

PREMIO: FAES FARMA

© REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

***Anisakis simplex*: PURIFICACIÓN ANTIGÉNICA Y
DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS DE
INMUNODIAGNÓSTICO *IN VIVO* E *IN VITRO***

***Anisakis simplex*: ANTIGENIC PURIFICATION AND
DEVELOPMENT OF NEW *IN VIVO* AND *IN VITRO*
IMMUNODIAGNOSTIC METHODS.**

1.- RESUMEN.....	3
2.-INTRODUCCION.....	5
3.- MATERIAL Y METODOS.....	6
4.- RESULTADOS.....	12
5.- DISCUSIÓN.....	24
6.- CONCLUSIONES.....	51
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	52
8.- ABREVIATURAS.....	60

1.-RESUMEN

La anisakidosis es una enfermedad parasitaria causada por la ingestión accidental de larvas de nematodos pertenecientes a la familia Anisakidae. La infección se adquiere tras la ingestión de pescado parasitado crudo o poco cocinado (Sakanari y McKerrow, 1989). Según su localización, la anisakidosis se divide en gástrica, intestinal o ectópica (Ishikura y col., 1993). Sin embargo, debido a la gran variedad de manifestaciones gastrointestinales que produce dicha enfermedad, la mayor parte de las veces es mal diagnosticada.

Si bien las técnicas inmunológicas permiten determinar la presencia de anticuerpos específicos frente a los diferentes parásitos, la introducción de técnicas extremadamente sensibles, como el ELISA, no evita la presencia de anticuerpos que presentan reactividad cruzada, la cual es especialmente intensa en la anisakidosis, cuando se utiliza antígeno total larvario de *Anisakis simplex* como materia prima. Con el fin de mejorar la especificidad y sensibilidad de las técnicas para el diagnóstico de la anisakidosis humana, hemos desarrollado un método de cromatografía de afinidad para la purificación de antígenos especie-específicos de las larvas de tercer estadio de *A. simplex*, realizando la posterior valoración de la sensibilidad y especificidad del antígeno purificado sobre sueros humanos de pacientes previamente diagnosticados de sensibilización a *Anisakis* mediante técnicas de ELISA, *western-blot* y prueba cutánea *prick test*.

SUMMARY

Anisakidosis is a human disease caused by the ingestion of larval nematodes from the family Anisakidae. The infection is acquired by eating raw seafood or undercooked fish and squid (Sakanari & McKerrow 1989). Anisakidosis is divided into gastric, intestinal, and ectopic (Ishikura et al. 1993). Due to the vagueness of the symptoms, this disease is often misdiagnosed.

The immunodiagnostic methods can determinate the presence of specific antibodies against different parasites, although, the introduction of sensitive techniques, such as ELISA, did not avoid the presence of antibodies that provoke cross-reactivities, which are very high in the anisakidosis disease, when the *Anisakis simplex* larval crude extract was used as reactive. In order to improve the specificity and sensitivity of the techniques for the human anisakidosis diagnosis, a method of affinity chromatography for the purification of species-specific antigens from *A. simplex* third stage larvae has been developed, valuing the sensitivity and the specificity of the purified antigen using sera from patients, previously diagnosed with *Anisakis* sensitisation, by ELISA techniques, western-blot, and skin *prick test*.

2.-INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos fundamentales para el diagnóstico de las infecciones parasitarias es el uso de antígenos adecuados para el desarrollo de inmunoensayos específicos y sensibles. Esto resulta particularmente complicado en el caso de las infecciones por nematodos debido a la elevada reactividad cruzada existente entre distintos parásitos de este grupo.

El diagnóstico de la anisakidosis resulta particularmente dificultoso debido a que dicha parasitación, al no poder ser diagnosticada por ensayo coprológico debido a la ausencia del parásito en heces, suele ser confundida con numerosos desórdenes gastrointestinales (Ohtaki y Ohtaki, 1989; Ishikura, 1990). Un posible y definitivo diagnóstico podría basarse en las características morfológicas de la larva de *Anisakis* cuando ésta es expectorada por el paciente o extraída del estómago mediante endoscopia, (Sakanari y col., 1988). Pero en la actualidad, existen gran cantidad de casos en donde la larva, o bien no se localiza en el estómago debido a su migración a otros lugares extragástricos o, por el contrario, se encuentra degradada siendo imposible, por tanto, su identificación.

Si bien las técnicas inmunológicas permiten determinar la presencia de anticuerpos específicos frente a los diferentes parásitos, la introducción de técnicas extremadamente sensibles, como el ELISA, no evita la presencia de anticuerpos que presentan reactividad cruzada, la cual es especialmente intensa en la anisakidosis, cuando se utiliza antígeno total larvario de *A. simplex* como materia prima para la determinación de los niveles de IgE específica en pacientes con sospecha

de anisakidosis, bien sea por *CAP System*, inmunoblot o prueba cutánea (*prick test*), debido a la elevada proporción de falsos negativos que se detectan (Lorenzo y col., 2000).

Del mismo modo, las larvas de *Anisakis* pueden originar manifestaciones de hipersensibilidad inmediata mediada por IgE en pacientes previamente sensibilizados a dicho parásito, cuando las larvas son ingeridas accidentalmente al consumir pescado parasitado, habiéndose detectado en España varios casos de urticaria, angioedema y/o choque anafiláctico (Fraj Lázaro 1998; 1995b; del Pozo 1996)

Por ello con el fin de mejorar la especificidad y sensibilidad de las técnicas para el diagnóstico de la anisakidosis humana, hemos desarrollado un método de cromatografía de afinidad para la purificación de antígenos especie-específicos de las larvas de tercer estadio de *A. simplex*, realizando su posterior valoración tanto de la sensibilidad como de la especificidad del antígeno purificado sobre sueros humanos de pacientes previamente diagnosticados de sensibilización a *Anisakis* mediante técnicas de ELISA, *western-blot* y prueba cutánea *prick test*.

3.- MATERIAL Y METODOS EMPLEADOS

3.1.- Obtención de larvas de tercer estadio (L3) de *Anisakis simplex* y de adultos de *Ascaris suum* y *Toxocara canis*.

Las L3 de *Anisakis simplex* fueron extraídas manualmente a partir de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*), destinadas al consumo humano. Se lavaron tres veces en solución salina estéril y se conservaron a -20°C (Perteguer y Cuéllar, 1998). Los adultos de *Ascaris suum* se obtuvieron del intestino de cerdos infectados de manera natural. Los

adultos de *Toxocara canis* se obtuvieron de perros con infección natural. Los machos y las hembras se lavaron varias veces con solución salina estéril al 0,85% y se conservaron en PBS (Fosfato 0,1M, NaCl 0,15 M) a 4°C hasta su utilización.

3.2.- Obtención de huevos de *Toxocara canis*.

Los huevos de *T. canis* se obtuvieron a partir de hembras grávidas. Posteriormente dichos huevos se filtraron por doble gasa y se concentraron por centrifugación a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos.

3.3.- Embrionamiento de huevos de *Toxocara canis*.

Se dispusieron en placas Petri estériles con solución salina estéril al 0,85% (20 ml/placa) y una concentración aproximada de 200.000 huevos/placa. Se incubaron a 37°C en presencia de la luz natural, conservándose a 4°C hasta su uso (Guillén y col., 1986).

3.4.- Obtención de antígeno total larvario de *Anisakis simplex* (antígeno AK) y de adultos de *Ascaris suum* (antígeno AS) y *Toxocara canis* (antígeno TC).

Las larvas de *A. simplex* fueron homogenizadas en mortero y sonicadas durante 6 minutos (10 s/pulso) al 70% de potencia. Posteriormente el homogenizado fue extraído en PBS a 4°C durante una noche y seguidamente fue delipidado con n-hexano (7:3 v/v) y centrifugado a 8.497 g durante 30 minutos a 4°C (Biofuge 17RS, Heraeus Sepatech). El sobrenadante fue dializado una noche a 4°C frente a PBS y su contenido proteico fue valorado mediante la técnica de Bradford. El extracto fue congelado a -20°C hasta su utilización.

Para la obtención del antígeno de adultos de *A. summ* y *T. canis* se empleó una modificación del método de Welch y col. (1983) sin realizar una rotura de los helmintos por ultrasonido. Así los parásitos fueron homogenizadas manualmente en mortero y posteriormente continuando como en el apartado anterior.

3.5.- Inoculación e inmunización de conejos.

Se realizó un recuento de huevos embrionados de *T. canis*. El inóculo se realizó mediante jeringa suspendiendo los huevos en 2 ml de solución salina al 0,85%. Se efectuaron pautas múltiples inoculando dosis únicas de 2.000 huevos embrionados/conejo durante 4 semanas.

Otros animales fueron inmunizados vía intramuscular con extractos antigénicos (1mg/ml) procedentes de *A. suum* y *A. simplex* emulsionados en Adyuvante Completo de Freund (ACF). Posteriormente se obtuvieron sueros de los distintos lotes sangrándolos semanalmente.

3.6.- Obtención de sueros humanos.

Se utilizaron 35 sueros humanos procedentes del Hospital Juan Canalejo de La Coruña, con sospecha clínica de larva migratoria visceral (LMV) y diagnosticados serológicamente frente al antígeno ES de *T. canis*, otros 28 sueros diagnosticados de sensibilización a *Anisakis* (sueros SAS) procedentes del Hospital del Aire de Madrid y diagnosticados mediante CAP System frente al antígeno total larvario de *A. simplex*.

3.7.- Método ELISA para la determinación de anticuerpos.

Las placas de 96 pocillos se sensibilizaron 1 noche mediante la adición de 100 µl/pocillo de antígeno diluido en tampón carbonato 0,1 M a pH 9,6 a una concentración de 1 ó 10 µg/ml. Después de lavar 3 veces

con PBS-Tween 20 al 0,05% (PBS-Tween), los pocillos se bloquearon con 200 µl por pocillo de BSA al 0,1% en PBS, durante 1 h a 37°C. Tras lavar, se añadieron 100 µl por duplicado de las muestras de sueros a 1/400 o 1/2 en PBS-Tween con BSA al 0,1% (PBS-Tween-BSA) y se incubaron 2 h a 37°C. Una vez lavadas las placas, se incubaron 1 h a 37°C con 100 µl por pocillo de inmunoglobulinas anti-Ig's, IgG, IgM o IgA humanas (Biosource International, Camarillo, CA, USA) a la dilución adecuada en PBS-Tween-BSA. En el caso de la detección de IgE se adicionó como conjugado un anticuerpo monoclonal murino frente a cadenas ε de IgE humana (IgG1κ, E21A11, INGENASA) en PBS-Tween-BSA e incubados durante dos horas a 37°C. Tras el lavado se añadieron 100 µl/pocillo de inmunoglobulinas de cabra anti-IgG1 (γ) murina marcadas con peroxidasa en PBS-Tween-BSA e incubados durante una hora a 37°C. Después de añadir el sustrato (tampón citrato fosfato con H₂O₂ al 0,04% y o-fenileno diamina al 0,04%) la reacción se paró con ácido sulfúrico 3N y las placas se leyeron a 490 nm (García y col., 1997).

3.8.- Inmunoelectrotransferencia (*Western-blot*).

Después de realizar el SDS-PAGE del antígeno, las bandas proteicas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,22 µm de poro con Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20% v/v, pH 8,3. La transferencia se hizo a voltaje constante (100 V) durante 1 h. Las membranas se bloquearon 3h a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% en PBS, antes del inmunorreconocimiento por incubación de 3h con los sueros humanos, de conejo o de oveja (The Binding Site,

Birmingham, England) diluidos 1/10 o 1/25, respectivamente, en PBS-Tween con leche desnatada al 1%.

Cada membrana se lavó en PBS-Tween (3 x 5 min) y se incubó 3h con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo o humanas marcadas con peroxidasa, o burro anti-IgG de oveja, mencionadas en el apartado de ELISA a la dilución adecuada en PBS-Tween, con leche desnatada al 1%. Las bandas se lavaron con PBS-Tween (3 x 5 min) y se hicieron reaccionar con el sustrato (H_2O_2 al 0,006% en PBS: 4-cloro-1-naftol al 0,03% en metanol). La reacción se frenó mediante lavados en agua destilada. Para la IgE el suero se incubó a la 1/2 revelándose como se indica en el apartado de ELISA antes de añadir el sustrato.

3.9.-Purificación de IgG de conejo y humanas.

Se prepararon columnas de proteína A-Sepharosa (Pharmacia Biotech) según las instrucciones de la casa comercial. Los sueros hiperinmunes de conejo anti-*A. simplex*, *A. suum*, y *T. canis*, así como, los sueros humanos anti-*Anisakis*, se cargaron en las columnas diluidos en tampón de muestra (Tris 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 8,0). Las columnas se lavaron con tampón de lavado (Tris 0,05 M, NaCl 0,5 M) y las IgG fijadas se eluyeron con tampón glicina (glicina 0,2 M, NaCl 0,5 M, pH 2,8) recogiendo en fracciones de 1 ml sobre 100 μ l de tampón colector (Tris-base 1 M, pH 8,5). Posteriormente se leyeron en un espectrofotómetro a 280 nm para así, calcular la concentración de IgG de conejo o humana.

3.10.- Preparación de columnas de inmunoafinidad.

Se prepararon columnas de inmunoafinidad a partir de IgG de conejo anti-*Anisakis*, anti-*Ascaris* y anti-*Toxocara*, así como a partir de IgG humanas anti-*Anisakis*. Las IgG, se acoplaron a Sepharosa 4B activada con CNBr siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Pharmacia Biotech) a una concentración de 5 mg/ml en NaHCO_3 0,1 M con NaCl 0,5 M (pH 8,5).

3.11.- Purificación del antígeno de *Anisakis simplex*.

Se añadió el antígeno AK en tampón de muestra (Tris 0,05M, NaCl 0,5M) sobre dichas columnas y se incubó 3 h a temperatura ambiente. Los antígenos no fijados se lavaron con tampón de muestra y los fijados se eluyeron en fracciones de 1 ml con tampón glicina (glicina 50 mM, NaCl 0,15 M) seguido de dietilamina 0,1 M en solución salina. Las fracciones se leyeron a 280 nm y la pureza de las proteínas eluidas se ensayó mediante SDS-PAGE. Los antígenos obtenidos fueron valorados por Bradford y congelados a -20°C hasta su utilización.

3.12.- Prueba cutánea *prick test*.

A los pacientes les fueron administrados los antígenos de *A. simplex* sobre la piel del antebrazo, así como un control negativo correspondiente a solución salina y un control positivo de histamina a 10 mg/ml. Pasados 15 minutos se procedió a la lectura de las pápulas, midiéndose el área de cada una de ellas expresadas en mm^2 . Para la obtención de los valores, los dibujos de las pápulas se han escaneado, vectorizado y, posteriormente, las áreas se midieron utilizando el programa TOP CAP 1.0 que expresa la superficie exacta en mm^2 .

4.- RESULTADOS

4.1.- Purificación del antígeno de *Anisakis simplex* por cromatografía de afinidad.

El antígeno AK se cargó en la columna con IgG de conejo anti-*A. simplex* y posteriormente mientras que los antígenos no fijados se lavaron, los fijados se eluyeron con tampón glicina seguido de dietilamina. Tras la primera elución, se aislaron proteínas situadas entre 200-14 kDa.

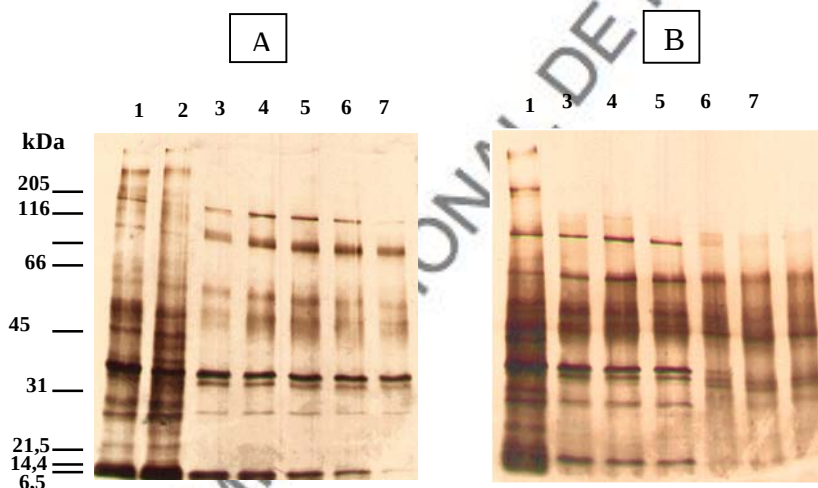


Figura 1.- SDS-PAGE. Calle 1: antígeno AK. Calle 2A: antígeno AK después de cargarlo en una columna de IgG de conejos inmunizados con antígeno EC de *A. simplex* acopladas a Sepharosa 4B activada con CNBr. Calles 3, 4, 5, 6 y 7: Fracciones de antígeno AK eluidas con A: tampón glicina (pH 2,9) o B: dietilamina (pH 11,5) de la columna de IgG de conejos inmunizados con antígeno EC de *A. simplex* acopladas a Sepharosa 4B activada con CNBr. de la columna anti-*A. simplex*.

Tras eluir con dietilamina en solución salina, se detectaron de nuevo pequeñas cantidades de las proteínas de 200, 40, 28 y 14 kDa en

las primeras fracciones eluidas, mientras que en las últimas fracciones dichas proteínas fueron casi inapreciables.

Posteriormente, todas las fracciones eluidas se mezclaron (antígeno PAK) y se sometieron a electroforesis. Las proteínas de 205 kDa y 120 kDa se mantuvieron, mientras que el doblete de 66-45 se observó en una menor proporción. Por último se detectaron grandes cantidades de la proteína de 40 kDa y los dobletes entre 31-21 kDa y 21,5-14,4 kDa (Fig. 2).

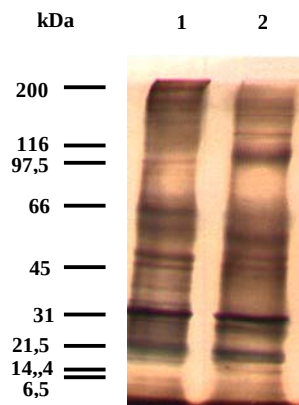


Figura 2.- SDS-PAGE. Calle 1: antígeno AK. Calle 2: Antígeno PAK

Posteriormente, el antígeno AK se cargó en una columna de IgG humana anti-A *simplex*. El patrón antigénico fue similar al obtenido cuando se utilizó la columna de IgG de conejo. Se observaron diferencias en el rango de 45-31 kDa, proteínas que aparecieron con mayor intensidad que en caso de la columna de IgG de conejo (Fig. 3).

Posteriormente, el antígeno PAK se cargó en la columna preparada con IgG de conejo anti-A. *suum*. Los antígenos no fijados se lavaron (antígeno PAS) y los fijados (antígeno EAS) se eluyeron. Después, se realizó un *immunoblot* utilizando antígeno PAK, antígeno

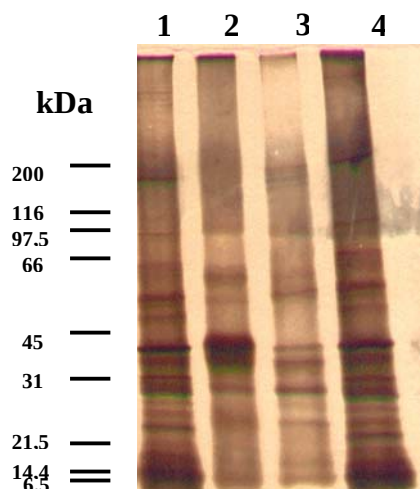


Figura 3.- SDS-PAGE. Calles 1 y 4: antígeno AK. Calle 2: antígeno EC de *A. simplex* eluído de la columna de IgG de pacientes SAS acopladas a Sepharosa 4B activada con CNBr. Calle 3: antígeno PAK.

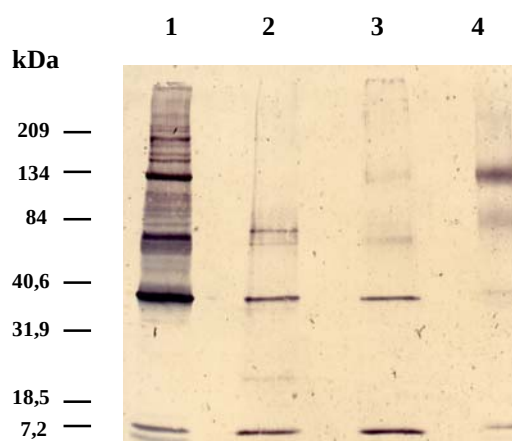


Figura 4.- Patrones de inmunorreconocimiento de IgG de conejos inmunizados con antígeno AK frente a: Calle 1: antígeno AK. Calle 2: antígeno PAK. Calle 3: antígeno PAS., Calle 4: antígeno EAS

PAS y antígeno EAS, utilizando sueros de conejos inmunizados con antígeno AK. Se observó la presencia de bandas alrededor de 205, 120 y un doblete de alrededor de 84-40 kDa. Aparecieron dos bandas de gran intensidad en el rango de 40 y 14 kDa, así como, un doblete de menor intensidad entre 32-18,5 kDa. Tras pasar a través de la columna anti-*A.suum*, las proteínas del antígeno PAK se mantuvieron pero aumentaron de intensidad las bandas de 40 y 14 kDa (Fig.4)

En la Figura 5 se muestran los patrones electroforéticos obtenidos con los antígenos anteriormente citados mediante SDS-PAGE. En el antígeno PAK apareció el doblete previamente mencionado. En el antígeno PAS, la proteína de 120 kDa aumentó en concentración, así como un doblete de aproximadamente 66-45 kDa, la proteína de 40 kDa se mantuvo en intensidad pero aumentó la de la proteína de 25 kDa, y un doblete entre 21,5 y 14 kDa. En el antígeno EAS se observaron restos de las IgG a 97-66 kDa. Así mismo, aparecieron proteínas muy intensas de aproximadamente 35 kDa y 7 kDa.

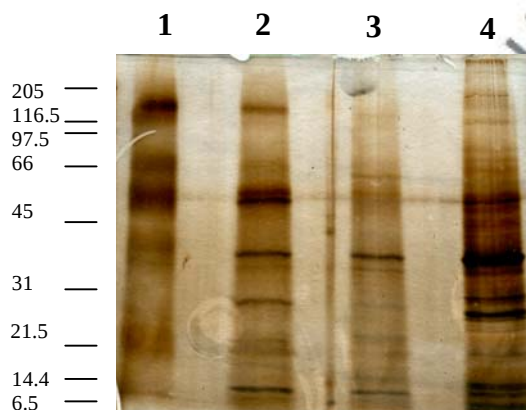


Figura 5.- SDS-PAGE. Calle 1: antígeno EAS. Calle 2: antígeno PAS. Calle 3: antígeno PAK. Calle 4: antígeno AK.

4.2.- Determinación de anticuerpos por ELISA en sueros SAS y sueros LMV con antígeno de *Anisakis simplex* purificado por cromatografía de afinidad.

Cuando enfrentamos los sueros SAS al antígeno AK, observamos que la IgG fue la inmunoglobulina más abundante, seguida de la IgM y de las Ig's, mientras que los valores inferiores correspondieron a la IgA.

Tan sólo el 40% de los sueros diagnosticados de LMV presentaron D.O. $\geq 0,2$ para las Ig's e IgG frente al antígeno TC por el contrario este valor aumentó hasta un 66% en el caso de la IgM. Para la IgA sólo se detectaron niveles de D.O. $\geq 0,2$ en el 11,5%.

Cuando se enfrentaron los sueros SAS al antígeno AS, el 45% mostró D.O. $\geq 0,2$ para las Ig's frente a un 29% frente al antígeno TC. El 39% tenían D.O. $\geq 0,2$ para la IgG en el caso del antígeno TC, frente a un 24% del antígeno AS, mientras que para la IgM, 1/2 de los sueros tuvieron D.O. $\geq 0,2$ (antígeno TC) frente a un 39% para *A. suum* (antígeno AS). Para la IgA tan sólo el 13% presentaron D.O. $\geq 0,15$ para el antígeno AS frente a un 8% para el caso de *T. canis* (antígeno TC).

Cuando se enfrentaron los sueros LMV al antígeno AS el porcentaje de sueros con D.O. $\geq 0,2$ para Ig's e IgG pasó de un 40% para *T. canis* (antígeno TC) a un 68% y 74% respectivamente. Los valores de IgM se mantuvieron igual que para *T. canis* (antígeno TC) (66%) y los de IgA bajaron a un 8,5%. Cuando se midieron las Ig's e IgM el número de sueros que dieron reacción cruzada con *A. simplex* (antígeno AK) fue inferior al observado con *A. suum* (antígeno AS), siendo del 28,5% y 17%, respectivamente. Sin embargo con *A. simplex* (antígeno AK) y a nivel de IgM; el 85% de los sueros LMV mostraron D.O. $\geq 0,2$

Al ensayar los sueros SAS frente al antígeno PAK y PAS, para ambos casos, los valores superiores correspondieron a la IgM seguida de las Ig's, IgG y, por último IgA. Cuando enfrentamos al antígeno EAS aumentaron los valores medios de IgG (D.O. = 0,26) respecto a los

antígenos purificados. Los niveles de IgM para ambos purificados (antígeno PAK y PAS) se mantuvieron sin variaciones significativas al igual que las Ig's y la IgA.

Cuando se utilizó el antígeno PAK sobre los sueros LMV, a nivel de la IgM, el 69% presentaron D.O. $\geq 0,2$. Este valor bajó a un 63% para el antígeno PAS, mientras que se obtuvo un 83% frente al antígeno EAS.

4.3.- Determinación de IgE por ELISA

Tan sólo en el 15% de los sueros SAS se detectaron niveles de IgE con D.O. $\geq 0,2$, frente al antígeno AK.

Cuando se enfrentaron al antígeno TC, se obtuvieron D.O. $\geq 0,1$ en un 13%. Frente al antígeno AS fue de un 29%. De ellos, tan sólo en 2 sueros se detectaron niveles de IgE al enfrentarlos al antígeno PAK y en 4 sueros, al utilizar el antígeno PAS. De todos los sueros en los que se detectaron niveles de IgE de D.O. $\geq 0,15$ frente al antígeno AS y TC respectivamente, en un 43% se detectaron niveles de IgE en el antígeno EAS. Por último frente al antígeno PAS, se detectaron niveles de IgE en un 10,5%.

En los sueros LMV se detectaron D.O. $\geq 0,2$ frente al antígeno TC en el 6% de ellos. Frente al antígeno AS los valores se mantuvieron igual que para *T. canis*.

4.4.- Cálculo de la sensibilidad y especificidad del antígeno AK y de los purificados PAK y PAS.

Se realizaron curvas 2x2 en las cuales se representó el número de sueros SAS y con valores de $CAP \geq 3$ y ≤ 2 frente a las D.O. obtenidas por ELISA al enfrentar los sueros a los distintos antígenos y a nivel de las inmunoglobulinas totales, IgG, IgM, IgA e IgE. Posteriormente se escogieron diferentes puntos de corte de D.O. con cada una de las inmunoglobulinas valoradas y cada uno de los antígenos ensayados (antígeno AK, AS, TC, PAK, PAS y EAS).

	$CAP \geq 3$	$CAP \leq 2$
ELISA $\geq 0,05$		
ELISA $< 0,05$		

Tabla 1.- Modelo de tabla 2x2 utilizada para calcular la sensibilidad y especificidad de los diferentes antígenos ensayados.

4.5.- Determinación de anticuerpos por *western-blot* en sueros SAS con antígeno de *Anisakis simplex* purificado por cromatografía de afinidad.

Se seleccionaron 24 sueros humanos procedentes del Servicio de Alergia del Hospital del Aire de Madrid, los cuales poseían CAP positivo a *Anisakis*.

Al enfrentarlos al antígeno AK, el 71% reconocieron proteínas entre 209-134 kDa a nivel de las Ig's y la IgM. El 100% reconocieron la proteína de 60 kDa, mientras que el 37,5% reaccionaron a nivel de la proteína de 40 kDa y el 12% reconoció la de 25 kDa a nivel de la IgG. A

nivel de la IgE, un 17% de los sueros no reconoció ninguna proteína de ningún antígeno (homólogos, bruto o purificados y heterólogos). El 46% (todos con $CAP \geq 3$) reaccionó con un doblete de aproximadamente 40 kDa y el 16% con la proteína de 25 kDa presentes en el antígeno AK.

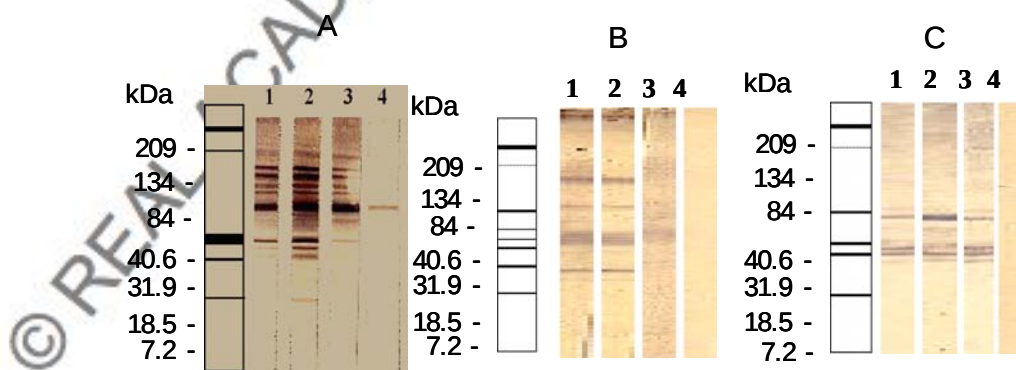
Al estudiar las reacciones cruzadas con *A. suum* y *T. canis*, todos los sueros reconocieron proteínas del antígeno TC siendo esta reacción más intensa que frente a *A. suum*. Así, la 1/3 de los sueros, reconocieron un triplete entre 84-40 kDa. Un 30% reconoció una proteína de 84 kDa y, el 41,5% reconoció la proteína de 32 kDa, y el 33% la de aproximadamente 25 kDa. A nivel de IgE, observamos reacción en el 25% de los sueros. De estos 6 sueros, 2 reconocieron la proteína de 60 kDa, 2 la de 45 kDa y otros 2 a los antígenos situados entre 209-134 kDa. En 5 de estos 6 sueros, también se observó reacción positiva cuando se estudiaron por *blot* utilizando el antígeno AS. De estos 5 sueros, 3 de ellos reconocían la misma proteína en ambos antígenos (TC y AS). El único que no reaccionó también con *Ascaris* resultó ser el de $CAP = 6$.

La reacción cruzada con *A. suum* fue menor que frente a *T. canis*, sólo el 50% de los sueros reaccionaron con un doblete de 40 kDa. Esto ocurrió a nivel de Ig's, IgG e IgM y, en 1/3 de ellos, también con la IgA. El 16% reconoció bandas de 60 kDa a nivel de las Ig's y la IgG. Todos los sueros reconocieron proteínas entre 209 y 134 kDa. Un 29% reconoció una banda de 25 kDa, tanto con Ig's como IgG y, sólo el 4% reaccionó con la de 35 kDa. Con IgE apareció reacción cruzada en el 30% de los sueros con proteínas entre 134 y 40 kDa. En ninguno de estos

sueros hubo reacción sobre el antígeno PAK, confirmando por lo tanto que se trata de reacción cruzada.

En el antígeno PAK, se concentraron las proteínas de 60, 40 y 25 kDa, habiendo un aumento del reconocimiento hacia estas fracciones peptídicas en un 83%, 16% y 4% respectivamente. En un 54% desapareció la reacción con proteínas de elevado peso molecular. El 17% reconoció proteínas a nivel de la IgE. De estos 4 sueros, en 3 de ellos reaccionaron con la proteína de 60 kDa y en 1 de ellos con la de 25 kDa (éste tenía $CA P=6$). Dicha proteína de 25 kDa también fue reconocida en el antígeno AK cuando se investigó el reconocimiento de la IgE.

En el antígeno PAS se concentraron las proteínas de 60, 40, 25 y 30-35 kDa, aumentando el reconocimiento de los sueros en un 79%, 45,8%, 25% y 25%, respectivamente. Hubo un aumento en el número de sueros que reconocieron la proteína de 40 kDa (del 16% al 45%) y la de 25 kDa (del 4% al 25%). Frente al antígeno EAS, observamos que 10 de los 12 sueros ensayados reaccionaron con una proteína de 14 kDa a nivel de Ig's, IgG e IgM.



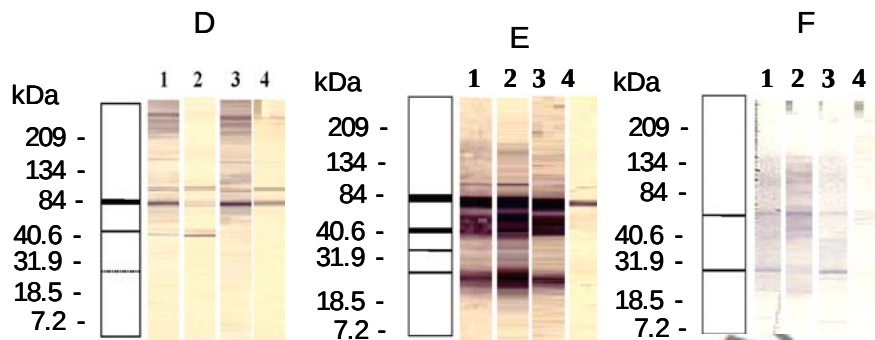


Figura 6.- Patrones de inmunorreconocimiento de los sueros SAS frente al A: antígeno AK, B: antígeno TC, C: antígeno AS, D: antígeno PAK, E: antígeno PAS y F: antígeno EAS, a nivel de 1: Ig's, 2: IgG, 3: IgM y 4: IgA.

4.6.- Determinación de IgE.

Cuando se enfrentaron los 24 sueros SAS al antígeno AK, en 10 de ellos hubo reacción con proteínas ≥ 84 kDa, en 9 apareció una banda a 40 kDa y tan sólo uno reaccionó con la proteína de 25 kDa y otro con la de 14 kDa. Frente al antígeno AS, sólo 2 sueros reaccionaron con una proteína de 45 kDa, en 3 apareció un triplete a 184 kDa y únicamente un suero reaccionó con la de 60 kDa. Para el antígeno TC, solamente en 3 sueros aparecieron bandas reactivas a 184, 60 y 40 kDa respectivamente.

Para el antígeno PAK no hubo reacción, mientras que para el antígeno PAS, un suero reconoció una proteína de 40 kDa otro la de 25, otro alrededor de 84 kDa y por último en 3 sueros hubo reacción a nivel de una proteína de 40 kDa. Finalmente frente al antígeno EAS un suero reconoció la proteína de 14 kDa, dos sueros la de 84 kDa y un último suero la de 184 kDa.

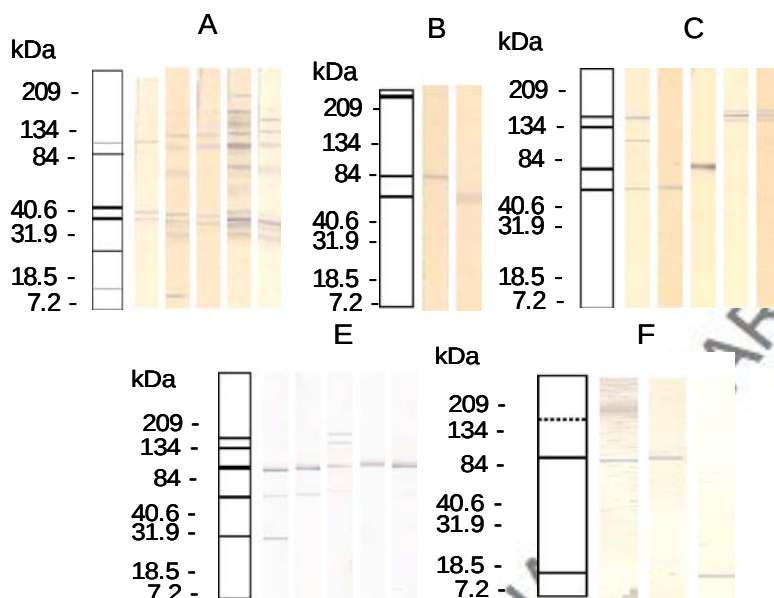


Figura 7.- Patrones de inmunorreconocimiento de los sueros SAS a nivel de la IgE, frente al A: antígeno AK, B: antígeno TC, C: antígeno AS, E: antígeno PAS y F: antígeno EAS.

4.7.- Evaluación mediante prueba cutánea (*prick test*) del antígeno de *Anisakis simplex* purificado mediante cromatografía de afinidad en pacientes diagnosticados de sensibilización a *Anisakis*.

Se seleccionaron 20 pacientes los cuales habían acudido al servicio de Alergia e Inmunología del Hospital del Aire de Madrid, con diferentes síntomas alérgicos gastrointestinales relacionados con la ingesta de pescado.

Únicamente el 30% de los pacientes se mostraron negativos para los extractos comerciales de *A. simplex* (AKABELLO y AKIPI).

Únicamente un paciente (número 11) que había sido positivo para los

extractos comerciales se mostró negativo para los otros antígenos ensayados (PAK, PAS, EAS y AS).

Frente al extracto bruto de *A. suum* (AS) el 35% fueron positivos, siendo la reacción de menor tamaño que la observada para el extracto comercial de IPI en la mitad de los pacientes (57%), mayor en el 28% y similar en el 14%. En 5 pacientes el tamaño de la pápula frente al antígeno PAS fue mayor que la observada con el antígeno PAK, y mientras que en 6 pacientes fue menor. Únicamente 3 de estos pacientes fueron negativos al antígeno EAS mostrándose también negativos al extracto bruto de adultos de *A. suum*.

En la figura 56 se han representado las medias y las desviaciones estándar de las áreas de las pápulas obtenidas mediante *prick test*.

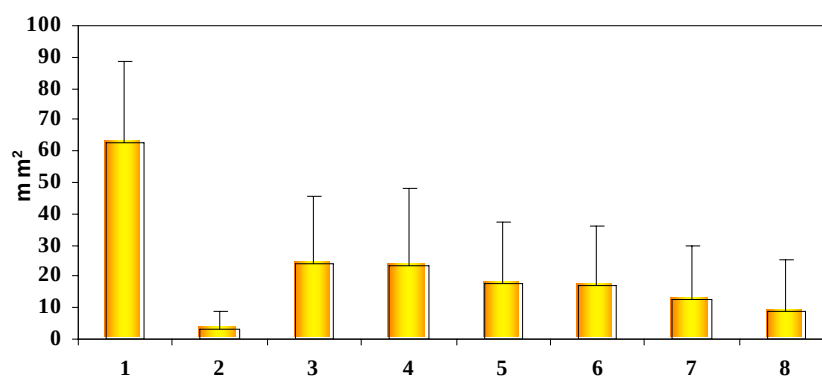


Figura 8- Medias y desviaciones estándar de las áreas de las pápulas obtenidas tras la administración por *prick test* de 1: histamina; 2: solución salina; 3: extracto comercial de *Anisakis simplex* de laboratorios ALK-ABELLÓ (AKABELLO); 4: extracto comercial de *A. simplex* de

laboratorios I.P.I (AKIPI); 5: antígeno PAK; 6: antígeno PAS, 7: antígeno EAS y 8: antígeno AS.

5.- DISCUSIÓN

5.1.- Purificación del antígeno bruto de *Anisakis simplex* mediante cromatografía de afinidad.

El primer paso de la purificación consistió en la unión del antígeno larvario de *A. simplex* a sus anticuerpos homólogos de conejos previamente inmunizados y eluidos de la columna. Este paso es necesario ya que un tratamiento único para eliminar las reacciones cruzadas con parásitos cercanos puede no eliminar la posibilidad de reacciones cruzadas del antígeno con bacterias o virus (Su y Prestwood, 1990). Además, se ha observado reacción cruzada entre el tercer estadio larvario de *Hysterothylacium aduncum* y *A. simplex* (Fernández y col., 1998), así como, reactividad cruzada entre proteínas fijadoras de IgE de *Anisakis*, *Daphnia*, quironómidos spp., camarón del atlántico (*Pandalus borealis*) y cucarachas (*Blatella germanica*) (Pascual y col., 1997).

Al realizar el SDS-PAGE los patrones del antígeno AK mostraban proteínas de 205, 120, 66-45, 40, 31-21, y 14 kDa. Después de su purificación por la columna de IgG de conejo anti-*A. simplex* (antígeno PAK) observamos las mismas proteínas pero en diferente proporción y en el caso de la columna de IgG humana la proteína de 40 kDa estaba más concentrada. El patrón proteico del antígeno de *A. simplex* eluido a partir de la columna de IgG humana fue similar al obtenido cuando se usó la columna de IgG de conejo, por lo que nos propusimos utilizar esta última columna para realizar las sucesivas purificaciones.

Existe controversia sobre el peso molecular de la poliproteína alergénica de *Ascaris* (ABA-1), el cual previamente se ha estimado que es de aproximadamente de 14.000 Da (Christie y col., 1990), pero su análisis espectrométrico indica que deben existir cinco componentes de tamaño similar, siendo el mayoritario de $14.643,2 \pm 1,4$ Da con un elevado grado de similitud entre los distintos ascáridos (Christie y col., 1993). Yahiro y col. (1998) clonaron el ADNc del TBA-1, la poliproteína alergénica de *T. canis* y encontraron que ésta debe ser similar al ABA-1, la poliproteína alergénica de *A. suum*, basándose en la secuencia de aminoácidos. Estos autores observaron una respuesta sólo transitoria de IgG frente al TBA-1 durante la infección, lo que podría explicar el fracaso de Kennedy y col. (1989) al buscar anticuerpos anti-TBA-1 en animales infectados por *T. canis* durante largos periodos de tiempo. Incluso, se han descrito formas diferentes del ABA-1 por Kato y Komatsu (1996), lo que podría explicar el diferente reconocimiento de anticuerpos, incluso se podrían expresar dos formas diferentes del TBA-1 en una forma estadio-específica. También Kennedy y col. (1988) observaron la presencia de un componente de 14.000 Da en *A. simplex* con homologías en *A. suum*, *Ascaris lumbricoides* y *T. canis* pero que no induce una respuesta de anticuerpos en la anisakiosis.

El segundo paso de la purificación consistió en la fijación y posterior eliminación de los antígenos responsables de la reacción cruzada a partir del antígeno purificado en el primer paso (con anticuerpos homólogos) para así recoger el antígeno específico. Para eliminar estos

antígenos causantes de las reacciones cruzadas se obtuvieron anticuerpos frente a *A. suum* o *T. canis* en conejos.

Después de pasarlo por la columna anti-*A. suum* (antígeno PAS), las proteínas que no se fijaron fueron las de 120, 66-45, 40, 31-21 y 14 kDa apareciendo concentraciones más elevadas de proteínas específicas que las observadas en las muestras no purificadas excepto en el caso de la proteína de 14 kDa. Las fracciones eluidas (antígeno EAS) las cuales contenían los antígenos que producían la reacción cruzada con *A. suum* mostraban bandas en los rangos moleculares situados a 40 y 14 kDa, observando en el último caso mayores concentraciones que en el antígeno específico (antígeno PAS).

Los sueros de conejos inmunizados con antígeno AK se enfrentaron mediante *inmunoblot* con los diferentes antígenos. Los patrones de inmunorreconocimiento utilizando dicho antígeno mostraron las típicas bandas de aproximadamente 205, 120, 66-45, 40, 14 y 7 kDa. En el antígeno PAK se observó reconocimiento de proteínas de 205, 120, 66-45, 40, 31-21 y 14 kDa, aumentando la reacción a nivel de 40 y 14 kDa. En el antígeno PAS observamos los mismos patrones aunque con reacciones más intensas con las proteínas de 40 y 14 kDa. Finalmente, en el antígeno EAS, observamos una reacción muy fuerte a nivel de 205 kDa y bandas pequeñas a un peso molecular de 40 y 14 kDa.

5.2.- Determinación de anticuerpos por ELISA en sueros SAS con antígeno de *Anisakis simplex* purificado por cromatografía de afinidad.

Se realizó una valoración de la sensibilidad y especificidad del antígeno purificado sobre 38 sueros SAS.

Cuando se midieron las Ig's, la mitad de los 38 sueros ensayados tenían valores de D.O. $\geq 0,2$, para la IgG el 44,7%, para la IgM el 42% y el 92% para la IgA, correspondiendo, dichos pacientes, a valores de CAP de entre 1 y 6. Esta diferencia en cuanto a los niveles de IgE obtenidos por CAP y las distintas inmunoglobulinas detectadas por ELISA puede ser debida, en primer lugar, a las diferentes técnicas y metodologías utilizadas para la determinación de los niveles de las distintas clases de inmunoglobulinas. Así en la prueba de CAP System se utilizó una dilución de suero muy inferior y una concentración de antígeno muy superior a la usada en la técnica de ELISA. Otro parámetro a tener en cuenta podría ser la posible competición de la IgE y la IgA con la IgG por los mismos epítomos presentes en el antígeno AK y que en el caso de la técnica CAP System, al haber un exceso de antígeno, esta competición se vería muy disminuida y por tanto los niveles de IgE se verían incrementados.

Sakanari y col. (1988) ya habían observado este hecho cuando determinaron la presencia de IgE e IgG en una paciente de 28 años que fue diagnosticada de anisakidosis intestinal. En dicha paciente observaron, mediante ELISA, niveles elevados de IgG y de IgM comparados con el suero control mientras que los niveles de IgE fueron, para ambos sueros, similares. Esta igualdad en los niveles de IgE se vio ampliamente modificada cuando realizaron dicha determinación utilizando la técnica RAST en donde, al igual que en la técnica de CAP System, se utiliza un exceso de antígeno parasitario, lo que se tradujo en

su caso, en un aumento de hasta tres veces de los niveles de IgE de la paciente en comparación con el suero control.

Estas diferencias entre los niveles de IgG, IgM, IgA y entre los de IgE también fueron observados por Montoro y col. (1997), cuando estudiaron a 25 pacientes diagnosticados de urticaria aguda recidivante debida a la sensibilización por *A. simplex*. Así, los diferentes niveles de anticuerpos anti-*Anisakis* observados en los diferentes pacientes frente al antígeno AK, podrían deberse a una diferente respuesta inmunitaria del hospedador dependiendo de la naturaleza de la enfermedad (gástrica o intestinal). Además, la sensibilización por *Anisakis* podría estar causada por una infección previa por la larva o por continuos contactos con las proteínas del parásito, sin la ingestión de la larva viable. En nuestro caso no conocemos el historial clínico de los pacientes utilizados en este estudio y si han estado en contacto con la larva viva, únicamente se utilizó como método de selección la medida de los valores de IgE específica determinados mediante *CAP System*, lo que podría explicar la variabilidad en los niveles de anticuerpos específicos frente a *Anisakis*.

Posteriormente dichos sueros se enfrentaron al antígeno AS y TC observándose que para la IgG y la IgM se obtuvieron valores de D.O. $\geq$ 0,2 en un 26 y 42% de los sueros, en el caso del antígeno AS y en un 37 y 52% en el caso del antígeno TC.

Es conocida la reactividad cruzada existente entre los antígenos de *Ascaris* y *Anisakis*. Iglesias y col. (1996) observaron como existe una elevada reactividad cruzada entre *A. simplex* y otros ascáridos como *H.*

aduncum, *T. canis* y *A. suum*, indicando que ningún antígeno ES o EC de *A. simplex* es óptimo para el serodiagnóstico.

En nuestros ensayos hemos observado que todos aquellos sueros (menos 3) que se mostraron positivos a nivel de la IgG frente a *Ascaris* también lo fueron cuando los enfrentamos al antígeno AK. Se ha observado como la respuesta de IgG frente al antígeno ES de *Anisakis* es rápidamente estimulada en conejos, roedores y humanos y de la misma forma ha sido observado tras la infección por *Ascaris* (O'Donnell y Mitchel, 1980).

En nuestros ensayos hemos observado como la reacción cruzada frente a *Ascaris* y *Toxocara* se mostraba más intensa a nivel de la IgM, lo que parece indicar la baja especificidad que presenta dicha inmunoglobulina. Lorenzo y col. (2000) observaron que, en pacientes sanos y alérgicos a *Anisakis*, los niveles de IgM están presentes en un 30 y 58% respectivamente y que, tras proceder a la desglicosilación del antígeno de *Anisakis*, dichos niveles descendieron a un 4,5 y 7% respectivamente, pudiéndose tratar en nuestro caso de una reacción frente a los epitopos azucarados presentes en los antígenos utilizados.

Al realizar estos ensayos también se ha puesto en evidencia la elevada reactividad cruzada que hemos observado entre el antígeno de *Ascaris* y *Toxocara* ya que, a nivel de la IgM, hemos observado que el 100% de los sueros positivos a *Ascaris* también lo fueron para *Toxocara* disminuyendo al 50% en el caso de la IgG.

Nosotros no hemos observado relación entre el valor de CAP obtenido frente a *Anisakis* y la reactividad cruzada frente a *Ascaris* y

Toxocara, es decir, no por tener un valor de *CAP* elevado resultó incrementada la reacción cruzada frente a *Ascaris* y *Toxocara*. Según Daschner y col. (2000) la cantidad de IgE específica responsable de la reactividad cruzada depende totalmente de los valores de IgE total, y que ésta varía considerablemente a lo largo de los meses tras haber padecido la reacción alérgica. Por otro lado, algunos autores han mencionado la importancia de los factores genéticos en la inducción de la respuesta inmunitaria frente a determinados antígenos.

En cuanto a la IgA, los niveles frente al antígeno EC de *Ascaris* fueron bajos, ya que hemos observado que el 13% de los sueros mostraron valores de D.O. $\geq 0,15$ y de tan sólo del 2,5% para *Toxocara*, hecho también observado en la infección natural por *Toxocara* en perros (Matsumura y Endo, 1982). Cuando se enfrentaron al antígeno PAK se produjo un descenso en el número de sueros positivos que fue más acusado a nivel de la IgG (del 60,5% al 18,5%) que de la IgM (del 60,5% al 50%).

Takahashi y col. (1986) obtuvieron dos anticuerpos monoclonales, An1 y An2 los cuales reconocen proteínas de 34 kDa y 40-42 kDa, respectivamente, demostrando más tarde que el An2 es un buen candidato para el serodiagnóstico de la anisakidosis utilizando el antígeno AK, mientras Raybourne y col. (1986) demostraron que los anticuerpos de la clase IgG, procedentes de pacientes infectados, reconocen proteínas de un rango entre 45-94 kDa, presentes en el antígeno ES de *A. simplex*. Esto se podría traducir en una reducción de los niveles de anticuerpos frente a aquellas proteínas cuya concentración se hubiera visto disminuida y que,

en el caso de la IgM, sus niveles no se vieron alterados tan intensamente lo que parece indicar de nuevo su baja especificidad, y por tanto, en nuestro caso, se pone de manifiesto que dicha inmunoglobulina no se debería tener en cuenta a la hora de realizar un posible diagnóstico de la anisakidosis.

Cuando se estudiaron los niveles de IgA, tan sólo 3 sueros mostraron valores de D.O. $\geq 0,15$. Dos de ellos también fueron positivos para *Anisakis* y el tercero, a pesar de mostrarse negativo frente a *Anisakis*, sí presentó reactividad cruzada frente a *Ascaris* y *Toxocara*. Según Akao y col. (1990) la IgA puede ser utilizada como valor de diagnóstico para la anisakidosis gástrica y sus niveles se pueden ver enmascarados cuando existen tasas elevadas de IgG, pudiéndose eliminar este problema absorbiendo el suero con proteína A procedente de *Staphylococcus aureus* antes de realizar la determinación de los niveles de IgA. En nuestro caso sí hemos observado que los mencionados sueros tenían niveles elevados de IgG con valores de D.O. superiores a 0,5 en dos de los mismos.

Cuando se enfrentaron los sueros al antígeno PAS, se observó que tan sólo 3 sueros mostraron niveles de D.O. $\geq 0,2$ a nivel de la IgG. Dos de estos sueros (CAP 5 y 6) ya habían sido positivos frente al antígeno PAK. Sin embargo, el tercero (CAP 2), no había superado el valor de 0,18 frente a los antígenos brutos de *Anisakis*, *Ascaris* y *Toxocara* y frente al antígeno PAK. Sin embargo, al enfrentarlo al antígeno PAS se obtuvieron valores de D.O. elevados (0,59). Esto parece indicar que se ha producido un aumento de las proteínas inmunogénicas capaces de desencadenar la respuesta de IgG y que, anteriormente, en los otros antígenos o bien se

encontraban en muy baja proporción o bien se debía a que podría existir una competición por epitopos presentes en proteínas poco específicas y responsables de las reacciones cruzadas entre *Ascaris* y *Toxocara* (presentes en el antígeno EAS), ya que dicho suero también fue positivo frente al antígeno EAS.

Por último, al enfrentar los sueros al antígeno EAS, el 45% fue positivo a nivel de la IgG y el 55% para la IgM. Para la IgG, estos valores superaron a los obtenidos frente al antígeno AS y TC, lo cual parece lógico ya que, en dicho antígeno EAS, se encuentran las proteínas responsables de producir reactividad cruzada frente a dichos parásitos. Todos los sueros excepto dos, que habían sido positivos a EAS también lo fueron para AK.

5.3.- Determinación de los niveles de IgE

Cuando se enfrentaron los sueros humanos al antígeno AK observamos cómo el 23,6% mostraron valores de IgE específica, expresados en D.O. $\geq 0,1$, sin embargo hubo más de un 75% de sueros en los que no detectamos niveles de IgE a pesar de mostrar valores de CAP entre 2 y 5. Cuando utilizamos la técnica de *western-blot* sobre 24 sueros SAS, los cuales poseían valores de CAP entre 2 y 4, observamos que frente al antígeno AK, el 41,6% reconoció proteínas de elevado peso molecular (≥ 84 kDa), un 37,5% proteínas alrededor de 40 kDa y tan sólo un suero reconoció la proteína de 25 kDa y otro la de 14 kDa.

Una posible causa de la baja proporción de sueros positivos, como se ha mencionado anteriormente, puede ser debida a que, como es sabido, la prueba CAP System utiliza una cantidad de antígeno muy elevada para

la detección de IgE, lo que también puede provocar un aumento de los falsos positivos al encontrarse también aumentadas las proteínas responsables de las reacciones cruzadas entre distintos parásitos y otro factor podría ser la posible competición de la IgE con la IgG por los mismos epitopos presentes en el antígeno AK, ya que en todos los sueros positivos menos en uno observamos niveles elevados de IgG. Estos problemas de baja especificidad que presenta la técnica de *CAP System*, ya habían sido comentados por otros autores (Del Pozo y col., 1996; García y col., 1997), los cuales propusieron la utilización de la técnica de *western-blot* como método de diagnóstico de los niveles de IgE en sueros, en la anisakidosis humana, debido a su mayor especificidad.

Según Daschner y col. (2000) otro factor a tener en cuenta a la hora de determinar los niveles de IgE en pacientes con sospecha clínica de anisakidosis, es el momento en el cual se realiza dicho análisis, ya que se ha observado como los niveles de la IgE total varían considerablemente en el tiempo tras la manifestación de la reacción alérgica, es decir dichos niveles de IgE sufren una disminución a medida que nos alejamos del momento del contacto con la larva, viéndose también afectados los niveles de IgE específica frente al parásito. En nuestro caso no sabemos en que momento se produjo la extracción del suero y si se ha producido un seguimiento a lo largo del tiempo de los niveles de IgE con el fin de determinar la dinámica seguida por dicha inmunoglobulina. Si bien los valores más elevados en ELISA, correspondieron a los sueros que presentaban el valor de *CAP* más elevado (*CAP*= 6), los cuales llegaron a superar valores de D.O. > 0,7.

Cuando se enfrentaron los sueros a los antígenos AS y TC hubo un mayor número de sueros que fueron positivos a *Ascaris* (29%) que a *Anisakis* (23,6%) y *Toxocara* (13%); sin embargo, en valores absolutos, los niveles fueron inferiores ya que no superaron el valor de D.O. de 0,42. Curiosamente este suero se había mostrado negativo a *Anisakis* y también lo fue para *Toxocara* a pesar de haber presentado un valor de CAP =2. De todos ellos, 3 habían sido positivos a *Anisakis* y uno también lo fue para *Toxocara*.

Al utilizar la técnica de *western-blot* observamos que, frente al antígeno AS, el 20,8% de los sueros reconocieron alguna proteína de alto y medio peso molecular, mientras que frente al antígeno TC, tan sólo 2 sueros se mostraron positivos, en donde uno de ellos reconoció una proteína de similar peso molecular en ambos antígenos (AS y TC).

Daschner y col. (2000) observaron como la cantidad de IgE total varía considerablemente a lo largo de los meses tras la aparición de la reacción alérgica y que la cantidad de IgE específica que presenta reacción cruzada con otros parásitos depende totalmente de los valores de IgE total. Nosotros no hemos observado que los sueros por tener un valor de CAP elevado (5 y 6) presenten una reacción cruzada mayor que aquellos sueros con un valor de CAP inferior, es más, los dos sueros con CAP = 6 que ensayamos, se mostraron negativos frente al antígeno EC de *Ascaris* y *Toxocara* a nivel de la IgE específica (suero 3801 y 3990) mientras que, como ya se mencionó anteriormente, el primero de ellos mostró niveles elevados de IgG (0,81) y bajos (0,2) de IgM frente al EC

de *Toxocara* y el segundo únicamente presentó niveles bajos (0,23) a nivel de la IgG frente a ambos parásitos (*Ascaris* y *Toxocara*).

Montoro y col. (1997) observaron la presencia de reactividad cruzada con el antígeno de *Ascaris* a nivel de la IgE específica y que dichos niveles se mostraron iguales o inferiores a los de IgE específica anti-*Anisakis* y que los niveles elevados de IgE específica, detectados mediante CAP, junto con niveles bajos de anticuerpos anti-*Anisakis* por ELISA, podrían detectar una reacción alérgica debido a los productos somáticos de *Anisakis*.

Otro factor a tener en cuenta a la hora de realizar la determinación de los niveles de IgE, es determinar el historial clínico del paciente con el fin de poder valorar la posible relación entre el desencadenamiento de la reacción alérgica con la posible ingesta de pescado o marisco crudo o poco cocinado, así como, la aparición de molestias gástricas. Así según Alonso y col. (1999), en pacientes con anisakidosis gastroalérgica únicamente aparecen los episodios de alergia cuando comen pescado crudo o poco cocinado, debido a que dichos pacientes se encuentran sensibilizados a los alérgenos presentes en el antígeno ES por lo que dichos pacientes no mostraron episodios alérgicos al realizarles las pruebas de provocación tras ingerir distintas cantidades de larvas de *Anisakis* liofilizadas o congeladas (Alonso y col., 1999), así como antígeno de *A. simplex* liofilizado (Sastre y col., 2000), mientras que si se tratara de pacientes previamente sensibilizados a antígenos de *Anisakis* pero no a proteínas de pescado, podrían desarrollar síntomas alérgicos tras la ingestión de pescado bien cocinado o incluso congelado y enlatado

debido a la termoestabilidad de los alergenos de *Anisakis* (Kasuya y col., 1990; Audicana y col., 1995a, 1995b; del Pozo y col., 1997; Moreno-Ancillo y col., 1997) .

Nosotros no tenemos constancia de si dichos pacientes han estado en contacto con la larva viva a nivel gástrico, y/o si les fueron extraídas alguna larva por gastroscopia, únicamente sabemos que fueron seleccionados por el Servicio de Alergia del hospital del Aire por presentar problemas alérgicos. De ser así, es posible que los niveles de IgE específica fueran superiores si la determinación hubiera sido realizada con antígeno ES. Según Sastre y col. (2000) dichos pacientes únicamente presentarían episodios de alergia cuando ingieren la larva viva debido a que los alergenos presentes en dicho antígeno ES no se encuentran en cantidad suficiente en las larvas muertas, pero sin embargo estos pacientes sí que han reconocido a las proteínas de *A. simplex* presentes en el extracto EC ya que la prueba *CAP System* utiliza este tipo de antígeno y no el ES para realizar la determinación de IgE específica.

Cuando se determinaron los niveles de IgE frente a los antígenos purificados PAK y PAS el número de sueros que se mostró positivo pasó de un 18,4% a un 31,5%, en donde se encontraban más de la mitad de los sueros que fueron positivos para *Anisakis*. Este hecho también se observó en la técnica de *western-blot*, ya que, mientras frente al antígeno PAK no se visualizaron bandas reactivas, al enfrenar los sueros al antígeno PAS, el 42% reconoció proteínas de alrededor 60 y 35 kDa. Este aumento en el reconocimiento y, por tanto, en la concentración de proteínas inmunogénicas, podría estar relacionado con los valores elevados de D.O.

observados en ELISA, que en el caso del suero 3975 (con valor de $CAP = 2$) fue superior a 0,8, mientras que para el EC de *A. simplex*, se mostró negativo. Esto indica que se ha producido una concentración importante de las proteínas responsables de producir un aumento de los niveles de IgE específica y, como resultado de ello, la aparición de los episodios alérgicos. Por último al enfrentar los sueros al antígeno EAS y mediante la técnica *western-blot* encontramos 5 sueros que reconocieron proteínas de alto y medio peso molecular de los que dos habían reconocido proteínas en el antígeno de *Ascaris* y/o *Toxocara*. También mediante la técnica de ELISA encontramos 10 sueros que presentaron valores de D.O. $\geq 0,1$, de los que el 40% había presentado reacción cruzada frente a *Ascaris* y/o *Toxocara*, lo que parece indicar, como ya se ha mencionado anteriormente que se ha producido un aislamiento y concentración de las proteínas responsables de desencadenar las reacciones cruzadas entre *Anisakis* y *Ascaris* y/o *Toxocara*, y en donde los niveles de IgE también se encuentran afectados.

5.4.- Determinación de anticuerpos por ELISA en sueros LMV con antígeno de *Anisakis simplex* purificado por cromatografía de afinidad.

Cuando se enfrentaron los sueros LMV al antígeno TC, tan sólo, el 40% fue positivo a nivel de la IgG. Como ya se ha mencionado anteriormente, estos sueros fueron diagnosticados de LMV mediante ELISA utilizando el antígeno ES larvario de *T. canis* y no EC de adulto utilizado por nosotros, por lo que podrían verse modificados los niveles

de anticuerpos al utilizar un antígeno diferente en ambas determinaciones, teniendo en cuenta que el hombre sólo entra en contacto con las larvas.

En el 65,7% detectamos IgM ($D.O. \geq 0,2$) y tan sólo 4 sueros se mostraron positivos a nivel de IgA Matsumura y Endo (1982) ya habían observado en cachorros que los niveles específicos de IgA son muy bajos en comparación con los de IgG. Un año más tarde, en 1983, Matsumura y col. (1984) aconsejaron que cuando se vaya a realizar la determinación de inmunoglobulinas minoritarias como IgA o IgE, mediante ELISA, el suero debería absorberse con el fin de eliminar la elevada cantidad de IgG, ya que se trata de la principal inmunoglobulina en suero. Sin embargo, este hecho no ha sido observado por nosotros ya que, de los cuatro sueros con niveles de IgA positivos, tan sólo en uno de ellos detectamos niveles de IgG (suero 19) los cuales fueron muy elevados ($D.O. = 0,98$), por lo que los valores de IgA observados en dicho suero ($D.O. = 0,34$), podrían verse incrementados si se produjese una absorción y/o eliminación de la IgG, siempre y cuando ambas inmunoglobulinas se encontraran compitiendo por los mismos epitopos presentes en el antígeno EC de *T. canis*.

Cuando se enfrentaron los sueros a los antígenos AK y AS observamos una reactividad cruzada casi 4 veces superior frente a *Ascaris* (77%) que frente a *Anisakis* (20%) a nivel de la IgG, lo que parece indicar que, en el antígeno de *Ascaris*, hay mayor cantidad de proteínas inmunogénicas comunes a *Toxocara*.

En nuestro caso queremos resaltar que, a pesar de que dichos pacientes fueron diagnosticados de LMV utilizando el antígeno ES de *T.*

canis, hubo un 37% más de sueros que mostraron niveles de IgG frente al EC de *Ascaris* comparado con *Toxocara*, lo que se traduce en la presencia de una elevada reactividad cruzada entre ambos antígenos, lo que hace pensar que, dicho antígeno ES, no es tan específico como algunos autores sugieren, ya que tan sólo un suero se mostró únicamente positivo a *Toxocara*, es decir, no se detectaron niveles de IgG D.O. > 0,18 frente al EC de *Anisakis* ni de *Ascaris*.

Cuando se midieron los niveles de IgM observamos el efecto contrario a lo detectado a nivel de la IgG, es decir la reactividad cruzada fue superior frente al EC de *Anisakis* (88,5%) que frente a *Ascaris* (65,7%).

Al realizar la valoración de los antígenos purificados PAK y PAS, observamos un elevado descenso en el número de sueros que fueron positivos a nivel de IgG (uno frente al antígeno PAK y dos frente el antígeno PAS), siendo los niveles de D.O. inferiores a 0,34. Por el contrario, este proceso de purificación no afectó a los niveles de IgM ya que, para ambos antígenos PAK y PAS, continuaron siendo muy elevados (68,5% y 60,5% respectivamente). Por último, al realizar la valoración del antígeno EAS, únicamente se observaron 2 sueros positivos (28 y 31) los cuales, anteriormente, ya habían mostrado niveles elevados de IgG frente al EC de *Ascaris* (D.O. de 0,43 y 0,65, respectivamente). Los niveles de IgM continuaron siendo elevados, incluso aumentaron afectando a un 77% de los sueros, no encontrando, por el contrario, ningún suero positivo a nivel de la IgA.

Al realizar la detección de IgE específica frente a su antígeno homólogo (EC de *T. canis*), observamos que tan sólo dos sueros (24 y 25) se mostraron positivos ($D.O. \geq 0,1$) presentando niveles elevados de IgE específica ($D.O.$ de 0,54 y 0,39, respectivamente).

Algunos investigadores han puesto de manifiesto la capacidad de las larvas de *T. canis* para inducir niveles elevados de IgE, siendo sólo una pequeña fracción de la misma específica frente al parásito (Jarret y Mackenzie., 1980), lo que podría explicar los bajos niveles detectados en los sueros ensayados.

Frente a los antígenos AK y AS, únicamente 4 sueros presentaron reactividad cruzada frente a *Anisakis* siendo sus niveles bajos ($D.O. \leq 0,13$) y otros 4 frente a *Ascaris*, en donde dos de ellos, también fueron positivos frente a *Anisakis* y *Toxocara*, lo que parece indicar que cuanto más cantidad de IgE específica se detecte en un suero aumenta la probabilidad de la aparición de reacciones cruzadas entre estos parásitos.

Cuando se valoraron los antígenos purificados PAK y PAS, únicamente encontramos 2 sueros positivos frente a PAS los cuales a su vez se habían comportado como negativos frente a todos los antígenos anteriormente ensayados. Los resultados obtenidos indican que en el proceso de purificación del antígeno EC de *A. simplex* se ha producido la eliminación de las proteínas responsables de desencadenar las reacciones cruzadas entre *Anisakis*, *Ascaris* y *Toxocara*.

5.5.- Cálculo de la sensibilidad y especificidad de los antígenos AK, PAK y PAS.

Uno de los aspectos fundamentales a la hora de realizar un correcto inmunodiagnóstico de cualquier enfermedad se basa en la elección de antígenos adecuados a la hora de realizar la prueba diagnóstica, lo que implica que posean tanto una elevada sensibilidad como especificidad. Ambos parámetros nos van a poner de manifiesto el porcentaje de pacientes enfermos que dan el test diagnóstico positivo como aquellos individuos sanos, que no padeciendo la enfermedad, se muestren negativos.

En primer lugar, para calcular ambos parámetros de sensibilidad y especificidad, hay que tomar como referencia el llamado “patrón de oro” el cual nos dará una evaluación de la exactitud de la prueba diagnóstica basándose en el hecho de que la supuesta enfermedad valorada, está verdaderamente presente o ausente en los pacientes seleccionados para realizar el estudio. En nuestro caso hemos escogido como “patrón de oro” el valor de *CAP* que, aunque no resulta muy fiable como método diagnóstico, es el parámetro que ha sido utilizado por el personal sanitario, a la hora de realizar la elección de los sueros de los pacientes que probablemente presentaban una sensibilización a *A. simplex*.

La determinación de la sensibilidad y especificidad la realizamos tanto sobre el antígeno AK como de los purificados PAK y PAS, con el fin de observar las posibles variaciones que se presentan a lo largo del proceso de purificación.

Cuando se utilizó el antígeno AK, observamos una variación de la sensibilidad y la especificidad en función de la inmunoglobulina detectada al realizar dicha determinación. Así, para un mismo punto de

corte de D.O. de 0,15, la sensibilidad variaba desde valores de alrededor del 83% para la IgG hasta tan sólo del 20,7% para la IgA, lo que pone de manifiesto que el inmunodiagnóstico de la anisakidosis resulta particularmente dificultoso, si únicamente tenemos en cuenta los niveles de una determinada inmunoglobulina.

Desde nuestro punto de vista hemos creído que resultaría más preciso a la hora de realizar el inmunodiagnóstico por ELISA, enfrentar primeramente los sueros de los posibles pacientes, al antígeno AK y posteriormente realizar una segunda determinación enfrentándolos a los antígenos PAK y PAS y, en función de los resultados obtenidos, emitir un posible diagnóstico.

Esto no implicaría prácticamente ningún gasto económico adicional ni más tiempo, ya que se requiere el mismo tiempo para realizar un test que los 3 a la vez. Por ello, decidimos tomar como primera referencia el punto de corte de D.O. $\geq 0,15$ para la IgG, ya que fue esta inmunoglobulina la que presentó una sensibilidad mayor (82,7%) y al encontrarnos en las primeras fases de la investigación diagnóstica las pruebas sensibles son las que muestran una mayor utilidad (Fletcher y col., 1998). Cuando aplicamos este parámetro, tal y como se observa en la tabla adjunta, el 70% de los sueros dieron el test positivo, a pesar de que todos ellos, menos uno, mostraban valores de $CAP \geq 2$. Lorenzo y col. (2000) al valorar distintas técnicas inmunológicas en el diagnóstico de la alergia frente a *Anisakis* encontraron un 50% de especificidad en esta técnica.

La segunda determinación se realizó utilizando el antígeno purificado PAK, tomándose como punto de corte el valor de D.O. $\geq 0,07$ para la IgG. Este valor fue seleccionado ya que al encontrarnos en mitad de la investigación diagnóstica, presentaba un valor medio de especificidad y sensibilidad (58,6 y 54,5 %, respectivamente). Cuando valoramos todos los sueros ensayados observamos un descenso del 20% en los sueros que se mostraban positivos, apareciendo tan sólo dos sueros que anteriormente habían sido negativos frente al antígeno EC de *A. simplex*.

Esto parece lógico ya que, para el antígeno EC de *A. simplex*, aunque el valor predictivo era alto (80%), siempre queda una probabilidad (alrededor del 20% o lo que es lo mismo seis sueros), de encontrarnos con falsos positivos. En nuestro caso el descenso fue superior en dos sueros ya que pasamos de tener 28 sueros positivos para el EC de *A. simplex* a 20 frente al antígeno PAK. Por último, al realizar la determinación del antígeno PAS escogimos el punto de corte de D.O. $\geq 0,05$ para la IgA, ya que ésta era la inmunoglobulina que mostraba una mayor especificidad (81,8%) y un valor predictivo positivo más elevado (88,9%). Otro factor en el cual nos basamos a la hora de seleccionar dicha inmunoglobulina y no la IgE, es la pequeña cantidad de muestra sérica necesaria a la hora de realizar el ELISA. Para realizar la determinación de IgE necesitamos alrededor de 200 μl de suero, y muchas veces no se precisa de tal cantidad, frente a tan sólo 1 μl necesario para la IgA. Al aplicar estos parámetros nos encontramos, tal y como se muestra en la tabla, que tan sólo 7 sueros se mostraban positivos y todos ellos también lo habían sido

PACIENTE	AK IgG $\geq 0,15$	PAK IgG $\geq 0,07$	PAS IgA $\geq 0,05$
2936/2			
3056/3	*	*	
3423/3	*		
3461/3	*	*	
3475/3	*	*	
3500/3			
3524/3	*	*	*
3530/2	*		
3544/3	*		
3604/3			
3619/3	*	*	*
3638/4			
3679/5			
3720/1	*	*	
3755/2	*		
3782/3	*	*	*
3801/6	*	*	
3807/2	*		
3837/2	*	*	*
3857/3	*	*	
3866/5	*		
3878/3	*	*	
3883/2			
3884/3	*	*	
3903/3	*		
3906/4	*	*	
3913/2			
3914/3	*		
3938/3	*		
3949/3	*		
3975/2		*	
3990/6	*	*	*
4009/4	*	*	*
4016/3	*	*	*
4118/4			
4153//2	*	*	
4159/5	*	*	
4189/2		*	
TOTAL	28	20	7

anteriormente frente al antígeno AK y PAK.

Un factor importante a mencionar a la hora de valorar la especificidad y sensibilidad de los diferentes antígenos es la elección del supuesto “patrón de oro”, ya que si dicho patrón no es muy exacto en su validez, la nueva prueba que se está valorando quizá rinda aparentemente mejor que la estándar y parecerá inferior a ésta, aunque se aproxime más exactamente a la certidumbre.

Tabla 2.- Sueros humanos positivos (*) frente al antígeno AK, PAK y PAS frente a los distintos puntos de corte seleccionados.

5.6.- Determinación de anticuerpos por *Western-blot* en sueros SAS con antígeno de *Anisakis simplex* purificado por cromatografía de afinidad.

Cuando se enfrentaron los 24 sueros humanos procedentes del Servicio de Alergia del Hospital del Aire de Madrid a su antígeno homólogo (antígeno AK), un 71% reconoció proteínas entre 209-134 kDa. Lorenzo y col. (2000) al realizar la técnica de ELISA captura con el anticuerpo monoclonal UA3 que reconoce proteínas de 139 y 154 kDa, observaron reacción positiva IgG1 e IgE, en sueros de pacientes alérgicos a *Anisakis* en un 92% y 100%, respectivamente. La desglicosilación de estas proteínas no afectó al resultado, mientras que supuso la desaparición de las reacciones inespecíficas provocadas por los epitopos azucarados presentes en el antígeno de *A. simplex*.

En el 100% de los sueros estudiados por nosotros hubo reconocimiento de la proteína de 60 kDa por parte de las Ig's, la IgM y la IgG, siendo la respuesta más intensa a nivel de las dos primeras. Akao y col. (1990) observaron que 9 pacientes diagnosticados de anisakiosis gástrica reaccionaron proteínas distribuidas entre 50 y 120 kDa. Nakata y col. (1990) analizaron mediante *immunoblot* distintos antígenos reconocidos por anticuerpos presentes en sueros de pacientes diagnosticados de anisakidosis gastrointestinal aguda, observando que la IgG reconocía proteínas de 91, 76, 64, y 60 kDa. Según estos autores las proteínas de 76, 64 y 60 kDa son específicas de *Anisakis* ya que no observaron inmunorreconocimiento de proteínas de peso molecular similar en homogenados de *A. suum*. Estos anticuerpos reaccionaron

también frente al antígeno ES de *Anisakis*, donde se encuentran proteínas específicas de 76 y 60 kDa.

También observamos que el 37,5% de los sueros ensayados reconocieron la proteína de 40 kDa y el 12% la de 25 kDa con la IgG, coincidiendo para esta última proteína con los sueros de mayor valor de CAP (dos sueros con CAP = 5 y un suero con CAP = 6).

Al revisar la bibliografía acerca del diagnóstico de la anisakidosis humana hemos observado que en la mayoría de *immunoblotting* realizados en pacientes con hipersensibilidad a *Anisakis* se visualizan múltiples bandas (del Pozo y col., 1996), sin embargo, otros autores, como Daschner y col. (1997), observaron tan solo una banda de 17 kDa reconocida por IgE en un paciente aquejado de anisakidosis gastroalérgica, pudiéndose haber inducido una respuesta de tipo IgE con anterioridad a la estimulación policlonal típica que provocan los parásitos.

Según estos autores, una causa de la pequeña proporción de sueros que reconocen proteínas de bajo peso molecular podría estar asociada con el momento en el cual se produjo la extracción del suero, modificándose las proteínas que estimulan la respuesta.

Al estudiar la presencia de reacciones cruzadas en *western-blot* observamos que todos los sueros reconocieron proteínas presentes en el antígeno TC, siendo esta reacción más intensa que frente a *A. suum*. Así, 1/3 de los sueros, reconocieron un triplete entre 84-40 kDa en el antígeno TC, un 30% reconoció una proteína de 84 kDa, el 41,5% reconocieron la proteína de 32 kDa y el 33% la de aproximadamente 25 kDa. La reactividad cruzada fue menor frente al antígeno AS que frente al de TC,

ya que sólo en el 50% de los sueros ensayados se produjo reacción a nivel de un doblete superior a 40 kDa, tanto con Ig's, IgG e IgM y en 1/3 de los sueros, también con la IgA. El 16% reconoció bandas de 60 kDa al medir la respuesta de Ig's e IgG. Un 29% reconoció una banda de 25 kDa tanto con Ig's como IgG y, solamente, el 4% reaccionó con la proteína de 35 kDa. Cuando valoramos el antígeno PAK, se produjo un aumento del reconocimiento hacia las fracciones peptídicas de 60, 40 y 25 kDa en un 83%, 16% y 4% respectivamente, mientras que en un 54% desapareció la reacción con proteínas de elevado peso molecular.

Al realizar la valoración de este antígeno mediante la técnica de ELISA, observamos un descenso en el número de sueros positivos que fue más acusado a nivel de la IgG (del 60,5% al 18,5%) que de la IgM (del 60,5% al 50%). Este hecho también fue observado por *western-blot*, ya que aparecieron bandas fuertemente marcadas en mayor proporción frente a las Ig's e IgM, siendo esto más acusado en aquellos sueros donde la respuesta era más débil frente al antígeno AK, los cuales a su vez poseían los menores valores de CAP (clase 2 y 3). Esto parece indicar que, desde el punto de vista diagnóstico, el hecho de que estos sueros muestren bajos niveles de Ig's y IgM frente al antígeno AK, no es excluyente a la hora de descartar una posible sensibilización frente a *Anisakis*, ya que, a pesar de ello, una posterior valoración mediante la técnica de *western-blot* frente al antígeno PAK podría revelar la presencia de proteínas inmunorreactivas, las cuales habrían pasado inadvertidas frente al antígeno AK debido a su baja concentración.

En el antígeno PAS aumentó el reconocimiento hacia las proteínas de 60, 40, 25 y 30-35 kDa, en un 79%, 45,8%, 25% y 25%, respectivamente. Arrieta y col. (2000) clonaron una proteína de *A. simplex* que posee un peso molecular de aproximadamente 21 kDa y que es reconocida por el 20% de los pacientes alérgicos, pudiendo existir una relación entre dichas proteínas y la banda de aproximadamente 25 kDa observada por nosotros.

Por último, frente al antígeno EAS, observamos reacción a nivel de una proteína de aproximadamente 14 kDa en 10 de los 12 sueros ensayados. El elevado reconocimiento de dicha proteína indica que tras la purificación del antígeno AK, hemos conseguido concentrar la proteína de 14 kDa en el antígeno EAS, sin que su antigenicidad se haya visto alterada.

5.7.- Evaluación mediante prueba cutánea (*prick test*) del antígeno de *Anisakis simplex* purificado por cromatografía de afinidad en pacientes diagnosticados de sensibilización a *Anisakis*.

Tras la administración del extracto comercial de *A. simplex* se observó que el 30% de los pacientes seleccionados no mostraban reactividad alguna mediante *prick test*. Todos estos pacientes mostraban síntomas intestinales, y 3 de ellos, eran también polínicos. Dos pacientes mostraron un tamaño de pápula mayor al producido por la histamina con el extracto comercial de *A. simplex* de laboratorios ALK ABELLÓ (antígeno AKABELLO) y, únicamente, un caso de $CAP = 6$ con el de los laboratorios I.P.I. (antígeno AKIPI). Los otros pacientes tenían urticaria crónica, prueba cutánea negativa a neumoalergenos y $CAP = 3$.

Al estudiar la reacción cruzada con *A. suum*, observamos que sólo el 35% de los pacientes dieron positivo. En ellos se observaron los siguientes datos de interés: el paciente número 7 también presentaba alergia a pescado, marisco y frutos secos, los pacientes 15 y 19 acudieron a consulta por dolor abdominal tras la ingesta de boquerones y presentaban valores de $CAP = 5$ y, por último, los pacientes 6 y 17 tenían urticaria crónica, prueba cutánea negativa a neumoalergenos y $CAP = 3$ por FEIA. En el 57% de los pacientes (números 5, 15, 18 y 19) estas reacciones fueron inferiores que las obtenidas con el extracto AKIPI, mientras que en el 28,5% de los mismos fueron superiores (pacientes 6 y 17). Todos los pacientes que habían sido positivos para el EC de *A. simplex*, excepto un paciente polínico, también lo fueron frente a los 2 antígenos PAK y PAS, mientras que el 30% se mostró negativo a todos los antígenos ensayados. Cuando se estudió mediante SDS-PAGE el patrón antigénico del EC de *A. simplex* observamos diferentes proteínas de 205, 120, 66-45, 40, 31-21 y 14 kDa, las cuales se mantenían cuando el antígeno se purificó a través de la columna de IgG de conejo anti-*A. simplex* pero en diferentes proporciones, pudiendo ser estas proteínas las responsables de producir un descenso en el tamaño de la pápula producido por el antígeno PAK.

El 43% de los pacientes positivos mostraron una reacción mayor con el antígeno PAK que con el PAS (pacientes 1, 6, 10, 15, 17 y 19). Los pacientes número 6 y 17 presentaban urticaria crónica, prueba cutánea negativa para neumoalergenos y $CAP = 3$ a *Anisakis*, mientras que los pacientes 15 y 19 presentaban abdomen agudo tras la ingestión de

boquerones y valores de $CAP = 5$. El 36% mostró reacción mayor con el antígeno PAS que la observada con el antígeno PAK, incluyendo en este grupo a un paciente que presentaba apendicitis con urticaria, siendo también positivo mediante prueba cutánea a *Lolium*, *Phleum*, *Olea* y *Platanus* y con valores de $CAP=3$ obtenidos al medir IgE específica frente a *Anisakis* mediante FEIA. El 14% mostró las mismas reacciones y el 7% fue negativo frente a ambos antígenos purificados. En 5 pacientes el tamaño de la pápula producido por el antígeno PAS fue mayor que el producido por el antígeno PAK, lo que podría indicar, que para estos pacientes, se ha producido una concentración de las proteínas responsables de desencadenar un aumento de los niveles de IgE. Por el contrario, en 6 pacientes el tamaño de las pápulas fue menor, debido probablemente a la eliminación de las proteínas responsables de la reacción cruzada con *Ascaris* (presentes en el antígeno EAS). Este hecho se comprobó debido a que sólo 1 de estos 6 pacientes (paciente número 1) no mostró reacción con el antígeno EAS, siendo el mismo en el que se produjo un menor incremento (sólo el 7%) en el tamaño de la pápula producido por el antígeno PAK comparado con el antígeno PAS, no tratándose de una reacción cruzada. Cuatro pacientes de los 6 que mostraron un tamaño de pápula producido por el antígeno PAK mayor que con el antígeno PAS, fueron también positivos frente al antígeno AS, siendo el tamaño de pápula mayor o igual al 20% considerando el 100% la reacción producida por la histamina. Por otro lado el paciente número 10 no reaccionó con el antígeno AS, siendo, sin embargo, positivo frente al antígeno EAS, debido probablemente a una reacción cruzada con

diferentes proteínas presentes en dicho antígeno. En 5 pacientes el tamaño de pápula producido tras la administración del antígeno PAS fue mayor que la producida por el antígeno PAK. Este incremento podría ser debido a una concentración de las proteínas responsables de desencadenar la reacción alérgica, las cuales habrían producido un incremento en el tamaño de pápula superior al 38% producido por el antígeno PAS en el paciente 5, quién además tenía un $CAP = 6$ frente a *Anisakis*. Los mayores tamaños de pápulas producidos por el antígeno PAS se observaron en los pacientes 5 y 16 (con un 86% y un 68%, respectivamente, en comparación con la histamina). Estos pacientes coincidieron también con aquellos en donde se observó el mayor tamaño de pápula cuando el extracto EC de *A. simplex* fue administrado siendo éste de alrededor del 96%. Estos hechos confirman que el proceso de purificación del antígeno larvario de *A. simplex* por cromatografía de afinidad utilizando suero de conejos inmunizados produce la eliminación de los epitopos antigénicos responsables de la reactividad cruzada entre los ascáridos y la producción de falsos positivos en el diagnóstico de la sensibilización producida por *A. simplex*.

6.- CONCLUSIONES

1.- La purificación del antígeno total larvario de *A. simplex* mediante su elución a partir de una columna de IgG anti-*A. simplex* y posterior filtrado por una columna de IgG anti-*A. suum* (antígeno PAS) produce un aumento de las proteínas inmunogénicas capaces de desencadenar la respuesta IgG evitando, además, la competición por epitopos presentes en

proteínas poco específicas y responsables de las reacciones cruzadas con *Ascaris* y *Toxocara*.

2.- En el antígeno PAK (eluído de una columna anti-*A. simplex*) se concentran las proteínas de 60, 40 y 25 kDa, con aumento del reconocimiento de los sueros hacia estas fracciones y disminución de la reacción con proteínas de alto peso molecular, propiedades que se encuentran aumentadas en el antígeno PAS (eluído de la columna de IgG anti-*A. simplex* y filtrado por la columna anti-*A. suum*).

3.- La proteína de 14 kDa, principal responsable de las reacciones cruzadas entre *Anisakis*, *Ascaris* y *Toxocara* se concentra en el antígeno EAS (eluído de una columna de IgG anti-*A. suum*), eliminándose del antígeno PAS los epitopos antigénicos responsables de la reactividad cruzada entre los ascáridos y la producción de falsos positivos en el diagnóstico de la sensibilización producida por *A. simplex* junto con una concentración importante de las proteínas responsables de inducir un aumento de IgE específica.

7.- BIBLIOGRAFIA

Akao N, Ohyama T, Kondo K. (1990). Immunoblot analysis of serum IgG, IgA and IgE responses against larval excretory-secretory antigens of *Anisakis simplex* in patients with gastric anisakiasis. J Helminthol. 64: 310-318.

Alonso A, Moreno A, Daschner A, López C. (1999). Dietary assessment in five cases of allergic reactions due to gastroallergic anisakiasis. Allergy. 54: 517-520.

Arrieta I, del Barrio M, Vidarte L, del Pozo V, Pastor C, González J, Cardaba B, Rojo M, Minguez A, Cortegano I, Gallardo S, Aceituno E, Palomino P, Vivanco F, Lahoz C. (2000). Molecular cloning and characterization of an IgE-reactive protein from *Anisakis simplex*: ani s 1. Mol Biochem Parasitol. 15: 263-268.

Audicana M, Fernández de Corres L, Muñoz ND, Fernández E, Navarro JA, del Pozo MD (1995). Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex*. J Allergy Clin Immunol. 96: 558-560.

Christie JF, Dunbar B, Davidson I, Kennedy MW (1990). N-terminal amino acid sequence identity between a major allergen of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*, and MHC-restricted IgE responses to it. Immunology. 69: 596-602.

Christie JF, Dunbar B, Kennedy MW. (1993). The ABA-1 allergen of the nematode *Ascaris suum*: epitope stability, mass spectrometry, and N-terminal sequence comparison with its homologue in *Toxocara canis*. Clin Exp Immunol. 92: 125-132.

Daschner A, Alonso G, Cabañas R, Suarez J, López C (2000a). Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease: allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. J Allergy Clin Immunol. 105: 176-181.

Daschner A, Alonso-Gómez A y López Serrano C. (2000b). What dose *Anisakis simplex* parasitism in gastro-allergic Anisakiasis teach us about interpreting specific and total IgE values? Allergol Immunopathol. 28: 67-70.

Del Pozo MD, Moneo I, Fernández L, Audicana MT, Muñoz D, Fernández E, Navarro JZ, García M (1996). Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy. J Allergy Clin Immunol . 97: 977-984.

Del Pozo MD, Audicana M, Díez J, Muñoz D, Ansotegui I, Fernández E, García M, Etxenagusia M, Moneo I, Fernández L (1997). *Anisakis simplex*, a relevant etiologic factor in acute urticaria. Allergy . 52: 576-579.

Desowitz ES, Rudoy R, Barnwell JW. (1981). Antibodies to canine helminth parasites in asthmatic and nonasthmatic children. Int Arch Allergy Appl Immunol. 65: 361-366.

Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. (1998). Epidemiología clínica. Aspectos fundamentales. Masson-Williams & Wilkins.

Fraj J, Remacha B, Colas C, Ortega A, Lezaun A. (1998). *Anisakis*, anisakiasis and IgE-mediated immunity to *Anisakis simplex*. J Investig Allergol Clin Immunol. 8: 61-63.

García M, Moneo I, Audicana T, Del Pozo MD, Muñoz D, Fernández E, Díez J, Etxenagusia A. (1997). The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. J Allergy Clin Immunol. 99: 497-501.

Glickman LT, Schantz PM. (1981). Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. Epidemiol Rev. 3: 230-250.

Guillén JL, Cuéllar C, del Águila C. (1986). Fotodependencia del desarrollo embrionario de *Toxocara canis* (Werner, 1782). Stiles, 1905. Rev Ibér Parasitol .46: 67-74.

Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM, Santamarina MT, Navarrete I, Sanmartín ML. (1996). Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. Parasitol Res. 82: 378-381.

Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM, Santamarin **Josephs DS**, Bhinder P, Thompson. (1981). The prevalence of *Toxocara* infection in a child population. Public Health. 95: 273-275.

Ishikura H. (1990). Clinical features of intestinal anisakiasis. (Ishikura H, Kikuchi K.). Intestinal anisakiasis in Japan. Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. Springer. Tokyo Berlin Heidelberg New York.

Ishikura H, Kikuchi K, Nagasawa K, Iowa T, Takamiya H, Sato N, Sugane K. Anisakidae and Anisakiosis. En: Sun T, ed. Progress in Clinical Parasitology. Nueva York: Springer-Verlag, 1993; 43-102.

Jarret E, Mackenzie S. (1980). Parasite-induced "nonspecific" IgE does not protect against allergic reactions. Nature. 383: 302-304.

Kasuya S, Hamano H, Izumi S. (1990). Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*. Lancet. 335: 665.

Kato Y, Komatsu S. (1996). ASABF, a novel cysteine-rich antibacterial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. Purification, primary

structure, and molecular cloning of cDNA. J Biol Chem. 271: 30493-30498.

Kennedy MW, Tierney J, Ye P, McMoanagle FA, McIntosh A, McLaughlin D, Smith JW. (1988). The secreted and somatic antigens of the third stage larva of *Anisakis simplex*, and antigenic relationship with *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, and *Toxocara canis*. Mol Biochem Parasitol. 31: 35-46.

Kennedy MW, Qureshi F, Fraser EM, Haswell-Elkins MR, Elkins OB, Smith HV. (1989). Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* and *Toxocara canis*. Clin Exp Immunol. 75: 493-500.

Lorenzo S, Romaris F, Iglesias R, Audicana T, Alonso J, Leiro J, Ubeira F. (2000). O-glycans as a source of cross-reactivity in determinations of human serum antibodies to *Anisakis simplex* antigens. Clin Exp Allergy. 30: 551-559.

Matsumura K, Endo R. (1982). Investigation of antibodies against *Toxocara canis* in naturally infected puppies. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A. 255: 402-405.

Matsumura K, Kazuta Y, Endo R, Tanaka K. (1984). Detection of circulating toxocaral antigens in dogs by sandwich enzyme-immunoassay. Immunology. 51: 609-613.

Montoro A, Perteguer MJ, Chivato T, Laguna R, Cuéllar C. (1997). Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*. Allergy. 52: 985-991.

Moreno A, Caballero T, Cabañas R, Contreras J, Martín J, Barranco P, López C. (1997). Allergic reactions to *Anisakis simplex* parasitizing seafood. Ann Allergy Asthma Immunol. 79: 246-50.

Nakata H, Yamamoto Y, Yamamoto Y. (1990). Analysis of antigens defined by anti-*Anisakis* larvae antibodies of IgE and IgG type in the sera of patients with acute gastrointestinal anisakiasis. Nipp Shok Gak Zas. 87: 762-770.

O'Donnell IJ, Mitchell GF. (1980). An investigation of the antigens of *Ascaris lumbricoides* using a radioimmunoassay and sera of naturally infected humans. Int. Arch Allergy Appl Immunol. 61: 213-219.

Ohtaki H, Ohtaki, R. (1989). Clinical manifestation of gastric anisakiasis. Gastric anisakiasis in Japan, epidemiology, diagnosis, treatment (Ishikura H, Namiki M.). Springer-Verlag Ltd: Tokyo.

Pascual CY, Crespo JF, Sanmartín S, Ornia N, Ortega N, Caballero T, Muñoz M, Martín M. (1997). Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis*, German cockroach, and chironomids. Allergy. 52: 514-520.

Perteguer MJ, Raposo R, Cuéllar C. (1996). *In vitro* study on the effect of larval excretory/secretory products and crude extracts from *Anisakis simplex* on blood coagulation. Int J Parasitol. 26: 105-108.

Perteguer MJ, Cuéllar C. (1998). Isotype-specific immune responses in murine experimental anisakiasis. *J Vet Medic.* 45: 603-610.

Poggensee U, Schommer G, Jansen-Rosseck R, Feldmeier H. (1989). Immunodiagnosis of human anisakiasis by use of larval excretory-secretory antigen. *Zent Bakt Mikr Hyg.* 270: 503-510.

Raybourne R, Deardorff TL, Bier JW. (1986). *Anisakis simplex*: Larval excretory secretory protein production and cytostatic action in mammalian cell cultures. *Exp Parasitol.* 62: 92-97.

Sakanari JA, Loinaz M, Deardorff TL, Raybourne RB, McKerrow JH, Frierson JG. (1988). Intestinal anisakiasis. A case diagnosed by morphologica and immunologic methods. *Am J Clin Pathol.* 90: 107-113.

Sakanari JA, McKerrow JH. (1989). Anisakiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2: 278-284.

Sastre J, Lluch M, Quirce S, Arrieta I, Lahoz C, del Amo A, Fernández E, Marañón F. (2000). A double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite, *Anisakis simplex*. *Allergy.* 55: 560-564.

Soares ME, Mota I, Macedo MS. (1992). Isolation of *Ascaris suum* components which suppress IgE antibody responses. *Int Arch Allergy Immunol.* 97: 37-43.

Su X, Prestwood A.K (1990). Isolation of *Trichinella*-specific antigens for diagnosis by gradient monoclonal antibody affinity chromatography. *J Parasitol.* 76: 842-848.

Sugane K, Oshima T. (1983). Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* infective larvae. Immunology. 50; 113-120.

Takahashi S, Ishikura H, Hayasaka H. (1986). Establishment of monoclonal antibodies that discriminate the antigen distribution specifically found in *Anisakis* larvae type I. J Parasitol. 72: 960-962.

Van Knapen F, Van Leusden J, Polderman AM, Franchimont JH. (1983). Visceral larva migrans: examination by means of enzyme-linked immunosorbent assay of human sera for antibodies to excretory-secretory antigens of the second-stage larvae of *Toxocara canis*. Z Parasitenkd. 69: 113-118.

Welch JS, Symons MH, Dobson C. (1983). Immunodiagnosis of parasitic zoonoses: purification of *Toxocara canis* antigens by affinity chromatography. Int J Parasitol. 13: 171-178

Yagihashi A, Sato N, Takahashi S, Ishikura H, Kondo A, Okubo M, Torimoto K, Hayasaka H, Kikuchi K. (1989). Establishment of a serodiagnostic assay system for anisakiasis using a monoclonal antibody specific for *Anisakis* larval antigen. J Clin Exp Med. 148: 213-214.

Yagihashi A, Sato N, Takahashi S, Ishikura H, Kikuchi K. (1990). A serodiagnostic assay by microenzyme-linked immunosorbent assay for human anisakiasis using a monoclonal antibody specific for *Anisakis simplex* larvae antigen. J Infec Dis. 161: 995-998.

Yahiro S, Cain G, Butler JE. (1998). Identification, characterization and expression of *Toxocara canis* nematode polyprotein allergen TBA-1. Parasite Immunol. 20: 351-357.

8.- ABREVIATURAS

Antígeno AK: antígeno total larvario de *Anisakis simplex*.

Antígeno AS: antígeno de adultos de *Ascaris suum*.

Antígeno TC: antígeno de adultos de *Toxocara canis*.

Antígeno PAK: antígeno total larvario de *Anisakis simplex* eluído después de pasarlo por una columna de IgG de conejos inmunizados con antígeno AK.

Antígeno PAS: Corresponde a las proteínas del antígeno PAK no fijadas, después de pasarlo por una columna de IgG de conejos inmunizados con antígeno AS.

Antígeno EAS: Corresponde a las proteínas del antígeno PAK fijadas y eluídas, después de pasarlo por una columna de IgG de conejos inmunizados con antígeno AS.

Sueros SAS: sueros humanos diagnosticados de sensibilización a *Anisakis*

Sueros LMV: sueros humanos diagnosticados de larva migratoria visceral.