

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

**Caracterización del riesgo de exposición al parásito de
pescado *Anisakis* sp**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Noelia Carballeda Sangiao

Director

Miguel González Muñoz

Madrid, 2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica

Departamento de Microbiología I



Caracterización del riesgo de exposición al parásito de pescado *Anisakis* sp.

Trabajo de investigación que presenta
María Noelia Carballeda Sangiao

Dirigido por el Doctor
Miguel González Muñoz

Madrid, 2016

El Dr. Miguel González Muñoz, Doctor en Ciencias Biológicas, facultativo del departamento de Inmunología del Hospital Universitario La Paz de Madrid,

CERTIFICA:

Que Doña María Noelia Carballeda Sangiao ha realizado bajo su dirección el trabajo “**Caracterización del riesgo de exposición al parásito de pescado *Anisakis sp.***” para optar al grado de Doctor el cual, ha terminado con el mayor aprovechamiento, y que una vez revisado el presente trabajo, quedo conforme con su presentación para ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a treinta de junio de dos mil dieciséis.



Fdo. Dr. Miguel González Muñoz

Director de Tesis Doctoral

Agradecimientos

Después de muchos ¿qué es la tesis? ¿Cómo llevas la tesis? ¿Has terminado ya la tesis? ¡He llegado al final! y no sé ni cómo expresar lo que siento....., tal es mi bloqueo que llevo dos días intentando escribir los agradecimientos y no tengo ni dos palabras. No es que no sepa lo que tengo que decir, es que no se por donde comenzar. Así que como dicen los grandes sabios comencemos por el principio.

Sin lugar a duda, las personas que merecen mi mayor gratitud y mi más grande admiración son mis padres, Suso y Chus, gracias por vuestro esfuerzo y sacrificio y por haberme dado siempre con vuestro apoyo y vuestros mejores consejos. Vosotros habéis sido siempre mi motor, mis guías, mi impulso y los maestros, que sin ningún tipo de estudio, han formado a la persona que soy hoy en día. Gracias por saber motivarme en los momentos de fracaso o cuando pensaba en abandonar con esas frases tan maravillosas: “los suspensos son para los estudiantes” o “Noelia, ¿estudias o vas con las vacas?, nosotros no te podemos ofrecer otra cosa”. Lo mejor que me habéis enseñado es que con esfuerzo y dedicación todo se consigue y que vaya a donde vaya uno nunca debe olvidar de donde viene.

A mi marido, Puente, porque sin entender absolutamente nada del mundo de la investigación siempre has apoyado cada una de mis decisiones sin cuestionarlas, sólo pensando que eso era lo mejor para mí y por decirme que cuando uno piensa que no puede lo que tiene que hacer es esforzarse más.

A mis hermanos, Toño y Patxi, por ser un apoyo en mis fracasos y los principales compañeros en la celebración de mis logros a lo largo de mi vida.

A mis padres en Madrid, Sara y Miguel, por recibirme en vuestra casa sin conocerme de nada y tratarme como si fuese vuestra hija. Por los consejos, el apoyo, la comprensión, las grandes charlas y por llevarme siempre con vosotros como si fuese

parte de vuestra familia. Sois unas grandes personas y nunca sabré como agradecer todo lo que habéis hecho por mí.

A mi jefe, el Dr. Miguel González Muñoz, por haberme ofrecido esta gran oportunidad, por su gran paciencia, por tener siempre tiempo para escuchar mis dudas aunque me repita siete veces, por ponerse los guantes y enseñarme como se trabaja en la poyata, por enseñarme todo lo que he aprendido en estos 5 años que llevo trabajando contigo y por ser mi amigo. Al Dr. Ignacio Moneo por compartir su sabiduría conmigo y su despacho para tomar café y a la Dra. Ana Isabel Rodríguez por haber compartido conmigo la mesa de trabajo, el ordenador, las pipetas, los protocolos,...y por ser la mejor compañera del mundo.

A todas las personas alrededor del mundo que han logrado que el proyecto PARASITE fuese un realidad, por sus esfuerzos y por hacer posible con ellos que yo pudiese realizar mi tesis doctoral. De forma especial debo agradecer a la Dr. Margarita Tejada, la Dra. Mercedes Careche y a la Dra. Isabel Sánchez del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) y al Dr. Alfonso Navas y la Dra. Susana Cobacho del Museo de Ciencias Naturales (MCIN-CSIC), por las colaboraciones, por hacer posibles muchos proyectos, por vuestra amistad y por esas estupendas comidas en el Pardo, las cuales espero que sigan repitiéndose durante mucho tiempo. También al Dr. Edoardo Pozio, a la Dra. M^a Ángeles Gómez Morales y a la Dra. Alessandra Ludovisi del Istituto Superiore di Sanità (Roma), por darme la oportunidad de hacer la estancia en vuestro equipo. Por haberme enseñado todo lo que se hace en vuestro laboratorio, por los paseos romanos, los deliciosos postres y un montón de palabras en italiano que me habéis enseñado. Haber tenido la gran suerte de poder hacer una estancia en el extranjero ha sido una de las mejores experiencias de mi vida.

A mis amigas, gallegas y madrileñas, gracias a todas por todos los momentos compartidos, las fiestas, los viajes, las infinitas charlas y por haberos percatado de que terminé de redactar la tesis porque ya no tengo cara de loca.... jajajja

Índice

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	4
SUMMARY.....	10
INTRODUCCIÓN.....	16
○ Identificación y caracterización del riesgo.....	17
• Infestación por parásitos de la familia Anisakidae.....	17
• Ciclo de <i>Anisakis</i> sp.	20
○ Patología causada por <i>Anisakis</i> sp.	22
• Sensibilización y exposición.....	22
• Sintomatología.....	23
• Diagnóstico.....	24
○ Evaluación de la exposición a <i>Anisakis</i> sp.	26
○ Alérgenos de <i>A. simplex</i>	28
○ Respuesta inmunológica al parásito <i>A. simplex</i>	31
• Respuesta inmune humoral.....	31
• Respuesta inmune celular.....	32
○ La Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria.....	33
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
○ Obtención de larvas de anisákidos.....	40
○ Preparación de extracto crudo de larvas L3.....	40
○ Preparación de extractos de productos de pesca.....	40
○ Preparación de extractos de piensos para pescados de acuicultura....	43
○ Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	43
○ Inmunodetección.....	43
○ Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)	45
○ Test de activación de basófilos (TAB).....	45

○ Autoclavado.....	46
○ Digestión con jugo gástrico simulado.....	47
○ Fraccionamiento con etanol.....	47
○ Espectrometría de masas de trampa iónica.....	48
○ Sujetos a estudiar.....	49
○ Producción de alérgenos recombinantes.....	51
○ Estudio de la termoestabilidad y resistencia al jugo gástrico simulado de Anis s 11.0201	53
○ Cuantificación de IgE total y de IgE, IgA, IgG e IgG4 específicas de <i>Anisakis</i> sp.	53
○ Cuantificación de inmunoglobulinas específicas de alérgenos de <i>A. simplex</i> por ELISA.....	53
○ Cultivos de sangre completa y cuantificación de citocinas.....	54
○ Estadística.....	55
RESULTADOS	57
○ Resistencia al autoclavado de las proteínas de las larvas L3.....	58
○ Resistencia al autoclavado del pescado parasitado artificialmente...	63
○ Enlatados comerciales.....	67
○ Pescado y pienso de piscifactoría.....	70
• Pescado de piscifactoría.....	70
• Piensos para pescados de piscifactoría.....	74
○ Respuesta inmune humoral a <i>Anisakis</i> sp.	83
• Persistencia de la sensibilización IgE a alérgenos de <i>Anisakis</i> sp.	83
• Respuesta humoral a alérgenos de anisákidos distintos de <i>Anisakis</i> sp.	92
• Caracterización de la proteína de tipo Anis s 11 como un alérgeno de <i>A. simplex</i>	94
• Cuantificación de inmunoglobulinas específicas a <i>Anisakis</i> sp.	106

○ Respuesta inmune celular a <i>Anisakis</i> sp.	110
• Respuesta efectora innata.....	110
• Respuesta efectora adaptativa.....	112
DISCUSIÓN	122
○ Caracterización del riesgo de exposición a anisákidos.....	123
• Resistencia al autoclavado de las larvas L3.....	123
• Resistencia al autoclavado del pescado parasitado artificialmente.....	126
• Enlatados comerciales.....	127
• Pescado de piscifactoría.....	129
○ Caracterización de la respuesta inmune específica a anisákidos	133
• Persistencia de la sensibilización IgE a alérgenos de <i>Anisakis</i> sp.	133
• Presencia de alérgenos en anisákidos.....	137
• Caracterización de la proteínas Ani s 11 como un nuevo alérgeno principal.....	138
• Respuesta inmunológica humoral a <i>A. simplex</i>	140
• Respuesta inmunológica celular a <i>A. simplex</i>	142
▪ Respuesta efectora innata. Activación de basófilos	142
▪ Respuesta efectora adaptativa (Th1/Th2/Th17)....	144
CONCLUSIONES	147
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
ANEXOS	173

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico del género <i>Anisakis</i>	21
Figura 2. Larvas L3 de <i>Anisakis</i> sp. en hígado de bacalao enlatado	41
Figura 3. Método de extracción de antígenos parasitarios	42
Figura 4. Efecto del autoclavado sobre las proteínas de <i>A. simplex</i>	60
Figura 5. Efecto del autoclavado sobre antígenos y alérgenos de <i>A. simplex</i>	60
Figura 6. RP-HPLC de la fracción 50-90% de etanol del extracto proteico de las L3 tras 40 minutos de autoclavado	61
Figura 7. Identificación de alérgenos estables al autoclavado de L3	61
Figura 8. Efecto del autoclavado sobre alérgenos de <i>A. simplex</i> en pescado parasitado	64
Figura 9. Patrón de alérgenos estables al autoclavado de pescado parasitado	65
Figura 10. Efecto del autoclavado y digestión gástrica sobre la alergenicidad del pescado parasitado	66
Figura 11. RP-HPLC de pescado parasitado autoclavado 40 minutos y jugo gástrico simulado durante 60 minutos	67
Figura 12. Efecto del enlatado industrial sobre las proteínas de L3 analizado por SDS-PAGE	68
Figura 13. Efecto del enlatado industrial sobre las proteínas de L3 analizado por inmunodetección	69
Figura 14. Efecto del enlatado industrial sobre los antígenos de L3 detectados por inmunodetección de IgE usando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a <i>A. simplex</i>	69
Figura 15. Presencia de Ani s 4 en pescados de acuicultura	71
Figura 16. Efecto de la reducción y ebullición en el reconocimiento de Ani s 4 en pescado de acuicultura	71
Figura 17. Inhibición de la inmunodetección de Ani s 4 en pescados de acuicultura	72
Figura 18. Inmunodetección de IgE en extractos de pescado de acuicultura con una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados a <i>A. simplex</i>	74
Figura 19. Presencia de Ani s 1 y Ani s 4 en piensos de acuicultura	75
Figura 20. Presencia de alérgenos en piensos de acuicultura	76

Figura 21. RP-HPLC de la fracción de 66-90% de etanol del extracto proteico del pienso 2	77
Figura 22. Identificación de proteínas de <i>Anisakis</i> sp. en pienso de acuicultura: alto peso molecular	81
Figura 23 Identificación de proteínas de <i>Anisakis</i> sp. en pienso de acuicultura: bajo peso molecular	81
Figura 24. Análisis de activación de basófilos por extractos de pienso y pescado de acuicultura	82
Figura 25. Cambios en los niveles de IgE específica (sIgE) para <i>Anisakis</i> sp. durante el seguimiento en los casos que se ajustan a un modelo de regresión	87
Figura 26. Cambios en la sensibilización IgE en pacientes cuyos niveles de IgE específica (sIgE) para <i>Anisakis</i> sp. no se ajustaban a una curva de regresión	91
Figura 27. Inmunodetección de alérgenos en el extracto crudo de <i>A. simplex</i> (A.s.), <i>C. osculatum</i> (C.o.) y <i>P. krabbei</i> (P.k.)	93
Figura 28. Ejemplo de TAB con extracto crudo de <i>A. simplex</i> y <i>P. krabbei</i> con un paciente alérgico a <i>A. simplex</i>	94
Figura 29. Diferentes patrones de unión de IgE para extracto crudo de <i>Anisakis</i> sp. y alérgenos recombinantes con suero de pacientes sensibilizados	101
Figura 30. SDS-PAGE e inmunodetección de Anis 11.0201. A: Tinción con Coomassie de Anis 11.0201	105
Figura 31. Patrón de secreción de citocinas en pacientes alérgicos a <i>A. simplex</i> y controles sanos tras ser estimulados con diferentes antígenos	116
Figura 32. Balance de la respuesta Th1/Th2 en pacientes alérgicos a <i>A. simplex</i> y controles sanos en función del estímulo antigénico utilizando la ratio IFN- γ / IL-5	120
Figura 33. Balance de la respuesta Th1/Th2 en pacientes alérgicos a <i>A. simplex</i> y controles sanos en función del estímulo antigénico utilizando la ratio IFN- γ / IL-4	121
Tabla 1. Principales características de los alérgenos de <i>A. simplex</i>	30
Tabla 2. Cebadores utilizados para obtener los alérgenos recombinantes de <i>A. simplex</i> Anis 1, Anis 5 y Anis 11.0201	52
Tabla 3. Porcentaje de basófilos activados con extracto crudo de <i>A. simplex</i> L3 no tratado o autoclavado	62
Tabla 4. Porcentaje de basófilos activados con extracto crudo de <i>A. simplex</i> L3 no tratado y con atún parasitado autoclavado durante 20, 40 y 80 minutos	65
Tabla 5. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en el pienso 2 de pescado	80

de acuicultura

Tabla 6: Características de los pacientes seleccionados para el seguimiento	85
Tabla 7. Datos clínicos y demográficos de los pacientes incluidos en el estudio con la proteína de tipo Ani s 11	95
Tabla 8. Inmunodetección de IgE de alérgenos recombinantes rAni s 1, rAni s 4, rAni s 5 y el recombinante de la proteína de tipo Ani s 11	98
Tabla 9. Cuantificación y comparación de los niveles de inmunoglobulinas contra extracto crudo y alérgenos de <i>A. simplex</i> en pacientes y controles	107
Tabla 10. Niveles de inmunoglobulinas específicas para <i>A. simplex</i> en pacientes agrupados por la sintomatología que presentan	109
Tabla 11. Activación de basófilos inducida por extracto crudo del parásito y alérgenos recombinantes en pacientes y controles	111
Tabla 12. Porcentaje de activación de basófilos de acuerdo a los síntomas presentados por los pacientes	111
Tabla 13. Niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivos en pacientes sensibilizados a <i>A. simplex</i> y controles sanos	113

Abreviaturas

A. simplex: Anisakis simplex

ACN: acetonitrilo

AL: síntomas alérgicos

Antígenos E/S: antígenos de excreción-secreción

AUC: área bajo la curva

BCIP-NBT: 5-bromo-4-cloro-indolilfosfato/ nitro-azul tetrazolio

BSA: albúmina de suero bovino

CRD: diagnóstico resuelto por componentes

DS: desviación estándar

E/S: excreción/secreción

EC: Comunidad Europea

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: European Food Safety Authority

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

FDA: Food and Drug Administration

GAA: Anisakiasis gastroalérgica

GI: síntomas gastrointestinales

Igs: inmunoglobulinas

IQR: rango intercuartil

ITS: espaciadores de transcripción interna

JGS: Jugo Gástrico Simulado

MX: síntomas alérgicos y gastrointestinales

PA: fosfatasa alcalina

PBS: Tampón fosfato salino (0,13 M NaCl; 2,68 mM KCl; 10,1 mM Na₂HPO₄; 1,76 mM KH₂PO₄; pH 7,5)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PHA: fitohemaglutinina

PNPP: paranitrofenilfosfato

ROC: Características operativas del receptor (receiver operating characteristics)

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

STF: suero de ternera fetal

TAB: Test de Activación de Basófilos

TFA: ácido trifluoroacético

TTBS: solución salina de tampón Tris con 0,5% de Tween 20

Resumen

Introducción

Uno de los agentes más relevantes causante de zoonosis por parásitos de pescado son los nematodos de la familia Anisakidae. La especie que se ha descrito más frecuentemente en humanos es el *A. simplex*. Las enfermedades que puede causar son debidas a la infestación después de la ingestión de larvas viables o a reacciones alérgicas (hipersensibilidad) por exposición a material parasitario sin requerir la presencia de larva viva, por lo que la evaluación de la exposición tiene características claramente distintivas en las dos entidades.

Los alérgenos de *A. simplex* son muy resistentes al calor y a la congelación, de hecho, se ha descrito persistencia de alérgenos y antígenos de *Anisakis* sp. tras realizar diversos tratamientos donde se someten las larvas al efecto del calor o de la congelación incluso en productos procesados de forma industrial; estos tratamientos aplicados a los productos de la pesca matan al parásito pero pueden no evitar el riesgo de alergia en los consumidores. Para evaluar la exposición a alérgenos del parásito hay que tener en cuenta también el consumo de productos de pesca que representan una fuente insospechada de alérgenos como son los productos muy elaborados, los productos envasados y los pescados de acuicultura. En el caso de los pescados de acuicultura, la ausencia de larva viva no excluye la posibilidad de que pueda detectarse en el músculo del pescado alérgenos procedentes de los piensos que hayan sido elaborados con harinas de pescado parasitados.

El nematodo *Anisakis* sp. es el único organismo conocido que es a la vez un parásito helminto y un alérgeno presente en productos de la pesca, por lo que el sistema inmune responde al *Anisakis* sp. como un parásito invasor y como un alérgeno.

Objetivos

El presente trabajo se enmarca en las recomendaciones de investigación que presenta la EFSA en su informe “Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products” de 2010 y tiene dos objetivos específicos. El primero de ellos es la detección y caracterización de alérgenos de *Anisakis* sp. en productos de pesca sin larva viva, esto es, pescado de acuicultura y conservas de pescado. El segundo es la caracterización de la respuesta inmune celular y humoral a antígenos de anisákidos.

Metodología

Para la detección y caracterización de alérgenos de *Anisakis* sp. en productos de pesca sin larva viva se evaluó la estabilidad antigénica al autoclavado de las larvas L3, del pescado parasitado artificialmente con L3 y de L3 en enlatados comerciales. Además se estudió la presencia de antígenos y alérgenos del parásito en pescados procedentes de acuicultura y en los piensos usados para su alimentación. Los diversos extractos fueron analizados por electroforesis, inmunodetección, TAB y en algunos se llevó a cabo RP-HPLC y secuenciación por espectrometría de masas. Para clarificar los mecanismos que causan reacciones adversas a antígenos/alérgenos de *Anisakis* sp. y mejorar el diagnóstico de las reacciones alérgicas a parásitos en productos de pesca, se seleccionó como población de estudio pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. y controles sanos. Se analizaron los cambios en la sensibilización IgE a alérgenos de *Anisakis* sp. a lo largo de varios años de seguimiento, la presencia de alérgenos en diferentes anisákidos, el potencial alergénico de la proteína de tipo Ani s 11 (Ani s 11.0201) y la respuesta inmune humoral y celular al extracto crudo de *Anisakis* sp. y a alérgenos específicos. Se han producido alérgenos recombinantes (Ani s 1, Ani s 4, Ani s 5 y Ani s 11.0201) y se han evaluado en un test de diagnóstico resuelto por componentes. La respuesta humoral se analizó usando el CAP-FEIA, ELISAs e inmunodetección con

sueros humanos. La respuesta inmune celular se ha caracterizado mediante el TAB por citometría de flujo y cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de cultivos de sangre total. Se ha comparado la respuesta inmune entre pacientes y controles y se han analizado las diferencias en función del tipo de síntomas.

Resultados y discusión

Los resultados del primer objetivo muestran que las larvas L3 sometidas al proceso de autoclavado presentan al menos dos alérgenos clínicamente relevantes, Ani s 1 y Ani s 4, los cuales son estables al proceso de enlatado industrial simulado en el laboratorio ya que mantienen la capacidad de unir IgE y de activar los basófilos de los pacientes sensibilizados. En los extractos de pescado parasitado artificialmente sometidos al autoclavado y a digestión con pepsina se pueden detectar alérgenos clínicamente relevantes ya que mantienen su capacidad de unir IgE y de activar basófilos. Principalmente, se detectó una banda de unos 21 kDa que podría corresponder a Ani s 1. Para confirmar los resultados del laboratorio se analizaron extractos de conservas comerciales, los cuales mantenían la capacidad de unir IgE y de activar basófilos. Se han detectado Ani s 1 y Ani s 4 y los sueros de los pacientes sensibilizados reconocían una proteína de unos 16 kDa que podría corresponder a Ani s 11.0201. Estos resultados confirman los obtenidos de forma experimental demostrando la resistencia al proceso de enlatado industrial de diferentes antígenos y alérgenos parasitarios.

En su conjunto, los datos obtenidos podrían justificar la presencia de síntomas en algunos pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. tras el consumo de productos procedentes de la pesca sin larva viva pero contaminados con alérgenos del parásito.

Se han detectado alérgenos de *Anisakis* sp. en todos los tipos de pescado de acuicultura. Se observó que el alérgeno Ani s 4 tenía un peso molecular superior al

esperado (9 kDa). Los extractos de los pescados de piscifactoría eran capaces de activar específicamente los basófilos de pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. La inmunodetección usando sueros de pacientes sensibilizados muestra un patrón común de bandas asociado a cada especie de pescado. La presencia de alérgenos de *Anisakis* sp. en los pescados de acuicultura puede ser justificado por la transferencia desde los piensos con los que son alimentados. El análisis de los extractos de los piensos demostró la presencia de alérgenos de *Anisakis* sp. con capacidad de unir IgE y de activar basófilos. Del mismo modo a lo que se observó con el pescado, se detectó el alérgeno Ani s 4 con un peso molecular superior al esperado. La secuenciación muestra la presencia de otros alérgenos mediante la identificación de péptidos específicos de la hemoglobina, enolasa y Ani s 9 de *Anisakis* sp.

El patrón común de alérgenos por tipo de pescado de acuicultura reconocidos por los sueros de los pacientes, sugiere que los antígenos/alérgenos probablemente lleguen a la musculatura a través de los piensos, ya que dependiendo de la especie y de sus necesidades energéticas son alimentados con un tipo determinado de pienso. Otra evidencia a favor de la transferencia de alérgenos del pienso al pescado es la coincidencia en el peso molecular alterado de Ani s 4 en ambos extractos.

Los resultados del segundo objetivo muestran que la sensibilización IgE a alérgenos de *Anisakis* sp. perdura durante muchos años. La monitorización de la IgE específica muestra que los niveles se incrementan en algunos pacientes alérgicos y que la contaminación de productos de pesca con alérgenos podría ocasionar los incrementos en los niveles de IgE específica. Tras una sensibilización a alérgenos de *Anisakis* sp. la ausencia de una exposición adicional a los alérgenos no daría lugar a la pérdida de sensibilización IgE. Se ha visto que Ani s 11.0201 es un alérgeno principal de *Anisakis* sp. resistente a calor y a pepsina y que su uso en el test de diagnóstico resuelto por

componentes incrementa la sensibilidad de la prueba. La presencia de alérgenos en *P.krabbei* y *C.osculatum* podría representar un riesgo para los pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. porque tienen proteínas que son capaces de unir IgE y activar basófilos.

Se ha observado que los controles sanos tienen IgG e IgA específica de *Anisakis* sp. indicando que están expuestos a antígenos del parásito. Además, se detectan IFN- γ , TNF- α y altas cantidades de IL-10 en los cultivos celulares con los antígenos de *Anisakis* sp. que podrían explicar la tolerancia a antígenos parasitarios en los controles sanos. La respuesta inmune en los pacientes es del tipo Th2 con valores altos de IgE e IgG4 específicas al extracto crudo de *Anisakis* sp. Respecto a la secreción de citocinas, tanto el extracto crudo como el alérgeno Ani s 1 inducen un perfil de secreción de tipo Th2 con altos niveles de secreción de IL-4 e IL-5. Sin embargo, los alérgenos Ani s 4 y Ani s 5 producen un perfil de tipo Th1 con alta secreción de IFN- γ e IL-10. Los altos niveles de IL-10 en las respuestas Th1 tanto en controles como pacientes, sugiere que ésta citocina está implicada en la tolerancia a los alérgenos de *Anisakis* sp.

Conclusiones

Los productos procedentes de la pesca procesados de forma industrial y los pescados de acuicultura alimentados con piensos secos extrusionados podrían suponer una fuente de alérgenos ocultos de *A. simplex*, representando un riesgo para los pacientes sensibilizados al gusano.

La presencia de alérgenos de anisákidos desencadena respuestas inmunes de tipo Th1 en población general. La respuesta inmune en pacientes que toleran el consumo de productos de pesca varía según el alérgeno. Las respuestas Th1 observadas en pacientes y controles están acompañadas por altos niveles de IL-10 lo que sugiere que es una citocina importante en la tolerancia a los alérgenos de anisákidos.

Summary

Introduction

One of the most important fish parasites causing zoonosis are the nematodes belonging to the Anisakidae family. The species most often described in humans is the *A. simplex*. Adverse reactions are due to infection after ingestion of viable larvae or to allergic reactions (hypersensitivity) by exposure to parasite material without requiring the presence of live larvae. As a result, assessment of exposure has different characteristics in the two entities.

A. simplex allergens are very resistant to heat and freezing. In fact, it has been described the presence of allergens and antigens of *Anisakis* sp. after performing various treatments subjecting larvae to the effect of heat or freezing and even in fishery products industrially processed; these treatments applied to fishery products kill the worm but may not prevent the risk of allergies in consumers. To assess the exposure to parasite allergens it should also be taken into account the consumption of fishery products that represent an unsuspected source of allergens such as highly processed products, i.e. canned products and fish aquaculture. In case of aquaculture fish, the absence of live larvae does not exclude the possibility that allergens can be detected in the muscle of fish due to the carry-over from the feed which has been produced with flour and oil from parasitized fish.

Anisakis sp. is the only known organism that is both a helminth parasite and an allergen present in fishery products, so that the immune system responds to *Anisakis* sp. as an invading parasite and as an allergen.

Objectives

The aim of this work focused on the research recommendations presented by the EFSA in its report "Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery

products" in 2010 and it has two specific objectives. The first objective is the detection and characterization of *Anisakis* sp. allergens in fishery products without live larvae, that is, aquaculture fish and canned fish. The second is to characterize the cellular and humoral immune responses to anisakid antigens.

Methodology

To detect and characterize *Anisakis* sp. allergens in fishery products without live larva, we have assessed the antigenic stability to autoclaving of larvae L3, antigenic stability to autoclaving of artificially parasitized fish with L3 and commercial canned parasitized cod liver. In addition, we have studied the presence of the parasite antigens and allergens in aquaculture fish and fish feed. The extracts were analysed by electrophoresis, immunoblotting, TAB and eventually RP-HPLC and protein sequencing by mass spectrometry were carried out. To clarify the mechanisms that cause adverse reactions to antigens / allergens from *Anisakis* sp. and to improve the diagnosis of allergic reactions induced by parasites in fishery products, we included in the study patients allergic to *Anisakis* sp. and healthy controls. We analysed changes in IgE sensitization to *Anisakis* sp. allergens over several years of follow-up, the presence of allergens in different anisakids, the allergenic potential of the Ani s 11-like protein (Ani s 11.0201) and the humoral and cellular immune responses to crude extract of *Anisakis* sp. and specific allergens. We have produced recombinant allergens (Ani s 1, Ani s 4, Ani s 5 and Ani s 11.0201) and they have been evaluated in a component resolved diagnostic testing. The humoral response was analysed using CAP-FEIA, ELISAs and immunoblotting with human sera. The cellular immune response was characterized by a flow cytometric TAB and quantification of cytokines in whole blood culture supernatants. We have compared the immune response between patients and healthy controls and analysed the differences dependent on the type of symptoms.

Results and discussion

The results of the first objective show that autoclaved L3 had at least two clinically relevant allergens, Ani s 1 and Ani s 4 which were stable to the industrial canning process simulated in the laboratory, since they maintained the ability of binding IgE and activating basophils from sensitized patients. In the extracts from parasitized fish subjected to autoclaving and pepsin digestion, clinically relevant allergens can be also detected since they can bind IgE and activate basophils. Of note, it was detected a band of about 21 kDa that could correspond to Ani s 1. To confirm the laboratory results we have analysed extracts from commercial canned fish and they retained the ability to bind IgE and activate basophils. We detected Ani s 1 and Ani s 4 and sensitized patients' sera recognized a protein of about 16 kDa which could correspond to Ani s 11.0201. These results confirm those obtained experimentally showing that different parasite antigens and allergens are resistant to industrial canning process.

The data obtained may justify the presence of symptoms in some patients sensitized to *Anisakis* sp. after consumption of fishery products without living larva but being contaminated with parasite allergens.

We detected *Anisakis* sp. allergens in all types of aquaculture fish. It was observed that the allergen Ani s 4 had a molecular weight higher than expected (9 kDa). Extracts of farmed fish were able to specifically activate basophils of sensitized patients to *Anisakis* sp. The sera from sensitized patients showed a common pattern of bands associated with each fish species. The presence of *Anisakis* sp. allergens in aquaculture fish can be justified by transference from the fish feed. The analysis of feed extracts showed the presence of *Anisakis* sp. allergens with capacity to bind IgE and activate basophils. Similarly to the results obtained with fish, Ani s 4 allergen was detected with

a molecular weight higher than expected. Sequencing analysis showed the presence of other *Anisakis* sp allergens based on the identifying of specific peptides to *Anisakis* sp. haemoglobin, enolase and Ani s 9.

There was a common pattern of allergens associated to different farmed fish species recognized by the sera of patients. This observation suggests that antigens/allergens could reach the muscle from feed, because different type of feed is used according to the fish species and their energy needs. Another evidence for the transference of allergens from fish feed, is the presence of high molecular weight Ani s 4 in both extracts.

Results of the second objective show that IgE sensitization to allergens from *Anisakis* sp. lasts for many years. Specific IgE monitoring showed that its levels increased in some allergic patients and that contamination of fishery products with allergens could result in the increased levels of specific IgE. After sensitization to allergens from *Anisakis* sp., the absence of further exposure to allergens would not lead to the loss of IgE sensitization. It has been seen that Ani s 11.0201 is a major allergen of *Anisakis* sp. resistant to heat and pepsin and their use increased the sensitivity of a component resolved diagnosis test. The presence of allergens in *P. krabbei* and *C. osculatum* could be a risk for sensitized patients to *Anisakis* sp. because its extract is able to bind IgE and activate basophils.

It has been observed that healthy controls had specific IgG and IgA to *Anisakis* sp. indicating they are exposed to parasite antigens. In addition, IFN- γ , TNF- α and high amounts of IL-10 are detected in cellular cultures with *Anisakis* sp. antigens and IL-10 could explain the tolerance to parasite antigens in healthy controls. The immune response in patients is a Th2 type response with high values of specific IgE and IgG4 to

crude extract of *Anisakis* sp. Regarding cytokine secretion, both crude extract and allergen Ani s 1 induce a Th2-type response with high levels of secretion of IL-4 and IL-5. However, Ani s 4 and Ani s 5 allergens produce a Th1-type profile with high IFN- γ and IL-10 secretion. The high levels of IL-10 in Th1 responses observed both in controls and patients, suggested that this cytokine was involved in tolerance to allergens *Anisakis* sp.

Conclusions

Industrially processed fishery products and aquaculture fish fed with extruded dry feed could be a hidden source of *Anisakis* sp. allergens, representing a risk for patients sensitized to the worm.

The presence of anisakid allergens triggers Th1 type immune responses in general population. The immune response in patients who tolerate the consumption of fishery products varies according to the allergen. Th1 response observed in patients and controls are accompanied by high levels of IL-10 suggesting that it is an important cytokine in anisakid allergen tolerance.

Introducción

Durante muchos años se ha utilizado una amplia variedad de productos derivados de animales marinos y de agua dulce para el consumo humano y para alimentar a los animales criados con la intención de ser consumidos por los seres humanos. El consumo de productos de pesca implica el riesgo de sufrir zoonosis por los parásitos portados por dichos productos de consumo. Uno de los agentes más relevantes causante de zoonosis son los nematodos de la familia Anisakidae. Las enfermedades que pueden causar pueden ser debidas a la infestación después de la ingestión de parásitos viables o a reacciones alérgicas (hipersensibilidad) contra los antígenos del parásito (EFSA, 2010). Generalmente las infestaciones transmitidas por productos de la pesca se han limitado a las poblaciones que viven en países de renta baja y media, pero los límites geográficos y de las poblaciones en situación de riesgo se están expandiendo debido al crecimiento de los mercados internacionales y de los sistemas de transporte, a la mejora de la globalización del suministro de alimentos y a los cambios demográficos (Chai JY et al., 2005).

Identificación y caracterización del riesgo

Infestación por parásitos de la familia Anisakidae

El primer caso de infestación humana producido por un nematodo identificado como *Anisakis* sp. se describió en los años sesenta (van Thiel PH y van Houten H, 1966), posteriormente se han ido describiendo nuevos casos de infestaciones alrededor del mundo (Mladineo I et al., 2016; Qin Y et al., 2013; Zullo A et al., 2010; Lock G et al., 2008; Auer H et al., 2007; Couture C et al., 2003; Cabrera R et al., 2003; Karmanova IV et al., 2002; Bhargava et al., 1996; Hemsrichart V, 1993; Hiramoto JT y Tokeshi J, 1991; Kliks MM, 1983) principalmente en Japón (90% del total de casos descritos) donde se siguen diagnosticando unos 2.000 casos anuales y el resto de casos

están descritos en los Países Bajos, Alemania, Francia y España (Chai JY et al., 2005). España es uno de los países donde más se consume pescado (72,3 g/persona/día) y a nivel europeo es el país con mayor incidencia de infestación por *A. simplex*, predominantemente por el consumo de anchoas en vinagre (EFSA, 2010). Sin embargo, se desconoce la carga de infestación, es decir la incidencia de la enfermedad y el número total de casos. Es importante destacar que la mayoría de los casos descritos de alergia a *Anisakis* sp. se han descrito en España y que se encuentra además entre las principales causas de anafilaxia (Moro Moro M et al., 2011). La sensibilización varía según las regiones habiéndose descrito seroprevalencias a *A. simplex* en poblaciones sanas desde 0,43% en Galicia (Valiñas B et al., 2001) hasta 39,8% en la Comunidad de Madrid (Rodero I et al., 2005).

El incremento el número de casos descritos en los últimos años probablemente sea debido al aumento de la conciencia diagnóstica, relacionada con el uso de técnicas de diagnóstico (endoscopia), el incremento global en la demanda de productos del mar, el consumo preferible de pescado crudo o poco cocinado asociado con la introducción de nuevos hábitos culinarios por influencia de la globalización como es la incorporación en la dieta occidental del consumo de pescado crudo o poco cocinado (Audicana MT y Kennedy MW, 2008). Se consideran platos de alto riesgo de infestación: sushi y sashimi japoneses, anchoas fermentadas en salazón filipinas, los arenques en salmuera o ahumados y el salmón marinado escandinavo, lomi-lomi y palu hawaiano, ceviche sudamericano y los boquerones en vinagre españoles (Audicana MT et al., 2002). La infestación puede ser causada por varios anisákidos, pero la especie que se ha descrito más frecuentemente en humanos es el *A. simplex*, luego, aunque menos frecuente, *Pseudoterranova decipiens* (Mercado R et al., 2001) y además, también aparecen en la bibliografía descritos unos pocos casos con otras especies estrechamente relacionadas,

como son *Contracaecum* sp. (Shamsi S y Butcher AR, 2011; Im KI et al., 1995) e *Hysterothylacium* sp. (González-Amores Y et al., 2015). Se han establecido 3 términos para definir la infestación: anisakidosis (enfermedad causada por cualquier miembro de la familia Anisakidae), anisakiasis (enfermedad causada por cualquier miembro del género *Anisakis*) y pseudoterranoviosis (enfermedad causada por miembros del género *Pseudoterranova*).

Como consecuencia del incremento de los casos de anisakiasis en Europa desde comienzos de la década de los noventa, se ha emitido normativa específica para evitar y prevenir la enfermedad. Esta normativa ha sido modificada por última vez en el año 2011, tras la elaboración del informe de la EFSA (EFSA, 2010) en el cual se evalúa el riesgo de la presencia de parásitos en productos de pesca. Actualmente, el reglamento EC 853/2004 dice que: requieren congelación a una temperatura no superior a -20°C en todas las partes del cuerpo del producto, durante al menos 24 horas, aquellos productos de pesca que van a ser consumidos crudos o casi crudos; productos de la pesca de arenque, caballa, sardineta (salvaje), salmón del Atlántico y del Pacífico, si van a someterse a un proceso de ahumado en frío en el cual, la temperatura interna del producto no va a ser mayor de 60°C; productos de pescado en escabeche y/o marinados, si el proceso es insuficiente para destruir la larva del nematodo.

El tratamiento de congelación debe ser aplicado a cualquier materia prima o producto final. En la normativa también se afirma que las empresas alimentarias no tendrán que realizar tratamiento de congelación, si los datos epidemiológicos disponibles indican que la zona de pesca de origen no presenta riesgo para la salud respecto a la presencia de parásitos y la autoridad competente lo autoriza. En España, las recomendaciones citadas, son obligatorias para los establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades (Real Decreto 1420/2006). Estas

indicaciones difieren de las dadas por la FDA de EEUU, que dice que para producir la muerte de los parásitos en los pescados o productos de pesca, estos han de mantenerse a una temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante 7 días o $\leq -35^{\circ}\text{C}$ durante 15 horas, pero las temperaturas recomendadas no tienen en cuenta la temperatura alcanzada en el centro térmico (EFSA, 2010), por lo que podrían ser insuficientes o excesivas.

Ciclo de Anisakis sp

El *A. simplex* es un nematodo cuya distribución geográfica es prácticamente universal. El ciclo biológico del género *Anisakis* (Fig. 1) es muy complejo y en algunos aspectos no están definidos completamente. Existen ciertas discrepancias entre los autores que han estudiado el ciclo del parásito (Nieuwenhuizen NE y Lopata AL, 2013; Mattiucci S y Nascetti G, 2006; Pascual S y Abollo E, 2005), por ello para explicarlo se ha seleccionado el aceptado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC).

Durante el ciclo de vida de *A. simplex* las etapas adultas residen en el estómago de mamíferos marinos, principalmente cetáceos (delfines, marsopas y ballenas), donde se encuentran embebidos en la mucosa. Los huevos embrionados producidos por las hembras adultas pasan a las heces de los mamíferos marinos y salen al medio acuático. En el interior del huevo se desarrollarán el primer (L1) y el segundo (L2) estadio larvario. Después de la eclosión de los huevos las larvas L2 nadan libremente. Estas permanecen libres hasta que son ingeridas por crustáceos, principalmente eufásidos, los cuales sirven como hospedadores intermediarios y en ellos la larva se transforma en estadio larvario L3. Peces y cefalópodos (hospedadores intermediarios) se infestan tras ingerir crustáceos y las larvas se transfieren de pescado en pescado a través de la cadena alimentaria. Pescados y calamares mantienen el tercer estado larvario (L3), que es el

que causa infestación en los seres humanos y mamíferos marinos. Cuando los peces o calamares que contienen el estadio L3 son ingeridos por los mamíferos marinos, la larva muda dos veces alcanzando el estadio adulto y sexualmente maduro cerrándose así el ciclo.

Los seres humanos son hospedadores accidentales tras ingerir pescados o cefalópodos parasitados con el estado larvario L3, pero en ellos el gusano no puede desarrollarse ni completar su ciclo vital.

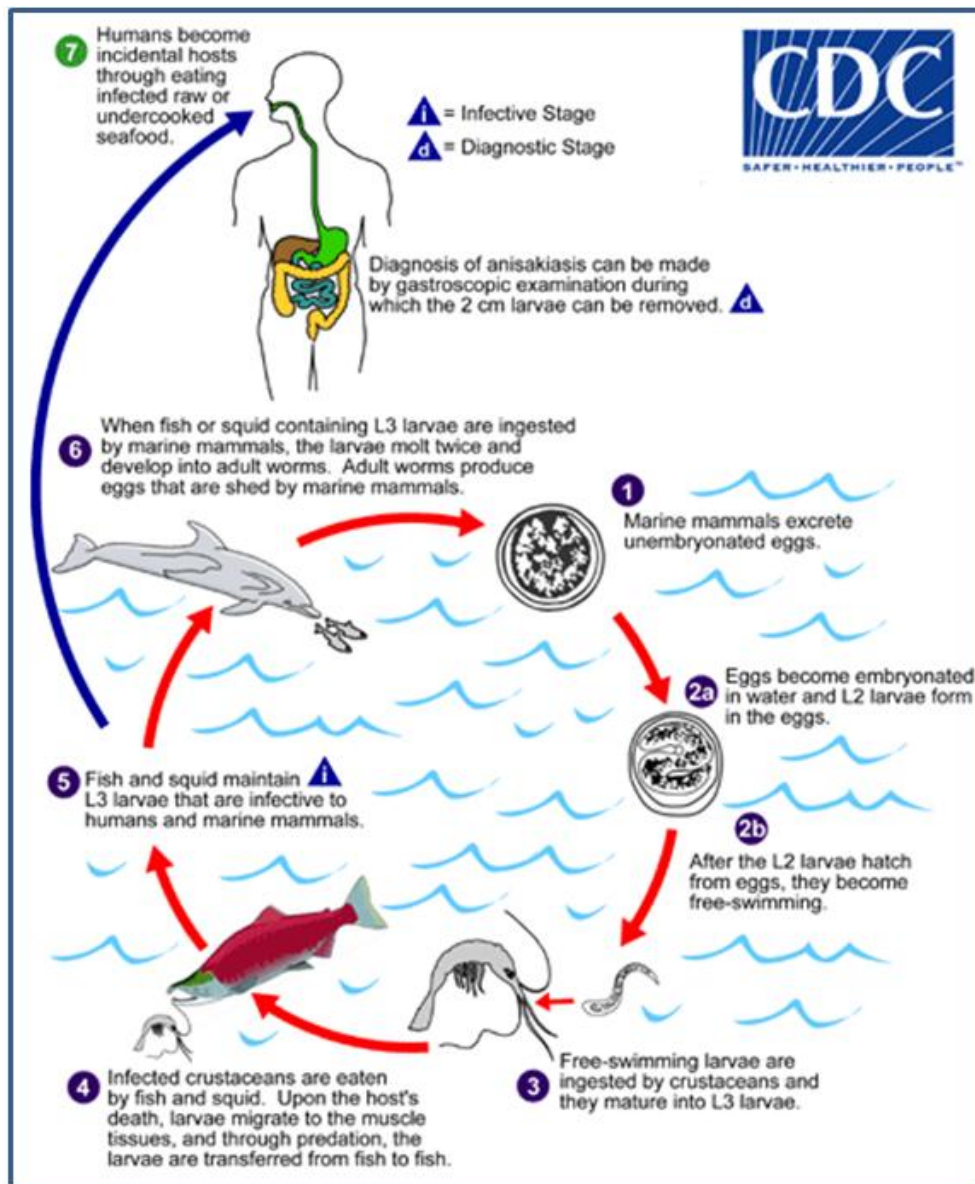


Figura 1. Ciclo biológico del género *Anisakis*.

Patología causada por *Anisakis* sp.

Sensibilización y exposición

Se acepta de forma general que, en la mayoría de los casos, la infestación de un individuo es necesaria para que se sensibilice a *Anisakis* sp. Esta hipótesis es difícil de establecer con certeza, ya que los casos de anisakiasis pueden pasar desapercibidos. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que la sensibilización puede ocurrir a través de la exposición a antígeno sólo, en ausencia de una infestación (Audicana MT et al., 2002). Una vez que se ha producido la sensibilización, la respuesta a los alérgenos del parásito puede ser muy agresiva y ocasionar sintomatología grave. A través de la observación clínica directa, algunos autores han demostrado que una infestación puede provocar un episodio alérgico concurrente a *A. simplex* en un individuo sensibilizado, y afirman que este es el mecanismo principal para la enfermedad (Valiñas B et al., 2001; Daschner A et al., 2000). Sin embargo, otro grupo de autores han descrito la presencia de síntomas alérgicos en pacientes sensibilizados tras la ingesta de pescado congelado o correctamente cocinado o productos enlatados donde la larva está muerta y, por lo tanto, es incapaz de parasitar el tracto gastrointestinal (AAITO-IFIACI *Anisakis* Consortium, 2011; Audicana MT y Kennedy MW, 2008; Ventura MT et al., 2008; Audicana MT et al., 2002; Montoro A et al., 1997). Esto no es sorprendente debido a la existencia de algunos alérgenos de *A. simplex* resistentes al calor y a la pepsina (Moneo I et al., 2007; Caballero ML y Moneo I, 2004). En la literatura se describe la persistencia de alérgenos y antígenos de *Anisakis* sp. tras realizar diversos tratamientos donde se someten las larvas al efecto del calor o de la congelación (Tejada M et al., 2015; Rodríguez-Mahillo AI et al., 2010; Vidaček S et al., 2010; Vidaček S et al., 2009a; Solas MT et al., 2009; Audicana L et al., 1997), e incluso en productos procesados de forma industrial (Faeste CK et al., 2015).

El impacto epidemiológico relativo para cada una de estas dos vías de exposición es desconocido. Sin embargo, hay un acuerdo general en que el consumo de productos de la pesca que contienen larvas de *A. simplex* viables supone un mayor riesgo de sensibilización y alergia a *A. simplex* que el consumo de productos que contienen parásitos no viables.

Sintomatología

La anisakiasis aguda se asocia principalmente con síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos, diarreas y dolor abdominal de diversa intensidad (Madi L et al., 2013). A partir de los años noventa, se comenzaron a describir reacciones alérgicas asociadas al consumo de pescado infestado con larvas L3 (Hoshino C y Narita M, 2011; Antón J et al., 2008; Kasuya S et al., 1990). Los síntomas relacionados con la alergia a *A. simplex* incluyen vómitos, diarrea, disnea, urticaria, asma, conjuntivitis, angioedema e incluso anafilaxia (Alonso MA et al., 2013; Pontone S et al., 2012; Audicana MT et al., 1995). La EFSA (2010) reconoce dos entidades asociadas a diferentes vías de exposición:

- Anisakiasis gastroalérgica, en la que los síntomas alérgicos son adicionales a una infestación gástrica aguda tras comer productos de pesca crudos o poco cocinados contaminados con la larva L3 viva.
- Alergia a *Anisakis sp.*, reconocida como una entidad propia, donde los síntomas alérgicos son resultado de la contaminación de los productos de pesca con alérgenos y no se necesita el parásito vivo para provocar la reacción alérgica.

Los síntomas gastrointestinales y/o alérgicos pueden presentarse hasta 24 horas tras la ingesta de pescado parasitado y en general se resuelven de forma espontánea.

Se ha demostrado que el *A. simplex* tiene una importancia similar a otros alérgenos alimentarios como frutas, frutos secos, pescados o mariscos (Del Pozo MD et al., 1997) y que es uno de los principales causantes de reacciones anafilácticas (Cardona V y Ansotegui IJ, 2016; Minciullo PL et al., 2012). Además, el *A. simplex* es, hasta el momento, el único parásito descrito asociado a productos de pesca capaz de causar respuestas alérgicas (EFSA, 2010). Sin embargo, recientemente se han descrito reacciones gastroalérgicas por *A. pegreffii* (Mattiucci S et al., 2013).

Diagnóstico

En la práctica clínica el diagnóstico de anisakiasis y alergia a *Anisakis* sp., se basa en una historia compatible con aparición de síntomas gastrointestinales (diarrea, vómitos, dolor abdominal) y/o alérgicos (desde urticaria o angioedema hasta anafilaxia), hasta 24 horas después de la ingesta de pescado o productos procedentes de la pesca. En los casos de anisakiasis, la endoscopia es un método útil para el diagnóstico y extracción del parásito, sin embargo, en muy pocos casos es necesario recurrir a ella ya que la infestación se resuelve espontáneamente. En los casos de sospecha de alergia, se realizan diferentes pruebas confirmatorias como son una prueba cutánea positiva, la detección de IgE específica para el parásito, y la ausencia de reacción a proteínas de pescado y a otras fuentes antigénicas con reactividad cruzada tales como insectos, ácaros, crustáceos y cucaracha (Audicana MT y Kennedy MW, 2008).

Es frecuente encontrar IgE frente a *A. simplex* en sujetos que no muestran reacciones alérgicas a este parásito. Hay que tener en cuenta que tanto la prueba cutánea como la detección de IgE específica son pruebas con muy buena sensibilidad pero, relativamente baja especificidad ya que se utiliza extracto crudo de *Anisakis* sp. que puede dar lugar a falsos positivos debido a reactividades cruzadas (Carralada-Sangiao

N et al., 2014; Guarneri et al., 2007; Iglesias R et al., 1996). Por lo tanto, la identificación de IgE específica contra el parásito no es un indicador totalmente fiable de alergia, ya que se ha detectado IgE específica en un alto porcentaje de individuos sanos (Rodero I et al., 2005; Del Pozo et al., 1997). Hay varias posibles explicaciones para la existencia de IgE frente a *A. simplex* sin manifestaciones clínicas: reactividad cruzada con otros nematodos debido a la presencia de panalérgenos como la tropomiosina; reactividad cruzada con hidratos de carbono o fosforilcolina y reactividad cruzada con glicanos que se presentan en glicoproteínas de otros nematodos; la presencia de biotín-enzimas que pueden estimular la producción de IgE en algunos pacientes; episodios previos de anisakiasis que no han sido diagnosticados (Audicana MT y Kennedy MW, 2008).

En las alergias alimentarias la “prueba oro” de confirmación es la provocación doble ciego con placebo, pero en la alergia a *Anisakis* sp. las consideraciones éticas imposibilitan realizar pruebas de provocación bajo la actual regulación ya que los parásitos no están clasificados como alimentos, a pesar de que es un contaminante común. En la bibliografía existen tres ensayos de provocación con larvas congeladas, liofilizadas y proteínas de E/S de *A. simplex*. En ninguno de los ensayos se observó una prueba de provocación positiva (Baeza ML et al., 2004; Alonso-Gómez A et al., 2004; Sastre J et al., 2000) sugiriendo que sería necesario la exposición a larva viva para desarrollar sintomatología. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la provocación no mimetiza una exposición real y no se puede concluir que el consumo de pescado parasitado con larva muerta sea seguro para los pacientes sensibilizados.

Un abordaje que aumente la especificidad del diagnóstico de alergia a *Anisakis* sp. puede ser la utilización de alérgenos recombinantes del parásito que no tengan reactividad cruzada con otros alérgenos, lo que se denomina un diagnóstico resuelto por

componentes (CRD) (Eller E et al., 2016). Un valor añadido del uso de proteínas recombinantes es que proporcionaría información para su uso en protocolos de desensibilización por inmunoterapia, evitando de este modo la provocación (Burk CM et al., 2016).

Durante los últimos años se ha incorporado la técnica de activación de basófilos en el diagnóstico y monitorización de las alergias, incluida la alergia a *Anisakis* sp. (Frezzolini A et al., 2010; González-Muñoz M et al., 2005). Este método se basa en la detección de cambios fenotípicos de los basófilos por citometría de flujo. Cuando los basófilos son incubados con alérgenos, la IgE unida al receptor de alta afinidad FcεRI en la membrana del basófilo reconoce los alérgenos de forma específica y como consecuencia el basófilo se activa, secreta mediadores y experimenta cambios en la expresión de marcadores fenotípicos. El marcador más comúnmente usado en el TAB es el CD63 que, incrementa su expresión en la membrana plasmática del basófilo cuando es activado y su expresión se correlaciona con la liberación de histamina (Lambert C et al., 2003). Este método se ha demostrado que puede complementar los métodos de diagnóstico serológicos (González-Muñoz M et al., 2005).

Evaluación de la exposición a *Anisakis* sp.

Como se ha comentado anteriormente, la patología asociada con la exposición a *Anisakis* sp. puede ser debida a la infestación por larva viva o a la exposición a material parasitario sin requerir la presencia de larva viva, por lo que la evaluación de la exposición tiene características claramente distintivas en las dos entidades. Esto no es solamente importante para las diferentes recomendaciones dietéticas, sino también por sus implicaciones en intervenciones preventivas de salud pública. La evaluación de la

exposición se complica aún más debido a las diferencias en la respuesta inmune a *A. simplex* como se expone más adelante.

Los alérgenos de *A. simplex* son muy resistentes al calor y a la congelación, por lo tanto, los tratamientos aplicados a los productos de la pesca que matan al parásito pueden no evitar el riesgo de alergia en los consumidores de estos productos (Vidaček S, 2010; Solas MT et al., 2008; Rodríguez-Mahillo et al., 2008; Audicana L, 1997). También se ha demostrado la resistencia de los alérgenos a la cocción en microondas (Vidaček S et al., 2011) y al tratamiento con altas presiones (Vidaček S et al., 2009b). Los alérgenos de *A. simplex* pueden estar también presentes en el músculo del pescado en zonas cercanas a las larvas, pudiendo causar síntomas alérgicos, independientemente de la ingestión de las larvas (Solas MT et al., 2008).

A la hora de evaluar la exposición a alérgenos del parásito hay que tener en cuenta también el consumo de productos de pesca que representan una fuente insospechada de alérgenos de *Anisakis* sp. como son los productos muy elaborados como el surimi, los productos envasados y los pescados de acuicultura. Se ha demostrado que en las etapas de lavado del músculo de pescado necesarias para la producción del surimi hay una disminución considerable del contenido de alérgenos de *Anisakis* sp. pero no se ha podido descartar que permanezca cierta cantidad al interaccionar con componentes del músculo de pescado (Olivares F et al., 2015).

La ingesta de pescado procedente de acuicultura se considera más segura, ya que estos son criados en un ambiente y con alimentación controlados (EFSA, 2010). Sin embargo, existen riesgos de transmisión de nematodos por la presencia en el medio de mamíferos marinos y aves ictiófagas, por la existencia de hospedadores intermediarios vivos en el medio o por la ingestión de alimentos (pescado crudo troceado) con larvas

vivas del nematodo (Mo TA et al., 2014; Shih HH et al., 2010). De hecho, ya existen descritos en la literatura casos donde se ha encontrado presencia de anisákidos en especies cultivadas (Roumbedakis et al., 2013; Shih HH et al., 2010). Se considera que casi no existe riesgo de infestación con *Anisakis* sp. en los pescados de acuicultura que son criados con piensos secos, debido a las condiciones de preparación de los piensos en las cuales no habría presencia de larva viva (Peñalvert J et al., 2010). Sin embargo, recientemente se ha demostrado la presencia de antígenos de *Anisakis* sp. en salmón noruego criado en granja y alimentado con piensos industriales (Faeste CK et al., 2015). En la actualidad, no existen estudios que determinen si existe riesgo de alergia a *Anisakis* sp. por transmisión de antígenos y alérgenos del parásito a través de los piensos. La ausencia de larva viva, no excluye la posibilidad de que pueda detectarse en el músculo del pescado de acuicultura la presencia de alérgenos procedentes de los piensos que hayan sido elaborados con harinas de pescado parasitados con larvas de *Anisakis* sp., del mismo modo que podría pasar con otros animales de granjas que son alimentados con piensos fabricados con harinas de pescado (Armentia et al., 2006).

Alérgenos de *Anisakis simplex*

Desde el año 2000 se han realizado estudios de aislamiento y caracterización de alérgenos de *A. simplex*, con el fin de poder realizar un diagnóstico más específico de pacientes alérgicos (Caballero ML et al., 2013; Gamboa PM et al., 2012; Anadón AM et al., 2010; Moneo I et al., 2000).

En la actualidad, hay descritos y reconocidos 14 alérgenos de *A. simplex*, que están aprobados por el Subcomité de la OMS/Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (WHO/IUIS) para la Nomenclatura de Alérgenos (<http://www.allergen.org/>; acceso: 24 Junio de 2016; Tabla 1). Sin embargo, este

parásito contiene otros alérgenos como se han podido demostrar mediante análisis proteómico que ha permitido la identificación de multitud de proteínas que son capaces de unir IgE de pacientes sensibilizados (Arcos SC et al., 2014; Arlian LG et al., 2003).

En el presente trabajo, se han utilizado los alérgenos Ani s 1, Ani s 4 y Ani s 5 en los estudios de caracterización de la respuesta inmune por su relevancia clínica. Ani s 1 es una proteína excretora/secretora termorresistente (Shimakura K et al., 2004) de 21kDa considerada alérgeno principal, ya que es reconocida por el 85% de los pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. (Moneo I et al., 2000), y además presenta un gran valor diagnóstico (Martínez-Aranguren RM et al., 2014; Gamboa PM et al., 2012; Caballero ML y Moneo I, 2002). Ani s 4 es una proteína excretora/secretora inhibidora de cisteín-proteasas con un peso molecular de 9 kDa, resistente al tratamiento al calor y a la digestión con pepsina, reconocida por el 27% de pacientes sensibilizados (Rodríguez-Mahillo AI et al., 2007). Se ha observado que los episodios de anafilaxia son más frecuentes en los pacientes que reconocen este alérgeno (Moneo I et al., 2005). Por otro lado, Ani s 4 se ha utilizado en diversos estudios donde se analiza la capacidad alérgica de muchos productos de pesca que son sometidos a diversos tratamientos (Vidaček S et al., 2011; Rodríguez-Mahillo AI et al., 2010; Vidaček S et al., 2010). Ani s 5 es una proteína excretora/secretora de 15 kDa perteneciente a la familia SXP/RAL-2, que es una familia de proteínas exclusiva de nematodos. Es un alérgeno termorresistente detectado por algunos pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. que no reconocen Ani s 1 ni Ani s 4.

Tabla 1. Principales características de los alérgenos de *A. simplex* aprobados por el Subcomité de la OMS/Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (WHO/IUIS) para la Nomenclatura de Alérgenos.

ALÉRGENO	TIPO ALÉRGENO	PM (kDa)	FUNCIÓN	CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES	REFERENCIA
Ani s 1	E/S	24	Inhibidor serín-proteasas	Reconocido por el 85% de pacientes alérgicos Termo-resistente	Moneo I et al., 2000
Ani s 2	Somático	97	Paramiosina	Reconocida por el 88% de los pacientes alérgicos Responsable reactividades cruzadas	Pérez-Pérez J et al., 2000 Guarneri F et al., 2007
Ani s 3	Somático	41	Tropomiosina	Responsable reactividades cruzadas Alérgeno no relevante Termo-resistente	Asturias JA et al., 2000 Gamboa PM et al., 2012
Ani s 4	E/S	9	Inhibidor cisteín-proteasas	Termorresistente y estable a pepsina Reconocido por el 27% de los pacientes alérgicos Alto valor diagnóstico	Rodríguez-Mahillo AI et al., 2007 Moneo I et al., 2005
Ani s 5	E/S	15	Familia SXP-RAL-2	Termo-resistente	Caballero ML et al., 2008
Ani s 6			Inhibidor serín-proteasas	Reconocido por el 18% de los pacientes alérgicos	Kobayashi Y et al., 2007a
Ani s 7	E/S	139	Función desconocida	Reconocido por el 93,9% de los pacientes alérgicos	Anadón AM et al., 2009 Anadón AM et al., 2010
Ani s 8	E/S	15	Familia SXP-RAL-2	Reconocido por el 25% de los pacientes alérgicos 35% de secuencia homóloga con Ani s 5 Termo-resistente	Kobayashi Y et al., 2007b
Ani s 9	E/S	14	Familia SXP-RAL-2	Reconocido por el 13,8% de los pacientes alérgicos Termo-resistente	Rodríguez-Pérez R et al., 2008
Ani s 10	Somático	21	Función desconocida	Reconocido por el 39% de los pacientes alérgicos Termo-resistente	Caballero ML et al., 2011
Ani s 11		27	Función desconocida	Reconocido por el 50% de los pacientes alérgicos	Kobayashi Y et al., 2011
Ani s 12		31	Función desconocida	Reconocido por el 57% de los pacientes alérgicos	Kobayashi Y et al., 2011
Ani s 13	E/S	37	Hemoglobina	Reconocido por el 63,6% de los pacientes alérgicos Responsable reactividades cruzadas	González-Fernández J et al., 2015
Ani s 14		24	Función desconocida	Reconocido por el 54% de los pacientes alérgicos	Kobayashi Y et al., 2015

Respuesta inmunológica al parásito *A. simplex*

El nematodo *Anisakis* sp. es el único organismo conocido que es a la vez un parásito helminto y un alérgeno presente en productos de la pesca, por lo que el sistema inmune responde al *Anisakis* sp. como un parásito invasor y como un alérgeno. Otra característica que diferencia *Anisakis* sp. de otros parásitos helmintos es que el ser humano es un hospedador accidental no pudiendo proseguir su ciclo vital, por lo que la anisakiasis se manifiesta de forma aguda y autolimitada y se resuelve de forma espontánea. Por todo ello, la respuesta a éste parásito es muy compleja atendiendo a su naturaleza parasitaria-alérgica.

Respuesta inmune humoral

La respuesta inmune humoral específica contra *Anisakis* sp. se ha estudiado principalmente en modelos animales (Cho SW y Lee HN, 2006), pero los resultados de estos estudios tienen la limitación de no ser extrapolables a la respuesta inmune humana a este parásito. Existen escasos estudios sobre la respuesta humoral en humanos. Se ha observado que la infestación por *Anisakis* sp. causa una fuerte respuesta inmune policlonal y tras un mes desde la infestación se pueden detectar anticuerpos de tipo IgG, IgM e IgA (Daschner A et al., 2002). En algunos pacientes se desarrolla una respuesta inmune mediada por IgE responsable de los síntomas alérgicos. La detección de IgE específica suele ir acompañada por un incremento en los niveles de IgE total en el primer mes de la aparición de los síntomas (García M et al., 1997), y se ha demostrado que el análisis serológico seriado tanto de la IgE total como la IgE específica es útil en el diagnóstico de la anisakiasis gastroalérgica (Daschner A, 1999). También se ha demostrado que la IgE específica es detectable hasta 38 meses después de la aparición de los síntomas (Anadón AM et al., 2010). Sin embargo, se desconoce cómo varía la

respuesta IgE específica a lo largo del tiempo y la respuesta humoral a diferentes alérgenos de *Anisakis* sp.

Se han llevado a cabo estudios de asociación de la sensibilización IgE a *A. simplex* con otras entidades. Algunos autores han encontrado una asociación entre los niveles de IgE específica para *A. simplex* y urticaria crónica (Daschner A et al., 2010), pero otros autores no ven esta asociación (López-Sáez MP et al., 2003). También se ha descrito una mayor prevalencia de IgE específica a *Anisakis* sp. en pacientes dispépticos (Toro C et al., 2006), y de IgG e IgA en pacientes con trastornos gastrointestinales (Gutiérrez R y Cuéllar C, 2002).

Respuesta inmune celular

La respuesta inmune celular se ha analizado principalmente midiendo las citocinas secretadas después de la exposición a *Anisakis* sp. De nuevo, la mayor parte de la información proviene de modelos animales de alergia a *Anisakis* sp. (Abdel-Ghaffar F et al., 2015; Nieuwenhuizen N et al., 2006; Baeza ML et al., 2005) en los que se sensibilizan a los animales bien con extracto crudo o con larva viva. En estos modelos animales se observa una respuesta Th2 o respuestas mixtas Th1/Th2 cuando son expuestos de nuevo al parásito.

En humanos se ha estudiado la respuesta inmunológica a la infestación por *Anisakis* sp. mediante el análisis de citocinas en biopsias intestinales de pacientes con anisakiasis. Se observó que los pacientes presentaban en mucosa y submucosa un infiltrado inflamatorio compuesto, principalmente, por eosinófilos y linfocitos e incluso se detectaron secciones claras de la larva por microscopía. Por otro lado, se observó un perfil de secreción de citocinas Th2. Estos datos fueron confirmados con cultivos de linfocitos de sangre periférica con extracto crudo de *A. simplex* y analizaron el patrón de

respuesta Th1/Th2 y, principalmente, se vio secreción de IL-5, con lo que se confirmó el patrón de respuesta Th2. Estos resultados indican que las células Th2 median el mecanismo inmunológico en los infiltrados producidos por la invasión de la larva en la mucosa intestinal (Del Pozo V et al., 1999). González-Muñoz M. et al., (2010) estudiaron las diferentes respuestas Th1/Th2 que presentaban pacientes sensibilizados a *A. simplex* mediante cultivos celulares con extracto del parásito. También analizaron si las proteínas termoestables mantenían su capacidad de inducir secreción de citocinas. Observaron altas concentraciones de IL-2, IL-4 e IL-5 con extracto crudo y altas concentraciones de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5 con las proteínas termoestables del parásito. Al analizar las diferencias en el patrón de respuesta según la sintomatología predominante, observaron un patrón Th1 en pacientes que presentaban síntomas gastrointestinales intensos y sin síntomas alérgicos y un patrón Th2 con síntomas alérgicos generalizados, pero no gastrointestinales (González-Muñoz M. et al., 2010).

Daschner A et al. (2011) estudiaron las citocinas en suero en aquellos pacientes que presentaban anisakiasis gastroalérgica asociada con urticaria crónica donde veían que los pacientes con urticaria presentaban menor producción de IL-10 que el grupo control y que la producción de IFN- γ era menor en todos los grupos con urticaria. Sin embargo, el análisis de las muestras no proporcionaba suficiente información sobre una posible desviación de la respuesta hacia Th1 o Th2 asociada a urticaria crónica con sensibilización a *Anisakis* sp.

La Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria

La Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) es una Agencia Europea independiente encargada de emitir informes de carácter científico y de comunicar los riesgos asociados con la cadena alimentaria. En 2010 emitió una “Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products” para dar

respuesta a una solicitud de opinión por parte de la Comisión Europea sobre la seguridad alimentaria relacionada con la presencia de parásitos en los productos de pesca (EFSA, 2010). Respecto a la evaluación de los problemas de seguridad alimentaria debido a posibles reacciones alérgicas a los parásitos que puedan estar presentes en productos de pesca, la EFSA extrae una serie de conclusiones entre las que se encuentran las siguientes:

- No hay datos adecuados sobre la exposición y la susceptibilidad a las reacciones alérgicas a parásitos de importancia para la salud pública en los productos de la pesca.
- No hay parásitos asociados a producto de pesca al margen del *A. simplex* que hayan sido claramente implicados con reacciones alérgicas.
- La infestación puede provocar un episodio alérgico a *A. simplex* concurrente en un individuo sensibilizado. Los episodios alérgicos pueden ser provocados también por la exposición a alérgenos solos en un individuo sensibilizado.
- Las principales respuestas alérgicas clínicas debidas a *A. simplex* son la anisakiasis gastroalérgica asociada al consumo de productos de la pesca que contienen larvas vivas y la alergia a *A. simplex*, como resultado de la contaminación de los productos de la pesca con alérgenos sin necesidad de la presencia del parásito vivo.
- La alergia a *A. simplex* y la anisakiasis gastroalérgica son relativamente comunes en algunas regiones en España. Sin embargo, este tipo de alergia rara vez se ha informado en otras partes de Europa. No se sabe si esto es debido a la falta de

concienciación y al uso poco frecuente de pruebas de diagnóstico, o a verdaderas diferencias en la incidencia de la enfermedad.

Por otro lado, la EFSA recomienda que se realicen estudios que mejoren la certeza diagnóstica de las reacciones alérgicas a los parásitos de los productos de pesca, que se proporcione una información clara y práctica a los clínicos sobre la reducción del riesgo y, finalmente, recomienda que se lleve a cabo trabajos de investigación para clarificar los mecanismos de la reacción alérgica y exposición a *A. simplex* presente en los productos de pesca.

El presente trabajo se enmarca en las recomendaciones que la EFSA presenta en su informe. Por ello se han realizado estudios que permitan una mejor evaluación del riesgo de exposición a los alérgenos parasitarios, se ha identificado un nuevo alérgeno con valor diagnóstico indudable, se han caracterizado las respuesta inmune humana a diferentes alérgenos de *Anisakis* sp. y se ha analizado la cinética de dicha respuesta en pacientes sensibilizados.

Hipótesis y Objetivos

La presencia de parásitos en productos de pesca que pueden dar lugar a zoonosis y reacciones alérgicas constituye un problema económico, de seguridad alimentaria y salud pública. Existen diferentes aspectos sobre el riesgo de exposición a estos parásitos que se desconocen o la información de que se dispone es muy escasa e incluso contradictoria. La caracterización e identificación de las proteínas parasitarias que por sus propiedades físico-químicas sean altamente estables a tratamientos tecnológicos aplicados a los productos de pesca, el análisis de la presencia de alérgenos biológicamente activos en alimentos que por su naturaleza se suponen un alimento seguro para las personas sensibilizadas a anisákidos y el análisis detallado de la respuesta inmune a dichos alérgenos parasitarios, permitirían una mejor evaluación del riesgo de exposición a los alérgenos parasitarios y la aplicación de medidas que pudieran reducir el riesgo tanto de forma individualizada para los pacientes como para la población general.

El objetivo general de esta tesis fue la caracterización del riesgo de exposición al parásito de pescado *Anisakis* sp., y de la respuesta inmune específica a anisákidos.

Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Objetivo 1. Detección y caracterización de alérgenos de *Anisakis* sp. en productos de pesca sin larva viva: pescado de acuicultura y conservas de pescado.
- Objetivo 2. Caracterización de la respuesta inmune celular y humoral a antígenos de anisákidos.
 - respuesta inmune humoral: caracterización del perfil de reconocimiento de alérgenos parasitarios por pacientes sensibilizados a *A. simplex*.

- respuesta inmune celular: activación de basófilos y secreción de citocinas.

Materiales y Métodos

Obtención de las larvas de anisákidos

Larvas L3 de *Anisakis* sp. se obtuvieron manualmente de vísceras y ovarios de merluza (*Merluccius merluccius*), se lavaron en PBS y se congelaron inmediatamente a -20°C hasta su uso. A lo largo del trabajo denominamos *Anisakis simplex* cuando se han tipificado mediante el análisis de los espacios intergénicos del ADN ribosomal (ITS; Arcos SC, et al., 2014) en el laboratorio del Dr. Alfonso Navas (Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, España), mientras que utilizamos *Anisakis* sp. cuando no han sido tipificadas genéticamente. Las larvas L3 de *Pseudoterranova krabbei* se obtuvieron de músculos de rape (*Lophius piscatorius*) y fueron también tipificadas mediante ITS (Arcos SC, et al., 2014) en el laboratorio del Dr. Alfonso Navas. Las larvas L3 de *Contracaecum osculatatum* recogidas de hígado de bacalao (*Gadus morhua*) fueron cedidas por el Dr. Kurt Buchmann (Universidad de Copenhague (OUC), Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud, Copenhague, Dinamarca).

Preparación de extracto crudo de larvas L3

Las larvas L3 se homogeneizaron en un Potter-Elvehjem en una relación 1:1 (p:v) de PBS y se aplicaron 5 pulsos de sonicación de 1 segundo en hielo a 20 vatios en un Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL (Misonix, Farmingdale, NY). Después se centrifugaron 10 minutos a 16000g y a 4°C, obteniendo un extracto crudo cuya cantidad de proteína fue medida por el método Bradford utilizando como estándar BSA.

Preparación de extractos de productos de pesca

Los extractos de diferentes productos de pesca fueron obtenidos con un método patentado (ES2340978) con una sensibilidad de 1ppm (Rodríguez-Mahillo AI et al., 2010) y con tasas de recuperación que se sitúan entre el 70-80 %.

Los productos de pesca que se han procesado son:

- Pescado parasitado de forma artificial. Se han parasitado merluza (*Merluccius merluccius*) y atún (*Thunnus thynnus*) con una relación 1L3/g de pescado como se describe en Olivares F, et al. (2015).
- Enlatados comerciales. Se han analizado 3 latas de diferentes marcas de hígado de bacalao enlatado (Fig. 2), que fueron cedidas por el Dr. Horst Karl (Max Rubner Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, Hamburg). Se procesaron las L3 que se encontraron en la conserva y muestras de hígado una vez extraídas las L3.
- Pescado de acuicultura. Se analizaron un total de 24 pescados procedentes de piscifactoría: 14 doradas (*Sparus aurata*), 4 rodaballos (*Scophthalmus maximus*), 4 lubinas (*Dicentrarchus labrax*) y 2 corvinas (*Argyrosomus regius*) cedidos por la Dra. Margarita Tejada (Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Madrid, España).

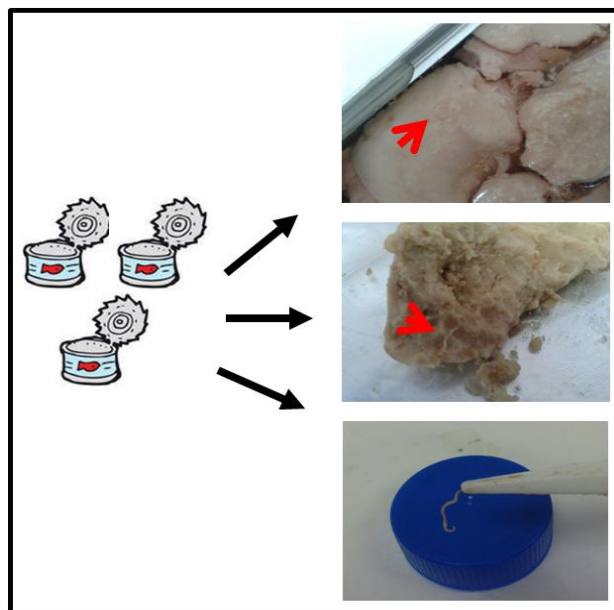


Figura 2. Larvas L3 de *Anisakis* sp. en hígado de bacalao enlatado.

El método de preparación de los extractos es el siguiente (Fig. 3): filetes de pescado o productos de pesca comerciales fueron triturados en un tampón Tris-salino bajo en sal (30mM tampón fosfato pH 7, 10mM NaCl) usando un Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) con una relación 1:7 (p:v). La mezcla resultante fue sonicada en hielo a 20 vatios con un Microson Ultrasonic Cell Disruptor XL. Posteriormente, se centrifugó durante 30 minutos a 6000g y 4°C. Se descartó el sedimento y el sobrenadante se acidificó hasta un pH entre 1-2 añadiendo 0,075 mM (concentración final) HCl, a continuación se neutralizó a pH 7 añadiendo 0,075 mM (concentración final) con NaOH y se centrifugó durante 15 minutos a 16000g y 4°C. Nuevamente se descarta el sedimento y el sobrenadante se guardó a -20°C para posteriormente, analizar la presencia de antígenos o alérgenos parasitarios.

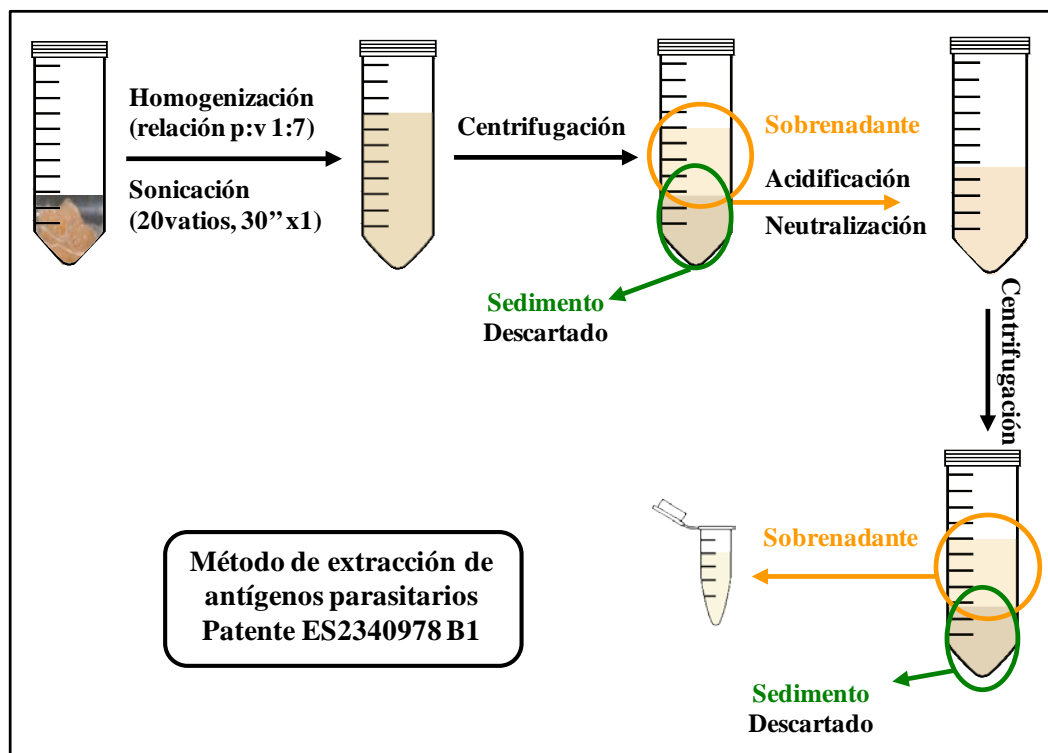


Figura 3. Método de extracción de antígenos parasitarios, patente ES2340978 B1. Cualidades técnicas: sensibilidad < 1ppm, recuperación alrededor de 70-80%.

Preparación de extractos de piensos para pescados de acuicultura

Se han analizado extractos de 4 piensos secos extrusionados diferentes utilizados en piscifactorías y cedidos por la Dra. Margarita Tejada (Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Madrid, España).

Dos gramos y medio de cada uno de los piensos fueron re-hidratados durante 48 horas en agitación a 4°C en 10 mL de PBS. Luego, se centrifuga 20 minutos a 5000g y a 4°C; se descarta el sedimento y el sobrenadante se congela a -20°C durante toda la noche. A continuación, se centrifuga durante 30 minutos a 16000g y a 4°C; el sedimento se descarta y el sobrenadante se congela a -20°C hasta su análisis.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los extractos de proteínas fueron separados por SDS-PAGE usando geles de Tris-glicina en gradiente del 4%-20% (Bio-Rad, Hércules, CA, USA). Cada uno de los extractos proteicos se diluyeron en tampón de muestra para SDS-PAGE (63,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,021% azul de bromofenol) a la concentración adecuada y la mezcla se aplicó sobre el gel. La electroforesis se desarrolló a un voltaje de 120 mA constantes.

Para visualizar bandas proteicas los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,0125% de Azul brillante de Coomassie, 50% metanol, 10% ácido acético en agua bidestilada) durante 15 minutos y como solución de desteñido se usó (30% metanol, 10% ácido acético en agua bidestilada).

Inmunodetección

Las proteínas sometidas a electroforesis se transfirieron por difusión pasiva, durante 18 horas, a membranas de nitrocelulosa colocando dos membranas de 0,45µm a

cada lado del gel (Rodríguez-Mahillo AI et al., 2010). Luego, se bloquearon las membranas con una solución de Nonidet P-40 al 3% en PBS durante 1 hora en agitación. Para detectar la presencia de los antígenos y alérgenos del parásito se incubaron las membranas durante 1 hora con una solución en TTBS, 0,5% STF de los siguientes antisueros específicos generados en conejo: anti-extracto crudo de *A. simplex* (1:10000), anti-Ani s 1 (1:1000) y anti-Ani s 4 (1:10000). Tras lavar la membrana con TTBS se incubaron con anti-IgG de conejo conjugada con PA producida en cabra (Sigma-Aldrich, 1:20000 en TTBS con 0,5% de STF).

Para analizar las muestras eluidas de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, se utilizó la inmunodetección por dot blot. Se aplicaron 3 µL de cada fracción a una membrana de nitrocelulosa y, una vez seca, se rehidrató con PBS. Los siguientes pasos de la inmunodetección con los antisueros específicos son como los descritos anteriormente.

Para identificar los alérgenos reconocidos por los pacientes, las membranas se incubaron con 10 mL de suero de pacientes sensibilizados a *A. simplex* (1:20 en TTBS y 0,5% STF) durante toda la noche. Tras lavar la membrana con TTBS, se incubó durante 2 horas con 10mL de anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE humana (1 mg/mL; Ingenasa, Madrid, España; dilución 1:1000 en TTBS y 0,5% STF) y, luego se incubó con anti-IgG de ratón conjugado con PA generado en cabra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; dilución 1:20000 en TTBS y 0,5% STF). Finalmente, las membranas fueron lavadas y reveladas incubando con sustrato BCIP-NBT (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos.

La inhibición de la inmunodetección por IgE se realizó preincubando el suero con 20µg de extracto crudo de *A. simplex*, 15µg de rAni s 1 o 15µg de rAni s 4 durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se siguió el procedimiento anterior.

Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Algunos de los extractos preparados fueron separados por RP-HPLC usando una columna BioBasic-18 (C18; 25cm x 0,46 cm; tamaño de partícula 5µm; Thermo Scientific; Waltham; MA; USA). La inyección y la elución de la muestra se hizo con un Agilent de cromatografía líquida de la serie 1200 (Agilent Thecnologies, Inc., CA, USA). La elución se hizo con un gradiente lineal de 0,1% TFA en ACN (vol/vol) (del 0% al 5% durante 10 minutos y del 5% al 100% en 60 minutos, con una velocidad de flujo de 1 mL/min). Cada fracción fue analizada por SDS-PAGE e inmunodetección por IgE como se ha descrito anteriormente.

Test de Activación de Basófilos (TAB)

Cien microlitros de sangre total heparinizada fue incubada durante 15 minutos a 37°C con 20µL de tampón de estimulación que contenía IL-3 (60 ng/mL) (Pharmlingen, BD Biosciences, Erenbodeguen, Bélgica) y extracto total de *A. simplex* (concentración final 20, 2 y 0,2 µg/mL), recombinante (r)Ani s 1 y rAni s 4 (concentración final 4,4; 0,44 y 0,044 µg/mL) y rAni s 5 y rAni s 11.0201 (concentración final 20 y 2 µg/mL). En el caso de los pescados y de los piensos de piscifactoría se hizo una curva de concentración (1/5, 1/50 y 1/100) de los extractos totales. Cada paciente tenía un control negativo para el cual la sangre se incubó sin alérgenos y un control positivo incubado con 10µL de anti-IgE humana (10µg/mL, Ingenasa). La activación de basófilos se paró incubando la sangre con 10µL de EDTA (20mM; Sigma-Aldrich, Madrid, España) a 37°C durante 5 minutos. Luego, las células se incubaron durante 20 minutos en

oscuridad con 20µL de una mezcla de CD63-FITC/CD123-PE/HLA-DR-PerCP (BD Bioscience). Se añadieron 2mL de tampón de lisis 1X (BD Biosciences) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Luego, las muestras fueron centrifugadas (500g, 5 minutos) y lavadas con 2 mL de PBS (BD Bioscience) y resuspendidas en 400µL de PBS. La suspensión de células se analizó en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences).

Para analizar el porcentaje de células activadas se seleccionó la población de basófilos utilizando la dispersión lateral de luz (SSC) y la expresión de CD123, eliminándose la mayoría de los restos celulares y seleccionando las células CD123+. Al menos, se analizaron 500 CD123+. Luego, las células seleccionadas se muestran en un gráfico de puntos CD123 / HLA-DR y los basófilos fueron seleccionados como los eventos CD123+HLA-DR-. Posteriormente, en esta población se analizó la expresión de CD63 en un gráfico de puntos CD63 / CD123. Los cuadrantes se establecieron con el control negativo de la muestra, de tal manera que los basófilos activados se sitúan en el cuadrante superior izquierdo por la alta expresión de CD63 (3^a - 4^a décadas). El porcentaje de basófilos activados se calculó restando la expresión espontánea CD63 (control negativo) a los datos obtenidos con las muestras estimuladas con los diferentes extractos y alérgenos recombinantes.

Autoclavado

El material sometido a autoclavado fue L3 de *A. simplex* y pescado parasitado artificialmente.

Para simular el proceso del enlatado industrial en el laboratorio, 30 larvas L3 fueron hervidas en PBS (1 L3/mL) durante 15 minutos y posteriormente autoclavadas en un autoclave vertical de mesa (Selecta, modelo Mediclave, España) a 121°C durante

20, 40 y 80 minutos. Luego, el extracto crudo se obtuvo de la misma forma descrita anteriormente, pero en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.).

En el caso del pescado parasitado artificialmente (1 L3/g), 5g de pescado en 35 mL de PBS se sometieron a las mismas condiciones de simulación de enlatado industrial que para las L3.

Digestión con jugo gástrico simulado

Se preparó extracto de atún parasitado artificialmente con L3 de *A. simplex* y autoclavado 40 minutos, y se incubó en JGS (30mM NaCl, 60mM HCl, 257,5 U/ mL pepsina) durante 30 y 60 minutos. Posteriormente, la presencia de alérgenos resistentes al autoclavado y al JGS fue analizada con el TAB.

Fraccionamiento con etanol

Se prepararon extractos proteicos mediante fraccionamiento con etanol. Para ello, un volumen de 5 mL de un extracto se mezcló con el mismo volumen de etanol absoluto (Panreac, Barcelona, España). Tras 30 minutos se centrifugó a 5000g durante 20 minutos, el sedimento se deja secar durante toda la noche a temperatura ambiente y posteriormente, se resuspende en 500µL de PBS, esta se considera la fracción 50% de etanol. El sobrenadante se mezcló con 4,7 mL de etanol absoluto para obtener una concentración final de etanol del 66%. Tras una nueva incubación de 30 minutos la mezcla se centrifuga usando las mismas condiciones descritas anteriormente, el sedimento se dejó secar y se resuspendió en 500µL de PBS, y se consideró como fracción 50-66% de etanol. Posteriormente, para obtener una concentración final de etanol del 90% se mezcló el sobrenadante con 35,28 mL de etanol absoluto, nuevamente se incubó 30 minutos, se centrifugó en las condiciones indicadas, el sobrenadante se

descartó y el sedimento se resuspende en 500 μ L de PBS, siendo la fracción 66-90% de etanol.

Espectrometría de masas de trampa iónica

La espectrometría de masas fue realizada por el Servicio de Proteómica y Genómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, Madrid, España) (Carballeda-Sangiao et al., 2014). Las bandas de proteínas de las fracciones de HPLC visualizadas con Coomassie R-250 y detectadas por sueros de pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. se extrajeron del gel deshidratado y secado con ACN, luego se destiñeron con bicarbonato amónico 50mM/ACN 50%. Los trozos de gel fueron rehidratados con 12,5 ng/ μ L de tripsina en bicarbonato amónico 50mM e incubados toda la noche a 30°C. Los péptidos fueron extraídos a 37°C usando ACN 100%; luego 0,5% TFA; se secó, se limpió usando ZipTip (Millipore, Billerica, MA, USA) y se reconstituyó en 5 μ L de ácido fórmico 0,1%/ACN 2%. Los péptidos fueron analizados por un nanoflow HPLC (Thermo Scientific) acoplado en línea a un espectrómetro de masas Orbitrap Velos LTQ a través de una fuente de iones nanoelectrospray (Thermo Scientific). Brevemente, los péptidos se cargaron en una Columna-ASY C18-A1 con 2 cm de precolumna (Thermo Scientific) y luego son eluidos en una columna Biosphere C18 (C18, diámetro interior, 15cm x 75 μ m, tamaño de partícula 3 μ m, Nano separaciones, Nieuwkoop, Países Bajos) y separados con un gradiente lineal de 2-99% de ACN en 0,1% de TFA a un flujo de 250nL/min. El espectro de masas fue adquirido en el Orbitrap Velos LTQ en el modo de iones positivos. El análisis completo del espectro MS (m/z 300-1700) fue adquirido en el Orbitrap con un valor diana de 1.000.000 a una resolución de 60.000 y fueron seleccionados los 15 iones más intensos para la disociación inducida por colisión de fragmentación, con un valor diana de 10.000 y una energía de colisión normalizada del 35%. Se realizaron búsquedas del archivo del espectro de masas obtenido en la base de

datos UniProtKB usando el SEQUEST y el MASCOT (versión 2.3, Matrix Science, Boston, MA, USA), que hacen la búsqueda a través del Proteome Discoverer (versión 1.3.0.339, Thermo Scientific). Los parámetros de búsqueda incluidos permiten un máximo de dos puntos de corte ausentes, la carbamidometilación de cisteínas como una modificación fija y la oxidación de metionina como modificaciones variables. La tolerancia del precursor y la masa del fragmento se establecieron en 10ppm y 0,8kDa respectivamente. La identidad de los péptidos se filtró por una FDR de 0,01 usando el Peptide Validator.

Sujetos a estudiar

Para el análisis de la respuesta inmune humoral y celular se han estudiado un conjunto de 51 pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. que pertenecen a la Comunidad Autónoma de Madrid (Hospital Universitario La Paz-Hospital Carlos III, Madrid) y a la Comunidad de Castilla la Mancha (Hospital General Nuestra Señora del Prado, Talavera de la Reina, Toledo) y 40 controles sanos. Como criterios de inclusión los pacientes han de presentar IgE sérica específica y test cutáneo positivo a *Anisakis* sp., y síntomas relacionados con el consumo de pescado. Los controles sanos deben tener IgE específica a *Anisakis* sp. indetectable y sin historia clínica de alergia a *Anisakis* sp. Según los criterios de exclusión no se incluirán en el estudio individuos menores de 18 años ni mayores de 70 años, embarazadas, ni sujetos que presenten IgE específica para pescado, ácaros, gambas y *Ascaris lumbricoides*. De cada uno de los sujetos bajo estudio se recogieron datos demográficos: edad, sexo, hábitos de consumo de pescado actuales y en el pasado (crudo, poco cocinado, cocinado y congelado) y datos clínicos: tipo de sintomatología (urticaria, angioedema, síntomas gastrointestinales, diarrea); otras alergias distintas a la hipersensibilidad a *Anisakis* sp.; atopia; test cutáneo a

aeroalérgenos comunes y a ácaros, pescado, gamba y *Anisakis* sp.; IgE total y específica a *Anisakis* sp., medicación y evolución clínica.

Para el estudio de seguimiento de los niveles de IgE específica, se realizó un análisis retrospectivo en pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. Para ello, se seleccionaron sujetos con al menos 30 meses de seguimiento tras la aparición de los síntomas. Fueron incluidos un total de 17 pacientes (6 mujeres), de la consulta de Inmunología del Hospital Carlos III (Madrid), siguiendo los mismos criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente y tenían una media de edad de 53 años (IQR = 45-57). Uno de los pacientes presentaba síntomas tras ingerir pescado cocinado (cabracho). Al final del seguimiento, se reevaluó la presencia de IgE específica para ácaros, gambas y *Ascaris lumbricoides* como marcadores de posibles nuevas sensibilizaciones que pudieran dar falsos positivos de IgE específica a *Anisakis* sp. A lo largo de las sucesivas visitas se realizaron mediciones de IgE total e IgE específica para *Anisakis* sp. y se llevaron a cabo evaluaciones clínicas. A todos estos pacientes se les aconsejó en la primera visita evitar el consumo de pescado crudo o poco cocinado y consumir pescado de piscifactoría y productos de pesca correctamente congelados; sin embargo, aquellos pacientes que presentaban niveles de IgE específica para *Anisakis* sp. superior a 100kU/L inicialmente se les recomendó mantener una dieta sin pescado durante 6 meses.

Los estudios realizados fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital La Paz-Carlos III y del Hospital General Nuestra Señora del Prado, y todos los sujetos incluidos firmaron un consentimiento informado.

Producción de alérgenos recombinantes

El ARN total se aisló por Ambion PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de 20 larvas L3 de *A. simplex* extraídas del músculo de merluza (*Merluccius merluccius*). Siete microgramos de RNA total se transcribieron a cADN utilizando un cebador oligo d (T) o cebador hexamérico aleatorio utilizando el protocolo First Strand cDNA Synthesis Protocol (Novagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las PCR se realizaron en un ciclador térmico Px2 (Thermo Electron Corporation, Foster City, CA, EE.UU.), utilizando una KOD ADN polimerasa (Novagen). Los cebadores pareados para cada uno de los recombinantes se muestran en la tabla 2, que se han diseñado teniendo en cuenta las secuencias de proteínas de bases de datos disponibles en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La PCR de tipo touchdown hot-start anidada se realizó para amplificar el mARN de Ani s 5 y de Ani s 11.0201 (isoalérgeno del Ani s 11) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial: 94 ° C durante 5 minutos; amplificación: 94°C durante 30 segundos, 77°C, disminuyendo 1 °C en cada ciclo hasta 67°C, durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, 11 ciclos; amplificación: 94°C durante 30 segundos, 66°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, 30 ciclos; paso de elongación final: 72°C durante 5 minutos. Todos los productos de PCR fueron purificados utilizando el QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen), y posteriormente secuenciados por el Servicio de secuenciación automática de ADN (Centro de Investigaciones Biológicas, Centro Superior de Investigaciones Científicas de Madrid, España). Se clonaron en el vector pGEM-T Easy mediante Ek / kits LIC Clonación (Novagen) siguiendo el protocolo del fabricante (T4 ADN Polymerase treatment of target insert and Annealing the Vector and Ek/LIC Insert). El plásmido bacteriano con el ADN de interés fue almacenado en *Escherichia coli* TOP 10 OneShot (Invitrogen) y

su producción en *E. coli* NovaBlue (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el producto se purificó usando His-Bind purification kit (Novagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un protocolo similar para producir rAni s 1, pero las condiciones de PCR para amplificar mRNA son las siguientes: desnaturalización inicial: 94 ° C durante 5 minutos; amplificación: 94 ° C durante 1 minuto, 72°C, disminuyendo 1 °C en cada ciclo hasta 63°C, durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos, 10 ciclos; amplificación: 94°C durante 1 minuto, 63°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos, 40 ciclos; paso de elongación final: 72 ° C durante 5 minutos. El producto de PCR se purificó y se clonó en el vector pPicZαA, y posteriormente fue expresado en la cepa KH714 de *Pichia pastoris* (Vida Technologies, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, CA, EE.UU.) utilizando el EasySelect Pichia Expression kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, el rAni s 1 secretado se purificó por precipitación con etanol.

El rAni s 4 fue producido en un sistema bacteriano como se describe previamente (Rodríguez-Mahillo et al., 2007).

Tabla 2. Cebadores utilizados para obtener los alérgenos recombinantes de *A. simplex* Ani s 1, Ani s 5 y Ani s 11.0201.

Cebador	Secuencia
Ani s1 sentido	5'-cgtctcgagaaaagagatagaacggaatgtcag-3'
Ani s 1 antisentido	5'-cgtccgcggttatttacaacaatttgcaaa-3'
Ani s 5 sentido	5'-gacgacgacaagatagacgatactccccctc-3'
Ani s 5 antisentido	5'-gaggagaagcccgggttattgaggcacag-3'
Ani s 11.0201 sentido	5'-gacgacgacaagatattcatattaccaggtg-3'
Ani s 11.0201 antisentido	5'-gaggagaagcccgggttacaacgaattct-3'

Estudio de la termoestabilidad y resistencia al JGS de Ani s 11.0201

Para estudiar la termoestabilidad del rAni s 11.0201, el recombinante fue hervido durante 30 minutos y, posteriormente analizado por inmunodetección de IgE con una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados a *A. simplex* (n=5). La resistencia a la digestión con pepsina fue determinada incubando el alérgeno con JGS (30mM NaCl, 60 mM HCl, pH 1,5) y pepsina (actividad 1015 U/mg, Sigma-Aldrich) con una ratio enzima/sustrato de 260 U de pepsina/mg de recombinante. La digestión se realizó a 37°C y se recogieron alícuotas en diferentes tiempos de digestión hasta los 120 minutos que, posteriormente, fueron analizadas por inmunodetección de IgE.

Cuantificación de IgE total y de IgE, IgA, IgG e IgG4 específicas de *Anisakis* sp.

Las medidas en suero de IgE total, IgE, IgA, IgG e IgG4 específicas se realizaron por el sistema CAP-FEIA con el instrumento Phadia 250 (Thermo Fischer Scientific, Phadia, Madrid, España) según las instrucciones del fabricante. El rango de detección para la IgE total es de 2-5000 kU/L. En cuanto a la IgE específica a *Anisakis* sp. se consideraron positivos los valores >0,7 kU/L (Carballeda-Sangiao et al, 2014). En el caso de otros alérgenos (gamba, ácaros, *Ascaris lumbricoides*) se consideraron positivos los valores para IgE específica >0,35 kU/L. Los valores para IgA, IgG e IgG4 específicos para *Anisakis* sp. se presentan en mg_A/L (donde A representa anticuerpos específicos de antígeno). Los valores >0,01 mg_A/L fueron considerados positivos para IgA y los >0,02 mg_A/L para IgG e IgG4.

Cuantificación de inmunoglobulinas específicas de alérgenos de *A. simplex* por ELISA

Se utilizó esta técnica para el estudio de la reactividad de IgE, IgA e IgG en sueros humanos con alérgenos recombinantes de *A. simplex* unidos a placas de ELISA.

Los pocillos de placas de poliestireno (MaxiSorp, NUNC) fueron adsorbidas con 10µg de rAni s 1, 1µg de rAni s 4 y 5µg de rAni s 5 diluidos en bicarbonato sódico 50 mM y pH 9,6 durante toda la noche a 4°C. Tras lavar con solución salina de tampón Tris con 0,5% de Tween 20 (TTBS) se bloqueó con 200µL BSA al 1% en PBS durante 1 hora a 37°C. Las placas fueron incubadas con suero humano diluido 1:5 para IgE, 1:100 para IgA y 1:500 para IgG en TTBS con 0,5% de suero de ternera fetal (STF) durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras otro lavado, la detección de IgE específica se hizo incubando primero con 100µL anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgE humana (Ingenasa, Madrid, España; dilución 1:1000 en TTBS y 0.5% STF) y, luego incubando con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con PA (Sigma-Aldrich, Madrid, España; dilución 1:20000 en TTBS y 0.5% STF). Los anticuerpos de tipo IgG e IgA específicos se detectaron incubando con 100µL de anticuerpo de ratón anti-IgG humana con PA y anticuerpo de ratón anti-IgA humana con PA (Sigma-Aldric, Madrid, España; dilución 1: 20000 y 1:15000 en TTBS y 0.5% STF, respectivamente). Finalmente, se añadieron 100µL de substrato PNPP (Thermo Scientific, Madrid, España) por pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Los resultados se expresan como A_{405nm} . Los valores cut-off para la A_{405nm} se determinaron como la media de $A_{405nm} + 3DS$ obtenidas con controles sanos que presentaban valores de IgE, IgG e IgA específicos para *Anisakis* sp. indetectables por CAP-FEIA.

Cultivos de sangre completa y cuantificación de citocinas

Setecientos microlitros de sangre heparinizada de cada sujeto a estudiar fueron cultivados durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂ con o sin (control negativo) 10µg de extracto crudo de *A. simplex*, 5µg de rAni s 1, rAni s 4 o rAni s 5. Como control

positivo la muestra fue incubada con 3µg/mL de PHA (Sigma-Aldrich Química, S.A.). Los cultivos se centrifugaron y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

La concentración de IL-17A, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-5, IL-4 e IL-2 se midió con un kit de cuantificación de citocinas Th1/Th2/Th17 o Th1/Th2 (CBA; BD Biosciences, Madrid, España) por citometría de flujo. El umbral de detección para cada una de las citocinas es 18,9 pg/mL para IL-17A; 7,1 pg/mL para IFN- γ ; 2,8 pg/mL para TNF- α ; 2,8 pg/mL para IL-10; 2,4 pg/mL para IL-6; 2,4 pg/mL para IL-5; 2,6 pg/mL para IL-4 y 2,6 pg/mL para IL-2. Brevemente, el CBA consiste en una serie de bolas con diferentes intensidades de fluorescencia y recubiertas con anticuerpos de captura específicos para cada citocina. Las bolas de captura de citocinas se mezclaron con un anticuerpo monoclonal secundario conjugado con ficoeritrina y con los estándares recombinantes o muestras de estudio para formar complejos tipo sándwich. La emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de citocina unida. Estándares y muestras fueron adquiridas con un citómetro de flujo FACSCalibur y se analizaron con el software CellQuest Pro versión 3.0 (BD Bioscience).

Estadística

Para contrastar la normalidad de las variables se empleó el test de Shapiro-Wilk. Las variables cualitativas fueron descritas por frecuencias y las diferencias entre grupos se analizaron usando la prueba de Chi-Cuadrado. Las variables cuantitativas se describieron con la mediana y el rango intercuartil (IQR). La comparación entre grupos se llevó a cabo usando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Los análisis de asociación entre variables se realizaron con el test de correlación de Spearman. En el estudio de seguimiento de la evolución de los valores de IgE específica a *Anisakis* sp. se realizaron comparaciones de muestras pareadas con el test de los rangos con signo de

Wilcoxon, y se utilizó análisis de regresión para estudiar la tendencia de los cambios de los valores de IgE específica. Se estimaron los cambios con modelos de regresión lineal y no lineal y se seleccionó el mejor ajuste entre ellos. Se realizó análisis de la curva de características operativas del receptor (ROC) para calcular el punto de corte óptimo de basófilos activados que discriminaba entre pacientes y controles sanos y que se correspondía con el valor mayor obtenido de la suma de las distintas sensibilidades y especificidades.

Se consideró que había diferencias significativas cuando el valor p era $<0,05$.

Los datos se analizaron con el SPSS 15.0 (SPSS, Inc., Chicago; IL, USA).

Resultados

Para valorar el riesgo de exposición debido a la presencia de alérgenos de *Anisakis* sp. en productos de pesca sin larva viva se analizaron conservas de pescado y pescado de acuicultura. En el caso de conservas de pescado, lo primero que se analizó fue si dichos alérgenos eran estables a ebullición y autoclavado, procesos que simulan el envasado industrial. Se realizaron experimentos con larvas directamente, con pescado parasitado y con conservas comerciales. Para analizar el pescado de acuicultura, se procesaron diferentes muestras de distintas especies y se estudió la presencia de alérgenos en piensos utilizados en acuicultura.

Resistencia al autoclavado de las proteínas de las larvas L3

Se analizó el efecto de la ebullición y autoclavado sobre las proteínas del parásito por SDS-PAGE. El principal efecto observado fue que el procesamiento reducía considerablemente el número y la intensidad de las bandas de proteínas identificables. No se observan diferencias en el perfil de proteínas entre las muestras autoclavadas durante 20 y 40 minutos, mientras que se vio una alta reducción de la intensidad de las bandas de proteínas tras 80 minutos de autoclavado (Fig. 4). Se observó principalmente una proteína de 12 kDa incluso tras el autoclavado de 80 minutos y también eran visibles bandas proteicas difusas entre 7 y 16 kDa, sugiriendo que tiene lugar la degradación proteica durante el procesamiento. La estabilidad antigénica al autoclavado fue analizada usando un anticuerpo policlonal anti-extracto crudo de *A. simplex*. La mayoría de las proteínas detectadas en el extracto de las L3 no tratadas se vuelven indetectables tras el autoclavado. Sin embargo, se observan antígenos principalmente en un rango de 7 a 16 kDa (Fig. 5A). Se observó que el autoclavado durante 80 minutos produce la mayor reducción en la detección de proteínas siendo visible solamente un antígeno de 7 kDa (Fig. 5A).

Para valorar la estabilidad de los alérgenos, se usa una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *A. simplex* y se observó que el autoclavado reduce la detección de alérgenos al compararlo con el perfil que reconocen en las L3 no tratadas (Fig. 5B). Se identificaron alérgenos de 250, 30 y 9 kDa y una banda ancha de entre 12-15 kDa tras el autoclavado durante 40 minutos. Los alérgenos de bajo peso molecular eran altamente resistentes al calor, ya que todavía eran detectados tras el autoclavado durante 80 minutos.

Para caracterizar los alérgenos resistentes al calor de bajo peso molecular tras el autoclavado, se obtuvo la fracción 50-90% de etanol del extracto crudo de *A. simplex* autoclavado durante 40 minutos y se sometió a RP-HPLC. Se detectaron varias proteínas en las fracciones eluidas por SDS-PAGE (Fig. 6A). Sobre las fracciones eluidas también se hizo inmunodetección de IgE usando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *A. simplex*, y se identificaron varios alérgenos (Fig. 6B). De ellos, únicamente dos proteínas de 14 y de 9 kDa fueron visibles en SDS-PAGE y fueron identificadas por espectrometría de masas. La proteína de 14 kDa fue identificada como Ani s 1, un alérgeno principal de *A. simplex*, y la de 9 kDa se correspondía con el Ani s 4, un alérgeno de *A. simplex* termorresistente y estable a la pepsina. En la figura 7 se muestran los péptidos identificados para Ani s 1 y Ani s 4.

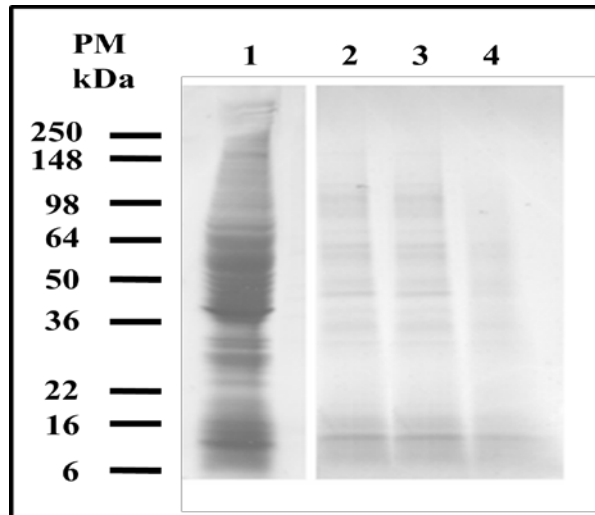


Figura 4. Efecto del autoclavado sobre las proteínas de *A. simplex*. Extracto crudo no tratado (calle 1) y L3 tratadas durante 20, 40 y 80 minutos a 121°C (calles 2, 3 y 4 respectivamente) se analizaron por SDS-PAGE. PM: estándares de peso molecular.

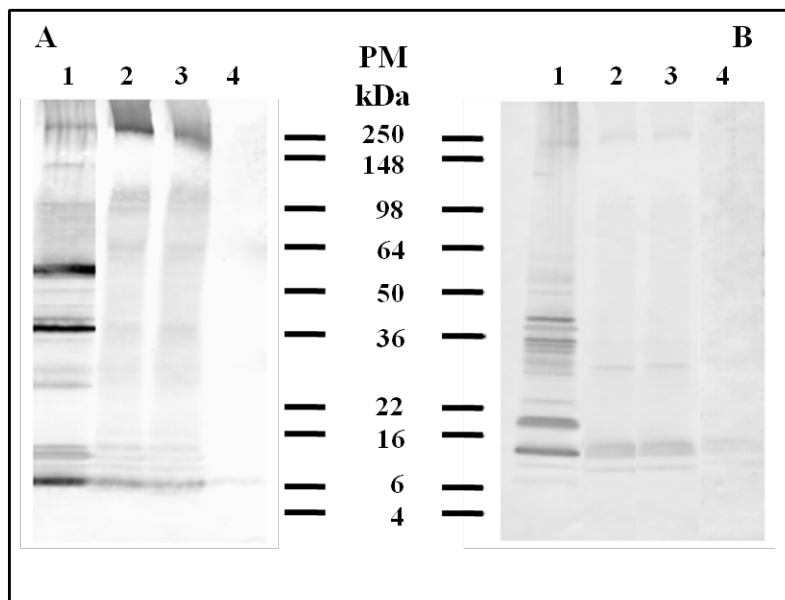


Figura 5. Efecto del autoclavado sobre antígenos y alérgenos de *A. simplex*. Extracto crudo no tratado (calle 1) y L3 tratadas durante 20, 40 y 80 minutos a 121°C (calles 2, 3 y 4 respectivamente) se analizaron por inmunodetección. La estabilidad antigénica fue analizada usando un antisero de conejo anti-extracto crudo de *A. simplex* (A). La alergenicidad se determinó por inmunodetección de IgE usando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *A. simplex* (B). PM: estándares de peso molecular.

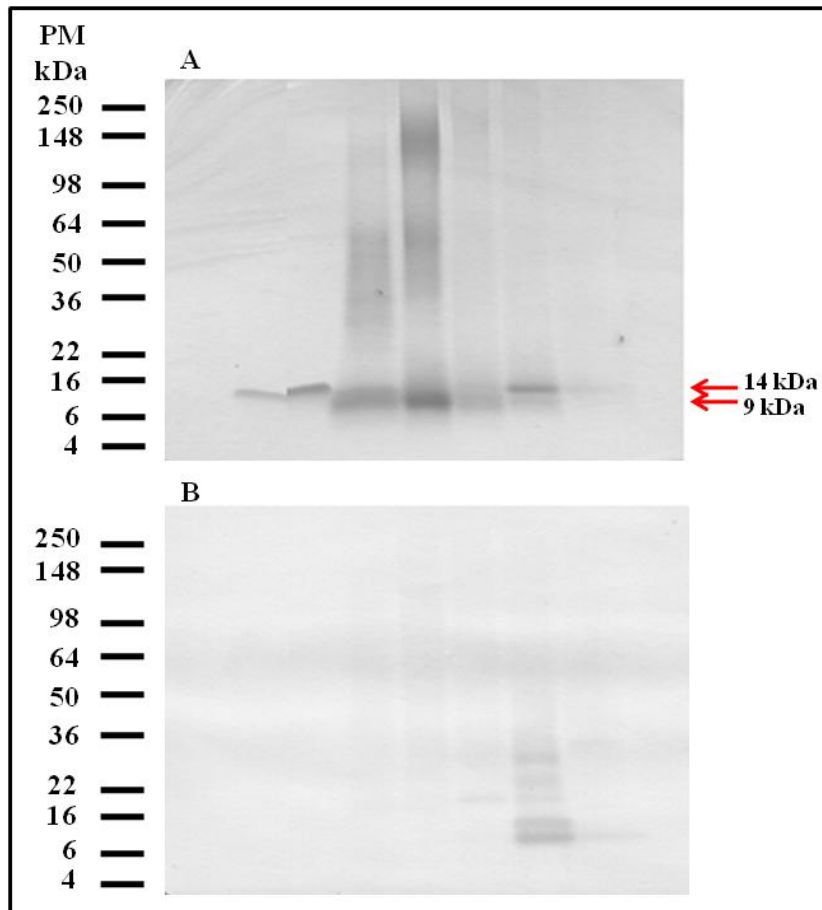


Figura 6. RP-HPLC de la fracción 50-90% de etanol del extracto proteico de las L3 tras 40 minutos de autoclavado. Las fracciones de RP-HPLC se resolvieron por electroforesis. Las proteínas (A) y los alérgenos (B) eluidos fueron analizados por SDS-PAGE y por inmunodetección de IgE, respectivamente. (A) y (B) están alineados con las mismas fracciones de RP-HPLC. PM: estándares de peso molecular.

Ani s 1
 MASMQHFLA ALLLAASICL GDADRTECQL PLDKGTPCTQ EGGVKPSVAW WHDDKSGICL
SFKYTGCGGN ANRFTTIKNCEQHCKMPDRG ACALGKKPAE DSNGEQLVCA GMREDKCPNG
 YQCKMMAFMG LCCPTKEEEL FAREYEGVCK SGKPVKMDRG SGWMMTILGKSCDDQFCPED
AKCERGLFA NCCK

Ani s 4
 MQSRIVVAVV VFCCIILMQT EAGMLGGSSD VDVNDPEIKE LAGKSIAKIS AMINDGKPHE
LVKVVSAKQ VVAGDKYTL EILVKDGDHQD LCTVTIWOKK WENFEEVKVL KCDHQ

Figura 7. Identificación de alérgenos estables al autoclavado de L3. Los alérgenos de *A. simplex* fueron analizados por espectrometría de masas de trampa iónica. Los péptidos identificados para Ani s 1 (nº acceso Q7Z1K3) y Ani s 4 (nº acceso Q14QT4) están subrayados.

Para determinar si los alérgenos parasitarios retenían su capacidad alérgica tras el autoclavado, se realizó el test de activación de basófilos a 8 pacientes sensibilizados a *A. simplex*. La media de los valores basales del % de basófilos activados (5%, IQR = 0,4-12%) y de los controles positivos del ensayo (71%, IQR = 48-83%) en pacientes fue similar a la encontrada en controles sanos (n=5) (3%, IQR = 1-8% y 80%, IQR = 79-97%, respectivamente). Los basófilos no se activaron con extractos de L3 no tratadas (2%, IQR = 1-6%) o autoclavadas (3%, IQR = 2-7%) en el caso de los controles sanos. Por el contrario, se observó activación de basófilos cuando las muestras de los pacientes fueron incubadas con los extractos obtenidos de las L3 autoclavadas durante 40 y 80 minutos. El porcentaje de basófilos activados no se correlacionaba con el tiempo de autoclavado ya que, no se observó una disminución del porcentaje con el aumento del tiempo en todos los pacientes. No se observó relación entre los niveles de IgE específica para *A. simplex* y el porcentaje de basófilos activados (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de basófilos activados con extracto crudo de *A. simplex* L3 no tratado o autoclavado.

PACIENTE	IgEs (kU/L)	L3 NO TRATADAS	L3 AUTOCLAVADAS 121°C	
			40 MINUTOS	80 MINUTOS
1	28,8	94	93	62
2	0,6	74	30	2
3	0,71	80	67	47
4	0,74	71	78	81
5	7,33	53	73	78
6	ND	87	56	ND
7	52,5	78	74	73
8	ND	96	78	56

ND: no determinado. IgEs: IgE específica a *A. simplex*

Estos resultados muestran que al menos dos alérgenos clínicamente relevantes, Ani s 1 y Ani s 4, son estables al proceso de enlatado manteniendo su capacidad de unir IgE y activar los basófilos de los pacientes sensibilizados al parásito.

Resistencia al autoclavado del pescado parasitado artificialmente

Una vez demostrada la estabilidad de los alérgenos al autoclavar directamente las L3 de *A. simplex*, se estudió su estabilidad en el caso de procesar pescado parasitado. Con el fin de analizar también el probable efecto de la matriz en la estabilidad alérgica, se utilizaron como pescados parasitados la merluza, como representante de pescado blanco, y el atún, como ejemplo de pescado azul.

El efecto del autoclavado en pescado parasitado de forma artificial se analizó sobre muestras de 5g de pescado (merluza y atún) que fueron parasitadas con 5 L3 y, posteriormente autoclavadas a 121°C durante 20, 40 y 80 minutos.

La estabilidad de los epítomos alérgicos se analizó usando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. Se observó que el autoclavado reduce la detección de alérgenos al compararlo con el perfil que reconocen en pescado parasitado no tratado, manteniéndose el reconocimiento de una banda de unos 21 kDa en el caso del atún y una de unos 17 kDa en merluza tras el autoclavado durante 40 minutos (Fig. 8). Estos datos muestran un efecto deletéreo sobre los alérgenos del autoclavado parecido a lo que se observó con las L3 y sugieren que existe un efecto de la matriz sobre la estabilidad alérgica.

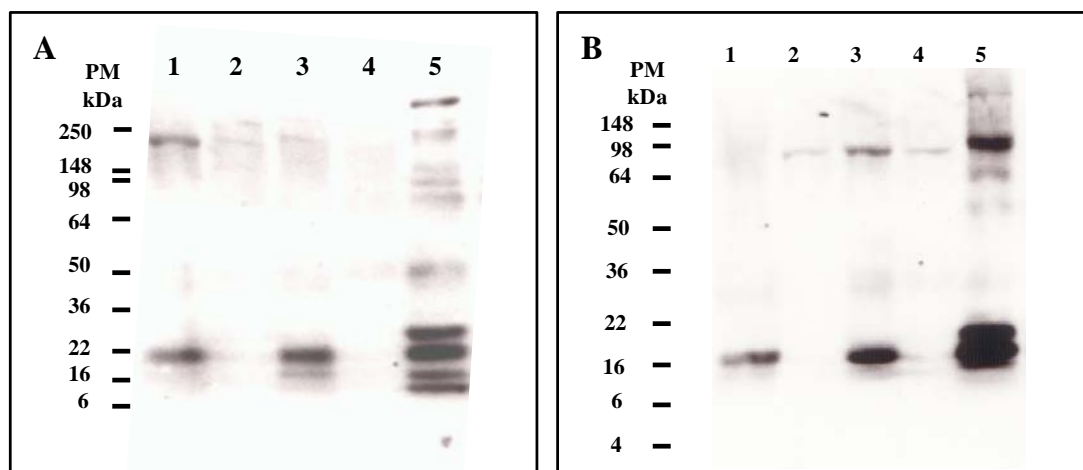


Figura 8. Efecto del autoclavado sobre alérgenos de *A. simplex* en pescado parasitado. La alergenidad se determinó por inmunodetección de IgE usando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *A. simplex*. A: atún, B: merluza. 1: pescado parasitado autoclavado 40 minutos, 2: pescado sin parasitar autoclavado 40 minutos, 3: pescado parasitado autoclavado 20 minutos, 4: pescado sin parasitar autoclavado 20 minutos y 5: pescado parasitado no tratado. PM: estándares de peso molecular.

Para comprobar que los extractos sometidos al autoclavado mantenían su capacidad alérgica se realizó el test de activación de basófilos a 7 pacientes sensibilizados a *A. simplex*. La media de los valores basales del % de basófilos activados (4,4%, IQR = 0,5-12%) y de los controles positivos del ensayo (69,5%, IQR = 37,5-87%) en pacientes fue similar a la encontrada en controles sanos (n=5) (3%, IQR = 1-8% y 80%, IQR = 79-97%, respectivamente). Los basófilos no se activaron con extractos de L3 no tratadas (2%, IQR = 1-6%) o con extracto de pescado parasitado autoclavado (3%, IQR = 2-7%) en el caso de los controles sanos. Sin embargo, se observó activación de basófilos cuando las muestras de los pacientes fueron incubadas con los extractos de pescado parasitado autoclavado durante 20, 40 y 80 minutos (Tabla 4). Al igual que ocurría con las L3 tratadas, la disminución en el porcentaje de basófilos activados no se correlacionaba con el tiempo de autoclavado.

Tabla 4. Porcentaje de basófilos activados con extracto crudo de *A. simplex* L3 no tratado y con atún parasitado autoclavado durante 20, 40 y 80 minutos.

PACIENTE	CRUDO L3 NO TRATADAS	PESCADO PARASITADO AUTOCLAVADO 121°C		
		20 minutos	40 minutos	80 minutos
1	93,57	20,83	5,19	11,45
2	79,79	66,96	10	13,51
3	ND	14,15	20,73	4,85
4	90,05	64,68	84,65	25,29
5	88,94	4,76	2,7	4
6	56,5	26,2	26,09	22,73
7	71,75	83,98	81,37	77

Como apoyo a la positividad del test de activación de basófilos se realizó inmunodetección de IgE de forma individual de los pacientes ensayados. Se observó una asociación entre el porcentaje de basófilos activados y la intensidad en el reconocimiento de los alérgenos. En la figura 9 se muestra un caso representativo (paciente 4, tabla 4).

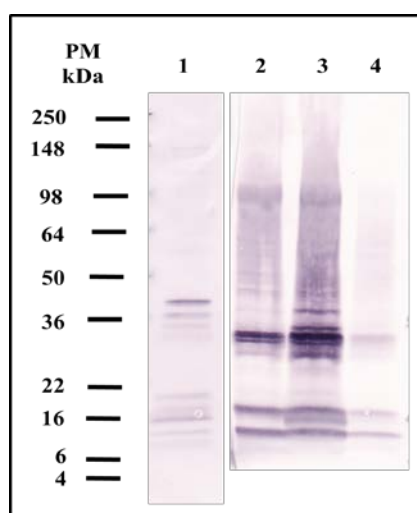


Figura 9. Patrón de alérgenos estables al autoclavado de pescado parasitado. Se muestra la inmunodetección de IgE del paciente 4 (tabla 4) como caso representativo. Calle 1: extracto crudo *A. simplex*. Calle 2, 3 y 4: atún parasitado autoclavado 20, 40 y 80 minutos, respectivamente.

Estos resultados demuestran que la estabilidad de algunos alérgenos de *A. simplex* al proceso de elaboración de conservas puede suponer un riesgo para los pacientes alérgicos al parásito. Sin embargo, dichos alérgenos, además de ser resistentes al procesamiento del alimento, deberían de mantener su actividad tras ser sometidos a la acción del jugo gástrico. Por lo tanto, se estudió la estabilidad de los alérgenos en pescado parasitado a la digestión gástrica después de ser sometidos a autoclavado. Para ello, extractos de atún parasitado autoclavado 40 minutos, se incubaron con JGS durante 30 y 60 minutos. La actividad biológica de los extractos tras el autoclavado y el tratamiento con pepsina fue analizada en 4 pacientes alérgicos a *A. simplex* por el TAB (Fig. 10). La capacidad de activar basófilos fue variabley parece ser dependiente del paciente, ya que el rango de activación oscilaba entre 13-75% después de la digestión durante 60 minutos pero, en general, el tratamiento con jugo gástrico simulado tiende a disminuir el porcentaje de basófilos activados.

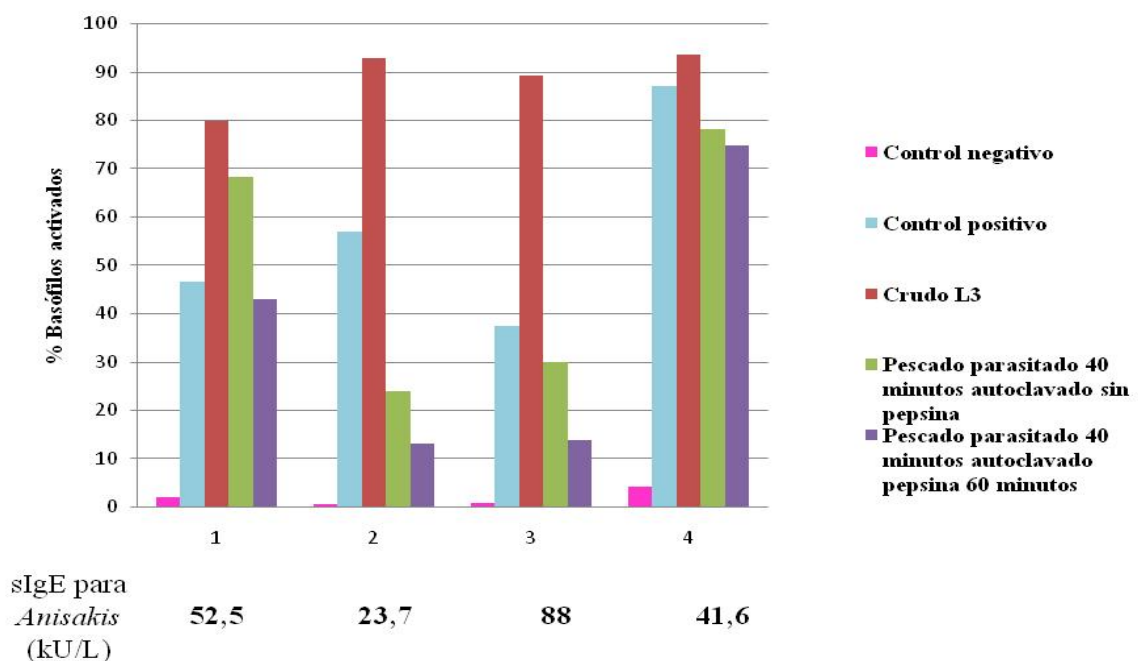


Figura 10. Efecto del autoclavado y digestión gástrica sobre la alergenicidad del pescado parasitado. Se muestra el porcentaje de basófilos activados en cuatro pacientes alérgicos con extracto crudo de *A. simplex* L3 no tratado, pescado parasitado autoclavado 40 minutos y pescado parasitado autoclavado 40 minutos pepsina 60 minutos. sIgE: IgE específica

No se observó ninguna relación entre los niveles de la IgE específica para *A. simplex* y el porcentaje de basófilos activados (Fig. 10).

El extracto de pescado parasitado autoclavado 40 minutos tratado con JGS 60 minutos fue sometido a RP-HPLC. Las distintas fracciones se resolvieron por electroforesis y los alérgenos fueron analizados por inmunodetección de IgE usando una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados a *A. simplex* (Fig. 11). En la inmunodetección se ve la presencia de una banda proteica de unos 21 kDa, que por su peso molecular se podría corresponder con el Ani s 1.

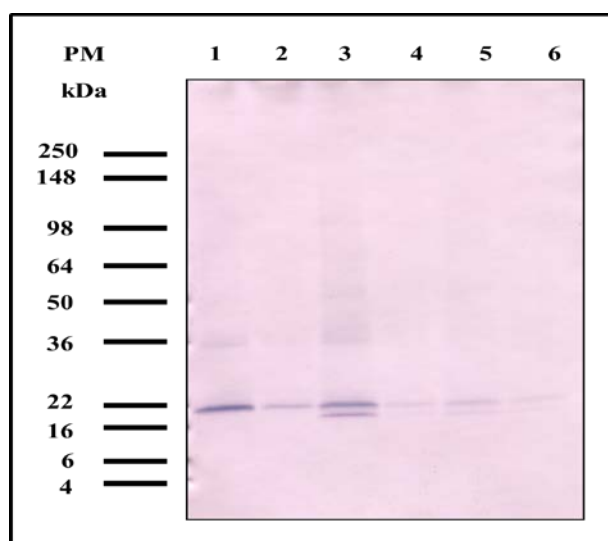


Figura 11. RP-HPLC de pescado parasitado autoclavado 40 minutos y jugo gástrico simulado durante 60 minutos. 1-6: fracciones consecutivas de RP-HPLC resueltas por electroforesis y analizadas por inmunodetección de IgE usando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *A. simplex*. PM: estándares de peso molecular.

Enlatados comerciales

Para confirmar los resultados obtenidos con el procesamiento del pescado parasitado en el laboratorio, se procedió al análisis de conservas comerciales de hígado de bacalao ya que disponíamos de información previa de que estos productos de consumo humano se encontraban parasitados. Se analizaron tanto las L3 como

porciones de hígado libres de parásito de tres marcas comerciales diferentes con la intención de detectar alérgenos en zonas sin larva. El efecto del proceso industrial sobre las L3 obtenidas de las conservas fue analizado por SDS-PAGE (Fig. 12). Se obtuvieron resultados similares al procesamiento de laboratorio, ya que se observó una disminución considerable en el número e intensidad de tinción de las proteínas de las L3 sometidas al proceso industrial del enlatado, al compararlo con un extracto de L3 no tratadas. Se analizó la estabilidad antigénica usando un anticuerpo policlonal anti-extracto crudo de *A. simplex* y se observó, que la mayoría de las proteínas antigénicas se mueven en un rango de entre 10-150 kDa. Además, Anis 1 y Anis 4 fueron detectados utilizando antisueros específicos (Fig. 13).

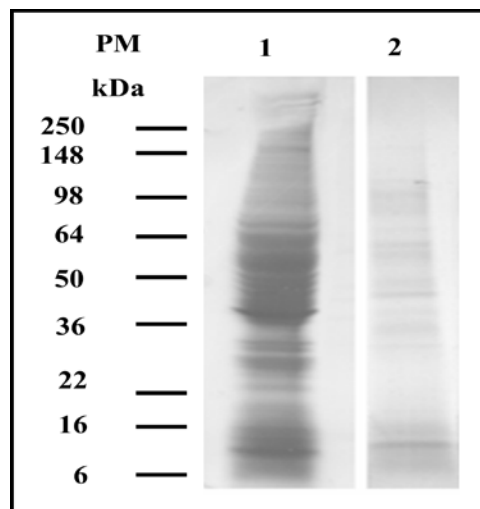


Figura 12. Efecto del enlatado industrial sobre las proteínas de L3 analizado por SDS-PAGE. Calle 1: L3 no tratadas. Calle 2: L3 de hígado de bacalao enlatado. PM: estándares de peso molecular.

Mediante la inmunodetección de IgE usando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *A. simplex*, se identificaba un alérgeno de unos 16 kDa en los extractos de las L3 de las 3 marcas de hígado de bacalao comercial. No se detectaron alérgenos en el hígado de bacalao libre del parásito (Fig. 14).

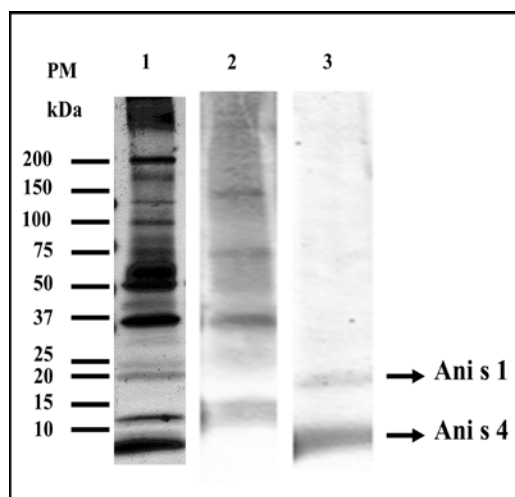


Figura 13. Efecto del enlatado industrial sobre las proteínas de L3 analizado por inmunodetección. Calle 1: antígenos detectados con anticuerpo policlonal anti-extracto crudo de *A. simplex* en L3 no tratadas. Calle 2: antígenos detectados con anticuerpo policlonal anti-extracto crudo de *A. simplex* en L3 de hígado de bacalao enlatado. Calle 3: antígenos detectados con anticuerpos policlonales anti-Ani s 1 y anti-Ani s 4 en L3 de hígado de bacalao enlatado.

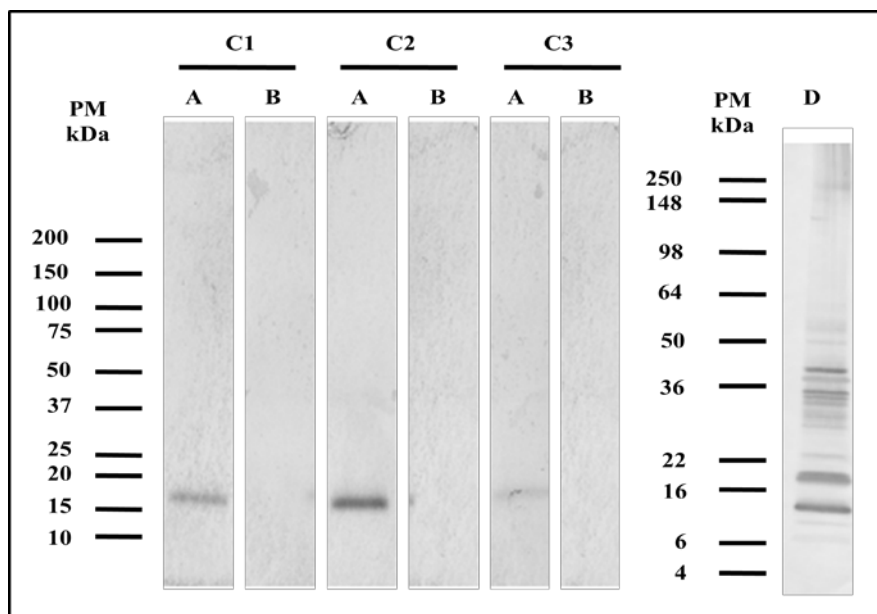


Figura 14. Efecto del enlatado industrial sobre los antígenos de L3 detectados por inmunodetección de IgE usando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *A. simplex*. A: L3 de hígado de bacalao enlatado. B: hígado de bacalao enlatado libre del parásito. C1, C2 y C3: tres marcas diferentes de hígado de bacalao enlatado. D: L3 no tratadas. PM: estándares de peso molecular.

Estos resultados confirman los obtenidos experimentalmente, demostrando la resistencia al proceso de enlatado industrial de diferentes antígenos y alérgenos parasitarios.

Pescado y pienso de piscifactoría

Pescado de piscifactoría

Tras la obtención de los extractos de los 24 pescados procedentes de piscifactoría, se realizó un primer examen mediante inmunodetección usando anticuerpos policlonales específicos para Ani s 1 y Ani s 4 (Fig. 15A). Para determinar qué bandas eran específicas, se incubaron las membranas con suero pre-inmune de conejo (Fig. 15B). En el caso del inmunoblot revelado con el policlonal anti-Ani s 1 solamente se observaron bandas inespecíficas (datos no mostrados). Por el contrario, con el policlonal anti-Ani s 4, en la mayoría de los pescados analizados (1-16) se pudo ver una proteína de unos 58 kDa y otra de unos 75 kDa de peso molecular en los pescados 1, 2, 4 y 12, que son rodaballos. Por otra parte se detectó una proteína de 50 kDa en las doradas 17, 20, 21 y 24 y otra de unos 22 kDa en la dorada 10. En el caso de los rodaballos (1, 2, 4 y 12) se observó un patrón similar de proteínas detectadas.

Para comprobar si el alto peso molecular del Ani s 4 detectado con el policlonal anti-Ani s 4 era debido a interacciones proteicas mediadas por enlaces disulfuro, se trataron los extractos de los pescados de piscifactoría con 2-mercaptoetanol y ebullición durante 5 minutos (Fig. 16). Tras el tratamiento se hizo inmunodetección utilizando el anticuerpo policlonal anti-Ani s 4. Se observó un incremento en la intensidad de detección de la banda de 75 kDa que aparece en los rodaballos 2 y 12 y, en la de 50 kDa que aparece en las doradas 17, 20, 21 y 24. Sin embargo, no se detectó Ani s 4 en su

peso molecular (9 kDa), lo que indicaría que el cambio observado en su recorrido electroforético no era debido a interacciones mediadas por puentes disulfuro.

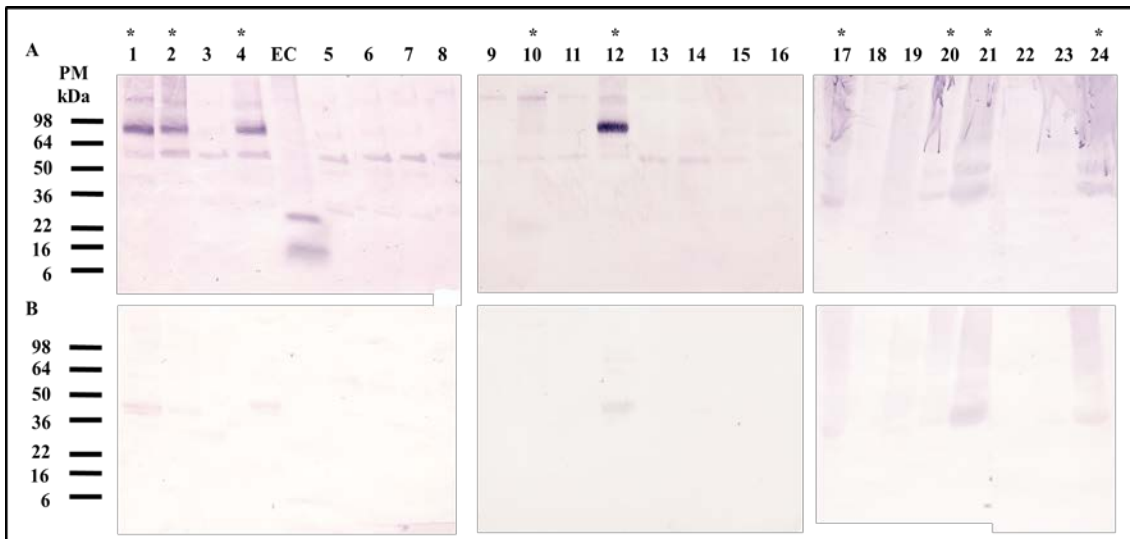


Figura 15. Presencia de Anisakis 4 en pescados de acuicultura. A: Inmunodetección de antígenos específicos de *A. simplex* en pescados de piscifactoría con el anticuerpo policlonal anti-Anisakis 4. B: Inmunodetección en pescados de piscifactoría con suero pre-inmune de conejo. EC: extracto crudo de *A. simplex*. 1, 2, 4 y 12: rodaballos. 3, 5, 6, 7, 10, 11, 15-21 y 24: doradas. 8 y 9: corvinas. 13, 14, 22 y 23: lubinas. PM: estándares de peso molecular.

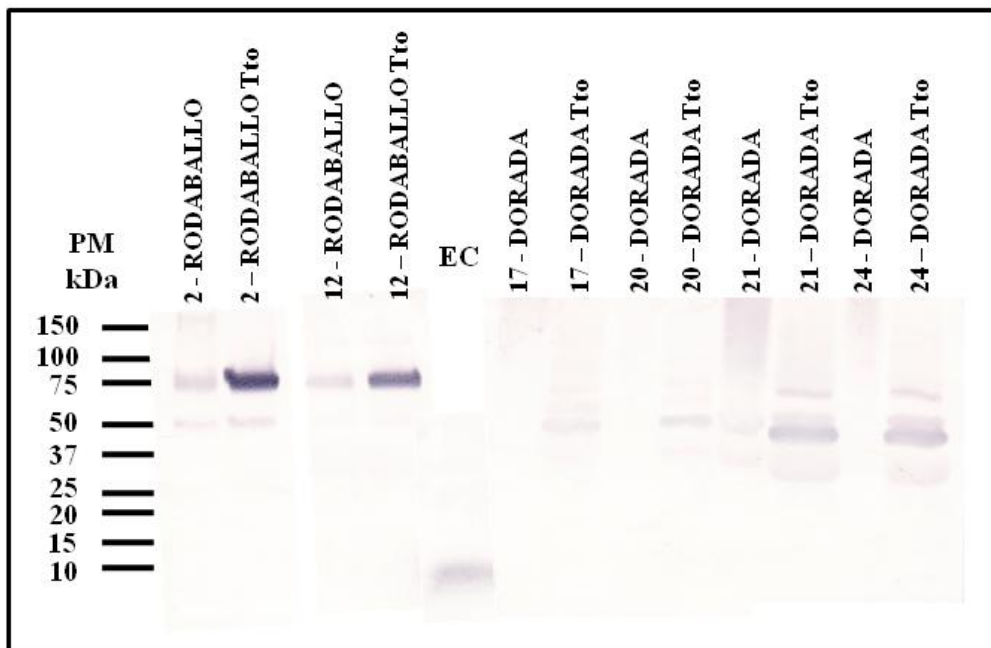


Figura 16. Efecto de la reducción y ebullición en el reconocimiento de Anisakis 4 en pescado de acuicultura. Se muestra la inmunodetección de antígenos específicos de *A. simplex* en pescados de piscifactoría sin y con tratamiento con β -mercaptoetanol (Tto) con anticuerpo policlonal anti-Anisakis 4 generado en conejo. EC: extracto crudo de *A. simplex*. PM: estándares de peso molecular.

Para confirmar que el elevado peso molecular de Ani s 4 detectado en estas muestras no era debido a artefactos, se realizó un ensayo de inhibición de la inmunodetección de IgE preincubando el antisuero con rAni s 4. Se ensayaron los rodaballos 2 y 12 ya que eran las muestras donde se detectaban las proteínas con mayor intensidad. Se observó que el reconocimiento era inhibido por la presencia de Ani s 4 (Fig. 17).

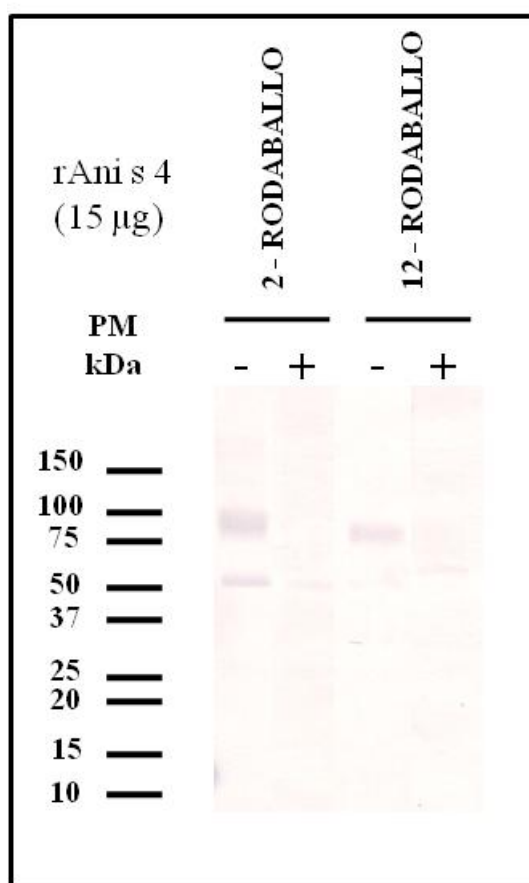


Figura 17. Inhibición de la inmunodetección de Ani s 4 en pescados de acuicultura. —: Inmunodetección de antígenos específicos de *A. simplex* en pescados de piscifactoría con un anticuerpo policlonal anti-Ani s 4. +: Inhibición de la inmunodetección de Ani s 4 preincubando el antisuero con 15µg de rAni s 4. PM: estándares de peso molecular.

La presencia de alérgenos en los extractos de pescados de acuicultura donde se detectaron antígenos del parásito fueron analizados por inmunodetección de IgE utilizando una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. (Fig. 18). El patrón de reconocimiento detectado por los sueros de los pacientes varía en función de las distintas especies analizadas y cada especie se puede asociar con un patrón común. Todos los pescados evaluados detectan con intensidad variable una banda de unos 50 kDa. En el caso de las lubinas (pescados 22 y 23) sólo se detecta este alérgeno. En las corvinas (pescados 8 y 9) se detectan además alérgenos de 20, 24 y 30 kDa. En los rodaballos analizados el patrón es variable, además del alérgeno de 50 kDa, se ven proteínas de unos 34 y 20 kDa en el caso del 1 y el 4, los cuales tienen un patrón de reconocimiento común y en el 12 se observa un alérgeno de unos 75 kDa. En el rodaballo 2 únicamente se detecta la de 50 kDa.

Otro abordaje experimental fue evaluar el potencial alergénico de los extractos de pescado de piscifactoría por el TAB. Se incubaron las muestras de sangre de 43 pacientes alérgicos a *A. simplex* con los extractos de pescados de piscifactoría. Los extractos de dorada (pescado 10) y de rodaballo (pescado 2) activaron los basófilos de 7/43 pacientes (25%, IQR = 18-38%).

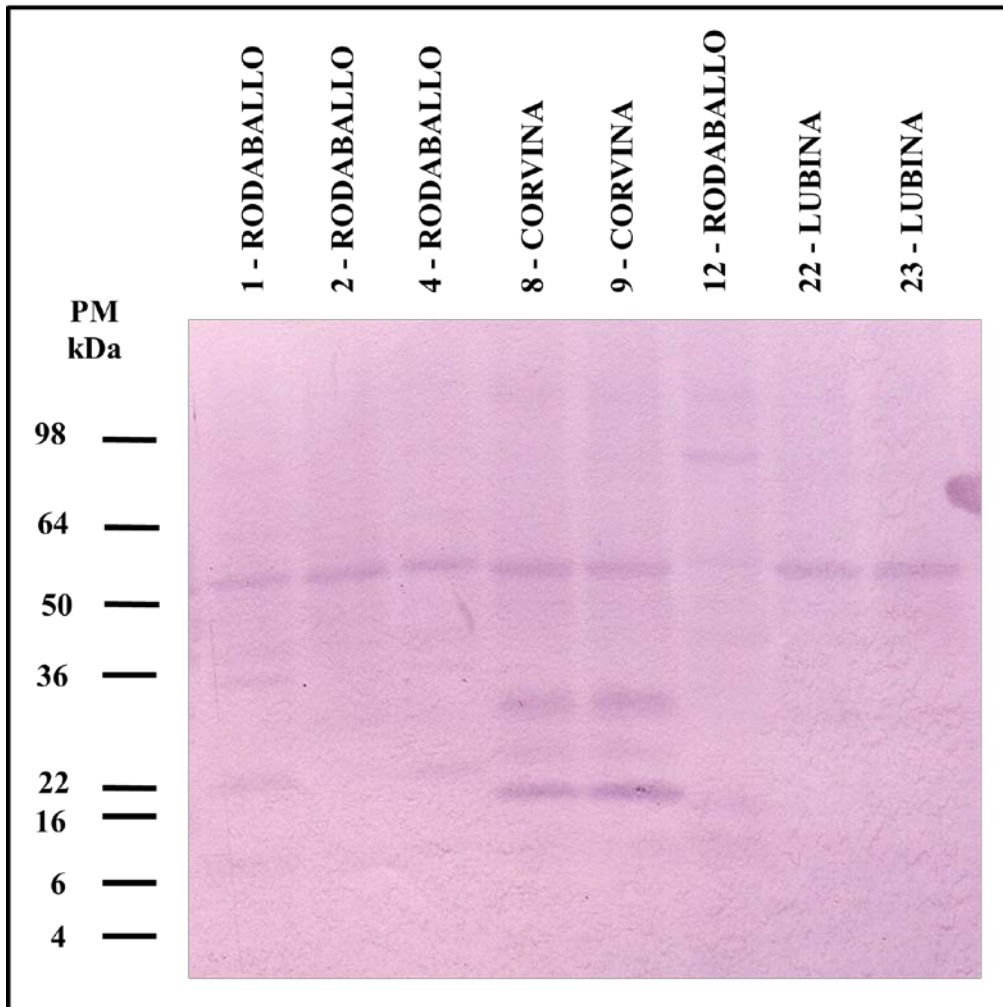


Figura 18. Inmunodetección de IgE en extractos de pescado de acuicultura con una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados a *A. simplex*. PM: estándares de peso molecular.

Piensos para pescados de piscifactoría

Tras obtener los extractos de los 4 piensos se hizo fraccionamiento con etanol y se analizaron dos fracciones diferentes, la 50-66% y la 66-90%. La figura 19 muestra la inmunodetección con los anticuerpos policlonales anti-Ani s 1 y anti-Ani s 4 en el extracto completo y en las fracciones etanólicas 50-66% y 66-90% de los piensos analizados. En los extractos completos de los piensos estudiados se detectaban bandas entre los 30-50 kDa. En la fracción 50-66% de etanol no se observaron bandas claras. En la fracción 66-90% de etanol también se observó bandas proteicas difusas con un

rango de peso molecular de 30-55 kDa. Tal y como ocurría con los extractos de pescado de acuicultura, las proteínas detectadas en los piensos con los antisueros específicos anti-Ani s 1 y anti-Ani s 4 tenían pesos moleculares superiores a los observados a las proteínas nativas Ani s 1 (21 kDa) y Ani s 4 (9 kDa) como se muestra en el extracto crudo (EC *A. simplex* en Fig. 19).

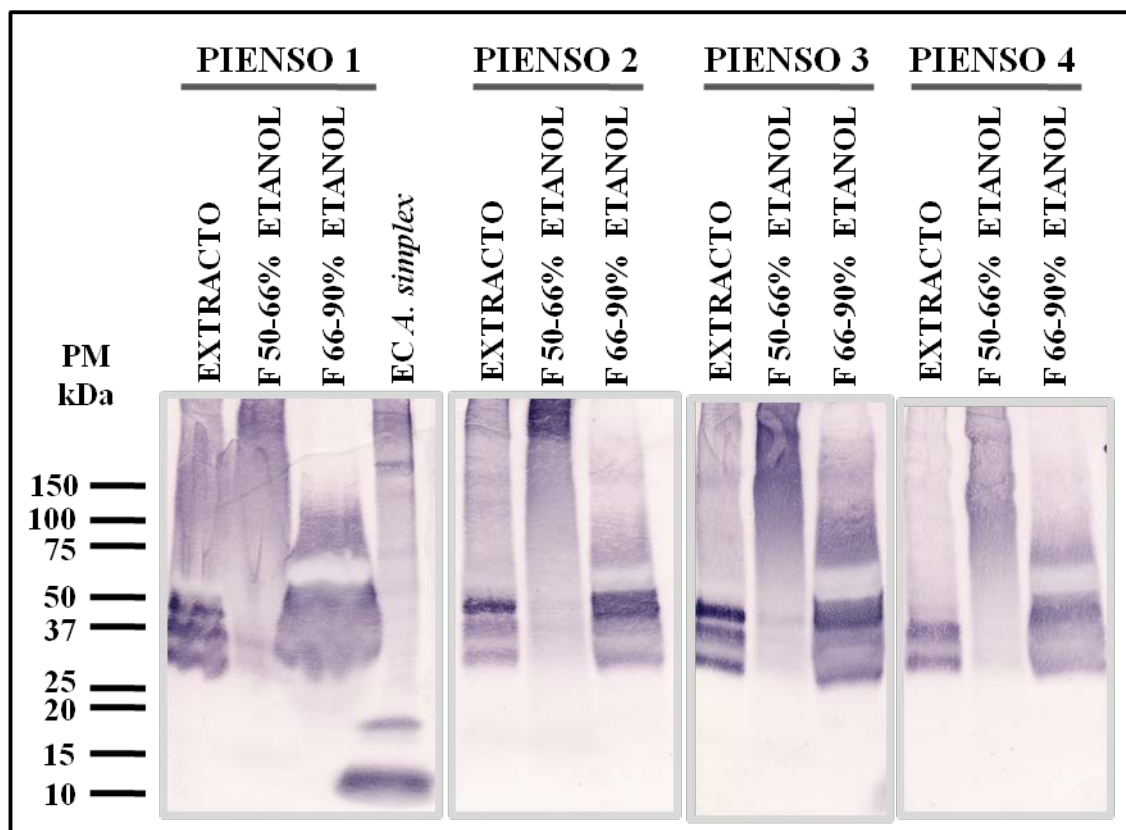


Figura 19. Presencia de Ani s 1 y Ani s 4 en piensos de acuicultura. Se muestra la inmunodetección de antígenos específicos de *A. simplex* en piensos para pescados de acuicultura (extracto completo, fracción 50-66% de etanol y fracción 66-90% de etanol) con anticuerpos policlonales anti-Ani s 1 y anti-Ani s 4. EC: extracto crudo. PM: estándares de peso molecular.

Las fracciones etanólicas estudiadas con los anticuerpos policlonales también fueron analizadas por inmunodetección de IgE usando una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados a *A. simplex* (Fig. 20). Tanto en el extracto completo como en la fracción 66-90 % de etanol de los piensos 1 y 2 se detectaron alérgenos de alrededor

de 50 kDa. Por el contrario, no se detectaron alérgenos en el extracto completo de los piensos 3 y 4 ni en sus fracciones etanólicas (la figura no se muestra).

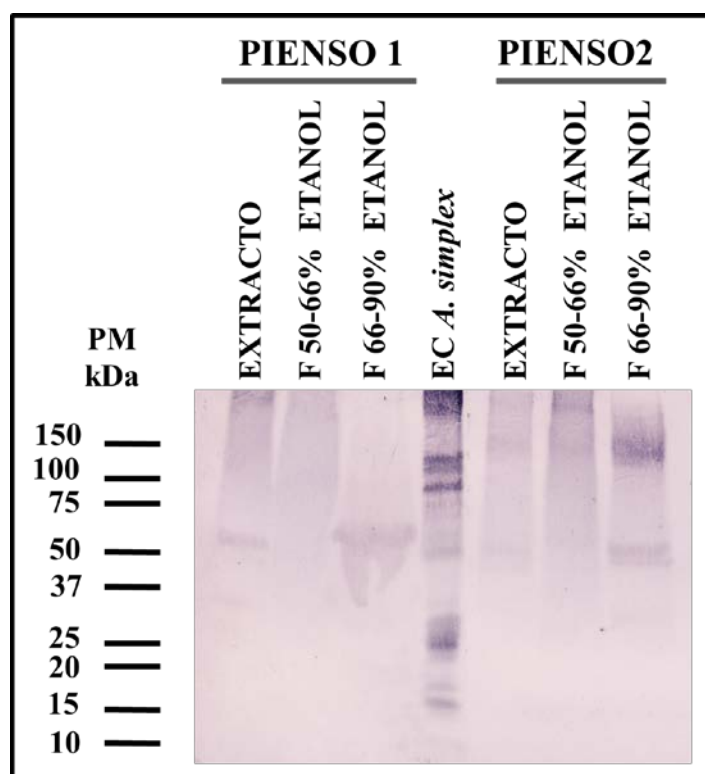


Figura 20. Presencia de alérgenos en piensos de acuicultura. Se muestra la inmunodetección de IgE de alérgenos de *A. simplex* en piensos para pescados de acuicultura (extracto completo, fracción 50-66% de etanol y fracción 66-90% etanol) con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *A. simplex*. EC: extracto crudo de *A. simplex*. PM: estándares de peso molecular.

Estos resultados apoyan los datos obtenidos con los anticuerpos policlonales de conejo, demostrando que los piensos de acuicultura contienen proteínas capaces de unir IgE de pacientes sensibilizados a *A. simplex*.

La fracción 66-90 % de etanol del pienso 2 fue sometida a RP-HPLC. Para seleccionar las fracciones que iban a ser analizadas por inmunodetección se hizo un primer rastreo de todas las fracciones eluidas por dot blot utilizando para el revelado anti-Ani s 1 y anti-Ani s 4 (la figura no se muestra). Aquellas fracciones que emitían señal fueron resueltas por electroforesis (Fig. 21).

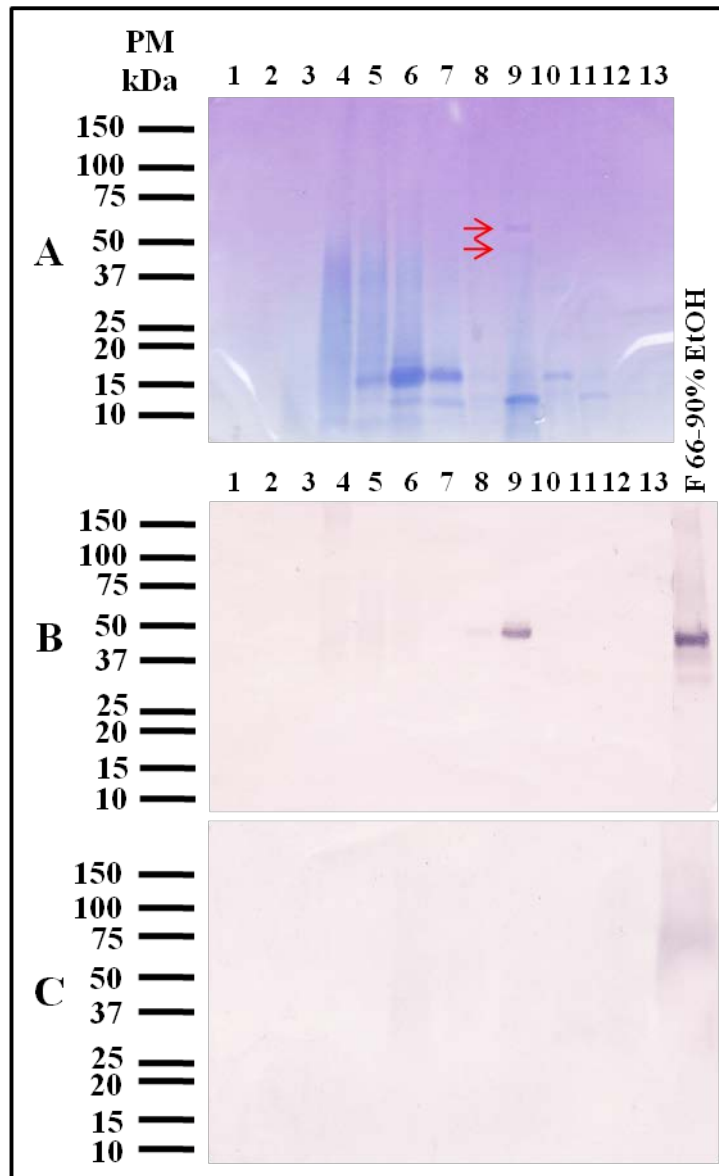


Figura 21. RP-HPLC de la fracción de 66-90% de etanol del extracto proteico del pienso 2. Las fracciones de RP-HPLC se resolvieron por electroforesis. A: Las proteínas fueron analizadas por SDS-PAGE. B: Inmunodetección de antígenos específicos de *A. simplex* en las fracciones eluidas con anticuerpo policlonal anti-Ani s 4. C: Inhibición de la inmunodetección de anti-Ani s 4 con 15µg de rAni s 4. A, B y C están alineadas con las mismas fracciones de RP-HPLC. 1-13: fracciones de RP-HPLC consecutivas. PM: estándares de peso molecular. Las proteínas analizadas por espectrometría de masas están señaladas con flechas.

Se detectaron varias proteínas en las fracciones eluidas por SDS-PAGE (Fig. 21A). Sobre estas fracciones se realizó inmunodetección con los anticuerpos policlones anti- ani s 1 y anti-Ani s 4. El antisuero anti-Ani s 1 no detectó ninguna proteína (la figura no se muestra). En el revelado con el anti-Ani s 4 se observó una

proteína de aproximadamente 50 kDa que también era detectada en la fracción 66-90% de etanol (Fig. 21B). Al hacer inhibición de la inmunodetección de anti-Ani s 4 con 15µg de rAni s 4 la proteína desaparece completamente, tanto en la fracción 66-90% de etanol como en la fracción eluida de RP-HPLC (Fig. 21C), indicando que la detección era específica.

Debido a que en el SDS-PAGE fueron visibles 2 proteínas próximas a 50 kDa (Fig. 21A) se optó por analizar ambas proteínas por espectrometría de masas. Los péptidos identificados fueron validados con el algoritmo Percolator y se aceptaron aquellos cuyo nivel de confianza es alto, para evitar falsos positivos. En la proteína con el peso molecular más alto (54 kDa) se identificaron hemoglobina, enolasa y tropomiosina y en la proteína con peso molecular bajo (50 kDa) se identificaron péptidos de Ani s 9, hemoglobina y enolasa (Tabla 5). Con los péptidos identificados se realizó una búsqueda de alineamiento de secuencias en la base de datos de secuencias de proteínas no redundantes mediante el programa Blast (www.expasy.org/proteomics) para comprobar si las secuencias peptídicas eran específicas de *Anisakis* sp. En la proteína de peso molecular alto (Fig. 22) los péptidos específicos de *Anisakis* sp. en la hemoglobina son: EAKQDGVLDLYK, HREGYTAADVQK, ETFDAYTHELMAR, QAWLEIGK, EFSSEITK, QNGVDLYK y LFAEYLDQK; en la enolasa el VSIAMDTAASEFYK y en el caso de la tropomiosina el péptido detectado no era específico del género. En el caso de la proteína de peso molecular bajo (Fig. 23) los péptidos específicos de *Anisakis* sp. fueron GGAVQAEFNK en el caso del Ani s 9 y EGYTAADVQK en la hemoglobina; el péptido detectado en la enolasa no era específico de *Anisakis* sp. Esto confirmaría la presencia de proteínas específicas del género *Anisakis* en los piensos que son destinados al alimento de los pescados de acuicultura.

Posteriormente se estudió si los alérgenos detectados en los piensos eran biológicamente activos. Para ello, muestras de sangre de 43 pacientes alérgicos a *A. simplex* se incubaron con el extracto del pienso 2 observándose activación en 10 de ellos (17% de basófilos activados, IQR = 10-49,5%). Hay que remarcar que los basófilos de dos de los pacientes se activaban tanto con pescado de acuicultura como con el pienso de piscifactoría. En la fig. 24 se muestra la estrategia de selección de la población de basófilos (paneles A y B) (descripción en Métodos) y el análisis de la activación de basófilos por citometría de flujo de estos dos pacientes con diferentes estímulos.

Tabla 5. Proteínas identificadas por espectrometría de masas en el pienso 2 de pescado de acuicultura, características y parámetros estadísticos. Score: parámetro estadístico de fiabilidad de la identificación. Coverage: % de péptidos identificados de la proteína. Péptidos: distintos péptidos identificados en esa proteína. PSMs: nº de identificaciones totales en cada proteína. AAs: nº aminoácidos. PM: peso molecular.

	Nº ACCESO	DESCRIPCIÓN	SCORE	COVERAGE	PÉPTIDOS	PSMs	AAs	PM (kDa)
PROTEÍNA PM ALTO	K9USK2	Hemoglobin (Fragment) OS=<i>Anisakis pegreffii</i> PE=2SV=1[K9USK2_9BILA]	393,56	30,42	12	157	309	36,6
	Q8MU59	Enolase OS=<i>Anisakis simplex</i> GN=eno PE=2 SV=1 - [Q8MU59_ANISI]	74,98	13,76	5	20	436	47,4
	G4XTD3	Tropomyosin OS=<i>Anisakis simplex</i> PE=2 SV=1 - [G4XTD3_ANISI]	5,94	3,17	1	2	284	33,1
PROTEÍNA PM BAJO	L7V0L4	Ani s 9 allergen OS=<i>Anisakis pegreffii</i> PE=2 SV=1 - [L7V0L4_9BILA]	9,15	12,24	2	3	147	15,5
	K9USK2	Hemoglobin (Fragment) OS=<i>Anisakis pegreffii</i> PE=2SV=1[K9USK2_9BILA]	2,96	3,24	1	1	309	36,6
	Q8MU59	Enolase OS=<i>Anisakis simplex</i> GN=eno PE=2 SV=1 - [Q8MU59_ANISI]	2,03	1,38	1	1	436	47,4

PROTEÍNA PM ALTO

HEMOGLOBINA

ELCMKSLEHAKVGSSEAKQDGVLDYKHMFEHYPMKCYFKHREGYTAADVQKDPLFIKQGGQNILLACHVVCATYDDRETFDAYTHELMARHERDHVRIIPNDVVAHFWEHFNMYLAEKTTMDEPTKQAWLEIGKEFSSEITKYGRPTVRDHCMSSELEHIAIGDEAHQKQNGVDLYKHMFEHYPHMRLAFKGRENYTAEDVQKDEFFVKQGHKILLALRMFCTSYPDDEPTDFDFVDALLDRHIKDDIHLPPAQWHEFWKLF AEYLDQKSHSHL TEDEKHSWTTIGEEFGHEADKHAKAGHHEGEHKEEHH

ENOLASA

MPITRIHARQIYDSRGNPTVEVDLTTEKGVFRAAVPSGASTGVHEALELRDGDKAVNHGKSVLKAVANINDKIAPAIVAKNFCSTQKKEIDQFMLDMDGTANKANLGANAILGVSLAVAKAGAVHKGMPLYKYIAELAGVKQVVMPVPSFNVIINGGSHAGNKLAMQEFMIMPIGAKNFTEAMRMGSEIYHHLKAEIKKRYGLDATAVGDEGGFAPNIQDNREGLDLLNTAIALAGYTGVSIAMDTAASEFYKADEKKYDLDFKNPNSDKSQWKTGDQLAEIYHSFVKEYPIVSIEDAFDQDDWENWTKFKSTLNIQLVGDLLTVNRRERIQMAIDKACDCLLLKVNQIGSVTESIEAAKLARANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLAVGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEELGSAAYVYAGEKFRNPQA

TROPOMIOSINA

MDAIKKKMQAMKIEKDNALDRADAEEKVRQMTDKLERIEEELRDTQKKMMQTENDLDKAQEDLSTANSNLEEKEKKVQEAEEVAALNRRMTLLEEELERAERLKLATAKLEEATHADESERVRKVMENRSFQDEERANTVESQLKEAQMLAEEADRKYDEVARKLTMVEADLERAEER AETGENKIVELEEELRVVGNLKSLEVSEEKALQR EDSYEEQIRTVSARLKEAETRAEFAERSVQKLQKEVDRLEDELVHEKERYKSISEELDQTFQELSGY

Figura 22. Identificación de proteínas de *Anisakis* sp. en pienso de acuicultura: alto peso molecular. Las proteínas identificadas en el pienso 2 fueron analizadas por espectrometría de masas de trampa iónica. Los péptidos identificados para hemoglobina (n° acceso K9USK2), enolasa (n° acceso Q8MU59) y tropomiosina (n° acceso G4XTD3) están en rojo y aquellos que además son específicos de *Anisakis* sp., están subrayados.

PROTEÍNA PM BAJO

Ani s 9

MKLCILAVAVFVAVSAQGPPLPPFVANAPPAVQAEFRQLANGAPDKTEAEIEAQIEQWVASKGGAVQAEFNKFKQMLEQGKARAEAAHQASLTRLSPA AKAADARLSAIASNRALKVGEKQRQLAAAFQALDPAVKAE LQKEMQG

HEMOGLOBINA

ELCMKSLEHAKVGSSEAKQDGVLDYKHMFEHYPMKCYFKHREGYTAADVQKDPLFIKQGGQNILLACHVVCATYDDRETFDAYTHELMARHERDHVRIIPNDVVAHFWEHFNMYLAEKTTMDEPTKQAWLEIGKEFSSEITKYGRPTVRDHCMSSELEHIAIGDEAHQKQNGVDLYKHMFEHYPHMRLAFKGRENYTAEDVQKDEFFVKQGHKILLALRMFCTSYPDDEPTDFDFVDALLDRHIKDDIHLPPAQWHEFWKLF AEYLDQKSHSHL TEDEKHSWTTIGEEFGHEADKHAKAGHHEGEHKEEHH

ENOLASA

MPITRIHARQIYDSRGNPTVEVDLTTEKGVFRAAVPSGASTGVHEALELRDGDKAVNHGKSVLKAVANINDKIAPAIVAKNFCSTQKKEIDQFMLDMDGTANKANLGANAILGVSLAVAKAGAVHKGMPLYKYIAELAGVKQVVMPVPSFNVIINGGSHAGNKLAMQEFMIMPIGAKNFTEAMRMGSEIYHHLKAEIKKRYGLDATAVGDEGGFAPNIQDNREGLDLLNTAIALAGYTGVSIAMDTAASEFYKADEKKYDLDFKNPNSDKSQWKTGDQLAEIYHSFVKEYPIVSIEDAFDQDDWENWTKFKSTLNIQLVGDLLTVNRRERIQMAIDKACDCLLLKVNQIGSVTESIEAAKLARANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLAVGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEELGSAAYVYAGEKFRNPQA

Figura 23 Identificación de proteínas de *Anisakis* sp. en pienso de acuicultura: bajo peso molecular. Las proteínas identificadas en el pienso 2 fueron analizadas por espectrometría de masas de trampa iónica. Los péptidos identificados para el Ani s 9 (n° acceso L7VOL4), hemoglobina (n° acceso K9USK2) y enolasa (n° acceso Q8MU59) están en rojo y aquellos que además son específicos de *Anisakis* sp., están subrayados.

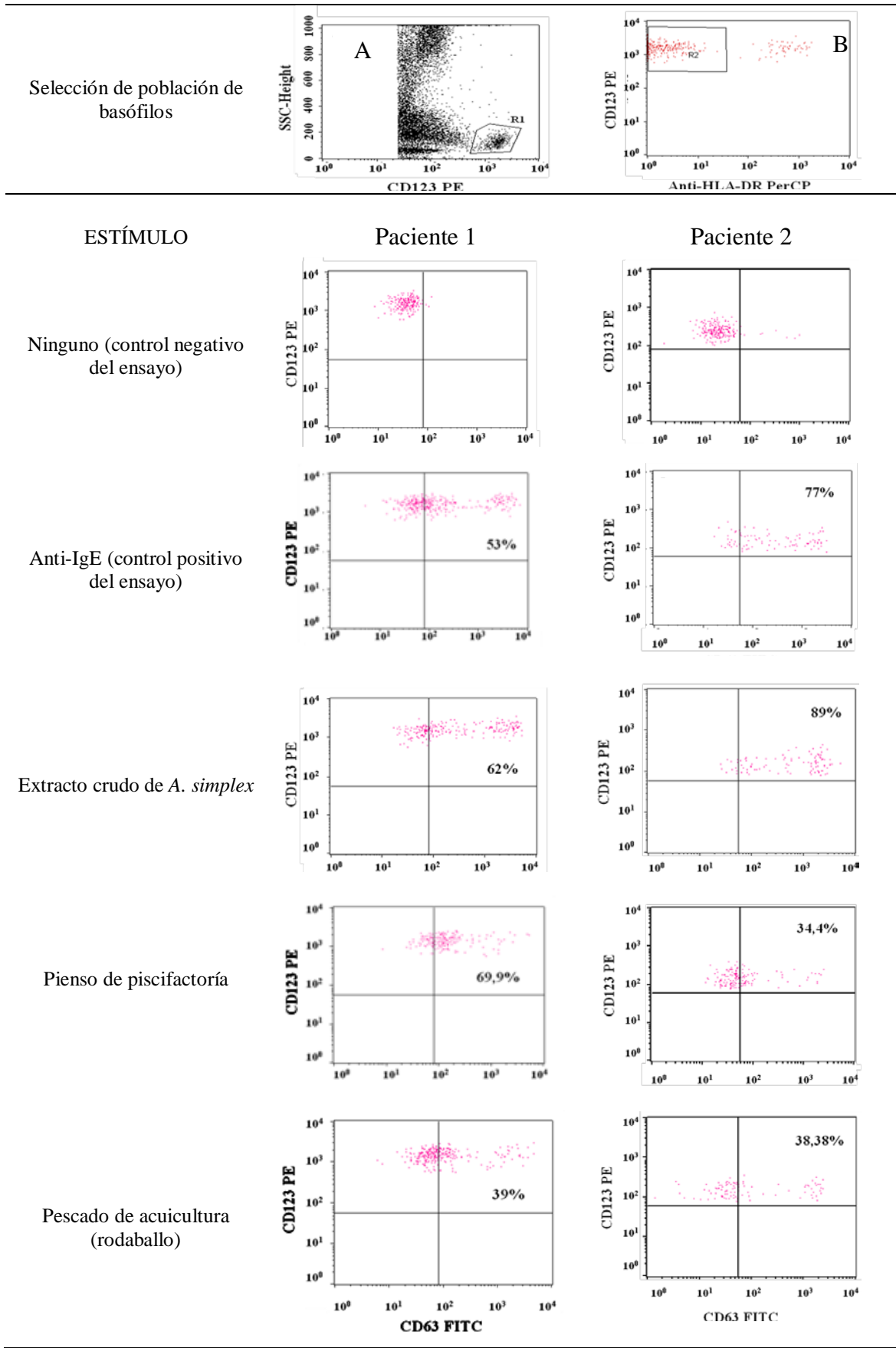


Figura 24. Análisis de activación de basófilos por extractos de pienso y pescado de acuicultura.

Respuesta inmune humoral a *Anisakis* sp.

Persistencia de la sensibilización IgE a alérgenos de Anisakis sp.

Se desconoce la evolución de los valores de IgE específica a lo largo del tiempo en pacientes sensibilizados a *A. simplex*. Por ello se estudiaron una serie de pacientes con al menos 30 meses de seguimiento.

Las características de los pacientes seleccionados para el seguimiento (n=17) se muestran en la tabla 6. En la primera visita presentaron síntomas gastrointestinales (grupo GI (n=3)) o alérgicos (grupo AL (n=6)) o síntomas gastrointestinales y alérgicos (grupo MX (n=8)) tras la ingesta de pescado crudo o poco cocinado, excepto el P14 que presentaba urticaria tras comer pescado cocinado (cabracho). El pescado consumido más frecuentemente relacionado con la aparición de síntomas fueron los boquerones en vinagre. El tiempo medio que transcurrió entre el episodio alérgico y la primera visita fue de un mes (IQR=0,85-7 meses). La media de duración del seguimiento fue de 49 meses (IQR=38-83 meses). Los pacientes P5, P7, P9 y P13 habían presentado episodios previos de alergia asociados con el consumo de pescado crudo. En la primera visita, además de la detección de IgE específica para *Anisakis* sp., se detectó IgE específica para Anisakis 1 en todos los pacientes e IgE específica para Anisakis 4 en cuatro de ellos mediante inmunodetección por IgE (Tabla 6). Aunque a los pacientes se les recomendó comer pescado de acuicultura y/o pescado previamente congelado, 5 no vuelven a incluir en su dieta el consumo de pescado ni productos de pesca durante todo el seguimiento (P2, P4, P7, P11 y P16) y se consideró que no habían estado re-expuestos a antígenos y alérgenos de *Anisakis* sp.

Se detectaron valores de IgE específica para *Anisakis* sp. positivos (>0,7 kU/L) en todos los pacientes a lo largo del seguimiento, excepto en P14, que tenía valores de

IgE específica para *Anisakis* sp. de 0,6 kU/L al final de período de seguimiento, en el mes 112.

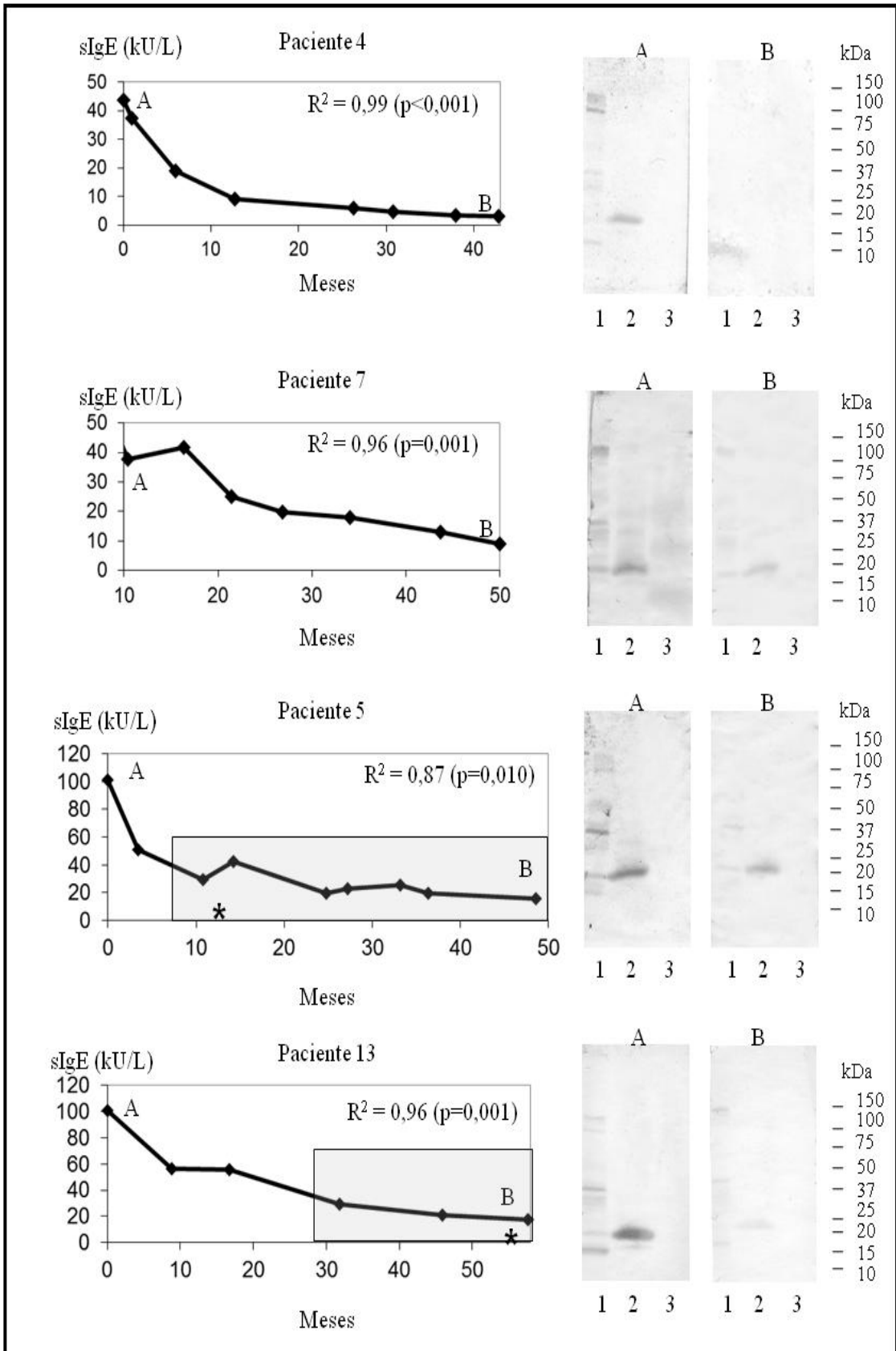
Los valores basales de IgE total (557 kU/L, IQR = 242-1648 kU/L) e IgE específica para *Anisakis* sp. (79 kU/L, IQR = 20-101 kU/L) fueron significativamente más altos que los valores de IgE total (184 kU/L, IQR = 57-410 kU/L; $p < 0,01$) e IgE específica para *Anisakis* sp. (13 kU/L, IQR = 3-21 kU/L, $p < 0,01$) al final del seguimiento. La media de los valores de IgE específica disminuyó en un 76% (IQR = 60%-88%) durante el período de seguimiento. La comparación de muestras pareadas entre las medidas basales y las finales muestran una disminución significativa en los títulos de IgE total ($p < 0,01$) e IgE específica ($p < 0,01$). No se encontraron diferencias significativas en los valores de IgE específica durante el período de seguimiento entre los pacientes que consumían habitualmente productos de pesca durante el seguimiento y los que no estuvieron re-expuestos a *Anisakis* sp.

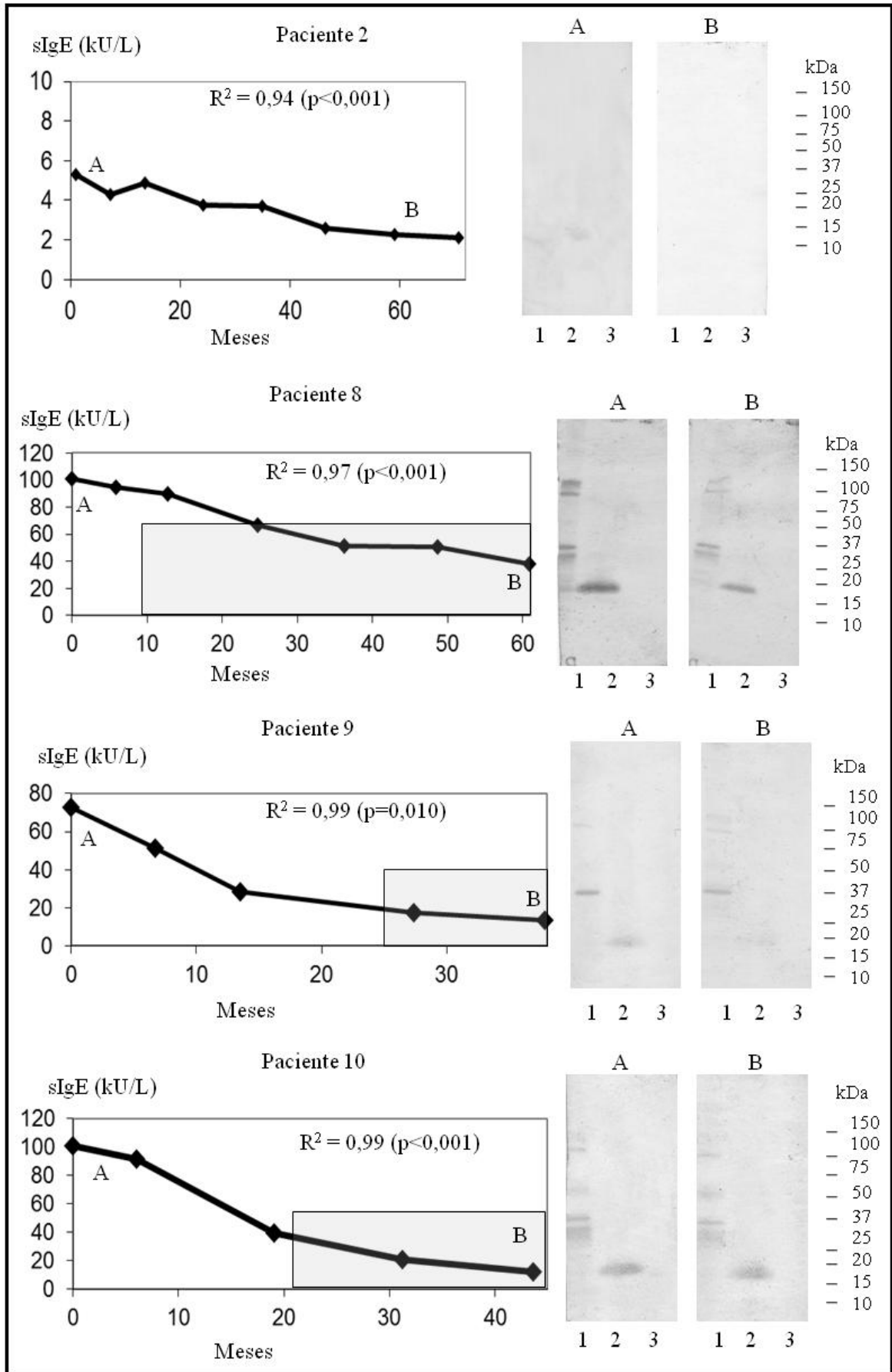
Tabla 6: Características de los pacientes seleccionados para el seguimiento.

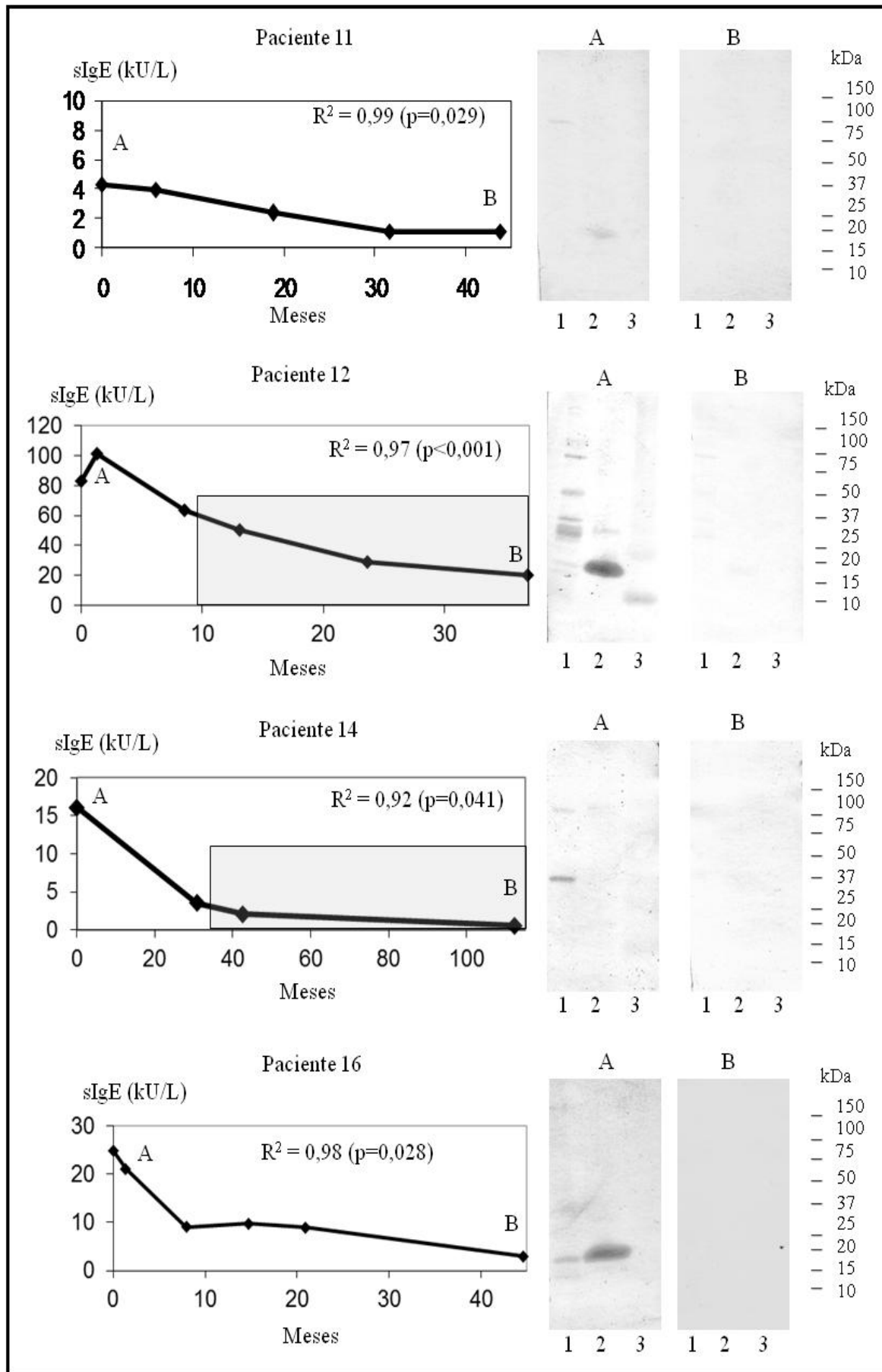
	Sexo	Edad	Síntomas	Te (meses)	Episodios alérgicos previos	Pescado	Detección de rAni s 1/rAni s 4	Seguimiento (meses)	Primera/última IgE total (kU/L)	Primera/última IgE específica (kU/L)
1	M	55	U, GI	0.6	n	anchoa	+/+	96	658/605	>100/23,7
2	M	48	AN, GI	12	n	anchoa, rape	+/-	71	28/20	5/2,1
3	M	63	AG, U, GI	0.6	n	anchoa	+/-	118	1740/437	32,4/21,7
4	F	30	U, GI	4	n	anchoa	+/-	43	341/41	43,9/3,18
5	M	62	GI	0.7	s	anchoa	+/-	49	541/70	>100/15,7
6	F	60	GI	1	n	merluza	+/-	95	1196/384	>100/52,5
7	F	50	U, GI	1	s	anchoa	+/+	50	1750/71	>100/8,95
8	F	54	U	1	n	anchoa	+/-	61	786/338	>100/37,8
9	F	64	AG, U, GI	5	s	anchoa	+/-	38	213/70	72,6/13,3
10	F	53	AN, U	1	n	anchoa	+/-	44	2958/258	>100/12,1
11	F	50	U	12	n	anchoa	+/-	38	57/45	4,3/1,1
12	M	27	U	1	n	anchoa	+/+	37	1557/440	82,8/20,1
13	F	54	U, GI	4	s	anchoa	+/-	58	327/103	>100/17,4
14	F	43	U	12	n	cabracho	+/+	112	557/347	16,1/0,6
15	F	32	U	0.6	n	anchoa	+/-	31	271/478	9,5/6,1
16	F	53	U, GI	3	n	anchoa	+/-	45	91/11	24,9/2,9
17	M	51	GI	9	n	anchoa	+/-	35	2423/184	79,2/20,6

M: masculino F: femenino; Te: tiempo entre el episodio alérgico y la 1ª visita; s: si n: no; U: urticaria, AG: angioedema, GI: gastrointestinales, AN: anafilaxia.

Para evaluar la tendencia de los cambios en los valores de IgE específica a *Anisakis* sp. se utilizó el análisis de regresión. La disminución de los valores de IgE específica a *Anisakis* sp. mostraba un ajuste exponencial o polinomial en 13/17 pacientes, incluyendo aquellos pacientes que no volvían a introducir el consumo de productos de pesca en la dieta durante el seguimiento (Fig. 25). Sin embargo, los cambios en los niveles de IgE específica a *Anisakis* sp. en 4 pacientes (P1, P3, P6 y P15) no se ajustaban a ningún modelo de regresión (Fig. 26). Los niveles de IgE específica para *Anisakis* sp. en P1 disminuyeron hasta 1 kU/L a los 10 meses, luego se incrementaron y se mantuvieron a >12 kU/L durante el resto del período del seguimiento. Inicialmente, P3 mostraba un 70% de disminución en los niveles de IgE específica para *Anisakis* sp. (de 50 kU/L a 14 kU/L) y luego, un año más tarde, se incrementó hasta 37 kU/L. Los cambios en los niveles de IgE específica para *Anisakis* sp. en P6 fueron similares a los de P1, con una disminución de los títulos de IgE específica hasta 3 kU/L a los 12 meses y un posterior incremento hasta los 50 kU/L en la siguiente visita. P15 presenta niveles de IgE específicos para *Anisakis* sp. moderados (10 kU/L) en la primera visita, que disminuyen un mes más tarde (6 kU/L) y se incrementan en la siguiente visita (Fig. 26).







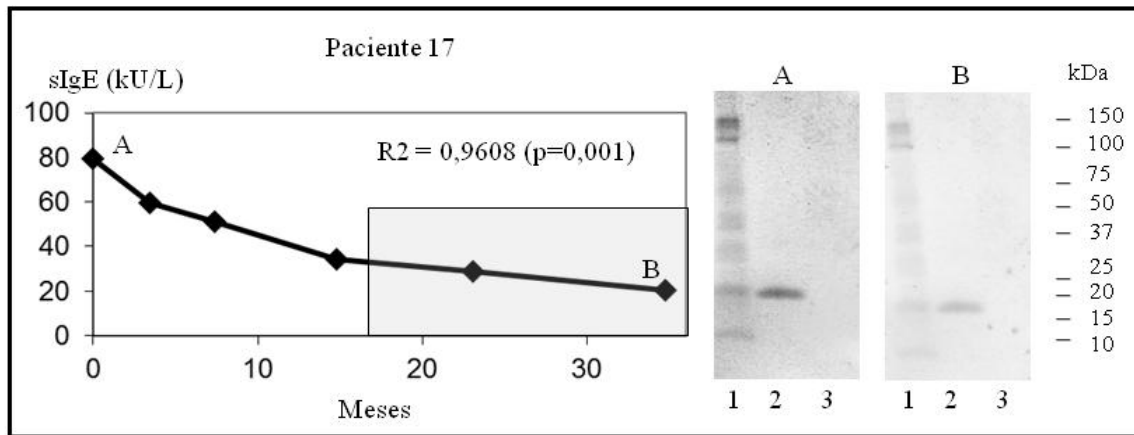


Figura 25. Cambios en los niveles de IgE específica (sIgE) para *Anisakis* sp. durante el seguimiento en los casos que se ajustan a un modelo de regresión. Se muestran el coeficiente de determinación (R^2) y los valores p. Las letras indican los puntos del seguimiento donde se realizó inmunodetección de IgE. Calle 1: extracto crudo *Anisakis* sp.; calle 2: rAni s 1 y calle 3: rAni s 4. Cajas grises: período en que los pacientes consumen pescado.*: momento en el que los pacientes presentan síntomas asociados con consumo de pescado.

El aumento de los niveles de IgE específica en estos 4 pacientes coincide con la reintroducción de pescado de acuicultura y pescado congelado en la dieta (Fig. 26). La comparación de muestras pareadas en estos pacientes no muestra diferencias significativas entre los valores de IgE total en la primera visita (927 kU/L, IQR = 367-1604 kU/L) y los valores de IgE total en la última visita (457 kU/L, IQR = 397-573 kU/L; $p=0,27$) o entre los valores de IgE específica para *Anisakis* sp. en la primera visita (66 kU/L, IQR = 15->100 kU/L) y los valores de IgE específica para *Anisakis* sp. en la última visita (23 kU/L, IQR = 10-45 kU/L; $p=0,07$). Cuando los títulos de IgE total y específica y la duración del seguimiento de los pacientes cuyos datos se ajustan al modelo de regresión se compararon con los de estos cuatro pacientes, sólo se encontró que los valores de IgE total en la última visita eran más altos en el último grupo (184 kU/L, IQR = 57-410 kU/L vs. 457 kU/L, IQR = 397-573 kU/L, $p < 0,01$).

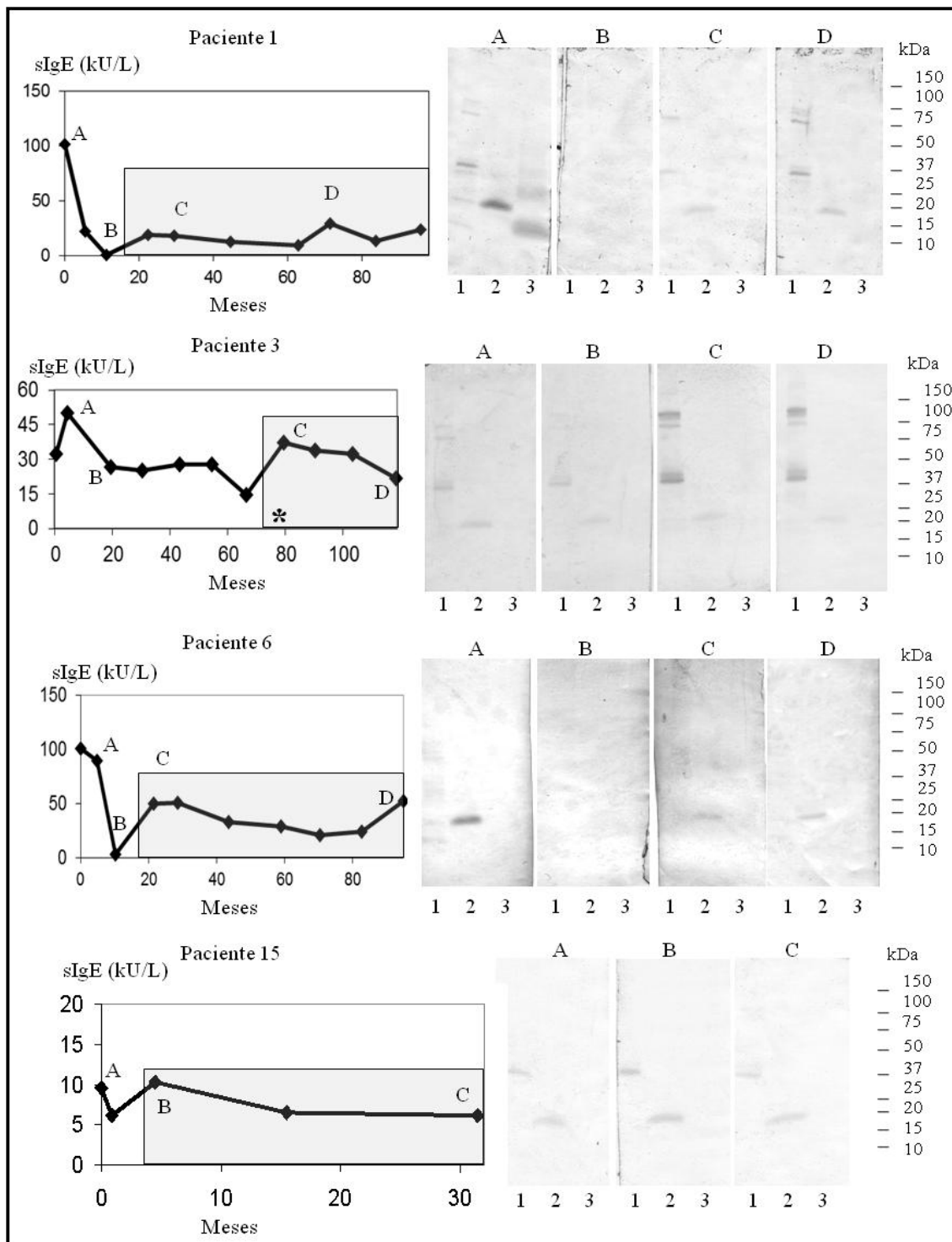


Figura 26. Cambios en la sensibilización IgE en pacientes cuyos niveles de IgE específica (sIgE) para *Anisakis* sp. no se ajustaban a una curva de regresión. Las letras indican los puntos del seguimiento donde se realizó inmunodetección de IgE. Calle 1: extracto crudo *Anisakis* sp.; calle 2: rAni s 1 y calle 3: rAni s 4. Cajas grises: período en que los pacientes consumen pescado. *: momento en el que los pacientes presentan síntomas asociados con consumo de pescado.

Tres de los pacientes presentaron síntomas durante el período de seguimiento. P3 presentó urticaria en manos tras comer bacalao que había congelado en su casa durante 72 horas (Fig. 26). P5 tuvo diarrea tras comer lubina de acuicultura (Fig. 25). En estos dos pacientes la aparición de síntomas coincidía con un incremento en los niveles de IgE específica. P13 presentó urticaria después de comer merluza congelada comercial (Fig. 25), pero este episodio ocurrió al final del seguimiento y no se pudo saber si los niveles de IgE específica para *Anisakis* sp. habían variado.

Para determinar si los cambios en los niveles de IgE específica a lo largo del tiempo se relacionaban con cambios en el reconocimiento del patrón de alérgenos, se realizó inmunodetección de IgE en diferentes puntos del tiempo de seguimiento. Como era de esperar, la inmunodetección de IgE inicial para el extracto crudo mostraba patrones diferentes en los distintos pacientes. El rAni s 1 fue detectado por todos los pacientes y el rAni s 4 por cuatro de ellos (Fig. 25, Fig. 26). La intensidad de las bandas del rAni s 1 variaba paralelamente con los niveles de IgE específica. Durante el período de seguimiento, se pudo observar que rAni s 4 desaparecía antes que rAni s 1, sugiriendo que el Ani s 4 es un marcador temprano de infestación. Por otro lado, el incremento de IgE específica para *Anisakis* sp. observado en algunos pacientes, se asoció con el incremento en la intensidad de algunos alérgenos del extracto crudo del parásito y de rAni s 1.

Respuesta humoral a alérgenos en Anisákidos distintos de Anisakis sp.

Para detectar si otros Anisákidos diferentes de *A. simplex* contienen alérgenos relevantes para pacientes sensibilizados, se analizó la presencia de alérgenos en el extracto crudo de *P. krabbei* y *C. osculatum* por inmunodetección de IgE con una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados a *A. simplex* y con los policlonales anti-

Ani s 1 y anti-Ani s 4. El patrón de alérgenos observado en *P. krabbei* y en *C. osculatum* es diferente al detectado en *A. simplex* (Fig. 27A). Tres alérgenos de 50, 44 y 32 kDa se detectaron en el extracto de *P. krabbei* y tres alérgenos de 50, 40 y 12 kDa en el de *C. osculatum*. Para el análisis de la reactividad cruzada de *P. krabbei* y *C. osculatum* con *A. simplex* se realizó inhibición de la inmunodetección de IgE con extracto crudo de *A. simplex*, y se observó casi una inhibición completa (Fig. 27 A y B). Mediante inmunodetección con anti-Ani s 1 (Fig. 27 C) y anti-Ani s 4 (Fig. 27 D), en el extracto de *P. krabbei* se pudo detectar un homólogo de Ani s 1 y otro de Ani s 4, pero éste con un peso molecular ligeramente más bajo que el de *A. simplex*. En el extracto de *C. osculatum* sólo se detectaba una banda clara de unos 37 kDa con anti-Ani s 1.

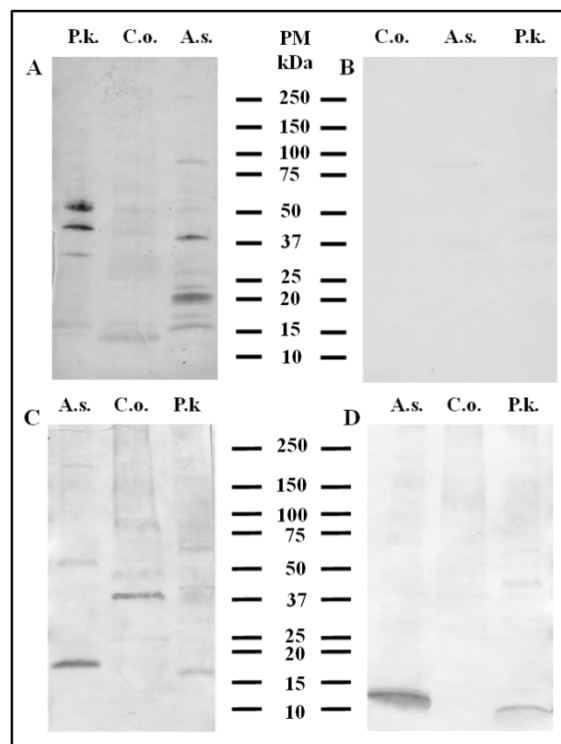


Figura 27. Inmunodetección de alérgenos en el extracto crudo de *A. simplex* (A.s.), *C. osculatum* (C.o.) y *P. krabbei* (P.k.). A: inmunodetección de IgE con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *A. simplex*. B: inhibición de la inmunodetección de IgE pre-incubando los sueros con 20 µg de extracto crudo de *A. simplex*. C: inmunodetección con anticuerpo policlonal anti-Ani s 1. D: inmunodetección con anticuerpo policlonal anti-Ani s 4.

Además, para comprobar si los alérgenos presentes en los extractos eran biológicamente activos se realizó un TAB (Fig. 28). El test mostró que los alérgenos de *P.krabbei* eran capaces de activar un porcentaje de basófilos similar al que se activa al utilizar como antígeno extracto de *A. simplex* en pacientes sensibilizados al parásito. El test no se pudo realizar para *C.osculatum* por falta de material.

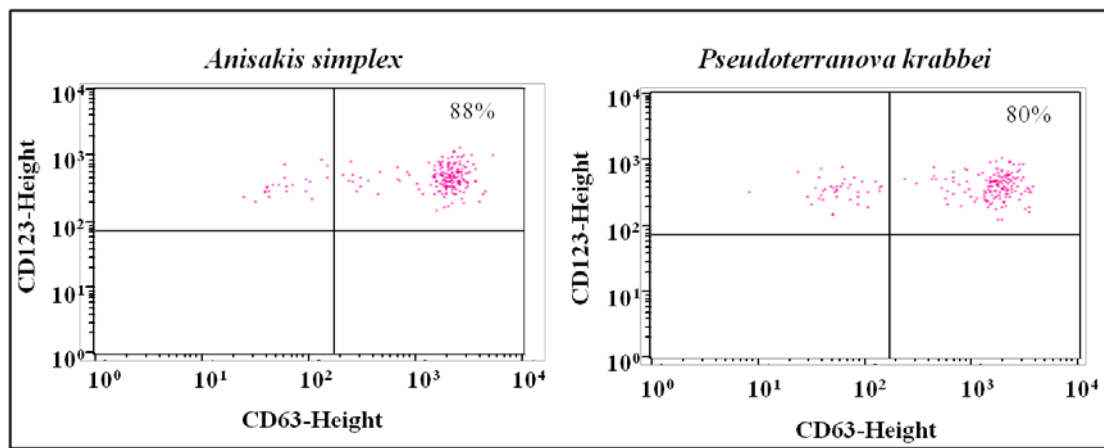


Figura 28. Ejemplo de TAB con extracto crudo de *A. simplex* y *P. krabbei* con un paciente alérgico a *A. simplex*.

Caracterización de la proteína de tipo Ani s 11 como un alérgeno de Anisakis simplex

En un intento de mejorar el diagnóstico de la alergia a *Anisakis* sp., se produjo la proteína de tipo Ani s 11 como recombinante y se analizaron sus características de termoestabilidad, resistencia a pepsina y su potencial uso en el diagnóstico resuelto por componentes. Para este estudio se incluyeron 51 pacientes alérgicos al parásito. Un 37% de los pacientes presentaban síntomas AL, que incluían urticaria, angioedema y/o anafilaxia, el 20% presentaban síntomas GI, como diarrea, vómitos y dolor abdominal y, un 43% presentaba síntomas MX. El pescado consumido más frecuentemente relacionado con el inicio de los síntomas fueron los boquerones en vinagre. Los valores

de las medianas de edad, IgE total e IgE específica para *Anisakis* sp. fueron de 57 años (IQR= 44-64), 259 kU/L (IQR= 88-608) y 41 kU/L (IQR= 9-67), respectivamente. Los datos clínicos y demográficos de cada paciente se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Datos clínicos y demográficos de los pacientes incluidos en el estudio con la proteína de tipo Anis 11.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Síntomas (a)	Hospedador	IgE total (kU/L)	sIgE <i>Anisakis</i> (kU/L)
1	Hombre	65	U, AG	Calamar	2394	384
2	Hombre	70	U	Boquerón	1657	262
3	Mujer	53	U, AG		923	88
4	Hombre	46	GI	Boquerón	275	14
5	Hombre	73	U	Boquerón	1004	81
6	Mujer	58	U, GI, AN	Bacalao	369	58
7	Mujer	61	U	Boquerón	483	47
8	Mujer	61	U	Boquerón	2624	405
9	Hombre	61	U	Merluza	330	44
10	Mujer	70	U	Merluza	1084	52
11	Mujer	44	U	Boquerón	325	2,83
12	Hombre	41	U, AG, GI	Boquerón	463	70
13	Mujer	38	GI, AN	Boquerón	146	35
14	Mujer	64	U, GI	Boquerón	81	3

15	Hombre	57	U	Boquerón	88	10
16	Mujer	63	U, GI	Salmonete	996	48
17	Mujer	43	AN, GI	Merluza	3255	88
18	Hombre	57	U, AG, GI	Boquerón	1834	83
19	Mujer	36	GI	Boquerón	235	67
20	Mujer	58	U, AG	Boquerón	337	62,6
21	Hombre	33	U	Boquerón	228	24
22	Hombre	42	GI	Boquerón	59	8
23	Hombre	51	U,AG,GI,AN	Boquerón	48	12
24	Hombre	62	U	Boquerón	224	41
25	Mujer	45	U, GI, AN	Boquerón	296	69
26	Mujer	66	U, GI	Boquerón	82	14
27	Mujer	44	U,AG,GI,AN	Boquerón	153	28
28	Mujer	46	GI	Boquerón	59	7
29	Mujer	52	U, AG, GI	Boquerón	157	5
30	Mujer	68	GI	Boquerón	236	51
31	Mujer	53	GI	Merluza	55	8
32	Hombre	58	U, GI	Boquerón	251	54
33	Mujer	64	U, AG, GI	Boquerón	156	57
34	Hombre	69	U, GI	Boquerón	773	34

35	Hombre	56	GI	Boquerón	1893	525
36	Mujer	67	U	Boquerón	2410	66
37	Mujer	62	U, GI	Lenguado	28	8
38	Hombre	64	AN	Merluza	354	37
39	Hombre	42	GI	Boquerón	59,6	8,04
40	Mujer	47	U, AG, GI	Merluza	59	8
41	Hombre	65	U, AG	Merluza	492	58
42	Hombre	42	U	Boquerón	160	31
43	Mujer	42	U	Boquerón	608	101
44	Mujer	62	U, AG, GI	Boquerón	29	6,56
45	Hombre	25	U	Merluza	259	5,49
46	Hombre	55	ND	ND	127	22,3
47	Mujer	65	U,GI	Boquerón	601	67,4
48	Mujer	49	GI	Boquerón	401	51,6
49	Mujer	33	U, GI	Boquerón	41	3,18
50	Mujer	68	GI	Merluza	197	21,1
51	Mujer	59	U,GI	Merluza	71	8,95

(a)U: urticaria; AG: angioedema; GI: gastrointestinales; AN: anafilaxia. ND: no disponible.

De acuerdo a los resultados obtenidos tras realizar inmunodetección por IgE, la frecuencia de reconocimiento para rAni s 1 fue del 80%, 27% para el rAni s 4, 25% para rAni s 5, y la frecuencia obtenida en el caso del recombinante de la proteína del tipo Ani s 11 fue del 82%. Únicamente dos pacientes analizados (P30 y P45) no detectaron

ninguno de los 4 recombinantes (Tabla 8). Ninguno de los controles sanos (n=40) reconocían los alérgenos recombinantes.

Tabla 8. Inmunodetección de IgE de alérgenos recombinantes rAni s 1, rAni s 4, rAni s 5 y el recombinante de la proteína de tipo Ani s 11.

Paciente	rAni s 1	rAni s 4	rAni s 5	Proteína de tipo Ani s 11
1	+	+	-	+
2	+	+	+	-
3	+	+	+	+
4	-	-	-	+
5	+	-	-	+
6	+	-	-	+
7	+	-	+	+
8	+	+	+	+
9	+	-	-	-
10	+	-	-	+
11	+	-	-	-
12	+	+	+	-
13	-	-	-	+
14	+	-	-	+
15	+	-	-	+
16	+	+	-	+
17	+	+	+	+
18	+	-	-	+
19	-	-	-	+
20	+	+	-	-
21	+	+	+	+
22	+	-	-	+

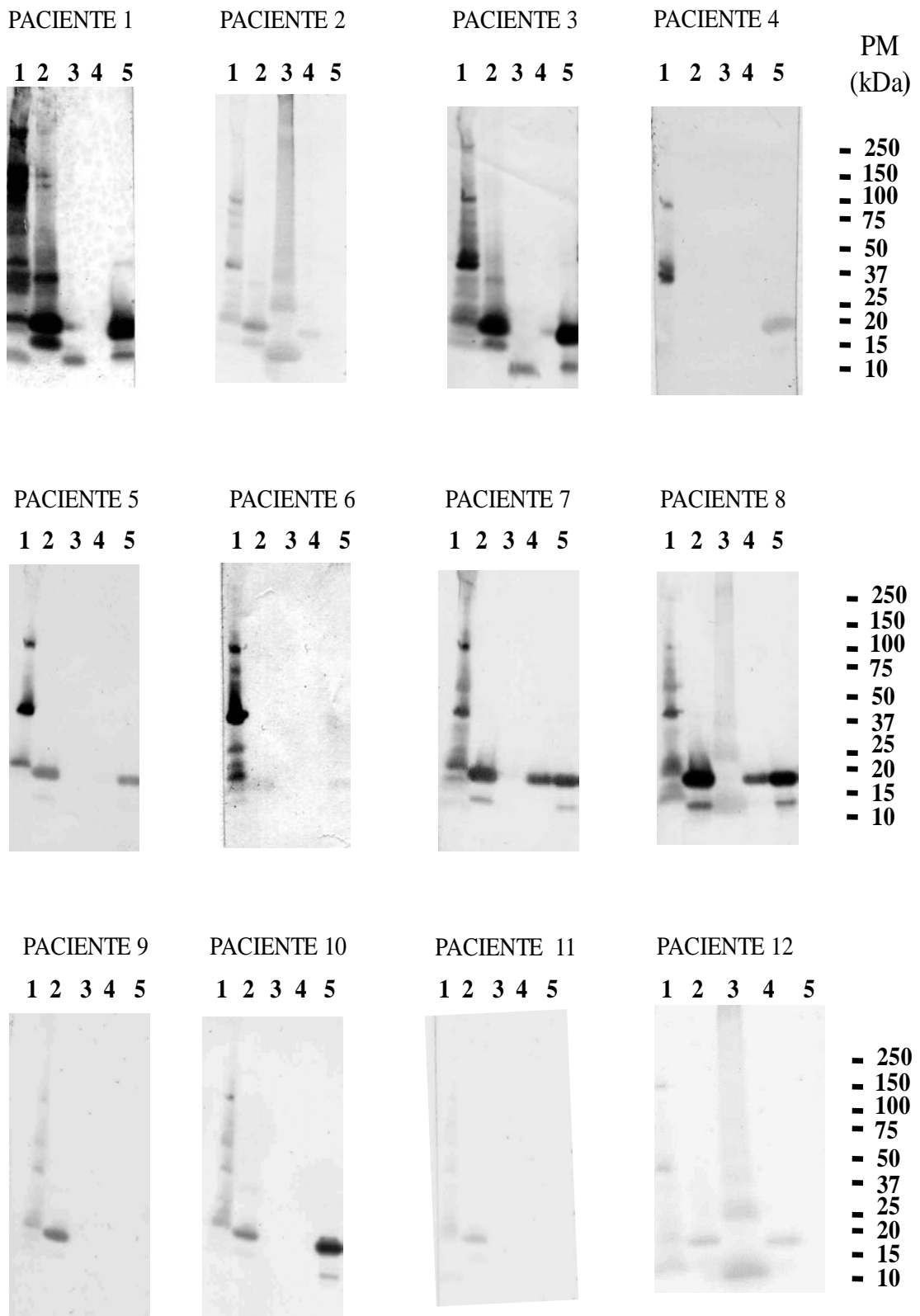
23	+	-	-	+
24	-	-	-	+
25	+	-	-	+
26	+	-	+	-
27	+	-	+	+
28	-	-	-	-
29	+	-	-	+
30	+	-	-	+
31	+	-	+	+
32	+	+	-	+
33	+	-	-	+
34	-	-	-	+
35	+	-	-	+
36	+	-	-	+
37	-	+	+	-
38	+	-	-	+
39	+	+	-	+
40	+	-	+	+
41	+	-	-	+
42	-	-	-	-
43	+	-	-	+
44	+	-	-	+
45	+	-	-	+
46	-	+	-	+
47	+	-	-	+
48	+	-	+	+
49	+	-	-	+

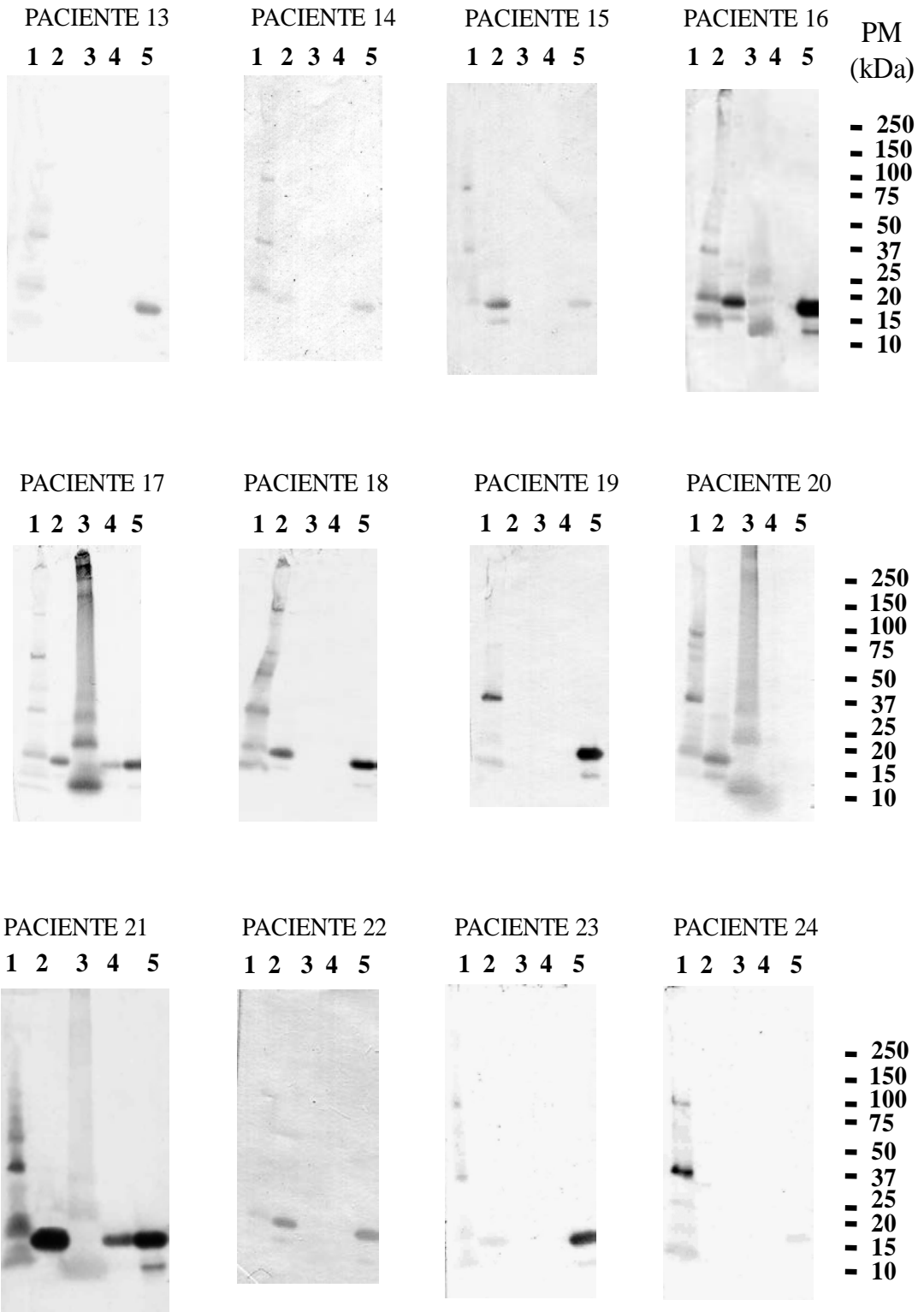
50	+	-	-	+
51	+	+	-	+

El sub-comité para la Nomenclatura de Alérgenos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS/OMS) ha admitido la proteína del tipo Ani s 11 como un nuevo isoalérgeno, nombrado como Ani s 11.0201 (<http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=706>).

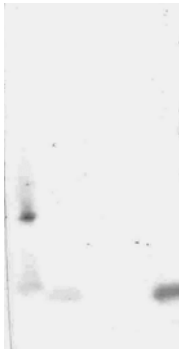
Se evaluó la existencia de una asociación entre el reconocimiento de alguno de los cuatro alérgenos recombinantes y la sintomatología que presentaban los pacientes (AL, GI, MX) pero, no se ha encontrado relación. Sin embargo, los datos indican que un 10% de los pacientes (5 pacientes) sólo detectaban Ani s 11.0201 y que es un alérgeno principal, ya que era detectado por más del 50% de los pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. (Tabla 8; Fig. 29). Tampoco se encontró asociación entre la detección de este alérgeno y las otras variables demográficas y clínicas.

También se analizó la termoestabilidad de Ani s 11.0201, porque es una característica de interés clínico cuando se sospecha que la exposición a alérgenos termoestables podría estar involucrado en la aparición de síntomas alérgicos. Este es un alérgeno termoestable, ya que mantiene su capacidad de unir IgE tras 30 minutos de ebullición (Fig. 30). Otra característica interesante es la resistencia a la digestión con pepsina. Nuestros resultados muestran que los epítomos de Ani s 11.0201 mantienen su capacidad de unir IgE tras 2 horas de digestión con pepsina (Fig. 30).

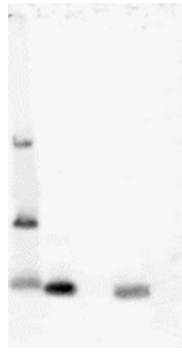




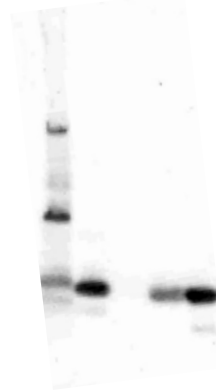
PACIENTE 25
1 2 3 4 5



PACIENTE 26
1 2 3 4 5



PACIENTE 27
1 2 3 4 5



PACIENTE 28
1 2 3 4 5

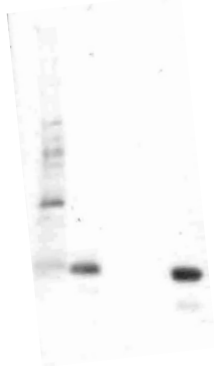


PM
(kDa)
- 250
- 150
- 100
- 75
- 50
- 37
- 25
- 20
- 15
- 10

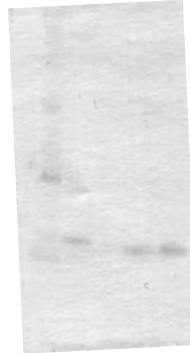
PACIENTE 29
1 2 3 4 5



PACIENTE 30
1 2 3 4 5



PACIENTE 31
1 2 3 4 5

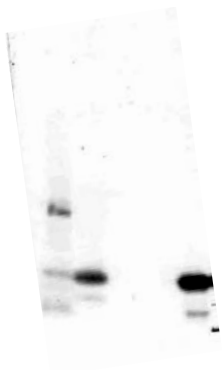


PACIENTE 32
1 2 3 4 5

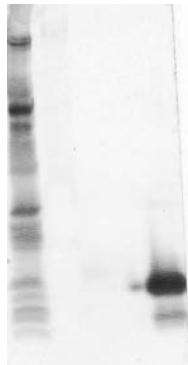


- 250
- 150
- 100
- 75
- 50
- 37
- 25
- 20
- 15
- 10

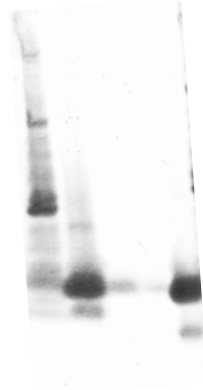
PACIENTE 33
1 2 3 4 5



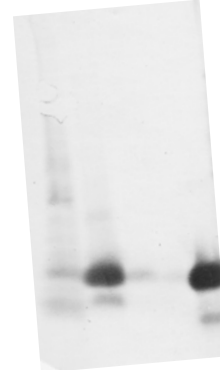
PACIENTE 34
1 2 3 4 5



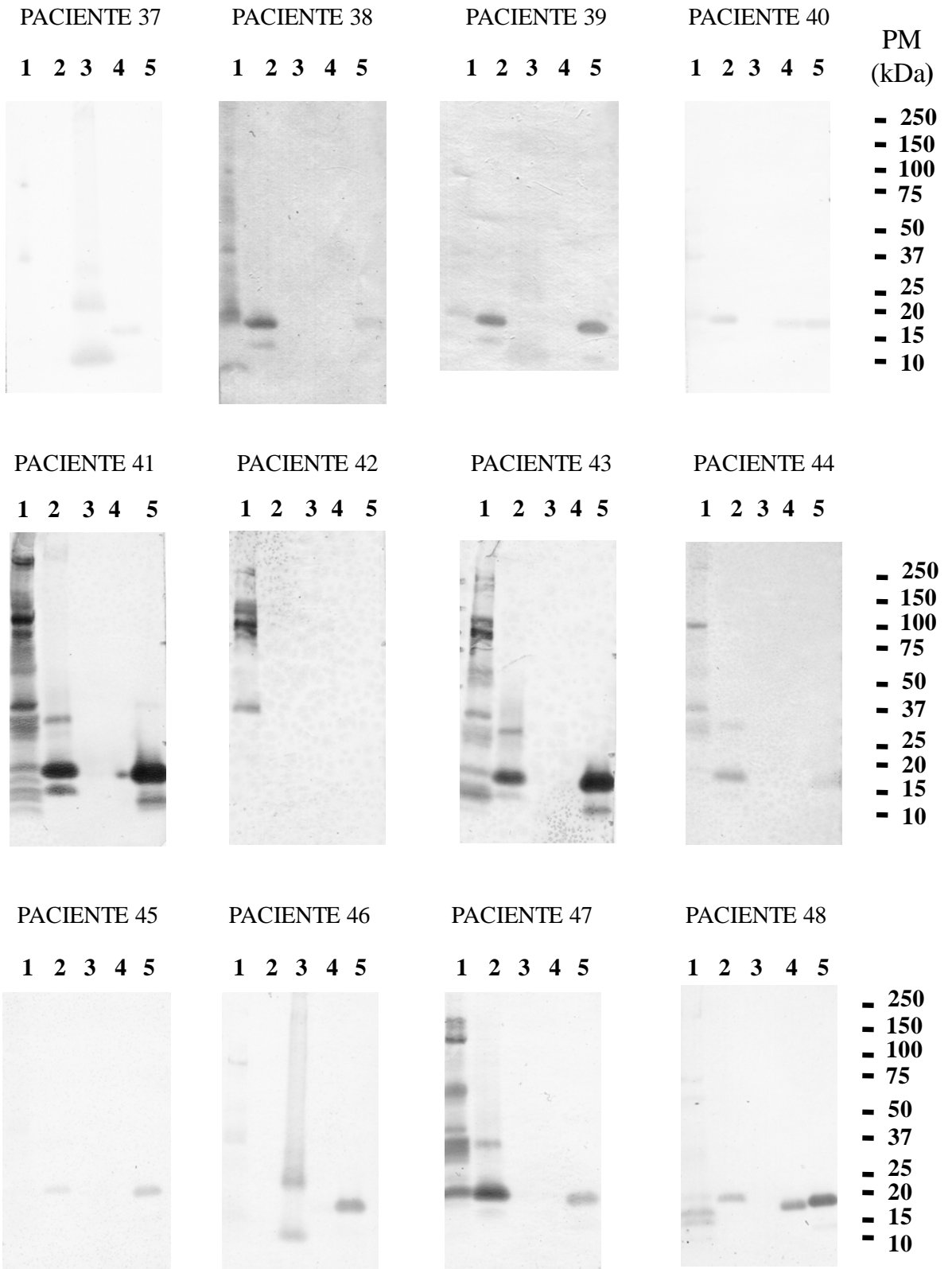
PACIENTE 35
1 2 3 4 5



PACIENTE 36
1 2 3 4 5



- 250
- 150
- 100
- 75
- 50
- 37
- 25
- 20
- 15
- 10



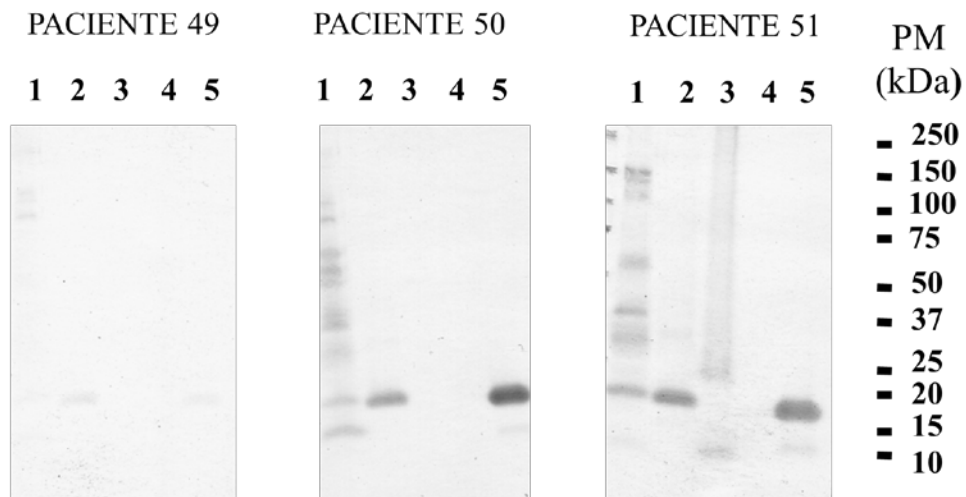


Figura 29. Diferentes patrones de unión de IgE para extracto crudo de *Anisakis* sp. y alérgenos recombinantes con suero de pacientes sensibilizados. Calle 1: extracto crudo, calle 2: rAni s 1, calle 3: rAni s 4, calle 4: rAni s 5 y calle 5: rAni s 11.0201.

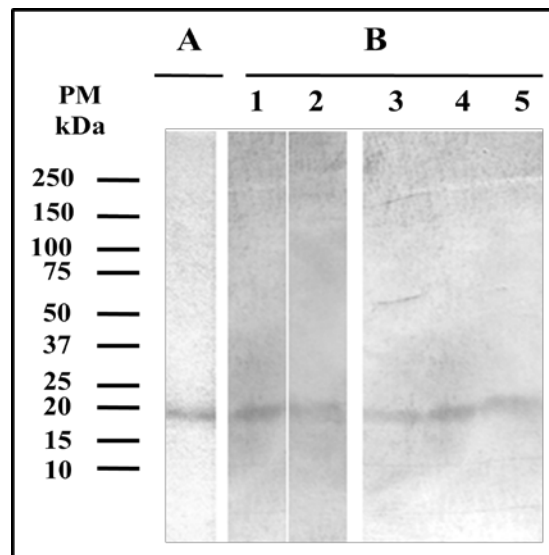


Figura 30. SDS-PAGE e inmunodetección de Ani s 11.0201. A: Tinción con Coomassie de Ani s 11.0201. B: Inmunodetección de IgE con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. de Ani s 11.0201 (calle 1), tras ebullición durante 30 minutos (calle 2), o tras digestión con pepsina 30 minutos (calle 3), 60 minutos (calle 4) y 120 minutos (calle 5). PM: estándares de peso molecular.

Cuantificación de inmunoglobulinas específicas a Anisakis sp.

Se cuantificaron en suero los niveles de IgG, IgG4, IgA e IgE específicas para *Anisakis sp.* mediante CAP-FEIA y los niveles de IgG, IgA e IgE específicos de alérgeno (rAni s 1, rAni s 4 y rAni s 5) mediante ELISA en un total de 51 pacientes alérgicos a *Anisakis sp.* (Tabla 7) y 40 controles sanos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9. En cuanto a lo encontrado en controles sanos, hay que destacar que algunos de ellos presentaban niveles de IgG (64%) y de IgA (52%) específicos de *Anisakis sp.* y que los niveles de IgE específica eran indetectables en todos ellos, además algunos también presentaban niveles detectables de IgG (IgG anti-Ani s 4 14% e IgG anti-Ani s 5 5,2%) y de IgA (IgA anti-Ani s 1 5,2%, IgA anti-Ani s 4 6,9 % e IgA anti-Ani s 5 1,7%) específicas de alérgeno. En el caso de los pacientes se observó que todos ellos presentaban niveles de IgG, IgG4, IgA e IgE específicas para el parásito y que, en algunos de ellos, también se podía detectar niveles de IgE (IgE anti-Ani s 1 70%, IgE anti-Ani s 4 32% y IgE anti-Ani s 5 65%), IgG (IgG anti-Ani s 4 15% y IgG anti-Ani s 5 3,5%) e IgA (IgA anti-Ani s 1 6,9%, IgA anti-Ani s 4 3,5% y IgA anti-Ani s 5 1,7%) específicos para los alérgenos estudiados. Los niveles de IgG, IgG4, IgA e IgE específicos para el parásito en pacientes eran más altos ($p < 0,001$) que en controles y se puede observar que sólo los pacientes detectan niveles de IgE específicos para *Anisakis sp.* y para los alérgenos analizados ($p < 0,001$). Al analizar los niveles de IgG y de IgA específicos de alérgeno sólo se han encontrado diferencias significativas entre pacientes y controles en los valores de IgA anti-Ani s 4, siendo más altos en el caso de los controles ($p < 0,01$). No se pudieron analizar los niveles de IgG anti-Ani s 1 obtenidos por ELISA ya que los resultados no eran fiables debido a la baja especificidad y sensibilidad.

Tabla 9. Cuantificación y comparación de los niveles de inmunoglobulinas contra extracto crudo y alérgenos de *A. simplex* en pacientes y controles.

	IgG anti-extracto (mgA/L)	IgG4 anti-extracto (mgA/L)	IgA anti-extracto (mgA/L)	IgE anti-extracto (kU/L)	IgE anti-Ani s 1 (A405nm)	IgE anti-Ani s 4 (A405nm)	IgE anti-Ani s 5 (A405nm)
Pacientes	13,5 (6,1-17,2)**	1,9 (0,3-2,3)**	2,4 (1,5-2,6)**	60,6 (9,8-68,5)**	0,5 (0,0-0,7)**(70%)	0,1 (0,0-0,0)**(32%)	0,5 (0,0-0,5)**(65%)
Controles	2,4 (0,2-3,9) (64%)	0,0 (0,0-0,1)	1,0 (0,0-2,0) (52%)	0,3 (0,3-0,3)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)

	IgG anti-Ani s 4 (A405nm)	IgG anti-Ani s 5 (A405nm)	IgA anti-Ani s 1 (A405nm)	IgA anti-Ani s 4 (A405nm)	IgA anti-Ani s 5 (A405nm)
Pacientes	0,2 (0,1-0,2) (15%)	0,4 (0,3-0,5) (3,5%)	0,4 (0,2-0,5) (6,9%)	0,1 (0,1-0,2) (3,5%)	0,1 (0,1-0,1) (1,7%)
Controles	0,2 (0,2-0,2) (14%)	0,5 (0,4-0,6) (5,2%)	0,5 (0,3-0,6) (5,2%)	0,2 (0,1-0,2)* (6,9%)	0,1 (0,1-0,2) (1,7%)

*p<0,01; **p<0,001

mgA: miligramo de anticuerpo específico.

En cuanto a la prevalencia de inmunoglobulinas específicas contra el extracto crudo, los valores de IgG específica positivos fueron más frecuentemente encontrados en pacientes (77,1%) que en controles (22,9%, $p < 0,001$). También se han encontrado diferencias significativas entre pacientes y controles en los niveles de IgG (73% vs 27%, $p=0,004$) e IgA (79% vs 21%, $p < 0,01$). Al analizar los niveles específicos para anti-Ani s 1, anti-Ani s 4 y anti-Ani s 5, sólo se encontraron diferencias significativas para la frecuencia de IgA anti-Ani s 4, que fue más baja en pacientes (33,3%) que en controles (66,7%, $p=0,046$).

Los pacientes también fueron analizados en cuanto a la sintomatología que presentaban (AL (n=19), GI (n=10) y MX (n=21)), pero no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de inmunoglobulinas (Tabla 10). En cuanto a la prevalencia de inmunoglobulinas específicas, el grupo AL muestra mayor frecuencia (90%) de IgE anti-Ani s 1 que el grupo GI (55,6%, $p=0,034$) y que el grupo MX (61,9%, $p=0,036$). La frecuencia de IgE anti-Ani s 4 entre el grupo AL y el GI es casi significativo (45% vs 11%, $p=0,076$). Se detecta IgA anti-Ani s 1 sólo en el grupo AL (20%), IgA anti-Ani s 5 sólo en GI (11%) y se detecta IgA anti-Ani s 4 tanto en el grupo AL (5%) como en el GI (11%), pero no se detectó en el grupo MX. No se observaron asociación entre los niveles de Igs específicas y las otras variables demográficas.

Tabla 10. Niveles de inmunoglobulinas específicas para *A. simplex* en pacientes agrupados por la sintomatología que presentan.

	IgG anti-extracto (mg_A/mL)	IgG4 anti-extracto (mg_A/mL)	IgA anti-extracto (mg_A/mL)	IgE Total (kU/L)	IgE anti-extracto (kU/L)	IgE Anti-Ani s 1 (A_{405nm})	IgE Anti-Ani s 4 (A_{405nm})	IgE Anti-Ani s 5 (A_{405nm})
Alérgico (n=19)	11,7 (5,4-22,6)	1,1 (0,3-4,7)	2,3 (1,8-3,2)	487,5 (275,5-1064)	50,1 (18,9-97,8)	0,5 (0,1-1,2)	0,02 (0,008-0,14)	0,3 (0,004-0,74)
Gastrointestinal (n=10)	9,8 (6,6-12,9)	1,4 (0,07-2,3)	2,1 (0,8-2,3)	235,5 (103,4-543,7)	38,3 (12,7-68,8)	0,08 (0,02-0,2)	0,01 (0,002-0,02)	0,2 (0,1-0,4)
Mixto (n=21)	10,2 (6,3-17,1)	0,9 (0,25-1,9)	2,1 (1,5-2,7)	146 (53,6-332,5)	17 (7,4-64)	0,15 (0,03-0,5)	0,01 (0,008-0,1)	0,19 (0,005-0,55)

	IgG Anti-Ani s 4 (A_{405nm})	IgG Anti-Anis 5 (A_{405nm})	IgA Anti-Ani s 1 (A_{405nm})	IgA Anti-Ani s 4 (A_{405nm})	IgA Anti-Ani s 5 (A_{405nm})
Alérgico (n=19)	0,19 (0,18-0,24)	0,49 (0,37-0,58)	0,5 (0,26-0,67)	0,19 (0,16-0,25)	0,15 (0,12-0,18)
Gastrointestinal (n=10)	0,2 (0,18-0,26)	0,52 (0,32-0,61)	0,34 (0,21-0,66)	0,16 (0,13-0,22)	0,17 (0,12-0,2)
Mixto (n=21)	0,19 (0,16-0,22)	0,42 (0,36-0,5)	0,29 (0,23-0,45)	0,17 (0,13-0,21)	0,13 (0,12-0,14)

mg_A: miligramo de anticuerpo específico

Respuesta inmune celular a *Anisakis* sp.

Respuesta efectora innata

La respuesta innata se evaluó mediante el TAB, incubando la sangre completa con diferentes antígenos del parásito. El porcentaje de basófilos activados inducidos por extracto crudo y alérgenos recombinantes en pacientes y controles se muestra en la tabla 11. En el caso de los controles sanos no se ha observado activación de basófilos.

Con los datos obtenidos del TAB se realizaron curvas ROC para establecer, para cada uno de los antígenos, un valor umbral que permita discernir entre pacientes y controles. Para el extracto crudo del parásito se estableció como valor umbral del 12% de basófilos activados utilizando una concentración de antígeno de 2 $\mu\text{g/mL}$ (sensibilidad y especificidad 100%, AUC = 1), para el rAni s 1 y rAni s 4 con una concentración de 0,44 $\mu\text{g/mL}$ el umbral fue del 3% (sensibilidad 89% y especificidad 100%, AUC = 0,95) y 2% (sensibilidad 56% y especificidad 100%, AUC = 0,86), respectivamente. En el caso del rAni s 5, con una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$, el umbral se situó en el 3% (sensibilidad 57% y especificidad 100%, AUC = 0,85) y el umbral fue del 3% para el rAni s 11.0201, con una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ (sensibilidad 71% y especificidad 95%, AUC = 0,88). Por otro lado, se han analizado los porcentajes de basófilos activados de acuerdo a la sintomatología que presentaban los pacientes (Tabla 12) y no se han observado diferencias significativas.

Tabla 11. Activación de basófilos inducida por extracto crudo del parásito y alérgenos recombinantes en pacientes y controles

	Control negativo (%)	Control positivo (%)	Extracto crudo (%)	rAni s 1 (%)	rAni s 4 (%)	rAni s 5 (%)	rAni s 11.0201 (%)
Controles	2,2 (1,2-3,2)	59,7 (40-84,1)	0,0 (0,0-0,5)	0,0 (0,0-0,3)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,6)	0,0 (0,0-0,3)
Pacientes	2,7 (1,4-3,2)	58,7 (38,1-81,0)	80 (52,7-86,6)*	61,15 (24,8-80,6)*	4,9 (0,4-58,6)*	5 (0,8-24,6)*	12,4 (1,9-52,1)*

*p<0,005

Tabla 12. Porcentaje de activación de basófilos de acuerdo a los síntomas presentados por los pacientes

	Control negativo (%)	Control positivo (%)	Extracto crudo (%)	rAni s 1 (%)	rAni s 4 (%)	rAni s 5 (%) *	rAni s 11.0201 (%) *
Alérgicos	2,5 (1,4-3,3)	58,4 (43,5-83,5)	82,4 (53,6-87,7)	63,4 (31,4-85,3)	5,6 (0,3-71,5)	0,8 (0,0-24,6)	2 (0,0-12,5)
Gastrointestinales	3 (1,2-5,3)	60,4 (51,6-80,3)	82,6 (74,8-87,9)	64,9 (16,1-77,1)	4,8 (0,4-9,6)	-	-
Mixtos	2,4 (1,4-3,1)	54,9 (21,7-75,1)	76 (32,7-86,1)	44,7 (24-80,6)	3,2 (0,08-61,1)	14 (2,1-53,7)	43,4 (11,2-72)

*: no hay datos de pacientes con síntomas gastrointestinales para rAni s 5 y rAni s 11.0201

Respuesta efectora adaptativa

La respuesta inmune Th1/Th2/Th17 para *A. simplex* y alérgenos del parásito (Ani s 1, Ani s 4 y Ani s 5) fue analizada por citometría de flujo mediante la cuantificación de citocinas (IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-5, IL-4 e IL-2) en los sobrenadantes de cultivos de sangre total de 51 pacientes con hipersensibilidad a *A. simplex* y 24 controles sanos. Los datos clínicos y demográficos de los pacientes se muestran en la tabla 7.

Todas las muestras fueron estimuladas durante 18 horas con PHA o con los antígenos a estudiar. En los cultivos controles (sin adición de antígeno) no se detectaron citocinas o estaban a concentraciones muy bajas (límites de detección para cada una de las citocinas indicados en metodología). La tabla 13 muestra los niveles de citocinas obtenidos para cada uno de los antígenos. Tras la estimulación con el mitógeno se detectaron niveles significativamente más altos de IL-17, IFN- γ , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 en el caso de pacientes que en controles.

En el caso de los controles, se observó secreción de grandes cantidades de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-6 tras la estimulación con Ani s 1 y Ani s 5. Con el extracto crudo del parásito se vio IL-6 e IL-2 y con Ani s 4 se secretaba IL-6, pero los casos en que era detectable, los niveles eran bajos.

Tabla 13. Niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivos en pacientes sensibilizados a *A. simplex* y controles sanos. Los datos representan la mediana y el IQR

		IL-17A (pg/mL)	IFN-γ (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-5 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-4 (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)
PHA	Controles	0,0 (0,0-0,0)	21,1 (0,0-42,7)	17,8 (4,6-43,9)	9,1 (3-21,8)	5,9 (3,1-24,3)	2833,5 (1482,5-4371,4)	0,0 (0,0-4,5)	0,0 (0,0-22,5)
	Pacientes	0,0 (0,0-23,6)*	43,2 (8,3-117,4)*	11,2 (0,0-47,6)	35,6 (3-58,2)*	33,4 (6,5-89,2)*	1919,1 (482,7-7948,8)	0,9 (0,0-35,6)*	5,6 (0,0-40)*
Extracto crudo <i>A. simplex</i>	Controles	INDETEC	0,0 (0,0-15,5)	0,0 (0,0-14,2)	0,0 (0,0-83,8)	0,0 (0,0-35,7)	54,5 (17,6-155,4)	0,0 (0,0-0,0)	34,5 (8,1-105,2)
	Pacientes	0,0 (0,0-29) *	26,1 (0,0-43,6) *	39,1 (11,9-113,1) **	14,9 (0,0-28,9)	132,1 (50-378) **	252,7 (78,5-1642,5) *	42,8 (14,9-115,8) **	2280,1 (582,6-4311,5) **
Ani s 1	Controles	INDETEC	17 (0,0-28,6)	1781,2 (475,1-2720,7)	1182,4 (613,5-1868,1)	0,0 (0,0-0,0)	48618,1 (38822,8-58759,6)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
	Pacientes	0,0 (0,0-36,9)*	0,0 (0,0-30,8)*	33,8 (9,2-68,8) **	76,7 (37,3-120,4) **	10,8 (0,0-21,7) *	6669 (3560-14213) **	0,0 (0,0-23,4) *	35,5 (6,3-62,9) **
Ani s 4	Controles	INDETEC	INDETEC	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-12,9)	INDETEC	INDETEC
	Pacientes	0,0 (0,0-31) *	16 (0,0-42,6) **	40,6 (6,5-89,6) **	608 (352,6-880,3) **	0,0 (0,0-17,2) *	13347 (5732,4-18618,6) **	0,0 (0,0-29,7) *	0,0 (0,0-33,4) *
Ani s 5	Controles	INDETEC	51,8 (22,5-134,3)	1481,7 (266,6-2294,8)	1025,7 (514,4-1559,9)	0,0 (0,0-0,0)	49621,9 (46909,9-58145,7)	INDETEC	INDETEC
	Pacientes	33,4 (28,6-44,1) **	5,3 (0,0-25,4) *	22,9 (1,6-194,6) *	996,5 (481-1648,9)	0,0 (0,0-0,0)	25528,8 (12862,6-31552,7) *	INDETEC	INDETEC

*p<0,05; **p<0,001 pacientes vs. controles.

En el caso de los pacientes, se observó secreción de grandes cantidades de IL-4 e IL-5 con el extracto crudo e IL-5 con Anis 1. Con Anis 4 y Anis 5, principalmente se secretaban IFN- γ , TNF- α , IL-10. Respecto a la IL-17, sólo algunos de los pacientes secretaban niveles detectables de IL-17 al ser estimulados con el extracto crudo y los alérgenos.

Se realizó un análisis de correlación para ver si había alguna asociación entre los niveles de citocinas detectadas en los sobrenadantes de los cultivos y el tiempo transcurrido desde el episodio alérgico. Lo que se observó es una disminución en la secreción inducida de IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-5 a medida que aumentaba el tiempo transcurrido, mientras que los niveles de IL-10 permanecían inalterados. Hay que destacar que las concentraciones de IL-10 se correlacionaban positivamente con las de IFN- γ , TNF- α e IL-6 (Anexo I).

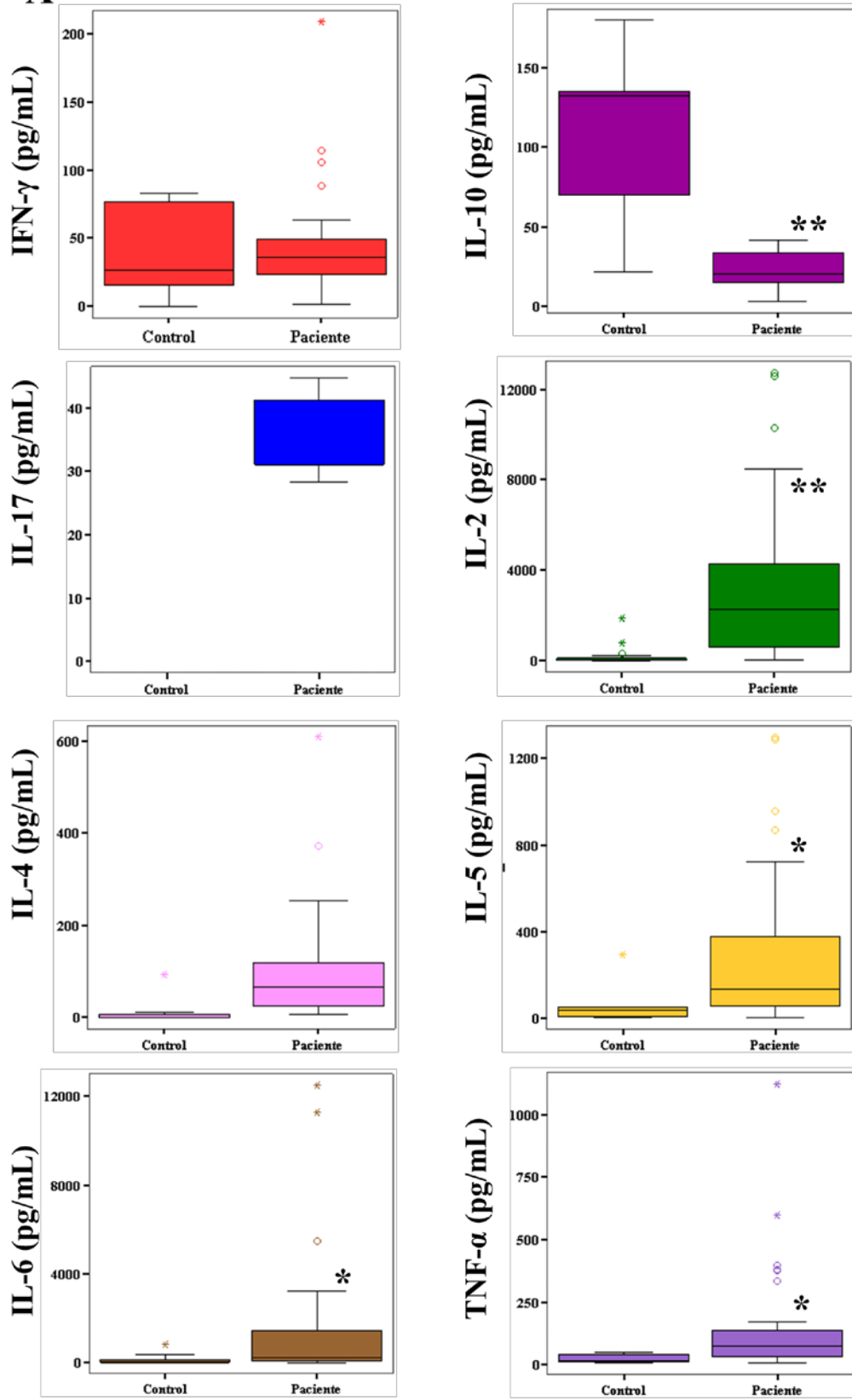
Para comparar los niveles de citocinas obtenidos entre pacientes y controles se realizó un análisis estadístico, sólo teniendo en cuenta aquellos casos con valores de citocinas que eran detectables (Fig. 31). Los resultados son similares a los mostrados en la tabla 13.

Para determinar la respuesta predominante Th1 o Th2 se evaluó el cociente IFN- γ /IL-5 (Th1: IFN- γ /IL-5 ≥ 2 y Th2: IFN- γ /IL-5 $\leq 0,5$) en pacientes y controles. Se obtuvieron diferentes perfiles de respuesta Th1/Th2 dependiendo del tipo de antígeno (Fig. 32). Anis 1 inducía, en los controles, una respuesta Th1 con altos niveles de IFN- γ y TNF- α . Por el contrario, en los pacientes la respuesta era Th2 con altos niveles de IL-5 e IL-4. Además, existían diferencias significativas en el patrón de respuesta observada en pacientes y controles. En los pacientes se observaba un patrón de respuesta de tipo Th1 con Anis 4 y la producción de citocinas ha sido indetectable en casi todos los

sujetos control. En cuanto al Anis 5, se observó un predominio en la respuesta de tipo Th1 tanto en controles como en pacientes con secreción de IFN- γ y de TNF- α , siendo mucho mayor en el caso de los controles. Además, no se detectó, ni en pacientes ni en controles, secreción de IL-2, IL-4 e IL-5. En este caso sólo se han podido analizar 10 de los pacientes sensibilizados. Por último, con el extracto crudo del parásito se observó un predominio en la respuesta de tipo Th2 en el caso de los pacientes con altos niveles de IL-5 ($p < 0,05$) e IL-4 y los controles producían, principalmente, IL-10 ($p < 0,05$) e IFN- γ .

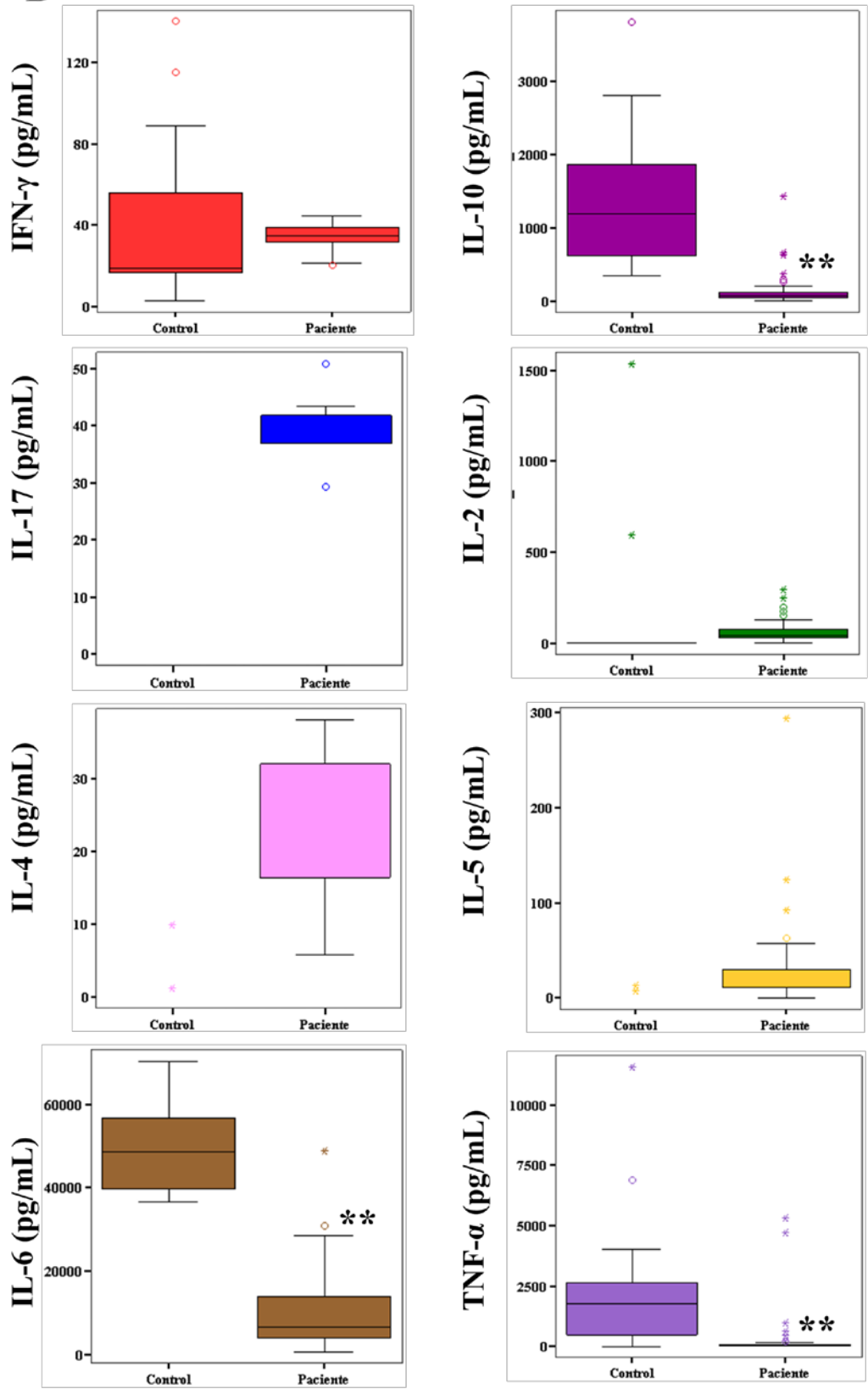
Extracto crudo de *A. simplex*

A

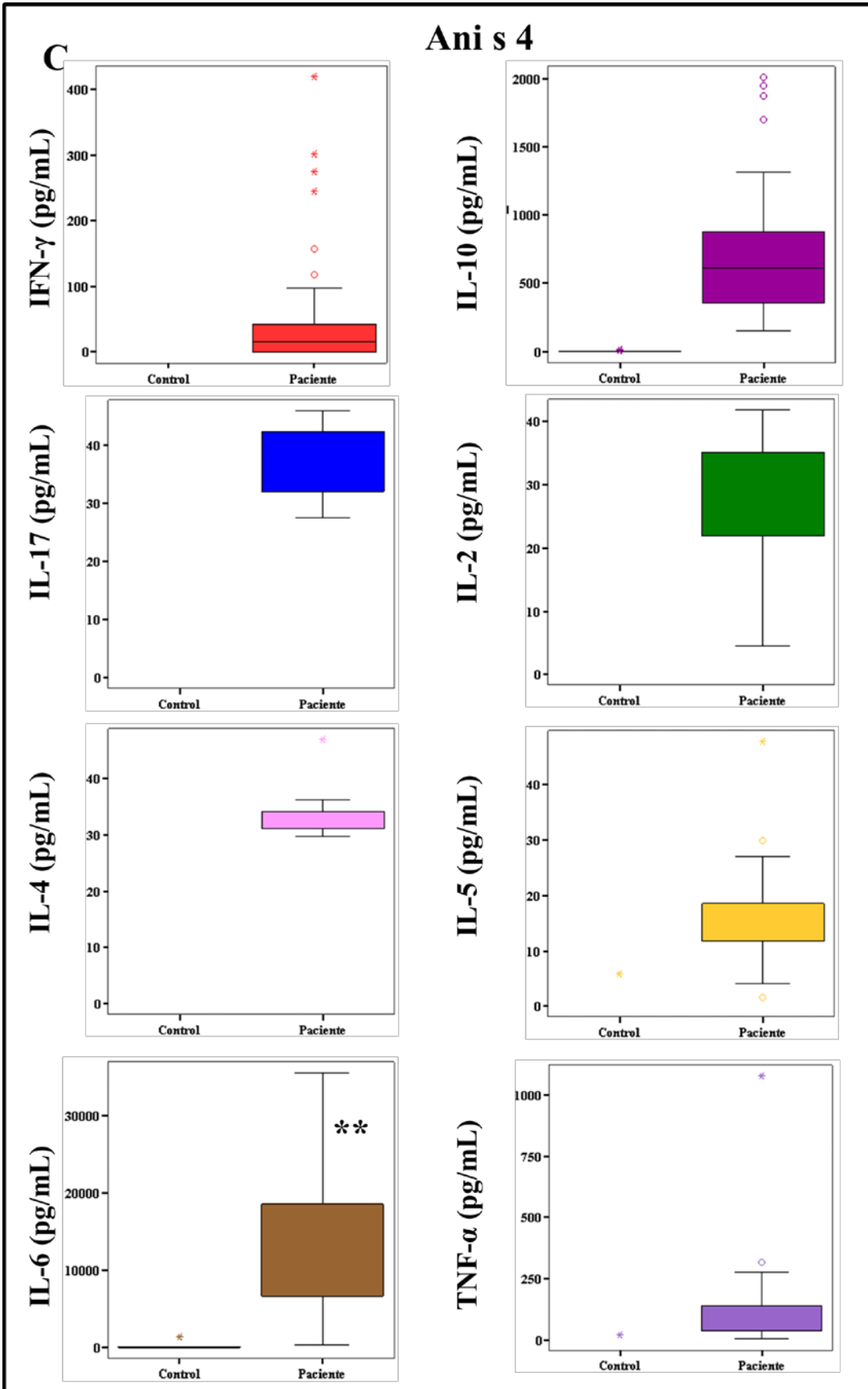


Ani s 1

B



Ani s 4



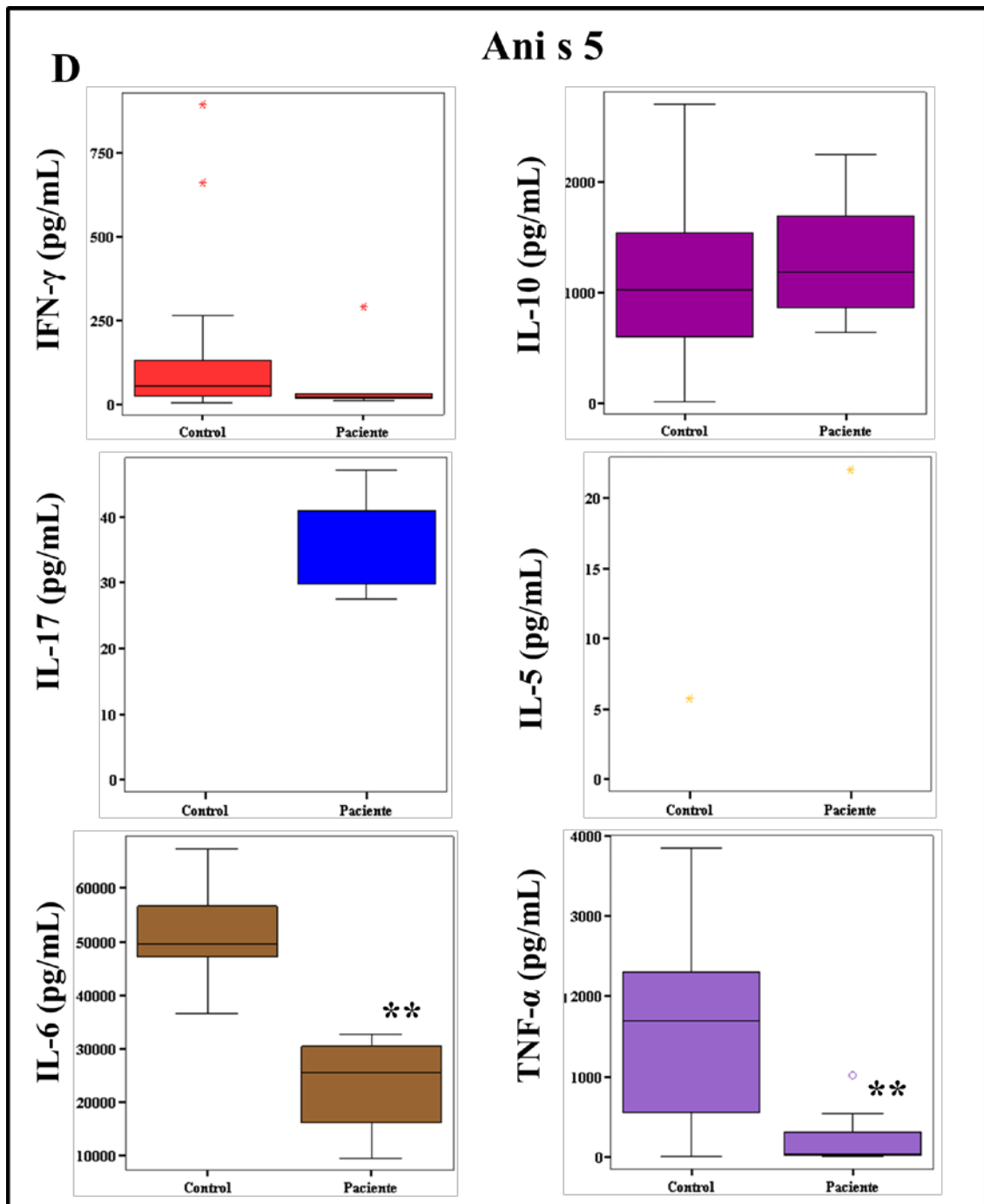


Figura 31. Patrón de secreción de citocinas en pacientes alérgicos a *A. simplex* y controles sanos tras ser estimulados con diferentes antígenos. A, B, C y D: estimulación con extracto crudo de *A. simplex*, Ani s 1, Ani s 4 y Ani s 5, respectivamente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ pacientes vs. controles.

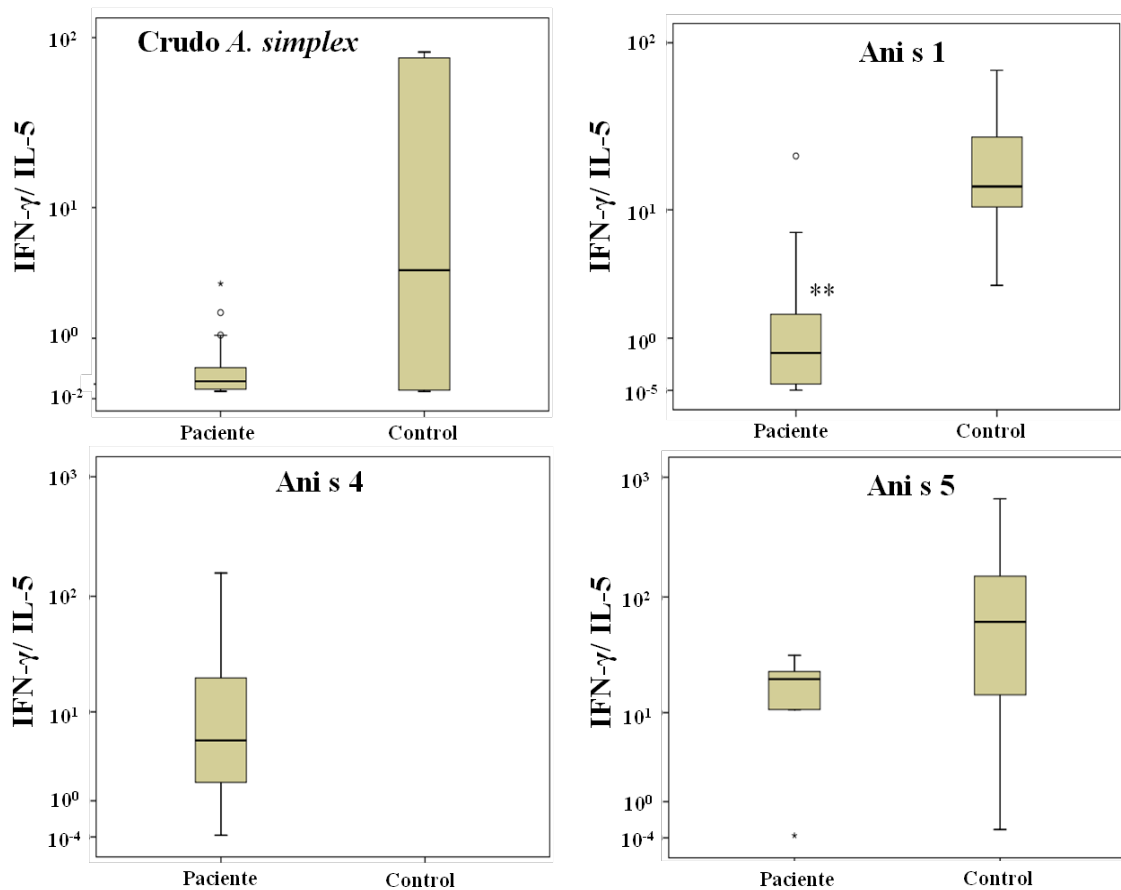


Figura 32. Balance de la respuesta Th1/Th2 en pacientes alérgicos a *A. simplex* y controles sanos en función del estímulo antigénico utilizando la ratio IFN- γ / IL-5. ** p<0,001 pacientes vs. controles.

Otra forma de confirmar el tipo de respuesta que induce cada uno de los antígenos utilizados para llevar a cabo el ensayo sería utilizar la ratio IFN- γ /IL-4 (Fig. 33). Usando esta ratio se confirma el patrón de respuesta observado para cada uno de los antígenos, con diferencias significativas en el caso del Ani s 1 pero además, también se observan diferencias significativas en el patrón de respuesta producido con el extracto crudo del parásito entre pacientes y controles.

Los datos indican que los controles, no alérgicos y consumidores de pescado, presentan una polarización Th1 en respuesta a Ani s 1 y Ani s 5, mientras que en los pacientes se observó una respuesta Th1 a Ani s 4 y Ani s 5, pero con el extracto crudo y

Años 1 las respuestas observadas eran de tipo Th2. Hay que mencionar que en las respuestas Th1, tanto en controles como pacientes, se detectaban altas concentraciones de IL-10.

Por otro lado, al analizar la secreción de citocinas en cuanto a la sintomatología que presentaban los pacientes (AL, GI o MX) no se observaron diferencias significativas. Tampoco se observó ninguna asociación entre los niveles de citocinas y las otras variables recogidas.

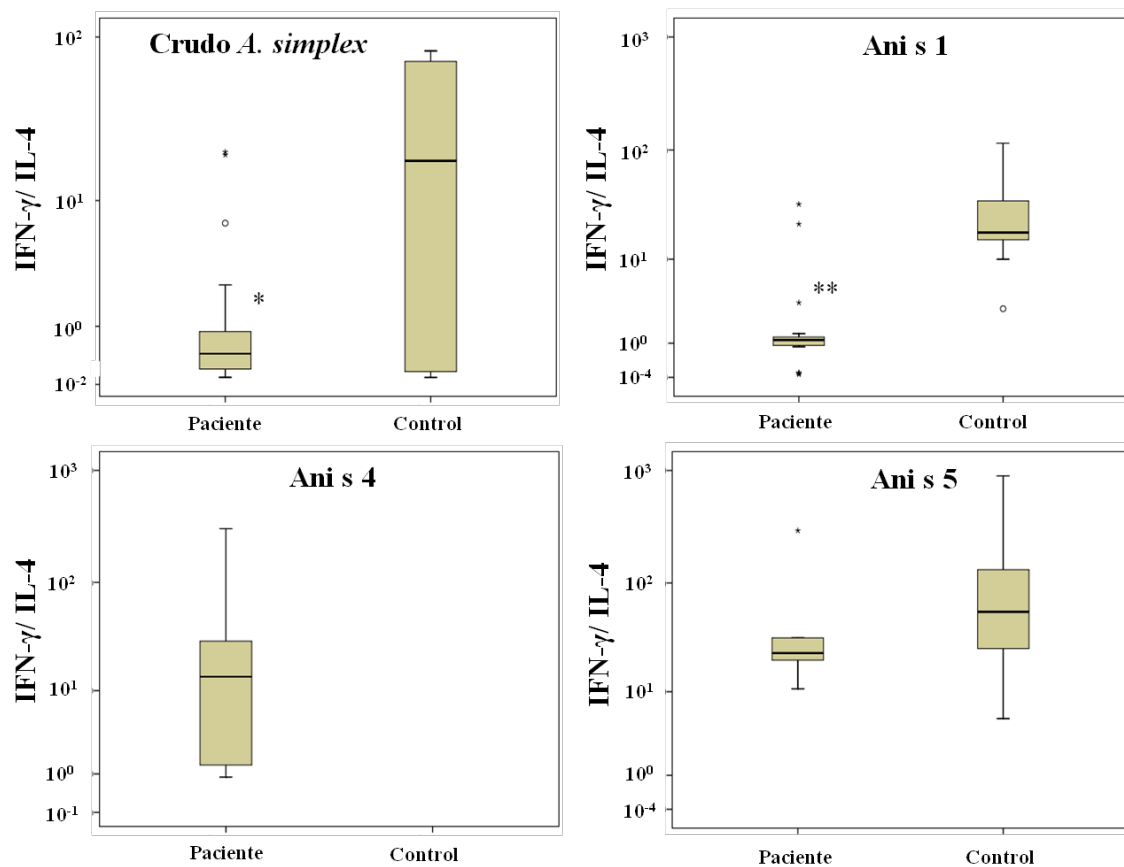


Figura 33. Balance de la respuesta Th1/Th2 en pacientes alérgicos a *A. simplex* y controles sanos en función del estímulo antigénico utilizando la ratio IFN- γ / IL-4. *p<0,05; ** p<0,001 pacientes vs. controles.

Discusión

Caracterización del riesgo de exposición a anisákidos

La infestación por *A. simplex* puede provocar episodios alérgicos en individuos sensibilizados cuando se consume pescado parasitado con larvas vivas. Estas reacciones alérgicas pueden ser provocadas también por la exposición a alérgenos en ausencia de larvas vivas y, por lo tanto, pueden tener lugar de forma independiente a un episodio de anisakiasis aguda (EFSA, 2010). Un paciente puede estar expuesto a alérgenos del parásito al consumir áreas de un pescado fresco que no contengan larvas pero que pueden estar contaminadas con proteínas del parásito (Solas MT et al., 2008) excretadas/secretadas durante la migración de la larva por el músculo del pescado. Por otro lado, existen casos de alergia a *Anisakis* sp. cuando pacientes sensibilizados consumen pescado sometido a tratamientos de congelación y/o cocción que matan las larvas (Moneo I et al., 2007; Audicana MT et al., 2002; Audicana L et al., 1997) e incluso después de consumir productos de pesca en conserva (AAITO-IFIACI *Anisakis* Consortium, 2011; Ventura MT et al., 2008; Moneo I et al., 2007; Audicana MT et al., 2002; Montoro A et al., 1997). Respecto a la exposición a antígenos parasitarios en productos de pesca en conserva, se desconoce la naturaleza de los alérgenos estables al tratamiento del envasado y si mantienen, y en qué grado, su capacidad alérgica después de ser sometidos al tratamiento con presión y altas temperaturas que se dan en el proceso de envasado (FAO, 1988). En el presente trabajo se caracterizó y analizó la estabilidad de los alérgenos de *Anisakis* sp. después de ser sometidos al autoclavado como proceso similar al utilizado en el envasado industrial.

Resistencia al autoclavado de las larvas L3

Los resultados obtenidos después de someter las larvas L3 al autoclavado nos muestran la existencia de grandes cambios en el perfil proteico observado por SDS-

PAGE y en el reconocimiento de alérgenos (Fig. 4). Se ha descrito que el efecto del autoclavado sobre las proteínas se manifiesta por una disminución de la concentración en la fracción soluble debido a la precipitación de proteínas y a cambios en su estructura secundaria (cambios en la relación alfa-hélice/hoja beta) (López E et al., 2012). Estos efectos justificarían los cambios observados en el presente trabajo. Sin embargo, a pesar de los resultados drásticos que supone el autoclavado sobre las proteínas, la alergenicidad de *Anisakis* sp. está preservada ya que, incluso después del autoclavado durante 80 minutos, se mantiene la capacidad de unir IgE y de activar basófilos (Fig.5, Tabla 3). Se ha descrito el efecto de diversos tratamientos térmicos con el objetivo de matar a la L3, pero se ha demostrado que varias proteínas del parásito retienen sus características antigénicas post-tratamiento (Vidaček S et al., 2011; Vidaček S et al., 2010; Rodríguez-Mahillo AI et al., 2008; Caballero ML y Moneo I, 2004). El análisis llevado a cabo por inmunodetección permitió identificar alérgenos de bajo peso molecular resistentes a temperaturas más altas que las anteriormente reportadas y similares a las del proceso del enlatado. El Ani s 1 fue identificado como uno de los alérgenos resistentes al autoclavado. Esta proteína fue el primer alérgeno identificado y fue caracterizada como un alérgeno principal ya que es reconocido por más del 80% de los pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. (Shimakura K et al., 2004; Caballero ML and Moneo I, 2002; Moneo I et al., 2000). De acuerdo con nuestro ensayo de inmunodetección de IgE, el Ani s 1 es detectado con un peso molecular más bajo del esperado. Una posible explicación es que el tratamiento térmico provoca cambios estructurales y/o hidrólisis de las proteínas (EFSA, 2014) que puede verse reflejado en un cambio en la movilidad electroforética. No podemos descartar de forma categórica la acción de proteasas endógenas durante el tratamiento aunque parece poco probable, ya que los procesos de autoclavado y extracción de proteínas fueron realizados en

presencia de inhibidores de proteasas. El otro alérgeno detectado es el Ani s 4 que es reconocido por el 27% de los pacientes alérgicos (Moneo I et al., 2005), es un inhibidor de cisteín proteasas (cistatina) y además, es termoestable y resistente a la digestión con pepsina (Rodríguez-Mahillo AI et al., 2007; Moneo I et al., 2005; Caballero ML y Moneo I, 2004). Su resistencia al autoclavado junto con la resistencia a la pepsina sugiere que podría ser clínicamente relevante en casos en que los pacientes sensibilizados al Ani s 4 están expuestos por el consumo de productos de pesca procesados y contaminados con proteínas del parásito. Respecto al Ani s 1, la resistencia a la digestión con pepsina no ha sido estudiada. Estudios adicionales sobre la estabilidad a jugo gástrico e intestinal reforzarían los resultados obtenidos. Teniendo en cuenta que la unión de la IgE, como se muestra por inmunodetección, no es suficiente para predecir que un alérgeno es capaz de desencadenar alergia (Sabato V et al., 2011; Van Ree R et al., 2006) se realizó el TAB con los extractos de las L3 procesadas. El análisis funcional muestra que los alérgenos de *A. simplex* son capaces de inducir activación de basófilos tras el autoclavado (Tabla 3). A pesar de la marcada disminución del contenido proteico observado tras el tratamiento durante 80 minutos, los alérgenos residuales del parásito pueden incrementar la expresión del CD63 en la superficie de los basófilos de los pacientes estudiados. El grado de activación de basófilos parece ser dependiente del paciente porque tras el tratamiento con calor se han observado incrementos, disminuciones o no se han visto cambios. Esta variabilidad se ha observado también con otros alérgenos de alimentos como los cacahuets blanqueados o tostados (Sabato V et al., 2011). Por otro lado, los niveles de IgE específica de *A. simplex* no predecían la magnitud de la activación de basófilos. La variabilidad en la respuesta observada en los diferentes pacientes sugiere que reconocen diferentes epítomos con distinto grado de termoestabilidad. El test de activación de basófilos

proporciona información de la sensibilización en el compartimento periférico y no implica necesariamente un paralelismo con la respuesta celular que tuviera lugar en el intestino. Sin embargo, teniendo en cuenta que esta prueba *ex vivo* mimetiza el mecanismo de activación que tiene lugar *in vivo*, los resultados obtenidos demuestran el potencial alergénico de las proteínas de *Anisakis* sp. a pesar de ser sometidos a tratamientos equivalentes al envasado industrial y sugieren que existe un riesgo de alergia para los pacientes sensibilizados.

Resistencia al autoclavado del pescado parasitado artificialmente

La estabilidad de los alérgenos de *A. simplex* al autoclavado también fue evaluada con la larva L3 embebida en el músculo de pescado ya que representa una situación real de exposición. Hay que mencionar que la aplicación de tratamientos tecnológicos al pescado contaminado con alérgenos de *Anisakis* sp. puede tener efectos distintos a los observados cuando se aplican directamente sobre el parásito, debido a que los alérgenos embebidos en la matriz de un alimento pueden interactuar con diferentes componentes de la misma cambiando su biodisponibilidad, y hay evidencias de que el calentamiento de proteínas en presencia de lípidos, carbohidratos o polifenoles pueden incluso originar nuevos alérgenos (Benedé S, et al., 2015). Nuestros resultados muestran que al igual que sucedía con las larvas L3 sometidas al proceso del autoclavado, en el pescado parasitado de forma artificial también se preservaba la alergenicidad, ya que se mantiene la capacidad de unir IgE y de activar basófilos, incluso en el extracto de pescado autoclavado 80 minutos (Fig. 9, Tabla 4). En el análisis de inmunodetección de IgE también se identificaban alérgenos de bajo peso molecular resistentes a temperaturas más altas que las anteriormente reportadas (Tejada M et al., 2015). Otro hallazgo es que el perfil de reconocimiento de alérgenos es

diferente en el atún y la merluza, lo que sugiere que existe un efecto de la matriz en la estabilidad de los alérgenos al autoclavado.

La digestión gástrica es un proceso determinante en el potencial alergénico de diferentes alimentos (Moreno FJ, 2007). Para explorar la relevancia que puede tener la exposición a alérgenos de *Anisakis* sp. en productos de pesca procesados, se analizó el efecto de la digestión gástrica sobre pescado parasitado y autoclavado. Se pudo comprobar que en el extracto quedaban proteínas de *Anisakis* sp. que tras ambos procesos todavía mantenían su capacidad para unir IgE (Fig. 11). Se detectó un alérgeno de unos 21 kDa que, por su peso molecular, podría corresponder a Ani s 1 (Shimakura K et al., 2004; Caballero ML and Moneo I, 2002; Moneo I et al., 2000). También se llevó a cabo el análisis funcional de las muestras mediante el TAB, observándose que los alérgenos termoestables y resistentes a la pepsina mantenían su capacidad de activar basófilos (Fig. 10). El efecto general observado después de aplicar ambos tratamientos es una disminución de la capacidad de inducir activación de basófilos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que nuestros resultados han sido obtenidos ensayando las fracciones solubles por lo que no se puede descartar que las fracciones insolubles de las muestras contengan alérgenos, lo que supondría un mayor riesgo de exposición cuando un paciente sensibilizado consumiese estos productos de pesca.

Enlatados comerciales

Para corroborar los resultados obtenidos en el laboratorio se estudió la estabilidad antigénica de las larvas L3 procedentes de conservas de hígado de bacalao comercial. También se pudo ver como el efecto del enlatado industrial provocaba grandes cambios en el perfil proteico observado por SDS-PAGE (Fig. 12). Utilizando un anticuerpo policlonal anti-crudo de *A. simplex* pudimos comprobar que parte de esas

proteínas eran estables y mantenían su capacidad antigénica. Además, utilizando dos anticuerpos policlonales dirigidos contra Anisakis 1 y Anisakis 4 pudimos detectar en el extracto de las larvas procedentes de conservas comerciales ambos alérgenos, los cuales se caracterizan por ser termoestables y, además el Anisakis 4 es estable a la acción de la pepsina. Por otro lado, el análisis realizado por inmunodetección de IgE permitió identificar un alérgeno de unos 16 kDa (Fig. 14) que, por su peso molecular podría corresponderse con Anisakis 11.0201, el cual se ha demostrado que es un alérgeno termoestable y resistente a pepsina (Carballeda-Sangiao N et al., 2016a).

Estos resultados tienen un gran interés ya que, el hígado de bacalao enlatado es un producto muy apreciado y consumido en varios países. Es muy rico en vitamina A y D y una buena fuente de ácidos grasos poli-insaturados ω -3. Pero se ha observado que los hígados de bacalao procedentes del Mar del Norte y Mar Báltico pueden estar muy contaminados con dioxinas y bifenilos policlorados, no siendo aptos para el consumo (Karl H, 2014). Una alternativa es el bacalao procedente de Groenlandia ya que, tiene bajos niveles de estos productos químicos, sin embargo, presenta una alta infestación por anisákidos causando problemas estéticos y preocupación por su potencial alergénico.

En su conjunto, los datos obtenidos podrían justificar la presencia de síntomas en algunos pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. tras el consumo de productos procedentes de la pesca sin larva viva pero contaminados con alérgenos del parásito (AAITO-IFIACI *Anisakis* Consortium, 2011; Audicana MT y Kennedy MW, 2008; Ventura MT et al., 2008; Audicana MT et al., 2002; Montoro A et al., 1997). Aunque la exposición a alérgenos funcionalmente activos tras ingerir pescado parasitado que ha sido sometido a procesos térmicos extremos puede ocurrir, es necesario complementar los estudios que se han realizado de estabilidad a la digestión gástrica con modelos de

digestión gástrica e intestinal para demostrar la estabilidad y, por tanto, la relevancia de los alérgenos que siguen conservando su capacidad alérgica tras el proceso del enlatado industrial.

Pescado de piscifactoría

En España, entre las principales especies de pescado procedentes de acuicultura se encuentran el rodaballo, la lubina, la corvina y la dorada. El cultivo de rodaballo se realiza, principalmente, en tierra firme en zonas próximas al mar para poder realizar bombeo del agua salada. Las otras 3 especies se cultivan en viveros en el mar que consisten en jaulas de aros de plástico rígido que dan soporte y flotación a redes en cuyo interior se encuentran los peces. La alimentación de estos pescados se basa, principalmente, en la administración de pienso extrusionado fabricado a base de harinas y aceites de pescado pero, en las primeras etapas de vida y en la fase reproductiva los requerimientos energéticos son muy elevados y suelen alimentarse con “dietas naturales” compuestas por pescado blanco troceado, calamares y organismos vivos como artemias y rotíferos (APROMAR, 2015).

En el informe de la EFSA 2010 se consideró que el riesgo de la presencia de *A. simplex* era insignificante en salmones atlánticos cultivados en jaulas flotantes que eran alimentados con pienso pero, se han descrito posteriormente unos pocos casos donde se han detectado anisákidos (Mo TA et al., 2014; Roumbedakis et al., 2013). En otros estudios no los han detectado (APROMAR, 2012; Peñalvert J et al., 2010; Deardorff TL y Kent ML, 1989), sin embargo no se puede descartar la presencia de anisákidos por los siguientes motivos: las dietas son suplementadas con otros organismos vivos; pequeños pescados pueden entrar y nadar en las jaulas; se han encontrado crustáceos dentro de las mismas ya que, por su tamaño pueden atravesar las redes; presencia de aves ictiófagas.

Además, se ha postulado que la ausencia de larvas de anisákidos en pescados de acuicultura no descarta la presencia de alérgenos o antígenos del parásito transferidos desde los piensos utilizados en la dieta que pueden estar contaminados con material parasitario (Faeste CK et al., 2015; APROMAR, 2012).

En los análisis llevados a cabo en los pescados de piscifactoría se ha demostrado la presencia del alérgeno Ani s 4 detectado con un anticuerpo policlonal específico (Fig. 15). Sorprendentemente, las proteínas detectadas por el policlonal en los distintos pescados no se corresponden con el peso molecular de Ani s 4 (9 kDa; Rodríguez-Mahillo et al., 2007). Sin embargo, los estudios de inhibición demuestran que el reconocimiento es específico. El tratamiento de las muestras con agentes reductores indican que el alto peso molecular del Ani s 4 no era debido a complejos mediados por puentes disulfuro. La presencia de alérgenos de *Anisakis* sp. en los pescados de acuicultura se confirmó mediante inmunodetección con IgE. Los sueros de los pacientes sensibilizados detectaron alérgenos en todas las especies de pescados analizados (Fig. 18). En alguno de los pescados se detectaban alérgenos con los mismos pesos moleculares que los observados con el anticuerpo policlonal anti-Ani s 4. Además, se visualizaron otros alérgenos con un peso molecular más bajo (20, 24, 30 y 34 kDa). En concreto, las proteínas de peso molecular de 24 y 34 kDa podrían corresponder con los alérgenos Ani s 14 (Kobayashi Y et al., 2015) y Ani s 13 (González-Fernández J et al., 2015), respectivamente.

La presencia de alérgenos de *Anisakis* sp. biológicamente activos se confirmó con el TAB. Estos datos indican que los pescados de piscifactoría son una fuente oculta de alérgenos pero se desconoce su relevancia clínica. No hay casos descritos en la literatura de síntomas alérgicos y/o gastrointestinales asociados al consumo de pescado de piscifactoría. En nuestra experiencia solamente hemos registrado un caso con

síntomas gastrointestinales tras consumir lubina de piscifactoría (Carballeda-Sangiao N et al., 2016b), lo que sugiere que el número de casos sería muy bajo. Los motivos de la ausencia de casos descritos pueden estar relacionados con que no hay concienciación sobre la posible asociación de síntomas con el consumo de estos pescados, que los síntomas puedan ser leves y de rápida resolución o que solamente un porcentaje pequeño de pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. tendrían síntomas.

Como se ha comentado anteriormente, se ha propuesto la posibilidad de que la presencia de antígenos parasitarios en el pescado de acuicultura sea debida a la transferencia de antígenos desde los piensos utilizados en piscifactoría. Nuestros datos apoyan esta posibilidad ya que demuestran la presencia de alérgenos en dichos piensos. Las evidencias se basan en la detección específica con anticuerpos policlonales específicos (Fig. 19), detección con sueros de pacientes alérgicos (Fig. 20), secuenciación por espectrometría de masas (Fig. 22, Fig. 23) y capacidad de activar basófilos (Fig. 24). Además del Ani s 4, se han identificado otros antígenos de *Anisakis* sp. gracias a la secuenciación por espectrometría de masas. Se han encontrado péptidos que son específicos de la hemoglobina y enolasa de *Anisakis* sp. y de Ani s 9. En el caso de la hemoglobina, uno de los péptidos encontrado como específico del género (LFAEYLDQK) también fue descrito por Faeste CK et al. (2014) como un marcador único para la hemoglobina de *Anisakis* sp. que permite diferenciarlo de otros nematodos y del pescado y también ha sido usado como un marcador para detección de proteínas de *Anisakis* sp. en salmón de piscifactoría y en productos de pescado procesado (Faeste CK et al., 2015). En el caso del Ani s 9, el péptido encontrado como específico del género (GGAVQAEFNK) también ha sido propuesto como un biomarcador para la identificación y detección de proteínas de *Anisakis* sp. en productos de pesca procesados (Carrera M et al., 2016).

Los pesos moleculares de los alérgenos detectados por inmunodetección eran discordantes con los pesos teóricos del mismo modo que se observaba con los alérgenos en los filetes de pescado de piscifactoría. Estas diferencias se pueden justificar por cambios en las propiedades físico-químicas de las proteínas durante el proceso de fabricación del pienso en el que las materias primas utilizadas son sometidas a deshidratación, calentamiento a altas temperaturas y altas presiones (Castelló-Orvay F, 1993). Estos tratamientos pueden provocar desnaturalización, agregación, hidrólisis, glicosilación de las proteínas, ruptura de puentes disulfuro y formación de nuevos enlaces inter/intramoleculares, formación de enlaces covalentes entre residuos de lisina y otros componentes de la matriz del pienso y generación de nuevas estructuras como los productos finales de glicación avanzada producidos por la reacción de Maillard entre los grupos amino de las proteínas y azúcares (EFSA, 2014). No se han podido realizar análisis sobre la naturaleza de los cambios experimentados por los alérgenos en nuestras muestras de piensos y por lo tanto no podemos explicar el mecanismo responsable de los mismos.

Los resultados de nuestro estudio muestran la presencia de proteínas de *A. simplex* en pescados procedentes de piscifactorías españolas, donde estos son alimentados, principalmente, con piensos extrusionados. Teniendo en cuenta que los pescados de acuicultura analizados no estaban parasitados por anisákidos (Tejada M, comunicación personal) y la coincidencia en los cambios de peso molecular de Ani s 4 en pienso y pescado, creemos que la presencia de estas proteínas procede de los piensos con los cuales son alimentados y que se transfieren a las diferentes partes de la musculatura, de la misma forma que se propuso en un estudio realizado con pollos alimentados con harinas de pescado (Armentia A et al., 2006) y en salmones procedentes de piscifactoría (Faeste CK et al., 2015). Otro hallazgo que sugiere la

transferencia de alérgenos desde el pienso al pescado es que, cada una de las especies de pescado analizadas se puede asociar con un patrón de alérgenos particular, tal y como se detecta con los sueros de los pacientes. Esto podría deberse a que las especies se alimentan con piensos diferentes en función de si se trata de peces pelágicos, litorales, bentónicos, etc y en función de las necesidades energéticas de cada una de ellas (Castelló-Orvay F, 2000).

Caracterización de la respuesta inmune específica a anisákidos

La respuesta inmune a *Anisakis* sp. es compleja en cuanto que el sistema inmune debe responder a un parásito que invade la mucosa gastrointestinal y, además, es una fuente de alérgenos. A esto hay que añadir que los mecanismos desencadenantes de la respuesta inmune estarán influidos por el tipo de exposición a los antígenos parasitarios ya sea a larva viva, a larva muerta o a antígenos embebidos en la matriz del músculo de pescado. Por ello, la caracterización de la respuesta inmune no sólo proporciona información sobre los mecanismos subyacentes de la misma, sino que además permite valorar el riesgo de exposición a los antígenos parasitarios que se encuentran en los productos de la pesca.

Persistencia de la sensibilización IgE a alérgenos de Anisakis sp.

En nuestro estudio se analizaron los cambios en los valores de IgE total e IgE específica para *Anisakis* sp. durante un periodo de tiempo de seguimiento más largo que los descritos previamente (Anadón AM et al., 2010; Daschner A et al., 2002; Trujillo MJ et al., 2002; Daschner A et al., 1999). Se realizaron medidas repetidas durante todo el estudio, incluyendo la detección de Ani s 1 y Ani s 4 (Tabla 6). Para evitar la aparición de nuevos síntomas se aconsejó a los pacientes consumir productos de pesca congelados o tratados con calor ya que, estos tratamientos matan a la larva y previenen

un nuevo parasitismo. También se les aconsejó el consumo de pescado de acuicultura porque el riesgo de exposición a larva viva de *Anisakis sp.* es menor en este tipo de pescado al ser alimentados con piensos secos. De los 17 pacientes seguidos, 12 consumen regularmente pescado congelado y de acuicultura durante el periodo del estudio, y 5 pacientes deciden llevar una dieta estricta sin productos de pesca durante todo el seguimiento. La disminución de los niveles de IgE específica en estos 5 pacientes, los cuales se considera que no han sido re-expuestos a material del parásito, fueron mayor que la observada previamente en pacientes con una dieta sin pescado y esta discrepancia fue probablemente debida a que nuestro periodo de seguimiento fue mucho más largo (Trujillo MJ et al., 2002). Al comparar la disminución de los valores de IgE total y específica para *Anisakis sp.* entre los pacientes que consumen y los que no consumen pescado durante el periodo de seguimiento, no se encontraron diferencias significativas, lo cual indicaría que el descenso de los niveles de IgE específica para *Anisakis sp.* no parece estar influenciado por el consumo de pescado previamente congelado.

Nuestros resultados también muestran que la sensibilización IgE para alérgenos de *Anisakis sp.* persiste durante varios años. Se observaron resultados similares en adultos sensibilizados a alérgenos de alimentos durante un periodo de seguimiento de 9 años (Patelis A et al., 2014). En nuestro estudio, se detectó IgE específica para Anis 1 durante varios años desde el comienzo de los síntomas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en un estudio con un periodo de seguimiento de entre 6 y 38 meses (Anadón AM et al., 2010) y sugiere que el Anis 1 puede ser detectado en casos antiguos y recientes de infestación por *Anisakis sp.* Otros casos en los que se ha descrito la persistencia durante años de IgE específica son las infestaciones humanas ocasionadas por filarias en las que la IgE era detectable años después del tratamiento en

ausencia de re-infestaciones con el parásito (Mitre E et al., 2006). A diferencia de los pacientes infestados por *Anisakis* sp., los que sufren filariasis no están libres de antígenos parasitarios porque los gusanos de las filarias muertas se mantiene en los tejidos humanos y por lo tanto, hay una exposición continua a antígenos del parásito. Por ello, la persistencia de la sensibilización de tipo IgE observada en los pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. que no han vuelto a consumir pescado durante varios años, indica que los alérgenos de *Anisakis* sp. inducen respuestas IgE de muy larga duración.

El análisis de los cambios de los niveles de IgE a lo largo del tiempo en pacientes que no han sido re-expuestos a alérgenos de *Anisakis* sp. y en algunos pacientes que de forma regular consumen pescado congelado y de acuicultura, muestra que la disminución de los títulos de IgE específica se ajustan a un modelo de regresión no lineal (Fig. 25). Sin embargo, observamos que los niveles de IgE específica de *Anisakis* sp. en 4 pacientes (P1, P3, P6 y P15) no se ajustan a ningún modelo de regresión al incrementarse en algún momento durante el seguimiento (Fig. 26). Estos incrementos podrían justificarse porque dichos pacientes se hubieran sensibilizado en algún momento del seguimiento a otras fuentes alérgicas con reactividades cruzadas con alérgenos de *Anisakis* sp., por ejemplo, otros parásitos nematodos, ácaros y crustáceos (Lozano MJ et al., 2004; Johansson E et al., 2001; Iglesias R et al., 1996). Sin embargo, de acuerdo con los datos disponibles de los pacientes, esta explicación no parece ser válida porque los pacientes no estaban sensibilizados a otros alérgenos con reactividad cruzada con alérgenos de *Anisakis* sp. al comienzo del seguimiento, ni se encontraron nuevas sensibilizaciones a dichos alérgenos durante el periodo de seguimiento. Además, el incremento de los niveles de IgE específica fue paralelo al incremento en la detección de Ani s 1, lo cual apoya la hipótesis de que los cambios observados en realidad eran debidos a la exposición a alérgenos de *Anisakis* sp. Otra

posible explicación de lo observado sería una re-infestación con larva L3 viva, pero lo más probable es que este no sea el caso, ya que los pacientes presentaron síntomas tras ingerir pescado congelado o de piscifactoría y, además, es poco probable que un episodio de anisakiasis aguda pase desapercibido en estos pacientes que ya lo habían padecido. Otra evidencia que descartaría nuevos episodios de infestación es que se ha descrito que cuando tienen lugar nuevas re-infestaciones, se detectan alérgenos diferentes a los reconocidos en los episodios de anisakiasis previos (Daschner A et al., 2002) y esto no se observa en nuestros pacientes. El perfil de alérgenos reconocidos por nuestros pacientes se mantiene estable a lo largo del seguimiento y este hallazgo concuerda con lo descrito en pacientes con alergia a aeroalérgenos que, tras nuevas exposiciones, experimentan incrementos de los valores de IgE específica, pero el perfil alérgico permanece inalterado (Niederberger V et al., 2007). Una explicación más plausible para los cambios en la sensibilización IgE es que la exposición a alérgenos presentes en los productos de pesca está implicada en el incremento de los niveles de IgE específica para *Anisakis* sp., ya que el aumento de los niveles de IgE coincide con la introducción de productos de pesca en la dieta. Como se ha comentado, algunos antígenos de *Anisakis* sp. son estables y mantienen su capacidad para unir IgE tras diferentes tratamientos por calor y congelación (Tejada M et al., 2015; Rodríguez-Mahillo AI et al., 2010). Además, hay que recordar que se han detectado antígenos de *Anisakis* sp. en salmones procedentes de acuicultura y en productos de pescado procesado (Faeste CK et al., 2015), que podrían contribuir en las variaciones de las tendencias de la sensibilización IgE observadas en el estudio.

El significado clínico de los resultados obtenidos en este estudio es difícil de determinar ya que, solamente tres pacientes han tenido síntomas durante el seguimiento. Se ha propuesto que la alta tasa de infestación del pescado por *Anisakis* sp. en nuestra

región resultaría en un contacto continuo con material parasitario lo que debería causar frecuentemente síntomas en individuos sensibilizados (Daschner A y Pascual CY, 2005). Lo que nuestros resultados indican es que la exposición a antígenos parasitarios presentes en productos de pesca sin larva viva podría contribuir a la persistencia o incluso al incremento de los niveles de IgE específica para *Anisakis* sp. Este incremento asociado con la aparición de síntomas sugiere que la exposición a antígenos de *Anisakis* sp. podría causar la aparición de síntomas en algunos pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. (Moneo I et al., 2007).

Presencia de alérgenos en Anisákidos

En la literatura se han descrito casos de anisakidosis ocasionados por larvas de otros géneros de la familia Anisakidae entre los que se encuentran *Pseudoterranova* sp. y *Contracaecum* sp. pero se desconoce el riesgo de alergia ocasionada por estos géneros siendo especies muy relacionadas filogenéticamente (Nadler SA et al., 2005).

Los resultados publicados en la literatura hablan de presencia de reactividades cruzadas entre el *A. simplex* y otros organismos como ácaros del polvo, mohos, crustáceos, moluscos, insectos, cucarachas, etc (Bernardini R et al., 2005; Lozano MJ et al., 2004) muchas de ellas debidas a la presencia de panalérgenos, como la tropomiosina, que presentan una alta homología entre las especies (López-Matas MA et al., 2015).

Nuestros resultados demuestran que los pacientes sensibilizados a *A. simplex* son capaces de reconocer proteínas presentes en los extractos de *C. osculatum* y *P. krabbei*, posiblemente por reactividades cruzadas entre las especies.

Los patrones de reconocimiento de alérgenos son diferentes para las 3 especies, pero el uso de anticuerpos policlonales para Ani s 1 y Ani s 4 permitieron identificar

dos proteínas homólogas para ambos alérgenos en el extracto de *P. krabbei* y un posible dímero de Ani s 1 en el extracto de *C. osculatum*. Los estudios de inhibición de la inmunodetección por IgE muestran que las reactividades son debidas a reacciones cruzadas con *Anisakis* sp (Fig. 27). La presencia de alérgenos funcionalmente activos se demuestra por su capacidad de activar basófilos de pacientes alérgicos. Se puede asumir que la sensibilización primaria es a *Anisakis* sp. al ser el parásito con mayor incidencia, pero la exposición a alérgenos de otros anisákidos que se encuentran en pescados de consumo frecuente, puede representar un riesgo de reacciones adversas en pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp.

Aunque el informe de la EFSA 2010 concluye que no hay datos que impliquen claramente a otros anisákidos diferentes a *A. simplex* en respuestas alérgicas, no debería descartarse que estas especies hermanas, también responsables de infestación activa, puedan por sí mismas ocasionar reacciones de hipersensibilidad. Hay evidencias que apoyarían esta hipótesis ya que recientemente se ha desarrollado un modelo murino de sensibilización a *Pseudoterranovadecipiens* en el que se demuestra el potencial alergénico de éste anisákido (Ludovisi A et al., 2016).

Caracterización de la proteína de tipo Ani s 11 como un nuevo alérgeno principal

La caracterización e identificación de las proteínas implicadas en la respuesta inmune a *Anisakis* sp. permitirían una mejor definición de los mecanismos de la respuesta inmune y de evaluación de la exposición y proporcionaría nuevas herramientas con valor diagnóstico.

La proteína de tipo Ani s 11 fue descrita (Kobayashi Y et al., 2011) como una proteína con alta homología con los alérgenos Ani s 11 y Ani s 10, por lo que los autores, aunque no lo analizan, sugieren que pudiera ser otro alérgeno. La proteína de

tipo Ani s 11 fue producida como recombinante y analizada su relevancia diagnóstica en un sistema que incluía Ani s 1, Ani s 4 y Ani s 5. Nuestros resultados demuestran que es un alérgeno principal (Tabla 8) y que es detectado por un mayor número de pacientes que los alérgenos estructuralmente similares, Ani s 11 y Ani s 10 (Kobayashi Y et al., 2011). Estas diferencias pueden ser debidas a las distintas características de los pacientes de los grupos analizados en cada estudio y/o a los diferentes métodos utilizados para la detección de IgE específica. Esta proteína ha sido reconocida como un isoalérgeno por el Subcomité para la Nomenclatura de Alérgenos WHO/IUIS y nombrada como Ani s 11.0201.

Los porcentajes de detección obtenidos con los otros alérgenos recombinantes usados en este estudio son similares a los obtenidos en trabajos previos. El rAni s 1 se detecta en más de un 80% de los pacientes alérgicos (Ibarrola I et al., 2008). Ésta frecuencia se incrementa hasta el 100% (Gamboa PM et al., 2012) cuando los pacientes son seleccionados por presentar valores de IgE específica de *Anisakis* ≥ 20 kU/L. Tanto el rAni s 4 como el rAni s 5 son reconocidos con la misma frecuencia (27% y 25% respectivamente) descrita previamente (Kobayashi Y et al., 2007a; Moneo I et al., 2005). Otro autores han utilizado un fragmento proteico de otro alérgeno principal, Ani s 7, como herramienta diagnóstica. Se ha descrito una sensibilidad del 93% para un polipéptido recombinante interno de Ani s 7 en un estudio con sueros de pacientes que fueron considerados verdaderos positivos de acuerdo a los valores obtenidos mediante ELISAs con Ani s 1 y/o Ani s 7 (Anadón AM et al., 2010). Los resultados obtenidos con alérgenos recombinantes individuales demuestran su utilidad para el diagnóstico con una alta especificidad, pero hay que destacar la necesidad de usar una combinación de alérgenos para incrementar la sensibilidad y obtener un diagnóstico preciso de la alergia a *Anisakis* sp. Este hecho se demuestra en nuestro estudio ya que 5 pacientes

(10%) detectan sólo el rAni s 11.0201, indicando que éste alérgeno puede ayudar en el diagnóstico resuelto por componentes de la alergia al *Anisakis* sp. Las diferencias en el perfil de alérgenos reconocidos por los pacientes con una historia convincente de alergia a *Anisakis* sp., se pueden justificar por variaciones interindividuales en la respuesta inmunológica a este parásito, variaciones cualitativas o cuantitativas en el contenido de alérgenos en diferentes especies de *Anisakis* sp. (Arcos SC et al., 2014) o diferentes rutas de exposición al alérgeno (Nieuwenhuizen NE y Lopata AL, 2014).

Muchos pacientes con alergia a *Anisakis* sp. toleran una dieta de pescado congelado o correctamente cocinado, pero como se ha comentado, se han descrito casos que presentan síntomas tras la ingesta de pescado correctamente procesado (AAITO-IFIACI *Anisakis* Consortium, 2011; Moneo I et al., 2007; Audicana MT et al., 2002). La resistencia del Ani s 11.0201 a la digestión y su termoestabilidad sugieren que esta proteína podría estar implicada en la aparición de síntomas tras el consumo de productos de pesca contaminados y procesados.

Respuesta inmunológica humoral a A. simplex

En más de la mitad de los sujetos control se detectaron Igs específicas a *Anisakis* sp. lo que demuestra que individuos sanos, consumidores habituales de productos de pesca, desarrollan una respuesta específica a los antígenos parasitarios a los que están expuestos al consumir estos alimentos (Tabla 9). Las clases que se han detectado han sido IgG e IgA mientras que eran indetectables la IgE e IgG4 lo que indicaría una respuesta asociada a un perfil Th1 (Maizels RM, 2005). La detección de IgG e IgA específicas de alérgenos de alimentos es un hallazgo habitual en la población sana y se considera que son marcadores de exposición (Tay SS et al., 2007; Barnes RM, 1995; Morgan JE et al., 1990).

La respuesta humoral en los pacientes es del tipo Th2 con valores altos de IgE e IgG4 específicas al extracto crudo de *Anisakis* sp. Además se detectan IgA e IgG anti-*Anisakis* sp. Los valores de la IgG específica son más altos que los correspondientes a IgG4 lo que indica que otras subclases de IgG están implicadas en la respuesta del parásito (Tabla 9). Previamente se ha descrito que en la anisakiasis aguda existe una respuesta mediada por todas las clases de inmunoglobulinas cuyos niveles disminuyen, exceptuando la IgA, hasta sus valores basales transcurridos unos 6 meses desde el episodio (Daschner et al., 2002). Nuestros datos muestran que las Igs específicas son detectadas durante más tiempo sugiriendo que la exposición a antígenos parasitarios por el consumo de productos de pesca pueda jugar un papel en la persistencia de las Igs específicas, del mismo modo a lo que se observó en el estudio de seguimiento de la sensibilización de IgE discutido anteriormente.

La respuesta mediada por IgE e IgG4 es característica tanto de la alergia como de las helmintiasis intestinales, sin embargo el significado biológico de estas Igs sería diferente en ambas entidades. En alergia, la IgE es la inmunoglobulina que determina las reacciones de hipersensibilidad inmediata, mientras que la IgG4 tendría un papel protector al bloquear los epítomos reconocidos por la IgE y, además, su detección está asociada con buenos resultados en la inmunoterapia específica de alérgeno (James LK et al., 2016). En cambio, en las helmintiasis intestinales, niveles altos de IgG4 o valores bajos en la relación IgE/IgG4 están implicados en una mayor gravedad de la enfermedad, mayor carga parasitaria o más posibilidad de re-infestación (Hagel I et al., 2008; Turner JD et al., 2005; Geiger SM et al., 2002). En el caso del *A. simplex*, al ser simultáneamente un parásito y una fuente de alérgenos, la interpretación de los niveles de Igs es más complicada. Nuestros datos indican que los niveles de IgE son muy elevados poco tiempo después del episodio de anisakiasis, lo que representaría una

respuesta destinada a la eliminación del parásito. Por otro lado, los análisis de correlación de los valores de las Igs con el tiempo transcurrido desde el episodio clínico demuestran una disminución de IgG y de IgE específicas a lo largo del tiempo, mientras que se mantiene la IgG4. Esta situación recuerda a lo que ocurre en la inmunoterapia en alergia. Se podría especular que la respuesta humoral a *A. simplex* tendría una primera fase con predominio de IgE para controlar la infestación, y luego cambiaría a otra etapa caracterizada por un descenso en la relación IgE/IgG4 asociada a la tolerancia a las proteínas del parásito.

Respecto a la IgA, la inmunoglobulina que juega un papel fundamental en la respuesta inmune en las mucosas, se ha sugerido que puede estar implicada en la inducción de tolerancia a alimentos (Konstantinou GN et al., 2014). Teniendo en cuenta que los pacientes analizados son consumidores habituales de productos de pesca, que están asintomáticos y que los valores de IgA específica se mantienen estables a lo largo del tiempo, se puede pensar que dicha inmunoglobulina puede estar implicada en la tolerancia a antígenos de *Anisakis* sp.

Respuesta inmunológica celular a A. simplex

A. Respuesta efectora innata. Activación de basófilos

El TAB es una prueba que ayuda a determinar si la presencia de IgE sérica específica a un alérgeno es relevante desde un punto de vista funcional. Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, es un método que permite valorar la actividad de los alérgenos de *Anisakis* sp. que están presentes en productos de pesca procesados y, por lo tanto, constituye una herramienta muy útil para analizar el riesgo de exposición por consumo de dichos productos.

El TAB es un método que mimetiza el mecanismo de activación de los basófilos que tiene lugar *in vivo* (Santos AF y Lack G, 2016) y se ha demostrado su utilidad para el diagnóstico de la alergia a *Anisakis* sp. utilizando extracto crudo del parásito y rAni s 1 (Martínez-Aranguren RM et al., 2014; Gamboa PM et al., 2012; González-Muñoz M et al., 2005). Nuestros resultados han ampliado trabajos previos al realizar el TAB con otros alérgenos y estableciendo los valores umbrales que discriminan entre pacientes alérgicos e individuos no alérgicos. Para el extracto crudo de *Anisakis* sp., se estableció un valor umbral del 12% con una sensibilidad y una especificidad del 100% y estos datos son similares a los obtenidos en otros estudios (Gamboa PM et al., 2012; González-Muñoz M et al., 2005). Un valor umbral del 3% de activación con Ani s 1 discriminaba pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. y controles sanos con una sensibilidad del 89% y una especificidad del 100%, similares a los datos obtenidos en otros trabajos (Martínez-Aranguren RM et al., 2014). Los valores umbrales establecidos para Ani s 4, Ani s 5 y Ani s 11.0201 fueron del 2%, 3% y 3% con una sensibilidad del 56, 57 y 71% y una especificidad del 100, 100 y 95%, respectivamente. Como se puede observar, el TAB con cada uno de los alérgenos ensayados muestran una especificidad muy alta. En cuanto a la sensibilidad encontrada para los diferentes alérgenos, parece que se han obtenido valores bajos con el Ani s 4 y el Ani s 5, pero hay que interpretarlos de acuerdo a la prevalencia de IgE específica para estos alérgenos en nuestro grupo de estudio. De acuerdo a los resultados obtenidos por inmunodetección con IgE, el Ani s 4 era detectado por un 27% y el Ani s 5 por el 25% de los pacientes, y estos datos sugieren que la sensibilidad del TAB para estas proteínas es mucho mayor que las pruebas serológicas.

Estos resultados demuestran que el TAB con los alérgenos clínicamente relevantes y termoestables Ani s 1, Ani s 4, Ani s 5 y Ani s 11.0201 sería una

aproximación útil para un diagnóstico resuelto por componentes de la alergia a *Anisakis* sp. y podría ayudar a establecer pautas dietéticas de forma individualizada.

B. Respuesta efectora adaptativa (Th1/Th2/Th17)

En este estudio hemos evaluado el perfil de citocinas en pacientes alérgicos a *Anisakis* sp. y en controles sanos frente al extracto del gusano y a alérgenos bien caracterizados (Ani s 1, Ani s 4 y Ani s 5).

En el caso de los controles que responden a las proteínas del parásito (Fig. 31), el perfil de secreción de citocinas observado muestra un patrón de respuesta de tipo Th1 con el extracto crudo y los alérgenos Ani s 1 y Ani s 5, mientras que el Ani s 4 no induce respuesta. Teniendo en cuenta que estos controles sanos son consumidores habituales de pescado, los resultados demuestran que existe una exposición a proteínas de *Anisakis* sp. que se encuentran en los productos de la pesca capaces de desencadenar una respuesta inmune. El perfil de respuesta pro-inflamatoria (Th1) que se ha observado en los controles sanos se caracteriza por una alta secreción de TNF- α , IL-6 y niveles moderados de IFN- γ , sin embargo esto no se asocia con ninguna manifestación clínica. Hay que remarcar que se secreta también altos niveles de IL-10 que podría jugar un papel crítico en la tolerancia a los antígenos parasitarios en los sujetos control. Se ha sugerido que la IL-10 tiene un papel modulador de la inducción y de mantenimiento de la tolerancia específica de alérgeno, regulando la formación de isotipos específicos, bloqueando la producción IgE específica y promoviendo la respuesta hacia un tipo dominante IgG4. Además, la IL-10 también inhibe la supervivencia de eosinófilos y la síntesis de IL-4 (Akdis M, 2006). Este perfil de respuesta inmune se ha descrito también en sujetos sanos expuestos a otros alérgenos (Perezábad L et al., 2015; Jutel M et al., 2003).

En el caso de los pacientes, se ha observado distintos perfiles de respuesta dependiente del estímulo utilizado (Fig. 31). Tanto el extracto crudo como el alérgeno Ani s 1 inducen un perfil de secreción de tipo Th2 con altos niveles de secreción de IL-4 e IL-5, que son algunas de las citocinas responsables de muchas manifestaciones alérgicas. La IL-4 promueve un cambio de fenotipo Th0 a Th2 e induce en las células B el cambio de clase para producir IgE. La IL-5 estimula, activa la maduración y prolonga la supervivencia de eosinófilos. Sin embargo, los alérgenos Ani s 4 y Ani s 5 producen un perfil de secreción de citocinas de tipo Th1 con alta secreción de IFN- γ y niveles indetectables o muy bajos de IL-4 e IL-5. Como ocurría con los controles sanos, la respuesta Th1 en los pacientes iba acompañada por secreción elevada de IL-10 con Ani s 4 y Ani s 5 que puede estar implicada en la regulación de la respuesta asociada a tolerancia como se ha comentado anteriormente. Otra evidencia que sugiere un papel regulador de la IL-10 es la correlación positiva que hay entre los niveles de IL-10 y las citocinas pro-inflamatorias IFN- γ , TNF- α e IL-6.

El hecho de que los alérgenos Ani s 4 y Ani s 5 provoquen una respuesta Th1 en los pacientes podría ser debido a diferentes motivos. Un factor que hay que tener en cuenta a la hora de interpretar estos resultados es que se han utilizado proteínas recombinantes en el cultivo que podrían no tener todas las propiedades de los alérgenos naturales (Cho MK et al., 2014). Otro aspecto a valorar es que los análisis se realizaron tiempo después de que los pacientes presentaran el episodio alérgico (14 meses, IQR = 8,5-27,5), pudiendo cambiar la cinética del tipo de respuesta dependiente de alérgeno. Asumiendo que el perfil de respuesta encontrada en los controles sanos se relacionaría con tolerancia a los antígenos parasitarios, se puede especular que los pacientes, que consumen productos de pesca sin aparición de síntomas, pueden estar cambiando su perfil de respuesta alérgica a una respuesta que promovería la tolerancia a los alérgenos

de *Anisakis* sp. Este cambio de perfil se ha descrito en otras alergias (Turcanu V et al., 2003). Se ha observado que niños alérgicos a cacahuete muestran una polarización Th2 con alérgenos de cacahuete. Sin embargo, este perfil cambia a una respuesta Th1 cuando los mismos niños han superado la alergia (Turcanu V et al., 2003). Para confirmar los cambios del perfil de respuesta a antígenos de *Anisakis* sp. a lo largo del tiempo, sería necesario realizar nuevos estudios incluyendo análisis más cercanos al episodio alérgico.

Conclusiones

1. El proceso de enlatado industrial de productos de pesca disminuye considerablemente el potencial alergénico de *Anisakis* sp. Sin embargo, algunos alérgenos relevantes retienen su capacidad de unir IgE y de activar basófilos después de ser sometidos a este tratamiento lo que puede representar un riesgo de exposición para los pacientes sensibilizados a éste parásito.
2. Los pescados de acuicultura pueden contener alérgenos de *Anisakis* sp. y pueden suponer una fuente insospechada de alérgenos parasitarios.
3. La presencia de alérgenos de *Anisakis* sp. en los piensos de acuicultura sugiere que puede haber transferencia de proteínas del parásito desde el pienso al pescado.
4. Después de sensibilizarse a *Anisakis* sp. la ausencia de re-exposición durante años a sus alérgenos no supone la desaparición de la IgE específica lo que indica que *Anisakis* sp. induce una respuesta inmune de larga duración.
5. La contaminación de productos de pesca por alérgenos puede justificar el incremento de los niveles de IgE específica en algunos pacientes alérgicos a *Anisakis* sp.
6. La presencia de alérgenos de otros anisákidos podría representar un riesgo en pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. porque tienen proteínas que son capaces de unir IgE y producir activación de basófilos.
7. El uso del alérgeno principal Ani s 11.0201 en el diagnóstico resuelto por componentes incrementaría la sensibilidad del test.
8. La resistencia del Ani s 11.0201 a la digestión y su estabilidad a los tratamiento por calor sugieren que esta proteína podría estar implicada en el incremento de la IgE específica tras la ingesta de productos de pesca contaminados por alérgenos del parásito.

9. El test de activación de basófilos es una prueba útil para el diagnóstico resuelto por componentes.
10. Los sujetos controles sanos consumidores habituales de pescado tienen una respuesta inmune humoral y celular específica a *Anisakis* sp. indicando que están expuestos a alérgenos del parásito.
11. En los pacientes sensibilizados a *Anisakis* sp. que toleran el consumo de pescado, se observan tanto respuestas de tipo 1 como de tipo 2 y dicha polarización es específica del alérgeno al que son expuestos.
12. Las respuestas de tipo Th1 observadas en los controles sanos y en los pacientes están acompañadas por niveles altos de secreción de IL-10, sugiriendo que esta citocina puede estar implicada en la tolerancia a los antígenos de *Anisakis* sp.

Referencias Bibliográficas

- AAITO-IFIACI Anisakis Consortium. Anisakis hypersensitivity in Italy: prevalence and clinical features: a multicenter study. *Allergy*. 2011 Dec; 66 (12): 1563-9.
- Abdel-Ghaffar F, Badr AM, Morsy K, Ebead S, El Deeb S, Al Quraishy S, Mehlhorn H. Cytokine signature and antibody-mediated response against fresh and attenuated *Anisakis simplex* (L3) administration into Wistar rats: implication for anti-allergic reaction. *Parasitol Res*. 2015 Aug; 114 (8): 2975-84.
- Akdis M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. *Curr Opin Immunol*. 2006 Dec;18(6):738-44
- Alonso MA, García MV, Hernández JE, Moro MM, Ezquerro PE, Ingelmo AR, Albelda CV. Recurrence of anaphylaxis in a Spanish series. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013; 23 (6): 383-91.
- Alonso-Gómez A, Moreno-Ancillo A, López-Serrano MC, Suarez-de-Parga JM, Daschner A, Caballero MT, Barranco P, Cabañas R. *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitises the gastrointestinal tract. *Parasitol Res*. 2004 Aug; 93 (5): 378-84.
- Anadón AM, Rodríguez E, Gárate MT, Cuéllar C, Romarís F, Chivato T, Rodero M, González-Díaz H, Ubeira FM. Diagnosing human anisakiasis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Apr; 17 (4): 496-502.
- Anadón AM, Romarís F, Escalante M, Rodríguez E, Gárate T, Cuéllar C, Ubeira FM. The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clin Exp Immunol*. 2009 Jun; 156 (3): 471-8.

- Antón J, Escudero R, Fernández-Benítez M. Anaphylaxis induced by Anisakis. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2008 Jan-Feb; 36 (1): 53-5.
- APROMAR (Asociación empresarial de productores de cultivos marinos en España). La acuicultura marina en España, 2012. (<http://www.apromar.es/Proyecto-Anisakis/APROMAR-Informe-ANISAKIS-2012.pdf>), fecha consulta: 24 de junio de 2016.
- APROMAR, (Asociación empresarial de productores de cultivos marinos en España). La acuicultura en España, 2015. (https://drive.google.com/file/d/0B4_4Ev9oqL_NmFY312WnM2Yms/view?pref=2&pli=1), fecha consulta: 24 de junio de 2016.
- Arcos SC, Ciordia S, Roberston L, Zapico I, Jiménez-Ruiz Y, González-Muñoz M, Moneo I, Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo A, Albar JP, Navas A. Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex sensu stricto* and *A. pegreffii*. *Proteomics*. 2014 Jun; 14 (12): 1547-68.
- Arlian LG, Morgan MS, Quirce S, Marañón F, Fernández-Caldas E. Characterization of allergens of *Anisakis simplex*. *Allergy*. 2003 Dec; 58 (12): 1299-303.
- Armentia A, Martín-Gil FJ, Pascual C, Martín-Esteban M, Callejo A, Martínez C. *Anisakis simplex* allergy after eating chicken meat. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006; 16(4): 258-63.
- Asturias JA, Eraso E, Moneo I, Martínez A. Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*? *Allergy*. 2000 Sep; 55 (9): 898-9.

- Audicana L, Audicana MT, Fernández de Corres L, Kennedy MW. Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. *Vet Rec.* 1997 Mar 1; 140 (9): 235.
- Audicana MT, Ansotegui IJ, de Corres LF, Kennedy MW. *Anisakis simplex*: dangerous--dead and alive? *Trends Parasitol.* 2002 Jan; 18 (1): 20-5.
- Audicana MT, Kennedy MW. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Apr; 21 (2): 360-79.
- Audicana MT, Fernández de Corres L, Muñoz D, Fernández E, Navarro JA, del Pozo MD. Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish. *J Allergy Clin Immunol.* 1995 Oct; 96 (4): 558-60.
- Auer H, Leskowschek H, Engler J, Leitner G, Wentzel C, Wolkerstorfer W, Schneider R. Epidemiology and nosology of anisakiosis, a rather rare helminthozoonosis in Central Europe. Two case reports. *Wien Klin Wochenschr.* 2007; 119 (19-20 Suppl 3): 106-9.
- Baeza ML, Conejero L, Higaki Y, Martín E, Pérez C, Infante S, Rubio M, Zubeldia JM. *Anisakis simplex* allergy: a murine model of anaphylaxis induced by parasitic proteins displays a mixed Th1/Th2 pattern. *Clin Exp Immunol.* 2005 Dec; 142 (3): 433-40.
- Baeza ML, Rodríguez A, Matheu V, Rubio M, Tornero P, de Barrio M, Herrero T, Santaolalla M, Zubeldia JM. Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. *Clin Exp Allergy.* 2004 Feb; 34 (2): 296-302.

- Barnes RM. IgG and IgA antibodies to dietary antigens in food allergy and intolerance. *ClinExp Allergy*. 1995 Jul; 25 Suppl 1: 7-9.
- Benedé S, López-Expósito I, Molina E, López-Fandiño R. Egg proteins as allergens and the effects of the food matrix and processing. *Food Funct*. 2015; 6 (3): 694-713.
- Berin MC, Shreffler WG. Mechanisms Underlying Induction of Tolerance to Foods. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016 Feb; 36 (1): 87-102.
- Bernardini R, Mistrello G, Novembre E, Roncarolo D, Zanotta S, Lombardi E, Cianferoni A, Pucci N, De Martino M, Vierucci A. Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis simplex* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2005 Oct-Dec; 18 (4): 671-5.
- Bhargava D, Raman R, El Azzouni MZ, Bhargava K, Bhusnurmath B. Anisakiasis of the tonsils. *J Laryngol Otol*. 1996 Apr; 110 (4): 387-8.
- Burk CM, Kulis M, Leung N, Kim EH, Burks AW, Vickery BP. Utility of component analyses in subjects undergoing sublingual immunotherapy for peanut allergy. *Clin Exp Allergy*. 2016 Feb; 46 (2): 347-53.
- Caballero ML, Moneo I, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, Casado I, Rodríguez-Pérez R. Isolation of Ani s 5, an excretory-secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis* larvae sensitization. *Parasitol Res*. 2008 Oct; 103 (5): 1231-3.
- Caballero ML, Moneo I. Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitol Res*. 2004 Jun; 93 (3): 248-51.

- Caballero ML, Moneo I. Specific IgE determination to Ani s 1, a major allergen from *Anisakis simplex*, is a useful tool for diagnosis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002 Jul; 89 (1): 74-7.
- Caballero ML, Asero R, Antonicelli L, Kamberi E, Colangelo C, Fazii P, de Burgos C, Rodríguez-Pérez R. *Anisakis* allergy component-resolved diagnosis: clinical and immunologic differences between patients from Italy and Spain. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013; 162 (1): 39-44.
- Caballero ML, Moneo I, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, Casado I, Rodríguez-Pérez R. Isolation of Ani s 5, an excretory-secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis* larvae sensitization. *Parasitol Res.* 2008 Oct; 103 (5): 1231-3.
- Caballero ML, Umpierrez A, Moneo I, Rodríguez-Pérez R. Ani s 10, a new *Anisakis simplex* allergen: cloning and heterologous expression. *Parasitol Int.* 2011 Jun; 60 (2): 209-12.
- Cabrera R, Luna-Pineda MA, Suárez-Ognio L. New case of human infection by a *Pseudoterranova decipiens* larva (Nematode, Anisakidae) in Peru. *Rev Gastroenterol Peru.* 2003 Jul-Sep; 23 (3): 217-20.
- Carballeda-Sangiao N, Olivares F, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Tejada M, Moneo I, González-Muñoz M. Identification of autoclave-resistant *Anisakis simplex* allergens. *J Food Prot.* 2014 Apr; 77 (4): 605-9.
- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Navas A, Caballero T, Domínguez-Ortega J, Jurado-Palomo J, González-Muñoz M. Ani s 11-Like Protein Is a Pepsin- and Heat-Resistant Major Allergen of *Anisakis* spp. and a Valuable Tool for

Anisakis Allergy Component-Resolved Diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016a; 169 (2): 108-12.

- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Navas A, Moneo I, González-Muñoz M. Changes over Time in IgE Sensitization to Allergens of the Fish Parasite *Anisakis* spp. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016b, 10(7): e0004864. doi:10.1371/journal.pntd.0004864.

- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Puente S, Gutiérrez MT, Moneo I, González-Muñoz M. *Anisakis/Ascaris* IgE ratio improves specificity for the diagnosis of *Anisakis simplex* sensitization in travellers and immigrants. *Acta Trop.* 2014 Oct; 138: 1-4.

- Cardona V, Ansotegui IJ. Component-resolved diagnosis in anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2016 Jun; 16 (3): 244-9.

- Carrera M, Gallardo JM, Pascual S, González ÁF, Medina I. Protein biomarker discovery and fast monitoring for the identification and detection of Anisakids by parallel reaction monitoring (PRM) mass spectrometry. *J Proteomics.* 2016 Jun 16; 142: 130-7.

- Castelló-Orvay F. *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción.* Barcelona, Edicions Universitat Barcelona, 1993.

- Castelló-Orvay F. Alimentos y estrategias de alimentación para reproductores y juveniles de peces marinos. En: *Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.* Noviembre 15-18, 1998. Civera-Cerecedo R, Pérez-Estrada CJ, Ricque-Marie D y Cruz-Suárez LE (Eds). La Paz, México: BCS; 2000. p 550-569.

- Chai JY, Darwin Murrell K, Lymbery AJ. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Int J Parasitol.* 2005 Oct; 35 (11-12): 1233-54.
- Cho MK, Park MK, Kang SA, Caballero ML, Perez-Pinar T, Rodriguez-Perez R, Ock MS, Cha HJ, Hong YC, Yu HS. Allergenicity of two *Anisakis simplex* allergens evaluated in vivo using an experimental mouse model. *Exp Parasitol.* 2014 Nov;146:71-7.
- Cho SW, Lee HN. Immune reactions and allergy in experimental anisakiasis. *Korean J Parasitol.* 2006 Dec; 44 (4): 271-83.
- Couture C, Measures L, Gagnon J, Desbiens C. Human intestinal anisakiosis due to consumption of raw salmon. *Am J Surg Pathol.* 2003 Aug; 27 (8): 1167-72.
- Daschner A, Alonso-Gómez A, Caballero T, Suarez-De-Parga JM, López-Serrano MC. Usefulness of early serial measurement of specific and total immunoglobulin E in the diagnosis of gastro-allergic anisakiasis. *Clin Exp Allergy.* 1999 Sep; 29 (9): 1260-4.
- Daschner A, Alonso-Gómez A, Cabañas R, Suárez-de-Parga JM, López-Serrano MC. Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol.* 2000 Jan; 105 (1 Pt 1): 176-81.
- Daschner A, Cuéllar C, Sánchez-Pastor S, Pascual CY, Martín-Esteban M. Gastro-allergic anisakiasis as a consequence of simultaneous primary and secondary immune response. *Parasite Immunol.* 2002 May; 24 (5): 243-51.

- Daschner A, De Frutos C, Valls A, Vega F. Anisakis simplex sensitization-associated urticaria: short-lived immediate type or prolonged acute urticaria. *Arch Dermatol Res.* 2010 Oct; 302 (8): 625-9.
- Daschner A, Pascual CY. Anisakis simplex: sensitization and clinical allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005 Jun; 5 (3): 281-5.
- Daschner A, Rodero M, De Frutos C, Valls A, Vega F, Blanco C, Cuéllar C. Different serum cytokine levels in chronic vs. acute Anisakis simplex sensitization-associated urticaria. *Parasite Immunol.* 2011 Jun; 33 (6): 357-62.
- Deardorff TL, Kent ML. Prevalence of larval Anisakis simplex in pen-reared and wild-caught salmon (Salmonidae) from Puget Sound, Washington. *J Wildl Dis.* 1989 Jul; 25 (3): 416-9.
- Del Pozo MD, Audicana M, Diez JM, Munoz D, Ansotegui IJ, Fernández E, García M, Etxenagusia M, Moneo I, Fernández de Corres L. Anisakis simplex, a relevant etiologic factor in acute urticaria. *Allergy.* 1997 May; 52 (5): 576-9.
- Del Pozo V, Arrieta I, Tuñon T, Cortegano I, Gomez B, Cárđaba B, Gallardo S, Rojo M, Renedo G, Palomino P, Tabar AI, Lahoz C. Immunopathogenesis of human gastrointestinal infection by Anisakis simplex. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Sep; 104 (3 Pt 1): 637-43.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2010). Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal* 8, 1543, 91 pp.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2014). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA Journal* 2014; 12 (11): 3894.

- Eller E, Mortz CG, Bindslev-Jensen C. Cor a 14 is the superior serological marker for hazelnut allergy in children, independent of concomitant peanut allergy. *Allergy*. 2016 Apr; 71 (4): 556-62.
- Faeste CK, Jonscher KR, Dooper MM, Egge-Jacobsen W, Moen A, Daschner A, Egaas E, Christians U. Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. *EuPA Open Proteom*. 2014 Sep; 4: 140-155.
- Faeste CK, Plassen C, Lovberg KE, Moen A, Egaas E. Detection of proteins from the fish parasite *Anisakis simplex* in Norwegian farmed salmon and processed fish products. *Food Anal. Methods* (2015) 8: 1390-1402.
- FAO (Food and Agriculture Organisation), 1988. Manual on fish canning. Fisheries Technical Paper – 285 (<http://www.fao.org/DOCREP/003/T0007E/T0007E00.HTM>), fecha consulta: 24 de junio de 2016.
- Frezzolini A, Cadoni S, De Pità O. Usefulness of the CD63 basophil activation test in detecting *Anisakis* hypersensitivity in patients with chronic urticaria: diagnosis and follow-up. *Clin Exp Dermatol*. 2010 Oct; 35 (7): 765-70.
- Gamboa PM, Asturias J, Martínez R, Antépara I, Jáuregui I, Urrutia I, Fernández J, Sanz ML. Diagnostic utility of components in allergy to *Anisakis simplex*. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2012; 22 (1): 13-9.
- García M, Moneo I, Audicana MT, del Pozo MD, Muñoz D, Fernández E, Díez J, Etxenagusia MA, Ansotegui IJ, Fernández de Corres L. The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Apr; 99 (4): 497-501.

- Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Carvalho OS, Corrêa-Oliveira R. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Parasite Immunol.* 2002 Nov-Dec; 24 (11-12): 499-509.
- González-Amores Y, Clavijo-Frutos E, Salas-Casanova C, Alcain-Martínez G. Direct parasitological diagnosis of infection with *Hysterothylacium aduncum* in a patient with epigastralgia. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015 Nov; 107 (11): 699-700.
- González-Fernández J, Daschner A, Nieuwenhuizen NE, Lopata AL, Frutos CD, Valls A, Cuéllar C. Haemoglobin, a new major allergen of *Anisakis simplex*. *Int J Parasitol.* 2015 May; 45 (6): 399-407.
- González-Muñoz M, Luque R, Nauwelaers F, Moneo I. Detection of *Anisakis simplex*-induced basophil activation by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005 Nov; 68 (1): 31-6.
- González-Muñoz M, Rodríguez-Mahillo AI, Moneo I. Different Th1/Th2 responses to *Anisakis simplex* are related to distinct clinical manifestations in sensitized patients. *Parasite Immunol.* 2010 Jan; 32 (1): 67-73.
- Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S. Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of Ani s 2 and Ani s 3. *Int J Dermatol.* 2007 Feb; 46 (2): 146-50.
- Gutiérrez R, Cuéllar C. Immunoglobulins anti-*Anisakis simplex* in patients with gastrointestinal diseases. *J Helminthol.* 2002; 76 (2): 131-6.
- Hagel I, Cabrera M, Buvat E, Gutiérrez L, Santaella C, Borges R, Infante B, Salas MC, Barrios Y. Antibody responses and resistance against *Ascaris lumbricoides*

infection among Venezuelan rural children: the influence of ethnicity. *J Trop Pediatr.* 2008 Oct; 54(5): 354-6.

- Hemsrichart V. Intestinal anisakiasis: first reported case in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 1993 Feb; 76 (2): 117-21.
- Hiramoto JT, Tokeshi J. Anisakiasis in Hawaii: a radiological diagnosis. *Hawaii Med J.* 1991 Jun; 50 (6): 202-3.
- Hoshino C, Narita M. Anisakis simplex-induced anaphylaxis. *J Infect Chemother.* 2011 Aug; 17 (4): 544-6.
- Ibarrola I, Arilla MC, Herrero MD, Esteban MI, Martínez A, Asturias JA. Expression of a recombinant protein immunochemically equivalent to the major Anisakis simplex allergen Ani s 1. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2008; 18 (2): 78-83.
- Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM, Santamarina MT, Navarrete I, Sanmartín ML. Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of Anisakis simplex and other nematodes. *Parasitol Res.* 1996; 82 (4): 378-81.
- Im KI, Shin HJ, Kim BH, Moon SI. Gastric anisakiasis cases in Cheju-do, Korea. *Korean J Parasitol.* 1995 Sep; 33 (3): 179-86.
- James LK, Till SJ. Potential Mechanisms for IgG4 Inhibition of Immediate Hypersensitivity Reactions. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016 Mar; 16 (3): 23.
- Johansson E, Aponno M, Lundberg M, van Hage-Hamsten M. Allergenic cross-reactivity between the nematode Anisakis simplex and the dust mites *Acarus siro*,

Lepidoglyphus destructor, Tyrophagus putrescentiae, and Dermatophagoides pteronyssinus. Allergy. 2001 Jul; 56 (7): 660-6.

- Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. Eur J Immunol. 2003 May; 33 (5): 1205-14.
- Karl H. Dioxins and anisakid species in cod liver from Greenland – consumer related aspects. 44 WEFTA Meeting. Comunicación oral. 9-11 Junio, 2014; Bilbao, España.
- Karmanova IV, Plashkova VV, Nechaeva OIu, Gubina VV. A case of human anisakiasis in Kamchatka. Med Parazitol (Mosk). 2002 Apr-Jun; (2): 32-3.
- Kasuya S, Hamano H, Izumi S. Mackerel-induced urticaria and Anisakis. Lancet. 1990 Mar 17; 335 (8690): 665.
- Kliks MM. Anisakiasis in the western United States: four new case reports from California. Am J Trop Med Hyg. 1983 May; 32 (3): 526-32.
- Kobayashi Y, Shimakura K, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from Anisakis simplex. Mol Biochem Parasitol. 2007b Oct; 155 (2): 138-45.
- Kobayashi Y, Ishizaki S, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K. Molecular cloning and expression of two new allergens from Anisakis simplex. Parasitol Res. 2007a May; 100 (6): 1233-41.

- Kobayashi Y, Kakemoto S, Shimakura K, Shiomi K. Molecular Cloning and Expression of a New Major Allergen, Ani s 14, from *Anisakis simplex*. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2015; 56 (5): 194-9.
- Kobayashi Y, Ohsaki K, Ikeda K, Kakemoto S, Ishizaki S, Shimakura K, Nagashima Y, Shiomi K. Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitol Int*. 2011 Jun; 60 (2): 144-50.
- Konstantinou GN, Nowak-Węgrzyn A, Bencharitiwong R, Bardina L, Sicherer SH, Sampson HA. Egg-white-specific IgA and IgA2 antibodies in egg-allergic children: is there a role in tolerance induction? *Pediatr Allergy Immunol*. 2014 Feb; 25 (1): 64-70.
- Lambert C, Guilloux L, Dzviga C, Gourgaud-Massias C, Genin C. Flow cytometry versus histamine release analysis of in vitro basophil degranulation in allergy to Hymenoptera venom. *Cytometry B Clin Cytom*. 2003 Mar; 52 (1): 13-9.
- Lock G, Ehresmann J, Jöntvedt E. Severe segmental colitis due to anisakiasis. Unusual manifestation of a rare infection in Germany. *Dtsch Med Wochenschr*. 2008 Sep; 133 (36): 1779-82.
- López E, Cuadrado C, Burbano C, Jiménez MA, Rodríguez J, Crespo JF. Effects of autoclaving and high pressure on allergenicity of hazelnut proteins. *J Clin Bioinforma*. 2012; 2 (1): 12.
- López-Matas MA, Iraola V, Moya R, Vailes LD, Pomés A, Boquete M, Fernández-Caldas E, Arlian LG, Chapman M, Carnés J. Cloning and characterization of

tropomyosin from the mite *Chortoglyphus arcuatus*. *Mol Immunol*. 2015 Dec; 68 (2 Pt C): 634-40.

- López-Sáez MP, Zubeldia JM, Caloto M, Olalde S, Pelta R, Rubio M, Baeza ML. Is *Anisakis simplex* responsible for chronic urticaria? *Allergy Asthma Proc*. 2003 Sep-Oct; 24 (5): 339-45.

- Lozano MJ, Martín HL, Díaz SV, Mañas AI, Valero LA, Campos BM. Cross-reactivity between antigens of *Anisakis simplex* s.l. and other ascarid nematodes. *Parasite*. 2004 Jun; 11 (2): 219-23.

- Ludovisi A, Di Felice G, Marucci G, Carballeda-Sangiao N, Barletta B, Butteroni C, Corinti S, González-Muñoz M, Pozio E, Gómez-Morales MA; Allergen capacity of Anisakidae worms other than *Anisakis* spp. in an animal model. Abstract. 12th European Multicolloquium of Parasitology (EMOP) Turku, Finlandia, Julio 20-24, 2016.

- Madi L, Ali M, Legace-Wiens P, Duerksen DR. Gastrointestinal manifestations and management of anisakiasis. *Can J Gastroenterol*. 2013 Mar; 27 (3): 126-7.

- Maizels RM. Infections and allergy – helminths, hygiene and host immune regulation. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 656–61.

- Martínez-Aranguren RM, Gamboa PM, García-Lirio E, Asturias J, Goikoetxea MJ, Sanz ML. In vivo and in vitro testing with rAni s 1 can facilitate diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014; 24 (6): 431-8.

- Mattiucci S, Fazii P, De Rosa A, Paoletti M, Megna AS, Glielmo A, De Angelis M, Costa A, Meucci C, Calvaruso V, Sorrentini I, Palma G, Bruschi F, Nascetti G.

Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2013 Mar; 19 (3): 496-9.

- Mattiucci S, Nascetti G. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite.* 2006 Jun; 13 (2): 99-113.
- Mercado R, Torres P, Muñoz V, Apt W. Human infection by *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Anisakidae) in Chile: report of seven cases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001 Jul; 96 (5): 653-5.
- Minciullo PL, Cascio A, David A, Pernice LM, Calapai G, Gangemi S. Anaphylaxis caused by helminths: review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012 Oct; 16 (11): 1513-8.
- Mitre E, Nutman TB. IgE memory: persistence of antigen-specific IgE responses years after treatment of human filarial infections. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Apr; 117 (4): 939-45.
- Mladineo I, Popović M, Drmić-Hofman I, Poljak V. A case report of *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) identified from archival paraffin sections of a Croatian patient. *BMC Infect Dis.* 2016 Feb 1; 16 (1): 42.
- Mo TA, Gahr A, Hansen H, Hoel E, Oaland Ø, Poppe TT. Presence of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809 det. Krabbe, 1878) and *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda; Anisakidae) in runts of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis.* 2014 Feb; 37 (2): 135-40.

- Moneo I, Caballero ML, Gómez F, Ortega E, Alonso MJ. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jul; 106 (1 Pt 1): 177-82.
- Moneo I, Caballero ML, González-Muñoz M, Rodríguez-Mahillo AI, Rodríguez-Pérez R, Silva A. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol Res*. 2005 Jul; 96 (5): 285-9.
- Moneo I, Caballero ML, Rodríguez-Pérez R, Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M. Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Parasitol Res*. 2007 Sep; 101 (4): 1051-5.
- Montoro A, Perteguer MJ, Chivato T, Laguna R, Cuéllar C. Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*. *Allergy*. 1997 Oct; 52 (10): 985-91.
- Moreno FJ. Gastrointestinal digestion of food allergens: effect on their allergenicity. *Biomed Pharmacother*. 2007; 61 (1): 50-60.
- Morgan JE, Daul CB, Lehrer SB. The relationships among shrimp-specific IgG subclass antibodies and immediate adverse reactions to shrimp challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1990 Sep; 86 (3 Pt 1): 387-92.
- Moro Moro M, Tejedor Alonso MA, Esteban Hernández J, Múgica García MV, Rosado Ingelmo A, Vila Albelda C. Incidence of anaphylaxis and subtypes of anaphylaxis in a general hospital emergency department. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2011; 21 (2): 142-9.
- Na HK, Seo M, Chai JY, Lee EK, Jeon SM. A case of anisakidosis caused by *Pseudoterranova decipiens* larva. *Korean J Parasitol*. 2013 Feb; 51 (1): 115-7.

- Nadler SA, D'Amelio S, Dailey MD, Paggi L, Siu S, Sakanari JA. Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from northern Pacific marine mammals. *J Parasitol*. 2005 Dec; 91 (6): 1413-29.
- Niederberger V, Ring J, Rakoski J, Jager S, Spitzauer S, Valent P, Horak F, Kundi M, Valenta R. Antigens drive memory IgE responses in human allergy via the nasal mucosa. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007; 142 (2): 133-44.
- Nieuwenhuizen N, Lopata AL, Jeebhay MF, Herbert DR, Robins TG, Brombacher F. Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 May; 117 (5): 1098-105.
- Nieuwenhuizen NE, Lopata AL. *Anisakis*- A food-borne parasite that triggers allergic host defences. *Int J Parasitol*. 2013 Nov; 43 (12-13): 1047-57.
- Nieuwenhuizen NE, Lopata AL. Allergic reactions to *Anisakis* found in fish. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014 Aug; 14 (8): 455.
- Olivares F, González-Muñoz M, Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, de Las Heras C, Navas A, Tejada M. Removal of *Anisakis simplex* allergens from infected fish during the washing step of surimi production. *J Sci Food Agric*. 2015 Oct; 95 (13): 2626-31.
- Pascual S, Abollo E. Whaleworms as a tag to map zones of heavy-metal pollution. *Trends Parasitol*. 2005 May; 21 (5): 204-6.
- Patelis A, Gunnbjörnsdóttir M, Borres MP, Burney P, Gislason T, Torén K, Forsberg B, Alving K, Malinowski A, Janson C. Natural history of perceived food hypersensitivity and IgE sensitisation to food allergens in a cohort of adults. *PLoS One*. 2014 Jan 10; 9 (1): e85333.

- Peñalver J, Dolores EM, Muñoz P. Absence of anisakid larvae in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in Southeast Spain. *J Food Prot.* 2010 Jul; 73 (7): 1332-4.
- Perezábad L, Reche M, Valbuena T, López-Fandiño R, Molina E, López-Expósito I. Clinicalefficacy and immunologicalchangessubjacent to egg oral immunotherapy. *Ann AllergyAsthmaImmunol.* 2015 Jun; 114 (6): 504-9.
- Pérez-Pérez J, Fernández-Caldas E, Marañón F, Sastre J, Bernal ML, Rodríguez J, Bedate CA. Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000 Oct; 123 (2): 120-9.
- Pontone S, Leonetti G, Guaitoli E, Mocini R, Manfredelli S, Catania A, Pontone P, Sorrenti S. Should the host reaction to anisakiasis influence the treatment? Different clinical presentations in two cases. *Rev Esp Enferm Dig.* 2012 Dec; 104 (11): 607-10.
- Qin Y, Zhao Y, Ren Y, Zheng L, Dai X, Li Y, Mao W, Cui Y. Anisakiasis in China: the first clinical case report. *Foodborne Pathog Dis.* 2013 May; 10 (5): 472-4.
- Rodero I, García-Comas L, Moneo I, Caballero ML, Sanz JC, Ordobás M, Cañellas S, Romera PL. Seroprevalencia frente a *Anisakis simplex* en población adulta de la Comunidad de Madrid. XXIII Reunión Científica de la Sociedad Española de Epidemiología. Las Palmas de Gran Canaria, 1-5 de noviembre de 2005.
- Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, de las Heras C, Tejada M, Moneo I. Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle. *Foodborne Pathog Dis.* 2010 Aug; 7 (8): 967-73.
- Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, Gómez-Aguado F, Rodríguez-Pérez R, Corcuera MT, Caballero ML, Moneo I. Cloning and characterisation of the *Anisakis*

simplex allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *Int J Parasitol.* 2007 Jul; 37 (8-9): 907-17.

- Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, Moneo I, Solas MT, Mendizábal A, de las Heras C, Tejada M. Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion. *J Food Prot.* 2008 Dec; 71 (12): 2578-81.

- Rodríguez-Pérez R, Moneo I, Rodríguez-Mahillo A, Caballero ML. Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. *Mol Biochem Parasitol.* 2008 Jun; 159 (2): 92-7.

- Roubledakis K, Marchiori NC, Paseto Á, Gonçalves EL, Luque JL, Cepeda PB, Sanches EG, Martins ML. Parasite fauna of wild and cultured dusky-grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) from Ubatuba, southeastern Brazil. *Braz J Biol.* 2013 Nov; 73 (4): 871-8.

- Sabato V, van Hengel AJ, De Knop KJ, Verweij MM, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Schiavino D, Stevens WJ, Ebo DG. Basophil activation reveals divergent patient-specific responses to thermally processed peanuts. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2011; 21 (7): 527-31.

- Santos AF, Lack G. Basophil activation test: food challenge in a test tube or specialist research tool?. *Clin Transl Allergy.* 2016 Mar 15;6:10.

- Sastre J, Lluch-Bernal M, Quirce S, Arrieta I, Lahoz C, Del Amo A, Fernández-Caldas E, Marañón F. A double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite, *Anisakis simplex*. *Allergy.* 2000 Jun; 55 (6): 560-4.

- Shamsi S, Butcher AR. First report of human anisakidosis in Australia. *Med J Aust.* 2011 Feb 21; 194 (4): 199-200.
- Shih HH, Ku CC, Wang CS. *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) third-stage larval infections of marine cage cultured cobia, *Rachycentron canadum* L., in Taiwan. *Vet Parasitol.* 2010 Aug 4; 171 (3-4): 277-85.
- Shimakura K, Miura H, Ikeda K, Ishizaki S, Nagashima Y, Shirai T, Kasuya S, Shiomi K. Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Mol Biochem Parasitol.* 2004 May; 135 (1): 69-75.
- Solas MT, García ML, de las Heras C, Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, Moneo I, Mendizábal A, Tejada M. *Anisakis Simplex* Antigens in Fresh and Frozen-thawed Muscle of Anchovies in Vinegar. *Food Sci Technol Int.* 2009; 15: 2139-148.
- Solas MT, García ML, Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, de las Heras C, Tejada M. *Anisakis* antigens detected in fish muscle infested with *Anisakis simplex* L3. *J Food Prot.* 2008 Jun; 71 (6): 1273-6.
- Tay SS, Clark AT, Deighton J, King Y, Ewan PW. Patterns of immunoglobulin G responses to egg and peanut allergens are distinct: ovalbumin-specific immunoglobulin responses are ubiquitous, but peanut-specific immunoglobulin responses are up-regulated in peanut allergy. *ClinExpAllergy.* 2007 Oct; 37 (10): 1512-8.
- Tejada M, Olivares F, de las Heras C, Careche M, Solas MT, García ML, Fernández A, Mendizábal A, Navas A, Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M. Antigenicity of *Anisakis simplex* s.s. L3 in parasitized fish after heating conditions used in the canning processing. *J Sci Food Agric.* 2015 Mar 30; 95 (5): 922-7.

- Toro C, Caballero ML, Baquero M, García-Samaniego J, Casado I, Martínez P, Alarcón T, Moneo I. Seropositivity to a major allergen of *Anisakis simplex*, *Anisakis* 1, in dyspeptic patients with *Helicobacter pylori* infection: histological and laboratory findings and clinical significance. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12 (5): 453-8.
- Trujillo MJ, Rodríguez A, Gracia Bara MT, Matheu V, Herrero T, Rubio M, Zubeldia JM, Baeza ML. Dietary recommendations for patients allergic to *Anisakis simplex*. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2002 Nov-Dec; 30 (6): 311-4.
- Turcanu V, Maleki SJ, Lack G. Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(7):1065-72.
- Turner JD, Faulkner H, Kamgno J, Kennedy MW, Behnke J, Boussinesq M, Bradley JE. Allergen-specific IgE and IgG4 are markers of resistance and susceptibility in a human intestinal nematode infection. *Microbes Infect*. 2005 Jun; 7 (7-8): 990-6.
- Valiñas B, Lorenzo S, Eiras A, Figueiras A, Sanmartín ML, Ubeira FM. Prevalence of and risk factors for IgE sensitization to *Anisakis simplex* in a Spanish population. *Allergy*. 2001 Jul; 56 (7): 667-71.
- Van Ree R, Vieths S, Poulsen LK. Allergen-specific IgE testing in the diagnosis of food allergy and the event of a positive match in the bioinformatics search. *Mol Nutr Food Res*. 2006 Jul; 50 (7): 645-54.
- Van Thiel PH, van Houten H. The herring worm *Anisakis marina* as a human parasite outside the wall of the gastrointestinal tract. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 1966 Aug 27; 110 (35): 1524-8.

- Ventura MT, Tummolo RA, Di Leo E, D'Ersasmo M, Arsieni A. Immediate and cell-mediated reactions in parasitic infections by *Anisakis simplex*. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2008; 18 (4): 253-9.
- Vidaček S, de las Heras C, Solas MT Rodríguez-Mahillo, AI, Tejada M. Effect of high hydrostatic pressure on mortality and allergenicity of *Anisakis simplex* L3 and on muscle properties of infested hake. *J Sci Food Agric*. 2009; 89: 2228–2235.
- Vidaček S, De Las Heras C, Solas MT, García ML, Mendizábal A, Tejada M. Viability and antigenicity of *Anisakis simplex* after conventional and microwave heating at fixed temperatures. *J Food Prot*. 2011 Dec; 74 (12): 2119-26.
- Vidaček S, de las Heras C, Solas MT, Mendizábal A, Rodríguez-Mahillo AI, Tejada M. Antigenicity and viability of *Anisakis* larvae infesting hake heated at different time-temperature conditions. *J Food Prot*. 2010 Jan; 73 (1): 62-8.
- Vidaček S, de las Heras C, Solas MT, Mendizábal A, Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, Tejada M. *Anisakis simplex* allergens remain active after conventional or microwave heating and pepsin treatments of chilled and frozen L3 larvae. *J Sci Food Agric* 2009; 89: 1997-2002.
- Zullo A, Hassan C, Scaccianoce G, Lorenzetti R, Campo SM, Morini S. Gastric anisakiasis: do not forget the clinical history!. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2010 Dec; 19 (4): 359.

Anexos

Anexo I. Análisis de correlación

La tabla muestra el análisis de correlación con el test rho de Spearman de los valores de las citocinas en los sobrenadantes de cultivo con extracto crudo de *Anisakis* sp. y el tiempo transcurrido desde el episodio alérgico.

Correlaciones											
			meses desde episodio	Crudo_IL17A	Crudo_IFN	Crudo_TNF	Crudo_IL10	Crudo_IL5	Crudo_IL6	Crudo_IL4	Crudo_IL2
Rho de Spearman	meses desde episodio	Coefficiente de correlación	1,000	1,000**	-,356	-,169	,073	-,513**	-,633*	-,346	-,353*
		Sig. (bilateral)	.	.	,088	,399	,729	,003	,015	,061	,047
		N	33	3	24	27	25	32	14	30	32
Crudo_IL17A		Coefficiente de correlación	1,000**	1,000	,377	,870**	,978**	-,410	,765**	,816	,688**
		Sig. (bilateral)	.	.	,461	,000	,000	,493	,000	,269	,001
		N	3	20	6	18	17	5	20	5	20
Crudo_IFN		Coefficiente de correlación	-,356	,377	1,000	,178	,387*	,458**	-,247	,469**	,320*
		Sig. (bilateral)	,088	,461	.	,260	,013	,003	,307	,003	,028
		N	24	6	47	42	41	39	19	38	47
Crudo_TNF		Coefficiente de correlación	-,169	,870**	,178	1,000	,380**	,590**	,376*	,581**	,794**
		Sig. (bilateral)	,399	,000	,260	.	,003	,000	,031	,000	,000
		N	27	18	42	67	58	44	33	43	67
Crudo_IL10		Coefficiente de correlación	,073	,978**	,387*	,380**	1,000	-,146	,448*	,092	,220
		Sig. (bilateral)	,729	,000	,013	,003	.	,363	,015	,573	,086
		N	25	17	41	58	62	41	29	40	62
Crudo_IL5		Coefficiente de correlación	-,513**	-,410	,458**	,590**	-,146	1,000	-,010	,911**	,853**
		Sig. (bilateral)	,003	,493	,003	,000	,363	.	,964	,000	,000
		N	32	5	39	44	41	54	22	47	54
Crudo_IL6		Coefficiente de correlación	-,633*	,765**	-,247	,376*	,448*	-,010	1,000	-,054	,270
		Sig. (bilateral)	,015	,000	,307	,031	,015	,964	.	,805	,097
		N	14	20	19	33	29	22	39	23	39
Crudo_IL4		Coefficiente de correlación	-,346	,816	,469**	,581**	,092	,911**	-,054	1,000	,725**
		Sig. (bilateral)	,061	,269	,003	,000	,573	,000	,805	.	,000
		N	30	5	38	43	40	47	23	50	50
Crudo_IL2		Coefficiente de correlación	-,353*	,688**	,320*	,794**	,220	,853**	,270	,725**	1,000
		Sig. (bilateral)	,047	,001	,028	,000	,086	,000	,097	,000	.
		N	32	20	47	67	62	54	39	50	78

La tabla muestra el análisis de correlación con el test rho de Spearman de los valores de las inmunoglobulinas específicas de *Anisakis* sp. y el tiempo transcurrido desde el episodio alérgico.

			meses desde episodio	IgG_CAP	IgG4_CAP	IgA_CAP	IgE_específica_CAP
Rho de Spearman	meses desde episodio	Coefficiente de correlación	1,000	-,455*	-,211	-,274	-,499**
		Sig. (bilateral)	.	,010	,246	,150	,003
		N	33	31	32	29	33
IgG_CAP	IgG_CAP	Coefficiente de correlación	-,455*	1,000	,508**	,310*	,172
		Sig. (bilateral)	,010	.	,000	,030	,227
		N	31	54	52	49	51
IgG4_CAP	IgG4_CAP	Coefficiente de correlación	-,211	,508**	1,000	,214	,259
		Sig. (bilateral)	,246	,000	.	,139	,064
		N	32	52	54	49	52
IgA_CAP	IgA_CAP	Coefficiente de correlación	-,274	,310*	,214	1,000	-,096
		Sig. (bilateral)	,150	,030	,139	.	,516
		N	29	49	49	49	48
IgE_específica_CAP	IgE_específica_CAP	Coefficiente de correlación	-,499**	,172	,259	-,096	1,000
		Sig. (bilateral)	,003	,227	,064	,516	.
		N	33	51	52	48	57

Anexo II.

Difusión de resultados de la Tesis

Publicaciones

- Carballeda-Sangiao N, Olivares F, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Tejada M, Moneo I, González-Muñoz M. Identification of autoclave-resistant *Anisakis simplex* allergens. J Food Prot. 2014 Apr; 77 (4): 605-9.
- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Navas A, Caballero T, Domínguez-Ortega J, Jurado-Palomo J, González-Muñoz M. Anis 11-Like Protein Is a Pepsin- and Heat-Resistant Major Allergen of *Anisakis* spp. and a Valuable Tool for *Anisakis* Allergy Component-Resolved Diagnosis. Int Arch Allergy Immunol. 2016; 169 (2): 108-12.
- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Navas A, Moneo I, González-Muñoz M. Changes over Time in IgE Sensitization to Allergens of the Fish Parasite *Anisakis* spp. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10(7): e0004864. doi:10.1371/journal.pntd.0004864.

Comunicaciones a Congresos

- Carballeda-Sangiao N, Olivares Ponce F, Rodríguez-Mahillo AI, Moneo I, Tejada M, Mendizabal A y González-Muñoz M. Effect of boiling and autoclaving on allergenicity of *Anisakis simplex*. European Congress of Immunology. Glasgow, Scotland 5-8 September, 2012.
- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez Mahillo AI, Olivares Ponce F, Tejada M, Careche M, Moneo I, González Muñoz M. *Anisakis simplex* allergens remain biologically active after canning and simulated gastric fluid treatment of

parasitized fish. 15th International Congress of Immunology, Milan, Italy, August 22-27, 2013.

- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Gómez-Morales MA, Navas A, Buchmann K, González-Muñoz M. Detección de IgE, IgG e IgG4 contra *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova krabiei* y *Contracaecum osculatum* en pacientes sensibilizados a *Anisakis simplex*. V Jornada científica de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM), Hospital 12 de Octubre, Madrid, 12 Dic 2014.
- Allergenic potential of canned cod liver due to the presence of *Anisakis* L3. Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Buchmann K, Karl H, González-Muñoz M. 4th European Congress of Immunology (ECI), Viena, Austria, 6-9 Sep 2015.

Difusión de resultados estrechamente relacionados con el tema de la tesis doctoral

Publicaciones

- Arcos SC, Ciordia S, Roberston L, Zapico I, Jiménez-Ruiz Y, González-Muñoz M, Moneo I, Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo A, Albar JP, Navas A. Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex* sensu stricto and *A. pegreffii*. *Proteomics*. 2014 Jun; 14 (12): 1547-68.
- Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Puente S, Gutiérrez MT, Moneo I, González-Muñoz M. *Anisakis/Ascaris* IgE ratio improves specificity for the diagnosis of *Anisakis simplex* sensitization in travellers and immigrants. *Acta Trop*. 2014 Oct; 138: 1-4.

- Olivares F, González-Muñoz M, Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, de Las Heras C, Navas A, Tejada M. Removal of *Anisakis simplex* allergens from infected fish during the washing step of surimi production. J Sci Food Agric. 2015 Oct; 95 (13): 2626-31.

Comunicaciones a Congresos

- Olivares F, de las Heras C, Rodríguez-Mahillo AI, Carballeda-Sangiao N, González-Muñoz M, Solas MT, Careche M, Tejada M. Effect of long-term freezing of infested muscle on the extraction, detection and quantification of *Anisakis* allergens. 43rd WEFTA Conference. Tromsø, Norway. October 2013.
- Olivares F, de las Heras C, Rodríguez-Mahillo AI, Carballeda-Sangiao N, González-Muñoz M, Careche M, Tejada M. Effect of cryoprotectants on allergens during frozen storage of surimi from hake infected with *Anisakis simplex* larvae. 44th WEFTA meeting. Bilbao, Spain. 9th-11th June 2014.
- Olivares F, de las Heras C, Rodríguez-Mahillo AI, Carballeda-Sangiao N, González-Muñoz M, Careche M, Tejada M. Effects of frozen storage of surimi gels from hake infected with *A. simplex* larvae. 44th WEFTA meeting. Bilbao, Spain. 9th-11th June 2014.
- Isabel Sánchez-Alonso, Alfonso Navas, Susana C. Arcos, Miguel González-Muñoz, Noelia Carballeda-Sangiao, Angel Mendizábal, Margarita Tejada, Mercedes Careche. Factors affecting viability of *Anisakis* L3 during the freezing process. 44th WEFTA. Bilbao, Spain. 9-11 Jun 2014.
- Careche M, Sánchez-Alonso I, Tejada M, González Muñoz M, Carballeda-Sangiao N, Navas A. Differences between *A. simplex* s.s. and *A. pegreffii*: in

- vitro infectivity and freezing tolerance. 45th WEFTA. Nantes, France. 12-16 Oct 2015.
- Sánchez-Alonso I, Careche M, Tejada M, González Muñoz M, Carballeda-Sangiao N, Navas A, Mendizábal A. Effect of heat treatments on mobility and in vitro infectivity of *Anisakis* L3 in hake muscle infected under controlled conditions. 45th WEFTA. Nantes, France. 12-16 Oct 2015.
 - Ludovisi A, Di Felice G, Marucci G, Carballeda-Sangiao N, Barletta B, Butteroni C, Corinti S, González-Muñoz M, Pozio E, Gómez-Morales MA. Allergenic capacity of Anisakidae worms other than *Anisakis* spp. in an animal model. Abstract. 12th European Multicolloquium of Parasitology (EMOP) Turku, Finlandia. Julio 20-24, 2016.
 - Ludovisi A, Carballeda-Sangiao N, Barletta B, Mari A, González-Muñoz M, Pozio E, Gómez-Morales MA. IgE from sera of Italian subjects presumably sensitized by *Anisakis pegreffii* react with proteins from *A. simplex*, *Contracoecum osculatum* and *Pseudoterranova decipiens*. XXIX Congress SOIPA, Bari, June 2016.
 - Sánchez-Alonso I, González-Muñoz M, Carballeda-Sangiao N, Navas A, Mendizábal A, Tejada M, Careche M. *In vitro* infectivity and allergenicity of *Anisakis simplex* L3 after freezing fish muscle. 46th WEFTA. Split, Croatia /12-14 Oct 2016.

Identification of Autoclave-Resistant *Anisakis simplex* Allergens

NOELIA CARBALLEDA-SANGIAO,¹ FABIOLA OLIVARES,² ANA I. RODRIGUEZ-MAHILLO,¹ MERCEDES CARECHE,² MARGARITA TEJADA,² IGNACIO MONEO,³ AND MIGUEL GONZÁLEZ-MUÑOZ^{3*}

¹Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Carlos III, Sinesio Delgado 10, 28029, Madrid, Spain; ²Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Jose Antonio Novais 10, 28040, Madrid, Spain; and ³Department of Immunology, Hospital Carlos III, Sinesio Delgado 10, 28029, Madrid, Spain

MS 13-278: Received 4 July 2013/Accepted 5 December 2013

ABSTRACT

Anisakis simplex is a fish parasite able to induce allergic reactions in humans infected when eating raw or undercooked fish parasitized with viable third-stage larvae. Some authors claim that exposure to nonviable *Anisakis* material can result in allergic symptoms in previously sensitized patients, indicating that parasite allergens are resistant to the thermal treatments of usual cooking procedures. Furthermore, some patients report symptoms after eating canned fish. The aim of this work was the analysis of parasite allergen stability in heating to 121°C in an autoclave to simulate the thermal process applied to canned fish. Third-stage larvae were subjected to autoclaving for 20, 40, and 80 min, and parasite crude extracts were analyzed by electrophoresis, immunoblotting, and a flow-cytometric basophil activation test. Allergens resistant to autoclaving were separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography and identified by ion trap mass spectrometry. Protein analysis by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis showed that autoclaving considerably reduced the number and intensity of identifiable protein bands in a time-dependent manner. Several allergens were detected by immunoblotting with a pool of *A. simplex* allergic patients' sera after autoclaving. Allergens of 9 and 14 kDa resistant to autoclaving were identified as Ani s 4 and Ani s 1 allergens, respectively. Functional analysis showed that allergens retain their capacity to activate basophils even after autoclaving for 80 min. In conclusion, some relevant *A. simplex* allergens retain their capacity to bind immunoglobulin E and activate basophils after being subjected to autoclaving, which is a method equivalent to that used in industrial canning processes.

Anisakis simplex is a fish parasite able to induce allergic reactions in humans that have been infected when eating raw or undercooked fish parasitized with viable third-stage larvae (L3) of *A. simplex* (4). After infection, humans can become sensitized, and allergic symptoms can appear in subsequent exposures to the parasite. Some authors consider hypersensitivity reactions only occur after sensitized subjects are exposed to viable L3 (5, 20), while others conclude that exposure to parasite allergens can trigger adverse reactions even when L3 are killed by freezing and/or cooking the fish (2, 14, 23). The possibility of inducing allergic reactions by nonviable *Anisakis* material indicates that parasite allergens are resistant to thermal treatments applied for killing larvae. It has been reported that several *A. simplex* antigens and allergens are heat stable, as observed when the parasite is subjected to different time-temperature conditions (7, 25). Heat stability of the parasite proteins when cooking parasitized hake has been also shown (15). Other evidence that epitopes of *A. simplex* allergens are preserved after thermal treatments are provided by specific immune cellular responses. Extracts from cooked parasitized fish and boiled *A. simplex* L3 are able to induce activation of basophils and T cells from allergic patients (8, 15).

Characterization of *A. simplex* proteins has allowed the description of several heat-resistant allergens: the major allergen, Ani s 1 (11, 21); cystatin Ani s 4 (16); and allergens belonging to the SXP/Ral family, Ani s 5 (9), Ani s 8 (10), and Ani s 9 (18). The presence of these thermostable allergens can account for the occurrence of hypersensitivity reactions to nonviable *A. simplex* material contaminating fishery products.

The aim of this work was the analysis of parasite allergen stability in heating to 121°C in an autoclave to simulate the thermal process applied to canned fish (26). Allergen identification was performed by mass spectrometry, and preservation of allergenic properties was studied by immunoblotting and a flow cytometric basophil activation test.

MATERIALS AND METHODS

Material preparation, processing, and preparation of parasite extracts. Live *A. simplex* in L3 were obtained from heavily parasitized hake (*Merluccius merluccius*) ovaries and viscera at the central fish market (Mercamadrid) in Madrid, Spain, from fish caught in the northwest Atlantic fishing grounds. L3 were extracted from fish tissue, washed in phosphate-buffered protein (PBS), and immediately frozen at –20°C until use. L3 were autoclaved in a vertical bench top autoclave (Selecta, model Mediclave, Barcelona, Spain) at 121°C, 105 kPa for 20, 40, and 80 min. The number of L3 for each temperature was 30 in 30 ml of

* Author for correspondence. Tel: +34 914532656; Fax: +34 91 7336614; E-mail: miguel.gonzalez.munoz@salud.madrid.org.

PBS. Then, untreated and autoclaved L3 were ground in a Potter-ELV homogenizer (Corning Incorporated Life Sciences, Tewksbury, MA) and sonicated at 18 W for 5 s. Extracts were obtained after centrifugation at $16,000 \times g$ at 4°C for 10 min. Autoclaving and preparation of larvae extracts were carried out in the presence of a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Patient samples. Samples were obtained from eight patients with allergic and/or gastrointestinal symptoms within 12 h after ingestion of fish. All of them showed specific immunoglobulin (IgE) to *A. simplex* >0.5 kU_A/liter and undetectable IgE to fish (ImmunoCAP; ThermoScientific, Waltham, MA). Samples from five healthy subjects were used as controls. This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Carlos III (Madrid, Spain), and all subjects included were asked to sign an informed consent form.

Electrophoresis and immunoblotting. Extracts from untreated and heat-treated L3 were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 4 to 20% Tris-glycine gel (Novex, Life Technologies, Grand Island, NY) and stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad, Hercules, CA). For immunoblotting, proteins were transferred to nitrocellulose membranes by applying a constant current of 1.3 A for 7 min in a Trans-Blot Turbo Instrument (Bio-Rad). Membranes were blocked with PBS, 0.05% Tween 20, and 1% bovine serum albumin for 1 h at room temperature and then incubated with either a rabbit polyclonal anti-*A. simplex* crude extract (1/10,000) or a pool of *A. simplex* allergic patients' sera (1/5). Then, membranes were incubated with the corresponding secondary antisera, according to previously published methods (16).

Basophil activation test. Venous blood samples were drawn from five *A. simplex* allergic patients with positive anti-*A. simplex* IgE values. One hundred microliters of whole blood was incubated for 15 min at 37°C with 20 µl of stimulation buffer containing interleukin 3 (5 ng/ml; Pharmingen/BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) and protein extracts of untreated or autoclaved *A. simplex* L3. Ten microliters of undiluted and 1/5 and 1/25 protein extracts were assayed. Negative and positive controls were included by incubating the blood without allergen or 10 µl anti-IgE (10 mg/ml; Pharmingen), respectively. Basophil activation was stopped by adding 10 µl of EDTA (20 mM; Sigma-Aldrich) at room temperature for 5 min. To analyze basophil activation, cells, in the dark and on ice, were stained with 20 µl of CD63–fluorescein isothiocyanate/CD123–phycoerythrin/human leukocyte antigen-DR–Peridinin–chlorophyll protein reagent mixture (BD Biosciences) for 20 min. Then, samples were incubated with 2 ml of FACS Lysing solution (BD Biosciences) for 15 min at room temperature. After centrifugation ($300 \times g$, 5 min) and washing with PBS, cells were resuspended with 300 µl of PBS and analyzed on a FACSort flow cytometer (BD Biosciences). The percentage of activated basophils was calculated by subtracting spontaneous CD63 expression (negative control) from the maximum percentage value obtained from the concentration curves of protein extracts.

Reversed-phase high-performance liquid chromatography. A 50 to 90% ethanol fraction (0.7 ml) of protein extract from L3 after autoclaving at 121°C for 40 min was separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a BioBasic18 column (C18, 25 by 0.46 cm; 5-µm particle size; ThermoScientific). Sample injection and elution was performed with an Agilent 1200 Series liquid chromatograph (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). Elution was carried

out with a linear gradient of acetonitrile (ACN) in 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid (0 to 5% for 10 min and 5 to 100% for 60 min, at a flow rate of 1 ml/min). Each fraction was analyzed by SDS-PAGE and tested for IgE binding by immunoblot using a pool of allergic patient sera.

Ion trap mass spectrometry. Mass spectrometry was performed at the Proteomics and Genomics Facility, Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, Spain). Protein bands from RP-HPLC fractions, detected by human sera and visualized with Coomassie R-250, were excised from gel and destained in 50 mM ammonium bicarbonate/50% ACN, dehydrated with ACN, and dried. Gel pieces were rehydrated with 12.5 ng/liter trypsin in 50 mM ammonium bicarbonate and incubated overnight at 30°C. Peptides were extracted at 37°C using ACN 100% and then 0.5% trifluoroacetic acid, dried, cleaned using ZipTip (Millipore, Billerica, MA), and reconstituted in 5 µl of 0.1% formic acid–2% ACN. Peptides were analyzed by a nanoflow HPLC (ThermoScientific) coupled on line to a Linear Trap Quadrupole (LTQ) Orbitrap Velos (ThermoScientific) mass spectrometer via a nano-electrospray ion source (ThermoScientific). Briefly, peptides were loaded onto a C18-A1 ASY-Column 2-cm precolumn (Thermo Scientific) and then eluted onto a Biosphere C18 column (C18, inner diameter, 15 cm by 75 µm, 3-µm particle size; Nano Separations, Nieuwkoop, The Netherlands) and separated with a linear gradient from 2 to 99% ACN in 0.1% formic acid at a flow rate of 250 nl/min. Mass spectra were acquired on the LTQ Orbitrap Velos in the positive ion mode. Full-scan mass spectrometry spectra (*m/z* 300 to 1,700) were acquired in the Orbitrap with a target value of 1,000,000 at a resolution of 60,000, and the 15 most intense ions were selected for collision-induced dissociation fragmentation in the LTQ, with a target value of 10,000 and normalized collision energy of 35%. Mass spectra *.raw files were searched against the UniProtKB database using SEQUEST and MASCOT (version 2.3, Matrix Science, Boston, MA) search engines through Proteome Discoverer (version 1.3.0.339, ThermoScientific). Search parameters included a maximum of two missed cleavages allowed, carbamidomethylation of cysteines as a fixed modification, and oxidation of methionine as variable modifications. Precursor and fragment mass tolerance were set to 10 ppm and 0.8 Da, respectively. Identified peptides were filtered by false discovery rate of 0.01 using a peptide validator.

Statistics. Quantitative variables are described by median and range.

RESULTS

The effect of autoclaving on parasite proteins was analyzed by SDS-PAGE. The main effect observed was that autoclaving considerably reduced the number and intensity of identifiable protein bands. There was no difference in protein profile between autoclaving for 20 and 40 min, while a high reduction in intensity of protein bands was observed after 80 min (Fig. 1). A protein band of 12 kDa was clearly identifiable even at 80 min of autoclaving, and diffuse protein bands at about 7 to 16 kDa were also visible, suggesting that protein degradation occurred during processing. Antigen stability to autoclaving was tested with specific rabbit polyclonal anti-*A. simplex* crude extract antiserum. Most proteins detected in the untreated L3 became undetectable after autoclaving, and the antigen bands were mainly located in the range of 6 to 16 kDa.

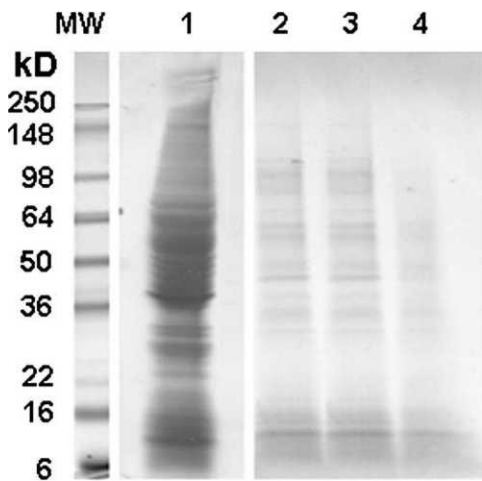


FIGURE 1. Effect of autoclaving on *A. simplex* proteins. Crude extracts of untreated (lane 1) and treated L3 for 20, 40, and 80 min at 121°C (lanes 2, 3, and 4, respectively) were analyzed by SDS-PAGE. MW, molecular weight standards.

Autoclaving for 80 min had a greater effect on antigen recognition as observed in the SDS-PAGE analysis, and only one protein band at 7 kDa was detected (Fig. 2A).

Regarding allergenic epitopes, autoclaving reduced the allergens detected by a pool of human sera as compared with the allergen profile found in untreated L3 (Fig. 2B). Allergens of 250, 35, and 9 kDa as well as a wide band of 12 to 15 kDa were identified after 40 min of autoclaving. The low-molecular-weight allergens were highly heat resistant because they were still detected after 80 min.

To characterize the heat-resistant low-molecular-weight allergens detected after autoclaving, a 50 to 90% ethanol fraction of the protein extract after 40 min of autoclaving was subjected to RP-HPLC. Several proteins were detected in the eluted fractions by SDS-PAGE (Fig. 3A). In specific IgE-immunoblotting assay with human pooled sera, several

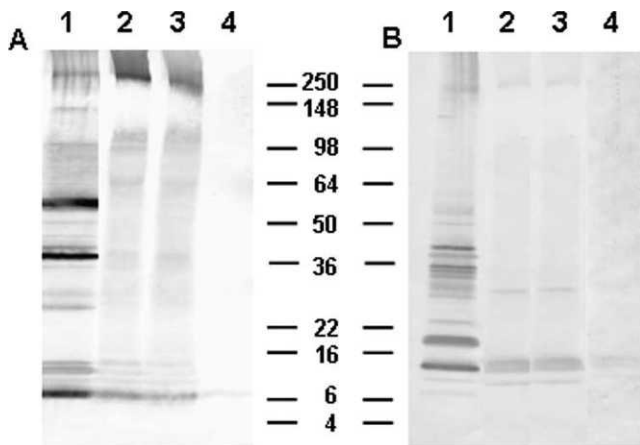


FIGURE 2. Effect of autoclaving on *A. simplex* antigens and allergens. Crude extracts of untreated (lane 1) and treated L3 for 20, 40, and 80 min at 121°C (lanes 2, 3, and 4, respectively) were analyzed by immunoblotting. Antigen stability was analyzed with an antiparasite crude extract antiserum (A). Allergenicity was determined by IgE-immunoblotting with a pool of *A. simplex* allergic patients' sera (B). MW, molecular weight standards.

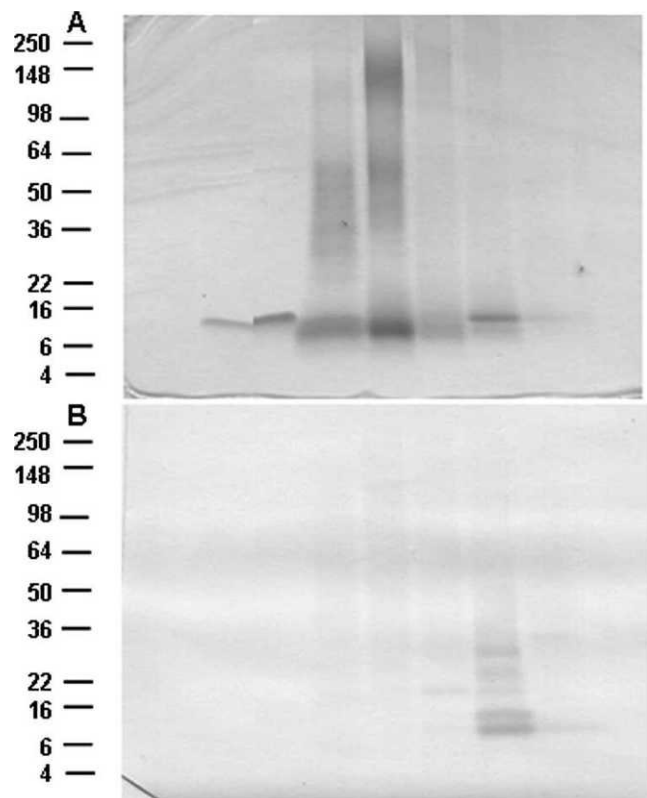


FIGURE 3. RP-HPLC of a 50 to 90% ethanol fraction of the L3 protein extract after 40 min of autoclaving. Consecutive RP-HPLC fractions were resolved by electrophoresis. Eluted proteins (A) and allergens (B) were analyzed by SDS-PAGE and IgE-immunoblotting, respectively. (A) and (B) are aligned with the same RP-HPLC fractions. MW, molecular weight standards.

allergen bands were also identified (Fig. 3B). Among them, only two proteins of 14- and 9-kDa bands were visible in SDS-PAGE and were then identified by mass spectrometry. The 14-kDa protein was identified as Ani s 1, a main *A. simplex* allergen, and the 9-kD protein was Ani s 4, a heat- and pepsin-resistant allergen. Figure 4 shows the peptides identified for Ani s 1 and Ani s 4.

To determine if parasite allergens retained their allergenicity after autoclaving, a basophil activation test was performed with five samples from *A. simplex*-sensitized patients. The median of spontaneous (4%, range 0.6 to 9.4%) and anti-IgE induced CD63 expression (82%, 76 to 98%) in patients ($n = 5$) were similar to those found in healthy controls ($n = 5$), that is, 3%, 1 to 8% and 80%, 79 to 97% for spontaneous and anti-IgE induced CD63 expression, respectively. No basophil activation with extracts from untreated (2%, 1 to 6%) or autoclaved L3 (3%, 2 to 7%) was found in healthy controls. Basophil activation was observed when patient samples were incubated with extracts obtained from L3 subjected to autoclaving for 40 and 80 min (Table 1). The results of basophil activation test were variable because both an autoclaving time-dependent decrease and increase have been found. Apparently there was not any relationship between the patients' anti-*A. simplex* IgE values and the percentage of activated basophils (Table 1).

FIGURE 4. A. *simplex* allergens analyzed by ion trap mass spectrometry. Peptides identified of Ani s 1 (accession no. Q7ZIK3) and Ani s 4 (accession no. Q14QT4) are underlined.

Ani s 1
 MASMQHFSLA ALLLAASICL GDADRTECQL PLDKGTPCTQ EGGVKPSVAW WHDDKSGICL
SFKYTGCGGN ANRFTTIKNC EQHCCKMPDRG ACALGKKPAE DSNGEQLVCA GMREDKCPNG
 YQCKMMAFMG LCCPTKEEEL FAREYEGVCK SGKPVKMDRG SGWMMTILGK SCDDQFCPED
AKCERGLKFA NCCK

Ani s 4
 MQSRIVVAVV VFCCIILMQT EAGMLGGSSD VDVNDPEIKE LAGKSIAKIS AMINDGKPH
LVKVVSARKQ VVAGDKYTL ILVKDGDHOD LCTVTIWOQK WENFEEVKVL KCDHQ

DISCUSSION

Our results showed that the autoclaving process caused profound changes in the SDS-PAGE protein profile and *A. simplex* allergen recognition by specific IgE. However, some allergenicity is preserved because the capacity of binding IgE and activating basophils is retained by the protein extract from larvae after autoclaving even for 80 min. Clinical interest in *A. simplex* allergens' thermostability comes from descriptions of patients reporting allergic symptoms after eating cooked fish (2, 3, 13) or canned fish (1, 3, 13, 14, 23).

Previous reports described the effect of different thermal procedures aimed to kill L3 on the parasite antigens showing that several parasite proteins retained their antigenic characteristics (7, 17, 24, 25). Our immunoblotting analysis allowed identifying low-molecular-weight allergens resistant to temperature higher than those previously reported and similar to canning processes. Ani s 1 was identified as one of the allergens resistant to autoclaving. This protein was the first allergen identified and was characterized as a major allergen recognized by more than 80% of *Anisakis* allergic patients (6, 11, 21). According to our IgE immunoblotting assays, Ani s 1 is detected with a lower molecular weight than expected. We cannot explain the change in its molecular weight, although the action of certain endogenous proteases could not be fully excluded, despite that the autoclaving and protein extraction processes were carried out in the presence of protease inhibitors. Ani s 4, the other identified allergen detected in 27% of allergic patients, was the first nematode protease inhibitor (cystatin) described as an allergen and has been previously shown to be heat stable (boiling for 30 min) and resistant to pepsin digestion (7, 12, 16). Its resistance to autoclaving along with pepsin resistance suggests that Ani s 4 could be clinically relevant in cases in which Ani s 4-sensitized patients are exposed following consumption of processed parasite-contaminated fishery products.

With regard to Ani s 1, pepsin digestion stability has not been analyzed so far. Further studies on pepsin stability would strengthen our results.

Taking into account that IgE binding, as shown by IgE immunoblotting, is not sufficient to predict that an allergen is able to trigger the allergic cascade (19, 22), a basophil activation test with processed L3 extracts was performed. Functional analysis showed that *A. simplex* allergens were able to induce basophil activation after autoclaving. Despite a marked decrease in protein content observed after treatment for 80 min (Fig. 1), the residual parasite allergens can induce CD63 upregulation in the patients tested. The capacity to induce basophil activation seemed to be patient dependent because decreased, increased, or unchanged basophil activation was observed after heat treatment. Similar findings have been reported with blanched or roasted peanuts (19). On the other hand, patients' anti-*A. simplex* IgE levels were not predictable for the magnitude of basophil activation. Although basophil activation tests do not provide information on cellular immune response in the gut, it allows the study of potential allergenicity of *Anisakis* allergens after food processing, because it mimics the in vivo pathway leading to symptoms.

In conclusion, autoclaving is a thermal process that considerably decreases the potential allergenicity of *A. simplex*. However, some relevant allergens retain their capacity to bind IgE and activate basophils after being subjected to this heat treatment, which is equivalent to that used in thermal industrial processes. Our findings are relevant for nonfish allergic subjects who are allergic to *Anisakis* and present symptoms after eating fishery products contaminated with parasite allergens. Although exposure to functionally active allergens after eating parasitized and thermal processed fish can occur, studies on gastroduodenal digestion stability are needed to demonstrate the relevance of allergens that remain allergenic after treatments that simulate a canning process.

TABLE 1. Specific anti-*Anisakis* IgE and percentage of activated basophils with protein extracts of untreated and autoclaved *A. simplex* L3

Patient	Untreated <i>Anisakis</i> L3	Autoclaving, 121°C		Specific IgE (kU _A /liter)
		40 min	80 min	
1	94	93	62	28.8
2	74	30	2	0.60
3	80	67	47	0.71
4	71	78	81	0.74
5	53	73	78	7.33

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Angel Mendizabal (Technical Unit of Mercamadrid) for kindly providing the *Anisakis* larvae. This work was supported by the Spanish grants AGL2005-05699-C02-01/02ALI and AGL2009-12485-C03-01/03.

REFERENCES

- AAITO-IFIACI *Anisakis* Consortium. 2011. *Anisakis* hypersensitivity in Italy: prevalence and clinical features: a multicenter study. *Allergy* 66:1563–1569.
- Audicana, L., M. T. Audicana, L. Fernández de Corres, and M. W. Kennedy. 1997. Cooking and freezing may not protect against

- allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. *Vet. Rec.* 140:235.
3. Audicana, M. T., I. J. Ansotegui, L. F. de Corres, and M. W. Kennedy. 2002. *Anisakis simplex*: dangerous dead and alive? *Trends Parasitol.* 18:20–25.
 4. Audicana, M. T., and M. W. Kennedy. 2008. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:360–379.
 5. Baeza, M. L., A. Rodríguez, V. Matheu, M. Rubio, P. Tornero, M. de Barrio, T. Herrero, M. Santaolalla, and J. M. Zubeldia. 2004. Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. *Clin. Exp. Allergy* 34:296–302.
 6. Caballero, M. L., and I. Moneo. 2002. Specific IgE determination to Anis 1, a major allergen from *Anisakis simplex*, is a useful tool for diagnosis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 89:74–77.
 7. Caballero, M. L., and I. Moneo. 2004. Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitol. Res.* 93:248–251.
 8. Gonzalez-Muñoz, M., A. I. Rodríguez-Mahillo, and I. Moneo. 2010. Different Th1/Th2 responses to *Anisakis simplex* are related to distinct clinical manifestations in sensitized patients. *Parasite Immunol.* 32:67–73.
 9. Kobayashi, Y., S. Ishizaki, K. Shimakura, Y. Nagashima, and K. Shiomi. 2007. Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res.* 100:1233–1241.
 10. Kobayashi, Y., K. Shimakura, S. Ishizaki, Y. Nagashima, and K. Shiomi. 2007. Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 155:138–145.
 11. Moneo, I., M. L. Caballero, F. Gómez, E. Ortega, and M. J. Alonso. 2000. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106:177–182.
 12. Moneo, I., M. L. Caballero, M. González-Muñoz, A. I. Rodríguez-Mahillo, R. Rodríguez-Perez, and A. Silva. 2005. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res.* 96:285–289.
 13. Moneo, I., M. L. Caballero, R. Rodríguez-Perez, A. I. Rodríguez-Mahillo, and M. Gonzalez-Muñoz. 2007. Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Parasitol. Res.* 101:1051–1055.
 14. Montoro, A., M. J. Perteguer, T. Chivato, R. Laguna, and C. Cuéllar. 1997. Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*. *Allergy* 52:985–991.
 15. Rodríguez-Mahillo, A. I., M. González-Muñoz, C. de las Heras, M. Tejada, and I. Moneo. 2010. Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen and cooked fish muscle. *Foodborne Pathog. Dis.* 7:967–973.
 16. Rodríguez-Mahillo, A. I., M. Gonzalez-Muñoz, F. Gomez-Aguado, R. Rodríguez-Perez, M. T. Corcuera, M. L. Caballero, and I. Moneo. 2007. Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Anis 4 as a cysteine-protease inhibitor. *Int. J. Parasitol.* 37:907–917.
 17. Rodríguez-Mahillo, A. I., M. González-Muñoz, I. Moneo, M. T. Solas, A. Mendizábal, C. de las Heras, and M. Tejada. 2008. Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion. *J. Food Prot.* 71:2578–2581.
 18. Rodríguez-Perez, R., I. Moneo, A. Rodríguez-Mahillo, and M. L. Caballero. 2008. Cloning and expression of Anis 9, a new *Anisakis simplex* allergen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 159:92–97.
 19. Sabato, V., A. J. van Hengel, K. J. De Knop, M. M. Verweij, M. M. Hagendorens, C. H. Bridts, L. S. De Clerck, D. Schiavino, W. J. Stevens, and D. G. Ebo. 2011. Basophil activation reveals divergent patient-specific responses to thermally processed peanuts. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 21:527–531.
 20. Sastre, J., M. Lluch-Bernal, S. Quirce, I. Arrieta, C. Lahoz, A. Del Amo, E. Fernández-Caldas, and F. Marañón. 2000. A double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite, *Anisakis simplex*. *Allergy* 55:560–564.
 21. Shimakura, K., H. Miura, K. Ikeda, S. Ishizaki, Y. Nagashima, T. Shirai, S. Kasuya, and K. Shiomi. 2004. Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135:69–75.
 22. van Ree, R., S. Vieths, and L. K. Poulsen. 2006. Allergen-specific IgE testing in the diagnosis of food allergy and the event of a positive match in the bioinformatics search. *Mol. Nutr. Food Res.* 50:645–654.
 23. Ventura, M. T., R. A. Tummolo, E. Di Leo, M. D'Ersasmo, and A. Arseni. 2008. Immediate and cell-mediated reactions in parasitic infections by *Anisakis simplex*. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 18:253–259.
 24. Vidaček, S., C. de las Heras, M. T. Solas, M. L. García, A. Mendizábal, and M. Tejada. 2011. Viability and antigenicity of *Anisakis simplex* after conventional and microwave heating at fixed temperatures. *J. Food Prot.* 74:2119–2126.
 25. Vidaček, S., C. de las Heras, M. T. Solas, A. Mendizábal, A. I. Rodríguez-Mahillo, and M. Tejada. 2010. Antigenicity and viability of *Anisakis* larvae infesting hake heated at different time-temperature conditions. *J. Food Prot.* 73:62–68.
 26. Warne, D. 1988. Manual on fish canning. FAO Fisheries technical paper. Available at: <http://www.fao.org/docrep/003/T0007E/T0007E00.htm#Contents>. Accessed 20 May 2012.

Ani s 11-Like Protein Is a Pepsin- and Heat-Resistant Major Allergen of *Anisakis* spp. and a Valuable Tool for *Anisakis* Allergy Component-Resolved Diagnosis

Noelia Carballeda-Sangiao^a Ana I. Rodríguez-Mahillo^a Mercedes Careche^c
Alfonso Navas^d Teresa Caballero^b Javier Dominguez-Ortega^b
Jesús Jurado-Palomo^e Miguel González-Muñoz^a

^aDepartment of Immunology and ^bAllergy Service, University Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPaz),

^cInstitute of Food Science, Technology and Nutrition, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTAN-CSIC),

and ^dDepartment of Biodiversity and Evolutionary Biology, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid, and

^eAllergy Service, Hospital Nuestra Señora del Prado, Talavera de la Reina, Toledo, Spain

Key Words

Anisakis spp. · Allergy · Ani s 11-like protein · Ani s 11.0201 · Component-resolved diagnosis

Abstract

Background: *Anisakis simplex* is a fish parasite responsible for gastrointestinal and allergic symptoms in humans. The Ani s 11-like protein has been proposed as an *Anisakis* allergen because its primary structure is similar to that of Ani s 11. The aims of this work were to analyse the frequency of detection of the Ani s 11-like protein and assess its diagnostic value. **Methods:** rAni s 11-like protein, rAni s 5 and rAni s 4 were expressed in *Escherichia coli* and rAni s 1 was produced in *Pichia pastoris*. Recombinant allergen detection patterns in 37 *Anisakis*-sensitised patients were determined. The stability to pepsin digestion and heat treatment of rAni s 11-like protein was also analysed by IgE immunoblotting. **Results:** Ani s 11-like protein is a major allergen detected by 78% of *Anisakis*-allergic patients, and 13.5% of patients detect only the rAni s 11-like allergen. This allergen is heat stable because it retains its capability of binding IgE after boiling for 30 min and it is resistant to pepsin digestion for 120 min.

Conclusions: These data indicate that the Ani s 11-like protein is a pepsin- and heat-resistant major allergen (Ani s 11.0201) of *Anisakis* spp. and a valuable tool for *Anisakis* allergy component-resolved diagnosis. © 2016 S. Karger AG, Basel

Introduction

The nematode *Anisakis simplex* is a parasite of marine mammals that can accidentally infect humans who consume raw or undercooked fish containing live *A. simplex* larvae [1]. Ingestion of L3 causes an acute and self-limiting infection that can manifest as abdominal pain, nausea, vomiting or diarrhoea. In some patients an IgE-mediated immune response is triggered, which results in the presentation of allergic symptoms, such as urticaria, angio-oedema or anaphylaxis, when sensitised subjects are re-exposed to the parasite allergens [2–4]. The two most frequently

This work was conducted at the University Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPaz), Madrid, Spain. N.C.-S. and A.I.R.-M. contributed equally to this work.

KARGER

© 2016 S. Karger AG, Basel
1018–2438/16/1692–0108\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/iaa

Correspondence to: Dr. Miguel González-Muñoz
Department of Immunology
University Hospital La Paz Institute for Health Research (IdiPaz)
Paseo de la Castellana 261, ES–28046 Madrid (Spain)
E-Mail miguel.gonzalez.munoz@salud.madrid.org

used methods for *Anisakis* allergy diagnosis are the skin-prick test and the detection of specific IgE using whole antigen from the parasite. Unfortunately, these diagnostic tools detect cross-reactivities to other nematodes and microorganisms [5–7]. A better diagnostic approach involves the use of recombinant allergens with no cross-reactivity with other species. Among the 14 *Anisakis* allergens (Ani s 1 to Ani s 14) described thus far, Ani s 1, Ani s 2, Ani s 7, Ani s 12, Ani s 13 and Ani s 14 are the major allergens (<http://www.allergen.org/>). Ani s 1 is a heat-resistant allergen [8] with a sensitivity of up to 86% [9]. Of the minor allergens, Ani s 4 is a pepsin and heat-resistant allergen, and its clinical relevance has been verified because it is associated with anaphylaxis [10]. Ani s 5 is also a heat-resistant allergen belonging to the SXP/RAL 2 family and is detected by some *Anisakis*-allergic patients who did not recognise Ani s 1 or Ani s 4 [11]. The Ani s 11-like protein has been proposed as an *Anisakis* allergen because its primary structure is similar to that of Ani s 11 [12]. Both proteins share 78% sequence identity, although their chain lengths are remarkably different (307 amino acids for Ani s 11 and 160 amino acids for Ani s 11-like protein). They show short sequences comprising 6–15 amino acid residues which have been classified into six types based on the amino acid sequence similarity [12]. This structural feature is also found in the Ani s 10 allergen, which shows 43% sequence identity with Ani s 11-like protein [12]. These allergens are proteins with unknown function.

To assess the recognition of this protein by *Anisakis*-allergic patients, we produced an rAni s 11-like protein and analysed its frequency of recognition in *Anisakis* allergy as well as its pepsin and heat stability. Furthermore, the usefulness of Ani s 11-like protein for component-resolved diagnostics was assessed in combination with rAni s 1, rAni s 4 and rAni s 5 by IgE immunoblotting.

Materials and Methods

Anisakis spp. Crude Extract

Live *Anisakis* spp. larvae in the third stage of the life cycle (L3) were obtained from parasitised hake (*Merluccius merluccius*) at local markets in Madrid, Spain. L3 were extracted from fish tissue, washed in PBS and immediately frozen at -20°C until use. Then, L3 were ground in a Potter-ELV homogeniser and sonicated at 18 W for 5 s. Protein extracts were obtained after centrifugation at 16,000 g and 4°C for 10 min.

Recombinant Allergens

The rAni s 4 was obtained as previously reported [13]. The primer pairs for Ani s 1, Ani s 5 and Ani s 11-like protein are shown in the online supplementary table S1 (for all online suppl. material, see www.karger.com/doi/10.1159/000444981). PCRs were

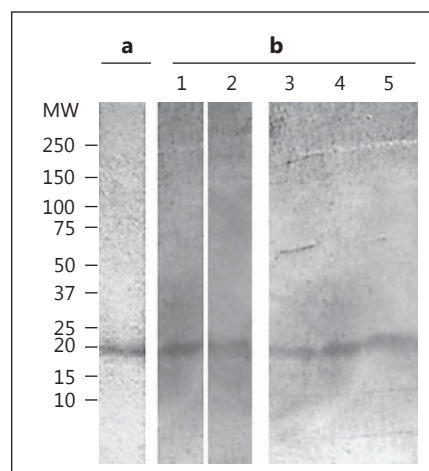


Fig. 1. SDS-PAGE and immunoblot of the rAni s 11-like protein. **a** Coomassie staining of the purified rAni s 11-like protein. **b** IgE immunoblotting with a serum pool from *Anisakis*-allergic patients (1), after boiling for 30 min (2), or pepsin digestion for 30 (3), 60 (4) and 120 min (5). MW = Molecular weight standards.

performed in a Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corp., Foster City, Calif., USA) using KOD DNA Polymerase (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The hotstart touchdown nested PCRs were performed to amplify Ani s 5 and Ani s 11-like protein mRNAs under the following conditions: initial denaturation, 94°C for 5 min; amplification, 94°C for 30 s, 77°C , decreasing 1°C in each cycle until 67°C , for 30 s, 72°C for 30 s, 11 cycles; amplification, 94°C for 30 s, 66°C for 30 s, 72°C for 30 s, 30 cycles; final elongation step, 72°C for 5 min. The PCR products of Ani s 5 and Ani s 11-like protein were cloned into the pET46 EK/LIC vector (Novagen) following the manufacturer's instructions. The recombinant proteins were expressed in the *Escherichia coli* BL21(DE3) strain and purified using HisBind Resin (Novagen) following the manufacturer's instructions. The PCR conditions to amplify Ani s 1 mRNA were: initial denaturation, 94°C for 5 min; amplification, 94°C for 1 min, 72°C , decreasing 1°C in each cycle until 63°C , for 1 min, 72°C for 2 min, 10 cycles; amplification, 94°C for 1 min, 63°C for 1 min, 72°C for 2 min, 40 cycles; final elongation step, 72°C for 5 min. The PCR product for Ani s 1 was cloned into the pPicZaA vector and expressed in the *Pichia pastoris* KH714 strain (Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, Calif., USA), following the manufacturer's instructions. The secreted rAni s 1 was then purified by ethanol precipitation. The rAni s 11-like protein was purified as a single band of approximately 17 kD according to non-reducing SDS-PAGE (fig. 1).

Study Subjects

Thirty-seven *Anisakis*-sensitised patients, 15 patients with a food allergy (fish, n = 5; shrimp, n = 5; fruits, n = 5) and 10 healthy controls were analysed. This study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital La Paz (Madrid, Spain) and the patients gave their informed consent to participate in the study. The *Anisakis*-sensitised patients reported allergic and/or gastrointestinal symptoms after eating raw or undercooked fish or seafood

and had a positive result when they were skin-prick tested with a commercial extract of *A. simplex* (IPI, Alicante, Spain). *Anisakis* sensitisation was confirmed by a positive IgE test and an undetectable IgE test to fish, mites and shrimp. The serum total and specific IgE determinations were performed with a Phadia 250 instrument (ThermoFisher, Phadia, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. The detection range for total IgE was 2–5,000 kU/l, and values >0.7 kU/l were considered positive for IgE to *Anisakis* [7]. The controls did not present symptoms related to the consumption of fish and showed undetectable IgE values to *Anisakis*.

Electrophoresis and IgE Immunoblotting

Electrophoresis and IgE immunoblotting were performed according to previously published methods [13]. Briefly, crude extract (15 µg/lane) and allergens (3 µg/lane) were separated by SDS-PAGE on 4–20% Tris-glycine gel (Novex, Life Technologies, Grand Island, N.Y., USA). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes by applying a constant current of 1.3 A for 7 min in a Trans-Blot Turbo Instrument (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA). Membranes were blocked with PBS, 0.05% Tween 20 and 1% BSA for 1 h at room temperature and then subsequently incubated with the sera of *A. simplex*-allergic patients (1/20), mouse anti-human IgE mAb and alkaline phosphatase-labelled goat anti-mouse IgG [13].

Stability to Heat Treatment and Pepsin Digestion

In order to assess the thermostability of Anisakis 11-like protein, the recombinant was boiled for 30 min and analysed by IgE immunoblotting with a serum pool (n = 5). Resistance to pepsin digestion was determined by incubating the allergen with simulated gastric fluid (30 mM NaCl, 60 mM HCl, pH 1.5) and pepsin (activity 1,015 U/mg; Sigma-Aldrich) at an enzyme/substrate ratio of 260 U pepsin/mg Anisakis 11-like protein. The digestion was performed at 37°C, and aliquots were collected at different time points up to 120 min and analysed by IgE immunoblotting.

Results

A total of 37.8% of the patients sensitised to *Anisakis* showed allergic symptoms, including urticaria, angio-oedema and/or anaphylaxis, 18.9% reported gastrointestinal symptoms, such as diarrhoea, vomiting and abdominal pain, and 43.2% presented allergic and gastrointestinal symptoms. Raw anchovies in vinegar sauce were the most frequently consumed fish related to the onset of symptoms. The medians and interquartile ranges (IQR) for age, total IgE and *Anisakis*-specific IgE were 58 years (IQR 45–64), 251 kU/l (IQR 117–1,000) and 47 kU/l (IQR 13–68), respectively. The demographic details and clinical data on the patients are shown in table 1.

According to the IgE immunoblotting results, the frequency of IgE-positive reactions to rAnisakis 1 was 84%, whereas a frequency of 35% was found for rAnisakis 4 and rAnisakis 5, and a frequency of 78% was obtained for rAnisakis

Table 1. Demographic and clinical data of the patients included in the study

Pa-tient	Sex	Age, years	Symptoms	Host	Total IgE, kU/l	<i>Anisakis</i> IgE, kU/l
1	Male	65	U, AG	Squid	2,394	384
2	Male	33	U	Anchovy	228	24
3	Male	56	GI	Anchovy	1,893	525
4	Female	67	U	Anchovy	2,410	66
5	Male	46	GI	Anchovy	275	14
6	Male	73	U	Anchovy	1,004	81
7	Female	58	U, GI, AN	Cod	369	58
8	Female	61	U	Anchovy	483	47
9	Female	61	U	Anchovy	2,624	405
10	Male	61	U	Hake	330	44
11	Female	62	U, GI	Sole	28	8
12	Female	70	U	Hake	1,084	52
13	Male	64	AN	Hake	354	37
14	Male	41	U, AG, GI	Anchovy	463	70
15	Female	38	GI, AN	Anchovy	146	35
16	Female	64	U, GI	Anchovy	81	3
17	Male	57	U	Anchovy	88	10
18	Female	63	U, GI	Red mullet	996	48
19	Female	43	AN, GI	Hake	3,255	88
20	Male	57	U, AG, GI	Anchovy	1,834	83
21	Female	36	GI	Anchovy	235	67
22	Male	70	U	Anchovy	1,657	262
23	Male	58	U, GI	Anchovy	251	54
24	Male	42	GI	Anchovy	59	8
25	Male	51	U, AG, GI, AN	Anchovy	48	12
26	Male	62	U	Anchovy	224	41
27	Female	45	U, GI, AN	Anchovy	296	69
28	Female	66	U, GI	Anchovy	82	14
29	Female	44	U, AG, GI, AN	Anchovy	153	28
30	Female	46	GI	Anchovy	59	7
31	Male	52	U, AG, GI	Anchovy	157	5
32	Female	68	GI	Anchovy	236	51
33	Female	53	GI	Hake	55	8
34	Female	47	U, AG, GI	Hake	59	8
35	Female	64	U, AG, GI	Anchovy	156	57
36	Male	65	U, AG	Hake	492	58
37	Male	42	U	Anchovy	160	31

U = Urticaria; AG = angio-oedema; GI = gastrointestinal; AN = anaphylaxis.

11-like protein. Only 1 patient (patient 30) did not detect any of the four recombinants (table 2). We assessed the existence of an association between the recognition of any of the four recombinants and the type of symptoms (allergic or gastrointestinal, or allergic plus gastrointestinal symptoms) and found no relationship. In contrast, our data indicate that 13.5% of the patients detected only rAnisakis 11-like protein and that it is a major allergen because it

Table 2. Detection of the recombinant Ani s 1, Ani s 4, Ani s 5 and Ani s 11-like protein by IgE immunoblotting

Patient	rAni s 1	rAni s 4	rAni s 5	rAni s 11-like protein
1	+	+	-	+
2	+	+	+	-
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	-	-	-	+
6	+	-	-	+
7	+	-	-	+
8	+	-	+	+
9	+	+	+	+
10	+	-	-	-
11	+	+	+	-
12	+	-	-	+
13	+	-	-	-
14	+	+	+	-
15	-	-	-	+
16	+	-	-	+
17	+	-	-	+
18	+	+	-	+
19	+	+	+	+
20	+	-	-	+
21	-	-	-	+
22	+	+	-	-
23	+	+	+	+
24	+	-	-	+
25	+	-	-	+
26	-	-	-	+
27	+	-	-	+
28	+	-	+	-
29	+	-	+	+
30	-	-	-	-
31	+	-	-	+
32	+	-	-	+
33	+	-	+	+
34	+	+	-	+
35	+	-	-	+
36	-	-	-	+
37	+	+	+	+

was detected by >50% of the *Anisakis*-sensitized patients (table 2; online suppl. fig. S1). According to the rules of the International Union of Immunological Societies (IUIS) allergen nomenclature, it is named Ani s 11.0201 (<http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=706>).

We assessed the thermostability of Ani s 11-like protein (Ani s 11.0201) because it is a characteristic of clinical interest when exposure to heat-stable allergens is suspected to be involved in allergic symptoms. This allergen is heat stable because it retained its capability of binding IgE after boiling for 30 min (fig. 1). Another characteristic of

interest is its stability to pepsin digestion. We observed that epitopes of the Ani s 11-like protein (Ani s 11.0201) maintain their capacity to bind IgE after pepsin digestion for 2 h (fig. 1).

Discussion

Ani s 11-like protein (Ani s 11.0201) was detected in a higher frequency of allergic patients in this study than the structurally similar allergens Ani s 11 and Ani s 10 were detected in a previous study [12]. These differences could be due to distinct characteristics of the patient groups analysed in each study and/or to different methods used for specific IgE detection. The percentages of detection of the other recombinant allergens used in this study are similar to those obtained in previous studies. rAni s 1 is consistently detected in >80% of *Anisakis*-allergic patients [9]. This frequency increased to 100% [14] when the patients were selected with specific anti-*Anisakis* IgE values ≥ 20 kU/l. The recombinant Ani s 4 protein is detected with a higher frequency of recognition (35–40%) [13] than the native allergen (27%) [10]. Our patients detect the rAni s 5 with a higher frequency than previously reported (25%) [15]. A sensitivity of 93% has been reported for a recombinant internal polypeptide of Ani s 7 in a study with patient sera that were considered to be true positive according to the values obtained through Ani s 1 and/or Ani s 7 ELISAs [16]. The results obtained with individual recombinant allergens demonstrate that they are useful for diagnosis with high specificity but underline the necessity of using a combination of selected allergenic components to increase the sensitivity for an accurate diagnosis of *Anisakis* allergy. In our study, 5 patients (13.5%) presented only rAni s 11-like protein, indicating that this allergen may aid the component-resolved diagnosis of *Anisakis* allergy. Differences in IgE reactivity in sera from patients showing a convincing clinical history of allergy to *Anisakis* suggest inter-individual variations in immunological responses to this parasite, qualitative or quantitative variations of allergen content in different *Anisakis* species [17] or different routes of exposure to allergens [1].

Many *Anisakis*-allergic patients tolerate a diet of frozen or well-cooked fish, but some patients report symptoms after eating cooked or processed fish [18–20]. The resistance of Ani s 11.0201 to digestion and heat treatment suggests that this protein may be involved in the appearance of symptoms after the consumption of contaminated fishery products.

In conclusion, our results show that Ani s 11.0201 is a pepsin- and heat-resistant major allergen of *Anisakis* spp. that can increase the sensitivity of the component-resolved diagnosis of *Anisakis*-sensitised patients. Therefore, the use of the Ani s 11-like protein (Ani s 11.0201) along with the heat-resistant Ani s 1, Ani s 4 and Ani s 5 allergens can be a valuable option for *Anisakis* allergy diagnosis.

Acknowledgements

The research leading to these results received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration under grant agreement No. 312068.

References

- 1 Nieuwenhuizen NE, Lopata AL: Allergic reactions to *Anisakis* found in fish. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014;14:455.
- 2 Kasuya S, Hamano H, Izumi S: Gastric anisakiasis with anaphylactic reaction. *ACI News* 1989;1:13–14.
- 3 Kasuya S, Hamano H, Izumi S: Mackerel-induced urticaria and Anisakis. *Lancet* 1990;335:665.
- 4 Audicana M, Fernández de Corres L, Muñoz D, Fernández E, Navarro JA, del Pozo MD: Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*-parasitizing fish. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:558–560.
- 5 Armentia A, Lombardero M, Martinez C, Barber D, Vega JM, Callejo A: Occupational asthma due to grain pests *Eurygaster* and *Ephestia*. *J Asthma* 2004;41:99–107.
- 6 Lozano MJ, Martin HL, Diaz SV, Manas AI, Valero LA, Campos BM: Cross-reactivity between antigens of *Anisakis simplex* s.l. and other ascarid nematodes. *Parasite* 2004;11:219–223.
- 7 Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Puente S, Gutiérrez MT, Moneo I, González-Muñoz M: *Anisakis/Ascaris* IgE ratio improves specificity for the diagnosis of *Anisakis simplex* sensitization in travellers and immigrants. *Acta Trop* 2014;138:1–4.
- 8 Carballeda-Sangiao N, Olivares F, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Tejada M, Moneo I, González-Muñoz M: Identification of auto-clave-resistant *Anisakis simplex* allergens. *J Food Prot* 2014;77:605–609.
- 9 Ibarrola I, Arilla MC, Herrero MD, Esteban MI, Martínez A, Asturias JA: Expression of a recombinant protein immunochemically equivalent to the major *Anisakis simplex* allergen Ani s 1. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2008;18:78–83.
- 10 Moneo I, Caballero ML, González-Muñoz M, Rodríguez-Mahillo AI, Rodríguez-Perez R, Silva A: Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol Res* 2005;96:285–289.
- 11 Caballero ML, Moneo I, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, Casado I, Rodríguez-Pérez R: Isolation of Ani s 5, an excretory-secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis* larvae sensitization. *Parasitol Res* 2008;103:1231–1233.
- 12 Kobayashi Y, Ohsaki K, Ikeda K, Kakemoto S, Ishizaki S, Shimakura K, Nagashima Y, Shioimi K: Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitol Int* 2011;60:144–150.
- 13 Rodríguez-Mahillo AI, Gonzalez-Muñoz M, Gomez-Aguado F, Rodriguez-Perez R, Corcuera MT, Caballero ML, Moneo I: Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *Int J Parasitol* 2007;37:907–917.
- 14 Gamboa PM, Asturias J, Martínez R, Antépara I, Jáuregui I, Urrutia I, Fernández J, Sanz ML: Diagnostic utility of components in allergy to *Anisakis simplex*. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2012;22:13–19.
- 15 Kobayashi Y, Ishizaki S, Shimakura K, Nagashima Y, Shioimi K: Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. *Parasitol Res* 2007;100:1233–1241.
- 16 Anadón AM, Rodríguez E, Gárate MT, Cuéllar C, Romarís F, Chivato T, Rodero M, González-Díaz H, Ubeira FM: Diagnosing human anisakiasis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:496–502.
- 17 Arcos SC, Ciordia S, Roberston L, Zapico I, Jiménez-Ruiz Y, Gonzalez-Muñoz M, Moneo I, Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo A, Albar JP, Navas A: Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex* sensu stricto and *A. pegreffii*. *Proteomics* 2014;14:1547–1568.
- 18 Audicana MT, Ansotegui IJ, de Corres LF, Kennedy MW: *Anisakis simplex*: dangerous – dead and alive? *Trends Parasitol* 2002;18:20–25.
- 19 Moneo I, Caballero ML, Rodriguez-Perez R, Rodriguez-Mahillo AI, Gonzalez-Muñoz M: Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Parasitol Res* 2007;101:1051–1055.
- 20 AAITO-IFIACI Anisakis Consortium: *Anisakis* hypersensitivity in Italy: prevalence and clinical features: a multicenter study. *Allergy* 2011;66:1563–1569.

RESEARCH ARTICLE

Changes over Time in IgE Sensitization to Allergens of the Fish Parasite *Anisakis* spp.

Noelia Carballeda-Sangiao¹, Ana I. Rodríguez-Mahillo¹, Mercedes Careche², Alfonso Navas³, Ignacio Moneo¹, Miguel González-Muñoz^{1*}

1 Department of Immunology, University Hospital La Paz Institute for Health Research, (IdiPaz), Madrid, Spain, **2** Department of Products, Institute of Food Science, Technology and Nutrition, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, **3** Department of Biodiversity and Evolutionary Biology, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

* miguel.gonzalez.munoz@salud.madrid.org



 OPEN ACCESS

Citation: Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Careche M, Navas A, Moneo I, González-Muñoz M (2016) Changes over Time in IgE Sensitization to Allergens of the Fish Parasite *Anisakis* spp. PLoS Negl Trop Dis 10(7): e0004864. doi:10.1371/journal.pntd.0004864

Editor: Herbert B. Tanowitz, Albert Einstein College of Medicine, UNITED STATES

Received: April 22, 2016

Accepted: June 29, 2016

Published: July 22, 2016

Copyright: © 2016 Carballeda-Sangiao et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The research leading to these results received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration under grant agreement n° 312068. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Sensitization to *Anisakis* spp. can produce allergic reactions after eating raw or undercooked parasitized fish. Specific IgE is detected long after the onset of symptoms, but the changes in specific IgE levels over a long follow-up period are unknown; furthermore, the influence of *Anisakis* spp. allergen exposure through consumption of fishery products is also unknown.

Objective

To analyse the changes in IgE sensitization to *Anisakis* spp. allergens over several years of follow-up and the influence of the consumption of fishery products in IgE sensitization.

Methods

Total IgE, *Anisakis* spp.-specific IgE, anti-Ani s 1 and anti-Ani s 4 IgE were repeatedly measured over a median follow-up duration of 49 months in 17 sensitized patients.

Results

Anisakis spp.-specific IgE was detected in 16/17 patients throughout the follow-up period. The comparison between baseline and last visit measurements showed significant decreases in both total IgE and specific IgE. The specific IgE values had an exponential or polynomial decay trend in 13/17 patients. In 4/17 patients, an increase in specific IgE level with the introduction of fish to the diet was observed. Three patients reported symptoms after eating aquaculture or previously frozen fish, and in two of those patients, symptom presentation was coincident with an increase in specific IgE level.

Conclusions

IgE sensitization to *Anisakis* spp. allergens lasts for many years since specific IgE was detectable in some patients after more than 8 years from the allergic episode. Specific IgE

monitoring showed that specific IgE titres increase in some allergic patients and that allergen contamination of fishery products can account for the observed increase in *Anisakis* spp.-specific IgE level.

Clinical Relevance

Following sensitization to *Anisakis* spp. allergens, the absence of additional exposure to those allergens does not result in the loss of IgE sensitization. Exposure to *Anisakis* spp. allergens in fishery products can increase the specific IgE level in some sensitized patients.

Author Summary

The nematode *Anisakis* spp. is a parasite of marine mammals that can parasitize humans when a raw or undercooked fish containing live *Anisakis* spp. larvae is consumed. As a result, gastrointestinal and/or allergic symptoms are reported. The allergic reaction can be diagnosed by quantifying the serum specific IgE against some parasite allergens. To avoid the appearance of symptoms, sensitized patients are advised to consume frozen or heat-treated fishery products because these treatments kill larvae to prevent new parasitism and allergic reactions. We have analysed the changes in *Anisakis* spp.-specific IgE levels through repeated measures during a long follow-up period of sensitized individuals whose diets did not include fishery products and subjects who regularly consumed fishery products. We have found that IgE sensitization to *Anisakis* spp. allergens persists over several years (more than 8 years in some cases) even in subjects who did not include fishery products into their diets. On the other hand, specific IgE titres increase in some allergic patients during the follow-up period and this increase was coincident with the introduction of previously frozen fish into their diet. These findings indicate that *Anisakis* spp. allergens induce long-lived IgE responses.

Introduction

The nematode *Anisakis* spp. is a parasite of marine mammals that can parasitize humans when a raw or undercooked fish containing live *Anisakis* spp. L3 is consumed. Ingestion of L3 causes an acute and self-limiting infection that can manifest with abdominal pain, nausea, vomiting or diarrhoea. Infection causes a strong polyclonal humoral immune response, and IgM, IgA, and IgG antibodies are detected after one month of infection [1]. In some patients, an IgE-mediated immune response is also triggered, and in those patients, allergic symptoms, such as urticaria, angioedema and anaphylaxis can develop after sensitization and re-exposure to the allergens of this parasite. The rise in specific IgE is usually accompanied with an increase in total IgE in the first month after the presentation of allergic symptoms, and serial serological analysis of both specific and total IgE values have been proven useful in the diagnosis of gastro-allergic anisakiasis [2]. To avoid the appearance of symptoms, sensitized patients are advised to consume frozen or heat-treated fishery products because these treatments kill larvae to prevent new parasitism [3–5].

Several groups have investigated the kinetics of specific antibody production in experimental animal models [review in 6], but the results of those studies may not be applicable to the human immune responses to this parasite. Studies of the changes over time of the level of specific IgE to *Anisakis* spp. in sensitized patients have shown the persistence of IgE sensitization

up to 38 months after the onset of symptoms [1, 2, 4, 7]. However, those studies did not report variations in the specific IgE levels at different follow-up time points.

The aim of this study was to analyse the changes in *Anisakis* spp.-specific IgE levels through repeated measures during a longer follow-up period than previously reported and to compare IgE sensitization between patients whose diets did not include fishery products and subjects who regularly consumed fishery products.

Methods

Patients

To analyse the kinetics of the IgE response, *Anisakis* spp.-allergic patients with at least 30 months of follow-up after symptom presentation were selected for this study. A total of 17 patients (six males) with a median age of 53 years (IQR = 45–57 years) were diagnosed as being allergic to *Anisakis* spp. because they reported allergic (urticaria, angioedema or anaphylaxis) and/or gastrointestinal (vomiting, diarrhoea, or abdominal pain) symptoms within 24 h after eating raw or undercooked fish or seafood. One patient reported symptoms after eating cooked fish (scorpion fish cake). Five patients had grass pollen allergy and one of them had dog dander allergy. The data collected at the first visit are shown in Table 1. Allergy was confirmed by a positive prick test and/or detection of specific IgE to *Anisakis* spp. and undetectable levels of IgE to shrimp, *Ascaris lumbricoides*, fish and mites. To assess new sensitization to these allergens, specific IgE levels were quantified at the last visit, and they remained undetectable in all patients. Measurements of the levels of total and specific IgE to *Anisakis* spp. and clinical evaluations were performed during successive visits. All patients were advised at the first visit to

Table 1. Patients' data at first visit and total and specific IgE values at first and last visits of follow-up.

Patient	Sex	Age	Symptoms	Te (months)	Previous allergic episodes	Fish	Detection of rAni s 1/rAni s 4	Follow-up (months)	First/last total IgE (kU/L)	First/last specific IgE (kU/L)
1	M	55	U, GI	0.6	n	anchovy	+/+	96	658/605	>100/23.7
2*	M	48	AN, GI	12	n	anchovy, anglerfish	+/-	71	28/20	5/2.1
3	M	63	AG, U, GI	0.6	n	anchovy	+/-	118	1740/437	32.4/21.7
4*	F	30	U, GI	4	n	anchovy	+/-	43	341/41	43.9/3.18
5	M	62	GI	0.7	y	anchovy	+/-	49	541/70	>100/15.7
6	F	60	GI	1	n	hake	+/-	95	1196/384	>100/52.5
7*	F	50	U, GI	1	y	anchovy	+/+	50	1750/71	>100/8.95
8	F	54	U	1	n	anchovy	+/-	61	786/338	>100/37.8
9	F	64	AG, U, GI	5	y	anchovy	+/+	38	213/70	72.6/13.3
10	F	53	AN, U	1	n	anchovy	+/-	44	2958/258	>100/12.1
11*	F	50	U	12	n	anchovy	+/+	38	57/45	4.3/1.1
12	M	27	U	1	n	anchovy	+/+	37	1557/440	82.8/20.1
13	F	54	U, GI	4	y	anchovy	+/-	58	327/103	>100/17.4
14	F	43	U	12	n	scorpion fish cake	+/+	112	557/347	16.1/0.6
15	F	32	U	0.6	n	anchovy	+/-	31	271/478	9.5/6.1
16*	F	53	U, GI	3	n	anchovy	+/-	45	91/11	24.9/2.9
17	M	51	GI	9	n	anchovy	+/-	35	2423/184	79.2/20.6

U: urticaria; GI: gastrointestinal; AN: anaphylaxis; AG: angioedema; Te: Time elapsed from the allergic episode to the first visit; M: male; F: female; n: no; y: yes. Asterisks indicate patients who did not include fish or seafood in their diet during the follow-up period

doi:10.1371/journal.pntd.0004864.t001

avoid consumption of raw and undercooked fish and to eat farmed fish and deep-frozen fishery products; however, patients with levels of specific IgE to *Anisakis* spp. higher than 100 kU/L were initially instructed to consume a fish-free diet for six months.

This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Carlos III (Madrid, Spain), and all included subjects were asked to sign an informed consent form.

Total and specific IgE

The serum total and specific IgE measurements were performed with a Phadia 250 instrument (Thermo Fischer Scientific, Phadia, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions. The detection range for total IgE was 2–5000 kU/L. Regarding positivity for specific IgE antibodies, values >0.7 kU/L [8] were considered positive for IgE to *Anisakis* spp., and values >0.35 kU/L were considered positive for IgE to the other allergens.

Anisakis spp. antigens

Live *Anisakis* spp. larvae in the third stage of the life cycle (L3) were obtained from parasitized hake (*Merluccius merluccius*) at local markets in Madrid, Spain. L3 were extracted from fish tissue, washed in PBS and immediately frozen at -20°C until use. Then, L3 were ground in a Potter-ELV homogenizer and sonicated at 18 w for 5 s. Protein extracts were obtained after centrifugation at 16,000 g and 4°C for 10 min.

Recombinant (r)Ani s 4 and rAni s 1 were obtained as previously reported [9, 10].

IgE immunoblotting

In addition to the total and specific IgE measurements, IgE immunoblotting was performed with the parasite crude extract, recombinant (r) Ani s 1 and rAni s 4.

Proteins extracted from L3 (15 μg), rAni s 1 (3 μg) and rAni s 4 (3 μg) were subjected to electrophoresis at 120 V on a 4%-20% Tris-glycine gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Thereafter, proteins were transferred to nitrocellulose membranes by applying a constant current of 1.3 A for 7 min in a Trans-Blot Turbo Instrument (Bio-Rad). Membranes were blocked with PBS, 0.05% Tween 20 and 1% BSA for 1 h at room temperature and then incubated with 10 mL of the sera of *Anisakis* spp. -allergic patients (1/20) overnight. After washing with PBS, the membranes were incubated for 2 h with 10 mL of a 1:1000 dilution of a monoclonal anti-IgE antiserum (1 mg/mL; Ingenasa, Madrid, Spain). After additional washes, the membranes were incubated with 10 mL of a 1:20,000 dilution of an alkaline phosphatase-labelled goat anti-mouse antiserum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finally, the membranes were washed and incubated with the BCIP-NBT (Sigma-Aldrich) substrate for 30 min.

Statistics

Statistical analyses were performed using SPSS 20.0 software (IBM Corporation, NY, USA). Quantitative variables are described as medians and interquartile ranges (IQR). The Mann-Whitney U test was used to compare the values of total IgE and specific IgE quantified at the first and last visits. A paired-samples comparison between the baseline and last visit values was performed using the Wilcoxon signed-rank test. Regression was used to analyse the trends in the changes in specific IgE values. Changes in specific IgE values over time were estimated with linear and non-linear regression models, and the best fit was selected. A p-value of <0.05 was considered statistically significant. For the statistical analysis, all values of *Anisakis* spp.-specific IgE >100 kU/L were assigned a value of 101 kU/L [11].

Results

At first visit, three patients reported gastrointestinal, allergic ($n = 6$) or allergic and gastrointestinal symptoms ($n = 8$) after eating raw or undercooked fish, except P14 who reported urticaria after eating cooked fish (scorpion fish cake). Raw anchovies in vinegar sauce were the most frequently consumed fish related to the onset of symptoms (Table 1). The median time elapsed from the allergic episode to the first visit was one month (IQR = 0.85–7 months). The median follow-up duration was 49 months (IQR = 38–83 months). P5, P7, P9 and P13 reported previous allergic episodes associated with raw fish consumption. At the first visit, using IgE immunoblotting, in addition to *Anisakis* spp.-specific IgE, specific IgE to rAni s 1 was detected in all patients, and specific IgE to rAni s 4 was detected in six patients (Table 1). Although patients were advised to eat aquaculture and previously frozen fish, five patients did not include fish or seafood in their diet during the follow-up period (P2, P4, P7, P11 and P16), and they were considered to have not been re-exposed to *Anisakis* spp. antigens or allergens.

Positive specific IgE to *Anisakis* spp. values (>0.7 kU/L) were detected in all patients throughout the follow-up period, except for P14, who had a specific IgE to *Anisakis* spp. value of 0.6 kU/L at the end of a 112-month follow-up period (Table 1). Baseline total IgE (557 kU/L, IQR = 242–1648 kU/L) and *Anisakis* spp.-specific IgE values (79 kU/L, IQR = 20–101 kU/L) were significantly higher than the final total IgE value (184 kU/L, IQR = 57–410 kU/L; $p < 0.01$) and the *Anisakis* spp.-specific IgE titre (13 kU/L, IQR = 3–21 kU/L, $p < 0.01$) (Table 1). The median value of the specific IgE decrease was 76% over the follow-up period (IQR = 60%–88%). The paired-samples comparison between the measurements at baseline and the last visit showed significant decreases in both total IgE ($p < 0.01$) and *Anisakis* spp.-specific IgE titres ($p < 0.01$). No significant differences were found between the patients who were and were not re-exposed to *Anisakis* spp. in the decrease in the *Anisakis* spp.-specific IgE level over the follow-up period (76%, IQR = 51%–84% and 88%, IQR = 66%–92%, respectively; $p = 0.28$) or in the follow-up duration (53 months, IQR = 37–96 and 45 months, IQR = 40–60, respectively; $p = 0.72$).

Regression was used to analyse the trend in the changes in *Anisakis* spp.-specific IgE values. The *Anisakis* spp.-specific IgE values underwent an exponential or polynomial decay trend in 13/17 patients, including the patients who had not included fish in their diet during the follow-up period (Fig 1 and S1 Fig). However, the changes in the *Anisakis* spp.-specific IgE levels from baseline to last visit in four patients (P1, P3, P6 and P15) did not fit a regression model (Fig 2). The *Anisakis* spp.-specific IgE level in P1 decreased to 1 kU/L at 10 months, and then increased and remained at > 12 kU/L throughout the remainder of the follow-up period. The *Anisakis* spp.-specific IgE level in P3 initially showed a 70% decrease (from 50 kU/L to 14 kU/L) and, then, increased up to 37 kU/L at one year later. The changes in the *Anisakis* spp.-specific IgE level in P6 were similar to those in P1, with a decrease of specific IgE titre until reaching 3 kU/L at 12 months and an obvious increase at the next visit (50 kU/L). P15 showed a moderate level of *Anisakis* spp.-specific IgE (10 kU/L) at the first visit; it decreased at one month (6 kU/L) and increased at the following visit. The *Anisakis* spp.-specific IgE increases in these four patients were coincident with the introduction of aquaculture and frozen fish into their diet (Fig 2). The paired samples comparisons in these patients revealed no significant differences between baseline total IgE (927 kU/L, IQR = 367–1604 kU/L) and last visit total IgE (457 kU/L, IQR = 397–573 kU/L; $p = 0.27$) or between baseline *Anisakis* spp.-specific IgE (66 kU/L, IQR = 15– >100 kU/L) and last visit *Anisakis* spp.-specific IgE (23 kU/L, IQR = 10–45 kU/L; $p = 0.07$). When the total and specific IgE titres and the duration of follow-up for the patients whose data fit a regression model were compared to those of these four patients, only total IgE

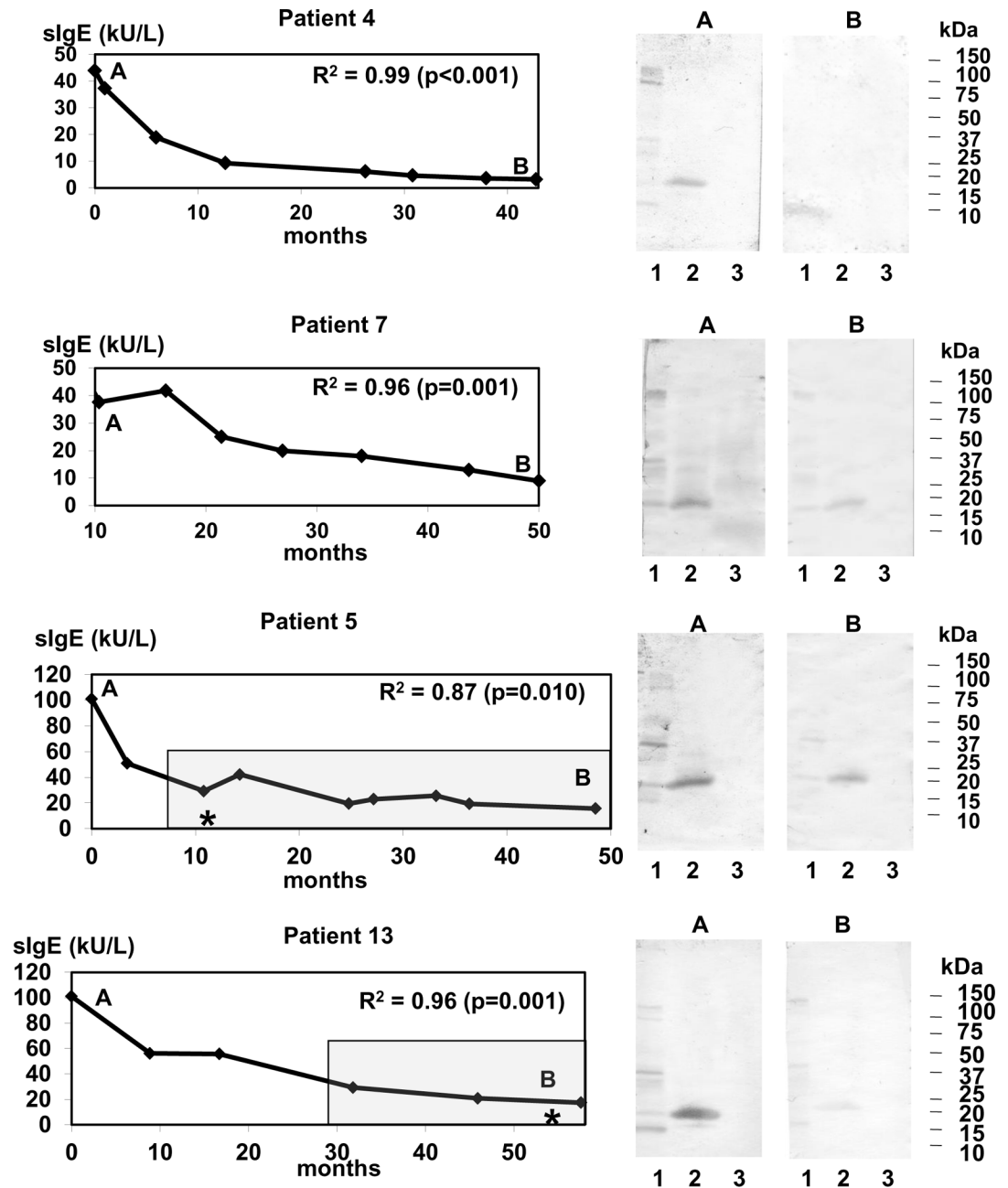


Fig 1. Changes during follow-up in the *Anisakis* spp.-specific IgE level fit a non-linear regression. Persistence of *Anisakis* spp.-specific IgE (sIgE) in patients who were not re-exposed (P4 and P7) and those who were re-exposed (P5 and P13) to *Anisakis* spp. allergens are depicted. The adjusted coefficient of determination (R^2) and the p values are shown. Letters indicate the time points during follow-up when IgE immunoblotting was performed. Lane 1: *Anisakis* spp. crude extract; lane 2: rAni s 1; lane 3: rAni s 4. The shadow box indicates the follow-up period during which the patients were consuming fish. Asterisks mark the time points at which symptoms associated with the intake of fish were reported. sIgE: specific IgE to *Anisakis* spp.

doi:10.1371/journal.pntd.0004864.g001

at last visit was found to be higher in the latter group (184 kU/L, IQR = 57–410 kU/L vs. 457 kU/L, IQR = 397–573 kU/L, $p < 0.01$).

Three patients reported symptoms during the follow-up period. P3 experienced localized acute urticaria in the hands after eating cod that had been frozen for 72 h at home (Fig 2). P5

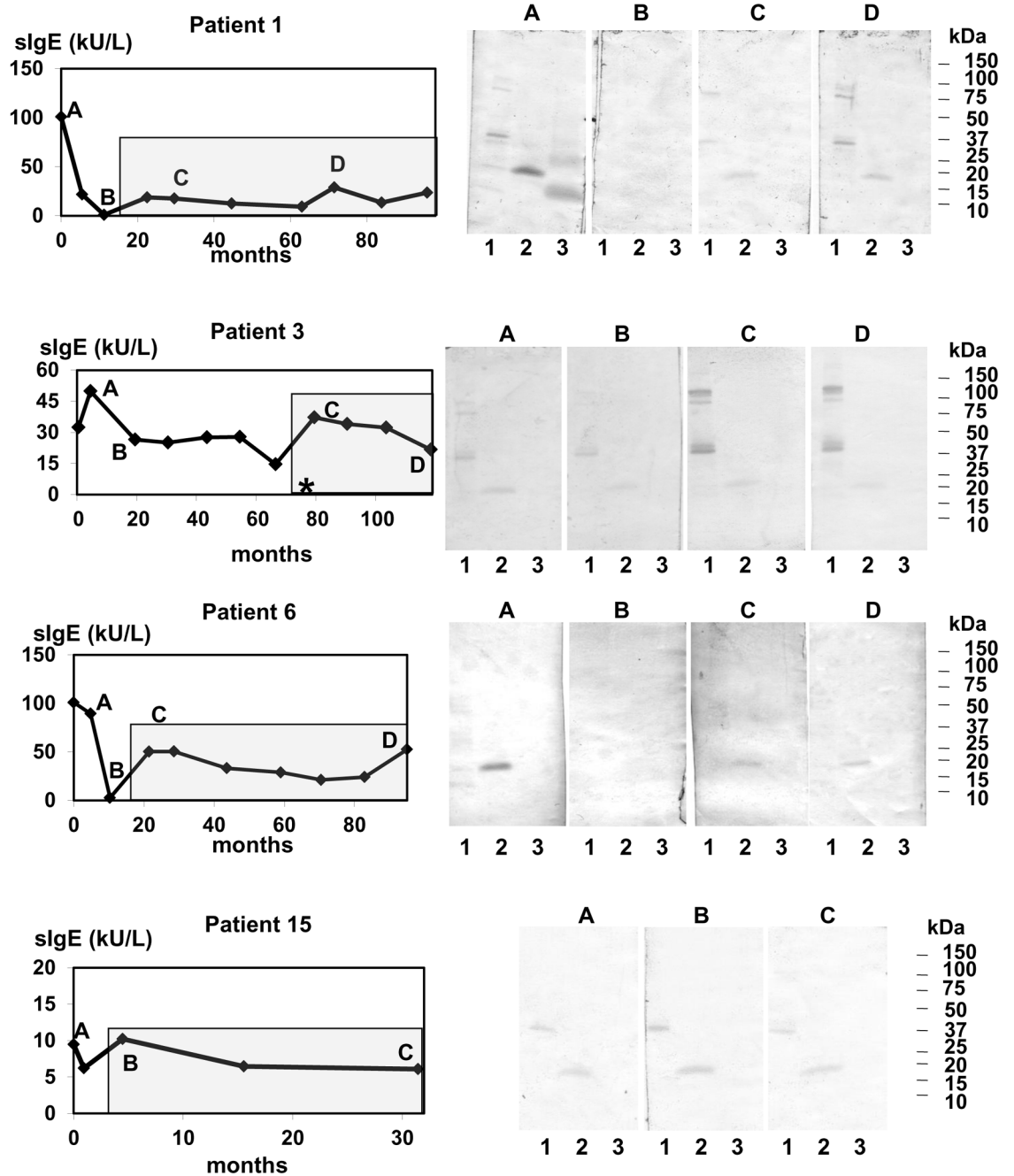


Fig 2. Changes in IgE sensitization in the patients who experienced increases in *Anisakis* spp.-specific IgE level during follow-up. Letters indicate the time points of follow-up when IgE immunoblotting was performed. Lane 1: *Anisakis* spp. crude extract; lane 2: rAni s 1; lane 3: rAni s 4. The shadow box indicates the follow-up period during which the patients were consuming fish. The asterisk marks the time point during which symptoms associated with the intake of fish was reported. sIgE: specific IgE to *Anisakis* spp.

doi:10.1371/journal.pntd.0004864.g002

reported diarrhoea after eating aquaculture sea bass (Fig 1). In these two patients, the appearance of symptoms was coincident with an increase in *Anisakis* spp.-specific IgE level. P3 and P5 did not report new episodes in the subsequent visits. P13 showed generalized acute urticaria after eating commercial frozen hake (Fig 1). Unfortunately, this episode occurred at the end of

the follow-up period, and we could not assess if the level of IgE against *Anisakis* spp. had varied. Other common causes of acute urticaria were discarded.

To determine if the changes in specific IgE over time are related to changes in the recognition pattern of allergens, IgE immunoblotting was performed at different time points. As expected, baseline IgE immunoblotting showed different patterns for the parasite crude extracts [12]. rAni s 1 was detected by all patients, and rAni s 4 was detected by six patients (Figs 1 and 2 and S1 Fig). The intensities of the bands corresponding to rAni s 1 paralleled the *Anisakis* spp.-specific IgE levels. During the follow-up period, the rAni s 4 bands disappeared prior to the rAni s 1 bands, suggesting that Ani s 4 is an early marker of *Anisakis* spp. infection. On the other hand, the increase in *Anisakis* spp.-specific IgE over time observed in some patients was associated with an increase in the intensity of some proteins in the parasite crude extract and rAni s 1 (Fig 2).

Discussion

Our study analysed the changes in the values of total IgE and specific IgE to *Anisakis* spp. over time using a longer follow-up period (31–118 months) than previous studies (6–38 months) [1, 2, 4, 7]. Repeated measures were performed throughout the study period and included detection of Ani s 1 and Ani s 4. Ani s 1 is a major and heat stable allergen [12] and Ani s 4 is a pepsin and heat-resistant allergen, and its clinical relevance has been verified because it is associated with anaphylaxis [9]. Exposure to the live fish-borne parasite *Anisakis* spp. L3 can produce an acute and self-limiting infection in humans with allergic and gastrointestinal symptoms. To avoid the appearance of symptoms, patients are advised to consume frozen or heat-treated fishery products because these treatments kill larvae and thus prevent new parasitism [3–5]. An alternative is to consume aquaculture fish because the risk of exposure to *Anisakis* spp. larvae in farmed fish has been shown to be minimal, because no *Anisakis* spp. larvae have been found in their viscera or flesh [5, 13]. Twelve patients regularly consumed aquaculture and frozen fish during the study period, and five patients decided to stop consuming fish throughout the follow-up period. The decrease in the *Anisakis* spp.-specific IgE levels in these patients, who were considered to have not been re-exposed to parasite material, was higher than those found previously in patients on a fish-free diet (57%) with a follow-up period of 13 months, and this discrepancy was probably due to our longer follow-up period [4]. On the other hand, we did not observe significant differences in the total or *Anisakis* spp.-specific IgE values between the patients who did and did not consume fish during the follow-up period [4]; thus, the rate of *Anisakis* spp.-specific IgE decay does not seem to be influenced by the consumption of previously frozen fish.

Our results show that IgE sensitization to *Anisakis* spp. allergens persists over several years since specific IgE was detectable in some patients after more than 8 years from the allergic episode. Similar results were observed in a nine-year follow-up study of adult subjects sensitized to food allergens [14]. In our study, specific IgE to Ani s 1 was detectable up to 118 months from the onset of symptoms, and this result agrees with that obtained in a study with 6–38 months of follow-up [7] and suggests that Ani s 1 can be detected in both recent and old *Anisakis* spp. infection cases. Therefore, the persistent IgE sensitization observed in *Anisakis* spp. allergic patients who were not exposed to parasite allergens for several years indicates that *Anisakis* spp. allergens induce long-lived IgE responses.

The analysis of the changes over time in specific IgE level in the patients that were not re-exposed to *Anisakis* spp. allergens and in some patients who regularly consume aquaculture and frozen fish shows that the decrease in specific IgE titres fit a non-linear regression model. However, we observed that the *Anisakis* spp.-specific IgE level in four patients (P1, P3, P6 and

P15) increased at some time points during follow-up. This increase in *Anisakis* spp.-specific IgE could be due to sensitization to other allergen sources that have been reported to cross-react with *Anisakis* spp. allergens, i.e., other parasite nematodes, mites and crustaceans [15–17]. However, according to the available patient data, this explanation does not seem to be valid because our patients were not sensitized to allergens that cross-react with *Anisakis* spp. allergens at baseline, and no new onset hypersensitivity to those allergens was found during the follow-up period. In addition, the increase in *Anisakis* spp.-specific IgE was parallel to the increase in Ani s 1 detected by immunoblotting, which supports the hypothesis that the observed changes in *Anisakis* spp.-specific IgE were actually due to exposure to *Anisakis* spp. allergens. Another explanation for this observation is re-infection with live L3. However, we do not believe this is the case because the patients reported symptoms after eating frozen or aquaculture fish, and it is unlikely that an acute parasitism episode went unnoticed by these patients, as they had experienced one previously. On the other hand, previously unrecognized allergens have been detected in the course of gastro-allergic anisakiasis [1], which was not observed in our patients according to the results of IgE immunoblotting. Accordingly, it has been shown that adult patients allergic to aeroallergens did not acquire sensitization to new allergens, but they exhibited a pre-established profile of allergens after antigen exposure. The levels of allergen-specific IgE in previously sensitized allergic patients decreased in the absence of allergen exposure and increased upon allergen exposure [18]. Because the raise in specific IgE levels is coincident with the introduction of fishery products to the diet, a more plausible explanation for the changes in IgE sensitisation is that exposure to allergens present in those fishery products is involved in the increase in the *Anisakis* spp.-specific IgE level. Some *Anisakis* spp. antigens have been shown to be stable and to maintain their capacity to bind IgE after different freezing and heat treatments [19, 20]. Furthermore, *Anisakis* spp. antigens have been detected in farmed salmon and processed fish products [21], which could contribute to the variations in the trends of IgE sensitization observed in this study.

The clinical significance of these results is difficult to determine because very few patients (n = 3) reported symptoms after the initial acute parasitism episode in our study. It has been proposed that the high rate of *Anisakis* spp. parasitism of fish in our region would result in frequent contact with parasite material, which would cause symptoms in sensitized subjects exposed to it when previously frozen or heat-treated fish is included in their diet [22]. However, our results suggest that the exposure to *Anisakis* spp. antigens present in fishery products may contribute to the persistence and even to the increase in *Anisakis* spp.-specific IgE level. The increase in the *Anisakis* spp.-specific IgE level associated with the appearance of symptoms indicates that exposure to *Anisakis* spp. material could be involved in the onset of symptoms in some *Anisakis* spp. allergic patients [12]. However, more studies are required to evaluate the clinical relevance of the re-exposure to *Anisakis* spp. in sensitized patients.

In conclusion, we have shown that IgE sensitization to *Anisakis* spp. allergens can last more than 8 years. Specific IgE monitoring showed that specific IgE titres increase in some allergic patients and that allergen contamination of fishery products can account for the observed increase in *Anisakis* spp.-specific IgE level.

Supporting Information

S1 Checklist. STROBE checklist.
(DOCX)

S1 Fig. Changes in IgE sensitization to *Anisakis* spp. allergens during follow-up. Letters indicate the time points during follow-up when IgE immunoblotting was performed. Lane 1: *Anisakis* spp. crude extract; lane 2: rAni s 1; lane 3: rAni s 4. The shadow box indicates the

follow-up period during which the patients were consuming fish. sIgE: specific IgE to *Anisakis* spp.
(PDF)

S1 Text. Accession numbers.
(DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MC AN IM MGM. Performed the experiments: NCS AIRM. Analyzed the data: NCS AIRM MC AN IM MGM. Contributed reagents/materials/analysis tools: NCS AIRM MC AN. Wrote the paper: IM MGM.

References

1. Daschner A, Cuéllar C, Sánchez-Pastor S, Pascual CY, Martín-Esteban M. Gastro-allergic anisakiasis as a consequence of simultaneous primary and secondary immune response. *Parasite Immunol.* 2002; 24: 243–251. PMID: [12060318](#)
2. Daschner A, Alonso-Gómez A, Caballero T, Suarez-De-Parga JM, López-Serrano MC. Usefulness of early serial measurement of specific and total immunoglobulin E in the diagnosis of gastro-allergic anisakiasis. *Clin Exp Allergy.* 1999; 29: 1260–1264. PMID: [10469036](#)
3. Alonso A, Moreno-Ancillo A, Daschner A, López-Serrano MC. Dietary assessment in five cases of allergic reactions due to gastroallergic anisakiasis. *Allergy.* 1999; 54: 517–520. PMID: [10380786](#)
4. Trujillo MJ, Rodríguez A, Gracia Bara MT, Matheu V, Herrero T, Rubio M, et al. Dietary recommendations for patients allergic to *Anisakis simplex*. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2002; 30: 311–314.
5. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal.* 2010; 8: 1543. [91 pp.].
6. Cho SW, Lee HN. Immune reactions and allergy in experimental anisakiasis. *Korean J Parasitol.* 2006; 44: 271–283. PMID: [17170569](#)
7. Anadón AM, Rodríguez E, Gárate MT, Cuéllar C, Romarís F, Chivato T, et al. Diagnosing human anisakiasis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol.* 2010; 17: 496–502. doi: [10.1128/CVI.00443-09](#) PMID: [20107002](#)
8. Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo AI, Puente S, Gutiérrez MT, Moneo I, González-Muñoz M. *Anisakis/Ascaris* IgE ratio improves specificity for the diagnosis of *Anisakis simplex* sensitization in travellers and immigrants. *Acta Trop.* 2014; 138: 1–4. doi: [10.1016/j.actatropica.2014.05.020](#) PMID: [24911935](#)
9. Rodríguez-Mahillo AI, Gonzalez-Muñoz M, Gomez-Aguado F, Rodriguez-Perez R, Corcuera MT, Caballero ML, et al. Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *Int J Parasitol.* 2007; 37: 907–917. PMID: [17324433](#)
10. Carballeda-Sangiao N, Rodríguez-Mahillo A.I., Careche M, Navas A, Caballero T, Dominguez-Ortega J, et al. Ani s 11-like protein is a pepsin and heat-resistant major allergen of *Anisakis* spp. and a valuable tool for *Anisakis* allergy component-resolved diagnosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016; 169:108–112 doi: [10.1159/000444981](#) PMID: [27049862](#)
11. Amin MR, Khoury JC, Assa'ad AH. Food-specific serum immunoglobulin E measurements in children presenting with food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2014; 112: 121–125. doi: [10.1016/j.ana.2013.09.027](#) PMID: [24468251](#)
12. Moneo I, Caballero ML, Rodriguez-Perez R, Rodríguez-Mahillo AI, Gonzalez-Muñoz M. Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Parasitol Res.* 2007; 101: 1051–1055. PMID: [17574476](#)
13. Peñalver J, Dolores EM, Muñoz P. Absence of anisakid larvae in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in Southeast Spain. *J Food Prot.* 2010; 73: 1332–1334. PMID: [20615348](#)
14. Patelis A, Gunnbjörnsdóttir M, Borres MP, Burney P, Gislason T, Torén K, et al. Natural history of perceived food hypersensitivity and IgE sensitisation to food allergens in a cohort of adults. *PLoS One.* 2014; 9: e85333. doi: [10.1371/journal.pone.0085333](#) PMID: [24427301](#)
15. Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM, Santamarina MT, Navarrete I, Sanmartin ML. Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol Res.* 1996; 82: 378–381. PMID: [8740558](#)

16. Johansson E, Aponno M, Lundberg M, van Hage-Hamsten M. Allergenic cross-reactivity between the nematode *Anisakis simplex* and the dust mites *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Allergy*. 2001; 56: 660–666. PMID: [11421925](#)
17. Lozano MJ, Martin HL, Diaz SV, Manas AI, Valero LA, Campos BM. Cross-reactivity between antigens of *Anisakis simplex* s.l. and other ascarid nematodes. *Parasite*. 2004; 11: 219–223. PMID: [15224584](#)
18. Niederberger V, Ring J, Rakoski J, Jager S, Spitzauer S, Valent P, et al. Antigens drive memory IgE responses in human allergy via the nasal mucosa. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007; 142: 133–144. PMID: [17057411](#)
19. Rodríguez-Mahillo AI, González-Muñoz M, de las Heras C, Tejada M, Moneo I. Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen and cooked fish muscle. *Foodborne Pathog Dis*. 2010; 7: 967–973. doi: [10.1089/fpd.2009.0517](#) PMID: [20500085](#)
20. Tejada M, Olivares F, de las Heras C, Careche M, Solas MT, García ML, et al. Antigenicity of *Anisakis simplex* s.s. L3 in parasitized fish after heating conditions used in the canning processing. *J Sci Food Agric*. 2015; 95: 922–927. doi: [10.1002/jsfa.6763](#) PMID: [24888867](#)
21. Kruse Fæste C, Plassen C, Løvberg KE, Moen A, Egaas E. Detection of Proteins from the Fish Parasite *Anisakis simplex* in Norwegian Farmed Salmon and Processed Fish Products. *Food Anal. Methods*. 2015; 8: 1390–1402.
22. Daschner A, Pascual CY. *Anisakis simplex*: sensitization and clinical allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005; 5: 281–285. PMID: [15864089](#)