

**Documentos Técnicos
de Saúde Pública**

Serie B. Nº 24



ANISAQUIOSIS Y ALERGIA

Un estudio seroepidemiológico en
la Comunidad Autónoma Gallega

6. EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Hasta el momento, los casos de anisakirosis humana descritos en el mundo (Tabla 4) constituyen aproximadamente el 97% del total de casos de anisakidosis registrados. El 3% restante está formado casi exclusivamente por casos de pseudoterranovosis, diagnosticados en su mayoría en Japón y EEUU. La anisakidosis, lógicamente, es especialmente común entre la población japonesa, en la cual se registran más de 2000 parasitaciones por año. En realidad, el número total de casos denunciados en Japón (alrededor de 13000) constituye cerca del 95% de los casos mundiales. En EEUU y en Europa la enfermedad es menos común: hasta la fecha se han notificado más de 50 casos (aproximadamente 10 por año) en EEUU y más de 500 en Europa, donde la mayor parte de los casos corresponden a Holanda, Alemania, Francia y España. En concreto, en nuestro país se han denunciado, en los últimos 8 años, 60 casos de anisakidosis (59 de anisakirosis y 1 de pseudoterranovosis), todos ellos confirmados por el hallazgo de la larva o de restos de ella en las lesiones. Esta cifra de 60 casos, sin embargo, no incluye aquellos que se atribuyen sólo a alergia causada por los antígenos del parásito y que suponen un número considerable (varios centenares).

Teniendo en cuenta la localización de las lesiones de los casos descritos en Japón, la forma gástrica (95% de los casos) es más frecuente que las formas intestinal (casi el 5% restante) y extragastrointestinal (117 casos), mientras que en Europa ocurre todo lo contrario (92% de la forma intestinal frente a 8% de la gástrica). Estas diferencias podrían ser debidas, principalmente, al uso habitual de las técnicas endoscópicas por parte de los médicos japoneses, quienes además, disponen de mayor experiencia a la hora de identificar las larvas en las lesiones gástricas. A este respecto, hay que decir que, previamente al desarrollo de estas técnicas, la proporción entre casos gástricos y casos intestinales en Japón era de aproximadamente 2:1. Desde la aparición de la endoscopia hasta la actualidad, la proporción ha variado hasta alcanzar casi un 20:1. Los casos descritos en nuestro país corresponden a 30 casos de parasitación gástrica (1 de ellos debido a *P. decipiens*), 27 intestinal (principalmente en íleon) y 3 extragastrointestinales (cavidad abdominal y hernia epigástrica).

Como ha sido apuntado previamente, la transmisión de la anisakidosis está íntimamente ligada a determinadas prácticas culinarias cuya base principal es el pescado (también calamares) crudo, ligeramente curado y/o condimentado. El *sushi* y el *sashimi* japoneses, los arenques salados o escabechados típicos de Holanda, el *gravlax* nórdico, el *lomi-lomi* hawaiano y el *cebiche* sudamericano, son claros ejemplos de estas prácticas y, por lo tanto, están o podrían estar implicadas en la transmisión de la anisakidosis. Además de los peces y calamares, determinados moluscos (mejillones, ostras, etc.) y crustáceos (langosta, cigalas, etc.) han sido considerados también posibles transmisores; a pesar de ello, las larvas de anisakídeos no han sido nunca encontradas parasitando estos animales.

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en Japón revelan que la enfermedad suele afectar a habitantes de zonas costeras, normalmente relacionadas con la industria de la pesca. En cuanto al sexo y a la edad de los pacientes, los varones de edades comprendidas entre 20 y 50 años parecen los más afectados, probablemente, por la frecuencia con que éstos ingieren pescado crudo. En general, la caballa (*Scomber japonicus*) y, en menor medida, el calamar (*Todarodes pacificus*) han sido identifica-

País	Nº de casos
Alemania	91
Bélgica	10
Dinamarca	1
España	60*
Francia	65
Gran Bretaña	9
Holanda	292
Italia	3
Noruega	6
Polonia	5
Suecia	3
Subtotal	545
Brasil	2
Canadá	3
Chile	5
EEUU	50
Groenlandia	1
Subtotal	61
Nueva Zelanda	1
Samoa del Oeste	1
Tahiti	1
Subtotal	3
Rusia	1
Corea	107
Israel	2
Japón	12541
Tailandia	1
Taiwán	1
Subtotal	12653
Total	13262

Tabla 4. Distribución mundial de la anisakidosis (anisakirosis + pseudoterranovosis). La tabla recoge la mayoría de los casos existentes en la bibliografía. (*) En esta cifra no se incluyen los casos de las formas alérgicas.

dos como los principales hospedadores responsables de la transmisión de las larvas de *Anisakis* en Japón, aunque las especies implicadas parecen variar según la región y la época del año. En algunas zonas, los peces y calamares son capturados y consumidos sólo en determinados meses, lo que ha sido relacionado con el carácter estacional observado en la parasitación humana. En EEUU la mayoría de los casos descritos han sido producidos por la ingestión de salmón del Pacífico (*Oncorhynchus* spp.) procedente del medio natural, que suele presentar gran número de larvas en la musculatura. En este sentido, en un estudio se ha llegado a demostrar que el 10% de los trozos de salmón consumidos en restaurantes de comida japonesa de Seattle contenían larvas de *Anisakis*. En Europa Occidental, el arenque (*Clupea harengus*) ha sido una de las especies más implicadas. En España, sin embargo, el boquerón (*Engraulis encrasicolus*) aliñado con vinagre y aceite parece ser la principal fuente de transmisión de la infestación por *Anisakis*. Sin embargo, también se han atribuido casos a la ingestión de sardinas (*Sardina pilchardus*) aliñadas con limón y merluza (*Merluccius merluccius*) y otros pescados insuficientemente cocinados.

Respecto a la especie *P. decipiens* los principales transmisores en Japón son el bacalao (*Gadus macrocephala*) y el halibut del pacífico (*Hyppoglossus stenolepis*) y en EEUU especies del género *Sebastes* (chancharros).

El incremento en el número de casos de anisakidosis descritos en todo el mundo, incluyendo determinados países como el nuestro, donde el pescado es habitualmente cocinado a temperaturas elevadas, podría ser consecuencia de varios factores entre los que se pueden destacar:

- El mayor conocimiento de la enfermedad por parte de los médicos y la mejora experimentada por los métodos de diagnóstico.
2. El asentamiento de determinadas etnias (especialmente orientales) que consumen habitualmente platos elaborados a base de pescado crudo en países de cultura occidental. Esto no sólo ha generado la proliferación de restaurantes especializados en este tipo de comidas, los cuales han sido directamente implicados en la transmisión de la anisakidosis, sino que también ha contribuido a que alguno de los casos descritos en estos países corresponda a pacientes de estas etnias, que mantienen sus costumbres alimenticias. Además, el aumento de estos restaurantes podría haber incrementado la popularidad de este tipo de comidas entre la población occidental.
3. La aplicación de determinadas tendencias culinarias que sostienen que los alimentos crudos o poco hechos conservan más sabor y mayor valor alimenticio.
4. El aumento experimentado por algunas poblaciones de mamíferos marinos desde la implantación de las leyes internacionales de protección de estos animales. A este respecto, cabe señalar que en EEUU la mayor parte de los casos de anisakidosis registrados corresponden a habitantes de la costa Oeste, donde las colonias de hospedadores definitivos son más abundantes.

En lo referente a las formas alérgicas, *A. simplex* es una causa importante de alergia en nuestro país. De hecho, tomando como referencia otros alérgenos relacionados con los alimentos, en estudios recientes efectuados en el País Vasco se ha comprobado una seroprevalencia del 12%, lo que equivale al conjunto de alergias frente a rosáceas, frutos secos y marisco, conjuntamente. En base a estos datos, cabría suponer que en otras comunidades españolas y en países con costumbres culinarias similares también deberían presentarse un gran número de casos de alergia a *Anisakis*. Sin embargo, existen al menos dos factores que impiden la extrapolación de los datos: a) los métodos analíticos empleados hasta la fecha para la determinación de anticuerpos específicos carecen de la especificidad adecuada (véase Diagnóstico); b) como ya ha sido comentado, hasta el momento no se ha podido demostrar si la alergia frente a este parásito es una entidad aislada a la que está expuesta la población en general (la que consume pescado supuestamente parasitado) o no es más que una manifestación de la anisakiosis (normalmente la forma gástrica aguda o gastroalérgica) con lo cual sólo se podrían dar casos en la población que consume pescado crudo o poco cocinado.

7. PROFILAXIS

La presencia de larvas de nematodos anisáquidos en la cavidad corporal, vísceras y musculatura del pescado no sólo supone un riesgo sanitario importante, sino que también puede influir negativamente en el aspecto comercial del pez y sus derivados. Es por ello que, durante largo tiempo, las industrias pesqueras y los investigadores han dirigido sus esfuerzos hacia la búsqueda de medidas de control capaces de reducir o eliminar totalmente la presencia de larvas viables de anisáquidos en el pescado o en sus derivados antes de su comercialización. Algunas de estas estrategias se basan en procedimientos que permiten detectar las larvas en las piezas de pescado para, de esa manera, poder eliminarlas, bien por extracción de las mismas en aquellas piezas poco parasitadas, o bien por descarte de la pieza entera o de parte de ella en piezas abundantemente parasitadas. Estas y otras medidas previas a la comercialización que incluyen la selección de pescado de pequeño tamaño o procedente de poblaciones poco parasitadas, la evisceración inmediata después de la captura y el descarte de la musculatura hipoaxial, pueden ayudar a reducir el riesgo de transmisión, pero nunca excluirlo totalmente.

Las únicas medidas que se consideran totalmente efectivas para evitar la parasitación humana, puesto que pueden matar las larvas contenidas en la musculatura, son la congelación y el calentamiento del pescado. En cualquier caso, no debemos olvidar que una de las principales medidas de control y, probablemente, la más fácil de llevar a cabo, independientemente de las características culturales y socio-económicas del país, es informar correctamente a la población acerca de los riesgos que conlleva la ingestión de platos elaborados a base de pescado crudo o insuficientemente cocinado.

MEDIDAS DE CONTROL PREVIAS A LA COMERCIALIZACIÓN

Selección del pescado en base a su tamaño o procedencia

Algunas empresas incluyen entre sus propias medidas de control la compra selectiva de los ejemplares más pequeños de determinadas especies en las que se ha demostrado que la carga parasitaria muscular aumenta con el tamaño del individuo. Igualmente, existen especies procedentes de determinados caladeros que, por la cohabitación o proximidad con colonias de mamíferos marinos, son claramente desaconsejables para su comercialización. En estos casos, la aplicación de las técnicas de detección y extracción de parásitos sería tediosa y enormemente costosa. Es por ello que muchas empresas prefieren seleccionar aquellas capturas procedentes de caladeros alejados de las zonas frecuentadas por mamíferos marinos.

La utilización de especies cultivadas es una medida de control excelente, sobre todo si éstas van a ser destinadas al consumo crudo o al procesado por cualquiera de los procedimientos que no aseguran la inactivación de las larvas (ver más adelante). Esta medida es totalmente efectiva, siempre y cuando el proceso de engorde de la especie se realice a base de piensos y no implique, en ningún caso, la utilización de otras especies de pescado para la alimentación, que podrían estar contaminadas con larvas de anisáquidos (por ejemplo, el engorde del rodaballo con bacaladilla sin congelación previa, empleado hace unos años en Galicia).

Evisceración inmediata tras la captura

En el caso de *A. simplex*, un fenómeno frecuentemente observado en determinadas especies de peces que son almacenadas durante largo tiempo sin eviscerar, es la existencia de migraciones larvarias desde las vísceras al tejido muscular perivisceral e incluso al exterior del pez. Así, en determinados estudios se ha comprobado que en arenques y caballas del mar del Norte, mantenidos en hielo sin eviscerar, la tasa de parasitación muscular suele aumentar con el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, es importante señalar que a pesar de que estas migraciones *post-mortem* pueden ser una de las causas de la

presencia abundante de parásitos en la carne del pescado, existen otras especies de peces que ya presentan una elevada parasitación muscular en el momento de la captura. A este respecto, algunos autores han intentado explicar por qué unos peces tienen mayor tendencia a presentar parasitación muscular que otros. En concreto, se ha sugerido que en peces piscívoros como la merluza, el merlán o el bacalao, las larvas parecen tener una mayor tendencia a asentarse en el tejido muscular, mientras que en especies que se alimentan principalmente de eufáusidos tales como el arenque, la bacaladilla o la caballa, las larvas suelen enquistarse en las vísceras. Igualmente, se ha indicado también que las migraciones *post-mortem* parecen tener lugar con mayor frecuencia en peces como el arenque o la caballa, que acumulan gran cantidad de lípidos en su musculatura. Lo cierto es que los datos existentes actualmente son contradictorios y cuestionan la validez de dichas hipótesis.

El estímulo o estímulos que llevan a las larvas de *Anisakis* a efectuar migraciones en el pez después de la captura no están claros, pero podrían estar relacionados con el aumento de la temperatura interna en aquellos peces que son refrigerados insuficientemente (conduce a la activación de las larvas puesto que los hospedadores definitivos son homeotermos) y con la autólisis parcial de los tejidos del pez entre los que se incluye la cápsula de tejido que se forma alrededor de la larva enrollada en espiral.

Para evitar la existencia de estas migraciones se recomienda llevar a cabo la evisceración del pescado inmediatamente tras la captura. No obstante, debemos resaltar que, aunque esta medida puede ayudar a reducir el grado de parasitación muscular, no excluye totalmente el riesgo de transmisión ya que, como hemos dicho, existen numerosas especies de peces que ya contienen un gran número de parásitos en la carne en el momento de la captura.

Descarte de la musculatura hipoaxial

Otra estrategia de control que ha sido utilizada a nivel industrial es el descarte de la musculatura que rodea a las vísceras en la elaboración de filetes de pescado. Esta medida reduce pero tampoco elimina totalmente el peligro de contaminación puesto que, aunque las larvas suelen concentrarse en estas zonas, una parte considerable de ellas también puede asentarse en la musculatura epiaxial.

Determinación de contaminación parasitaria

Para determinar la presencia de larvas de *A. simplex* en pescado o en sus derivados se han empleado diversos procedimientos:

Examen visual normal del pez

Este procedimiento de detección, que implica simplemente la observación de las diferentes partes del pescado (paquete visceral, cavidad corporal y musculatura perivisceral) sin ayuda de aumento ni iluminación especial, es fácil de llevar a cabo pero sólo permite detectar un 45-83% de las larvas musculares contenidas en especies como el arenque, jurel o caballa. Como consecuencia, su utilización en el examen de especies de mayor tamaño tales como bacalao, merluza, merlán, etc, no es aconsejable.

Examen del pescado mediante transiluminación o epiiluminación con luz UV

El procedimiento de transiluminación, que ha sido ampliamente utilizado en la industria del bacalao, puede ser empleado para detectar las larvas presentes en filetes, lomos, rodajas o trozos pequeños de pescado fresco o que ha sido mantenido congelado. Las especies estudiadas por este método deben tener la musculatura blanquecina y nunca oscura, ya que ésto dificultaría la detección. Las muestras a examinar, por supuesto, deben haber sido antes peladas, descongeladas si fuera el caso, y nunca deben exceder los 30 mm de grosor. Las porciones de pescado que han sido empanadas pueden también ser observadas por éste método tras llevar a cabo la extracción de la capa de empanado (inmersión del producto descongelado en una solución de lauril sulfato sódico al 2% a 50°C hasta que el empanado se separe).

Idealmente, el procedimiento debe efectuarse sobre un transiluminador equipado con luz fría con una temperatura de color recomendada de 4200 K (p. ej. un mínimo de dos tubos fluorescentes de 20 W). La superficie del aparato debe tener unas dimensiones adecuadas para poder visualizar filetes (p. ej. 30 x 60 cm y 5-7 mm de espesor) y una translucidez del 45-60%. La iluminación de la sala debe ser adecuada para no interferir con la detección de los parásitos ni fatigar la vista del observador. Los parásitos embebidos en la musculatura se visualizan como una silueta opaca, pudiendo así ser extraídos por el trabajador si éstos no son muy abundantes. Si la carga parasitaria es grande la pieza debe descartarse directamente para la comercialización.

La detección por transiluminación puede mejorarse comprimiendo la muestra entre dos placas de Plexiglas o de cualquier otro material transparente (p. ej. metacrilato), para reducir temporalmente el grosor de la pieza examinada.

Las porciones pertenecientes a especies de carne oscura como el salmón pueden examinarse bajo una luz UV (epiiluminación) en una habitación a oscuras. Cada muestra debe ser examinada por ambos lados empleando una luz UV reflejada de 366 nm de longitud de onda. Los restos de pan rallado procedentes de muestras desmenuadas pueden ser observados también mediante esta técnica para visualizar si contienen algún nematodo. En este caso, los restos deben ser transferidos antes a una malla del nº 40. Las formas parasitarias se observan de color azul o verde fluorescente. Las espinas y el tejido conectivo del pescado, que también se ven azulados, se pueden diferenciar de los parásitos por su distribución uniforme y, en el caso de las espinas, por su rigidez. Para realizar esta técnica, el observador debe protegerse los ojos con pantallas o gafas protectoras especiales para luz UV (p. ej. con cristales de óxido de uranio) y evitar la exposición de la piel al mínimo.

A pesar de la facilidad y rapidez de realización de este método, los mejores resultados parecen obtenerse con material sometido previamente a ciclos de congelación-descongelación. En este sentido, algunos autores han observado que los nematodos contenidos en pescado tratado previamente con calor, *shock* de CO₂ o escabechado son capaces de emitir fluorescencia, mientras que los contenidos en pescados procesados mediante ahumado frío o marinado con hierbas no la emiten. Este fenómeno podría estar relacionado con el grado de supervivencia de las larvas, ya que si están vivas tampoco se aprecia emisión de fluorescencia.

La transiluminación y la epiiluminación con luz UV pueden ser utilizadas rutinariamente en la industria de la pesca aunque su aplicación no excluye totalmente el riesgo de transmisión de larvas al ser humano. Algunos autores han notificado que muchas de las larvas de *A. simplex*, más claras y de menor tamaño que las de *P. decipiens* (marrones-rojizas), no se pueden detectar al trasluz. En concreto, se ha observado que, dependiendo de la especie a examinar, la transiluminación sólo detecta un 53-79% de los filetes contaminados y un 43-76% de las larvas de *Anisakis* presentes.

Digestión artificial

Esta técnica de detección, que intenta reproducir las condiciones físico-químicas del estómago de los mamíferos, permite la recuperación de gran parte de las larvas existentes en el pescado mediante la digestión de la musculatura circundante. A pesar de su eficacia, resulta tediosa, cara y, por tanto, inadecuada para ser aplicada en inspecciones industriales a gran escala. Por el contrario, su utilización es aconsejable para estudios de tipo experimental (p. ej. en estudios destinados a comprobar la eficacia de nuevos protocolos de procesamiento para inactivar las larvas de anisáquidos).

Básicamente, el método consiste en tomar una muestra de pescado (se recomienda estudiar muestras de al menos 250 g por cada kg de pieza de pescado), sumergirla en solución de digestión (15 g de pepsina + 750 ml de solución salina + HCl hasta ajustar el pH de la disolución a 2) e incubar la mezcla a 37°C con agitación suave (100 rpm) hasta que la digestión alcanza un nivel aceptable (no debe sobrepasar las 24 h). A continuación, la mezcla se pasa a través de una malla (tamaño de poro recomendado de 1 mm) y se visualizan los restos que han quedado retenidos, donde estarán la mayoría de nematodos. Cualquier resto de carne sin digerir presente en el retenido debe ser desmenuzado para examinar si contiene o no parásitos. La muestra filtrada debe ser analizada también por si algún nematodo o resto de él ha pasado la malla. Para ello la mezcla debe ser antes decantada en una copa de decantación durante 1 h, tras la cual se examina el sedimento en una placa de Petri en un estereomicroscopio.

MÉTODOS DE INACTIVACION

Tanto la congelación como los diferentes procesados que implican el calentamiento a temperaturas elevadas del pescado o de sus derivados (cocción, cocinado en microondas, etc.) constituyen medidas de control que pueden excluir totalmente el riesgo de transmisión de nematodos anisáquidos y que pueden ser aplicadas después de la comercialización, por el propio consumidor. En algunos casos, como en la congelación o en los ahumados en caliente, la muerte de las larvas puede llevarse a cabo también durante el procesado del pescado, previamente a su puesta en el mercado.

A pesar de que la inactivación de las larvas en el pescado antes de su consumo ha sido intentada por múltiples vías (ej., la aplicación de radiaciones entre 5-10 kGy mata las larvas, pero deteriora sensiblemente la calidad del pescado), la congelación parece el único método totalmente eficaz para matar las larvas de anisáquidos sin alterar profundamente las propiedades culinarias del producto, cuando éste no vaya a ser procesado a temperaturas elevadas (pescado crudo, marinados, escabechados, salazones, ahumados fríos, etc.).

Aunque las larvas de *Anisakis* aisladas sólo resisten 2 h a -20°C , el tipo y el tamaño del pez o del producto pesquero y el procedimiento de congelación y posterior almacenamiento empleado condicionan el tiempo de supervivencia de éstas en la musculatura. En este sentido, algunos autores han demostrado que un pescado entero de 2-4 kg de peso debe ser almacenado durante al menos 5 días a -20°C en congelador doméstico para asegurar la muerte de todas las larvas.

Cuando la congelación se realiza rápidamente y la temperatura interna del pescado desciende y se mantiene a -30°C durante 2-3 h todavía puede sobrevivir alguna larva. Sin embargo, un almacenamiento posterior durante 24 h a -18°C tras este procedimiento de congelación se ha mostrado definitivo para inactivar la totalidad de las larvas presentes en la musculatura. La eficacia de este método ha sido estudiada con arenques enteros o en filetes, congelados en grupos de 7-7,5 kg. Si los arenques se congelan individualmente es suficiente con llegar a una temperatura interna de -20°C durante la congelación siguiendo, a continuación, el mismo protocolo de almacenamiento. De forma similar, se ha notificado que la congelación rápida del salmón (1,8-3,6 kg) hasta una temperatura interna de -35°C (aproximadamente 15 h), proceso normalmente utilizado en la industria de este pescado, y su posterior almacenamiento a -18°C durante 24 h inactiva todas las larvas de *Anisakis*.

De estos estudios se deriva que el proceso de congelación en sí, entendido como la operación de aplicar refrigeración a un producto hasta que su temperatura descienda por debajo de su punto de congelación, no asegura la muerte de la totalidad de las larvas de *Anisakis*, al menos, en las especies en las que ha sido estudiada su eficacia y con los protocolos de congelación utilizados. Por ello, para excluir totalmente el riesgo de transmisión de este parásito al hombre, debe existir siempre un período de almacenamiento posterior a la congelación a temperaturas iguales o inferiores a -18°C durante 24 h. Esta precisión es muy importante, puesto que se trata de un aspecto que no aparece reflejado específicamente en la legislación existente, tanto en la Unión Europea como en EEUU, sobre las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos derivados de la pesca (**Anexo 2**). Cabe señalar además que, dado que la congelación es de los pocos procedimientos de procesado industrial que controla el riesgo potencial que supone la presencia de larvas de anisáquidos en el pescado o en sus productos derivados, debe ser considerada por cualquier empresa relacionada con estos procesos industriales como un Punto Crítico de Control (PCC) a la hora de establecer un sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (ARPCC).

La efectividad de la congelación como medida de control sanitario de la anisakuosis ha sido demostrada en Holanda, donde a partir de la puesta en funcionamiento, en 1967, de la ley que obligaba a congelar el arenque previamente a su comercialización o consumo (alcanzar los -20°C en 12 h y almacenar posteriormente durante al menos 24 h a esta temperatura), el número de casos descritos se vió sensiblemente reducido.

El tercer estadio larvario de los nematodos anisáquidos también es muy sensible a prácticas culinarias que implican el calentamiento del pescado a temperaturas elevadas. Así, mientras las larvas de *Anisakis* aisladas son capaces de sobrevivir durante aproximadamente 78 min a 45°C, éstas mueren rápidamente (1 s) cuando son sometidas a temperaturas superiores a 60°C. Al igual que en el caso de la congelación, el tipo y el tamaño del pescado o del producto pesquero a preparar y el procedimiento de calentamiento empleado condicionarán el tiempo necesario para la inactivación de la totalidad de las larvas. Así, algunos autores han sugerido que los filetes de pescado deben ser calentados a 60°C o más, al menos durante 10-12 min por cada pulgada de grosor, para asegurar que dicha temperatura se alcance también en las partes más internas de la pieza. Durante años se ha demostrado que algunos tipos de ahumados efectuados a temperaturas moderadas (antiguos ahumados holandeses realizados a 28°C y 40°C, y ahumados en frío efectuados a temperaturas inferiores o iguales a 32,2°C) no matan las larvas presentes en la musculatura. Por el contrario, los procesados de ahumado en caliente que aplican temperaturas iguales o superiores a 62,8°C, sí se han mostrado totalmente efectivos.

Recientemente, se ha comprobado que el cocinado del pescado en horno microondas puede resultar ineficaz a la hora de inactivar la totalidad de las larvas musculares. En concreto, se ha demostrado que algunas larvas de *Anisakis* contenidas en filetes de platija (*Atheresthes stómius*) de 0,5-1,75 cm de espesor sobreviven a tiempos de cocinado inferiores a 4,5 min (en microondas de 700 W, a la máxima potencia), que equivalen a temperaturas finales internas inferiores a 77°C. Un ejemplo claro del riesgo de la utilización del microondas es el caso de anisakirosis descrito recientemente en España, debido a la ingestión de merluza cocinada por este método.

Otras prácticas culinarias como la preparación del pescado a la plancha, a la brasa o incluso frito, también deben ser realizadas con cautela, pues podrían ser insuficientes para eliminar el riesgo de infestación si la pieza cocinada no alcanza la temperatura adecuada en su interior.

RESISTENCIA DE LAS LARVAS A OTROS PROCESADOS

Los nematodos contenidos en la musculatura del pescado pueden sobrevivir durante largo tiempo a otro tipo de prácticas culinarias que no conllevan el calentamiento del pescado. Así, las larvas de *Anisakis* pueden mantenerse viables hasta 25 días en mezclas de sal y vinagre utilizadas normalmente en el marinado del arenque en Holanda, 21 días en procesados de salazón que implican la acumulación de un 20% de NaCl en la fase acuosa del tejido del pez y 35 y 42 días en arenques sometidos a mezclas de marinado típicas de Alemania y Dinamarca, respectivamente. Una disminución en la concentración de sal acumulada en la fase acuosa del tejido del arenque del 9% al 4,3%, manteniendo la cantidad de acético constante (2,6%), puede incrementar la supervivencia de las larvas de 35 a 119 días. La resistencia prolongada a este tipo de procesados no es de extrañar si se tiene en cuenta la capacidad que tienen las larvas aisladas para sobrevivir en determinadas soluciones y condimentos (**Tabla 5**).

Sustancia	Tiempo de supervivencia
Formol 10%	6 días
NaCl 0,9%	24 días
NaCl 15%	3 días
NaCl saturada	1 día
HCl 1%	112 días
Jugo gástrico a 37°C	10 días
Acido acético 5%	32 días
Vinagre	51 días
Salsa Worcester	1 día
Shoyu (salsa de soja)	18 horas
Pasta de wasabi (rábano japonés)	2 horas
Jengibre	4-7 días
Mostaza dulce	4-7 días

Tabla 5. Resistencia de las larvas de *Anisakis* aisladas a diferentes productos y condimentos, algunos de los cuales son empleados en la preparación del pescado para el consumo humano.

8. DIAGNÓSTICO

La anisakirosis humana, a diferencia de otras helmintosis gastrointestinales, no puede ser diagnosticada por técnicas coprológicas, ya que durante su evolución no se libera ningún tipo de forma parasitaria en las heces del hospedador. Además, las manifestaciones clínicas con las que cursa esta enfermedad son comunes a numerosas dolencias del tracto gastrointestinal. Como consecuencia de estas características, el diagnóstico confirmativo sólo puede ser establecido cuando la larva, único signo patognomónico de la enfermedad, es correctamente visualizada. No obstante, no debe ser olvidado que el hombre adquiere la infestación a través del consumo de pescado crudo o inadecuadamente cocinado. Por esta razón, la realización de una anamnesis detallada del paciente, en la que se revelen estos hábitos alimenticios, es de vital importancia. Esta parte del examen clínico resulta prácticamente imprescindible para el diagnóstico de aquellos casos en los que la larva no puede ser detectada por ninguno de los métodos físicos.

DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

En la actualidad, la *endoscopia* es la técnica de elección para el diagnóstico de la anisakirosis gástrica aguda (**Figura 12**). La introducción simultánea de un forceps de biopsia junto con el fibroscopio permite, además de la correcta visualización de la larva, la extracción de ésta de la zona lesionada posibilitando así la curación del paciente. Su eficacia en el diagnóstico confirmativo y en el tratamiento de esta forma de enfermedad ha sido ampliamente demostrada. Cuando la larva no se aprecia por endoscopia normal, se puede administrar una solución de índigo carmín al 0,1% sobre la zona lesionada con ayuda de un micropulverizador asociado al canal de biopsia. El colorante aumenta el contraste en zonas de relieves suaves permitiendo, en muchos casos, la visualización de la larva. Esta técnica puede ser también aplicada en casos de anisakirosis gástrica crónica para el diagnóstico diferencial con cáncer gástrico. Si a pesar de ello, la adición de colorante tampoco revela la presencia de la larva en la lesión, se recomienda la extracción de una biopsia, con ayuda del forceps, y su posterior examen histopatológico. Las técnicas endoscópicas también pueden ser aplicadas con éxito en el diagnóstico y tratamiento de aquellos casos de anisakirosis intestinal en los que las larvas se asientan en localizaciones accesibles para el fibroscopio como el duodeno o colon.

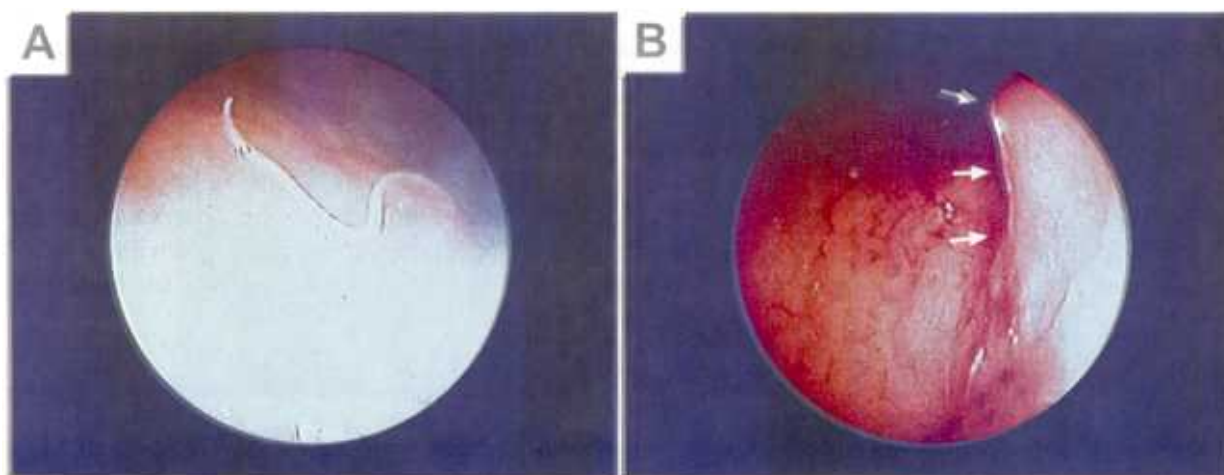


Figura 12. Imagen endoscópica correspondiente a un caso de anisakirosis gastro-alérgica diagnosticado en España. El paciente había sido parasitado por dos larvas de *A. simplex*. **A.** Imagen correspondiente a una de las larvas, que aparece con la porción anterior emergiendo de la mucosa. **B.** Elevación de la mucosa gástrica de cuyo interior se extrajo una segunda larva (flechas). Cortesía de la Dra. M. Audicana, Servicio de Alergia e Inmunología, Hospital Santiago Apóstol (Vitoria-Gasteiz).

En la anisakuosis gástrica, la *radiología* también puede constituir una técnica de diagnóstico útil, aunque en estos casos, la larva, identificada como un defecto filiforme de repleción del contraste, no resulta tan fácilmente detectable como por los métodos endoscópicos. En el caso de la forma intestinal, la aplicación de esta técnica es más valiosa ya que, en la mayoría de los casos (lesiones en el íleon), la endoscopia no puede ser utilizada. No obstante, si el nematodo no es visualizado, los hallazgos radiológicos son muy semejantes a los observados en otras dolencias intestinales tales como la enteritis regional, la ileitis isquémica o la hemorragia intestinal de la submucosa.

La *ecografía* ha sido aplicada al diagnóstico de la anisakuosis tanto en la forma gástrica como en la intestinal. Los hallazgos obtenidos mediante esta técnica ya han sido comentados al describir las características clínicas de la enfermedad. En este caso, el diagnóstico diferencial de la forma gástrica incluye gastritis aguda, úlcera y cáncer gástrico. Las úlceras de grandes dimensiones, sin embargo, pueden manifestarse como una zona de eco alto en la pared engrosada (eco bajo) que no se observa en la anisakuosis. Asimismo, en la parasitosis, el engrosamiento de la pared se muestra como un eco interno uniforme, algo que no suele ser observado en los casos de cáncer gástrico. Las ecografías típicas de la anisakuosis intestinal pueden ser confundidas con una obstrucción intestinal, linfoma intestinal maligno, ileitis terminal, apendicitis u otras dolencias intestinales. En ocasiones, los linfomas intestinales avanzados pueden ser diferenciados de la anisakuosis por la presencia de imágenes de masa; otras enfermedades, como la colitis de diferentes etiologías, enfermedad de Crohn, tuberculosis intestinal, síndrome de Behçet y cáncer avanzado, pueden ser distinguidas en base a las diferentes capas de la pared afectadas y según esté destruida o conservada la estructura pentalaminar. Mas recientemente, la *ecografía transendoscópica* ha sido utilizada para discriminar entre casos de anisakuosis gástrica aguda y otras enfermedades que generan también engrosamiento de la pared gástrica como el síndrome de Ménétrier, cáncer de Borrmann tipo 4 o linfoma maligno avanzado.

Debido a las manifestaciones clínicas inespecíficas que tienen lugar durante la anisakuosis intestinal, muchos de los cuadros clínicos presentados por los pacientes son diagnosticados preoperatoriamente (en el caso de la forma aguda) como ileitis regional, apendicitis, peritonitis, íleo y abdomen agudos y, en el caso de la forma crónica, como tumor, cáncer y pólipos intestinales, apendicitis crónica o tuberculosis intestinal. La repentina aparición y severidad de los síntomas en la forma fulminante hacen que el médico tenga que decidirse rápidamente sobre la necesidad de llevar a cabo una laparotomía. La presencia de una anamnesis que revele la ingestión de pescado crudo o inadecuadamente cocinado pocas horas antes de la aparición de los síntomas puede ser definitiva para descartar la intervención, ya que, como se ha demostrado, las manifestaciones clínicas asociadas a esta forma de la enfermedad revierten espontáneamente en 1-2 semanas de infestación (ver Tratamiento). Existen, no obstante, una serie de características clínicas generales que, junto con el interrogatorio al paciente, pueden ser suficientes para establecer un diagnóstico preoperatorio fiable de la anisakuosis intestinal aguda. Estas características son: presencia de eosinofilia en fluido ascítico (muy importante), fiebre y defensa muscular ausentes o muy ligeras, leucocitosis normalmente superior a la observada en otras enfermedades inflamatorias, movilidad mostrada por el punto de dolor y la induración asociada al punto doloroso y, por supuesto, los hallazgos radiológicos y ecográficos, ya comentados.

TÉCNICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

La utilización de técnicas histológicas en el diagnóstico de la anisakuosis humana resulta de interés sobre todo en los casos gástricos crónicos y en las formas ectópicas o extragastrointestinales. En estos casos, el estudio histológico de una biopsia obtenida de la lesión sospechosa puede evidenciar una lesión inflamatoria con restos larvarios en su interior que, dependiendo del grado de alteración de la larva, pueden permitir su identificación en base a la presencia de rasgos específicos de la misma (cordones hipodermes laterales bilobulados, luz triangular del canal alimentario, célula excretora, etc.) (**Figura 13**). Cuando las larvas están muy destruidas y su identificación morfológica es difícil, se puede recurrir a la utilización de técnicas de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia empleando anticuerpos especí-

ficos (véase Serodiagnóstico). A continuación, se describen las características anatomopatológicas de los tres tipos de lesiones que se han descrito en pacientes con anisakuosis gástrica crónica:

- a. *Lesión tipo absceso*: corresponde a la fase inicial y está caracterizada por la presencia de un absceso marcado en la submucosa. En el centro del mismo se observa la larva parcialmente degenerada (cutícula y órganos internos semidestruidos), rodeada por abundante infiltración celular. Aunque los eosinófilos son predominantes, también están presentes neutrófilos, macrófagos y linfocitos. El absceso, a su vez, está rodeado por una zona granulomatosa, donde se aprecia necrosis, hemorragia, infiltración eosinofílica y exudación de fibrina o degeneración fibrinoidea. En los casos de mayor severidad la capa muscular y la capa serosa presentan apariencia similar.
- b. *Lesión tipo absceso-granuloma*: en esta fase el absceso aparece reducido y rodeado por tejido granulomatoso con ligera colagenización. Los restos de la larva están invadidos por eosinófilos y, en ocasiones, por células epitelioides o células gigantes de cuerpo extraño. En este estado, la infiltración por eosinófilos es menor que en el anterior y los linfocitos son predominantes. Esta lesión también se suele encontrar en las formas extragastrointestinales.
- c. *Lesión tipo granuloma*: corresponde a la fase más avanzada. En este momento, el absceso aparece casi totalmente reemplazado por tejido granulomatoso con fibrosis e infiltración por células gigantes de cuerpo extraño, linfocitos y, en menor medida, eosinófilos. Los restos larvarios son casi inapreciables y, en ocasiones, ya no se detectan.

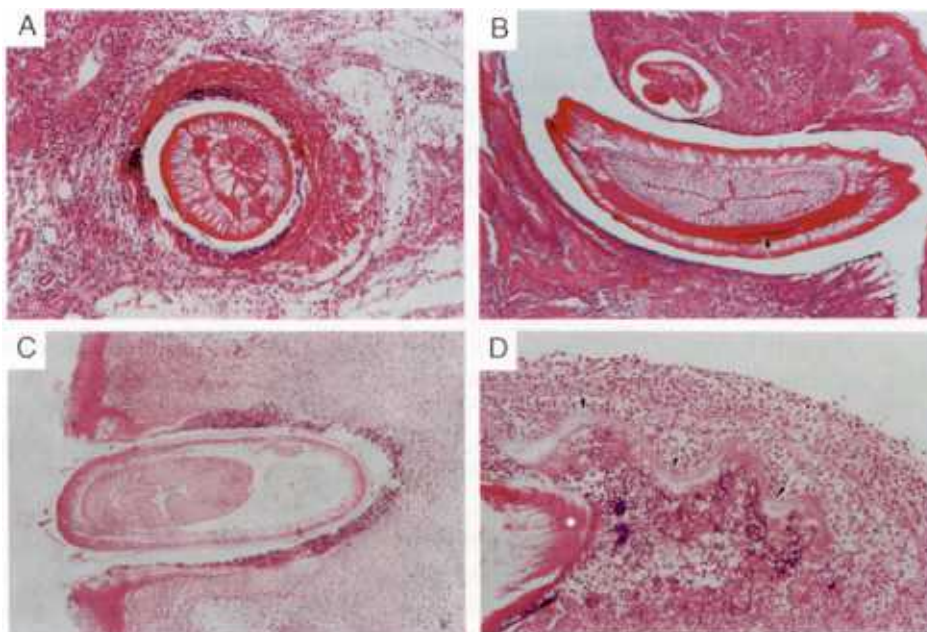


Figura 13. Secciones histológicas de diferentes lesiones causadas por *A. simplex* en los tejidos de mamíferos, teñidas con hematoxilina-eosina. **A.** Lesión correspondiente a un nódulo localizado en la cavidad abdominal, que revela la presencia de una larva intacta en el centro de la misma. En la sección transversal del nematodo se pueden distinguir entre otras estructuras: la musculatura, la célula excretora, muy pequeña a este nivel, los dos cordones hipodermiales laterales bilobulados y el esófago, claramente visible en el centro del parásito y que presenta una luz trirradiada rodeada por dos sectores musculares y un sector glandular (glándula esofágica dorsal). **B.** Sección tangencial de una larva L3 (nótese la fina estriación cuticular) donde se distinguen el intestino, formado por un epitelio columnar simple y de luz rectilínea, la célula excretora con un núcleo prominente (teñido de hematoxilina; flecha) y los cordones hipodermiales laterales. **C.** Sección de una larva L4 penetrando en la mucosa del estómago de una rata. Nótese la luz intestinal en zigzag y la cutícula con estriación gruesa características de este estadio de desarrollo. **D.** Detalle de una lesión tipo absceso-granuloma donde se puede apreciar el borde de una larva L4 parcialmente destruida (con estriación cuticular gruesa; *) y los restos de la antigua cutícula de la L3 (flechas), liberada tras la muda y retenida en el tejido inflamatorio circundante.

Además de estas alteraciones, y sobre todo en los casos ectópicos, también se han observado lesiones típicas de *respuesta a cuerpo extraño*, caracterizadas por infiltración con neutrófilos más que con eosinófilos y por la ausencia o escasa presencia de edema, exudación de fibrina, hemorragia y daño vascular. En este tipo de lesiones puede observarse también una formación granulomatosa alrededor de la larva.

En las formas agudas o crónicas intestinales, dado que el íleon es la región afectada con más frecuencia y que no resulta accesible al fibroscopio por vía intraluminal, lo más habitual es que se proceda a una exploración laparoscópica y a una resección del segmento comprometido del mismo. En tales circunstancias el diagnóstico anatomopatológico se realiza sobre la pieza operatoria, pudiendo encontrarse la larva entera o parcialmente destruida en el centro de una lesión inflamatoria que presenta un fuerte infiltrado eosinofílico. En los casos crónicos, las lesiones asociadas son similares a las observadas en el estómago. Al igual que en las formas gástricas o ectópicas, también en este caso se puede recurrir a la utilización de anticuerpos específicos para localizar antígenos parasitarios cuando la morfología no permita su identificación de una manera clara.

Los hallazgos microscópicos típicos de la forma aguda intestinal revelan una lesión tipo flemón (muy similar a la observada en la forma gástrica aguda, pero de mayor severidad) que implica un engrosamiento de la pared de 3 a 5 veces superior a las dimensiones normales. La larva suele encontrarse intacta en la submucosa, asociada a edema marcado, infiltración celular severa, exudado inflamatorio y fibrinoso, necrosis tisular y pequeñas lesiones hemorrágicas. Los eosinófilos son los principales componentes celulares observados, aunque los monocitos, neutrófilos y linfocitos, también están presentes. Cuando la larva no puede encontrarse en la zona reseçada, es muy probable que haya perforado totalmente la pared intestinal, alcanzando la cavidad abdominal. La mucosa no siempre presenta signos de ulceración o necrosis, pero en la mayoría de los casos se observa hiperplasia de los folículos linfoides. Generalmente, la capa muscular muestra cambios inflamatorios más suaves que la submucosa, sin edema ni exudación de fibrina y con poca infiltración celular. La capa serosa, por el contrario, puede presentar estas alteraciones en mayor medida. La mayoría de las hemorragias importantes son observadas en esta capa, ya que se trata de una zona bien irrigada por capilares. Los mesenterios regionales de los intestinos flemonosos muestran también ligera inflamación. En ocasiones, la submucosa de zonas próximas al punto de penetración presenta también edema intenso, infiltración eosinofílica marcada, exudación de fibrina, pequeñas hemorragias, vasculitis severa y necrosis fibrinoidea.

Actualmente se conocen bastantes casos de anisakirosis que han sido confirmados en estudios retrospectivos de piezas operatorias que habían sido diagnosticadas como granulomas eosinofílicos de causa desconocida. Por esta razón, se debe alertar a los patólogos sobre los tipos de lesiones normalmente asociados a esta enfermedad. La actitud del especialista ante una pieza de resección intestinal o apendicectomía en cuyos cortes se observe una eosinofilia importante debe ser, por tanto, proceder siempre a la búsqueda de formas parasitarias, con especial atención a las zonas que presenten ulceraciones o trayectos fistulosos.

PRUEBAS CUTÁNEAS

Al igual que ocurre con otras enfermedades alérgicas mediadas por reacciones de hipersensibilidad de tipo I, la respuesta de anticuerpos frente a los alérgenos de *A. simplex* puede ser evidenciada mediante la realización de una historia clínica adecuada y una prueba cutánea (epicutánea -*prick-test*- o, menos frecuentemente, intracutánea).

El *prick-test* es fácil de realizar y además produce pocas molestias al paciente. Para la realización del método se pueden utilizar aplicadores individuales o múltiples (lancetas para *prick-test*) mediante los cuales se punciona una zona de la piel donde se ha depositado previamente una gota de la solución antigénica. La lectura se realiza a los 20 minutos y la positividad se manifiesta en forma de un habón urticariforme, rodeado de un halo eritematoso, alrededor del punto de inoculación del antígeno (Figura 14). Los antígenos para la realización de esta prueba son disoluciones acuosas del extracto antigénico que



Figura 14. Reacción de hipersensibilidad de tipo I producida por la prueba del *prick-test* en el antebrazo de una paciente sensibilizada. Obsérvese la intensa reacción pápulo-eritematosa producida (área enmarcada). Cortesía del Dr. Luis de Corres, Servicio de Alergia e Inmunología, Hospital Santiago Apóstol (Vitoria-Gasteiz).

contienen glicerina al 50% y suelen ser estables durante varios años. En el caso de *Anisakis*, los extractos antigénicos se obtienen normalmente a partir de larvas L3 recogidas manualmente de peces parasitados y posteriormente se procesan para la obtención del alérgeno o alérgenos de interés y se valora su actividad biológica. Los extractos antigénicos para la realización del *prick-test* están disponibles comercialmente (ej., ALK-Abelló). Estos extractos permiten diagnosticar alrededor del 95% de los pacientes sensibles a los mismos. Además, la técnica presenta la ventaja de que permite a los alergólogos probar distintos alérgenos en la propia consulta sin necesidad de esperar a la realización de otras pruebas de laboratorio. Por el contrario, el principal inconveniente es que al estar confeccionado el extracto antigénico con los alérgenos totales del parásito existe el riesgo de se produzcan respuestas positivas debidas a reactividades cruzadas por exposición previa a otros microorganismos, parásitos, etc. con los que *Anisakis* comparte epitopos. Es por ello, que mientras no se disponga de alérgenos específicos para las pruebas cutáneas, cualquier resultado positivo o dudoso requiere confirmación posterior mediante una prueba de laboratorio específica. Por otra parte, el riesgo de que algunos pacientes puedan sufrir reacciones anafilácticas obliga a que la técnica sea realizada sólo por personal especializado.

Las pruebas intracutáneas, aunque son más reproducibles y entre 100 y 1000 veces más sensibles que las pruebas epicutáneas, son menos utilizadas porque consumen más tiempo, son más difíciles de realizar, suelen ser más molestas para los pacientes y presentan un riesgo asociado mayor de reacción sistémica. Además, dada su sensibilidad, suelen producir más falsos positivos y, puesto que se utilizan los mismos extractos antigénicos que en el caso del *prick-test*, también se pueden producir los mismos problemas de reactividades cruzadas. En un estudio en que se utilizó un antígeno purificado del parásito (hemoglobina de *Anisakis*) se observó reacción positiva en el 100% de pacientes estudiados con anisakirosis aguda, pero también en el 63% de adultos aparentemente sanos, en el 39% de estudiantes que cursaban estudios superiores y más del 2% de población infantil.

SERODIAGNÓSTICO

Como hemos comentado, en determinadas ocasiones la larva de *Anisakis* no puede ser visualizada, bien porque ha migrado a localizaciones inaccesibles para la sonda endoscópica (intestino delgado medial y distal, capas internas de la pared del tracto gastrointestinal y tejidos y órganos extragastrointestinales), o bien porque la enfermedad se encuentra en un estado avanzado y la larva ha sido prácticamente destrui-

da por el sistema inmune del hospedador. En estos casos, teniendo en cuenta que durante la anisakuosis, al igual que sucede en otras helmintosis, se genera una importante respuesta inmune humoral en el hospedador, las pruebas inmunológicas pueden constituir una buena alternativa preoperatoria. Además, estas pruebas resultan imprescindibles cuando se trata de determinar si existe una sensibilización alérgica frente a los antígenos del parásito.

De manera análoga a otros nematodos, *A. simplex* expresa antígenos comunes junto con otros que son específicos de cada estadio larvario. Esto quiere decir que, durante la parasitación, el hospedador sufre un proceso de inmunización por los antígenos de la larva L3 (antígenos de superficie y antígenos de excreción/secreción) y, una vez que se produce la muda, frente a los antígenos que expone en superficie o secreta/excreta la larva L4. Más aún, a medida que la larva se destruye con el transcurso de los días, el hospedador se inmunizará también con los antígenos somáticos de la fase L4. Es probable, por lo tanto, que durante la anisakuosis crónica el mayor estímulo antigénico lo constituyan los antígenos somáticos de las larvas L4. Por el contrario, cuando las larvas L3 son expulsadas en una fase temprana, el contacto con los antígenos de la larva L4 no se produce. De todo ello se deduce que un sistema de serodiagnóstico será ideal si el antígeno seleccionado, además de ser específico, está presente en las larvas L3 y L4, que son los estadios a los que se expone habitualmente el ser humano.

Hasta hace relativamente poco tiempo, las pruebas serológicas para el diagnóstico de la anisakuosis tenían poca sensibilidad y especificidad. Entre las que más se llegaron a utilizar, hemos de destacar la aglutinación de partículas de látex, inmunodifusión doble e inmunoelectroforesis, hemaglutinación indirecta y la fijación del complemento. Con algunos de estos métodos se ha logrado diagnosticar serológicamente hasta un 90% de los casos de anisakuosis gástrica e intestinal en población japonesa pero, dependiendo del método elegido, también se producían entre un 30 y un 60% de respuestas positivas en población normal. Por tal motivo, los resultados sólo eran tenidos en cuenta cuando se producía un aumento significativo en el título de anticuerpos del paciente en el transcurso de 2-4 semanas desde el inicio del episodio clínico. De manera similar a lo que se ha descrito para las pruebas cutáneas, la utilización de hemoglobina de *Anisakis* como antígeno en las técnicas que hemos mencionado tampoco supuso un incremento importante en lo referente a la especificidad de dichas pruebas.

Por otra parte, dichos métodos, por su naturaleza y/o baja sensibilidad, no permiten la determinación de anticuerpos de clase IgE que, según hemos indicado, es la más específica y frecuente en la anisakuosis. Además, como es lógico, la determinación de la misma resulta imprescindible en los casos en que tan sólo se producen manifestaciones alérgicas.

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia indirecta fue utilizada a principios de la década de 1970 sobre secciones histológicas de *Anisakis*, pero también se observó la existencia de fuertes reacciones cruzadas con otras helmintosis. Sin embargo, más recientemente fue empleada con éxito para confirmar un caso de anisakuosis intestinal, comprobándose que los anticuerpos presentes en el suero del paciente reconocían mayoritariamente los órganos larvarios implicados en la producción de los antígenos de excreción/secreción. La sensibilidad de la técnica puede alcanzar el 95% de los casos en los primeros 10-30 días que siguen a la infestación pero, como hemos comentado, carece de la especificidad necesaria como para que pueda ser utilizada actualmente en diagnóstico humano de la anisakuosis. Sin embargo, cuando se utilizan anticuerpos específicos para antígenos de *Anisakis* (ej. anticuerpos monoclonales, véase más adelante) posiblemente la inmunofluorescencia y/o la inmunohistoquímica sean herramientas de gran utilidad para la identificación del nematodo en la pared del estómago o del intestino (ya sea en una biopsia o en una pieza operatoria) cuando el parásito se halle parcialmente destruido y no sea posible la identificación morfológica en el corte histológico.

RAST (radioallergosorbent test)

Al ser la IgE una inmunoglobulina muy minoritaria en el suero, para su determinación fue necesario el desarrollo de técnicas inmunológicas que detectasen biomoléculas en el rango de nanogramos/ml. El desarrollo del RAST en 1968 o, posteriormente, las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA y FEIA, ver más adelante), que permiten la determinación cualitativa o cuantitativa de los niveles de IgE específica frente a un alérgeno, vino a solucionar este problema. Como es sabido, el RAST se basa en la inmovilización del alérgeno de interés en un soporte sólido (matriz sintética de Sephadex, agarosa, disco de papel, etc.). El soporte recubierto con el alérgeno es incubado con el suero del paciente y los anticuerpos de todas las clases se pegan al mismo. A continuación las partículas se lavan y se procede a una segunda incubación con un segundo anticuerpo marcado radiactivamente (ej. anti-IgE humana marcada con ^{125}I). Posteriormente, el soporte se lava y la radiactividad ligada al mismo se mide en un contador de radiactividad, siendo ésta proporcional a la concentración de IgE específica contenida en el suero objeto de estudio. Los resultados se pueden transformar en unidades internacionales utilizando una curva patrón obtenida a partir de un suero de referencia (estándar) o en unidades de masa si se puede disponer de concentraciones conocidas de IgE. Es importante destacar que la matriz utilizada para inmovilizar el alérgeno debe tener capacidad para unir un exceso del mismo; en caso contrario, otras clases de anticuerpo mayoritarias (ej. IgG) podrían desplazar a los anticuerpos IgE objeto de estudio.

En el caso de la anisakirosis, el RAST fue utilizado para la determinación de IgE específica a partir de 1980 y permitió detectar entre el 77 y el 100% de los casos, dependiendo de los estudios. A diferencia de otras inmunoglobulinas como la IgG o IgM, la determinación de IgE anti-*Anisakis* resultó mucho más específica. Con frecuencia se observaron valores de hasta 10000 U a las 3-5 semanas postinfestación frente a las 30-50 U observadas en población normal o en individuos con otros trastornos alérgicos. A pesar del aparente éxito inicial, esta metodología tampoco estaba exenta de limitaciones, particularmente en lo referente a la utilización de materiales radiactivos. Por esta razón, el RAST fue cayendo en desuso en favor de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA, FEIA, etc.). Además presenta los mismos problemas de inespecificidad que afectan a estas últimas (ver más adelante).

Técnicas inmunoenzimáticas (ELISA, FEIA)

El desarrollo a lo largo de la década de 1980 de los métodos inmunoenzimáticos (ej. ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* y FEIA: *fluorescent enzyme immunoassay*) fue relegando paulatinamente a las técnicas basadas en marcaje radiactivo tanto por su peligrosidad potencial como por los problemas en la eliminación de residuos, inversión en aparataje específico, etc. que conlleva tal metodología. De manera similar al RAST, en los sistemas ELISA/FEIA (método indirecto), el antígeno o alérgeno se une a un soporte sólido (habitualmente placas de poliestireno de 96 pocillos) y se incuba con el suero del paciente, cuyos anticuerpos se pegarán al antígeno. Posteriormente, los anticuerpos de las distintas clases que se hayan unido al antígeno se pueden determinar mediante un segundo anticuerpo ligado covalentemente a un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc) que reconozca específicamente la clase o clases de anticuerpo humano que queremos determinar (anti-IgE, anti-IgG, etc). Finalmente, se añade un sustrato específico para el enzima y, después de un tiempo de reacción, se mide la cantidad de producto coloreado que se ha producido y que es proporcional a la cantidad de anticuerpo primario que se haya unido al antígeno/alérgeno. La diferencia básica entre los ensayos ELISA y FEIA es que los primeros utilizan sustratos cromogénicos, mientras que los segundos emplean sustratos fluorescentes y, en general, presentan una capacidad de detección superior a los primeros.

Al igual que con otras técnicas precedentes, los primeros estudios realizados con metodología ELISA a finales de 1980 y durante 1990 se vieron condicionados fundamentalmente por el tipo de antígeno utilizado (frecuentemente, antígeno total del parásito o antígenos de excreción/secreción), por la clase de inmunoglobulina detectada y por el tiempo transcurrido entre la aparición de los síntomas y la extracción

de la muestra sérica. En este sentido, las reactividades cruzadas con antígenos de *Ascaris* y *Toxocara* (pertenecientes, al igual que *A. simplex*, a la Superfamilia Ascaridoidea) y probablemente también de otros parásitos y microorganismos, seguían siendo un problema a resolver, particularmente en lo referente a la determinación de anticuerpos de las clases IgM e IgG.

Como hemos indicado, la determinación de IgE anti-*Anisakis* es mucho más específica que la medición de otras inmunoglobulinas séricas y, de hecho, no resulta difícil alcanzar positivities superiores al 95% en pacientes con anisakirosis gástrica confirmada. Por tal motivo algunas casas comerciales han diseñado y comercializado sistemas de diagnóstico utilizando antígenos totales o una fracción de los mismos para la determinación de este isotipo.

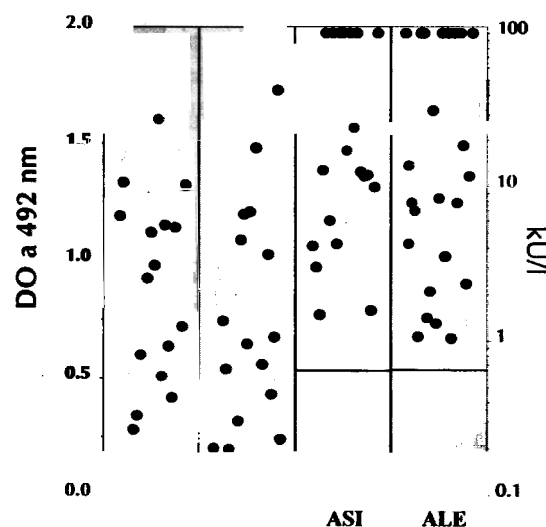
Uno de los métodos que presentan una mayor detectabilidad en la determinación de IgE específica frente a *Anisakis* es el INMUNOCAP (Pharmacia-Upjohn), un ensayo FEIA que continúa siendo el método de laboratorio más empleado por los alergólogos para cuantificar los niveles de IgE anti-*Anisakis* en el suero de pacientes sensibilizados frente a alérgenos del parásito. Esta técnica utiliza un soporte sólido con capacidad para unir un exceso de alérgenos, que impide que se bloquee la unión de la IgE (minoritaria), por parte de otras inmunoglobulinas. Sobre esta fase sólida se hace reaccionar el suero del paciente que, en caso de contener inmunoglobulinas IgE específicas, se unirán a los antígenos inmovilizados. A continuación, las IgE humanas se detectan mediante un anticuerpo anti-IgE, marcado con un enzima. Finalmente, se añade un sustrato, que por acción enzimática se transforma en un producto fluorescente.

Al igual que otros métodos precedentes hoy sabemos que al no utilizar antígenos de probada especificidad el INMUNOCAP puede producir un buen número de falsos positivos debidos a reactividades cruzadas, particularmente debido a la presencia de azúcares que están representados sobre un buen número de antígenos del parásito (ver más adelante). Además, este método está diseñado para la determinación de IgE exclusivamente, con lo cual para cuantificar otros isotipos hay que recurrir a otras técnicas.

La introducción de la metodología de anticuerpos monoclonales para permitir el reconocimiento de antígenos definidos y específicos ha traído mejoras sustanciales en el serodiagnóstico de la anisakirosis y/o de la alergia atribuida al parásito. Con estos reactivos inmunológicos resulta posible realizar ensayos ELISA-captura, en los cuales un anticuerpo monoclonal unido a la fase sólida se encarga de capturar el antígeno específico de interés, para así evitar las reactividades cruzadas que se puedan producir por la presencia de otros antígenos contenidos en la mezcla antigénica. Los primeros estudios que utilizaron esta metodología fueron llevados a cabo por investigadores japoneses que ensayaron un anticuerpo monoclonal, denominado An2, que reconocía un antígeno de excreción/secreción (heterodímero de 40-42 kD), para detectar anticuerpos no reagénicos (IgA-M-G) e IgE en pacientes con anisakirosis confirmada (visualización/extracción de la larva mediante gastroscopia). Dichos estudios, aunque prometedores, no sobrepasaron una capacidad de detección del 82% de los pacientes con anisakirosis confirmada en las fases tempranas de la enfermedad referida a anticuerpos IgE. Los porcentajes correspondientes a otras inmunoglobulinas fueron mucho más bajos.

Más recientemente, nuestro grupo ha desarrollado también un panel de anticuerpos monoclonales en ratones, uno de los cuales, denominado UA3, se ha probado con éxito en el desarrollo de un método ELISA-captura (ELISA-UA3) que permite la determinación de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes sensibilizados frente a antígenos de *Anisakis*. De manera similar al INMUNOCAP, este método también presenta una alta sensibilidad/detectabilidad. En la valoración de dicho método se han empleado sueros de pacientes con anisakirosis confirmada, pacientes con manifestaciones clínicas de alergia al parásito y población supuestamente sana (grupo control). La demostración de la parasitación fue realizada por observación directa (fibrogastroscopia) o bien en el postoperatorio mediante demostración de la larva entera o parcialmente destruida en la pieza operatoria. Estos pacientes, presentaban además dolor abdominal de pocas horas de evolución y antecedentes de ingestión de pescado crudo. Por su parte, la población alérgica fue catalogada como tal en base a tres criterios: a) manifestaciones alérgicas (urticaria/

angioedema o anafilaxia) en las primeras 6 horas después de la ingesta de pescado; b) prueba de anafilaxia cutánea (*prick-test*) positiva con extracto total de *Anisakis*; c) ausencia de alergia conocida a pescado o a otros alérgenos conocidos. La población normal se seleccionó entre donantes de sangre que no presentaban anticuerpos IgE mediante la prueba INMUNOCAP para *Anisakis*. Tomando como referencia la media de los valores de densidad óptica (DO) del grupo control, el método ELISA-UA3 fue capaz de detectar valores de IgE por encima del valor de corte establecido (media + 4 DE) en el 100% de los casos de anisakirosis y alergia (Figura 15).



Pero además de presentar una excelente detectabilidad/sensibilidad hay que destacar que el ensayo ELISA-UA3 no presentó los problemas de reactividad cruzada de los métodos precedentes. En un estudio reciente efectuado por nuestro laboratorio con sueros de dos poblaciones de Sudamérica (36 sueros de niños y 78 sueros de adultos) que, por su aislamiento geográfico y bajo nivel económico, no tenían posibilidad de ingerir peces de agua salada y que, por lo tanto, nunca habían estado en contacto con antígenos de *Anisakis*, se ha podido constatar que mientras el ensayo INMUNOCAP generaba entre un 45-55% de falsos positivos (ver Figura 16), el ensayo ELISA-UA3 se mantenía en el 100% de especificidad. Aunque las mencionadas comunidades padecen con frecuencia parasitaciones por nematodos intestinales (algunos relacionados con *Anisakis*) no se ha podido demostrar que el número de falsos positivos obtenidos mediante INMUNOCAP estuviese relacionado con la presencia de algún parásito en particular.

En base a estos resultados, el método ELISA-UA3 debe ser considerado hoy por hoy el procedimiento estándar para la determinación de anticuerpos específicos anti-*Anisakis*.

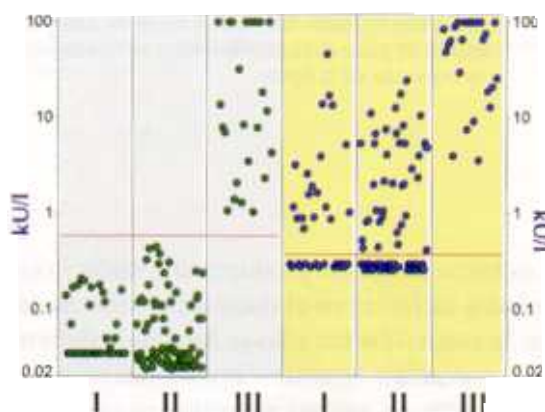


Figura 16. Niveles séricos (kU/l) de IgE anti-*Anisakis* medidos en un ensayo ELISA-UA3 (sombreado gris) o mediante el método INMUNOCAP (sombreado amarillo), en tres poblaciones distintas de sujetos. Se estudiaron dos poblaciones que nunca estuvieron en contacto con *A. simplex*: población I (constituida por 36 sueros de niños argentinos (Resistencia)) y población II (constituida por 78 sueros de adultos procedentes de Táchira (Venezuela)). La tercera población la constituyeron 24 pacientes españoles con alergia a *Anisakis* (III). Cada punto representa la media del valor de kU/l obtenido para cada suero individual ensayado por duplicado. Los valores de IgE se expresan como kU/l calculadas a partir de una curva de calibración obtenida al ensayar un suero de referencia con concentración (kU/l) conocida de IgE.

Inmunotransferencia (Western blot)

La separación de los antígenos básicamente en función del peso molecular de los mismos utilizando geles de poliacrilamida y su transferencia posterior a un soporte de nitrocelulosa o nylon para ser posteriormente detectados por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes, constituye la base de esta técnica que tiene, en general, una gran especificidad junto con una sensibilidad/detectabilidad aceptables.

La determinación de anticuerpos anti-*Anisakis* por este método se ha mostrado más eficaz utilizando antígenos somáticos del parásito que cuando se emplearon antígenos de excreción/secreción. Además, en lo referente a los isotipos, se ha podido constatar que, de manera similar a otros métodos ya descritos, tan sólo la determinación de anticuerpos IgE produce resultados aceptables.

Desde el punto de vista de la especificidad, esta técnica tiene la ventaja de que permite la separación previa de los antígenos antes de ser incubados con el suero de los pacientes, con lo cual es posible visualizar frente a cuál o cuáles antígenos parasitarios se está produciendo la respuesta. Ello ha posibilitado que algunos autores llegaran a proponer patrones de bandeo determinados para agrupar las distintas respuestas IgE que se observan en los pacientes con alergia a *Anisakis*. Sin embargo, dado que todavía no se ha podido demostrar que los antígenos reconocidos sean verdaderamente específicos del parásito, la utilidad de la técnica es cuestionable. Es más, en un estudio reciente llevado a cabo por nosotros comparando los patrones de reconocimiento de los anticuerpos IgE presentes en los sueros de pacientes con alergia a *Anisakis* y sueros de pacientes pertenecientes a colectividades libres de *Anisakis* (poblaciones Sudamericanas, ya mencionadas antes) no hemos podido establecer ninguna banda que pudiera ser considerada específica de *Anisakis* mediante esta técnica (ver Figura 17). Este hecho, unido a la menor detectabilidad y mayor coste de este método frente a los sistemas ELISA condicionan su utilización.

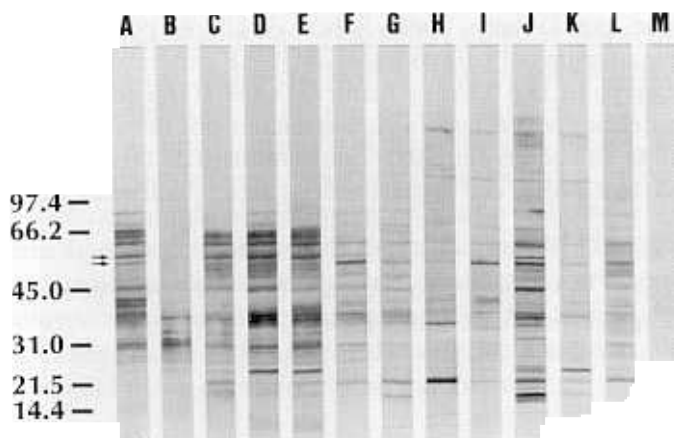


Figura 17. Inmunotransferencia (Western blot) de los antígenos somáticos de *A. simplex* revelando la presencia de anticuerpos IgE en sueros de distintos individuos. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Canales A-E: sueros de pacientes alérgicos a *A. simplex* (CAP: 51.9, 26.0, 58.3, 84.8, >100 kU/l respectivamente); canal F: mezcla de sueros de 8 sujetos de la población negativa I (ver Fig. 16) (valor medio de CAP: 12 kU/l); canales G-L: sueros de individuos de la población negativa II (ver Fig. 16) (todos los sueros tenían resultado de CAP positivo, con niveles de IgE anti-*Anisakis* de 6.85, 11.2, 6.94, 24.6, 7.64, 11 kU/l respectivamente); canal M: control negativo. Los marcadores de peso molecular (en kDa) se representan a la izquierda de la figura.

DATOS DE LABORATORIO COMPLEMENTARIOS

Tanto en las formas intestinales como en las gástricas es frecuente que se produzca una leucocitosis intensa de manera similar a como ocurre con otras enfermedades incluidas en el diagnóstico diferencial (íleo agudo, apendicitis, etc.). En los casos gástricos agudos, la eosinofilia tan sólo se ha podido demostrar en alrededor de un tercio de los enfermos. En estos casos el porcentaje de eosinófilos no suele superar el 10%. En los casos intestinales, el nivel de eosinófilos suele estar en valores normales en el estadio

inicial de la enfermedad aguda y, por tanto, en el momento del diagnóstico. En algunos pacientes, los niveles pueden elevarse a las dos semanas de la presentación de la enfermedad para descender finalmente a la tercera semana. Cuando existe fluido ascítico, éste puede contener hasta un 30% de eosinófilos, lo que resulta importante para el diagnóstico. En estos casos, se recomienda el estudio bacteriológico del mismo para tratar una eventual infección bacteriana asociada.

PAUTAS A SEGUIR EN EL DIAGNÓSTICO

La sospecha de anisakirosis debe establecerse para todos aquellos pacientes que presenten un cuadro clínico gástrico o intestinal que curse con malestar o dolor abdominal, con antecedentes de ingesta de pescado marino crudo o insuficientemente cocinado en las 6-48 horas anteriores a la presentación de la manifestaciones clínicas. Asimismo, se debe sospechar alergia a *Anisakis* en todos los episodios relacionados con la ingesta de alimentos entre los que se encuentre el pescado de mar. El procedimiento a seguir en el diagnóstico de las distintas formas clínicas de la enfermedad se resume en la **Figura 18**. Como se puede observar, cuando la sospecha de parasitación recae sobre una víscera hueca (ej. estómago) que es accesible desde el exterior, la fibrogastroscopia es el método diagnóstico de elección. Sin embargo, tanto en los casos que sólo presentan manifestaciones alérgicas como en aquellos en los que sea necesario descartar que la larva no se encuentre en un lugar no accesible al fibroscopio, es necesario recurrir a métodos de diagnóstico indirectos, como las pruebas cutáneas o las pruebas serológicas.

Como se puede apreciar en la **Tabla 6**, de todas las técnicas serológicas disponibles en la actualidad, tan sólo el método ELISA-UA3 ofrece seguridad en el diagnóstico, puesto que combina especificidad y detectabilidad adecuadas. Actualmente se están haciendo pruebas para la adaptación de este método a los sistemas de diagnóstico empleados rutinariamente en hospitales.

Características	Método			
	UA3 ELISA	WB	CAP	Prick
• Antígeno	Específico	Total ¹	Total ²	Total
• Isotipos	Todos	Todos	IgE	IgE ³
• Cuantitativo	Si	No	Si	No
• Respuesta individualizada para antígeno/s de interés	Si	Si	No ⁴	No ⁴
• Especificidad	Alta	Baja	Baja	Baja
• Detectabilidad	+++	++	++++	++

Tabla 6. Características de los diversos métodos empleados para evaluar la alergia frente a los alérgenos de *A. simplex*. ¹Los componentes de la mezcla antigénica son separados en SDS-PAGE. ²El extracto total se somete previamente a fraccionamiento. ³Liberación de mediadores de la inflamación dependiente de IgE. ⁴Se podrá realizar cuando se disponga de antígenos individuales.

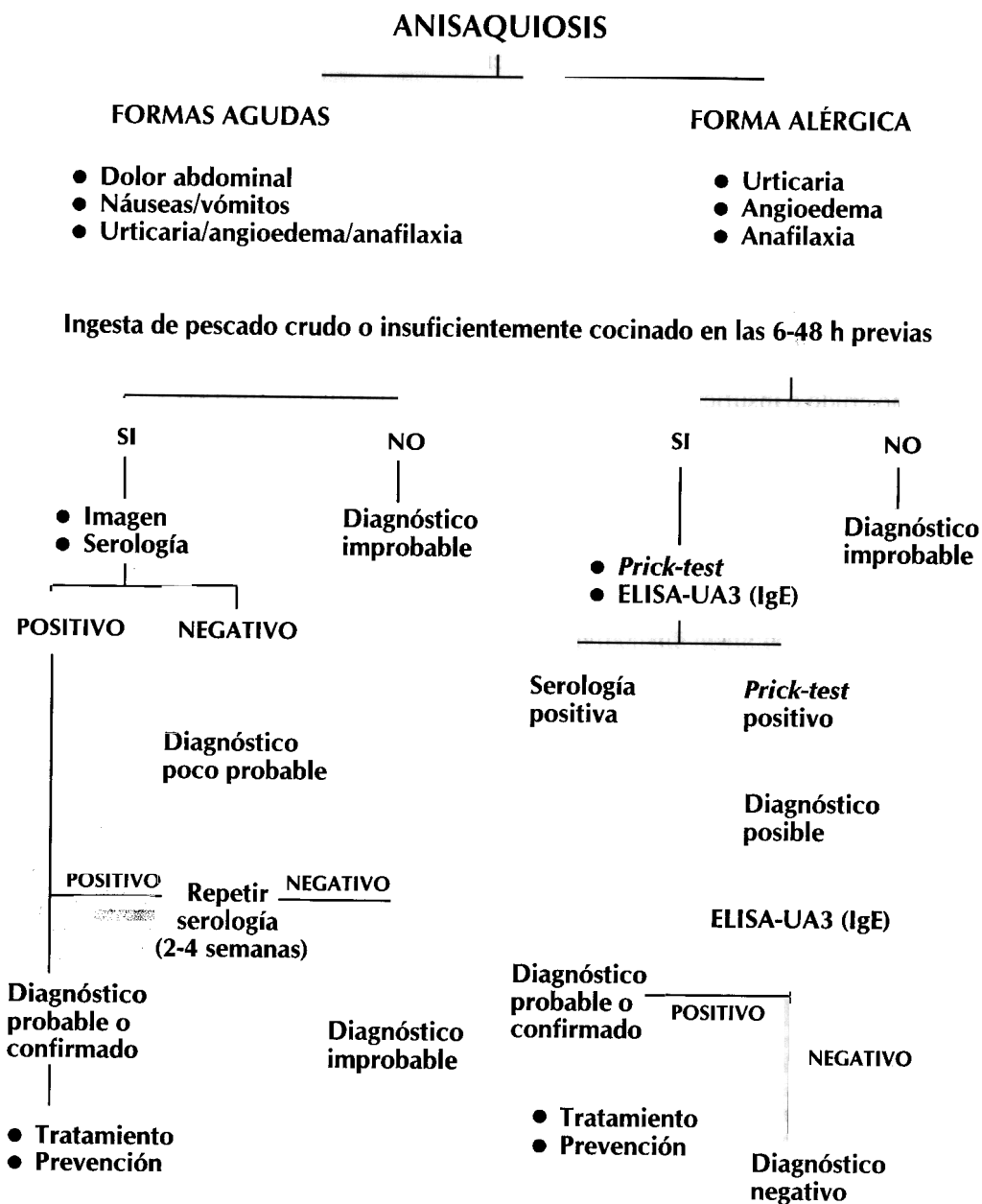


Figura 18. Representación esquemática de las pautas a seguir en el diagnóstico de las diferentes formas clínicas de la anisakirosis

9. TRATAMIENTO

La anisakirosis aguda puede ser fácilmente tratada por técnicas endoscópicas cuando la larva se localiza en la pared del estómago, duodeno o colon. Después de la extracción de la larva, llevada a cabo con ayuda de un forceps de biopsia, los síntomas revierten rápidamente. Por el contrario, cuando la larva se asienta en localizaciones inaccesibles para el fibroscopio y no puede ser visualizada, se suele recurrir al tratamiento mediante laparotomía y resección de la zona afectada. No obstante, hay que resaltar que el pronóstico de la anisakirosis intestinal aguda es normalmente bueno y que la sintomatología desaparece espontáneamente en las primeras dos semanas de infestación. Por lo tanto, cuando las manifestaciones clínicas, el diagnóstico por imagen y la anamnesis sugieran la existencia de esta enfermedad, la administración de una terapia conservadora a base de antibióticos, anticolinérgicos y/o corticoesteroides es suficiente para su curación. En el caso de las formas crónicas se recomienda una resección parcial de la zona afectada para evitar una posible exacerbación alérgica de la lesión. Algunos autores han sugerido que determinados medicamentos como el tiabendazol, el flubendazol o el mebendazol podrían tener aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de la anisakirosis. Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado ningún antihelmíntico eficaz para el tratamiento de esta parasitosis.

10. BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Audicana, M.T.; del Pozo, M.D.; Iglesias, R. y Ubeira, F.M.** (2000). *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens*. En: International Handbook on Food Borne Pathogens. (Eds. Miliotis, M. y Bier, J.) Marcell Dekker, Columbia (en prensa).
- García, M.; Moneo, I.; Audicana, M.T.; del Pozo, M.D.; Muñoz, D.; Fernández, E.; Díez, J.; Etxenagusia, M.; Ansotegui, I. y Fernández de Corres, L.** (1997). The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99: 497-501.
- Iglesias, R.** (1998). La anisaquiosis y su diagnóstico. Tesis doctoral. (Ed. Ubeira, F.M.) Imprenta Universitaria, Santiago de Compostela, 144 pp.
- Ishikura, H. y Kikuchi, K.** (1990). Intestinal anisakiasis in Japan. Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. (Eds. Ishikura, H. y Kikuchi, K.) Springer-Verlag, Tokyo, 265 pp.
- Ishikura, H.; Kikuchi, K.; Nagasawa, K.; Ooiwa, T.; Takamiya, H.; Sato, N. y Sugane, K.** (1993). Anisakidae and anisakidosis. En: Progress in clinical parasitology. Vol. III. (Ed. Sun, T.) Springer-Verlag, New York, pp.: 43-102.
- Ishikura, H. y Namiki, M.** (1989). Gastric anisakiasis in Japan. Epidemiology, diagnosis, treatment. (Eds. Ishikura, H. y Namiki, M.) Springer-Verlag, Tokyo, 144 pp.
- Lorenzo, S.; Iglesias, R.; Leiro, J.; Ubeira, F.M.; Ansotegui, I.; García, M. y Fernández de Corres, L.** (2000). Usefulness of currently available methods for the diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. *Allergy* 55: 627-633.
- Lorenzo, S.; Iglesias, R.; Audicana, M.T.; García-Villaescusa, R.; Pardo, F.; Sanmartín, M.L. y Ubeira, F.M.** (1999). Human immunoglobulin isotype profiles produced in response to antigens recognized by monoclonal antibodies specific to *Anisakis simplex*. *Clinical and Experimental Allergy* 29: 1095-1101.
- Lorenzo, S.; Romarís, F.; Iglesias, R.; Audicana, M.T.; Alonso, J.M.; Leiro, J. y Ubeira, F.M.** (2000). O-glycans as a source of cross-reactivity in determinations of human serum antibodies to *Anisakis simplex* antigens. *Clinical and Experimental Allergy* 30: 551-559.
- Pereira Bueno, J.M.** (1992). Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisaquiosis. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Dirección General de Salud Pública, 64 pp.
- Sanmartín, M.L.; Quinteiro, P.; Iglesias, R.; Santamarina, M.T.; Leiro, J. y Ubeira, F.M.** (1994). Nematodos parásitos en peces de las costas gallegas. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, 80 pp.
- Sugane, K. y Sun, S.** (1994). Detection of anti-helminth antibody by microenzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen and anti- β -galactosidase monoclonal antibody. *Journal of Immunological Methods* 168: 55-60.