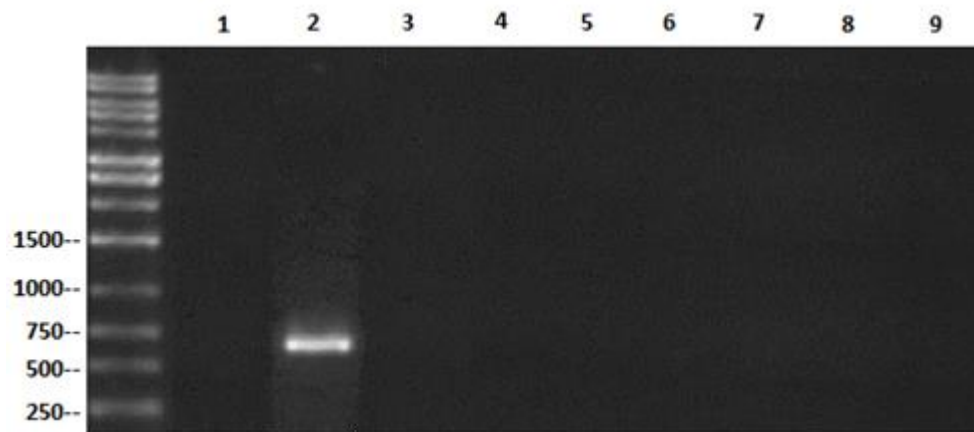


Foto 06. Determinación de especificidad analítica en conservas inoculadas con otros parásitos distintos a los Anisákidos. Agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio. 1kb: Marcador de peso molecular;(1) Blanco;(2) Control positivo, (3) *Diphilobothrium pacificum*; (4) *Hepatoxylon trichiuri*; (5) *Tentacularia coryphaenae*;(6) *Rhadinorhynchus* sp; (7) *Sarda chiliensis chiliensis*; (8) *Mugil cephalus*;(9) *Trachurus picturatus murphyi*.

8. DISCUSIÓN

Diversos estudios para la detección molecular de Anisákidos en diversos productos hidrobiológicos demostraron la posibilidad de detectar parásitos en muestras con condiciones extremas de degradación como en el caso de conservas de pescado.

Un estudio realizado por Espiñeira *et al.* (2010), denominado detección e identificación de Anisákidos en alimentos a través del método *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) de la región del *Internal transcribed spacer* (ITS-1), demostró que a pesar del tratamiento térmico aplicado a los productos enlatados se permitió evaluar la correcta amplificación del ADN en el caso más extremo de degradación a (115 ° C durante 50 minutos). Así mismo, Herrero *et al.* (2011), cuyo trabajo denominado detección de Anisákidos en peces y productos pesqueros en PCR en tiempo real, considera que su propuesta es rápida, robusta, altamente sensible y fácilmente adaptable en el diagnóstico molecular de muestras sometidas a procesos intensivos de transformación, como los alimentos enlatados.

La evaluación por PCR en tiempo real para la detección de *Anisakis simplex* en alimentos realizada por (López y Pardo., 2010) a través de la subunidad I del gen citocromo oxidasa (COI) determinó que el ensayo desarrollado en ese estudio es una metodología muy confiable, específica y sensible para detectar la presencia de este parásito en los productos del mar, incluidas las muestras altamente procesadas.

Un estudio (Mossali *et al.*, 2010) para la detección y cuantificación de Anisákidos en alimentos para bebés y conservas a base de pescado a través de PCR en tiempo real utilizando la Región ITS-1 (*Internal transcribed spacer*), demostró que los

Anisákidos a menudo estaban presentes en el músculo del pescado y en los productos derivados del pescado, incluida la comida para bebés. Cabe destacar que solo los productos alimenticios para bebés que contienen “Solla” y “Merluza europea”, ambas especies representan productos pesqueros comunes en España y, naturalmente, propensos a la infección por Anisákidos, dieron un resultado positivo a la prueba, mientras que los productos alimenticios para bebés que contienen dorada y lubina, que típicamente se producen por la acuicultura dieron negativo (es decir, se supone que no estaban infectados por Anisákidos). Esto sugeriría que los acuicultores podrían tener ventajas sobre los peces silvestres, ya que se puede garantizar que están libres de *A. simplex* y parásitos relacionados.

En el presente estudio buscamos demostrar la posible detección de Anisákidos en muestras de conservas de pescado utilizando metodologías más tradicionales (al utilizar el método de extracción CTAB y utilizar un termociclador para la amplificación del ADN), objetivo que si se pudo corroborar en base a los resultados obtenidos en el presente estudio, siendo posible la detección de amplicones de 629 pb de la región mitocondrial de la subunidad II de la Citocromo Oxidasa (COXII). Una variante de los demás estudios fue la de detectar la presencia de los Anisákidos a partir del líquido escurrido producto de homogenización vigorosa de toda la conserva y no de mezcla de tejidos como en los trabajos citados anteriormente gracias a esta variante se soluciona el problema de tomar varias muestras de un mismo envase permitiendo procesar varias muestras al mismo tiempo (pools).

Otra variante de los métodos tradicionales fue la de utilizar una doble amplificación. Dado esto es importante mencionar que el proceso de extracción dura

aproximadamente 6 horas, seguidas de dos fases de amplificación por PCR de dos horas y media (en total 5 horas), y finalmente un proceso de 2 horas de corrida electroforética y visualización del gel de agarosa. Por otro lado, tomar en cuenta que la exposición al bromuro de etidio y a los rayos UV resulta ser perjudicial para quienes manipulan estos elementos, queda a criterio de los investigadores escoger entre métodos tradicionales o métodos más modernos como en el caso de PCR en tiempo real.

Con respecto al tamaño de muestra tanto Espiñeira *et al.* (2010) como Herrero *et al.* (2011) utilizaron respectivamente un total de 20 muestras de mezclas de peces y Anisákidos enteros en diferentes presentaciones (seco, salado, cocido, frito, congelado, ahumado y enlatado), de donde sólo 7 muestras fueron utilizadas para las validaciones de la detección de Anisákidos en muestras de peces. Asimismo, Mossali *et al.* (2010), en su estudio de detección y cuantificación de Anisákidos en alimentos para bebés y conservas a base de pescado utilizaron como máximo 8 muestras por producto y López y Pardo (2010) utilizaron 4 muestras de conservas de pescado y 1 muestra de comida para bebé para la detección de *Anisakis simplex* en PCR en tiempo real. En el presente estudio se trabajó con un tamaño de muestra de 16 conservas por presentación, definido a través del cálculo de estimación de proporciones para una población desconocida de conservas de pescado, una proporción esperada del 94%, con un nivel de confianza del 95% y un margen de error del 10 %, nos dio un total de 16 muestras (conservas de caballa en distinto líquido de gobierno), una de las limitantes de estos estudios relacionados en la inoculación de parásitos fue la de poder coleccionar considerables cantidades de parásitos como en el caso de nuestro estudio en donde tuvimos que coleccionar 240

parásitos Anisákidos. Los peces y parásitos colectados para el estudio de especificidad analítica fueron escogidos en base al trabajo de detección de parásitos de peces comercializados en la ciudad de Lima (Serrano *et al.*, 2017), en donde se encontraron parásitos de importancia en salud pública, como el *Anisakis sp.* en todas las especies de peces estudiadas, a excepción de la lisa *Mugil cephalus*.

El protocolo CTAB es ampliamente utilizado en diferentes investigaciones para extraer el ADN genómico de parásitos Anisákidos, a partir de tejidos de peces y de productos procesados (Espíñeira *et al.*, 2010; Herrero *et al.*, 2011). La novedad del presente trabajo fue emplear este protocolo, con ligeras modificaciones, a partir del líquido escurrido después de la homogenización vigorosa de toda la conserva. En los tres líquidos de gobierno probados en el presente estudio el sobrenadante del líquido producto de la homogenización vigorosa tenía características oleosas en las cuales se atribuyen al alto contenido lipídico de la caballa (FAO, 1999). Los métodos de extracción de ADN en aceites son más exitosos con el método de extracción CTAB, prueba de ello el trabajo elaborado por (Yunjing *et al.*, 2018) que comparó 5 métodos de aislamiento de ADN usando 25 aceites vegetales comerciales producidos a partir de soja, maní, maíz, girasol, colza y aceites mezclados con la finalidad de establecer un método eficiente de aislamiento de ADN a partir de los aceites vegetales. La calidad del ADN aislado se determinó mediante espectrofotometría Nanodrop 2000, mostrando que solo las muestras de ADN aisladas por el método de Bromuro de cetil Trimetil amonio (CTAB) fueron capaces de amplificar el gen tRNA-Leu. Además, los valores de Ct de los genes de referencia endógenos específicos de la especie fueron mayores que 36.

Concluyendo que el método CTAB mostró la mejor resolución en la detección de ADN para aceites vegetales comerciales y también en nuestro estudio fue posible detectar la presencia de Anisákidos en el sobrenadante compuesto por partículas oleosas en su mayoría.

A pesar de que el protocolo recomendado por (Alejos *et al.*, 2015) refería usar 100 mg de tejido, en el presente trabajo se tomó 300ul de líquido sobrenadante en relación proporcional al trabajo de (Espiñeira *et al.*, 2010 y Herrero *et al.*, 2011) de donde tomaban 300 mg de mezclas de peces y parásitos para detectar la presencia de Anisákidos en las muestras analizadas obteniéndose resultados favorables con esta cantidad de muestra.

Los métodos de detección molecular de parásitos en productos hidrobiológicos, sometidos a procesos térmicos agresivos (esterilización), tienen que superar el problema de la fragmentación del ADN, que dificulta su detección (Chen *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2011). En el presente estudio desde la etapa de extracción pudimos observar una gran diferencia entre valores de concentración de ADN y los valores del factor A260/A280 entre las muestras que se utilizaron como controles positivos y las muestras de conservas (donde el parásito y el pescado fueron sometidos a grandes temperaturas por mucho tiempo), estos valores incidieron en las etapas de amplificación del ADN debido a esto se planteó realizar una doble amplificación para asegurar maximizar los índices de detección del protocolo.

Así, el estudio realizado por Quinteiro *et al.* (1998), determinó que el tamaño máximo de amplificado por PCR, en productos enlatados, difícilmente supera los 170 pb. Posteriormente, trabajos como los de Espiñeira *et al.* (2010) y López y Pardo (2010), lograron la amplificación de fragmentos de mayor tamaño (260 pb).

Estos estudios emplearon como muestra la mezcla de parásitos y pescado en conserva, similar a las condiciones de nuestro estudio. En el presente estudio, la detección del parásito en una sola corrida de PCR simple no fue suficiente pues como los fragmentos esperados del gen COXII de mayor tamaño eran amplicones de 629 pb. Esto se solucionó mediante un proceso de amplificación adicional, que usó como ADN molde el producto de la primera reacción (doble amplificación), bajo las mismas condiciones y utilizando exactamente los mismos cebadores de la primera amplificación.

Según Espiñeira *et al.* (2010) y Herrero *et al.* (2011), la sensibilidad analítica alcanzada con sus métodos fue de 4.8 mg de parásito en 300 mg de tejido de pescado y lo desarrollaron mediante el método de dilución seriada del ADN no especificando la metodología para determinar la sensibilidad analítica, en el presente estudio, se determinó la sensibilidad analítica mediante diluciones de ADN, a una concentración inicial de ADN de 346.5 ng/μL y un factor de absorbancia de 1.47, de donde se determinó que la técnica evaluada en esta investigación puede detectar hasta 91.125 ng/μL lo que equivale a 1.25 individuos de Anisákidos, cabe resaltar que en el presente estudio no se evaluó la eficacia de la técnica, ya que no se detectó cuál es la mínima cantidad de ADN del parásito por mg o ml de conserva. Asimismo mediante el método de proporciones (pescado/parásito), se pudo detectar hasta un parásito entero de 6 mg por cada 50 000 mg de pescado.

Se determinó que los líquidos de gobierno no funcionan como limitantes en la extracción y amplificación del ADN pues los índices de sensibilidad y

especificidad de la prueba no tuvieron diferencia significativa, siendo comparable con el método RT-PCR, reportado por Herrero *et al.* (2011) y a Espiñeira *et al.* (2010), quienes alcanzaron un 99% de eficiencia en sus estudios aunque utilizaron otros genes y modelos de PCR.

En el presente trabajo no se realizó pruebas para detectar la expresión de las proteínas termorresistentes de los Anisákidos después de un proceso de esterilización (autoclavado) (121 °C x 60 minutos) pues el objetivo principal de fue la detección de ADN de Anisákidos en éstas condiciones extremas de degradación a través de Reacción en cadena de la Polimerasa, debido a esto en la presente investigación no podemos afirmar que las conservas de caballa contaminadas con parásitos puedan causar toxicidad en personas previamente sensibilizadas, pero parte de la metodología de inoculación de parásitos y condiciones de autoclavado nos llevan a comparar con estudios relacionados en la detección de proteínas termorresistentes de los Anisákidos (Carballeda *et al.*, 2014) los cuales después de los procesos de autoclavado por (20, 40 y 80 minutos) respectivamente demostraron que Ani S1 fue identificada como un alérgeno resistente al autoclavado, esta proteína es la primera en caracterizada como alérgeno reconocido por más del 80 % de pacientes sensibilizados. Por otro lado, Ani S4 es el otro alérgeno reconocido por más del 27 % de los pacientes con síntomas alérgicos teniendo también resistencia a las altas temperaturas y a las pruebas de detección con pepsina.

Asimismo, Carballeda *et al.* (2014) realizaron pruebas de activación de basófilos con extractos de L3 procesados en donde el análisis funcional mostró que los

alérgenos de *A. simplex* eran capaces de inducir la activación de basófilos después del autoclavado. A pesar de una marcada disminución en el contenido de proteínas observado después del tratamiento durante 80 minutos, los alérgenos parásitos residuales pueden inducir la regulación al alza de CD63 en los pacientes que fueron evaluados en ese estudio. La capacidad para inducir la activación de basófilos depende de cada paciente pero aun así se observó una activación de basófilos disminuida, aunque las pruebas de activación de basófilos no proporcionan información sobre la respuesta inmune celular en el intestino, permite el estudio de la alergenicidad potencial de los alérgenos de los Anisákidos después del procesamiento de alimentos, porque imita la vía in vivo que conduce a los síntomas. Asimismo (Olivares,2013) realizó un estudio para evaluar el efecto sobre los alérgenos de las larvas L3 de *Anisakis* al aplicar tratamiento selectivo en pescado parasitado teniendo como resultados que el tratamiento térmico de esterilización de pescado infestado produjo un descenso en los antígenos de *Anisakis*, incluso en los alérgenos termo-resistentes, aunque en todos los casos se ha detectado antigenicidad residual concluyendo que estos productos podrían suponer un riesgo para la salud en consumidores que han sido previamente sensibilizados a alérgenos de *A. simplex*.

En Perú la evaluación de técnica propuesta en este trabajo aporta al uso en los controles de calidad en la industria por su fácil acceso pues no será necesario tomar varias muestras de un solo envase tal como se propone en otras metodologías de PCR a partir de muestras de tejido, donde se corre el riesgo de tomar parte del tejido que no esté contaminado, lo que dé como resultado falsos negativos, lo cual se

solucionó con la homogenización de toda muestra del envase con el líquido de gobierno.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar si los procesos de fabricación de conservas de pescado afectan en la detección molecular tanto del ADN como a las proteínas de los parásitos. Este trabajo tuvo como objetivo realizar la evaluación de la detección a nivel molecular del ADN de los Anisákidos, pero no se puede afirmar que al detectar el ADN de los Anisákidos en el máximo grado de degradación se detecte también las proteínas con potencial alergénico.
- Se sugiere poder realizar validaciones de la técnica evaluada, esto requiere de muestras adicionales de parásitos colectados, una limitante del presente estudio fue la de poder colectar grandes cantidades de parásitos tomando en cuenta que se utilizaron un total de 240 parásitos Anisákidos.
- Tomando en cuenta que el pescado cuando es comercializado en los mercados ya se encuentra en estado postmortem, los parásitos que contiene este pescado ya se encuentran muertos, esto resulta ser una limitante para el óptimo estudio del proceso normal de la detección en conservas ya que en condiciones normales el parásito debería estar “vivo” enquistado en el musculo a procesar antes de la elaboración de la conserva, segregando sus líquidos y toxinas. En este trabajo se utilizaron un 100% de larvas muertas de Anisákidos debido a esta limitante.

10. CONCLUSIONES

- La técnica molecular evaluada, detectó la presencia de parásitos Anisákidos inoculados artificialmente en conservas de caballa , a través de 3 distintos líquidos de gobierno (agua, aceite y salsa de tomate).
- La técnica molecular evaluada pudo amplificar fragmentos de 629 pb, mediante un protocolo de PCR de doble amplificación, aún después de procesos como la esterilización comercial.
- La sensibilidad diagnóstica de la técnica evaluada fue de 100% para las conservas cuyo líquido de gobierno fueron aceite y salsa de tomate comercial y de 93.75% en el caso de las conservas en agua.
- La sensibilidad analítica de la técnica evaluada fue 91.125 ng/μL de parásito el cual fue determinado mediante diluciones seriadas. asimismo mediante el método de proporciones (pescado/parásito), se pudo detectar hasta un parásito entero de 6 mg por cada 50 000 mg de pescado.
- La técnica evaluada tuvo 100% de especificidad analítica y diagnóstica.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **Anderson R, Chabaud A, Willmott S. 2009.** Keys to the nematode parasites of vertebrates. London, UK: CAB International. 480 p.

- **Alejos L, Aragón M, Cornejo R. 2015.** Extracción y purificación de ADN2015 - México DF. In-text: Extracción y purificación de ADN. 1st ed. [ebook] México DF, pp.1-2. Available at: [Accessed 5 Sep. 2015].
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/extraccion.pdf>

- **Audicana L, Audicana M, Fernández de Corres L, Kennedy M. 1997.** Cooking and freezing may not protect against allergic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in human. Vet Rec. 140(9): 235.

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

- **Bier J. 1976.** Experimental anisakiasis: cultivation and temperature tolerance determinations. J. Milk Food Technol. 39: 132-137.

- **Bublitz C, Choudhury G. 1992.** Effect of light intensity and color on worker productivity and parasite detection efficiency during handling of cod fillets. J. Aquat. Food Prod. Technol. 1: 75-89.

- **Caballero M, Umpierrez A, Moneo I, Rodríguez-Pérez R. 2011.** Anisakis 10, a new *Anisakis simplex* allergen: Cloning and heterologous expression. *Parasitol. Int.* 60: 209-212.

- Caballero M, Moneo I. 2004.** Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitol. Res.*, 93, 248–251.
- **Cabrera R, Trillo-Altamirano M. 2004.** Anisakidosis: ¿Una zoonosis parasitaria marina desconocida o emergente en el Perú? *Rev. Gastroenterol. Perú.* 24:335- 342.

- **Carballeda S, Olivares F, Rodríguez-Mahillo A, Careche M, Tejada M, Moneo I, Gonzales M. 2014.** Identification of Autoclave-Resistant *Anisakis simplex* Allergens. *Journal of Food Protection.* 77(4):605-609.

- **Chen Q, Yu H, Lun Z, Chen X, Song H, Lin R. 2008.** Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodes with zoonotic potential. *Parasitology Research.* 104: 79–84.

- **EFSA. 2010.** Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal.* 8(4): 1543.

- **Espiñeira M, Herrero H, Vieites JM, Santaclara F.J. 2010.** Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR–RFLP of ITS-1 region. *Food Control*. 21:1051–1060.
- **FAO. 1999.** El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. FAO Documento técnico de pesca 348. Cap. 04.
- **Fernández P, Pértegas S. 2003.** Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Cad Aten Primaria*. 10: 120-124.
- **Gea B. 2015.** Análisis genético de Parásitos Anisakis en Pescados del Cantábrico. Trabajo de fin de Máster. Universidad de Oviedo. 58-92.
- **Gómez Z, Gérez C, Zangróniz U, Muro O, González J, García P. 1999.** Reacciones de hipersensibilidad y manifestaciones digestivas producidas por la ingestión de pescado parasitado por *Anisakis simplex*. *Semergen*. 25 (9): 792-797.
- **Herrero H, Vieites JM, Espiñeira FJ. 2011.** Detection of anisakids in fish and seafood products by real-time PCR. *Food Control*. 22 :933–939.
- **Huang W. 1990.** Méthodes de recherche des larves d’anisakidés dans les poissons marins. Possibilités d’application à l’inspection des poissons commercialisés en région parisienne. *Réc. Méd. Vet*. 166: 895-900.

- **Klapper R, Carballeda-Sangiao N, Malene H, Buchmann K; Gonzalez-Muñoz M, Karl K. 2018.** Anisakid infection levels in fresh and canned cod liver: Significant reduction through liver surface layer removal. *Food Control*.17-24.
- **Køie M, Berland B, Burt M. 1995.** Development to third-stage larva occurs in eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 52 [Suppl 1]:134-139.
- **Karl H, Leinemann M. 1993.** A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillet and fishery products. *Arch. Lebensmittelhyg.* 4: 105-128.
- **Levsen A, Lunestad B, Berland B. 2005.** Low detection efficiency of candling as a commonly recommended inspection method for nematode larvae in the flesh of pelagic fish. *J. Food Prot.* 68(4): 828-832.
- **Lopez I, Pardo M.A. 2010.** Evaluation of a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Anisakis simplex* parasite as a food-borne allergen source in seafood products. *J. Agric. Food. Chem.* 58: 1469-1477.
- **Mattiucci S, Paoletti M, Webb S. 2009.** *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the Southern hemisphere:

morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Syst. Parasitol.* 74: 199-217.

- **Mattiucci S, Nascetti G. 2006.** Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite.* 13: 99113.

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

- **Mattiucci S, Farina V, Campbell N, Mackenzie K, Ramosd P, Pinto A, Abaunza P, Nascetti G. 2008.** *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fish. Res.* 89: 146-151.

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

- **Mattiucci S, Paoletti M, Damiano S, Nascetti G. 2007.** Molecular detection of sibling species in anisakid nematodes. *Parassitologia*. 49: 147-153.
- **Moneo I, Caballero M, Gómez F, Ortegam E, Alonso. 2000a.** Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 177-82.
- **Moneo I, Caballero M, Jimenez F. 2000b.** Inmunodetección de IgE específica (immunoblotting) en el estudio de prevalencia de sensibilización a *Anisakis simplex* en España. *J. Allergy Clin. Immunol.* 15:255-261.
- **Moneo I, Caballero M, González-Muñoz M, Rodríguez-Mahillo A, Rodríguez-Pérez R, Silva A. 2005.** Isolation of a heat resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res.* 96: 285-289.
- **Mossali C, Palermo S, Capra E, Piccolo G, Botti S, Bandi C, D'Amelio S, Giuffra E. 2010.** Sensitive Detection and Quantification of Anisakid Parasite Residues in Food Products. *Foodborne pathogens and disease.* 7(4):391-397.
- **Nadler S, Hudspeth D. 2000.** Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *J Parasitol.* 86(2):380-93.

- ***Olivares F. 2013.*** Efecto sobre los alérgenos de las larvas L3 de anisakis al aplicar tratamientos selectivos en pescado parasitado. Memoria para optar el grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid.341.
- ***Panel on Biological Hazards. 2010.*** Risk assessment on parasites in fishery products. EFSA Journal. 8:1543
- ***Pippy J. 1970.*** Use of ultraviolet light to find parasitic nematodes in situ. J. Fish. Res-Bd. Can. 27: 963-965.
- ***Quinteiro J, Sotelo C, Rehbein H, Pryde S, Medina I, Perez-Martin R. 1998.*** Use of mt DNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR–restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46, 1662–1669.
- ***Rodríguez-Mahillo A, González-Muñoz M, Delas Heras C, Tejada M, Moneo I. 2010.*** Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen and cooked fish muscle. Foodborne Pathog. Dis. 7(8): 967-973.
- ***Rogers S, Bendich A. 1985.*** Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium, and mummified plant tissue. Plant Molecular Biology. 5: 69–76.

- **SANIPES. 2018.** Informe de ER.001.2018-SDIP. Informe técnico de evaluación de riesgo. Opinión técnica-científica sobre la evaluación de Riesgo relativo a los parásitos en productos hidrobiológicos.15-17.

- **SANIPES. 2017.** Comunicado SANIPES N°026-2017 SANIPES alerta a no consumir conservas elaboradas por la empresa China Tropical Food Manufacturing (NINGBO) Co. Ltd.
<http://www.sanipes.gob.pe/documentos/Comunicado-N-026-SANIPES.pdf>.

- **SANIPES. 2016.** N° 057-2016-SANIPES-DE. Resolución de dirección ejecutiva. Indicadores Sanitarios de inocuidad para los productos pesqueros y acuícola para el mercado nacional y de exportación.7-8.

- **Serrano-Martínez E, Quispe M, Hinostroza E, Plasencia L. 2017.** Detección de Parásitos en Peces Marinos Destinados al Consumo Humano en Lima Metropolitana. Rev. Investig. Vet. Perú. 28(1): 160-168.

- **Smith JW. 1983.** *Anisakis simplex* (rudolphi, 1809, det. Kxabbe, 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.

- **Smith JW, Wootten R. 1978.** Anisakis and anisakiasis. Advances in Parasitology. 16: 92-163.

- **Tejada M, Solas M, Navas A, Mendizábal A. 2006.** Effect of freezing and different heat treatments on *Anisakis larvae*: preliminary study. In “Seafood research from fish to dish” Quality, safety and processing of wild and farmed fish. J.B. Luten; C. Jacobsen; K. Bekaert; A. Sæbø; J. Oehlenschläger Eds. Wageningen Academic Publishers, 309-316.
- **Valentini A, Mattiucci S, Bondanelli P, Webb SC, Mignucci –Giannone AA, Colom-Llavina OMM, Nascetti G. 2006.** “Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial COXII sequences, and comparison with allozyme data”. *J Parasitol.* 92(1):156-66.
- **Van Hengel A. 2007.** Food allergen detection methods and the challenge to protect food allergic consumers. *Anal. Bioanal. Chem.* 389: 11-118.
- **Vidaček S, De las Heras C, Tejada M. 2009.** Quality of fish muscle infested with *Anisakis simplex*. *Food Sci. Technol. Int.* 15(3): 283-290.
- **Vidaček S, De las Heras C, Solas M, Mendizábal A, Rodríguez-Mahillo A, Tejada M. 2010.** Antigenicity and Viability of *Anisakis* larvae heated at different time-temperature conditions. *J. Food Protect.* 73(1): 62-68.
- **Vidaček S, De las Heras C, Solas M, García M, Mendizábal A, Tejada M. 2011.** Viability and antigenicity of *Anisakis simplex* after conventional and

microwave heating at fixed temperatures. *J. Food Protect.* 74 (12): 2119-2126.

- ***Yunjing L, Lin S, Xiao F, Danfeng W, Yuhua W, Jun L, Jun L, Li Z, Gang W. 2018.*** Evaluation of five DNA extraction methods for commercial vegetable oils. *Oil Crop Science.* 3: 122-136

ANEXO 1

1. Preparación de materiales para la extracción y preparación de Soluciones para la extracción

Para la extracción y purificación del ADN de las muestras fue necesario previamente esterilizar morteros, pistilos, tubos para microcentrífuga y puntas para micropipetas. Se rotularon los tubos a utilizar con marcadores indelebles.

Se precalentaron las estufas a la temperatura requerida antes de comenzar a trabajar y preparamos con anticipación las soluciones a utilizar para la extracción del ADN.

Se utilizó agua libre de DNasas y RNasas para preparar las soluciones.

2.1. Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8

Dentro de una campana de extracción, se disolvió en 65 mL de agua desionizada 0.605 g de Tris-HCl. Se agregó HCl al 0.1 N, agitando constantemente hasta ajustar el pH a 8. Se aforó a un volumen de 100 mL con agua desionizada. Se mantuvo a temperatura ambiente.

1.2. Buffer de extracción Bromuro de Cetil Trimetil amonio CTAB 2X

Para la preparación del Buffer de extracción se utilizó 1.4 M de NaCl (8.181 g), 20 mM de EDTA (0.744 g) y 2 % P/V de CTAB (Sigma-Aldrich, Alemania) (2 g). Se disolvió lo anterior en 75 mL de buffer Tris-HCl 100 mM pH 8 en un agitador termomagnético hasta que las sustancias se

disolvieron completamente. Enseguida se agregó 300 μ L de 2- β -mercaptoetanol (Thermo Fisher Scientific, USA) en la campana de extracción ya que este compuesto es muy volátil y tóxico. Finalmente se aforó a un volumen de 100 mL con la solución de Tris-HCl previamente utilizada. Se mantuvo a temperatura ambiente y antes de iniciar el proceso fue necesario calentarlo a 55 °C.

1.3.Solución Fenol: Cloroformo: isoamílico 25:24:1

Se mezcló en la campana de extracción 50 mL de fenol, 48 mL de cloroformo y 2 mL de alcohol isoamílico. Se mantuvo almacenado a -20°C.

1.4.Acetato de amonio 10 M

Se disolvió en 5 mL de agua desionizada, 7.71 g de acetato de amonio y se aforó a 10 mL con agua desionizada. Se mantuvo almacenado a temperatura ambiente.

1.5.Etanol al 70 %

Por cada 70 mL de etanol absoluto, agregar 30 mL de agua desionizada y mezclar. Se mantuvo almacenado a -20°C.

ANEXO 2

Cuadro 1. Concentración y pureza de ADN extraído de las muestras de líquido de escurrido de conserva de caballa con Anisákidos en aceite.

N°	MUESTRA	CONCENTRACIÓN	FACTOR A 260/ A
		(ng/μL)	280
1		208.6	1.55
2		162.7	1.94
3		364.5	1.47
4	LIQUIDO DE	267.2	1.85
5	ESCURRIDO	305.6	1.9
6	DE	304.5	1.56
7	CONSERVA	258.3	1.8
8	DE CABALLA	289.9	1.61
9	CON	278.4	1.49
10	ANISAKIDOS	356.5	1.72
11	EN ACEITE	302.5	1.68
12		234.4	1.76
13		308.9	1.83
14		245.8	1.78
15		223.6	1.67
16		254.8	1.77

Cuadro 2. Concentración y pureza de ADN extraído de las muestras de líquido de escurrido de conserva de caballa con Anisákidos en agua.

N°	MUESTRA	CONCENTRACIÓN	FACTOR A 260/ A
		(ng/μL)	280
1		245.3	1.35
2		197.2	1.65
3		334.9	1.45
4		268.2	1.35
5	LÍQUIDO DE	305.6	1.56
6	ESCURRIDO	145.5	1.59
7	DE	213.7	1.31
8	CONSERVAS	276.8	1.27
9	DE	278.4	1.48
10	CABALLA	165.8	1.75
11	CON	302.5	1.7
12	ANISAKIDOS	249.6	1.62
13	EN AGUA	341	1.81
14		154.1	1.57
15		262.4	1.52
16		276.9	1.59

Cuadro 3. Concentración y pureza de ADN extraído de las muestras de líquido de escurrido de conserva de caballa con Anisákidos en salsa de tomate.

N°	MUESTRA	CONCENTRACIÓN	FACTOR A 260/ A
		(ng/μL)	280
1		245.9	1.45
2		234.4	1.54
3		435.3	1.56
4	LIQUIDO DE	396.4	1.65
5	ESCURRIDO	378.6	1.78
6	DE	504.8	1.47
7	CONSERVAS	235.7	1.49
8	DE	234.6	1.67
9	CABALLA	435.8	1.52
10	CON	412.8	1.63
11	ANISAKIDOS	239.4	1.61
12	EN SALSA	218.5	1.75
13	DE TOMATE	269	1.78
14		245.8	1.79
15		345.7	1.76
16		540.5	1.48

ANEXO 3

GoTaq® G2 Green Master Mix

GoTaq® G2 Green Master Mix, 2X: GoTaq® G2 DNA Polymerase se suministra en 2X Green GoTaq® G2 Reaction Buffer (pH 8.5), dATP 400µM, dGTP 400µM, dCTP 400µM, dTTP 400µM y 3 mM MgCl₂. El tampón de reacción Green GoTaq® G2 es un tampón patentado que contiene un compuesto que aumenta la densidad de la muestra y los colorantes amarillo y azul, que funcionan como colorantes de carga cuando los productos de reacción se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa. El tinte azul migra a la misma velocidad que los fragmentos de ADN de 3 a 5 kb, y el tinte amarillo migra a una velocidad más rápida que los cebadores.