

ANITEST: un método de evaluación de la infectividad para una acuicultura libre de anisakis.



#### Obtención de larvas III de *Anisakis pegreffii* s.s.

Estas larvas se presentan en alta prevalencia e intensidad en la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) y por tanto se utilizará esta especie como pez modelo adecuado para la experimentación con *Anisakis* spp..

#### Creación de bloques de pescado y congelación

Se utilizarán moldes cúbicos de 24x24x24cm y realizados con mallas metálicas para la creación de bloques de peces mediante congelación parcial. En estos bloques distinguiremos la sección externa, expuesta de forma directa a la refrigeración y la sección interna definida como el centro del bloque. Posteriormente los bloques parcialmente congelados se colocaron en tres condiciones experimentales: cajas de poliespan, malla metálica y sin cobertura.

#### Análisis de los ejemplares

Tras 24 o 48 h se sacaron los bloques del congelador y se cortaron por la mitad con la ayuda de una sierra. Posteriormente, se extrajeron los anisakis con la ayuda de unas pinzas y se registró su ubicación en el bloque separándolos en placas individuales con solución salina (salinidad 9‰). En este punto, cinco ejemplares correspondientes a cada una de las condiciones experimentales se limpiaron y se fijaron en etanol al 70% para su observación en el microscopio electrónico de barrido.

#### Determinación de su viabilidad

Para conocer la viabilidad de los ejemplares de *Anisakis pegreffii* s.s. se utilizaron diferentes criterios:

- Aspecto y coloración: clara, blanquecina u oscura y amarillenta, presence of ventrículo blanquecino o transparente
- Movimiento: fluido y rápido, espasmódico y lento, sólo presenta respuesta a estímulo mecánico, sin movimiento
- Presencia de lesiones: presencia de lesiones macroscópicas y microscópicas

Se consideraron **ejemplares completamente viables** aquellos que presentaban una coloración clara con un ventrículo blanquecino bien contrastado, un movimiento fluido y rápido y no presentaban lesiones.

Se consideraron **ejemplares no viables** aquellos que presentaban una coloración oscura y un ventrículo transparente y no mostraban signos de vitalidad (ausencia de movimiento).

Se consideraron **parcialmente viables** aquellos ejemplares que a pesar de presentar buena coloración y movimientos parcialmente fluidos mostraban lesiones en la cutícula, ya que esto podría indicar un aumento en su vulnerabilidad.

ANITEST: un método de evaluación de la infectividad para una acuicultura libre de anisakis.



### Obtaining larvae III of *Anisakis pegreffii* s.s.

These larvae are found in high prevalence and intensity in blue whiting (*Micromesistius poutassou*) and therefore, this species stands out as a suitable model fish for experimentation with *Anisakis* spp..

### Creation of blocks and freezing of fish

Cubic moulds of 24x24x24cm constructed with metal mesh were used to package and partially freeze fish. Two sections were distinguishable in the blocks: the external, directly exposed to refrigeration, and the internal, defined as the center of the block. Subsequently, the partially frozen blocks were subject to three experimental conditions: polystyrene boxes, metal mesh and absence of cover.

### Analysis of the specimens

After 24 or 48 h, the blocks were removed from the freezer and cut in half with the aid of a saw. Subsequently, the anisakis were removed using a forceps, their location in the block was registered and specimens were isolated in individual plates with saline solution (salinity 9‰). At this point, five specimens corresponding to each experimental condition were cleaned and fixed in 70% ethanol for observation under the scanning electron microscope.

### Analysis of the viability

To know the viability of *Anisakis pegreffii* s.s. different criteria were used:

- a) Appearance and coloration: clear, whitish or dark and yellowish, presence of whitish or transparent ventricle
- b) Movement: fluid and fast, spasmodic and slow, only responding to mechanical stimuli, without movement
- c) Presence of lesions: presence of macroscopic and microscopic lesions
  - **Completely viable specimens** were those that presented a light coloration with a well-contrasted whitish ventricle, fluid and rapid movement, and no lesions.
  - **Non-viable specimens** were those that presented a dark coloration and a transparent ventricle and did not show signs of vitality (absence of movement).
  - Those specimens that despite presenting good coloration and partially fluid movements showed injuries on the cuticle were considered **partially viable**, since this may indicate an increase of their vulnerability.



**Tabla 1.** Supervivencia de *Anisakis pegreffii* sometido a congelación de pescado en bloques atendiendo al grado de recubrimiento del bloque y a la ubicación de los peces/anisakis en el interior del bloque.

CONDICIONES DE TRATAMIENTO			RESULTADOS	
TIEMPO DE CONGELACIÓN	RECUBRIMIENTO DEL BLOQUE	UBICACIÓN DE ANISAKIS	N ANISAKIS	SUPERVIVENCIA (%)
CONTROL 24h	COMPLETO	EXPUESTO	100	99
		INTERNO	100	100
	PARCIAL	EXPUESTO	100	98
		INTERNO	100	99
24 HORAS	COMPLETO	EXPUESTO	100	98
		INTERNO	100	90
	PARCIAL	EXPUESTO	100	0
		INTERNO	100	0
	NO	EXPUESTO	100	78
		INTERNO	100	90
48 HORAS	COMPLETO	EXPUESTO	100	0
		INTERNO	100	21
	PARCIAL	EXPUESTO	100	0
		INTERNO	100	1
	NO	EXPUESTO	100	8
		INTERNO	100	7

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA



CONDICIONES DE TRATAMIENTO			RESULTADOS	
TIEMPO DE CONGELACIÓN	RECUBRIMIENTO DEL BLOQUE	UBICACIÓN DE ANISAKIS	N ANISAKIS	SUPERVIVENCIA (%)
CONTROL 24h	COMPLETO	EXPUESTO	100	99
		INTERNO	100	100
	PARCIAL	EXPUESTO	100	98
		INTERNO	100	99
24 HORAS	COMPLETO	EXPUESTO	100	95
		INTERNO	100	90
	PARCIAL	EXPUESTO	100	20
		INTERNO	100	31
	NO	EXPUESTO	100	14
		INTERNO	100	12
48 HORAS	COMPLETO	EXPUESTO	100	17
		INTERNO	100	21
	PARCIAL	EXPUESTO	100	2
		INTERNO	100	1
	NO	EXPUESTO	100	1
		INTERNO	100	2

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

ANITEST: un método de evaluación de la infectividad para una acuicultura libre de anisakis.



CONDICIONES DE TRATAMIENTO			RESULTADOS		LESIONES
TIEMPO DE CONGELACIÓN	RECUBRIMIENTO DEL BLOQUE	UBICACIÓN DE ANISAKIS	N ANISAKIS	SUPERVIVENCIA (%)	PRESENCIA Macroscópica o microscop
CONTROL 24h	COMPLETO	EXPUESTO	100	99	no
		INTERNO	100	100	no
	PARCIAL	EXPUESTO	100	98	no
		INTERNO	100	99	no
24 HORAS	COMPLETO	EXPUESTO	100	95	no
		INTERNO	100	90	no
	PARCIAL	EXPUESTO	100	20	no
		INTERNO	100	31	no
	NO	EXPUESTO	100	14	no
		INTERNO	100	12	no
48 HORAS	COMPLETO	EXPUESTO	100	17	no
		INTERNO	100	21	no
	PARCIAL	EXPUESTO	100	2	no
		INTERNO	100	1	no
	NO	EXPUESTO	100	1	no
		INTERNO	100	2	no

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA