



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales
y Oceanográficas



Seminario de Tesis

"Caracterización de géneros de parásitos anisákidos presentes en merluza (*Macruronus magellanicus*) de importancia comercial en Chile mediante espectroscopía de infrarrojo medio (MIR) y cercano (NIR) en contraste con técnicas morfológicas y moleculares"

Michelle Dekyi Lhamo Suckel G.

Profesor Guía: Juan Araya Quintana

Profesor Patrocinante: Ciro Oyarzún

Profesora co-guía: Pilar Suárez

Presentado al
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFÍA
DE LA UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
para optar al título de
BIÓLOGA MARINA

Concepción - Chile

2025

Índice

Resumen.....	3
Abstract.....	4
Introducción	6
Materiales y métodos.....	15
Resultados.....	21
Discusión.....	32
Conclusiones.....	36
Bibliografía.....	37
Anexo.....	41

Índice de figuras

Figura 1: Ciclo de vida en anisákidos.....	9
Figura 2: Metodología general.....	15
Figura 3-9.....	22
Figura 10: Espectros MIR.....	29
Figura 11: Gráfico de Scores (A) y Loadings (B).....	30

Índice de tablas

Tabla 1. Determinación del género según su morfología.....	2
--	---

Resumen: Debido a la creciente popularidad de preparaciones con pescado crudo o poco cocido, el traspaso accidental de parásitos desde el pescado hacia el ser humano se ha convertido en una problemática de salud pública. Parásitos como los anisákidos pueden provocar una amplia gama de síntomas, dentro del cuadro clínico conocido como anisakidosis. Esta condición, sumada a enfermedades preexistentes o alergias, puede incluso derivar en intervenciones quirúrgicas. El desarrollo de técnicas moleculares ha sido clave en la clasificación y diferenciación de estos organismos. Sin embargo, se requiere seguir explorando e implementando metodologías que no sólo permitan su identificación taxonómica, sino que además sean rápidas, económicas y robustas, ideales para su aplicación en la industria pesquera, contribuyendo así a garantizar la inocuidad alimentaria. En este estudio, se propuso una estrategia analítica basada en espectroscopía MIR y Machine Learning para diferenciar géneros de la familia Anisakidae. Aunque la amplificación de ADN fue exitosa solo en una de las muestras, los análisis espectroscópicos permitieron observar diferencias químicas claras entre hospedador y parásitos, así como entre grupos de anisákidos, lo que sugiere un potencial uso de estas herramientas en la detección temprana de afectaciones debido a productos pesqueros.

Abstract: Due to the increasing popularity of raw or undercooked fish preparations, the accidental transmission of parasites from fish to humans has become a relevant public health issue. Parasites such as anisakids can cause a wide range of symptoms collectively known as anisakidosis. In individuals with pre-existing conditions or allergies, this may even require surgical intervention. The development of molecular techniques has played a key role in the identification and classification of these organisms. However, it is still necessary to explore and expand alternative methodologies that are not only accurate but also fast, cost-effective, and robust enough for implementation in the fishing industry. This study proposes an analytical approach based on Near-Infrared (NIR) spectroscopy and machine learning to differentiate genera within the family Anisakidae. The preliminary results showed chemically distinguishable patterns between host and parasite tissues, and between two distinct groups of anisakids. These findings support the potential application of this technology for anisakid detection in fish meat.

1. Introducción

1.1 Anisakidosis

Los parásitos nemátodos son organismos comunes en la naturaleza, presentes en múltiples redes tróficas, habiendo especies marinas con el rol de hospedadores naturales, algunas etapas larvales de nemátodos pueden incluso pasar al ser humano, quien actúa como hospedador accidental, cuando este consume pescado crudo o poco cocido, incluso cefalópodos contaminados con el parásito (Aibinu, Smooker *et al.* 2019). El aumento en popularidad del consumo de preparaciones con nula o poca cocción ha generado un alza en el riesgo de infección y, por lo tanto, de posibles zoonosis con parásitos anisákidos (Castellanos-Garzón, Falla-Zúñiga *et al.* 2020; Felipe Falla-Zuñiga, Alejandra Castellanos-Garzón *et al.* 2021). Este tipo de intoxicación con especímenes de la familia Anisakidae recibe el nombre de anisakidosis. La presencia de anisákidos en musculatura de peces teleósteos o calamar, preparados mediante el ahumado o crudo de la carne, es un indiscutible riesgo para la salud pública (Fernández, Suárez, *et al.* 2022); (Del Carmen, 2021) y un peligro emergente en seguridad alimentaria (Torres, Puga, *et al.* 2014). Aproximadamente 2000 casos de anisakidosis son diagnosticados anualmente en Japón, alrededor de 50 casos en USA y unos 500 reportados en Europa. A nivel mundial estas cifras han aumentado con el tiempo (Audicana, Ansotegui *et al.* 2002). Pese a la gran industria pesquera que posee Suramérica, esta cuenta con relativa baja información y casos reportados de esta afección, en comparación a los continentes europeo y asiático, siendo Chile y Perú los países con más casos reportados (Felipe Falla-Zuñiga, Alejandra Castellanos-Garzón *et al.* 2021). Dentro de la familia Anisakidae, los géneros *Anisakis*, *Contracaecum*, *Pseudoterranova* e *Hysterothylacium* son los más comunes en peces de consumo de estos países. Existen evidencias que respaldan por qué es tan importante poner atención a esta creciente parasitosis, *i.e.* su distribución geográfica, ya que está presente en todos los continentes, siendo un problema

de salud pública que involucra una amplia gama de hospedadores, las dificultades clínicas e histopatológicas involucradas en su diagnóstico y, por último, la gravedad de la enfermedad, en especial si el paciente tiene un historial clínico subyacente que hace más compleja la situación, pudiendo incluso llegar a requerir de cirugía (Pampiglione, Rivasi *et al.* 2002). La anisakiasis puede ser catalogada como invasiva o no invasiva, según el estado y vitalidad del parásito. Si la larva se ve incapaz de entrar en la mucosa intestinal o gástrica del hospedero, es no invasivo lo que la vuelve generalmente asintomática y de fácil expulsión, mientras que la forma invasiva comprende el acceso de dicha larva a la mucosa intestinal o gástrica y una penetración activa al tejido del tracto gastrointestinal. Esto provoca desde síntomas leves, como náuseas, vómitos, dolor abdominal, alergias, hasta daño en paredes gástricas e intestinales del hospedador, llevando a úlceras y granuloma eosinofílico (D'Amelio, *et al.* 2023; Mattiucci, *et al.* 2018). Por esto, la gravedad varía en función de la ubicación del parásito (Leatherland & Woo, 2006). Esta afección causa signos y síntomas gastrointestinales, pero pueden producirse reacciones alérgicas que van desde urticaria y/o angioedema hasta la anafilaxia (Hoshino & Narita, 2011), siendo Japón y España los países con más casos notificados (Pontone, Giovannini *et al.* 2023). Esto evidencia lo variadas que pueden ser las consecuencias del consumo de nemátodos, ya que dependen del género del parásito, la localización afectada, así como de las características y previa condición del hospedador.

Es sabido que las principales especies causantes de anisakidosis son *A. simplex* y *A. pegreffii* (Rosales, M., *et al.* 1999) pudiendo incluso tratarse de una co-infección, es decir, más de una especie de parásitos presentes en un mismo hospedador, ya sea paraténico, final o accidental, lo que puede agravar la reacción en pacientes humanos (Umehara, A., *et al.* 2006).

No sólo están los efectos de patologías asociadas y riesgos a la salud, sino que también se han de considerar las pérdidas monetarias que esta problemática

instala a nivel nacional, así como sus implicancias en inocuidad alimentaria. Por esto, se eligió una problemática local. La pesquera Grimar de Coronel, en la región del Biobío, siendo un ejemplo de cómo se ve afectado este sector por los parásitos en sus productos. Se pescan diversas especies, pero se evaluará la merluza de nombre comercial “hoki” o merluza de cola larga (*Macruronus magellanicus*), pez demersal en su etapa adulta y pelágico en su fase juvenil. Su tipo de flota extractiva es industrial, con pesca de red de arrastre de media agua y se ejecuta entre las regiones VIII y XII de Chile, siendo una especie de gran importancia comercial. En el caso de Grimar, luego de mantenerse el pescado a -20°C, el 90% es filete interfoliado exportado a Polonia. También exportan lotes a EE. UU. y España (97% de la producción). A pesar de la revisión y extracción de los parásitos, éstos son difíciles de identificar, debido a su ubicación a nivel intramuscular, por lo que son exportados con estos organismos ocultos en la carne, y al llegar al mercado extranjero, se suelen devolver por este tipo de contaminación. Se ha estimado que esta reaparición de los parásitos en los países de destino genera pérdidas del 20%.

1.2 Ciclo de vida y morfología

Leatherland & Woo (2006) han proporcionado una descripción extensiva de la morfología de estos organismos. De acuerdo con su trabajo, los nemátodos adultos presentan dimorfismo sexual y tienen cinco estadios (L1, L2, L3, L4 y estadio adulto) con cuatro mudas entre ellos. El ciclo de vida comienza con los huevos liberados al medio marino junto con las heces del hospedador final, que suelen ser mamíferos marinos. Estos huevos eclosionan y las larvas son ingeridas por el primer hospedador, pudiendo ser una gran diversidad de crustáceos, que posteriormente son devorados por organismos de mayor tamaño, transportando las larvas como hospedadores paraténicos. Las larvas L3 migran a los tejidos, por lo que al ser cazados por depredadores tope (hospedadores

Estos organismos son
mayormente
fusiformes, de cuerpo

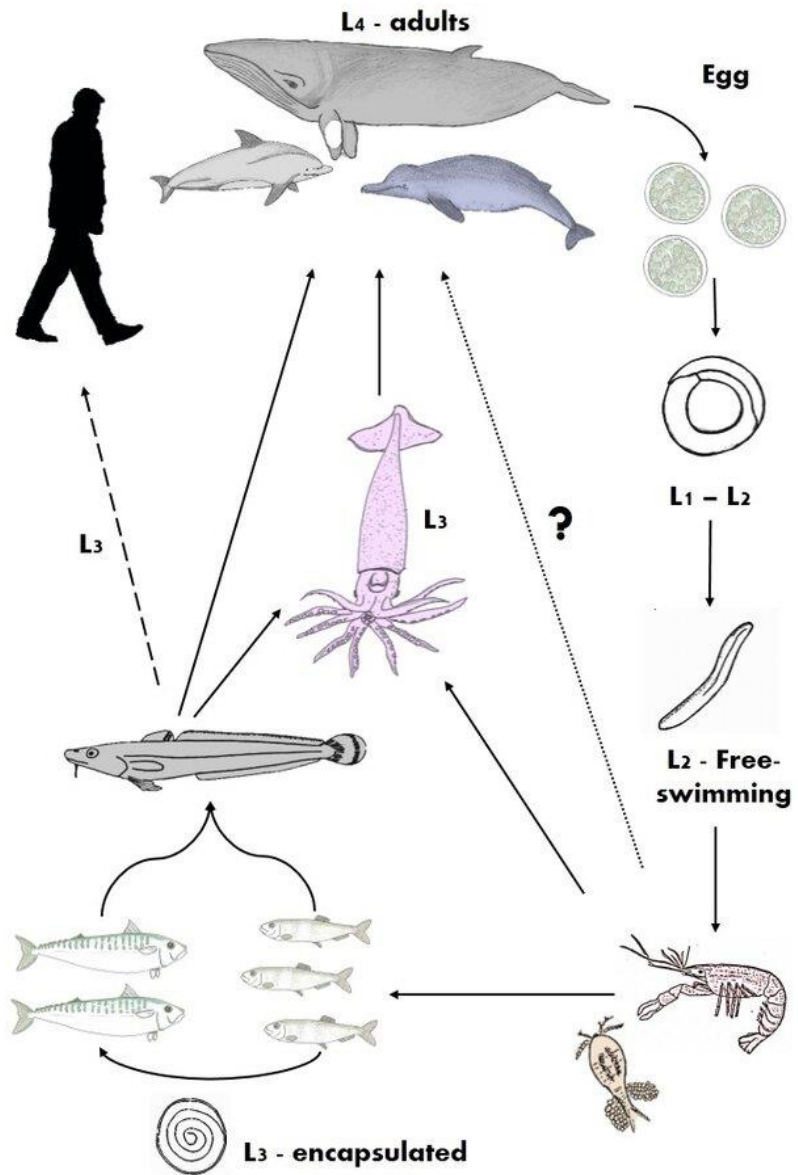


Figura 1. Ciclo de vida en anisákidos. Se muestra el estadio de huevo (L1) y larva de vida libre (L2) en el entorno marino, para posteriormente desarrollarse hasta su tercer estadio larval (L3) en su hospedador, pudiendo ser consumido incidentalmente por humanos en este punto, antes de haber podido culminar su ciclo (L4) en mamíferos marinos de mayor tamaño. Imagen de Celine Smith Svanevik.

alargado y delgado, no poseen órganos respiratorios ni sistemas sanguíneos. La

hembra suele ser más alargada que el macho. La larva en L3 suele encontrarse en hospedadores accidentales, como el humano, aunque se han encontrado formas transitorias entre L3 y L4, y larvas L4 ya desarrolladas o inmaduras (Rosales, M., *et al.* 1999). La coloración varía según la alimentación y locación del parásito en el organismo hospedador. Tienen una cutícula elástica, que puede estar cubierta de papilas de función táctil y quimiorreceptora, ya que todas las papilas acaban conectadas por un nervio. Estas suelen estar en la región cefálica, y según su función y ubicación en el nemátodo, recibe el nombre de labial, cefálica, cervical y papila genital. La estructura de la boca puede tener una gran variedad de formas, pudiendo formar labios grandes o crecimientos cuticulares llamados inter-labios (presentes en anisákidos), ésta desemboca en la cápsula bucal y le sigue el esófago, de estructura muy variada, pudiendo tener parte muscular y otra glandular, así como ser enteramente muscular. El esófago se une al intestino directamente o a través de un ventrículo sub-globular. El intestino termina en el recto, que se abre en el lado ventral del extremo posterior. En los machos el recto y el conducto eyaculador comparten una misma cloaca, suelen tener, además, órganos copulatorios accesorios, la mayoría de los que parasitan peces, poseen un par de espículas. En el caso de las hembras, mayormente poseen un par de ovarios tubulares que conducen mediante el oviducto al útero, por donde los huevos o larvas pasan a la vagina muscular y vulva. Estos organismos también poseen un anillo nervioso esofágico que representa el sistema nervioso central. En nemátodos parásitos de peces (Leatherland & Woo, 2006).

1.4 Variabilidad genética

La complejidad en la familia Anisakidae radica en que son especies particularmente extendidas, en hospedadores y ubicaciones geográficas (Farjallah *et al.*, 2008), lo que ha llevado a la posibilidad de hibridación y generación de subespecies. Esto implica que haya especies morfológicamente iguales, pero molecularmente diferentes. Entre las especies crípticas, se

encuentran: *A. simplex*, *sensu stricto*, y *A. pegreffii*, pertenecientes al complejo *A. simplex*, *sensu lato*, (Godínez-González, C., et al. 2017).

1.5 Detección

Se ha descrito que etapas larvales de *Anisakis* son morfológicamente muy similares, por lo que es difícil discriminar entre cada una de ellas (Berland, B., 1961). El reconocimiento morfológico es útil para definir su tipo (larva de *Anisakis* Tipo I o tipo II), pero impreciso para esclarecer el género, ya que es difícil con la actual falta de claves morfológicas en larva L3, especialmente a la hora de diferenciar entre *A. simplex* y *A. Pegreffii* (Quiazon, K. M. A., et al. (2008)). Es posible sopesar esta dificultad, mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM), donde se alcanzan a apreciar características morfológicas distintivas, como el mucrón saliente y poros excretores en larvas. Este detalle del mucrón como característica de la L3 son congruentes con el árbol filogenético (Cheypanya, V., et al. 2021). Esto podría ayudar a diferenciar las larvas de anisákidos a nivel de especie, aunque por sí sola no es suficiente, ya que requiere un método adicional para validar esta identificación. Para ello se han utilizado varios genes, donde la región espaciadora transcrita interna (ITS), las subunidades de citocromo oxidasa (ADNr *cox1* y ADNmt *cox2*) ayudan a complementar de forma más específica la identificación morfológica de estos parásitos (Zhang et al. 2018). Este análisis molecular de anisákidos está basado en secuencias de nucleótidos de ADN ribosómico ITS1-5.8S-ITS2, región que exhibe mayores diferencias en la secuencia de nucleótidos entre especies (Mostafa N., et al. 2023). Debido a que el uso de análisis mediante técnicas de biología molecular puede no ser lo suficientemente sensible, lo que sería un indicador de especies crípticas (Cheypanya, V., et al. 2021), es que es necesario incursionar en técnicas más robustas.

Identificar y caracterizar polimorfismos del ADN actualmente es posible, siendo de utilidad en la identificación de anisákidos independientemente de su

procedencia geográfica y la familia Anisakidae a la que pertenezca el parásito provocador de anisakidosis en un paciente. La sensibilidad de este análisis por PCR permite utilizar una mínima cantidad de material parasitario, detectando así de 10-20 ng de ADN del nemátodo, siendo útil incluso para muestras extraídas a través de endoscopia (Perterguer M. J., *et al.* 2004).

Se ha desarrollado en gran medida el mejoramiento de técnicas moleculares de detección, siendo métodos de referencia en esta investigación, una de aquellas recientemente utilizadas para productos derivados de pescado es qPCR optimizada mediante la técnica SYBR Green. Mattiucci *et al.* (2018) evidencia un mejoramiento en la detección de ADN de anisákidos del 60% a niveles traza tanto en pescado fresco como en productos procesados, siendo un método sensible ante pequeñas cantidades de material genético. Esto indica que la PCR en tiempo real (RT-PCR) ha superado limitaciones relacionadas con la cantidad de ADN y el tiempo, que también ha mostrado mejoría, respecto a las técnicas secuenciación directa de genes diana convencional y de mayor simplicidad anteriormente utilizadas mediante PCR-ADN (Valentini, A., *et al.* 2006). Por lo tanto, el uso de qPCR junto con la técnica SYBR Green permiten una detección confiable y robusta para la cuantificación de pescado fresca y productos altamente procesados, importante para un mejor control de calidad (Godínez-González, C., *et al.* 2017).

1.6 Espectroscopía MIR y NIR

El uso de espectroscopía NIR (Espectroscopía de Infrarrojo cercano) gana cada vez más terreno en la investigación, permitiendo comprender sistemas biológicos complejos. Los espectros de NIR tienen bandas de absorción a longitudes de onda corta (800-2500 nm) comparado con infrarrojo medio (MIR). de ondas medias (2500–15 000 nm), lo que le permiten mayor profundidad de penetración, para un análisis rápido, no invasivo, no destructivo y libre de químicos que pudieran ser añadidos (Manley, M., 2014). Una de las mayores

ventajas de la espectroscopia infrarrojo en general es que se pueden hacer múltiples predicciones a partir de un solo espectro, donde cada propiedad es medible independientemente, si se ha calibrado previamente (Osborne, B. G., *et al.* 1993).

Aunque se pueden diferenciar mediante técnicas de biología molecular, el uso de espectrometría en infrarrojo es un método ideal para caracterizar organismos parásitos y evaluar su presencia en peces hospedadores (Rocha, B., 2017), también, tiene como beneficios ser un método rápido, que requiere cantidades mínimas y poca preparación de las muestras, reduciendo costos y a la vez siendo más eficiente (Dalal, N., *et al.* 2024). La región NIR permite profundidad de penetración (espectro localizado entre los 700 y 2500 nm) para un análisis directo de muestras sólidas. Además, el hecho de que es un método no destructivo ni invasivo da pie a la posibilidad de su implementación en la industria, con fines de control de calidad (Manley, M., 2014).

La espectroscopía e imagen espectral han permitido estudiar y determinar la composición química de pescado y sus subproductos, con una detección del 58% de nemátodos en filetes de pescado, pudiendo tener un rol relevante en análisis de seguridad alimentaria y calidad (Liu, D., *et al.* 2013). Se ha utilizado además para cuantificar y predecir propiedades en músculo de pescado, tales como humedad, contenido lipídico, contenido de proteínas, pH e indicadores de frescura, tales como nitrógeno básico volátil total, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, y valores K como índice de calidad (Cheng, J. H., & Sun, D. W., 2017).

1.7 Machine Learning

La información espectral proporcionada por la espectroscopía infrarrojo suele estar compuesta por bandas donde muchas veces enlaces químicos de diferentes grupos funcionales se encuentran absorbiendo energía muy cercanos entre sí, lo que dificulta la interpretación química. Además,

especialmente en NIR, sobre tonos y bandas de combinación producen espectros solapados con poca resolución entre bandas. Por causa de esto, el análisis de espectros infrarrojo debe ser acompañado de métodos de análisis multivariados, conocidos en química analítica como métodos de quimiometría o *Machine learning*, los cuales son capaces de extraer información química depurada y de calidad, a partir de mezclas espectrales complejas. El algoritmo de Análisis de componentes principales (PCA) es uno de los métodos quimiométricos más usados para reconocimiento de patrones multivariados en espectros de infrarrojo. En PCA, se usa un algoritmo que a partir de un set de datos (e.g. espectros de una serie de muestras) encuentra los vectores originales cuya combinación lineal da origen a los espectros. Esta estrategia matemática permite que la información espectral contenida en las muestras se depure, haciendo que las características químicas similares se agrupen entre sí en función de patrones espectrales comunes. De esta manera, permite la identificación de muestras de un mismo género de *Anisakis*, en función de sus patrones químicos comunes. La combinación de NIR y métodos quimiométricos basados en PCA ha, demostrado ser de gran utilidad en la caracterización química de músculo de pescado, así como en la detección de parásitos (Cheng, J. H., & Sun, D. W., 2017).

2. Hipótesis de trabajo: En base a los antecedentes descritos, peligrosidad a la salud humana y difícil detección, es que surge la siguiente aseveración: es posible diferenciar géneros dentro de la familia Anisakidae presentes en peces de importancia comercial en Chile mediante espectroscopia infrarroja, en función de sus patrones espectrales característicos.

3. Objetivo general: Discriminar entre géneros de la familia Anisakidae mediante el uso de espectroscopia en infrarrojo como herramienta secundaria de diferenciación.

3.1 Objetivos específicos:

3.1.1 Caracterizar morfológicamente distintos géneros de anisákidos obtenidos desde merluza de cola.

3.1.2 Caracterizar químicamente las larvas de anisákidos mediante espectroscopia NIR/MIR y métodos multivariados de reconocimiento de patrones.

3.1.3 Determinar la variabilidad de género dentro de la familia Anisakidae en función de sus características morfológicas, genéticas y químicas.

4. Materiales y Métodos

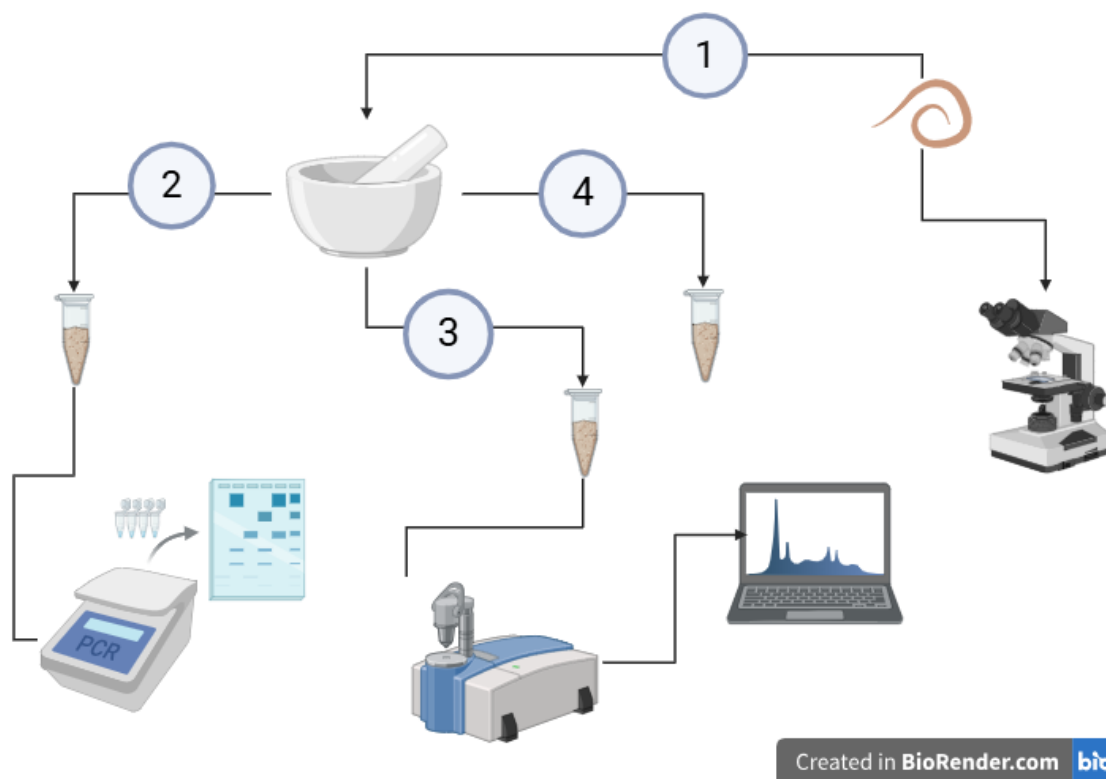


Figura 2. Metodología general. 1) Anisákidos extraídos son observados en microscopio para su identificación morfológica. 2) El primer tubo eppendorf de los tres tubos obtenidos por individuo, luego de ser molido en el mortero de ágata, es utilizada para extracción de ADN, PCR y electroforesis para su identificación molecular. 3) El segundo tubo eppendorf es llevado a secar en horno sobre un portaobjetos apto para ser sometido a análisis en el CMA, estos resultados espectrales se analizan con IA. 4) Muestra sobrante, en caso de ser necesaria.

4.1 Obtención de las muestras.

Se obtuvieron 50 especímenes de merluza (*Macruronus magellanicus*) provenientes de la empresa Grimar, ubicada en la comuna de Coronel, en la región del Biobío, para su posterior traslado al laboratorio. Los ejemplares, en estado fresco, fueron conservados a -20°C hasta su procesamiento. A cada

individuo se le realizó una disección, extrayéndose manualmente los parásitos presentes. Para ello, se examinaron las vísceras y el contenido estomacal, y posteriormente la musculatura, desmenuzando cuidadosamente la carne. Los parásitos extraídos se clasificaron en dos categorías: aquellos encontrados en las vísceras y los localizados en la musculatura del pez. Una vez extraídos, los especímenes se hidrataron con agua miliQ para preservar su forma y se montaron sobre portaobjetos para su observación al microscopio.

4.2 Caracterización morfológica.

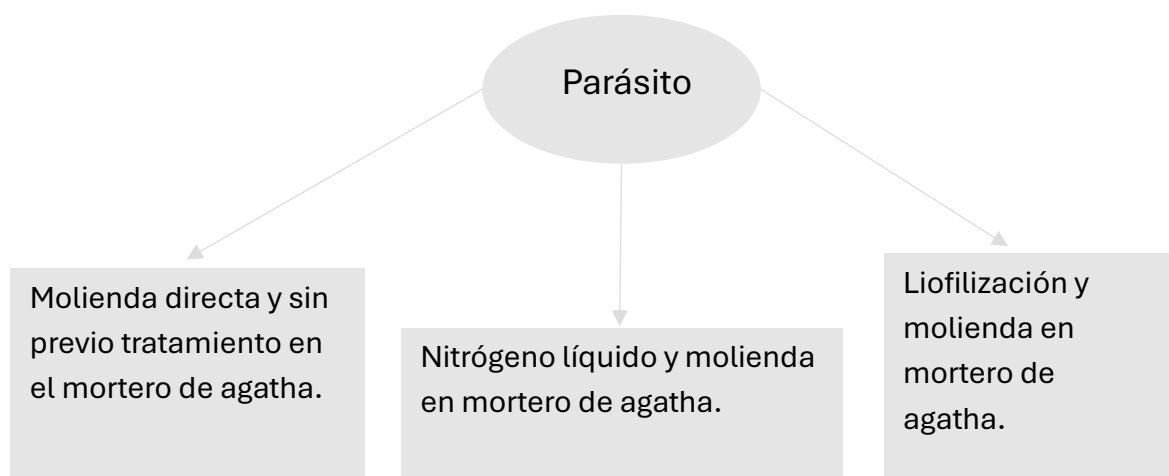
Cada muestra fue observada bajo microscopio con el objetivo de identificar características morfológicas distintivas de los géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterothylacium*. Se realizó un registro fotográfico de cada parásito, anotando su ubicación (músculo o vísceras) y el individuo del cual fue extraído, con el fin de asegurar la trazabilidad. Las imágenes se capturaron utilizando el programa MOTIC Images Plus 2.0, junto con su respectiva cámara y microscopio. Los ejemplares fueron observados con aumentos de 4x, 10x y 40x.

Para la identificación morfológica se utilizó como referencia el trabajo de Adroher-Auroux y Benítez-Rodríguez (2020), el cual destaca tres áreas clave en la diferenciación de géneros: la zona cefálica, donde se analizó la ubicación del poro excretor y las características bucales; la zona ventral, en la que fue relevante observar la forma y posición del ventrículo entre el esófago y el intestino; y la zona caudal, en la cual se examinó la forma del extremo posterior y la presencia o ausencia de mucrón.

4.3 Preparación de muestras.

Se estandarizó la molienda de los parásitos con el objetivo de obtener una solución homogénea para la espectroscopia en infrarrojo y para facilitar caracterización molecular. Para ello, se emplearon tres métodos. El primero consistió en moler directamente el parásito, previamente conservado a -80°C , utilizando un mortero de ágata, seleccionado por su baja porosidad y alta resistencia. El segundo método contempló la congelación del parásito en nitrógeno líquido antes de su molienda en el mismo tipo de mortero. El tercer y último método consideró la liofilización de las muestras (CHRIST ALPHA 2-4 LO plus, 121550 PMMA) antes de su posterior molienda.

Una vez obtenida la masa homogénea del parásito, se añadieron $300\ \mu\text{L}$ de agua miliQ. Esta solución se dividió en tres tubos Eppendorf de $100\ \mu\text{L}$ cada uno por parásito. Los tubos fueron almacenados a -80°C para su posterior análisis, siendo destinados de la siguiente manera: uno para análisis molecular, otro para análisis espectral y el tercero como respaldo.



4.4 Caracterización molecular.

En el procedimiento, se probaron dos técnicas de extracción de ADN:

Kit de extracción de ADN por lisis mecánica: se utilizó el kit comercial Quick-DNA Fecal/Soil Microbe MiniPrep Kit (Zymo Research, Cat. No.: D6010), el cual emplea lisis mecánica mediante bead beating para la ruptura celular, seguida de purificación del ADN mediante columnas de extracción. La metodología se llevó a cabo siguiendo estrictamente las instrucciones descritas en el protocolo proporcionado por el fabricante.

Extracción de ADN por lisis enzimática: Se utilizó una solución de lisis enzimática compuesta por un tampón con 100 mM de Tris-HCl (pH 8.0), SDS al 10 %, Tris-HCl 1 M y EDTA 0.5 M. Las muestras fueron incubadas a 56 °C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a la purificación del ADN mediante el método de fenol-cloroformo descrito por Seesao et al. (2014).

La purificación consistió en la adición de fenol-cloroformo (Merck) en una proporción 1:1 con respecto a la muestra, seguida de una segunda extracción utilizando cloroformo-álcool isoamílico (Winkler) también en proporción 1:1. Finalmente, el ADN purificado fue resuspendido en 100 µL de agua libre de nucleasas.

La extracción de ADN se comprobó mediante la cuantificación de ácidos nucleicos con el instrumento NanoQuant Infinite M200Pro (TECAN), obteniendo una cantidad y calidad suficientes de ADN, para proceder con la metodología de PCR. Para esta detección molecular se utilizaron los partidores del ITS-2 y cox-2. Los partidores para el espaciador ITS-2 fueron: partidor Forward: 5' - GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT -3' y partidor reverse: 5' - TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3'. Para el gen cox-2 se utilizaron: partidor forward: 5' - TTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT-3' y partidor reverse 5' - CACCAACTCTTAAATTATC-3', según el procedimiento descrito por (Martín-Carrillo, N. et al (2022); D'Amelio, S., et al. (2000)).

En el procedimiento de PCR de ambos genes se utilizó el Máster Mix SapphireAmp Fast PCR (Takara, n°catálogo RR350) bajo las siguientes condiciones:

Número de ciclos	35
Hibridación inicial	94°C/1min
Hibridación final	98°C/30s
Alineamiento	52,4°C/30s
Elongación	72°C/30s
Elongación final	72°C/1min
Término	∞ 4°C

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1,5% utilizando como intercalante SafeView Plus 20,000X (Fermelo Biotec). Finalmente, los Productos PCR fueron visualizados por transiluminador (TCL. Maestro LB-16. Número de serie:130207 010).

4.5 Espectroscopia MIR

Tras la descongelación de las muestras a temperatura ambiente, se procedió a depositar cada alícuota sobre portaobjetos microscópicos reflectantes de baja emisividad MirIR (Kevley Technologies, Chesterland, OH, EE. UU.). Posteriormente, las muestras se secaron a 37 °C durante 30 minutos y las placas fueron almacenadas en un desecador hasta su análisis.

Los espectros de infrarrojo medio (MIR) se adquirieron en el rango de 600 a 4000 cm⁻¹ en modo de transfectancia, utilizando un sistema de microscopía FT-IR Spectrum Frontier/Spotlight 400 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.).

En las primeras cuatro placas utilizadas se sembraron seis muestras de 5 µL cada una. Sin embargo, debido a la baja concentración observada en los espectros, las placas preparadas posteriormente fueron sembradas con 15 µL por muestra. Todas las placas fueron enviadas al Centro de Microscopía Avanzada (CMA

Biobío) de la Universidad de Concepción para su análisis, allí se escogieron los puntos exactos de cada gota de muestra para obtener espectros.

4.6 Análisis de datos Modelamiento por *Machine Learning*

Los espectros obtenidos fueron analizados usando el programa PLS_Toolbox (Eigenvector) ejecutado en un ambiente MATLAB usando MATLAB R2021 (Mathworks inc.). Se ejecutó un análisis de componentes principales (PCA) en los espectros. Los datos fueron pretratados por corrección de línea base y normalizado, y se realizó un preprocesamiento por centrado en la media.

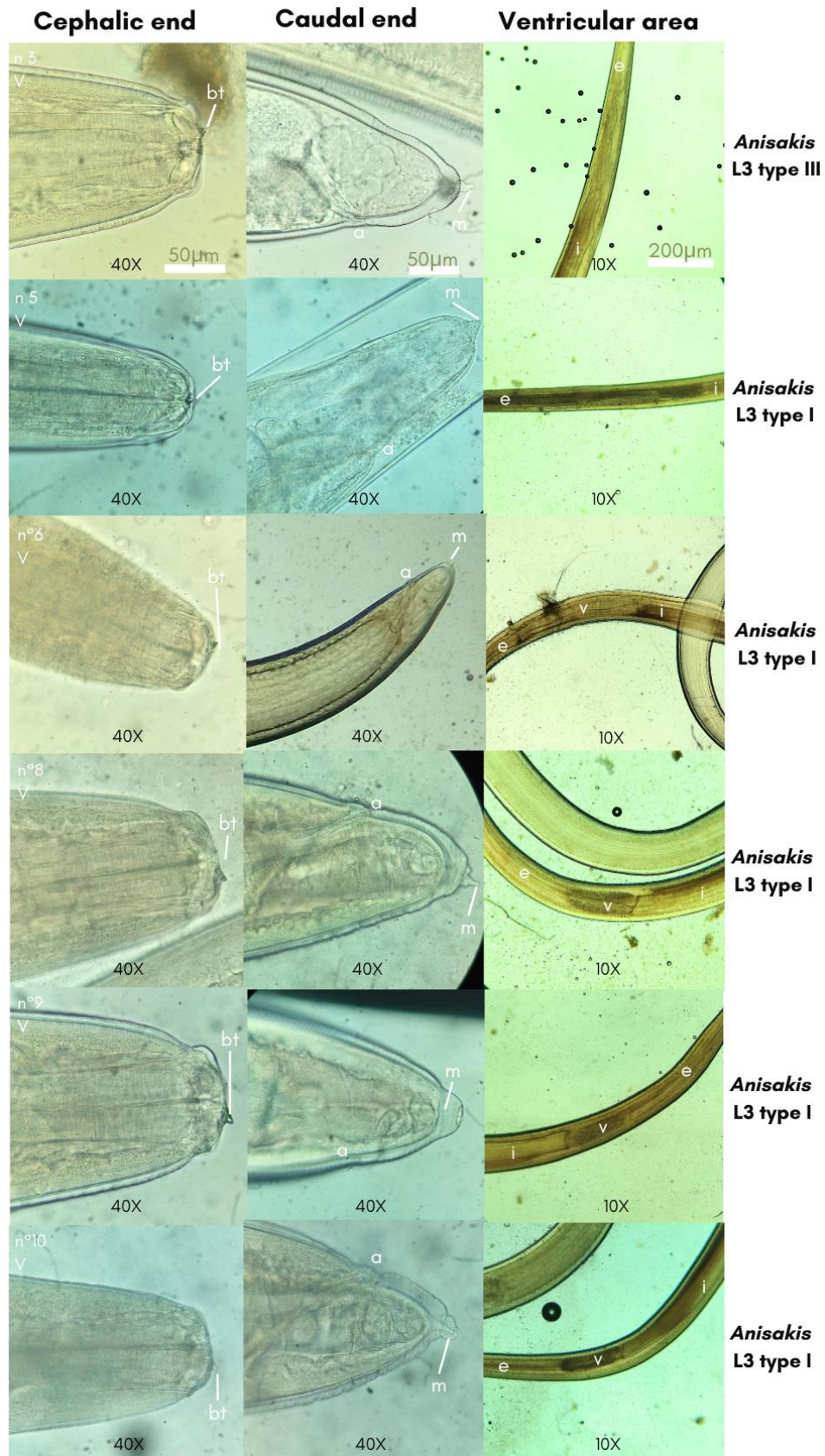
5. Resultados

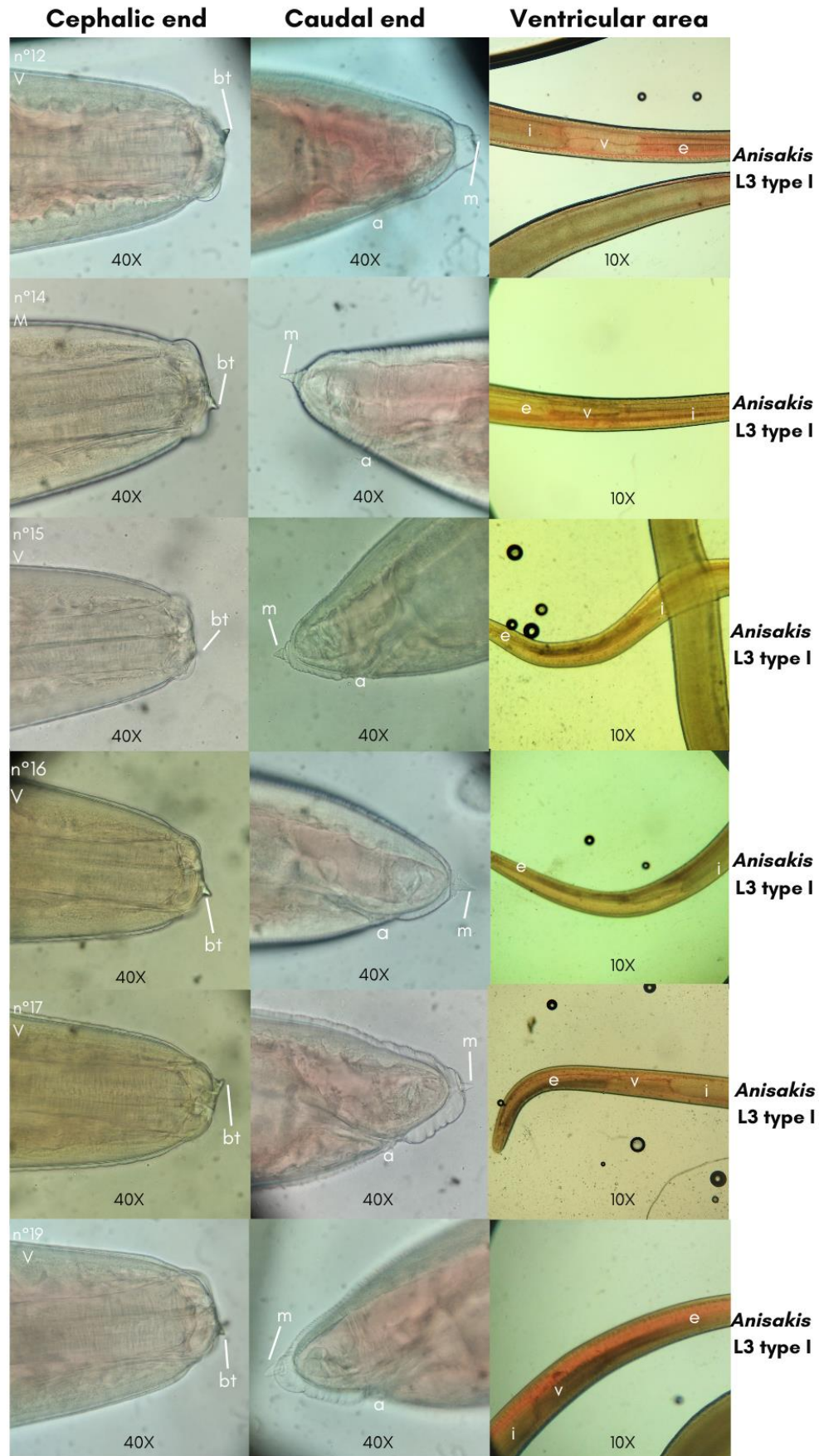
5.1 Identificación morfológica

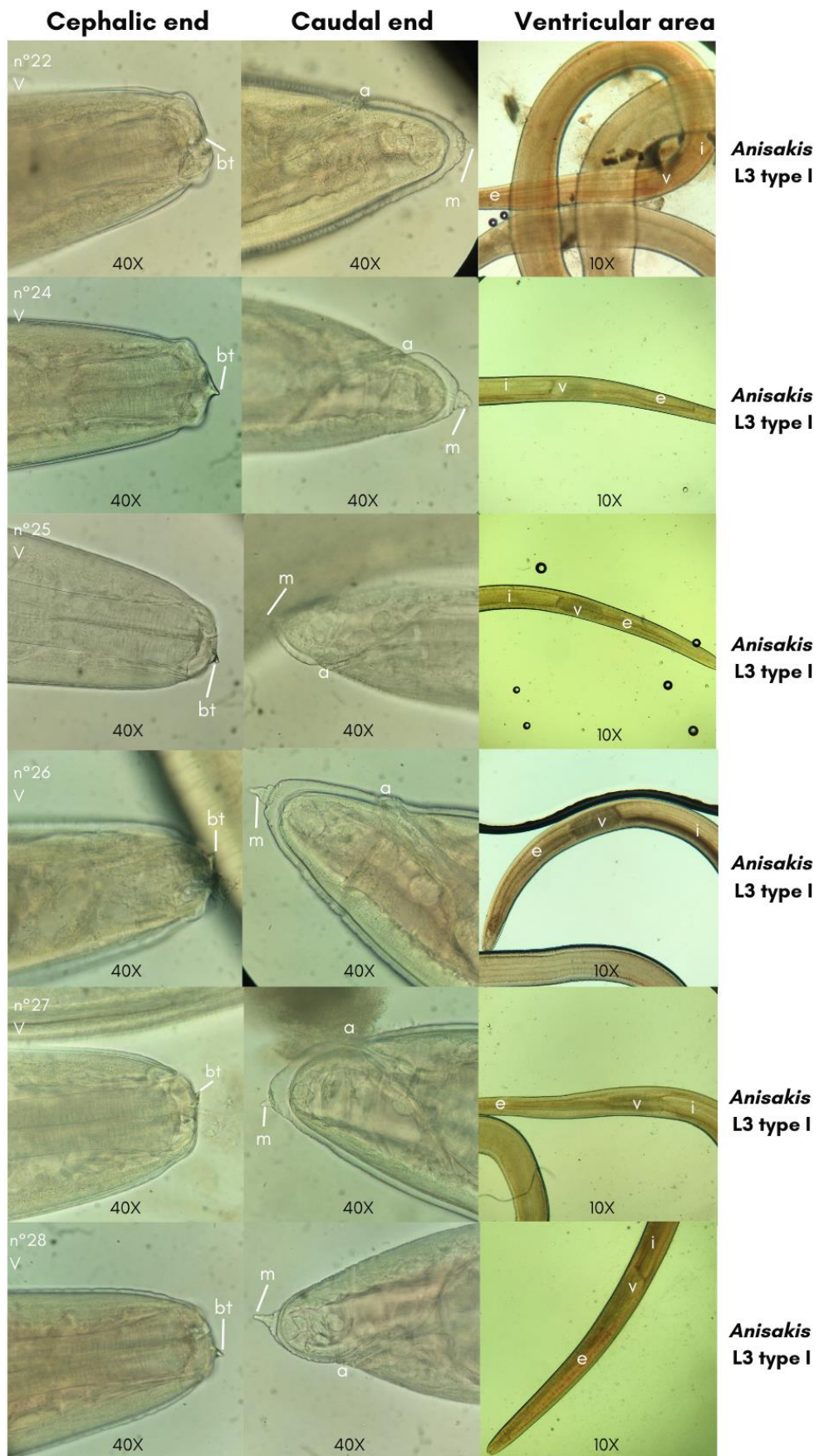
Para la identificación morfológica de los nematodos se observó la ubicación y distancia entre el ano y el mucrón, así como la presencia o ausencia de este último. Asimismo, resultó fundamental examinar la forma y la continuidad entre el ventrículo, el esófago y el intestino, ya que estas estructuras permiten distinguir entre diferentes géneros. Otro rasgo clave fue la presencia y morfología del diente en la zona cefálica.

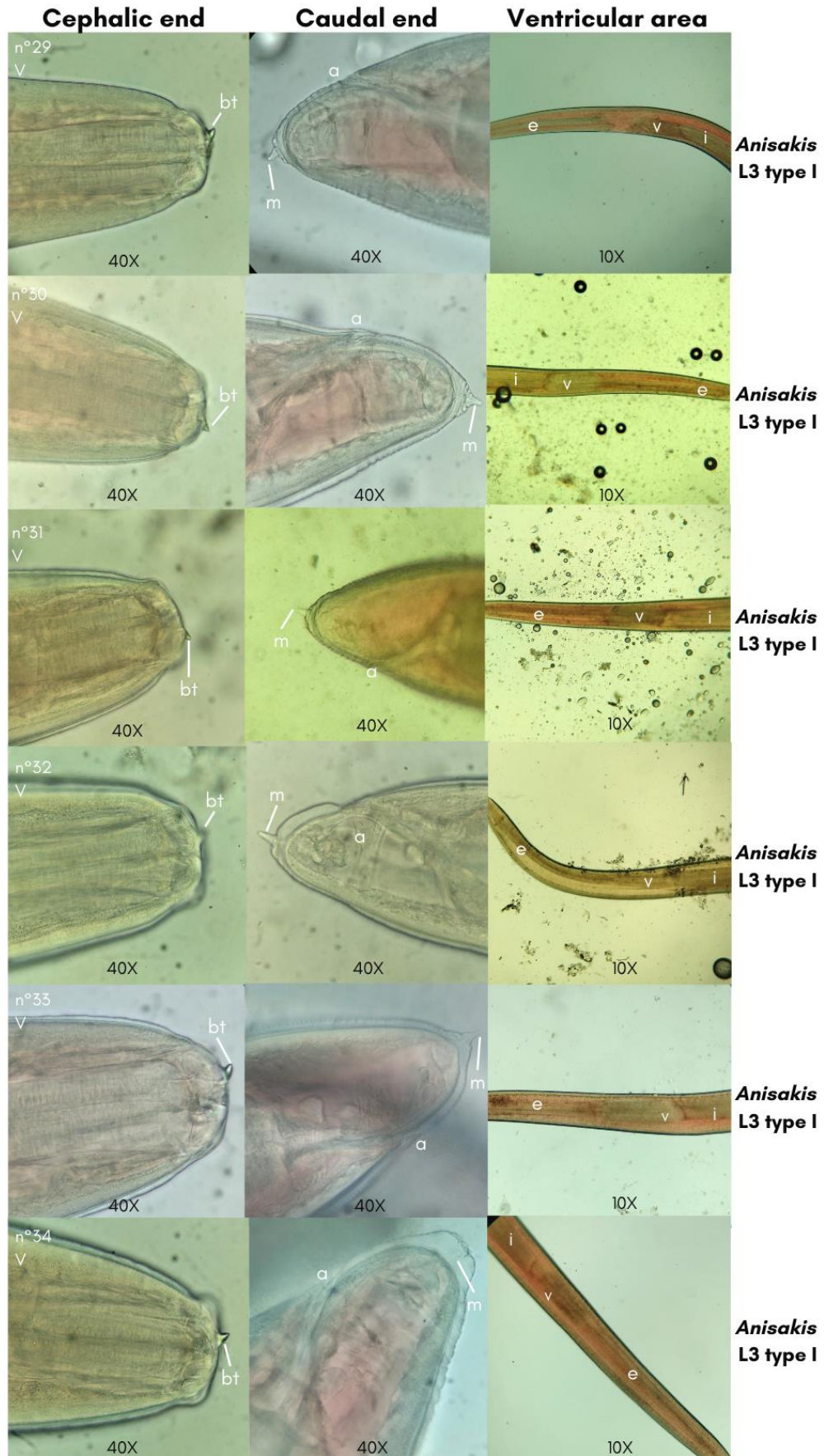
Ubicación	<i>Anisakis</i> L3-I	<i>Anisakis</i> L3-II	<i>Anisakis</i> L3-III	Total
V	35	8	1	45
M	5	1	0	6
Total	40	9	1	51

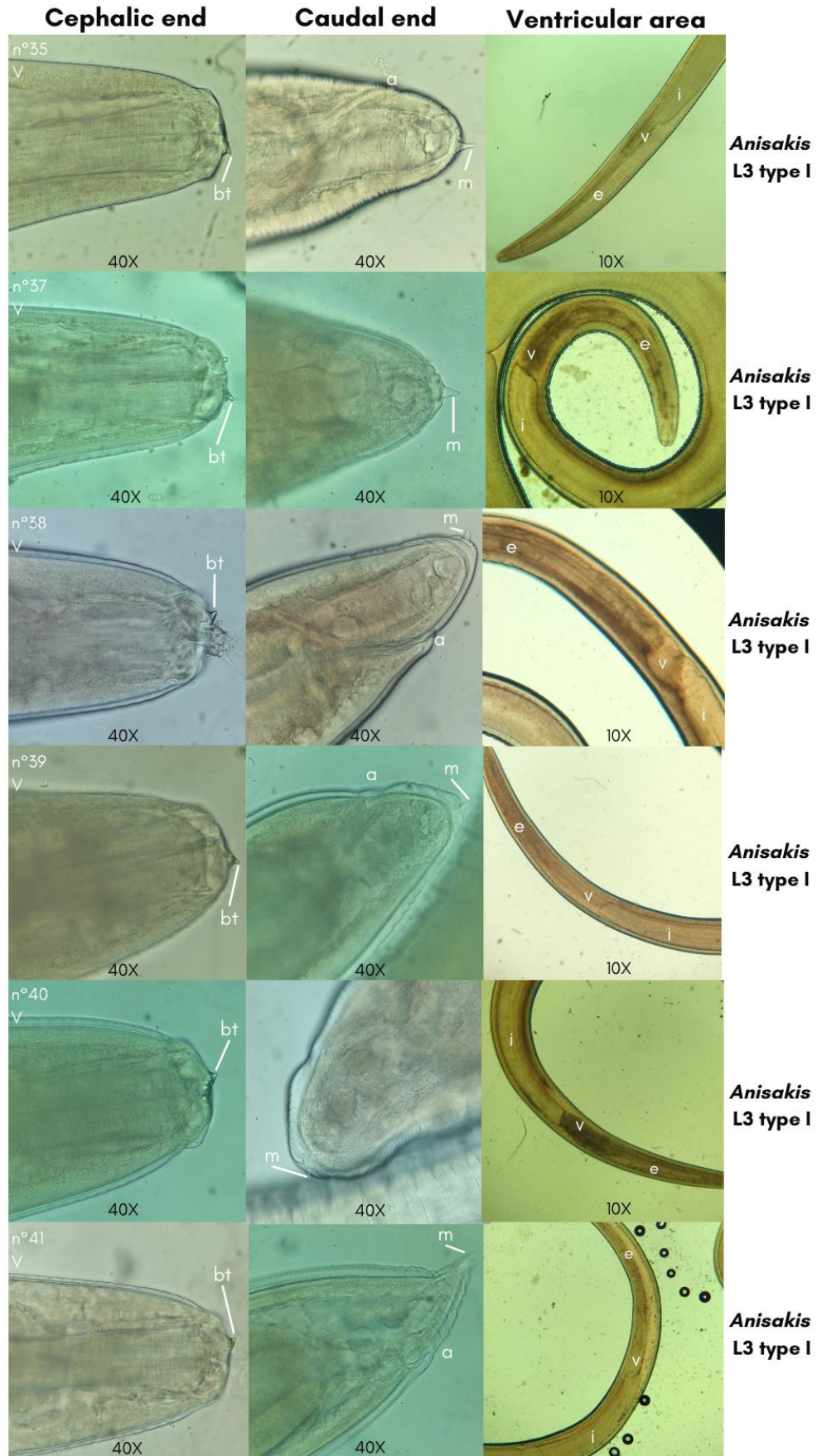
Tabla 1. Determinación del género según su morfología.

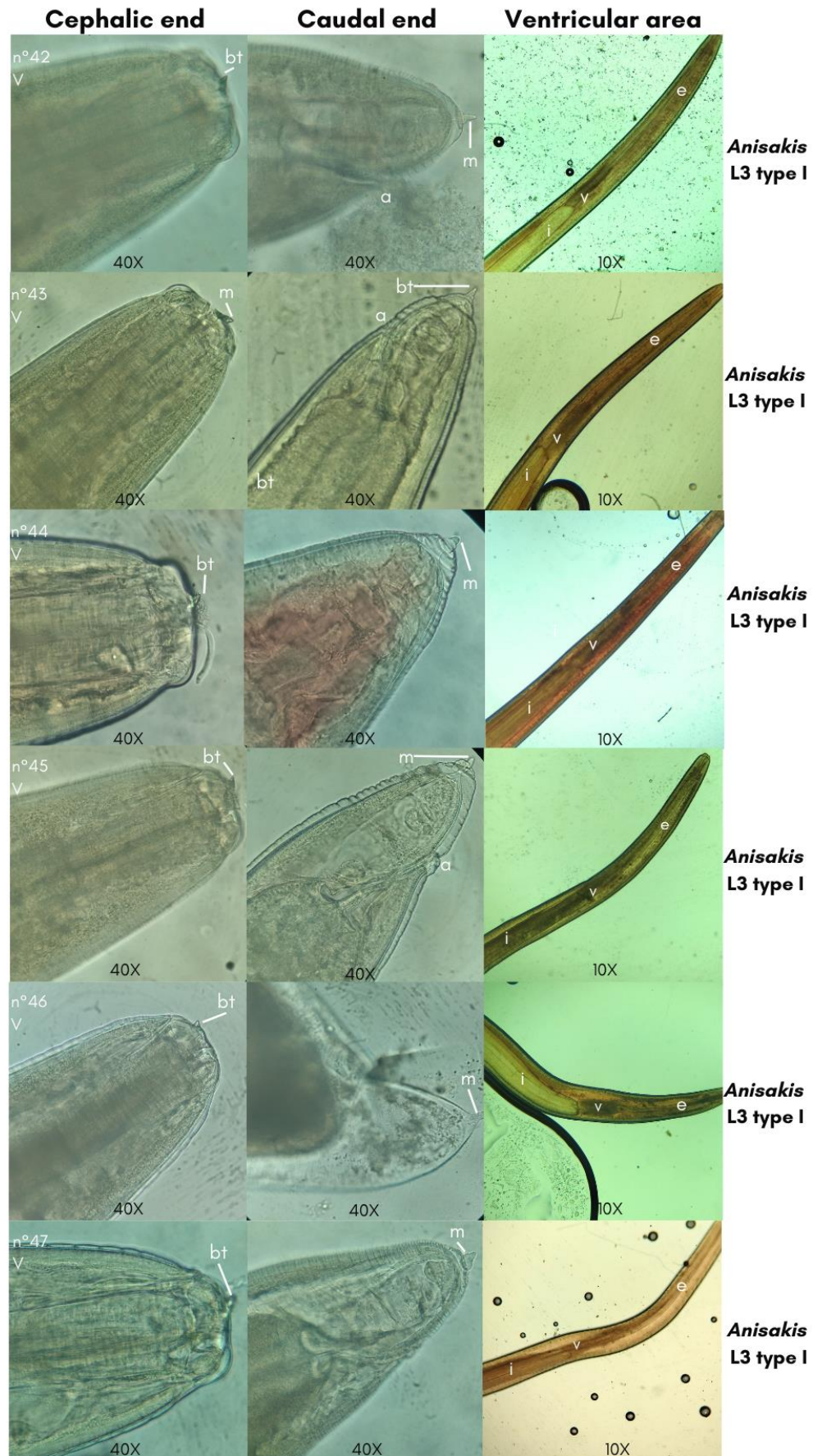














Figuras 3-9. Identificación morfológica. Cada uno de los 42 anisákidos fue colocado sobre un portaobjetos para ser observado en microscopio, en específico: la zona central para ver la forma y posición del ventrículo **(v)**, el esófago **(e)** e intestino **(i)**; la zona caudal para observar el mucrón **(m)**, que sobresale como una espina, así como el conducto que desemboca en el ano **(a)**; mientras que en la zona cefálica se podía identificar el diente, llamado en inglés “boring tooth” **(bt)**.

5.2 Identificación molecular

Se realizaron múltiples intentos de amplificación de ADN para el gen *cox-2* y el espaciador ITS-2 a partir de muestras de parásitos previamente identificados morfológicamente. De un total aproximado de 50 muestras, solo una presentó amplificación exitosa, con el espaciador ITS-2.

Con el objetivo de optimizar las condiciones de PCR, se aplicó un gradiente de temperaturas de alineamiento para esta única muestra, lográndose una amplificación óptima a 52,4 °C. El producto amplificado presentó una banda visible de aproximadamente 1000 pb al ser visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (ver Figura 4 en Anexos) por lo que corresponde al género *Anisakis*, coincidiendo con su identificación morfológica (muestra n°38). Los intentos de replicar esta amplificación en otras muestras, tanto para ITS-2 como para *cox-2*, no dieron resultados, a pesar de haber obtenido valores adecuados de concentración y pureza de ADN según mediciones en el equipo TECAN (NanoQuant Infinite M200Pro).

5.3 Análisis mediante MIR

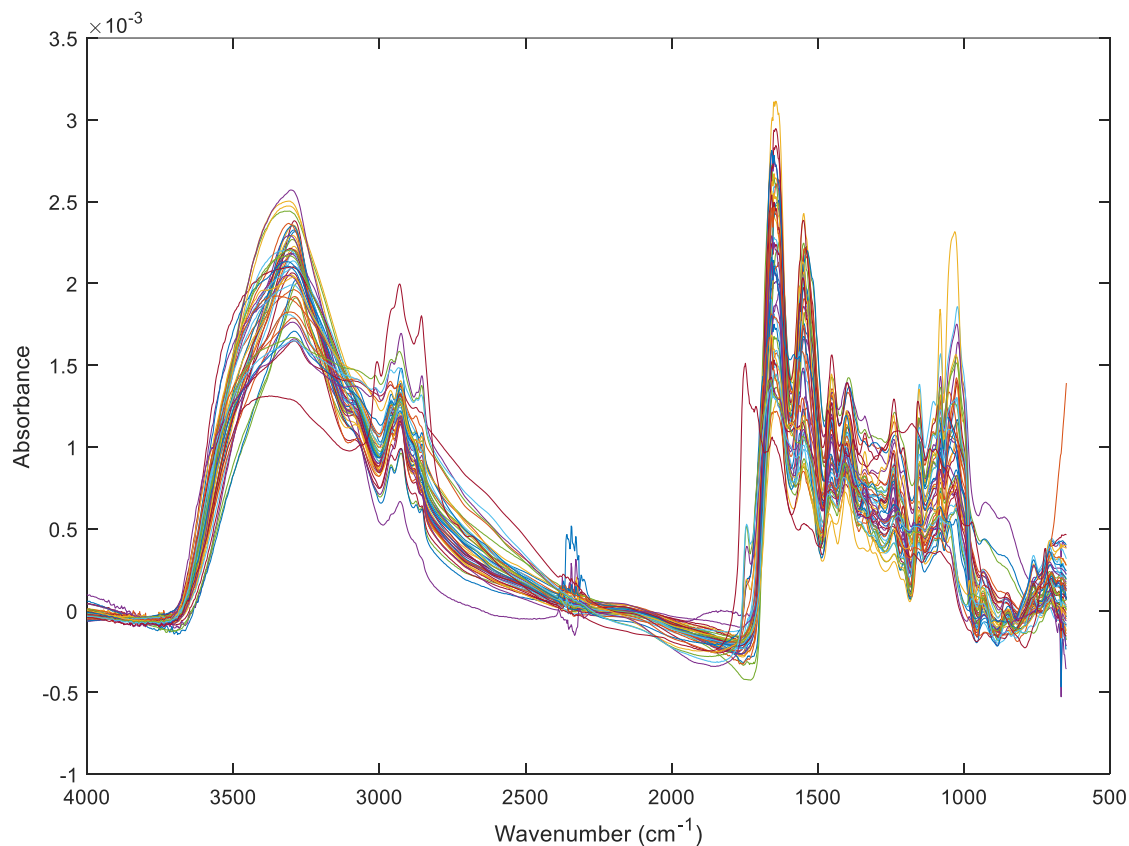


Figura 10: Espectros en infrarrojo medio (MIR) de muestras analizadas de *Anisakis* y de sus hospedadores (*Macrurus magellanicus*), procesados mediante corrección de línea base y normalización.

Se identificaron bandas de absorción en torno a los $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$, las cuales corresponden a vibraciones características de carbohidratos (Wang *et al.*, 1997). Destacan también las bandas entre ~ 1600 y $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$, asociadas a proteínas, específicamente a los grupos Amida I y Amida II, respectivamente. En la región cercana a los $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ se observaron señales atribuidas a carbohidratos solvatados o agua estructurada (Dovbeshko *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2009). Asimismo, se detectaron bandas alrededor de los 2800 y 2900 cm^{-1} ,

correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los grupos metilo y metileno presentes en lípidos y ácidos grasos (Dovbeshko *et al.*, 2000). Finalmente, la banda ubicada en $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ se atribuye principalmente a la vibración de los enlaces O-H de la molécula de agua, aunque en este rango también pueden encontrarse contribuciones de la banda Amida, correspondiente a proteínas (Dovbeshko *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2009).

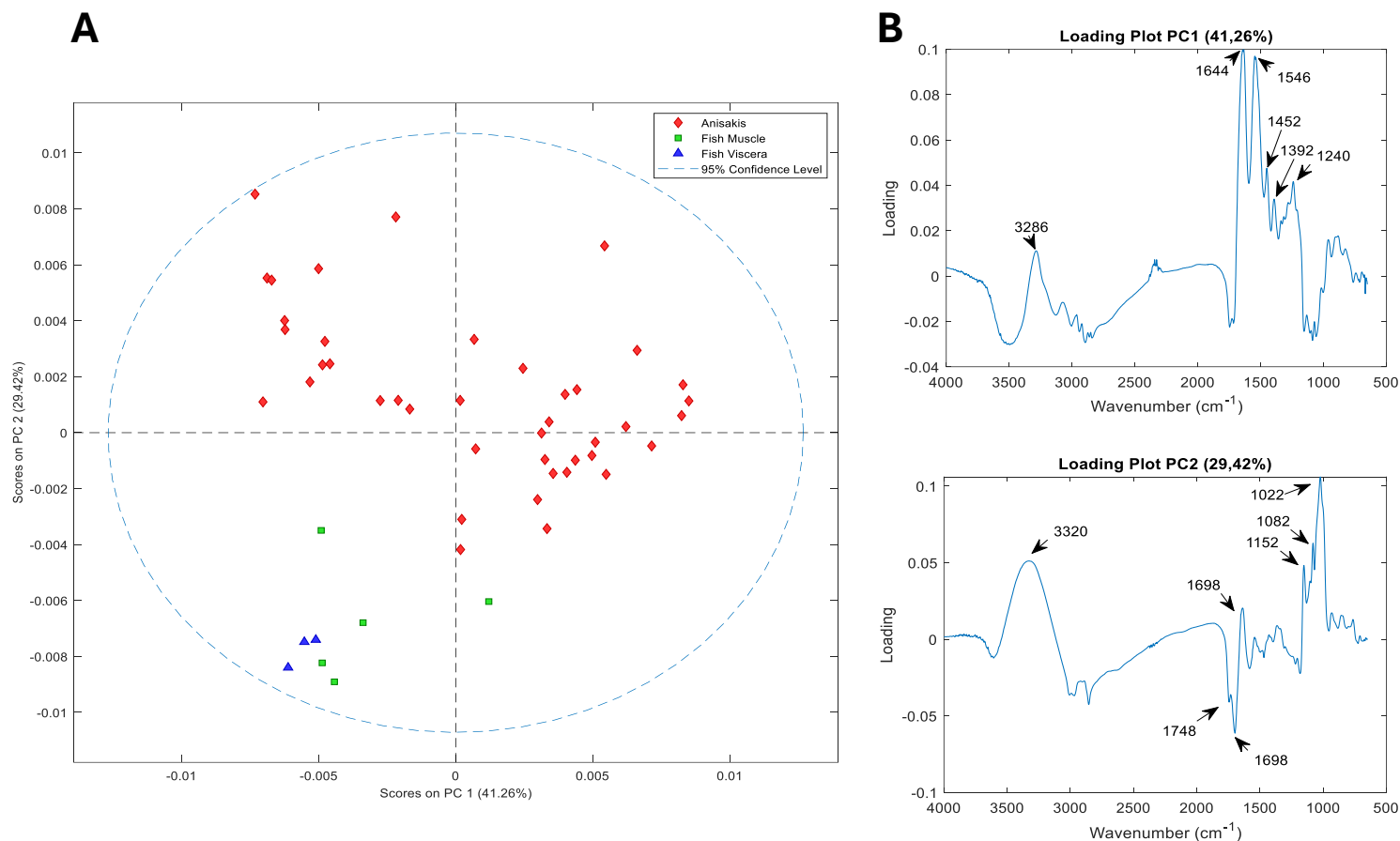


Figura 11: Gráfico de scores (A) y loadings (B) obtenidos a partir de un Análisis de Componentes Principales (PCA), aplicado a los espectros MIR de muestras de *Anisakis*, así como de músculo y vísceras de los hospedadores.

En la Figura 11A se muestra el gráfico de Scores, donde se observa la distribución de las muestras en el espacio bidimensional descrito por los Componentes Principales 1 y 2. Se observa una separación de las muestras de pescado (triángulos azules y cuadrados verdes) de las muestras de parásitos (rombos

rojos). Además, se observa una tendencia de separación en dos grupos de parásitos (rombos rojos). En, la Figura 11B se muestran los *Loadings* que contienen los patrones espectrales para los Componentes Principales 1 y 2. La banda ubicada alrededor de los 2900 cm^{-1} corresponde a lípidos, mientras que las bandas entre ~ 1500 y $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ se asocian a la vibración de enlaces carbonilo y amida, característicos de proteínas. La proporción relativa de lípidos y proteínas resulta crucial para la discriminación entre estos organismos.

6. Discusión

Del total de 50 merluzas (*Macruronus magellanicus*) disecadas, se identificaron morfológicamente 42 nemátodos pertenecientes a la familia Anisakidae. Solo 8 individuos de merluza fueron encontrados libres de anisákidos, sin embargo, estos presentaban infestación por céstodos, por debajo de la piel, branquias y ano. Este resultado podría estar influenciado por errores humanos en la revisión, especialmente durante los días posteriores a la congelación completa de los ejemplares, pese a que se inspeccionaron vísceras, contenido estomacal, hígado y musculatura.

Se observó que los parásitos se encontraban vivos únicamente durante el primer día de disección, cuando los peces aún estaban frescos. Su movilidad facilitaba la detección visual directa. Sin embargo, tras una semana de congelación a -20 °C, los parásitos ya no presentaban movimiento, lo que dificultó su identificación, particularmente en la musculatura. Este factor sugiere que la cantidad de parásitos en tejido muscular podría estar subestimada. En contraste, en las vísceras los parásitos se encontraron con mayor facilidad, ya que su concentración era visiblemente superior en esta región.

La observación de parásitos vivos incluso después de varias horas a -20 °C indica que se requiere un tiempo de al menos una semana para asegurar la inactivación completa por congelación. Esto refuerza la importancia de aplicar medidas preventivas, tal como lo establece la normativa sanitaria chilena. En particular, el Decreto 977 del Ministerio de Salud (13-MAY-1997), en su artículo 317, establece que “todos los pescados frescos y enfriados que se expenden o elaboran deben ser eviscerados tan pronto sean capturados, excepto algunas especies de talla reducida (sardinas, pejerreyes, anchovetas y otros)”, mientras que el artículo 318 indica que “el pescado fresco que no sea eviscerado inmediatamente después de su captura, sólo podrá comercializarse si ha sido sometido de inmediato a la congelación a temperatura de -18°C como

máxima medida en su centro térmico.” Dado que la merluza es una especie de mayor talla, y considerando que los parásitos pueden atravesar los tejidos hacia la musculatura mientras aún están vivos a bajas temperaturas, sería recomendable la evisceración inmediata posterior a la captura. Esta acción preventiva permitiría reducir significativamente el riesgo de migración parasitaria desde las vísceras hacia el músculo durante el proceso de enfriamiento.

Los espaciadores transcritos internos ITS I e ITS II de ADN ribosomal han sido usados para identificación de nemátodos, pero siendo probados para el género *Anisakis* primeramente por Podolska, M., & Chilton, N. B. (1998). A pesar de que la cuantificación y calidad del ADN extraído fueron adecuadas, la baja tasa de amplificación observada podría atribuirse a varios factores. La presencia de inhibidores podría haber interferido con la reacción de PCR. Además, la formación de dímeros de cebadores y la presencia de estructuras secundarias en el ADN molde pueden haber reducido la eficiencia de la amplificación, así como la presencia de las gruesas cutículas, característica propia de estos organismos, dificultan la lisis completa, liberando ADN fragmentado (D'Amelio *et al.*, 2000). Además, es importante considerar que, aunque la cantidad de ADN fue suficiente, la calidad del ADN también es crucial para una amplificación exitosa. La degradación del ADN o la presencia de contaminantes pueden afectar negativamente la eficiencia de la PCR. Para mejorar la tasa de amplificación en estudios futuros, se recomienda optimizar las condiciones de la reacción de PCR, utilizar polimerasas con actividad de corrección de errores y asegurar una purificación adecuada del ADN para eliminar posibles inhibidores.

Respecto a análisis en NIR, como fue propuesto en un comienzo, éstos no se muestran por no haber tenido resultados concluyentes, por lo que los resultados mostrados corresponden a MIR únicamente. Estos hallazgos coinciden, sin embargo, con los autores Cheng & Sun (2017), quienes reportaron que el NIR

convencional tiene limitaciones para detectar infecciones parasitarias en pescado no procesado. Esto da validez a la necesidad de usar MIR. La principal dificultad al trabajar con NIR fue el ruido espectral producido por efectos de dispersión de radiación, que suele ser frecuente en NIR, lo que produce no linealidades que requieren un extenso pre-tratamiento matemático para ser eliminadas antes de someterlo a los algoritmos de Machine Learning. El acotado tiempo que se tenía para realizar este trabajo dificultó encontrar la combinación adecuada de pretratamientos matemáticos de los espectros. En este escenario, cuando se requiere un tiempo más extenso para lograr un mayor procedimiento matemático, el uso de MIR resultó más conveniente. También es probable que la sensibilidad del instrumento no fuera óptima, ya que bandas claves, como de 960 nm (asociada a la quitina que recubre a estos parásitos) requieren de una alta resolución (Manley, M., 2014).

En el PCA, se observa una separación entre las muestras de pescado y las de parásitos. Esta separación se produce en la gráfica en sentido vertical (ver Figura 11^a). Puesto que el Componente Principal 2 (PC2) es el componente en la vertical, el *Loading* del componente 2 explica las razones químicas de esa tendencia (Ver Figura 11B, abajo). Se puede observar la presencia de bandas principalmente de carbohidratos en sentido positivo, así como algunas bandas asociadas a lípidos en sentido negativo. Esto puede interpretarse como que las diferencias en la composición general de estos dos compuestos químicos son las más contrastantes entre pescado y parásito. Por otro lado, en la Figura 11A se observa también una tendencia que separa dos grupos de parásitos, hacia la derecha e izquierda. Puesto que el PC1 se encuentra en la horizontal, el *Loading* de este compuesto (ver Figura 11B, arriba) muestra que este agrupamiento diferente se debe a bandas asociadas principalmente a proteínas, de manera que pudiese inferirse que existen perfiles proteicos variados, que separan diferentes poblaciones de parásitos, lo que pudiese asociarse a géneros o especies diferentes de la familia Anisakidae. Esta

heterogeneidad química pudiese ser explotada en estudios posteriores para identificar mediante espectroscopía de infrarrojo diferentes géneros o especies de anisákidos.

7. Conclusión

Se determinó que el espectro de infrarrojo medio (MIR), reflejo de la composición química, difiere claramente entre los parásitos anisákidos y sus hospedadores, lo que permitió obtener espectros distintivos para cada uno. Asimismo, dentro del grupo de parásitos se identificaron diferencias químicas que permitieron separar dos conjuntos diferenciados, evidenciando la utilidad potencial de la espectroscopía MIR para la discriminación taxonómica y funcional de estos organismos. En consecuencia, la hipótesis planteada se acepta parcialmente: fue posible diferenciar químicamente grupos de parásitos en función de sus patrones espectrales característicos; sin embargo, la correspondencia de estos grupos con categorías taxonómicas específicas (género o especie) requiere ser corroborada mediante análisis complementarios. Finalmente, la integración de técnicas morfológicas, espectrales y moleculares aporta un enfoque multidisciplinario valioso para la identificación y caracterización de parásitos en *Macruronus magellanicus*, contribuyendo al mejor control sanitario en recursos pesqueros y a la salud pública.

8. Referencias

1. Aco Alburquerque, R., Palomba, M., Santoro, M., & Mattiucci, S. (2020). Molecular identification of zoonotic parasites of the genus *Anisakis* (Nematoda: Anisakidae) from fish of the southeastern Pacific Ocean (Off Peru Coast). *Pathogens*, 9(11), 910.
2. Adroher-Auroux, F. J., & Benítez-Rodríguez, R. (2020). Anisakiasis and *Anisakis*: An underdiagnosed emerging disease and its main etiological agents. *Research in veterinary science*, 132, 535-545.
3. Aguilar-Marcelino, L., C. R. Bautista-Garfias, T. Zaheer, A. Maqsood, S. S. I. Bamarni, B. H. Abdullah, A. Z. Faruk, M. Salman, T. Akhtar and F. E. M. Silva (2022). "Potential of Anisakiasis in Foodborne Zoonosis." *Pakistan Veterinary Journal* **42**(4).
4. Aibinu, I. E., P. M. Smooker and A. L. Lopata (2019). "Anisakis nematodes in fish and shellfish-from infection to allergies." *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **9**: 384-393.
5. Audicana, M. a. T., I. J. Ansotegui, L. F. de Corres and M. W. Kennedy (2002). "Anisakis simplex: dangerous—dead and alive?" *Trends in parasitology* **18**(1): 20-25.
6. Berland, B. (1961). "Nematodes from some Norwegian marine fishes." *Sarsia* **2**(1): 1-50.
7. Castellanos-Garzón, J. A., L. F. Falla-Zúñiga, L. Salazar and M. C. Pustovrh-Ramos (2020). "Anisákidos y anisakidosis: generalidades y su actualidad en Colombia. Revisión bibliográfica." *Iatreia* **33**(2): 143-154.
8. Cheng, J. H., & Sun, D. W. (2017). Partial least squares regression (PLSR) applied to NIR and HSI spectral data modeling to predict chemical properties of fish muscle. *Food engineering reviews*, 9, 36-49.
9. Cheypanya, V., Wongsawad, P., Wongsawad, C., & Nantarat, N. (2021). Morphological study and molecular epidemiology of *Anisakis* larvae in mackerel fish. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 14(5), 214-222.
10. Dalal, N., Ofano, R., Ruggiero, L., Caporale, A. G., & Adamo, P. (2024). What the fish? Tracing the geographical origin of fish using NIR spectroscopy. *Current Research in Food Science*, 100789.
11. D'Amelio, S., Mathiopoulos, K. D., Santos, C. P., Pugachev, O. N., Webb, S. C., Picanço, M., & Paggi, L. (2000). Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology*, 30(2), 223-226.
12. D'Amelio, S., Bellini, I., Chiovoloni, C., Magliocco, C., Pronio, A., Di Rocco, A., ... & Cavallero, S. (2023). A case of gastroallergic and intestinal anisakiasis in

- Italy: Diagnosis based on double endoscopy and molecular identification. *Pathogens*, 12(9), 1172.
13. Del Carmen Rentería-Altamirano, M. M., & Díaz-Vélez, C. (2021). Anisakis, ¿es o no un problema de salud pública? *Iatreia*, 34(3), 191-193.
 14. Dovbeshko, G. I., Gridina, N. Y., Kruglova, E. B., & Pashchuk, O. P. (2000). FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. *Talanta*, 53(1), 233-246.
 15. Farjallah, S., Busi, M., Mahjoub, M. O., Slimane, B. B., Paggi, L., Said, K., & D'Amelio, S. (2008). Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitology International*, 57(4), 430-436.
 16. Falla-Zuñiga, F., L., J. Alejandra Castellanos-Garzón, L. Salazar and M. Carolina Pustovrh (2021). "Anisakis and anisakidosis: hosts and case reports in South America. Systematic review." Revista Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia 69(2).
 17. Fernández, I., P. Suarez, V. Madrid, A. Valenzuela, Á. Opazo and V. Campos (2022). "Anisakidosis en peces frescos comercializados en tres ciudades de la Región del Bío Bío, Chile." Revista chilena de infectología 39(5): 559-564.
 18. Godínez-González, C., Roca-Geronès, X., Cancino-Faure, B., Montoliu, I., & Fisa, R. (2017). Quantitative SYBR Green qPCR technique for the detection of the nematode parasite Anisakis in commercial fish-derived food. *International journal of food microbiology*, 261, 89-94.
 19. Hoshino, C. and M. Narita (2011). "Anisakis simplex-induced anaphylaxis." Journal of Infection and Chemotherapy 17(4): 544-546.
 20. Manley, M. (2014). Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: non-destructive analysis of biological materials. *Chemical Society Reviews*, 43(24), 8200-8214.
 21. Martín-Carrillo, N., García-Livia, K., Baz-González, E., Abreu-Acosta, N., Dorta-Guerra, R., Valladares, B., & Foronda, P. (2022). Morphological and molecular identification of Anisakis spp. (Nematoda: Anisakidae) in commercial fish from the Canary Islands coast (Spain): Epidemiological data. *Animals*, 12(19), 2634
 22. Mattiucci, S., Cipriani, P., Levsen, A., Paoletti, M., & Nascetti, G. (2018). Molecular epidemiology of Anisakis and anisakiasis: an ecological and evolutionary road map. *Advances in parasitology*, 99, 93-263
 23. Mostafa, N. A., Abdel-Ghaffar, F., Fayed, H. O., & Hassan, A. A. (2023). Morphological and molecular identification of third-stage larvae of Anisakis typica (Nematoda: Anisakidae) from Red Sea coral trout, Plectropomus areolatus. *Parasitology Research*, 122(3), 705-715.
 24. Leatherland, J. F. and P. T. K. Woo (2006). Fish diseases and disorders / edited by P.T.K. Woo.

25. Lee, S. Y., Yoon, K. A., Jang, S. H., Ganbold, E. O., Uriintuya, D., Shin, S. M., ... & Joo, S. W. (2009). Infrared spectroscopy characterization of normal and lung cancer cells originated from epithelium. *Journal of veterinary science*, 10(4), 299-304.
26. Liu, D., Zeng, X. A., & Sun, D. W. (2013). NIR spectroscopy and imaging techniques for evaluation of fish quality—a review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 48(8), 609-628.
27. Rosales, M., Mascaró, C., Fernandez, C., Luque, F., Sanchez Moreno, M., Parras, L., ... & Ramón Muñoz, J. (1999). Acute intestinal anisakiasis in Spain: a fourth-stage *Anisakis simplex* larva. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 823-826.
28. Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. H. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. Longman scientific and technical.
29. Pampiglione, S., F. Rivasi, M. Criscuolo, A. De Benedittis, A. Gentile, S. Russo, M. Testini and M. Villani (2002). "Human anisakiasis in Italy: a report of eleven new cases." *Pathology-Research and Practice* **198**(6): 429-434.
30. Perteguer, M. J., Ortiz, G., García, E., Flores, M., Rodríguez, E., Ubeira, F. M., & Gárate, T. (2004). Aplicación de la técnica PCR-RFLP en la identificación de nematodos implicados en la anisakiasis humana. *Medicina clínica*, 122(18), 686-689.
31. Pontone, M., M. Giovannini, S. Barni, F. Mori, E. Venturini, L. Galli, C. Valleriani, L. De las Vecillas, C. Sackesen and A. L. Lopata (2023). "IgE-mediated *Anisakis* allergy in children." *Allergologia et Immunopathologia* **51**: 98-109.
32. Quiazon, K. M. A., Yoshinaga, T., Ogawa, K., & Yukami, R. (2008). Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitology International*, 57(4), 483-489.
33. Rocha, B. A. d. (2017). Nir spectroscopy for non-destructive quality evaluation of fish.
34. Rosales, M., Mascaró, C., Fernandez, C., Luque, F., Sanchez Moreno, M., Parras, L., ... & Ramón Muñoz, J. (1999). Acute intestinal anisakiasis in Spain: a fourth-stage *Anisakis simplex* larva. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94, 823-826.
35. Seesao, Y., Audebert, C., Verrez-Bagnis, V., Merlin, S., Jerome, M., Viscogliosi, E., ... & Gay, M. (2014). Monitoring of four DNA extraction methods upstream of high-throughput sequencing of *Anisakidae* nematodes. *Journal of microbiological methods*, 102, 69-72.
36. Torres, P., S. Puga, L. Castillo, J. Lamilla and J. Miranda (2014). "Helmintos, myxozoos y microsporidios en músculos de peces comercializados frescos y

su importancia como riesgo potencial para la salud humana en la ciudad de Valdivia, Chile." Archivos de medicina veterinaria **46**(1): 83-92.

37. Umehara, A., Kawakami, Y., Matsui, T., Araki, J., & Uchida, A. (2006). Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitology international*, 55(4), 267-271.
38. Valentini, A., Mattiucci, S., Bondanelli, P., Webb, S. C., Mignucci-Giannone, A. A., Colom-Llavina, M. M., & Nascetti, G. (2006). Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox2* sequences, and comparison with allozyme data. *Journal of Parasitology*, 92(1), 156-166.
39. Wang, H. P., Wang, H. C., & Huang, Y. J. (1997). Microscopic FTIR studies of lung cancer cells in pleural fluid. *Science of the Total Environment*, 204(3), 283-287.
40. Zhu, X., Gasser, R. B., Podolska, M., & Chilton, N. B. (1998). Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 28(12), 1911-1921.

8. Anexo



Figura 1. Merluza de cola, *Macruronus magellanicus*, fresca y mantenida a -20°C para disección y extracción de parásitos.



Figura 2. Parásito visible a través de la piel de carne de pescado.



Figura 3. Múltiples parásitos en merluza de cola eviscerada, todos se encontraban en este espacio entre vísceras y musculatura, se ven sobre la vejiga natatoria.

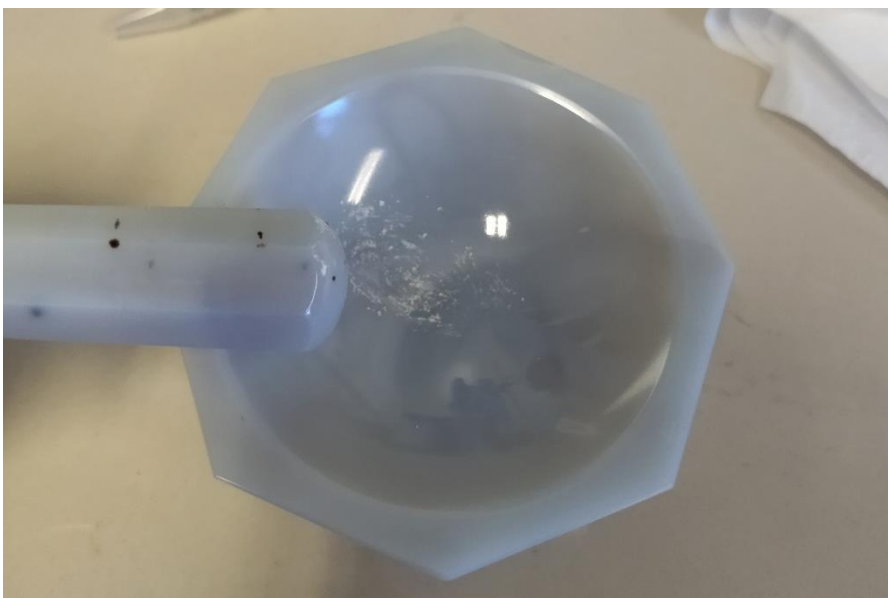


Figura 4. Molienda estandarizada de parásitos, posterior a la liofilización, antes de agregarse agua miliQ para terminar el procedimiento.

Muestra	[] ng/uL	Ratio
9	186,75	1,38
33	204,85	1,61
17	392,35	1,72
29	449,55	1,555
34	117	1,505
31	233,8	1,545
30	332,6	1,445
27	117,35	1,41
14	542,2	1,495
8	65,9	1,37
22	461,35	1,755
16	782	1,61
13	313,55	1,35
23	233,15	1,505
52	214,3	1,285
50	136,2	1,825
48	41,45	1,78
51	83,45	1,74
52	125,45	1,88
54	66,75	1,85
37	136,25	1,95
44	94,3	1,74
47	27,2	1,77
43	156	1,985
49	65,2	1,765
45	67,35	1,49
53	89,35	1,84
41	63,6	1,83
39	50,4	1,81
46	104,45	1,74
42	23,25	1,995
38	80,15	1,76
46	95,4	1,86

Tabla 2. Resultados obtenidos en TECAN de la concentración de ADN. Estos muestran una cantidad y calidad suficiente de ADN para continuar con el procedimiento de PCR y electroforesis.

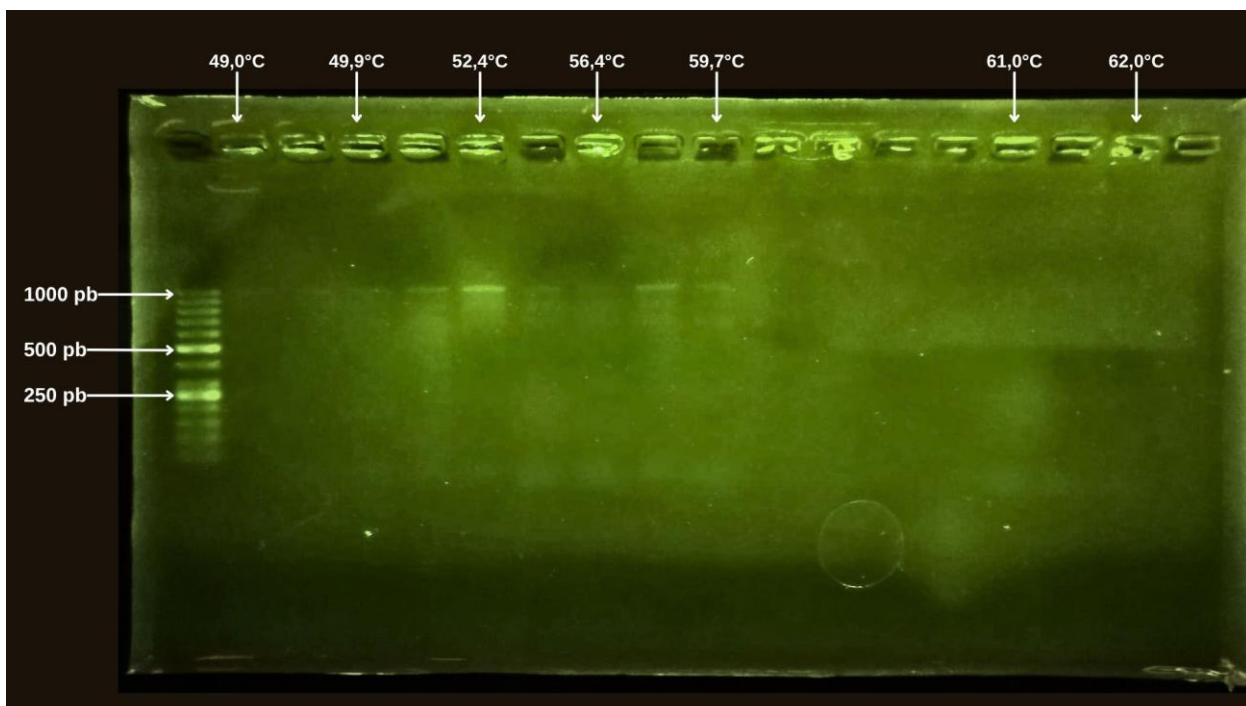


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa (1,5 %) de productos PCR del espaciador ITS-2 de *Anisakis*. Se muestra la única muestra que amplificó ADN exitosamente, analizada bajo un gradiente de temperaturas de alineamiento, donde se determinó que 52,4 °C fue la temperatura óptima para obtener un fragmento de aproximadamente 1000 pb. Las demás muestras no presentaron amplificación detectable bajo estas condiciones.