

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Reconocimiento de los antígenos excretorios/secretorios de *Anisakis* tipo I y evolución de la IgE en ratas infectadas experimentalmente



Magdalena Gómez-Mateos^a, Adela Valero-López^{a,*}, Teresa de la Rubia-Nieto^b,
María del Carmen Romero-López^a y Victoriano Díaz-Sáez^a

^a Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España

^b Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 23 de abril de 2013

Aceptado el 2 de septiembre de 2013

On-line el 7 de noviembre de 2013

Palabras clave:

Anisakiosis
Inmunotransferencia
Anisakis simplex spp.

Keywords:

Anisakiasis
Immunoblotting
Anisakis simplex spp.

R E S U M E N

Introducción: *Anisakis* spp., durante la parasitación, libera antígenos de excreción secreción (ES) que, al ponerse en contacto con el sistema inmunológico del hombre, pueden desencadenar una respuesta de hipersensibilidad mediada por la IgE, provocando diversos síntomas alérgicos.

Objetivos: Evaluar la respuesta de la IgE en ratas Wistar tras la infección con larvas L3 del parásito.

Métodos: Se ha procedido a la obtención de antígenos ES del parásito y suero anti-*Anisakis*. Se investigan también en este trabajo ciertos factores que intervienen en la técnica de inmunotransferencia, como la concentración de poliácridamida empleada en la preparación de los geles, la concentración antigénica utilizada y la temperatura requerida para la desnaturalización de las proteínas.

Resultados: Las reacciones inmunológicas (Ag-Ac) observadas mediante esta técnica muestran mayor intensidad con los sueros obtenidos después de la reinfección, los cuales han reconocido proteínas que podrían corresponder al antígeno principal Ani s 1 y a otros polipéptidos de interés en el diagnóstico de la anisakiosis humana.

Conclusión: En este trabajo, se pone de manifiesto que inmunotransferencia es una técnica útil para detectar anticuerpos de tipo IgE frente a proteínas de *Anisakis*.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Recognition of excretory/secretory antigens of *Anisakis* type I and evolution of IgE in experimentally infected rats

A B S T R A C T

Introduction: *Anisakis* spp., during parasitism, release excretory-secretory antigens that, in contact with the human immune system, can trigger a hypersensitivity response mediated by IgE, causing various allergic symptoms.

Objectives: To evaluate the IgE response in Wistar rats after infection with L3 larvae of the parasite *Anisakis* spp.

Methods: Some determining factors involved in the technique have been improved in this work, such as: the concentration of polyacrylamide used in the preparation of the gels, the antigen concentration used, and the temperature required for denaturation of proteins.

Results: Immune responses (Ag-Ab) observed by the immunoblotting technique showed a greater intensity with serum obtained after reinfection, which have recognized proteins that may correspond to the major antigen Ani s 1 and other polypeptides of interest in the diagnosis of human anisakiasis.

Conclusion: This paper concludes that immunoblotting is a useful technique to detect IgE antibodies against *Anisakis* proteins.

© 2013 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

Anisakis spp. son nematodos de organismos marinos que completa su ciclo biológico en varios hospedadores. Así, en los

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: avalero@ugr.es (A. Valero-López).

mamíferos marinos, los parásitos adultos se fijan a la mucosa del estómago; la hembra deposita huevos que se liberan al mar, continuando su desarrollo hasta larva L3. Esta larva sale del huevo envuelta por la cutícula de la larva L2 y nada hasta que la ingiere un crustáceo. En el hemocele de estos hospedadores pierde la cutícula de la L2 y alcanza una longitud de 4–6 mm. Peces, principalmente teleosteos, y cefalópodos se infectan al ingerir crustáceos; también pueden hacerlo por depredación de otros peces o cefalópodos que albergan el tercer estado larvario. Los nematodos en los peces se localizan en la cavidad corporal, moviéndose libremente o bien, enrollados en espiral y envueltos en tejido conectivo de las vísceras; también las larvas pueden migrar a la musculatura. En los calamares, en cambio, los parásitos se alojan principalmente en la pared externa del estómago. La presencia de *Anisakis* en los peces y calamares está ampliamente distribuida por todo el mundo, aumentando la carga parasitaria con la edad¹.

El hombre puede convertirse en un hospedador accidental de la larva (L3) cuando ingiere pescado crudo, ahumado, adobado, conservado en vinagre o poco cocinado, según otras especialidades gastronómicas. La infección humana transcurre con lesiones en el tracto digestivo y a veces puede afectar a otros órganos, causando erosión y/o lesión hemorrágica, ascitis, perforación y granuloma; también puede cursar con reacciones alérgicas que van desde leves hasta choque anafiláctico. Cuando ambas situaciones coinciden en el tiempo, hablamos de anisakiosis gastroalérgica. En estos procesos patológicos, participan enzimas proteolíticas que, además de otras funciones, se encuentran entre los principales alérgenos. Desde el punto de vista inmunológico, los antígenos liberados por la larva desencadenan eosinofilia local, mastocitosis, activación de basófilos, producción de IgE específica y otros isotipos frente a *Anisakis*. Los anticuerpos IgE se producen en respuesta del organismo a la penetración de la larva en los tejidos y puede mantenerse elevada durante más de 5 años. La detección de estos anticuerpos IgE específicos es de utilidad para el diagnóstico de la anisakiosis gastroalérgica e intestinal, y se suele llevar a cabo mediante la técnica fluoro-enzimo-inmunoanálisis (FEIA) (CAP-System, Phadia, Uppsala, Suecia). Entre otras técnicas usadas en investigación, también se cita inmunotransferenciala inmunotransferencia^{2,3}.

Como alérgenos de *Anisakis simplex* s.l. se han identificado hasta la fecha 12 proteínas diferentes, aunque se cree que deben existir otros alérgenos desconocidos⁴.

El 95% de los casos de esta enfermedad se registra en Japón. Por lo que respecta a España, desde que se detectó en 1991 en el hombre, se han sucedido otros muchos casos, tanto de infecciones como de reacciones alérgicas. La ingestión de boquerones en vinagre constituye la causa principal de infección⁵, si bien el consumo de merluza ha originado una mayor proporción de casos de alergia en el norte de España⁶; en general, este pescado se consume tras un tratamiento térmico, por ello, diversos autores indican que podría atribuirse a la termoestabilidad de algunos alérgenos del parásito⁷. En este sentido, Vidacek et al.⁸ encuentran en el músculo del pescado el alérgeno Ani s 4, después de un tratamiento con calor y sugieren que dicho alérgeno es liberado por la larva en el tejido circundante, conservando su alergenicidad. Asimismo, la congelación del pescado en condiciones comerciales y periodos superiores a un año no afecta al alérgeno Ani s 4⁹. Estos hechos son de gran importancia para el consumidor, ya que las medidas profilácticas recomendadas por la Unión Europea, tales como la congelación y la cocción adecuadas del pescado para inactivar la larva, y por tanto evitar la infección, serían insuficientes para protegerse de las posibles respuestas de hipersensibilidad mediada por la IgE.

En las últimas décadas, la anisakiosis humana ha aumentado en muchos países, posiblemente debido a la mejora en las técnicas de diagnóstico y el mayor conocimiento de la enfermedad.

Teniendo en cuenta que la anisakiosis es una enfermedad presente en nuestro entorno y que muchos aspectos del ciclo biológico del parásito y de la enfermedad siguen sin dilucidarse, las investigaciones llevadas a cabo en este campo son de gran interés. Por todo ello, en este trabajo se ha estudiado la evolución de la respuesta de IgE tras la infección de ratas con larvas L3 de *Anisakis* tipo 1 mediante inmunotransferencia y la influencia de determinados factores sobre dicha técnica.

Metodología

Material biológico

Las larvas L3 de *Anisakis* tipo 1 se han aislado de la cavidad corporal y vísceras de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*), procedentes del Océano Atlántico. La identificación de los parásitos se ha realizado bajo el microscopio según los criterios de Berland¹⁰.

Obtención de antígenos excretorios-secretorios de *Anisakis*

Entre 250–350 larvas de *Anisakis* se lavaron en solución de ClNa al 0,9% y se sometieron a solución antibiótica durante 30 min, en cámara de flujo laminar. Posteriormente, se depositaron en un tubo con 1–1,5 ml con una solución de ClNa al 0,9% estéril y se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂ durante un tiempo de 3, 6 y 9 días. Tras estos periodos, y retiradas las larvas, las soluciones antigénicas se centrifugaron a 4.000 rpm, 4 °C, 30 min. Para comprobar la esterilidad de los extractos, se realizaron siembras en medio infusión de cerebro corazón (BHI), solidificado con 1,5% de agar; los cultivos se llevaron a cabo tanto en aerobiosis como en atmósfera rica en CO₂ a 37 °C, durante 48 h.

La solución antigénica se dividió en 2 alícuotas: una se mantuvo en estufa a 37 °C durante 2 días con el fin de evaporar el agua contenida en los extractos y aumentar la concentración antigénica, y la otra no se sometió a este proceso. La concentración de proteínas se midió mediante el método de Bradford¹¹.

Obtención de sueros positivos frente a los antígenos excretorios-secretorios de la L3 de *Anisakis*

Se emplearon 5 ratas machos Wistar infectadas con 8 larvas de *Anisakis*, mediante sonda gástrica, y se re infectaron a los 14 y 28 días. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena coccígea. Un total 6 extracciones se llevaron a cabo en un periodo de 2 meses; durante el primer mes, se obtuvo la sangre cada 2 semanas y durante el segundo mes, cada semana. Los sueros controles procedían de 2 ratas machos sanos en los que se siguió la misma pauta.

Electroforesis en gel de poli acrilamida

Se utilizó un sistema de geles discontinuos¹². Las concentraciones ensayadas del gel separador fueron: 10% y 12%, y en gradientes de 5–20%, 7–15%, 10–15% y 10–13%; en todos los casos, se utilizó una solución o bien 2, en el caso de gradientes, de bisacrilamida al 30% en buffer tris-ClH a pH 8,8.

Previamente a su análisis, las proteínas de antígenos excretorios-secretorios (ES) se mezclaron con tampón de muestra (1:1) y se desnaturalizaron en un baño de agua hirviendo durante 4 min, dejando enfriar a temperatura ambiente hasta su uso; también se ensayó la muestra sin tratamiento térmico y sin tampón de muestra. Para estas experiencias, se depositaron en cada pocillo entre 30–60 µl de extracto antigénico, excepto en el primero, en el que se utilizaron 5 µl de una solución estándar de proteínas de peso molecular (PM) comprendido entre 250–2 kDa. Las condiciones de la electroforesis fueron: temperatura ambiente, 200 V y aproximadamente 45 min, usando como indicador el azul de bromofenol.

La determinación de los PM de las proteínas objeto de estudio se hizo por comparación de sus movilidades relativas con las de las proteínas de PM conocidos. Para ello, se midió la distancia de migración de cada proteína (estándar y problemas) y se dividió por la distancia recorrida por el colorante (movilidad electroforética de la proteína o Rf). Posteriormente, se construyó una curva semilogarítmica con los logaritmos de los PM de las proteínas controles en función de sus valores de Rf. Así, conociendo la Rf de una proteína puede calcularse su PM mediante interpolación en la curva.

Inmunotransferencia

Tras la electroforesis, se equilibró el gel separador sumergiéndolo en tampón de transferencia (Tris base 3 g/l, glicina 14,5 g/l y 20% v/v de metanol) durante 20 min y, posteriormente, se realizó la transferencia en una cámara Mini-Trans Blot cell (Bio-Rad), siguiendo la técnica descrita por Towbin et al.¹³. El bloqueo de los grupos reactivos libres de la nitrocelulosa se llevó a cabo con el kit AttoGlow Western Blot Enhancing Kit-with Millenium Enhancer (Biochain), durante 30 min, a temperatura ambiente y con agitación. Para las incubaciones, se usó un aparato Mini-Protean II Multiscreen (Bio-Rad), manteniéndolas durante una hora a temperatura ambiente y con agitación. Como anticuerpo primario, se utilizaron los sueros obtenidos de ratas Wistar infectadas con *Anisakis* a la dilución 1/7 y 1/100 para aquellos usados como control. Para la incubación con el anticuerpo secundario (anti IgE de rata), se procedió del mismo modo que para el anticuerpo primario, pero a la dilución 1/5.000, tanto para los sueros positivos como para los sueros controles. La membrana de nitrocelulosa se reveló con tetrametilbencidina 0,1 ml/cm².

Resultados

Concentración de las soluciones antigénicas

La concentración de antígenos ES más alta conseguida (sin aplicar evaporación) ha sido de 1,8 µg/µl, con 370 L3, mientras que con evaporación fue de 4,00 µg/µl (tabla 1).

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE): influencia de determinados factores

De todas las concentraciones de los geles de poliácridamida ensayadas, con la que se obtuvo mejores resultados fue en gradiente 10-13%. En este gel, las proteínas ES del parásito presentaron un perfil electroforético nítido, incluso a concentración tan bajas como de 0,66 µg/µl, originando bandas entre 235 y 3 kDa (fig. 1A).

Se realizaron ensayos en los que se separaron las proteínas metabólicas del parásito con una concentración de 4,0 µg/µl (obtenidas mediante evaporación) y de 0,8 µg/µl. En el primer caso, a pesar de

la mayor concentración lograda, la falta de definición de las bandas detectadas hizo que descartásemos este proceso (fig. 1B).

Por otro lado, se compararon los patrones moleculares de los productos ES (PES) de las larvas a distinta concentración tras 9 días de mantenimiento. Dichos productos mostraron un perfil de bandas casi idéntico a concentraciones entre 1,8 y 0,66 µg/µl de antígeno; no obstante, se detectaron un desdoblamiento y una intensidad más notable en las bandas de 75 y 35 kDa: así mismo, también presentaron mayor coloración las de 107 y 30 kDa en los extractos de 1,8 y 1,5 µg/µl (fig. 1C).

En los ensayos realizados se empleó el extracto antigénico desnaturalizado con tampón de muestra (1:1), hervido durante 4 min y sin hervir. Las bandas obtenidas en el primer caso han aparecido mejor delimitadas (fig. 1D).

Inmunotransferencia

La respuesta inmunológica en 2 de los animales tuvo lugar a los 15 días de la infección primaria, mientras que el resto fueron positivas a los 15 días de la primera reinfección.

El patrón de bandas originado en los distintos blots osciló entre 213-11 kDa, observándose PM altos, medios y bajos con el suero de todos los animales. Fue común la aparición de bandas más intensas a partir de la segunda semana después de la infección con las larvas y también la estabilización de una respuesta inmunológica mayor tras las sucesivas reinfecciones. No obstante, se detectaron diferencias dignas de mención:

- Rata 1: los PM de las bandas visibles fueron de 145 hasta 13 kDa. El número de bandas aumentó a partir de la cuarta toma de sangre y las bandas de 49,5 y 19 kDa se hicieron más intensas (fig. 2A).
- Rata 2: los PM de las bandas detectadas oscilaron entre 178 y 17 kDa, aumentando también desde el cuarto suero obtenido. Destacó la mayor coloración de las bandas de 42 y 24 kDa (fig. 2B).
- Rata 3: las bandas presentes en la nitrocelulosa tuvieron PM entre 213 y 11 kDa. Se incrementó el número de bandas a partir del tercer suero, apareciendo más intensas aquellas con PM próximos a 45 y 19 kDa (fig. 2C).
- Rata 4: se observaron bandas con PM desde 135 a 13 kDa. A partir del tercer suero, el patrón molecular de las bandas fue homogéneo. Dos bandas, una de 52 y otra de 21 kDa, mostraron una reacción más coloreada a partir del cuarto suero (fig. 2D).
- Rata 5: se originó un menor número de bandas que en el resto de los animales infectados (entre 55 y 17 kDa). La banda de 54 kDa se mostró más intensa a partir del cuarto suero y apareció una banda de 19 kDa (fig. 2E).

Discusión

Los antígenos ES de la larva L3 de *Anisakis* son los principales responsables de la alergenicidad provocada en los humanos¹⁴. Estas proteínas se liberan al medio en la primera fase de la parasitación, desempeñando un papel fundamental en la digestión de los tejidos del hospedador y, por tanto, en la invasión tisular y en la respuesta humoral y celular¹⁵⁻¹⁷. Por ello, en este trabajo, se han usado dichas proteínas de la L3 del parásito porque incrementan la sensibilidad y especificidad de la técnica de inmunotransferencia.

Obtención de soluciones antigénicas

Son muchos los factores implicados en los fenómenos metabólicos de excreción y secreción de las larvas de *Anisakis*, como el tamaño de las mismas, el posible remanente de antibiótico en el cultivo, etc., y, según lo observado, es complicado establecer una pauta general con el fin de obtener la concentración de PES deseada. En

Tabla 1

Relación del número de larvas L3, modo de preparación, tiempo de mantenimiento y concentración de proteínas ES

Número de larvas L3	Evaporación	Tiempo (días)	Concentración (µg/µl)
300, 280, 250, 240, 230, 220, 160, 155, 100, 73, 60	Sí	9	4,00
370	No	9	1,80
350	No	9	1,54
270	No	9	1,03
250	No	9	0,72
240	No	9	0,66
100	No	9	0,57
	No	6	0,48
	No	3	0,42

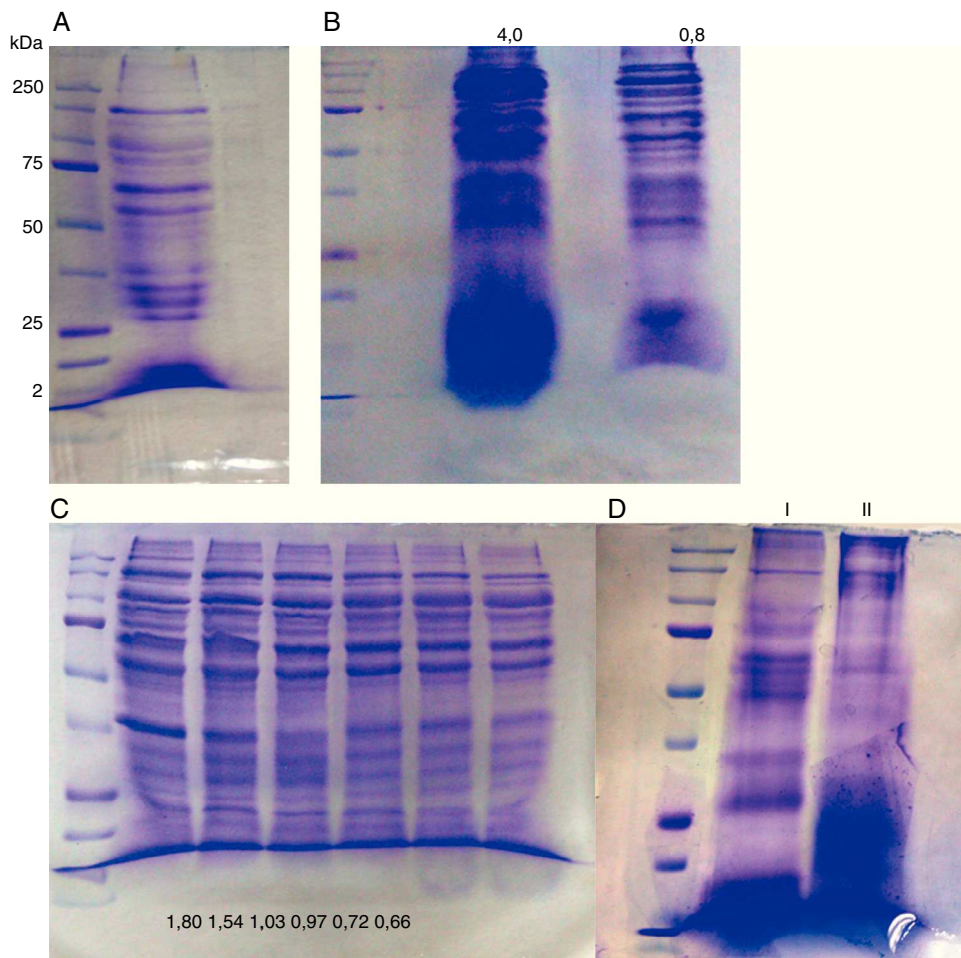


Figura 1. . Proteínas ES de *Anisakis* en un gel de poliacrilamida en gradiente 10-13% (A). Extractos antigénicos de *Anisakis*, uno concentrado mediante calor ($4,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) y otro no ($0,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (B). Productos ES de *Anisakis* con distinta concentración antigénica en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (C). Mezcla de extracto antigénico ES de *Anisakis* con tampón de muestra hervida (I) y sin hervir (II) (D).

este trabajo, en ninguno de los ensayos se superó $1,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, valor alejado de $4,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ recomendado por Laemmli¹²; sin embargo, la concentración obtenida fue suficiente para obtener resultados aceptables.

Por lo que respecta al tiempo de mantenimiento de las larvas, conviene indicar que las soluciones antigénicas obtenidas pasados 9 días han originado valores de concentración proteica más altos que tras 3 y 6 días; tales datos concuerdan con Valero et al.¹⁸. Moneo y Caballero¹⁹ comprobaron que, incubando las larvas durante 2 h en ácido HCl diluido a 37°C , aumenta la liberación de alérgenos; este método no se ha contemplado en el presente trabajo, ya

que en experiencias anteriormente realizadas por este grupo de investigación los resultados obtenidos en inmunotransferenciala inmunotransferencia no fueron muy alentadores.

Por otro lado, teniendo en cuenta la demostrada termoestabilidad de algunos alérgenos de *A. simplex*^{8,20} y las concentraciones recomendadas por Laemmli¹² para el análisis de la IgE por inmunotransferencia ($4,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), se consideró, en un principio, la evaporación del agua contenida en la solución antigénica como método adecuado. Sin embargo, los extractos antigénicos logrados por este método ($4,0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) han originado bandas poco definidas en la electroforesis, compartiendo la idea de que los diferentes deter-

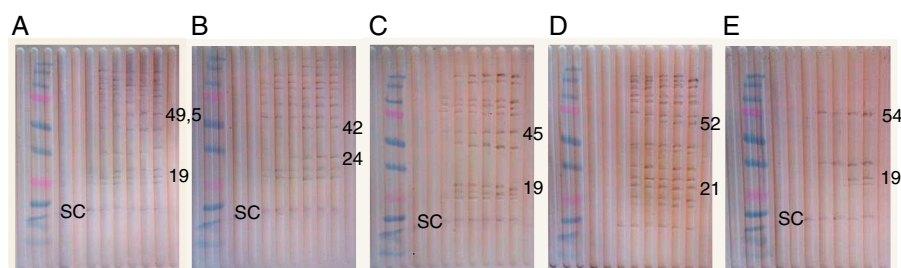


Figura 2. A-E) Respuesta de IgE correspondiente a las cinco ratas infectadas con *Anisakis*. SC: pocillos que se incuban con sueros controles, uno con anti-IgE y otro sin anti-IgE. Los pocillos siguientes se incuban con los sueros positivos en orden: 1.^a, 2.^a, 4.^a, 5.^a y 6.^a toma de sangre.

minantes antigénicos de cada una de las moléculas de menos de 100 kDa podrían tener distinta respuesta al calor⁷.

Concentración de geles de poliacrilamida e influencia de algunos factores

Para optimizar la técnica SDS-PAGE, se han ensayado los geles a distinta concentración de poliacrilamida. El amplio patrón molecular originado cuando se empleó el gradiente 10-13% concuerda con el agrupamiento de las bandas polipeptídicas mostrado por Martín²¹, si bien este autor utiliza un gradiente entre 5-20%. La detección de proteínas menores de 5 kDa puede deberse a una irregular polimerización del gel.

Un dato de mención hallado en las experiencias realizadas mediante SDS-PAGE fue la necesidad de aplicar tratamiento térmico a la mezcla antigénica más tampón para mejorar la definición de las bandas. Según Laemmli¹², este proceso sería útil para deformar las proteínas y que estas alcancen su estructura primaria.

Estudio de la respuesta inmunológica en ratas infectadas con L3 de *Anisakis*

La técnica SDS-PAGE ha puesto de manifiesto que las concentraciones de antígenos obtenidas entre 1,8 y 0,66 µg/µl producen resultados casi idénticos, detectándose una reacción inmunológica positiva con los sueros de las ratas problemáticas. En lo que se refiere al tiempo transcurrido entre las infecciones de los animales, hay que indicar que con el suero de todas ellas aparecieron bandas más intensas después de la segunda reinfección. Este resultado se apoya en las investigaciones sobre la cinética de producción de anticuerpos específicos frente a *Anisakis* en ratas infectadas oralmente²². Iglesias et al.²³ obtuvieron una amplificación de la respuesta en IgM e IgG1 tras las sucesivas inmunizaciones de ratones con antígenos de ES de *A. simplex*.

Por otra parte, los sueros de las ratas, tanto infectadas como tras la segunda reinfección, reconocieron una proteína soluble entre 19 y 24 kDa, por lo que podría tratarse del antígeno principal Anis 1 específico de *Anisakis*^{23,24}. Conviene resaltar las bandas encontradas de alrededor de 50 kDa en las ratas parasitadas; tales antígenos se han reconocido después de la reinfección, como la mayoría de las polipéptidos transferidos. Además, con los sueros de 4 de los animales aparecieron bandas entre 50 y 140 kDa. Estos resultados están en consonancia con los de Akao et al.²⁵, quienes indican bandas antigénicas con un PM entre 50 y 120 kDa en la anisakiosis gástrica humana. En el caso de las bandas detectadas correspondientes a los antígenos de bajo (14-18 kDa) y medio (30-50 kDa) PM, podrían ser indicativas de una anisakiosis intestinal según Domínguez-Ortega et al.²⁶; sin embargo, García et al.²⁷ asocian este patrón de bandas de bajo y medio PM a individuos alérgicos al parásito. Tal observación podría evidenciar una respuesta IgE, que puede ser un primer paso hacia una futura respuesta alérgica². La heterogeneidad presente en las bandas de una de las ratas podría atribuirse, de acuerdo con Kennedy et al.²⁸, a las diferencias genéticas entre los individuos, específicamente en la región de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad.

Hay que tener en cuenta que la complejidad de los antígenos parasitarios, y en concreto la ocurrencia de reacciones cruzadas con otros miembros del infraorden *Ascaridomorpha*, condiciona la fiabilidad, la sensibilidad y la especificidad de las técnicas²⁹ y, en consecuencia, dificultan el diagnóstico inmunológico. Sin embargo, las ratas objeto de nuestras experiencias no se han infectado con otros helmintos intestinales, como se ha comprobado durante y al término del estudio; por tanto, tales proteínas reconocidas por la IgE en el suero de los animales corresponderían a *Anisakis* tipo I.

Así se pone de manifiesto que inmunotransferencia inmunotransferencia es una técnica útil para detectar anticuerpos de tipo

IgE frente a proteínas de *Anisakis*. Es importante destacar que la infección se llevó a cabo de manera experimental en ratas, por lo que los resultados no pueden extrapolarse directamente a las respuestas alérgicas producidas en el hombre; sin embargo, Cho et al.²² han demostrado que la infección oral con L3 de *Anisakis* en estos animales ejerce una reacción inmunológica con producción regular de anticuerpos. También se ha observado en ratones una sintomatología alérgica, tanto con las larvas vivas como con los antígenos procedentes del parásito³⁰.

Debido al alto número de especies de peces parasitados que forman parte de la dieta cotidiana humana, el contacto con los antígenos de este parásito es muy elevado y, por tanto, el riesgo de presentar una reacción alérgica a tales proteínas está presente en nuestro entorno. Por otro lado, Iglesias et al.²³ indican que los roedores de laboratorio pueden ser un modelo útil para el estudio inmunológico de *A. simplex* en el hombre.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Valero A, Paniagua MI, Hierro I, Díaz V, Valderrama MJ, Benítez R, et al. *Anisakis* parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the Mediterranean coasts of Andalucía (Southern Spain). *Parasitol Int.* 2006;55:1-5.
- Audicana MT, Kennedy MW. *Anisakis simplex*: From obscure infectious worm to indicator of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:360-79.
- Ubeira FM, Valiñas B, Lorenzo S, Iglesias R, Figueiras A, García-Villaescusa R. Anisakiosis y alergia. Un estudio seroepidemiológico en la Comunidad Autónoma Gallega. Santiago de Compostela: Documentos Técnicos de Salud Pública; Serie B, n.º 24. Ed. Consellería de Sanidade e Servizos Sociais, Xunta de Galicia; 2000.
- Kobayashi Y, Ohsaki K, Ikeda K, Kakemoto S, Ishizaki S, Shimakura K, et al. Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitol Int.* 2011;60:144-50.
- Alonso-Gómez A, Moreno-Ancillo A, López-Serrano MC, Suárez de Parga JM, Daschner A, Caballero MT, et al. *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitizes the gastrointestinal tract. *Parasitol Res.* 2004;93:378-84.
- Fernández de Corres L, Audicana M, Del Pozo MD, Muñoz D, Fernández L, Navarro JA, et al. *Anisakis simplex* induces not only anisakiosis: Report on 28 cases of allergy caused by this nematode. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 1996;6:315-9.
- Caballero ML, Moneo I. Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitol Res.* 2004;93:248-51.
- 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. *Food Prot.* 2011;74:2119-26.
- Olivares FO. Efecto sobre los alérgenos de las larvas L3 de *Anisakis* al aplicar tratamientos selectivos en pescado parasitado. Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid. 2012.
- Berland B. Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia.* 1961;2:1-50.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1977;227:680-5.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure. Some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76:4350-4.
- Kim JS, Kim KH, Cho S, Park HY, Cho SW, Kim YT, et al. Immunochemical and biological analysis of allergenicity with with excretory-secretory products of *Anisakis simplex* third stage larva. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;136:320-8.
- Bier JW, Jackson GJ, Earl FL, Knollenberg WG. Experimental anisakiosis in pigs: Gross and microscopic pathology with larval *Anisakis* sp. and *Phocanema* sp. nematodes from fishes. *Trans Am Microsc Soc.* 1976;95:264-5.
- Sakanari JA, Loinaz HM, Deardorff TL, Raybourne RB, McKerrow JH, Friens JG. Intestinal anisakiosis. A case diagnosed by morphologic and immunologic methods. *Am J Clin Pathol.* 1988;90:107-13.
- Ishikura H. Epidemiological aspects of intestinal anisakiosis and its pathogenesis. En: Ishikura H, Kikuchi K, editores. *Intestinal anisakiosis in Japan Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention.* Tokyo: Springer-Verlag; 1990. p. 3-21.
- Valero A, Terrados S, Díaz V, Reguera V, Lozano J. Determination of IgE in the serum of patients with allergic reactions to four species of fish-parasite anisakids. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2003;13:94-8.
- Moneo I, Caballero ML. Las larvas de *Anisakis simplex* incubadas en medio ácido diluido liberan alérgenos que pueden tener utilidad en diagnóstico clínico. *Alergol Immunol Clin.* 2002;17:201-7.

20. Ochoa ML, San Martín MS. Termoestabilidad de los antígenos de la larva *Anisakis simplex*. *Alergol Inmunol Clin.* 2000;15:240–6.
21. Martín L. Estudio antigénico de algunas especies del orden Ascaridida. Investigación de antígenos de *Anisakis simplex* en sangre de animales infestados experimentalmente. Tesis doctoral. Universidad de Granada, 2001.
22. Cho SW, Lee HN. Immune reactions and allergy in experimental anisakiasis. *Korean J Parasitol.* 2006;44:271–83.
23. Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM, Santamarina MT, Sanmartin ML. *Anisakis simplex*: Antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. *Parasite Immunol.* 1993;15:243–50.
24. 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;106:177–82.
25. Akao N, Ohyam T, Kondo K. Immunoblot analysis of serum Ig G Ig A and Ig E responses against larval excretory –secretory antigens of *Anisakis simplex* in patients with gastric anisakiasis. *J Helminthol.* 1990;64:310–8.
26. Domínguez-Ortega J, Cimarra M, Sevilla M, Alonso-Llamazares A, Moneo I, Robledo-Etxarren T, et al. *Anisakis simplex*: una causa de pseudobstrucción intestinal. *Rev Esp Enferm Dig.* 2000;92:132–5.
27. García M, Moneo I, Audicana MT, Del Pozo MD, Muñoz D, Fernández E, et al. The use of Ig E immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99:497–501.
28. Kennedy MW, McIntosh AE, Blair AJ, McLaughlin D. MHC (RT1) restriction of the antibody repertoire to infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in the rat. *Immunology.* 1990;71:317–22.
29. Golvan YJ, Ambroise-Thomas P. *Les nouvelles techniques en Parasitol.* Paris: Flammarion Med Sci; 1984. p. 298.
30. Sánchez-Monsálvez I, De Armas-Serrá C, Bernadina W, Rodríguez-Cabeiro F. Altered autonomic control in rat intestine due to both infection with *Anisakis simplex* and incubation with the parasite's crude extract. *Dig Dis Sci.* 2003;48:2342–52.