

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) en relación a la alergia a *Anisakis*

Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Elena Alonso Lebrero, José Manuel Barat Baviera, María Pilar Conchello Moreno, Ramón Estruch Riba, María Antonia Ferrús Pérez, Guillermina Font Pérez, Susana Guix Arnau, Arturo Hardisson de la Torre, Ángeles Jos Gallego, Ascensión Marcos Sánchez, Amelia Marti del Moral, Olga Martín Belloso, María Aránzazu Martínez Caballero, Alfredo Palop Gómez, Gaspar Pérez Martínez, José Luis Ríos Cañavate, Gaspar Ros Berrueto, Jesús Ángel Santos Buelga, Jesús Simal Gándara, Josep Antoni Tur Marí

Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Número de referencia: AECOSAN-2016-004

Documento aprobado por la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico en su sesión plenaria de 21 de septiembre de 2016

Grupo de trabajo

Elena Alonso Lebrero (Coordinadora)
Susana Guix Arnau
Alfredo Palop Gómez
Gaspar Ros Berrueto
Jesús Ángel Santos Buelga

Resumen

La anisakiosis y la alergia a *Anisakis* son un problema sanitario especialmente importante en países que, como España, tienen un elevado consumo de pescado. La alergia a *Anisakis* puede producir manifestaciones de reacción alérgica (hipersensibilidad) de tipo inmediato que van desde la urticaria o angioedema al choque anafiláctico, así como cuadros mixtos con manifestaciones clínicas gastrointestinales y alérgicas.

En los últimos años se han producido avances en el conocimiento científico en esta materia, en relación a la alergenidad del parásito muerto y a la posible aparición de clínica en relación a la ingestión del pescado tratado según las normas recomendadas, lo que representaría un peligro para los alérgicos. Por todo ello se ha solicitado a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) que se revise y valore la información disponible actualmente sobre alergia a *Anisakis*.

La bibliografía científica publicada hasta la fecha de elaboración de este informe, y consultada al efecto para redactarlo, no muestra evidencias clínicas actuales que permitan afirmar que el parásito muerto represente un peligro para los consumidores alérgicos a *Anisakis*.

Sin embargo, el reconocimiento inmunológico de diversos antígenos termoestables, demostrado aun después de aplicar los métodos de procesamiento recomendados, no permite descartar totalmente que pueda existir riesgo de reacción alérgica en algunas personas sensibilizadas a éstos.

Palabras clave

Alérgenos, alergia alimentaria, *Anisakis*, anisakiosis, parasitosis, pescado, prevención.

Report from the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) on allergy to *Anisakis*

Abstract

Anisakiasis and allergy to *Anisakis* are a particularly significant health concern in countries such as Spain with a high level of fish consumption. Allergy to *Anisakis* may produce immediate signs of allergic reaction (hypersensitivity) ranging from urticaria or angioedema to anaphylactic shock, and mixed symptoms with gastrointestinal and allergic clinical manifestations.

In recent years, progress has been made in the scientific knowledge in this area, in relation to the allergen potential of the dead parasite and the possible clinical appearance with respect to the intake of fish treated in accordance with recommended standards, implying a risk for allergic individuals. Consequently, the Food Safety and Nutrition Section of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs, Food Safety and Nutrition (AECOSAN) has been asked to review and assess the currently available information on allergy to *Anisakis*.

The scientific bibliography published up to the date of publication of this report, and consulted in order to write the report, does not show current clinical evidence to confirm that the dead parasite is a health concern for consumers who are allergic to *Anisakis*.

Nevertheless, the immunological recognition of different thermostable antigens, demonstrated even after applying the recommended methods of treatment, does not permit the total rejection of the possibility of risk of allergic reaction in those individuals who are sensitive to these.

Key words

Allergens, food allergy, *Anisakis*, anisakiasis, parasitosis, fish, prevention.

1. Introducción

La anisakiosis y la alergia a *Anisakis* son un problema sanitario especialmente importante en países que, como España, tienen un elevado consumo de pescado. La alergia a *Anisakis* puede producir manifestaciones de reacción alérgica (hipersensibilidad) de tipo inmediato que van desde la urticaria o angioedema al choque anafiláctico, así como cuadros mixtos con manifestaciones clínicas gastrointestinales y alérgicas. En 2005 el Comité Científico emitió un informe en relación a los factores favorecedores de la aparición de alergia a *Anisakis* y las medidas de prevención aplicables para garantizar la muerte del parásito antes del consumo de pescado (AECOSAN, 2005).

Desde entonces se han producido avances en el conocimiento científico en esta materia, en relación a la alergenicidad del parásito muerto y a la posible aparición de clínica en relación a la ingestión del pescado tratado según las normas recomendadas, lo que representaría un peligro para los alérgicos. Por todo ello se ha solicitado a la Sección de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) que se revise y valore la información disponible actualmente sobre alergia a *Anisakis*.

1.1 Antecedentes

En 2005 el Comité Científico de la AECOSAN emitió un informe en relación a los factores favorecedores de la aparición de alergia a *Anisakis* y las medidas de prevención aplicables (AECOSAN, 2005). En 2006 se publicó el Real Decreto 1420/2006, de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades (BOE, 2006). Posteriormente a través de otro informe del Comité Científico y centrándose sobre medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de *Anisakis* (AECOSAN, 2007) se difundieron indicaciones acerca de los tratamientos térmicos más seguros a los que se debe someter el pescado destinado a ser consumido cocinado o en preparados crudos.

En este último documento se proporcionan unas recomendaciones destinadas tanto al consumidor como a la restauración colectiva en relación al tratamiento térmico del pescado destinado a consumirse cocinado y al que se consumiría crudo. Estas recomendaciones, que están basadas en la aceptación de la no alergenicidad de las larvas muertas del parásito se describen a continuación:

1. Respecto al pescado consumido cocinado

Se consideran seguros desde el punto de vista de la inactivación del parásito los productos cocinados completamente, es decir, hervidos y fritos, dado que en tales tratamientos se alcanzan temperaturas superiores a los 90 °C y 170 °C, respectivamente.

Se proporcionan pautas para aumentar la seguridad del pescado cocinado a la plancha, que incluyen normas como considerar “pescado bien hecho” cuando se verifique que “la carne se separa sin dificultad de la espina” y que posee un “aspecto mate típico de las proteínas coaguladas”. Respecto a otro tipo de cocinado se incluyen recomendaciones para cocción en microondas, recomendándose voltear la pieza y dejar reposar tapado 2 minutos para garantizar condiciones térmicas adecuadas. Si no se cumplieran estas condiciones se recomienda someter a congelación previa.

2. Respecto al pescado consumido sin cocinar

Congelación: La normativa establece que los productos de la pesca que vayan a ser consumidos crudos o prácticamente crudos deberán congelarse a una temperatura igual o inferior a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ alcanzada en la totalidad del producto, no solo en superficie, durante un período de, al menos, 24 horas o a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un periodo mínimo de 15 horas. Se recomienda congelar los pescados marinados y escabechados y pescados salados si la concentración de sal no alcanza un nivel del 9 % mantenido durante 6 semanas. Este tratamiento es también obligatorio para procedimientos de cocinado en los que la temperatura en el interior de la pieza no sobrepasa los $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, como los productos ahumados en frío.

Todas estas medidas se han venido considerando seguras para la destrucción de la larva viva, que se ha considerado hasta el momento es la única que puede causar síntomas en individuos alérgicos a *Anisakis*. Sin embargo desde la implantación de estas medidas se han producido tanto notificaciones de reacciones alérgicas como nuevos avances en el reconocimiento inmunológico de antígenos del *Anisakis*, incluso muerto, por lo que cabe preguntarse si estas recomendaciones son suficientes para garantizar la seguridad del consumidor.

2. Avances en el conocimiento de la antigenicidad del *Anisakis*

Actualmente, y dentro de la práctica clínica habitual, se acepta que resulta necesaria la infección activa, por larva viva, para que se desencadene una reacción alérgica. Por tanto, se asume que los tratamientos térmicos que se indican siguiendo las pautas proporcionadas por el Comité Científico de la AECOSAN (2007) y las recomendaciones europeas (UE, 2004) (EFSA, 2010) resultan seguros. Esta presunción se basa y se confirma por los trabajos experimentales de los autores que han comprobado que pacientes sensibilizados y con clínica anterior, y sobre los que se realizó prueba de exposición controlada, presentaron tolerancia a la ingestión de parásitos previamente congelados (Alonso et al., 1998) (López Serrano et al., 2000) (Alonso-Gómez et al., 2004), larvas muertas liofilizadas (Sastre et al., 2000) o antígeno excretor secretor (Baeza et al., 2004). Es de destacar que en estos estudios se realizó un seguimiento clínico posterior de los pacientes, durante periodos largos de meses o años, y que durante éste los pacientes continuaban con dieta, con el pescado tratado según recomendaciones estándar de evitación de riesgo, sin que presentaran síntomas.

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que solo el parásito vivo sería capaz de provocar la clínica, o lo que es lo mismo, que los alérgenos de *Anisakis simplex* sólo interactúan con el sistema inmune del hospedador cuando el parásito los inocula en sus tejidos (Alonso-Gómez et al., 2004) por lo que resulta necesaria la ingestión de la larva viable para desencadenar una reacción alérgica. Del mismo modo, en estudios experimentales con ratas inoculadas con larvas vivas y larvas muertas de *Anisakis*, solamente se observó un aumento de la reactividad, medida por parámetros inmunológicos IgM e IgE, en los animales inoculados con larvas vivas (Abe y Teramoto, 2014).

Sin embargo, otros autores han descrito que algunos individuos refieren haber sufrido síntomas con alimentos congelados, enlatados o cocinados según las normas indicadas oficialmente (Alonso et al., 1997) (Audicana, 2001) (Audicana et al., 2002) (Falcão et al., 2002) (Caballero y Moneo, 2004) (Moneo et al., 2005) (Armentia et al., 2006) (Moneo et al., 2007). De ser esto cierto, algunos antígenos

nos termoestables procedentes de larvas muertas, o incluso también alérgenos resistentes a la digestión por proteasas gástricas, podrían ser capaces de provocar manifestaciones alérgicas en individuos sensibilizados previamente.

Estas discrepancias entre las dos hipótesis, podrían justificarse por varias causas:

- El reconocimiento por algunos de estos pacientes de antígenos resistentes al tratamiento térmico. Es posible que existan diferentes tipos de pacientes alérgicos que podrían reconocer diferentes antígenos incluso procedentes de larva muerta, lo cual podría hacer necesario recomendar diferentes medidas dietéticas, en función de las características de las proteínas a las que estén sensibilizados.
- La permanencia de larvas activas aun utilizando las medidas recomendadas.
- Baja adherencia a las recomendaciones.

2.1 Antígenos de elevada resistencia

Actualmente se han caracterizado hasta 28 alérgenos para *Anisakis simplex* (Arcos et al., 2014). Algunos de estos alérgenos presentan una elevada resistencia tanto a distintos rangos de temperatura, como a la degradación por proteasas, lo cual hace pensar que la infección con larva viva no sería imprescindible para causar sintomatología (Solas et al., 2008). A partir de los datos de reconocimiento de dichos antígenos por el suero de pacientes se extrapola que el reconocimiento podría justificar la sintomatología que se presenta en algunos casos.

Por otro lado, la exposición a determinados alérgenos de *Anisakis simplex* también podría ocurrir por consumo de algunas zonas de pescado que contuvieran antígenos secretores pero en las cuales la larva intacta ya no estuviera presente, bien por haber sido eliminada, o por consumirse partes no habitualmente parasitadas desechando las más afectadas (Audicana y Kennedy, 2008).

La mayoría de los estudios publicados recientemente se centran en la descripción y caracterización de alérgenos resistentes térmicamente, empleando sueros de pacientes sensibilizados (Caballero y Moneo, 2004) (Caballero et al., 2008). Se trata de estudios fundamentalmente *in vitro* en los que se han incluido sueros de pacientes que refieren, hasta en un 20 % de los casos en algunas series, haber presentado síntomas con pescado procesado según las recomendaciones de evitación de riesgo (Moneo et al., 2007). Hasta un 30 % de los pacientes reconocieron alérgenos *in vitro* tras tratamiento térmico del producto. Estos alérgenos resistentes podrían explicar la aparición de síntomas tras la ingesta de pescado cocinado o en conserva.

Asimismo, se ha descrito la capacidad de antígenos termoestables para inducir una respuesta celular semejante a la de los antígenos sin tratar térmicamente (González-Muñoz et al., 2010). En otro trabajo de este mismo grupo, aceptando "a priori" la alergenicidad de las proteínas termoestables, se ha desarrollado una técnica muy sensible para valorar cuantitativamente (hasta 1 ppm de Ani s4) la presencia de antígenos reconocidos por suero de pacientes, en pescados tratados mediante congelación (-20 °C durante 11 meses) y en pescado cocinado (Rodríguez-Mahillo et al., 2010).

Otros grupos de investigadores han identificado algunos de los alérgenos termoestables de *Anisakis*, que podrían tener interés de cara a ser usados como alérgenos recombinantes para mejorar

la especificidad del diagnóstico, en los pacientes sensibilizados. Se describen así el Ani s5 (Caballero et al., 2011), Ani s7, Ani s9 (Kobayashi et al., 2007) (Rodríguez et al., 2008) (Rodríguez-Pérez et al., 2008), Ani s10 (Caballero et al., 2011), Ani s7 (Cuellar et al., 2012) (Fæste et al., 2014), Ani s13 (González-Fernández et al., 2015) y Ani s11 (Carballeda-Sangiao et al., 2016).

Asimismo se ha determinado la presencia de alérgenos tras someter al pescado a condiciones semejantes a las correspondientes a la conservación enlatada, con diferentes grados de calor y tiempo, desde 90 °C durante 30 minutos, hasta 115 °C durante 90 minutos. Se obtuvo una disminución del reconocimiento de Ani s4 pero se confirmó que persistía antigenicidad residual (Tejada et al., 2015).

En otra publicación dentro de esta misma línea, tras aplicación de calentamiento en autoclave a 121 °C durante 20, 40, y 80 minutos (Carballeda-Sangiao et al., 2014), se advierte que se conserva la capacidad de activación de basófilos aunque se reduce el número e intensidad de las bandas detectadas por *immunoblotting* en razón del tiempo de aplicación de calor, sobre todo durante 80 minutos. Así pues, los autores concluyen que algunos antígenos de *Anisakis simplex* mantienen su capacidad de unir IgE y de activar basófilos después de haber sido sometidos a métodos equivalentes a los de conservación y enlatado industrial y podrían representar un riesgo para pacientes sensibilizados.

Un aspecto diferente abordado en otras publicaciones sería la capacidad de las larvas muertas de producir una respuesta inmunológica en sujetos sensibilizados, valoradas en, este caso, mediante pruebas cutáneas de *prick-test* y parche (Ventura et al., 2008). Utilizando larvas muertas, cocinadas o congeladas, como antígenos para la realización de la prueba, un 70 % de los pacientes presentó un resultado positivo en la prueba cutánea en *prick*, sugiriendo que las larvas muertas pueden evocar una respuesta inmune. En la misma línea, con las pruebas epicutáneas o de parche el 37.5 % y el 12.5 % de los pacientes reconocieron respectivamente larvas congeladas y cocinadas.

Todas estas publicaciones abordan la alergenidad, con reconocimiento de proteínas termoestables del pescado tratado (Moneo et al., 2005) (Fæste et al., 2014) y medida únicamente como detección de alérgenos mayoritariamente *in vitro*, sin que esto suponga necesariamente correlación clínica.

2.2 Vitalidad de las larvas tras la aplicación al alimento de diferentes tratamientos térmicos

Algunos trabajos se han centrado en estudiar y confirmar si las recomendaciones actuales pueden considerarse seguras porque garanticen que se produzca la muerte del parásito.

Se ha observado viabilidad parcial de larvas tras congelación (Adams et al., 2005). Mientras que todas las larvas murieron sometiendo las piezas durante 96 horas a -15 °C, 60 horas a -20 °C, 12 horas a -30 °C y 9 horas a -40 °C, se encontró que tras 48 horas a -20 °C sobrevivían hasta un 30 % de las mismas, resultando más determinante el grosor de la pieza, que el tiempo mantenido a la temperatura de congelación alcanzada.

Usando técnicas de microscopía electrónica y fluorescencia, se ha examinado el efecto de algunos tratamientos térmicos sobre la estructura de las larvas (Tejada et al., 2006). Sometiendo

filetes de pescado parasitado artificialmente con una dosis de 40-60 larvas de *Anisakis simplex* a tratamientos de congelación (a -20 °C durante 44 h), calentamiento por inmersión en agua (a 95 °C durante 8 minutos) y cocción (3 minutos en microondas 900 W), se observaron cambios significativos en la cutícula de las larvas en las muestras cocinadas, así como en algunas de las muestras congeladas. No obstante, en estas últimas muestras también se identificaron parásitos que no habían sufrido ningún cambio estructural significativo (Tejada et al., 2006). Conocer si los cambios estructurales observados en la cutícula de las larvas pudieran modificar la resistencia de los parásitos a la acción de los enzimas gástricos requiere de estudios adicionales. En otro estudio se demostró que tras el calentamiento a 60 °C durante 10 minutos algunas larvas presentaban movimientos espontáneos, que no se observaban manteniendo temperaturas iguales y superiores a 70 °C durante un tiempo igual o superior a 1 minuto (Vidaček et al., 2010).

Estudios de inactivación de las larvas por microondas (Vidaček et al., 2011) han permitido comprobar que los tratamientos a 70 °C en microondas, inactivan las larvas con más rapidez que los procesos de cocción tradicionales, siempre y cuando se garantice que las microondas penetran completamente toda la pieza. No obstante, en este estudio también se detectó la presencia de alérgenos termoestables en el tejido muscular circundante a las larvas, sugiriendo que la larva muerta podría liberar alérgenos en tejidos circundantes, lo que puede suponer un riesgo para pacientes sensibilizados a alérgenos termorresistentes.

2.3 Baja adherencia a las recomendaciones

Otra posibilidad a valorar es que, en la vida cotidiana, exista una preparación insuficiente en tiempo o temperatura o bien se produzca una interpretación laxa de las recomendaciones basadas en apreciaciones subjetivas (“cambio de color”, “separación de la espina”, etc.), que pueden resultar insuficientemente precisas, y que motivan que el paciente ingiera larvas viables y sufra síntomas.

3. Discusión

Sin duda la alternativa más segura para el paciente que ha sufrido clínica de alergia a *Anisakis* es el mantenimiento de una dieta exenta de pescado.

Sin embargo, el tipo de restricciones dietéticas que se indique seguir a las personas alérgicas a *Anisakis*, es un aspecto que incide de forma importante en la vida cotidiana del paciente y en la de su entorno. La dieta exenta en pescado, o las recomendaciones excesivamente restrictivas en su preparación, pueden ser difíciles de cumplir en poblaciones que mantienen costumbres culinarias arraigadas y que incluyen, tanto el consumo frecuente de pescado, como formas de preparación con tratamiento térmico insuficientes para el control de la aparición de síntomas alérgicos. Por todo ello se han adoptado recomendaciones que se han considerado suficientes para lograr la muerte y consiguiente inocuidad del parásito (UE, 2004) (AECOSAN, 2005, 2007) pero permiten el consumo de pescado en condiciones que resulten organolépticamente aceptables para el consumidor.

Actualmente, mientras la posible exposición al parásito se incrementa debido al aumento de la ingestión del pescado por razones dietéticas, nutricionales y de cambio de costumbres gastronómi-

cas, la inmunología de la infestación y de la sensibilización alérgica a *Anisakis* está siendo objeto de nuevos estudios.

En el momento actual, el conocimiento, descripción y caracterización *in vitro* de antígenos de elevada resistencia se encuentra más desarrollado que los estudios clínicos, con prueba de exposición controlada mediante ingesta, que se corresponderían con la misma situación de termoestabilidad. La evidencia clínica de que la exposición a antígenos termoestables provoca síntomas no se ha visto, hasta el momento, demostrada experimentalmente en pacientes. Solo se podría aumentar el conocimiento sobre este problema, mediante la realización de más estudios clínicos que incluyan pruebas de exposición controlada con alérgenos termoestables, en aquellos pacientes que han referido síntomas con pescado procesado adecuadamente para que se considere libre de larva viva. Es decir, hasta el momento, están descritas sensibilizaciones a múltiples alérgenos (reconocimiento inmunológico del alérgeno) pero eso no necesariamente implica que exista alergia clínica. Esta diferencia, que está claramente establecida, y es aplicable tanto para inhalantes, como para alimentos, o para cualquier alérgeno potencial, entre lo que es la sensibilización sin síntomas y la alergia, es la base del diagnóstico clínico preciso en cualquier trastorno alérgico.

Además, algunos enfoques recientes (Daschner et al., 2012) orientan el debate desde un punto de vista distinto, resaltando el hecho de que la patología alérgica provocada por *Anisakis* no sigue el mismo patrón que el equivalente a una alergia alimentaria. Así, en la alergia a alimentos clásica, el paciente presenta siempre síntomas tras la ingestión del alimento, con una intensidad que varía dependiendo de grado de sensibilización y de la cantidad ingerida.

En el caso de la parasitación por *Anisakis* la exposición al alérgeno depende de que el pescado consumido esté o no parasitado. En este último caso, la ingesta de un pescado no parasitado, aun con una cierta relajación en el seguimiento de normas, no provocaría síntomas y proporciona al paciente una falsa sensación de seguridad que puede disminuir el grado de adherencia a las recomendaciones. La ingesta de un pescado parasitado, cocinado en las mismas condiciones del que previamente fue tolerado, es decir con larvas viables, provocaría sin embargo sintomatología.

En esta línea argumental, algunos métodos recomendados previamente (AECOSAN, 2007) pueden resultar subjetivos, con un margen de interpretación, con indicaciones como que “la carne se separe sin dificultad de la espina” o “aspecto mate típico de las proteínas coaguladas” en cuanto a lo que se considera “pescado bien hecho” en relación a formas de cocinado a la plancha o en microondas.

Conclusiones del Comité Científico

La bibliografía científica publicada hasta la fecha de elaboración de este informe, y consultada al efecto para redactarlo, no muestra evidencias clínicas actuales que permitan afirmar que el parásito muerto represente un peligro para los consumidores alérgicos a *Anisakis*.

Sin embargo, el reconocimiento inmunológico de diversos antígenos de elevada resistencia aún después de aplicar los métodos de procesados recomendados, no permite descartar totalmente que pueda existir riesgo de reacción alérgica en algunas personas sensibilizadas a éstos.

Referencias

- Abe, N. y Teramoto, I. (2014). Oral inoculation of live or dead third-stage larvae of *Anisakis simplex* in rats suggests that only live larvae induce production of antibody specific to *Anisakis simplex*. *Acta Parasitológica*, 59 (1), pp: 184-188.
- Adams, A.M., Ton, M.N., Wekell, M.M., Mac Kenzie, A.P. y Dong, F.M.J. (2005). Survival of *Anisakis simplex* in arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*) during frozen storage. *Journal of Food Protection*, 68 (7), pp: 1441-1446.
- AECOSAN (2005). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. La alergia por *Anisakis* y medidas de prevención. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 1, pp: 19-35.
- AECOSAN (2007). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe sobre medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de *Anisakis*. *Revista del Comité Científico de la AECOSAN*, 6, pp: 59-65.
- Alonso, A., Daschner, A. y Moreno-Ancillo, A. (1997). Anaphylaxis with *Anisakis simplex* in gastric mucosa. *The New England Journal of Medicine*, 337, pp: 350-351.
- Alonso, A., Moreno-Ancillo, A., Daschner, A. y López-Serrano, M.C. (1998). Dietary assessment in five cases of allergic reactions due to gastroallergic anisakiasis. *Allergy*, 54 (5), pp: 517-520.
- Alonso-Gómez, A., Moreno-Ancillo, A., López-Serrano, M.C., Suárez de Parga, J.M., Daschner, A., Caballero, M.T., Barranco, P. y Cabañas, R. (2004). *Anisakis simplex* only provokes allergic symptoms when the worm parasitizes the gastrointestinal tract. *Journal of Parasitology Research*, 93 (5), pp: 378-384.
- Arcos, S.C., Ciordia, S., Roberston, L., Zapico, I., Jiménez-Ruiz, Y., Gonzalez-Muñoz, M., Moneo, I., Carballeda-Sangiao, N., Rodríguez-Mahillo, A., Albarrán J.P. y Navas, A. (2014). Proteomic profiling and characterization of differential allergens in the nematodes *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii*. *Proteomics*, 21, 14 (12), pp: 1547-1568.
- Armentia, A., Martín-Gil, F.J., Pascual, C., Martín-Esteban, M., Callejo, A. y Martínez, C. (2006). *Anisakis simplex* allergy after eating chicken meat. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16, pp: 258-263.
- Audicana, M.T. (2001). Controversia en el diagnóstico de alergia a *Anisakis simplex*: Diagnóstico clínico y manejo. *Alergología e Inmunología Clínica*, 16, pp: 45-50.
- Audicana, M.T., Ansotegui, I.J., De Corres, L.F. y Kennedy, M.W. (2002). *Anisakis simplex*: dangerous-dead and alive? *Trends in Parasitology*, 18 (1), pp: 20-25.
- Audicana, M.T. y Kennedy, M.W. (2008) *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, 21 (2), pp: 360-379.
- Baeza, M.L., Rodríguez, A., Matheu, V., Rubio, M., Tornero, P., De Barrio, M., Herrero, T., Santaolalla, M. y Zubeldia, J.M. (2004). Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. *Clinical & Experimental Allergy Journal*, 34, pp: 296-302.
- BOE (2006). Real Decreto 1420/2006, de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comidas a los consumidores finales o a colectividades. BOE 302 de 19 de diciembre de 2006, pp: 44547-44549.
- Caballero, M.L. y Moneo, I. (2004). Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Journal of Parasitology Research*, 93 (3), pp: 248-251.
- Caballero, M.L., Moneo, I., Gómez-Aguado, F., Corcuera, M.T., Casado, I. y Rodríguez-Pérez, R. (2008). Isolation of Ani s5, an excretory-secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis larvae* sensitization. *Parasitology Research*, 103 (5), pp: 1231-1233.
- Caballero, M.L., Umpiérrez, A., Moneo, I. y Rodríguez-Pérez, R. (2011). Ani s10, a new *Anisakis simplex* allergen: cloning and heterologous expression. *Parasitology International*, 60 (2), pp: 209-212.
- Carballeda-Sangiao, N., Olivares, F., Rodríguez-Mahillo, A.I., Careche, M., Tejada, M., Moneo, I. y González-

- Muñoz, M.J. (2014). Identification of autoclave-resistant *Anisakis simplex* allergens. *Journal of Food Protection*, 77 (4), pp: 605-609.
- Carballeda-Sangiao, N., Rodríguez-Mahillo, A.I., Careche, M., Navas, A., Caballero, T., Domínguez-Ortega, J., Jurado-Palomo, J. y González-Muñoz, M. (2016). Ani s11-Like Protein Is a Pepsin- and Heat-Resistant Major Allergen of *Anisakis* spp. and a Valuable Tool for *Anisakis* Allergy Component-Resolved Diagnosis. *Allergy Immunology*, 169 (2), pp: 108-112.
- Cuellar, C., Daschner, A., Valls, A., De Frutos, C., Fernández-Figares, V., Anadón, A.M., Rodríguez, E., Gárate, T., Rodero, M. y Ubeira, F.M. (2012). Ani s1 and Ani s7 recombinant allergens are able to differentiate distinct *Anisakis simplex*-associated allergic clinical disorders. *Dermatology Research*, 304 (4), pp: 283-288.
- Daschner, A., Cuéllar, C. y Rodero, M. (2012). The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help? *Trends in Parasitology*, 28 (1), pp: 9-15.
- EFSA (2010). European Food Safety Authority. Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *The EFSA Journal*, 8 (4), pp: 1543-1634.
- Fæste, C.K., Jonscher, K.R., Dooper, M.M., Egge-Jacobsen, W., Moen, A., Daschner, A., Egaas, E. y Christians, U. (2014). Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. *EuPA Open Proteomics Journal*, 4, pp: 140-155.
- Falcão, H., Lunet, N., Neves, E. y Barros, H. (2002). Do only live larvae cause *Anisakis simplex* sensitization? *Allergy*, 57 (1), pp: 44.
- González-Fernández, J., Daschner, A., Nieuwenhuizen, N.E., Lopata, A.L., Frutos, C.D., Valls, A. y Cuéllar, C. (2015). *Anisakis* haemoglobin (Ani s13) a potential candidate for developing more specific diagnosis tools. *International Journal for Parasitology*, 45 (6), pp: 399-407.
- González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A.I. y Moneo, I. (2010). Different Th1/Th2 responses to *Anisakis simplex* are related to distinct clinical manifestations in sensitized patients. *Parasite Immunology Journal*, 32 (1), pp: 67-73.
- Kobayashi, Y., Shimakura, K., Ishizaki, S., Nagashima, Y. y Shiomi, K. (2007). Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 155 (2), pp: 138-145.
- López-Serrano, M.C., Alonso Gómez, A., Moreno-Ancillo, A., Daschner, A. y Suárez de Parga, J. (2000). Anisakiasis gastro-alérgica: Hipersensibilidad inmediata debido a parasitación por *Anisakis simplex*. *Alergología e Inmunología Clínica*, 15, pp: 230-236.
- Moneo, I., Caballero, M.L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A.I., Rodríguez-Pérez, R. y Silva, A. (2005). Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Journal of Parasitology Research*, 96 (5), pp: 285-289.
- Moneo, I., Caballero, M.L., Rodríguez-Pérez, R., Rodríguez-Mahillo, A.I. y González-Muñoz, M. (2007). Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Journal of Parasitology Research*, 101 (4), pp: 1051-1055.
- Rodríguez, E., Anadón, A.M., García-Bodas, E., Romarís, F., Iglesias, R., Gárate, T. y Ubeira, F.M. (2008). Novel sequences and epitopes of diagnostic value derived from the *Anisakis simplex* Ani s7 major allergen. *Allergy*, 63 (2), pp: 219-225.
- Rodríguez-Mahillo, A.I., González-Muñoz, M., De las Heras, C., Tejada, M. y Moneo, I. (2010). Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle. *Foodborne Pathogens Disease*, 7 (8), pp: 967-973.
- Rodríguez-Pérez, R., Moneo, I., Rodríguez-Mahillo, A. y Caballero, M.L. (2008). Cloning and expression of Ani s9, a new *Anisakis simplex* allergen. *Molecular Biochemical Parasitology*, 159 (2), pp: 92-97.
- Sastre, J., LLuch-Bernal, M., Quirce, S., Arrieta, I., Lahoz, C., Del Amo, A., Fernández-Caldas, E. y Marañón, F.A. (2000). Double-blind, placebo-controlled oral challenge study with lyophilized larvae and antigen of the fish parasite *Anisakis simplex*. *Allergy*, 55, pp: 560-564

- Solas, M.T., García, M.L., Rodríguez-Mahillo, A.I., González-Muñoz, M., De las Heras, C. y Tejada, M. (2008). Anisakis antigens detected in fish muscle infested with *Anisakis simplex* L3. *Journal of Food Protection*, 71 (6), pp: 1273-1276.
- Tejada, M., Solas, M.T, Navas, A. y Mendizábal, A. (2006). Scanning electron microscopy of *Anisakis larvae* following different treatments. *Journal of Food Protection*, 69 (6), pp: 1379-1387.
- Tejada, M., Olivares, F., De las Heras, C., Careche, M., Solas, M.T., García, M.L., Fernández, A., Mendizábal, A., Navas, A., Rodríguez-Mahillo, A.I. y González-Muñoz, M. (2015). Antigenicity of *Anisakis simplex* s.s. L3 in parasitized fish after heating conditions used in the canning processing. *Journal of Science, Food and Agriculture*, 95 (5), pp: 922-927.
- UE (2004). Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. DOL 139 de 30 de abril de 2004. pp: 113-114.
- Ventura, M.T., Tummolo, R.A., Di Leo, E., D'Ersasmo, M. y Arsieni, A.J. (2008) Immediate and cell-mediated reactions in parasitic infections by *Anisakis simplex*. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 18 (4), pp: 253-259.
- Vidaček, S., De Las Heras, C., Solas, M.T., Mendizábal, A., Rodríguez-Mahillo, A.I. y Tejada, M.J. (2010). Antigenicity and viability of *Anisakis larvae* infesting hake heated at different time-temperature conditions. *Journal of Food Protection*, 73 (1), pp: 62-68.
- Vidaček, S., De Las Heras, C., Solas, M.T., García, M.L., Mendizábal, A. y Tejada, M.J. (2011). Viability and antigenicity of *Anisakis simplex* after conventional and microwave heating at fixed temperatures. *Journal of Food Protection*, 74 (12), pp: 2119-2126.