

Efecto de lavados sucesivos de músculo infestado en la extracción y detección de alérgenos de *ANISAKIS*

Effect of successive washes of infested muscle in the extraction and detection of *ANISAKIS* allergens

Fabiola Olivares¹; Cristina de las Heras²; Ana Rodríguez-Mahillo³;
Miguel González-Muñoz⁴; Margarita Tejada⁵

Resumen

Aunque la adecuada congelación o cocción produzcan la muerte de las larvas de *Anisakis* y se evite la infestación de los consumidores, las larvas muertas conservan su capacidad alergénica y los alérgenos son capaces de inducir una respuesta inmune en pacientes previamente sensibilizados, especialmente si son termo-resistentes como *Anisakis* 4. En la fabricación de surimi, el lavado del músculo de pescado es uno de los pasos clave y de acuerdo a las características de algunos de los alérgenos de *Anisakis* descritos, se ha considerado que en esta operación se podrían eliminar algunas proteínas alergénicas del músculo infestado. El objetivo del estudio fue evaluar la reducción o eliminación de las proteínas alergénicas del músculo por solubilizaciones selectivas aplicando el método tradicional japonés de obtención de surimi. Se tuvieron en cuenta los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de los principales alérgenos de *Anisakis* a fin de poder eliminarlos en las soluciones residuales de cada lavado. Se utilizó músculo de merluza con infestación natural (@20 larvas por cada 100 g músculo) que fue sometido a 3 lavados sucesivos con buffer fosfato [1:4 (p:v); 10 minutos; 5°C; pH 7-7,5]. Se evaluó la concentración y perfil de las proteínas extraídas con las soluciones de lavado (Proteína bruta y electroforesis en gel de poliacrilamida) y la presencia de alérgenos de *A. simplex* (Inmunoblotting). *Anisakis* 4 se mantuvo presente en el músculo después del tercer lavado, aunque su eliminación fue progresiva y se reflejó en las soluciones residuales de cada lavado, quedando en algunos casos por debajo del límite de detección de la técnica (<1 ppm). Es necesario continuar con los trabajos de investigación a fin de mejorar las condiciones de detección de alérgenos de *Anisakis* e incluir técnicas de concentración de proteínas que permitan detectar su presencia a bajas concentraciones para determinar con exactitud el efecto de los lavados sucesivos en distintas condiciones de infestación y tratamiento.

Palabras clave: *A. simplex*; lavados sucesivos; surimi; *Anisakis* 4; alérgenos; inmunoblotting.

Abstract

Although the adequate freezing or cooking results in the death of *Anisakis* larvae and this will prevent consumer infestation, dead larvae retain their allergenic capacity and allergens are capable of inducing an immune response in previously sensitized patients, especially if they are thermo-resistant as *Anisakis* 4. In the manufacture of surimi, the washing of fish muscle is one of the key steps and according to the characteristics of some of the described *Anisakis* allergens, it has been considered that this operation could eliminate some allergenic proteins from the infested muscle. The objective of the study was to evaluate the reduction or elimination of the allergenic proteins from the muscle by selective solubilizations applying the traditional Japanese method of surimi production. The molecular weights and isoelectric points of major allergens of *Anisakis* were taken into consideration in order to remove them from waste solutions. Hake muscle with natural infestation (@20 larvae per 100 g muscle) was subjected to three successive washes with phosphate buffer [1:4 (w: v), 10 minutes, 5°C, pH 7-7.5]. The concentration and profile of the proteins extracted with the washing solutions (Crude protein and polyacrylamide gel electrophoresis) and the presence of *A. simplex* allergen (Immunoblotting) were evaluated in all samples. *Anisakis* 4 remained present in the muscle after the third wash, although its elimination was progressive and was reflected in each waste solution, being in some cases below the detection limit of the technique (<1 ppm). It is necessary to continue the research to improve the detection of *Anisakis* allergens, including protein concentration techniques to detect their presence at low concentrations to accurately determine the effect of successive washes under different conditions of infestation and treatment

Keywords: *A. simplex*; successive washes; surimi; *Anisakis* 4; allergens; immunoblotting.

1. Facultad de Pesquería, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú). Email: folivares@lamolina.edu.pe

2. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid (España). E-mail: cha@ictan.csic.es

3. Fundación para Investigación Biomédica, Hospital Carlos III, Madrid (España). E-mail: anai_rm@yahoo.es

4. Departamento de Inmunología, Hospital Carlos III, Madrid (España). E-mail: mgonzalez_munoz@hotmail.com

5. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid (España). E-mail: mtejada@ictan.csic.es

1. Introducción

Tras la detección del primer caso de infestación humana, en los años 60, asociado al consumo de pescados crudos (Van Thiel, P., Kuipers, F. and Roskam, R., 1962), *Anisakis* es considerado actualmente un problema de salud pública. El sector y las autoridades sanitarias son conscientes desde hace décadas de los problemas relacionados con la parasitación de pescado por Anisákidos ya que afectan tanto al valor comercial de las capturas como a la salud de los consumidores. Desde el punto de vista tecnológico, para producir la muerte de las larvas se recomienda la aplicación de altas temperaturas ($\geq 60^{\circ}\text{C}$ en el centro térmico, 1 min.) o bajas temperaturas ($\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante al menos 24 horas o -35°C durante al menos 15 horas) en el caso de pescados o productos de la pesca que se van a consumir crudos o sometidos a tratamientos tecnológicos o culinarios que no producen la muerte de la larva (Reglamentos 853/2004, 854/2004, 1276/2011 del Parlamento Europeo y FDA, 2011). Sin embargo, aunque se produzca la muerte de la larva por aplicación de distintos tratamientos que evitarían la infestación en humanos (Tejada, M., Solas, M., Navas, A. and Mendizábal, A., 2006; Rodríguez-Mahillo, A., González-Muñoz, M., De las Heras, C., Tejada, M. and Moneo, I., 2010; Vidaček *et al.*, 2009; 2010; 2011), no se evita la aparición de alergia en la población previamente sensibilizada a ciertos alérgenos de *Anisakis* (Montoro, A., Perteguer, M., Chivato, I., Laguna, R. and Cuellar, C., 1997; Audicana, M., Ansotegui, I., Fernández de Corres, L. and Kennedy, M., 2002; Moneo *et al.*, 2005; AAITO-IFIACI *Anisakis* Consortium, 2011) debido principalmente a su gran resistencia al calor y acidez extrema (Moneo, I., Caballero, M., Gómez, F., Ortegam, E. and Alonso, M., 2000a; Kobayashi, Y., Shimakura, K., Ishizaki, S., Nagashima, Y. and Shiomi, K., 2007; Rodríguez-Pérez, R., Moneo, I., Rodríguez-Mahillo, A., Caballero M., 2008; Vidaček *et al.*, 2009; 2010; 2011).

Actualmente, se han descrito las principales características químicas y bioquímicas de algunas proteínas alergénicas de *Anisakis*, tales como su estructura, peso molecular, punto isoeléctrico, grupos -SH, estabilidad térmica entre otros (IUIS, 2013). Estas características tienen gran importancia, ya que pueden proporcionar estabilidad al alérgeno durante la aplicación de procesos tecnológicos, manteniendo sus propiedades alergénicas a pesar de que dichos procesos produzcan la muerte de las larvas o, por el contrario, extraerse o formar enlaces con proteínas musculares desnaturalizadas durante el procesado, perdiendo dichas propiedades alergénicas.

En la fabricación de surimi, la etapa de lavado del músculo de pescado es uno de los pasos clave y es considerada como una operación necesaria para evitar la desnaturalización de la proteína miofibrilar durante el almacenamiento en congelación (Park y Lin, 2005). Uno

de los factores que determina la eficacia de esta etapa es el pH debido a que influye en la capacidad de retención de agua del músculo y en consecuencia en las características de los geles elaborados con el surimi producido (Borderías y Tejada, 1987). Una forma de evitar una mayor retención de agua en el músculo es lavar a un pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (4,5-5,5). Sin embargo, es necesario tener en cuenta que a pH inferiores a 6,3 la funcionalidad de estas proteínas disminuye considerablemente (Nishioka, 1984).

En la industria, los ciclos de lavado suelen tener una duración entre 9 y 12 minutos empleándose en cada lavado una cantidad de agua de 3 a 4 veces el peso del músculo (Park y Lin, 2005; Martín-Sánchez, A., Navarro, C., Pérez-Álvarez, J. and Kuri, V., 2009) y para lograr una mejor capacidad funcional del surimi durante el lavado el pH se mantiene entre 6,5 y 7,5 (Okada, 1981; Park y Lin, 2005). Se ha considerado que en esta operación además de eliminar todas las impurezas que puedan proporcionar características sensoriales indeseables en el producto final y producir la lixiviación de proteínas sarcoplásmicas, también se podrían eliminar algunas proteínas alergénicas del músculo infestado, debido principalmente al peso molecular y punto isoeléctrico de algunos de los alérgenos de *Anisakis* descritos, que en la mayoría de los casos tienen un punto isoeléctrico alejado de pH 7,5 (IUIS, 2013).

El objetivo del estudio fue evaluar la reducción o eliminación de las proteínas alergénicas del músculo por solubilizaciones selectivas, aplicando la tecnología basada en la obtención de surimi por método tradicional japonés (Suzuki, 1987). Para lograr el objetivo, se tomaron en cuenta los puntos isoeléctricos de los principales alérgenos de *Anisakis* (pI entre 5,57 y 9,68) a fin de poder extraerlos y detectarlos en las soluciones residuales de lavado y en el músculo después del tercer lavado, según corresponda.

2. Materiales y métodos

Pescado

Se obtuvieron dos merluzas (*Merluccius merluccius*) capturadas del Atlántico noroeste (zona de Pesca FAO 27) en febrero del 2010, recibidas en el mercado central de pescado de Madrid (Mercamadrid) y posteriormente enviadas a las instalaciones del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) en Madrid, España. Se seleccionó esta especie por su alto valor económico y la alta prevalencia e intensidad de infestación por *A. simplex*. La longitud y el peso de los individuos fueron $44,25 \pm 1,32$ cm y $0,92 \pm 0,02$ kg, respectivamente. El pescado se descabezó, evisceró y fileteó. La temperatura durante la manipulación y conservación de las muestras fue $\leq 5^{\circ}\text{C}$. La tasa de infestación natural del músculo dorsal fue ≤ 5 larvas por 100 g músculo.

Con objeto de obtener una tasa de infestación de @20 larvas por 100 g musculo, se utilizó un lote adicional de musculaturas ventrales con alta tasa de infestación (>50 larvas por 100 g de músculo) obtenidas de merluzas capturadas en noviembre del 2009, envasadas al vacío en bolsas plásticas y conservadas en congelación a $-30\pm 3^{\circ}\text{C}$. Se utilizaron 4 músculos ventrales (2 izquierdos y 2 derechos) previamente descongelados y con un peso total de 200 g.

Preparación de la muestra

En una batidora-picadora (Hand processor accesory, Minipimer 5, Braun GmbH, Alemania) se obtuvo una mezcla homogénea de músculo dorsal y ventral (750 g, @20 larvas por 100 g de músculo), la cual fue sometida a 3 lavados sucesivos manteniendo una relación entre músculo-solución de lavado (BF-Na: Buffer fosfato pH 7,5) de 1:4 (p:v) (Carvajal, P., Lanier, T. and Mac Donald, G., 2005). Cada lavado tuvo una duración de 10 minutos, con agitación constante, se verificó que el pH de la mezcla estuviese entre 7,0 y 7,5 y que la temperatura no excediera los 5°C .

Para separar el músculo de la solución de lavado, se centrifugó (Centrifuga Heraeus Multifuge 3L-R, Kendro Laboratory Products, Alemania) a $3000 \times g$ durante 15 minutos a 5°C . El músculo obtenido después del tercer lavado (ML) y las soluciones residuales obtenidas en cada lavado (S1, S2 y S3) se reservaron en refrigeración ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$, 2 horas) para los análisis correspondientes. Con la finalidad de verificar y controlar la cantidad de proteína eliminada en cada lavado, cada solución residual obtenida se ajustó a volumen constante con buffer fosfato (BF-Na).

Proteína bruta.

Se determinó proteína bruta [Método Dumas, Analizador de nitrógeno/proteína LECO FP-2000 (LECO Corp., St. Joseph, MI, EE.UU), utilizando un factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6,25] del músculo infestado sin tratamiento (MP), músculo obtenido después del tercer lavado (ML) y soluciones residuales de cada lavado (S1, S2 y S3). Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje (%) respecto al músculo inicial.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las soluciones residuales de cada lavado (S1, S2 y S3) y la proteína residual tras el tercer lavado (ML) se evaluaron por electroforesis (SDS-PAGE) y se siguió la técnica sugerida por Hames (1985). La electroforesis se llevó a cabo empleando un equipo PhastSystem horizontal (Pharmacia Biotechnology AB, Uppsala, Suecia) usando geles de poliacrilamida de 12,5%. Las muestras tratadas con dodecil sulfato sódico (SDS) (25 g L^{-1} SDS y $0,02 \text{ g L}^{-1}$ de azul de bromofenol) o SDS + β -mercaptoetanol (β -ME, 50 mL L^{-1}) fueron calentadas durante 5 minutos en un baño de agua a 100°C . Las condiciones de electroforesis fueron de 4 mA por gel, 250 V y 3 W. Las bandas de proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie (Pharmacia LKB Biotechnology AB). Las masas moleculares de las proteínas en las muestras se calcularon mediante la comparación de su movilidad con la de un estándar comercial (Full Range

Rainbow Recombinant Protein Molecular Weight Marker, Amersham GE Healthcare UK Limited, Reino Unido) compuesto por miosina (220 kDa), fosforilasa b (97 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhídrido carbónico (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*.

Antígenos y antisueros empleados

Los antígenos y antisueros utilizados fueron preparados de acuerdo al protocolo descrito por Rodríguez-Mahillo *et al.* (2007). El extracto crudo antigénico de *A. simplex* se obtuvo después de triturar en un mortero larvas recogidas manualmente (García *et al.*, 1997), mientras que el extracto de Ani s 4 recombinante se obtuvo de un sistema bacteriano. Para la detección de antígenos de *Anisakis* y Ani s 4, los antisueros se obtuvieron inmunizando conejos con extracto crudo de *A. simplex* y Ani s 4 recombinante respectivamente.

Extracción de alérgenos del músculo

El método de extracción y detección de alérgenos de *Anisakis* utilizado es el que se describe en la Patente N° 2 340 978 (Rodríguez-Mahillo, A., Tejada, M., González-Muñoz, M., Moneo, I. y Solas, M., 2011). Las muestras de músculo (MP y ML) fueron homogenizadas en ultraturax T25 (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania) con solución salina (30 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 6,8) (1:3 p:v). La mezcla resultante se sonicó (Misonix XL-2000 Series), incubó en agitación orbital (Tube rotator Modelo SB3, Stuart, Barloworld Scientific Ltd., Reino Unido) y centrifugó (Centrifuga Heraeus Multifuge 3L-R) ($5000 \times g$, 20°C , 30 minutos). Se descartó el precipitado y el sobrenadante se acidificó hasta $\text{pH} < 1$ adicionando HCl, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, se neutralizó hasta $\text{pH} 7$ con NaOH y se centrifugó ($16000 \times g$, 20°C , 30 minutos). Se descartó el precipitado y se analizó el sobrenadante (extracto).

Inmunodetección por Western-blot (WB)

Los extractos obtenidos del músculo (ML) y las soluciones residuales de los lavados (S1, S2 y S3) fueron diluidas 1:4 en tampón de muestra para SDS-PAGE (63,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,021% azul de bromofenol). La mezcla se aplicó a geles al 16% de acrilamida (Moneo, I., Caballero, M. and Jiménez, S., 2000b) y se desarrolló a un voltaje de $3,75 \text{ V cm}^{-2}$ e intensidad 20 mA constantes. Para las proteínas purificadas de Ani s 4, la electroforesis se realizó en SDS-PAGE en geles pre-hechos con gradientes de 4 a 20% de acrilamida (Novex® Tris-Glycine Gels, 1,0 mm, 100 Well, 20-200 kDa, Invitrogen by Life Technologies Ltd., Paisley, UK). En ambos casos, tras la electroforesis los geles fueron teñidos con tinción de Coomassie (0,0125% de Azul brillante de Coomassie, 50% metanol, 10% ácido acético en agua bidestilada) y desteñidos hasta visualizar las bandas de proteína en solución de desteñido (7,5% metanol, 10% ácido acético en agua bidestilada).

Para la inmunodetección por WB, las proteínas sometidas a electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (NC) por difusión pasiva durante 18 horas

(Moneo *et al.*, 1995), bloqueadas con solución al 3% de Nonidet P-40 en PBS e incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo anti-extracto crudo de *A. simplex* o anti-Ani s 4 recombinante (1:1000) y el correspondiente antisuero secundario, de acuerdo con los métodos publicados previamente (Moneo *et al.*, 2000b; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007). Para revelar el WB se usó el sustrato de fosfatasa alcalina BCIP-NBT (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol Fosfato/Nitrozolú de Tetrazolio; Amresco, Solom, Ohio, USA) (Moneo *et al.*, 2000b).

Resultados y discusión

Evaluación y cuantificación de las modificaciones de las proteínas del músculo de pescado.

La **Fig. 1** muestra la cantidad de proteína extraída en los lavados sucesivos con buffer fosfato. En el músculo lavado (ML) se evidencia una disminución de proteína con respecto al músculo control sin tratamiento (MP) (**Fig. 1a**). En las soluciones de lavado la cantidad de proteína extraída disminuye con el número de lavados (**Fig. 1a y 1b**), comportamiento que ha sido reportado en merluza almacenada en congelación durante 12 meses en condiciones similares de tratamiento (Tejada *et al.*, 2003). Aunque algunos autores consideran que aproximadamente el 50% de los componentes solubles se extraen en el primer ciclo de lavado, la extracción dependerá de factores como la especie, la frescura del músculo o el pH durante el lavado (Yamamoto, 1974; Morrissey *et al.*, 2005). En nuestro caso la proteína en S1 representó el 77% de la cantidad total de proteína total extraída (Figura 1b).

En la **Fig. 2** se presenta el patrón electroforético de las soluciones residuales de lavado. Después de tres lavados sucesivos con buffer fosfato (pH 7,5) se detectaron las mismas bandas en las 3 soluciones aunque las del primer lavado (S1) son más intensas que las de los lavados sucesivos (S2 > S3), lo que se corresponde con la menor concentración de proteína en estas muestras (Fig. 1b). La disminución de bandas en las soluciones residuales de lavado se observó claramente en la zona de 17-24 kDa y 38-52 kDa.

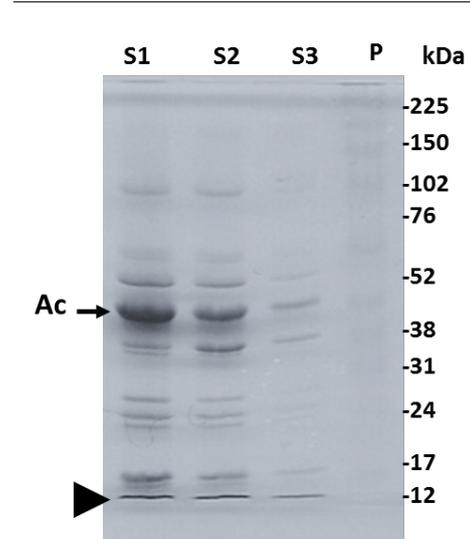


Figura 2. Patrón de electroforesis de las soluciones residuales de lavado. **S1:** Solución residual del primer lavado; **S2:** Solución residual del segundo lavado; **S3:** Solución residual del tercer lavado; **P:** Patrón de PM (kDa); **Ac:** Actina; **▶**: Banda correspondiente al PM de Ani s 4.

En todas las soluciones residuales de lavado (S1, S2 y S3) se logró detectar una banda cercana al PM de Ani s 4 (9 kDa) lo que podría indicarnos su eliminación durante los lavados sucesivos.

Inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

En la **Fig. 3** se presenta la inmunodetección por WB revelada con anticuerpo policlonal de conejo anti-extracto crudo de *A. simplex* y anti-Ani s 4.

En el músculo lavado (ML) se comprobó la presencia de Ani s 4 entre las bandas de 9 y 12 kDa, sin embargo en las soluciones residuales de cada lavado (S1, S2 y S3) las bandas correspondientes a Ani s 4 fueron imperceptibles, probablemente debido a que dadas las condiciones del tratamiento las proteínas alérgicas extraídas se

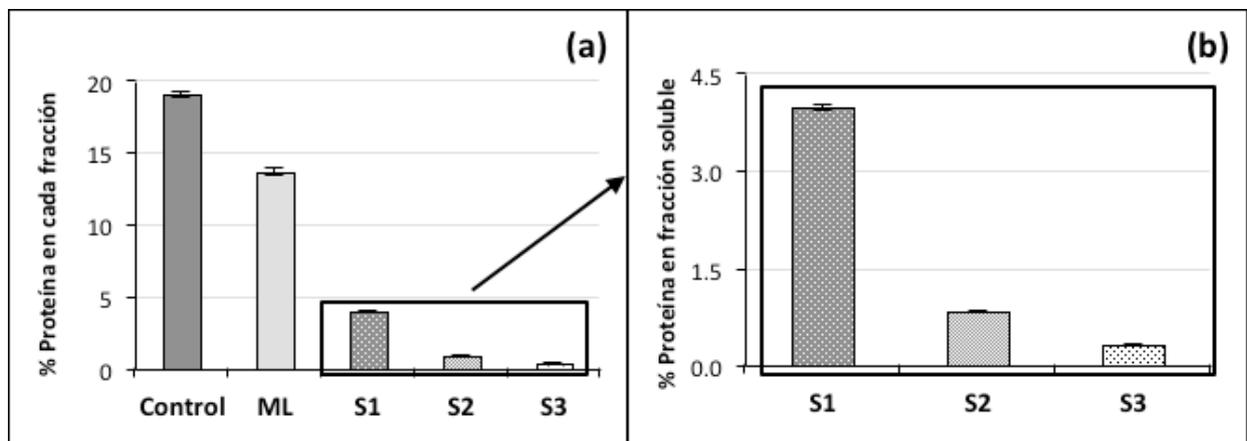


Figura 1. Porcentaje de proteína (%) respecto al músculo inicial en músculo de merluza con infestación natural sometido a lavados sucesivos. **Control:** Músculo infestado sin tratamiento (MP); **ML:** Músculo después del tercer lavado con buffer fosfato pH 7,5 (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$); **S1:** Solución residual del primer lavado; **S2:** Solución residual del segundo lavado; **S3:** Solución residual del tercer lavado.

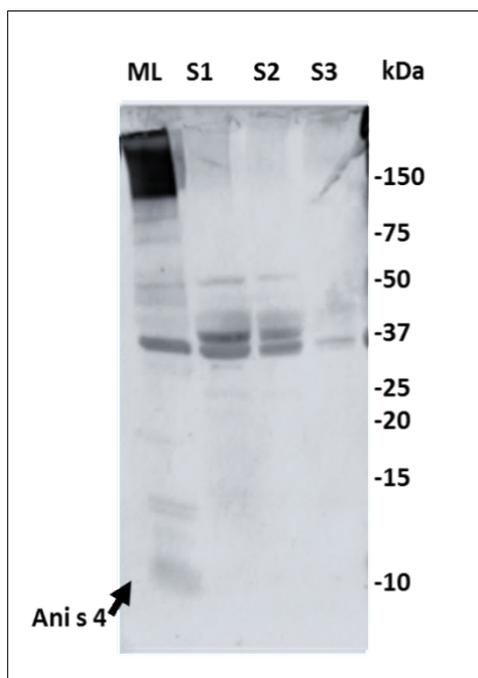


Figura 3. Inmunodetección revelada con anticuerpo policlonal de conejo anti-extracto crudo de *A. simplex* y anti-Ani s 4 del músculo lavado y soluciones residuales de lavado obtenidas de merluza infestada naturalmente. **ML:** Músculo después del tercer lavado con buffer fosfato pH 7,5 (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$); **S1:** Solución residual del primer lavado; **S2:** Solución residual del segundo lavado; **S3:** Solución residual del tercer lavado.

encontraron muy diluidas quedando por debajo del límite de detección de la técnica (<1 ppm).

En todas las fracciones, pero con mayor intensidad en S1, se evidenció la presencia de proteínas de PM entre 37 y 50 kDa, lo que nos sugiere que algunas de las proteínas alergénicas de *Anisakis* que se encuentran dentro de ese rango de PM se podrían estar eliminando durante los lavados sucesivos.

Los resultados obtenidos evidencian que a pesar que la cantidad de proteína en las fracciones S2 y S3 disminuye, la presencia de Ani s 4 se sigue detectando en el músculo después del tercer lavado, lo que nos indica su eliminación parcial durante el proceso de elaboración de surimi.

Actualmente, se están realizando estudios dirigidos a la utilización diferentes técnicas de concentración de proteínas, que permitan detectar claramente la presencia de Ani s 4 u otros antígenos de *A. simplex* a bajas concentraciones, pero que a su vez no provoquen pérdidas de proteínas o interferencias en la detección final

3. Conclusiones

La aplicación de lavados sucesivos con solución de buffer fosfato (pH 7,5) provocó una disminución del contenido de proteína alergénicas de *A. simplex*, lo que nos sugirió que un alto porcentaje de alérgenos de *A. simplex* pasó del músculo infestado a las soluciones residuales de lavado.

Es necesario mejorar las condiciones de extracción y detección de alérgenos de *Anisakis*, incluyendo técnicas de concentración de proteínas que permitan detectar la presencia de proteínas alergénicas a bajas concentraciones.

4. Agradecimientos

El presente trabajo ha sido realizado en el ICTAN-CSIC de Madrid y ha sido financiado por el proyecto del Plan Nacional I+D+i español AGL2009-12485-C03-01/03 (ANIDET). Fabiola Olivares ha realizado el trabajo en el ICTAN mediante una beca de estudios concedida por el Programa de Ciencia y Tecnología del Gobierno de Perú (FINCyT) administrada por LASPAU.

5. Literatura citada

- AAITO-IFIACI Anisakis Consortium. 2011.** *Anisakis* hypersensitivity in Italy: prevalence and clinical features: a multicenter study. *Allergy*, 66: 1563-1569.
- Audicana, M.; Ansotegui, I.; Fernández de Corres, L. and Kennedy, M. 2002.** *Anisakis simplex*: dangerous-dead and alive? *Trends Parasitol*, 18: 20-25.
- Borderías, J. y Tejada, M. 1987.** El surimi. *Rev Agroquím Tecnol Aliment*, 27(1): 1-14.
- Carvajal, P.; Lanier, T. and Mac Donald, G. 2005.** Stabilization of proteins in surimi. (J Park. Ed.). *Surimi and surimi seafood*. (2° ed.) Florida, USA: Taylor & Francis.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). (2011).** *Fish and fishery products hazards and controls guidance*. (4° ed.). Department of Health and Human Services. Public Health Service. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Food Safety. Chapter 5-Parasites, pp. 91-98.
- García, M.; Moneo, I.; Audicana, M.; Del Pozo, M.; Muñoz, D.; Fernández, E.; Diez, J.; Etxenaguisa, M.; Ansotegui, I. and Fernández de Corres, L. 1997.** The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 99: 497-501.
- Hames, B. (1985).** An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. (B. Hames and D. Rickwood Eds.). *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. Oxford, UK: IRL Press. Pp. 1-91.
- International Union of Immunological Societies (IUIS). 2013.** *Allergen Nomenclature Sub-Committee. Allergen Nomenclature*. Disponible en: <http://www.allergen.org/index.php>
- Kobayashi, Y.; Shimakura, K.; Ishizaki, S.; Nagashima, Y. and Shiomi, K. 2007.** Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. *Mol Bioch Parasitol*, 155: 138-145.
- Martín-Sánchez, A.; Navarro, C.; Pérez-Álvarez, J. and Kuri, V. 2009.** Alternatives for efficient and sustainable production of surimi: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8: 359-374.
- Moneo, I.; Alday, E.; Sánchez-Agudo, L.; Curiel, G.; Lucena, R. and Calatrava, J. 1995.** Skinprick tests for hypersensitivity to alpha-amylase preparations. *Occup Med*, 45: 151-155.

- Moneo, I.; Caballero, M.; Gómez, F.; Ortegam, E. and Alonso, M. 2000^a.** Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol*, 106: 177-82.
- Moneo, I.; Caballero, M. and Jiménez, S. 2000^b.** Inmunodetección de IgE específica (immunoblotting) en el estudio de la prevalencia de sensibilización a *Anisakis simplex* en España. *Alergol Immunol Clin*, 15: 255-261.
- Moneo, I.; Caballero, M.; González-Muñoz, M.; Rodríguez-Mahillo, A.; Rodríguez-Pérez, R. and Silva, A. 2005.** Isolation of a heat resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol Res*, 96: 285-289.
- Montoro, A.; Perteguer, M.; Chivato, I.; Laguna, R. and Cuellar, C. 1997.** Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*. *Allergy*, 52: 985-991.
- Morrissey, M.; Lin, J. and Ismond, A. 2005.** Waste management and by-products utilization. (J Park eds.). *Surimi and surimi seafood*. (2° ed.) Florida, USA: Taylor & Francis. Pp. 279-323.
- Nishioka, F. 1984.** Leaching treatment. (H. Shimizu ed.). *Science and Technology of Fish Paste Products*. Tokyo, Japón: Koseisha-Koseikaku Publishing. Pp. 62-73.
- Okada, M. 1981.** Theory and practice of manufacturing fish gel products. (T. Kinumaki; M. Okada; G. Yokozeki Eds.). *Fish gel products*. Tokyo, Japón: Koseisha-Koseikaku Publishing.
- Park, J. and Lin, J. 2005.** Surimi: Manufacturing and evaluation. (J Park. Ed.). *Surimi and surimi seafood*. (2° ed.) Florida, USA: Taylor & Francis. Pp. 33-106.
- Reglamento 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. Diario Oficial de la Unión Europea, DOUE L139/55 de 30.04.2004.
- Reglamento 854/2004** del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano Diario Oficial de la Unión Europea, DOUE L139/206 de 30.4.2004.
- Reglamento 1276/2011** de la comisión de 8 de diciembre de 2011 que modifica el anexo III del Reglamento 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente al tratamiento para matar parásitos viables en los productos de la pesca destinados al consumo humano. Diario Oficial de la Unión Europea, DOUE L327/39 de 9.12.2011.
- Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M.; De las Heras, C.; Tejada, M. and Moneo, I. 2010.** Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen and cooked fish muscle. *Foodborne Pathog Dis*, 7(8): 967-973.
- Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M.; Gómez-Aguado, F.; Rodríguez-Pérez, R.; Corcuera, M.; Caballero, M. and Moneo, I. 2007.** Cloning and characterization of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *Int J Parasitol*, 37: 907-917.
- Rodríguez-Mahillo, A., Tejada, M., González-Muñoz, M., Moneo, I. y Solas, M. 2011.** Patente N° 2 340 978. *Método de extracción y detección de antígenos de Anisakis en alimentos destinados al consumo humano o animal.*
- Rodríguez-Pérez R.; Moneo, I.; Rodríguez-Mahillo, A. y Caballero, M. 2008.** Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. *Mol Biochem Parasitol* 159(2): 92-97.
- Suzuki, T. 1987.** *Tecnología de las proteínas de pescado y krill*. (1° ed.) Zaragoza, España: Acribia.
- Tejada, M.; Huidobro, A. and Fouad Mohamed, G. 2003.** Comparison of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and hake (*Merluccius merluccius*) muscle proteins during iced and frozen storage. *J Sci Food Agric*, 83(2): 113-122.
- Tejada, M.; Solas, M.; Navas, A. and Mendizábal, A. 2006.** Effect of freezing and different heat treatments on *Anisakis* larvae: preliminary study. (J.B. Luten; C. Jacobsen; K. Bekaert; A. Sæbø; J. Oehlenschläger.) *Seafood research from fish to dish: Quality, safety and processing of wild and farmed fish*. Wageningen, NL: Academic Publishers. Pp. 309-316.
- Van Thiel, P.; Kuipers, F. and Roskam, R. 1962.** A nematode parasitic to herring causing acute abdominal syndromes in man. *Trop Geogr Med*, 2: 97-113.
- Vidaček, S.; De las Heras, C.; Solas, M., Mendizábal, A.; Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M. and Tejada, M. 2009.** *Anisakis simplex* allergens remain active after conventional or microwave heating and pepsin treatments of chilled and frozen L3 larvae. *J Sci Food Agric*, 89: 1997-2002.
- Vidaček, S.; De las Heras, C.; Solas, M.; Mendizábal, A.; Rodríguez-Mahillo, A. and Tejada, M. 2010.** Antigenicity and Viability of *Anisakis* larvae heated at different time-temperature conditions. *J Food Protect*, 73(1): 62-68.
- Vidaček, S.; De las Heras, C.; Solas, M.; García, M.; Mendizábal, A. and Tejada, M. 2011.** Viability and antigenicity of *Anisakis simplex* after conventional and microwave heating at fixed temperatures. *J Food Protect*, 74 (12): 2119-2126.
- Yamamoto, T. 1974.** *Frozen surimi and kneaded Seafoods. Reito Surimi-to Suisan Neriseihin*. Tokyo, Japón: Nippon Shokuhin Keizai (N.S.K.) Sha Co.