

Identificación molecular de *Contraecum rudolphii* (Nematoda: Anisakidae) en peces de importancia comercial de tres localidades en Nuevo León, México.

A.C. González-Morales*¹, Z.J. Molina-Garza¹, L. Galaviz-Silva¹, A.K. Olvera-Leal¹ y J.A. Delgado-Garduño¹.

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Patología Molecular y Experimental, Departamento de Zoología de Invertebrados No Artrópoda. Ave Universidad s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 66455. San Nicolás De los Garza, Nuevo León, México.

*acgm_92@hotmail.com

RESUMEN

Los anisákidos son parásitos nematodos de la familia Anisakidae cuyo ciclo biológico se desarrolla en hospedadores acuáticos. La anisakidosis humana es causada por la ingesta de pescado crudo o insuficientemente cocido infectado con larvas de tercer estadio (L3) de los géneros Anisakis, *Pseudoterranova*, *Contraecum* e *Hysterothylacium*. Por lo tanto, el diagnóstico molecular constituye una herramienta muy útil para la identificación definitiva de estos parásitos. Actualmente se han descrito diversas entidades genéticamente aisladas dentro del género *Contraecum sensu lato*, la distribución y ecología de este grupo sigue siendo un desafío en el país. En la presente investigación se ha recopilado información basada en datos de secuencias de ADN registradas anteriormente en el Gen Bank sobre la identificación de la especie *C. rudolphii* en organismos acuáticos *Micropterus salmoides* e *Ictalurus punctatus*. Estos datos corroboran la presencia de *C. rudolphii* en peces que habitan cuerpos de agua dulce salobre, dentro de tres sitios diferentes del Estado de Nuevo León, México.

Palabras clave: Parásitos, zoonosis, contraecosis, organismos acuáticos, detección, hospedero accidental.

ABSTRACT

The anisakids as nematode parasites of the Anisakidae family whose life cycle takes place in aquatic hosts. Human anisakidosis is caused by the ingestion of raw or undercooked fish infected with third-stage larvae (L3) of the genera Anisakis, *Pseudoterranova*, *Contraecum*, and *Hysterothylacium*. Therefore, molecular diagnosis is a very useful tool for the definitive identification of these parasites. Currently, several genetically isolated entities have been described within the genus *Contraecum sensu lato*, the distribution and ecology of this group continues to be a challenge in the country. In the present investigation, information has been compiled based on data from DNA sequences previously registered in the Gen Bank on the identification of the species *C. rudolphii* in aquatic organisms *Micropterus salmoides* and *Ictalurus punctatus*. These data corroborate the presence of *C. rudolphii* in fish that inhabit brackish freshwater bodies, within three different sites in the State of Nuevo León, Mexico.

Keywords: Parasites, zoonoses, contraecosis, aquatic organisms, detection, accidental host.

INTRODUCCIÓN

México es un país importante a escala mundial por su riqueza pesquera, ya que cuenta con una extensión considerable de litoral, lagunas salobres, esteros y mantos acuíferos continentales. Actualmente se conocen en México un total de 2,763 especies, lo que representa un 9.8% de las especies de peces conocidas en el mundo, tanto marinas como dulceacuícolas. Las especies mexicanas están comprendidas en 53 órdenes de los 62 reconocidos para todo el mundo, lo que implica que un 85% de la diversidad mundial está representada en el país. Además, en nuestro territorio se encuentran 265 familias y 967 géneros de un total de 515 (51.4%) y 4,494 (21.5%), respectivamente (Nelson *et al.*, 2006). En la zona marina y estuarina se han detectado hasta el momento poco más de 2,100 especies de peces tanto para el Pacífico mexicano como para las áreas del golfo de México y el Caribe (Espinoza-Pérez, 2014).

Ecológicamente los parásitos son una parte esencial de la comunidad acuática y la mayoría de los individuos de las poblaciones de peces silvestres o en cultivo, están infectados con uno o más parásitos (Al-Zubaidy, 2009).

Los nemátodos de la familia Anisakidae son parásitos de cuerpo no segmentado, cilíndrico, alargado, ligeramente afilado en los extremos, aproximadamente de unos 3 cm de longitud, menos de 1 mm de diámetro y de color blanquecino; constituido por los géneros *Anisakis*, *Hysterothylacium*, *Pseudoterranova* y *Contracaecum*. Los cuales son de importancia económica por encontrarse en especies de pescado de consumo y su localización geográfica es prácticamente global. Ocasionalmente se han hallado larvas en peces de aguas dulces. El primer caso de anisakiosis humana se describió en Holanda en 1955 y desde entonces se han documentado casos en todo el mundo (Arenal-Vera *et al.*, 1991).

Las larvas de *A. simplex* y *P. decipiens* se localizan preferentemente en el estómago, sin embargo, hasta 30-40% de los casos de infección por *A. simplex*, se localiza también en el intestino. Tradicionalmente la anisakiosis humana se ha dividido en anisakiosis gástrica y anisakiosis intestinal dependiendo de la zona afectada del aparato digestivo. La anisakiosis gástrica se caracteriza por dolor de estómago, náuseas y vómitos que aparecen a las pocas horas de ingerir pescado crudo parasitado. Si no se diagnostica correctamente los síntomas pueden permanecer desde varias semanas hasta dos años. En la anisakiosis intestinal, los síntomas (dolor abdominal, náuseas y vómitos) aparecen aproximadamente a los siete días de la ingestión del pescado parasitado. Las lesiones de la anisakiosis humana se han clasificado en cinco tipos: respuesta a un cuerpo extraño, reacción flemonosa, lesión tipo absceso, lesión absceso-granulomatosa y lesión granulomatosa (Fernández de Corres *et al.*, 1996; Degese, 2015).

En varios estados de México se ha encontrado al género *Contracaecum*, al parasitar una gran variedad de hospederos, incluyendo diversas especies de peces (Juárez-Arroyo, 1986; Juárez-Arroyo & Salgado-Maldonado, 1987; Meléndez & Rosas, 1995; Mendoza *et al.*, 1996; Pérez-Ponce de León *et al.*, 1996; Castillo-Sánchez *et al.*, 1998; Mendoza-Pamero *et al.*, 2007; Perez-Talamantes, 2008).

El parasitismo es fundamentalmente una asociación ecológica, que puede definirse como una relación entre dos organismos (hospedador y parásito) en la que el parásito es dependiente metabólicamente de su hospedador (Mehlhorn & Piekarski, 1998). Esta forma de vida representa más de la mitad de toda la diversidad animal, lo que se debe en gran parte a la especificidad de cada parásito frente a cada hospedador (Tompkins & Clayton, 1999). Los peces de cultivo no se escapan de estas relaciones, las altas densidades, las condiciones ecológicas simplificadas y los reducidos tiempos de residencia,

favorecen la transmisión de parásitos que infectan directamente al hospedador (Bakke & Harris, 1998).

Los estudios de *Contracaecum* en el estado de Nuevo León a nivel molecular son escasos y no se tiene un registro de estas especies para poder identificar y hacer comparaciones con las especies presentes y así, determinar si son endémicas o exóticas traídas de otras granjas acuícolas de los estados vecinos de Nuevo León. Por lo que, el presente estudio pretende ser una contribución en la identificación de la especie de *Contracaecum rudolphii* en estadio temprano de larva con el mínimo de muestra, mediante técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El presente estudio se realizó en dos presas y una laguna del Estado de Nuevo León, México (Fig. 1).

La Presa El Cuchillo-Solidaridad se localiza en el municipio de China, N.L., a 110 Km, al Noreste de Monterrey, en las coordenadas geográficas 25° 38' Latitud Norte y 99° 14' Longitud Oeste.

La Presa Rodrigo Gómez (La Boca) se localiza en Santiago N.L., ubicada aproximadamente a 30Km al Oriente de Linares, en las coordenadas 25°24' Latitud Norte y 100° 10' Longitud Oeste.

La laguna artificial de Ciudad Deportiva está ubicada en Monterrey N.L., en la Av. Churubusco entre las calles Ing. Francisco Beltrán y Jesús M. Garza en las coordenadas 25° 41' 19" al Noreste y 100° 16' 15" al Oeste (CONAGUA, 2013).

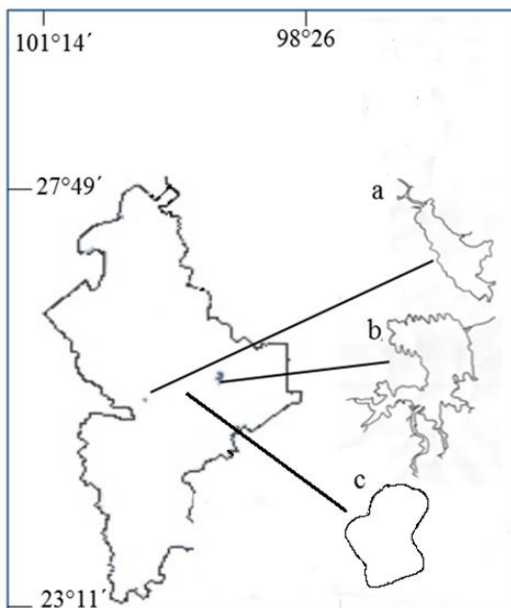


Figura 1. Ubicación de presas muestreadas en el Estado de Nuevo León, México. a. Presa Rodrigo Gómez (La Boca), b. Presa El Cuchillo-Solidaridad y c. Laguna artificial de Ciudad Deportiva.

Colecta de organismos

En las localidades de estudio se obtuvieron peces de la especie *Micropterus salmoides* e *Ictalurus punctatus* que son capturados por pescadores locales del mes de agosto a septiembre del 2019. Éstos se mantuvieron en acuarios conectados con aireadores para poder ser trasladados a UANL-FCB en el laboratorio de Patología Molecular y Experimental ubicado entre 80 y 267 km de la localidades y analizados para realizar los estudios correspondientes.

Técnica de Disección

Las técnicas utilizadas para disección fueron las descritas por Hoffman (1967), Conroy y Armas de Conroy, (1987) y Thoesen (1994). Galaviz *et al.* (2012) para el procesamiento de los parásitos. A los pescados se les practicó una incisión transversal ventral con unas tijeras de punta roma para no dañar los órganos internos, los cuales se colocaron en solución salina al 0.65%. Después se abrieron con agujas de disección con ayuda de un estereoscopio marca Leica EZ4D para buscar los nematodos que se encuentren en la luz del intestino, estómago y ciegos intestinales. Estos nematodos se colocaron en alcohol etílico 70% para su conservación y extracción de ADN.

Extracción del ADN

Para la extracción de ADN, la cual se realizó mediante el protocolo del DNAzol® (Molecular Research Center, Inc 2001) de la siguiente manera: las muestras y DNAzol se pusieron en un tubo en tubos Eppendorf de 1,5 ml en una proporción de 200ml y 800ml respectivamente. Se incubaron durante 24 horas a 4 °C. A continuación, se añadió etanol absoluto frío al sobrenadante en una proporción de 1:1, se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante; después de esto, se realizaron dos lavados más con 300 µl de etanol frío al 70%, se dejó secar el exceso de alcohol del tubo a temperatura ambiente durante 15 min, se agregaron 100 µl de agua libre de nucleasas y se cuantificó el extracto de ADN con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se almacenó a - 20 ° C (Galaviz-Silva *et al.*, 2013).

Técnica de PCR punto final

La amplificación de la región ITS1 se llevó a cabo utilizando los primers reportados por Shamsi *et al.* (2009) SS1 (Forward; 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGCG-3') y NC13R (Reverse: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT-3') y la región ITS-2 SS2 (Forward; 5'-TTGCAGACACATTGAGCACT-3') y NC2 (Reverse: 5'-TTAGTTTCTTTTCCCTCCGCT-3'). Para la reacción de PCR punto final, se utilizó el Kit de BIOLASE DNA Polymerase (BIOLINE) con sus concentraciones correspondientes: [10 mM] 10X NH4 Buffer, [3 mM] MgCl2, [250µM] dNTP MIX, 2 µ de muestra, [50 pmol] de cada iniciador (NC2, NC5) y 2U Taq polimerasa para una reacción final de 50 µl y un termociclador (Labnet) con las siguientes condiciones: después de una desnaturalización inicial de 95°C por 10 min. seguirán 35 ciclos de 95°C por 30 seg (desnaturalización), 52° por 30 seg (alineamiento), 72° por 1.15 min (extensión) y una extensión final de 72° por 7 min. Se tomó una muestra de 2 µl de ADN de la reacción de PCR y se sometió a corrimiento en gel al 1% de agarosa-TBE, con 1 µl de bromuro de etidio para su revelado en la cámara de luz UV. El medio de la cámara de electroforesis fue el buffer de TBE al 0.5%, el cual se corrió con un voltaje de 120 V, 250 mA por un tiempo de 50 min.

Secuenciación de ADN con el método de Sanger

Para la secuenciación del ADN, se utilizó el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing de Applied Biosystems (AB), el cual utiliza didesoxinucleótidos (ddNTPs) (terminadores) marcados con fluorocromos. Los fragmentos de DNA sintetizados y marcados son separados por tamaño mediante electroforesis capilar en un secuenciador de AB. La secuenciación de los productos de PCR se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, a cargo de la Dra. Laura Ongay.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron parásitos de diferentes peces *Micropterus salmoides* e *Ictalurus punctatus*, los cuales se observaron al estereoscopio y microscopio, se identificaron morfológicamente pertenecientes al género *Contracaecum* (Fig. 2).

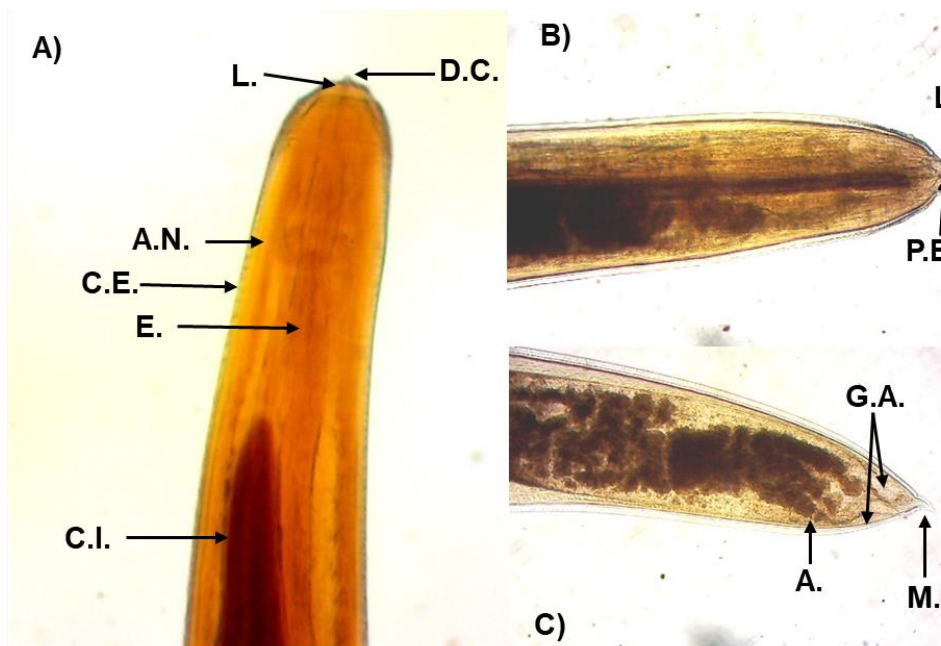


Figura 2. A-B) Parte anterior de un ejemplar de *Contracaecum* spp. aislado en *Micropterus salmoides*, señalando el diente cuticular (D.C.), labios (L.), poro excretor (P.E.), anillo nervioso (A.N.), cutícula estriada (C.E.), esófago (E.), ciego intestinal (C.I.) y C) parte posterior, donde se señalan las glándulas anexas (G.A.), el ano (A.) y mucrón (M.) (10X).

El producto de la amplificación de la región ITS de las larvas colectadas se muestra en la Figura 3. Las secuencias que se obtuvieron variaron entre los 408 pb a los 477 pb, mostrando una identidad nucleotídica de un 88-92% con una muestra del género *Contracaecum rudolphii* (Genbank FJ467620.1), de acuerdo con el análisis del algoritmo BLAST.

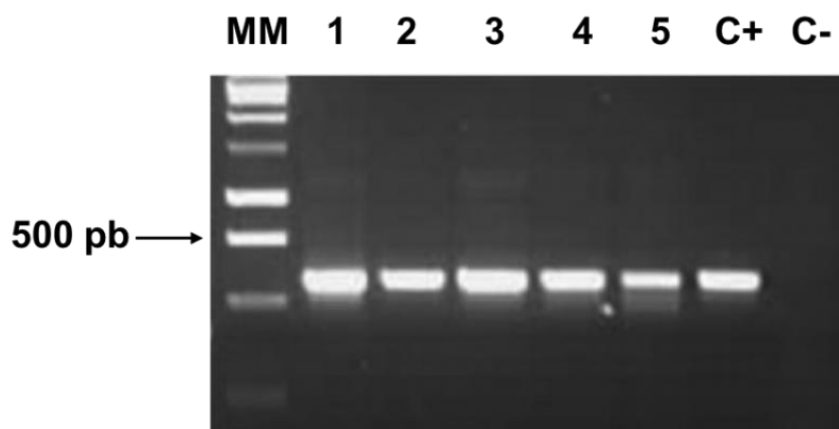


Figura 3. Fragmento ADN mitocondrial ITS. (MM) Marcador molecular (100 pb), (1–5) Larvas L3 colectadas, (C+) control positivo, (C-) Control negativo.

Se realizó la comparación del tamaño de las bandas de amplificación de las regiones conservadas (ITS) de las larvas y su respectiva secuenciación para generar tablas de comparación de especies. Las secuencias fueron obtenidas del Gen Bank de especies de *Contracaecum* descritas con anterioridad.

Tabla 1. Especies comparadas y sus respectivas claves GenBank.

Especie	Clave GenBank
<i>Contracaecum rudolphii</i>	FJ589791.1
<i>Contracaecum spp.</i>	AY821752.1
<i>Contracaecum rudolphii</i>	FJ467620.1
<i>Contracaecum rudolphii</i>	FJ467619.1
<i>Contracaecum bioccai</i>	JF424598.1

Se secuenciaron las bandas y se obtuvo las secuencias correspondientes a las muestras y se llevaron al programa Blast para generar secuencias con un orden de 5' a 3' identificándose como *Contracaecum rudolphii* (Nematoda: Anisakidae).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

gi|269996981|gb|F3589792.1| .....ATCGAGCTAAACCAAAAAGT 20
gi|269996980|gb|F3589791.1| .....ATCGAGCTAAACCAAAAAGT 20
gi|56714152|gb|AY821752.1| TTTCTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTCGAGCTAAACCAAAAAGT 50
gi|237856642|gb|F3467620.1| .....ATCGAGCTAAACCAAAAAGT 20
gi|237856641|gb|F3467619.1| .....ATCGAGCTAAACCAAAAAGT 20
gi|331686770|gb|JF424598.1| .....TAGT 4
6_NC5.ab1 .....
7_NC51.ab1 .....

gi|269996981|gb|F3589792.1| CTCCCTACGTGCATAAATTCACATTTGCGCGTAATCGTGAGCCATGCAGCG 70
gi|269996980|gb|F3589791.1| CTCCCTACGTGCATAAATTCACATTTGCGCGTAATCGTGAGCCATGCAGCG 70
gi|56714152|gb|AY821752.1| CTCCCTACGTGCATAAATTCACATTTGCGCGTAATCGTGAGCCATGCAGCG 100
gi|237856642|gb|F3467620.1| CTCCCTACGTGCATAAATTCACATTTGCGCGTAATCGTGAGCCATGCAGCG 70
gi|237856641|gb|F3467619.1| CTCCCTACGTGCATAAATTCACATTTGCGCGTAATCGTGAGCCATGCAGCG 70
gi|331686770|gb|JF424598.1| CTCCCTACGTGCATAAATTCACATTTGCGCGTAATCGTGAGCCATGCAGCG 54
6_NC5.ab1 .....TTGCACTACTTCCATTTGCGAGTGCTCGTGAGCCATGCAGTA 42
7_NC51.ab1 -TCCGTACTTGCACTACTTCCATTTGCGAGTGCTCGTGAGCCATGCAGTA 49
*****.....**.....

gi|269996981|gb|F3589792.1| AGTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTGGCTGTTTTTCATTGG-CTGAC 119
gi|269996980|gb|F3589791.1| AGTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTGGCTGTTTTTCATTGG-CTGAC 119
gi|56714152|gb|AY821752.1| AGTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTGGCTGTTTTTCATTGG-CTGAC 148
gi|237856642|gb|F3467620.1| AGTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTGGCTGTTTTTCATTGG-CTGAC 119
gi|237856641|gb|F3467619.1| AGTCATACACATGTGGTGGCAGCCGTGGCTGTTTTTCATTGG-CTGAC 119
gi|331686770|gb|JF424598.1| AGCCATACACATGTGGTGGCAGCCGTGGCTGTTTTTCATTGG-CTGAC 103
6_NC5.ab1 GAGCACGCACATGTGGTGGCAGCCGTGGCTGTTGCTTGGTGGCGGAC 92
7_NC51.ab1 GAGCACGCACATGTGGTGGCAGCCGTGGCTGTTGCTTAGTTGG-CGAAC 98
..**.....*****.....*****.....**.....

gi|269996981|gb|F3589792.1| AATGGCTATGGCTTGC.TGTGTGTGGAGGGGAAGTGAAGTATCCGATATG 169
gi|269996980|gb|F3589791.1| AATGGCTATGGCTTGC.TGTGTGTGGAGGGGAAGTGAAGTATCCGATATG 169
gi|56714152|gb|AY821752.1| AATGGCTATGGCTTGC.TGTGTGTGGAGGGGAAGTGAAGTATCCGATATG 199
gi|237856642|gb|F3467620.1| AATGGCTATGGCTTGC.TGTGTGTGGAGGGGAAGTGAAGTATCCGATATG 169
gi|237856641|gb|F3467619.1| AATGGCTATGGCTTGC.TGTGTGTGGAGGGGAAGTGAAGTATCCGATATG 169
gi|331686770|gb|JF424598.1| AATGGCTACTTGTGTCATGTTGAGGGGAAGTGAAGTATCCGATATG 153
6_NC5.ab1 AATGGCTACTTGTGTCATGTTGAGGGGAAGTGAAGTATCCGATATG 142
7_NC51.ab1 AATGGCTACTTGTGTCATGTTGAGGGGAAGTGAAGTATCCGATATG 148
*****.....**.....*****.....*****.....**.....
    
```

Figura 4. Alineación de secuencias de ADN ribosómico regiones ITS (408 pb) de *C. rudolphii*.

Los resultados de las secuencias de los ejemplares analizados para este trabajo fueron depositados en el banco de genes del NCBI bajo el número de acceso: NCBI GU265865.1 GI: 283971005 “*Contraecum rudolphii* clone rancho El Coronel small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence” 408 bp linear DNA.

Estos resultados nos indican que nuestras larvas pertenecen a la especie de *Contraecum rudolphii* después de hacer una comparación en la base de datos del GenBank mediante Blast de nucleótidos.

Los análisis de PCR en estos tipos de estudios son hechos cuando la especie ya está en fase adulta y ha sido identificada morfológicamente, gracias a este estudio, se recomienda que se utilice como base para futuras investigaciones en diversas especies de hospederos y determinar más fácilmente que tipo de larva está presente e intentar brindar un diagnóstico certero y tratamiento temprano.

Los dendogramas nos indican que las secuencias de los ejemplares identificados (NC5.ab1) son filogenéticamente cercanos a *C. rudolphii* con los números de acceso GU265865.1 GI: 283971005 “*Contraecum rudolphii* clone rancho El Coronel small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence” 408 bp linear DNA.

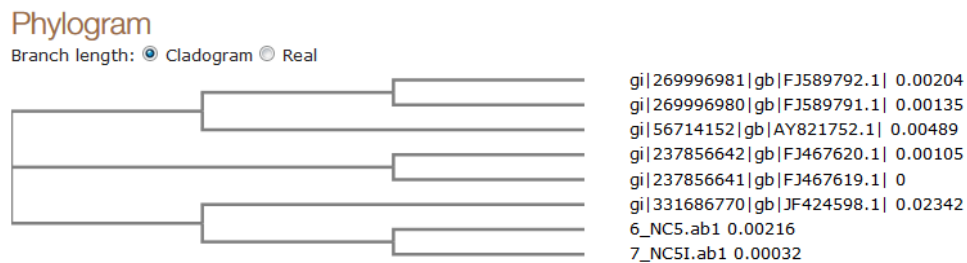


Figura 5. Dendograma de la región ITS (408 pb) de género *Contraecum*.

No existen estudios previos relacionados con la secuenciación de *Contracaecum* en Nuevo León, solo se han encontrado referencias sobre la abundancia presente en el Estado, pero ninguna llega a especie. Por lo cual, estos resultados nos dan base para poder comparar mediante los ITS las diferentes especies presentes, aunque se encuentren en su forma larvaria y así poder tener un resultado concreto al momento de determinar que especie abunda en el estado de Nuevo León (Kijewska *et al.*, 2002).

Comprobamos que las técnicas de PCR punto final pueden ser utilizadas en larvas de *Contracaecum* con un mínimo de muestra, lo que generó un aporte para determinar cualquier otro género de la familia Anisakidae.

CONCLUSIÓN

Después de haber realizado las técnicas de PCR y Secuenciación, concluimos que son técnicas específicas, muy útiles para identificar género y especie de larvas de *Contracaecum* en etapa temprana de desarrollo, sin la necesidad de esperar la forma adulta para determinar mediante sus características morfológicas, la especie que se estudia o está dando un problema en granjas acuícolas del estado de Nuevo León y así poder determinar su origen endémico o exótico.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Zubaidy, A. B. (2009). Prevalence and densities of *Contracaecum* sp. larvae in Liza abu (Heckel, 1843) from different Iraqi water bodies. *Marine Science*. 20:3-17
- Arenal-Vera, J.J., Marcos-Rodríguez, J.L., Borrego-Pintado, M.H., Bowakin-Dib, W., Castro-Lorenzo, J., Blanco-Álvarez, J.I. (1991). Anisakiasis aguda como causa de apendicitis aguda y cuadro reumatológico: primer caso en la literatura médica. *Rev. Esp. Enf. Digest.*, 79: 355-358
- Bakke TA, Harris PD. (1998). Diseases and parasites in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Can J Fish Aquat Sci.*, 55:247-26.
- Choc-ML, Jiménez-RA, Arguedas-CD, Dolz G. (2020). *Contracaecum multipapillatum* (Nematoda: Anisakidae) en peces de aguas continentales de Guanacaste, Costa Rica e Izabal, Guatemala. *Revista Colombiana de Ciencia Animal RECIA*, 12(2):e767. <https://doi.org/10.24188/recia.v12.n2.2020.767>
- Conroy DA, Armas de Conroy G. (1987). Manual de Métodos de Diagnóstico en Ictiopatología con Especial Referencia a los salmónidos. FAO/Programa Cooperativo Gubernamental GCP/RLA/075/ITA. Apoyo a las Actividades Regionales de Acuicultura para América Latina. Documento de Campo No. 4.22.
- Degese, M. F. (2015). Identificación molecular de nematodos Anisákidos de impacto en la salud pública. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de San Martín. Buenos Aires, Argentina
- Espinosa-Pérez, H. (2014). Biodiversidad de peces en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 450-459
- Fernández de Corres, L., Audicana, M.T., del-Pozo, M.D., Muñoz, D., Fernández, E., Navarro, J.A., García, M., Díez, J. (1996). *Anisakis simplex* induces not only anisakiasis: report on 28 cases of allergy caused by this nematode. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 6: 315-319.
- Galaviz Silva, L., Z.J.Molina Garza, F.J.Iruegas Buentello y N.Salinas López. L. (2012). Parasitología Clínica, Manual de Laboratorio. Galaviz Silva (Ed.). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.
- Hoffman G. (1976). Parasites of North America Freshwater Fishes. University of California. Press, Berkeley. Los Angeles, California, USA.

- Juárez. (1986). Helmintos de la lisa *Mugil cephalus* Linneus, en Topolombo, Sinaloa SEDEMAR. Dirección General de Oceanografía, Topolombo, Sinaloa. 56 pp.
- Juárez-Arroyo J. y G. Salgado-Maldonado. (1987). Helminths of the "lisa" *Mugil cephalus* at Topolombo, Sinaloa, Mexico. *Anales del Instituto de Biología*, 60 (3): 279-298.
- Kijewska, A., Rokicki, J., Sitko, J., & Węgrzyn, G. (2002). Ascaridoidea: a simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. *Experimental Parasitology*, 101(1), 35-39.
- Mehlhorn H, Piekarski G. (1998). Grundriss der Parasitenkunde. Ed. Gustav Fisher.
- Meléndez, S. Y M. Rosas. (1995). Algunos aspectos ecológicos de los helmintos que afectan a las especies de peces endémicas de Pátzcuaro Michoacán, México. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 83 pp.
- Mendoza-Garfias, B., García-Prieto, L. y Pérez, G. (1996). Helmintos de la "acúmara" *Algansealacustrisen* el Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Anales del Instituto de Biología*, 67: 77—88.
- Mendoza-Palmero, C., H. Espinosa-Pérez, and G. Salgado-Maldonado. (2007). Helmintos parásitos de peces dulceacuícolas. Pages 179–191 in A. Lot-Helgueras, ed. Guía Ilustrada de la Cantera Oriente: Caracterización Ambiental e Inventario Biológico. Coordinación de la Investigación Científica, Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., Mexico.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World*. 4a ed. John Wiley & Sons, Nueva York. 601 pp.
- Pérez-Ponce de León, G., L. García-Prieto, D. Osorio-Sarabia and V. León-Règagnon. (1996). Listados faunísticos de México VI. Helmintos parásitos de peces de aguas continentales de México. México D.F.: Serie Listados Faunísticos del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 100 p.
- Pérez-Talamantes, R. (2008). Abundancia de *Contracaecum* sp. en *Micropterus salmonoides* (Lecepede, 1802) colectados en el rancho "El Coronel", Dr. Coss, Nuevo León, México. Tesis. Facultad de Ciencias Biología. UANL.
- Shamsi, S., Norman, R., Gasser, R. y Beveridge, I. (2009). Evidencias genéticas y morfológicas de la existencia de especies hermanas dentro de *Contracaecum rudolphii* (Hartwich, 1964) (Nematoda: Anisakidae) en Australia. *Investigación de parasitología*, 105 (2), 529-538.
- Shamsi, S., Norman, R., Gasser, R. y Beveridge, I. (2009). Redescrición y caracterización genética de *Contracaecum* spp. (Nematoda: Anisakidae) seleccionadas de varios huéspedes en Australia. *Investigación de Parasitología*, 104 (6), 1507-1525.
- Thoesen, JC. (1994). *Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens* (eds) 4thV.1. Yamaguti S. 1968. *Systema Helminthum*. Vol IV. Monogenea and Aspidocotyla. Interscience Publ, New York. 699.
- Tompkins J, Clayton D. (1999). Host resources govern the specificity of swift let lice: Size matters. *J Anim Ecol.*, 68: 489-500.