



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

Caracterización proteica e inmunogénica de la larva L3 de *Anisakis simplex*, *A. physeteris* y *Contracaecum osculatum* (Nematoda: Anisakidae) y presencia de anticuerpos específicos en pescadores artesanales y pacientes de gastroenterología

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Zoología con
mención en Morfología y Fisiología

AUTOR

Rosa Nérida MARTÍNEZ ROJAS

Lima, Perú

2013

RESUMEN

La Anisakiasis o Anisakidosis es una zoonosis parasitaria causada por la ingestión accidental de larvas del estadio L₃ de *Anisakis simplex*, *A. physeteris*, *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatum* e *Hysterotylacium* sp., que se encuentran enquistadas en la superficie visceral o tejido muscular de algunos peces teleósteos marinos. El presente estudio se realizó con el objetivo de conocer la composición proteica e inmunogénica de las larvas (L₃) de *A. simplex*, *A. physeteris* y *C. osculatum*; y determinar la presencia de anticuerpos específicos en el suero de pescadores artesanales y pacientes de gastroenterología con etiología desconocida. Las L₃ fueron aisladas de la superficie visceral de algunos peces teleósteos, procedentes de los terminales pesqueros de Lima e Ica. Las L₃ de *A. simplex*, *A. physeteris* y *C. osculatum*, fueron procesadas utilizándose una solución buffer fosfato salino estéril (pH 7,2), posteriormente se sonicó y centrifugó en frío. Para la obtención de suero hiperinmune se inmunizaron conejos (New Zealand), evaluándose luego el título de anticuerpos (IgG) específicos mediante ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Para la evaluación de proteínas totales se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), y el perfil antigénico por Western blot. Se evaluó la presencia de anticuerpos específicos para las tres especies frente al suero de pescadores artesanales, personas que sufren de gastritis y de personas escogidas al azar procedentes de Andahuaylas. Se caracterizó el patrón proteico de las larvas (L₃) de *A. simplex*, con 13 bandas con peso molecular de 64 a 11 kDa; *A. physeteris*, con 18 bandas de 73 a 9.5 kDa y *C. osculatum* con 14 bandas de 77 a 11 kDa. Se determinó bandas proteicas específicas de 58, 35 y 9.5 kDa para *A. physeteris* y de 77 y 28 kDa para *C. osculatum* que los diferencian de *A. simplex*. Se observó mayor similitud entre *A. simplex* y *A. physeteris*, y entre *A. physeteris* y *C. osculatum*; y menos semejanza entre *A. simplex* y *C. osculatum*. Se determinó el perfil antigénico para *A. simplex*, con 06 bandas proteicas inmunogénicas de 40, 25, 21, 18, 14 y 11 kDa; *A. physeteris*, con 07 bandas de 41, 35, 30, 24, 12,

10 y 9 kDa; y *C. osculatum*, igualmente con 07 bandas de 47, 28, 24, 17, 15, 13 y 11 kDa. Se determinó la seroprevalencia resultando positivos 15% (3/20) sueros de pescadores artesanales, frente al antígeno de *A. simplex* y *A. physeteris*; y 5% (1/20) de un paciente de gastroenterología con *A. simplex*, presentando bandas inmunogénicas específicas características. En conclusión, se reconoce por primera vez la presencia de anticuerpos específicos contra larvas de estadio 3 (L₃) de *Anisakis simplex* y *A. physeteris* en consumidores de pescado en el Perú; siendo un caso nuevo y el primero de Anisakiasis por *A. physeteris* en el neotrópico, confirmada por *Western blot*.

Palabras clave: Anisákidos, *Anisakis simplex*, *A. physeteris*, *Contracaecum osculatum*, proteínas, antígenos de Anisákidos.

ABSTRACT

The Anisakiasis or Anisakidosis is a parasitic zoonosis caused by the accidental ingestion of the third stage larvae of *Anisakis simplex*, *A. physeteris*, *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatum* and *Hysterotylacium* sp. (L₃), which is encysted in the visceral surface or muscular tissue of marine fishes. The present study was made with the objective to know the composition and antigenic activity protein the L₃ of *A. simplex*, *A. physeteris* and *C. osculatum*; and to determine the presence of specific antibodies in the serum of artisan fishermen and gastroenterology patients with unknown etiology. The L₃ was isolated of the visceral surface of some teleost fishes, coming from the fishing terminals of Lima and Ica. The L₃ of *A. simplex*, *A. physeteris* and *C. osculatum*, were processed by using a sterile phosphate buffer solution (pH 7,2), later on were sonicated and centrifuged cold. To obtain hyperimmune serum rabbits were immunized (New Zealand), being evaluated the specific antibody title (IgG) by means of ELISA'S test (enzyme-linked immunosorbent assay). For the total proteins evaluation an electrophoretic assay was made in gel of polyacrilamide (SDS-PAGE); and the antigenic profile became by Western blot. The presence of specific antibodies was evaluated for the three species against the artisan fishermen serum, patients of gastroenterology and people selected at random chosen from Andahuaylas was evaluated. The protein pattern of the L₃ of *A. simplex* was characterized with 13 bands with a molecular weight of 64 to 11 kDa; *A. physeteris* with 18 bands of 73 to 9,5 kDa and *C. osculatum* with 14 bands of 77 to 11kDa. Determining specific protein bands of 58, 35 and 9,5 kDa for *A. physeteris*; and of 77 and 28 kDa for *C. osculatum* that differentiate them from *A. simplex*. A higher similarity was determined among *A. simplex* and *A. physeteris*, and among *A. physeteris* and *C. osculatum*; and there was less similarity between *A. simplex* and *C. osculatum*. The antigenic profile was determined for *A. simplex* with 06 immunogenic protein fractions of 40, 25, 21, 18, 14 and 11 kDa; *A. physeteris* with 07 bands of 41, 35, 30, 24, 12, 10 and 9 kDa; and *C.*

osculatum equally with 07 bands of 47, 28, 24, 17, 15, 13 and 11 kDa. From the evaluation of serums, were positive 15% (3/20) serums of artisan fishermen in front of the antigen of *A. simplex* and *A. physeteris*, and 5% (1/20) of a patient of gastroenterology with *A. simplex*, presenting immunogenic protein bands specific characteristics. In conclusion, recognizes as the first time the presence of specific antibodies against larvas of stadium 3 (L₃) of *Anisakis simplex* and *A. physeteris* in consumers of fish in Peru, being a new case and the Anisakiasis's first one for *A. physeteris* in the neotrópico, confirmed by Western blot.

Key words: Anisákidos, *Anisakis simplex*, *A. physeteris*, *Contracecum osculatum*, proteins, Anisakids antigens.