



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 340 978**

② Número de solicitud: 200803495

⑤ Int. Cl.:

G01N 33/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **10.12.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2010**

Fecha de la concesión: **12.05.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **24.05.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
24.05.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 51 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Carlos III (Titular al 49 %)

⑱ Inventor/es: **Rodríguez Mahillo, Ana Isabel;**
Tejada Yábar, Margarita;
González Muñoz, Miguel;
Moneo Goiri, Ignacio y
Solas Alados, María Teresa

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos destinados al consumo humano o animal.**

㉑ Resumen:

Método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos destinados al consumo humano o animal.

La presente invención se refiere a un método de extracción y detección de alérgenos de parásitos de pescado en muestras alimentarias para el consumo humano o animal. La extracción se basa en aplicar soluciones con baja fuerza iónica, homogeneización, sonicación y diferentes pH a diversos tipos de pescado ya sean frescos o tratados. La detección se basa en métodos inmunoquímicos mediante el uso de anticuerpos policlonales que permiten detectar proteínas antigénicas del parásito así como anticuerpos policlonales que permiten detectar el alérgeno Ani s 4, que por sus características físico-químicas resiste el tratamiento térmico del alimento. El método es sensible, ya que se puede detectar Ani s 4 en cantidades inferiores a 1ppm con tasas de recuperación mayores a un 65%. El método descrito es específico ya que no muestra reactividad cruzada con componentes de las distintas matrices ensayadas.

ES 2 340 978 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos destinados al consumo humano o animal.

5 La presente invención se refiere a un método de extracción y detección de alérgenos de parásitos de pescado en muestras alimentarias para el consumo humano o animal. La extracción se basa en aplicar soluciones con baja fuerza iónica, homogeneización, sonicación y diferentes pH a diversos tipos de pescado ya sean frescos o tratados. La detección se basa en métodos inmunoquímicos mediante el uso de anticuerpos policlonales que permiten detectar proteínas antigénicas del parásito así como anticuerpos policlonales que permiten detectar el alérgeno Ani s 4, que por
10 sus características físico-químicas resiste el tratamiento térmico del alimento. El método es sensible, ya que se puede detectar Ani s 4 en cantidades inferiores a 1 ppm con tasas de recuperación mayores a un 65%. El método descrito es específico ya que no muestra reactividad cruzada con componentes de las distintas matrices ensayadas.

Estado de la técnica anterior

15 El género *Anisakis* incluye parásitos nemátodos que pertenecen a varias especies relacionadas. Mediante el uso de marcadores morfológicos y genéticos/moleculares actualmente se reconocen las siguientes especies de *Anisakis*: *Anisakis pegreffii*, *Anisakis physeteris*, *Anisakis schupakovi*, *Anisakis simplex*, *Anisakis typical*, *Anisakis ziphidarum*, *Anisakis typica*, *Anisakis brevispicuiata* o *Anisakis paggiae*.

20 Las especies de *Anisakis* alcanzan la madurez sexual en el estómago de cetáceos y, menos frecuentemente, en pinnípedos. Estos mamíferos pueden infestarse por ingestión de a) hospedadores paraténicos, es decir, peces (principalmente teleósteos) y cefalópodos (principalmente calamares), que albergan la tercera fase larvaria del parásito (L3), y b) por ingestión de krill, como intermedio, que también alberga las larvas L3 (por ejemplo, ballenas).

25 Al igual que los mamíferos marinos, los seres humanos también pueden infestarse por larvas L3 de *Anisakis* mediante la ingestión de peces y calamares crudos o poco cocinados portadores del parásito, lo cual produce una enfermedad clínica denominada anisakiosis o anisakiasis.

30 Cuando las larvas L3 de *Anisakis* infestan a seres humanos, a menudo causan síntomas gastrointestinales que pueden estar asociados con reacciones alérgicas de distinta gravedad. Dependiendo de la localización de las larvas y los síntomas dominantes, se han presentado cuatro formas clínicas principales de anisakiosis (gástrica/gastroalérgica, intestinal, extragastrointestinal y alérgica) en seres humanos. En la forma gástrica (aguda) de anisakiosis, la larva penetra la pared gástrica y frecuentemente se observa un curso clínico caracterizado por dolor epigástrico agudo,
35 náuseas y vómitos unas pocas horas después de la ingestión de pescado que contenga larvas de *Anisakis* L3 vivas. Además, también pueden observarse síntomas alérgicos en individuos sensibilizados (aproximadamente el 10% de los casos).

40 La presencia de larvas de *Anisakis* en pescado produce en el consumidor la infestación por las larvas vivas cuando se consume el pescado crudo o sometido a tratamientos. La larva L3 de *Anisakis* es capaz de segregar proteínas que pueden producir reacciones alérgicas graves en individuos sensibilizados. Estas reacciones pueden ser producidas por la ingestión de las larvas vivas o muertas. Varios de los alérgenos de *Anisakis* descritos hasta la fecha son estables a congelación, altas temperaturas o altas presiones y resistentes a variaciones de pH y a la acción de enzimas digestivas. En su estructura poseen entre otros, grupos sulfidrilo (SH) que posibilitan la formación enlaces covalentes
45 con proteínas de la matriz en la que se encuentran, lo que puede complicar su extracción y modificar su capacidad antigénica.

50 Existen diferentes técnicas de complejidad y eficacia variables para detectar la presencia de la larva de *Anisakis* en el músculo y vísceras de pescado. Se pueden enumerar las siguientes: Examen visual simple, transiluminación con luz ultravioleta, digestión, espectroscopia de imagen por absorción/reflexión, diferencia de conductividad (W093/14400). Todas ellas tienen como objetivo la detección del parásito vivo o muerto pero no detectan la presencia de antígenos del parásito en el músculo del pescado.

55 Por otra parte han sido descritas técnicas de detección basadas en secuencias nucleotídicas y peptídicas pertenecientes a las larvas de *Anisakis* pero que no están basadas en la extracción, concentración o captura de los antígenos de *Anisakis* a partir de muestras alimentarias (WO2008006927 A1).

60 El problema técnico que plantea la detección de antígenos alergénicos de larvas de *Anisakis* es la dificultad en la extracción de antígenos propios del parásito que sean válidos en un paso posterior para inducir la producción de anticuerpos contra dichos antígenos y/o para que sean detectados por anticuerpos ya generados con anterioridad.

65 Se han descrito métodos de extracción de antígenos que utilizan la incubación de larvas vivas a rangos de pH similares al del estómago de humanos (ES2209592 y Moneo *et al.* (2005) *Parasitol. Res.* 96(5):285-9). Para una detección precisa se requiere un proceso de extracción de antígenos que sea robusto, rápido, eficaz y sencillo que permita la detección de antígenos presentes en una muestra que contenga o haya contenido larvas de *Anisakis* vivas o muertas.

En el caso de parásitos de peces que suponen un riesgo para la salud, como las especies pertenecientes al género *Anisakis*, hay que añadir que las matrices varían de un pescado a otro, incluso tratándose de pescados frescos, y se pueden modificar al aplicar procesos de conservación y tratamiento tecnológico debido a la labilidad de las proteínas del pescado y a la rápida oxidación de sus lípidos. Por ello, es necesario disponer de un método de extracción sencillo, sin pasos complejos de captura y aislamiento de un alérgeno de interés en salud humana, que sea aplicable a diferentes pescados, ya sean frescos, congelados o cocinados y que permita la detección de antígenos alérgenos en concentraciones traza.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un método de extracción y detección de alérgenos de parásitos de pescado en muestras alimentarias para el consumo humano o animal. El método permite la extracción sencilla y eficaz sin pasos de captura y aislamiento del alérgeno. Además se identifica la presencia de alérgenos de interés en salud humana. Mediante la aplicación de este método se extraen alérgenos de *Anisakis* en concentraciones inferiores a 1 ppm y con tasas de recuperación superiores a un 65%. El método es aplicable a diferentes pescados, a muestras procedentes de diferentes partes del pescado o a otras muestras que contienen cualquier procesado de pescado. La detección de los antígenos de *Anisakis* se lleva a cabo por medio de técnicas inmunoquímicas basadas en anticuerpos policlonales. Utilizando anticuerpos policlonales frente a un extracto crudo del *Anisakis*, se detectan diferentes proteínas del parásito permitiendo la identificación de antígenos incluso en los casos en que la inspección veterinaria no detecta al parásito. Asimismo al utilizar anticuerpos policlonales dirigidos al alérgeno Anis 4, se puede detectar la presencia del alérgeno que, debido a sus propiedades físico-químicas de bajo peso molecular, termoestabilidad, resistencia a pepsina y a altas presiones resiste los procesados, tratamientos o los diferentes procesos culinarios. El método descrito es específico ya que no muestra reactividad cruzada con componentes de las distintas matrices ensayadas.

La extracción y posterior detección de algunos alérgenos en alimentos puede ser complicada ya que suelen estar en concentraciones traza y en matrices complejas. Además cuando se trata de alimentos ya elaborados, conservados o cocinados, la extracción y detección de los alérgenos puede verse alterada por el procesamiento del alimento. La detección por métodos inmunoquímicos basados en anticuerpos (ELISA, Western blot, dot blot o tiras inmunocromatográficas) permite la identificación específica del alérgeno en el extracto. Sin embargo, la alteración del alérgeno por el procesamiento del alimento puede alterar su extracción y/o detección. En la presente invención, esto se soluciona utilizando un método de extracción sencillo y eficaz y una detección por medio de anticuerpos policlonales generados contra un extracto crudo del parásito y/o detectando alérgenos que sean estables y por lo tanto que puedan ser detectados incluso después de que el alimento sea congelado, calentado o sometido a otros tratamientos.

El método de la presente invención conduce a un resultado inesperado, ya que se simplifican los pasos de extracción de antígenos de *Anisakis*, consiguiéndose de al mismo tiempo un efecto sorprendente en la detección posterior de antígenos específicos de *Anisakis*, tal como se demuestra en los ejemplos, obteniéndose una tasa de recuperación del antígeno Anis 4, inyectado en músculo de pescado, de un 65% y una sensibilidad de detección de menos de 1 ppm.

En este sentido, el principal aspecto de la presente invención es un método de extracción y detección de antígenos del género *Anisakis* en un alimento destinado al consumo humano y/o animal que comprende: Obtener la muestra de alimento. Añadir una solución hipotónica a la muestra de alimento para fracturar las membranas celulares y homogeneizar para seguir fracturando las membranas intactas. Sonicar el homogenado para liberar con mayor eficacia los antígenos. Separar el sobrenadante. Reducir el pH del sobrenadante hasta un valor igual o menor de 3. Incubar el sobrenadante. Neutralizar el pH. Separar el sobrenadante del producto obtenido, en este caso el sobrenadante se denomina extracto crudo y, analizar el extracto crudo por medio de técnicas inmunoquímicas.

Los ejemplares del género *Anisakis* son nematodos parásitos, cuyo ciclo vital afecta a los peces y mamíferos marinos. Son infecciosos para los seres humanos y causan anisakiasis, una reacción alérgica severa. Las especies del género *Anisakis* a las que se refiere la presente invención se seleccionan de la lista que comprende, sin limitarse, *Anisakis pegreffii*, *Anisakis physeteris*, *Anisakis schupakovi*, *Anisakis simplex*, *Anisakis typical*, *Anisakis ziphidarum*, *Anisakis typica*, *Anisakis brevispicuiata* o *Anisakis paggiae*. Preferiblemente se selecciona la especie *Anisakis simplex*.

El término “solución hipotónica” hace referencia a una solución con una concentración de soluto menor que la concentración de soluto del interior de la célula (citoplasma). De este modo, en una célula sumergida en una solución hipotónica, el agua difunde al interior de la célula sin límite y como consecuencia tiende a romper las membranas celulares, es decir, la célula muere y se libera el contenido del citoplasma.

El término “homogeneizar” tal como se usa en la presente invención hace referencia al proceso que permite romper las células con la ayuda de un émbolo rotatorio que se ajusta a las paredes de un tubo. El dispositivo que permite la homogeneización se denomina homogeneizador. Existen homogeneizadores en los que está calibrada la separación entre el émbolo y la pared para producir homogenizados con un tamaño de partícula determinado.

El término “sonicar” tal como se usa en la presente invención se refiere a la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular. La intensa agitación producida destruye las membranas celulares. Dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada se pueden destruir asimismo las estructuras subcelulares e incluso solubilizar complejos proteicos. Se suele aplicar en frío para evitar el sobrecalentamiento de las muestras que podría provocar la desnaturalización de las proteínas.

ES 2 340 978 B1

Por tanto, todas las técnicas descritas anteriormente se emplean para destruir las células y liberar sus proteínas. Cada una de las técnicas produce un efecto en la destrucción de las membranas celulares y todos ellos constituyen una forma efectiva de extraer las citadas proteínas.

5 El término “separar el sobrenadante” tal como se entiende en la presente invención se refiere al fraccionamiento y selección de la fracción líquida también denominada sobrenadante. Para ello se emplean técnicas que permiten la separación de las fracciones sólidas o en suspensión que son insolubles de las fracciones líquidas que contienen las proteínas solubles. Preferiblemente la separación se lleva a cabo mediante centrifugación.

10 Concretamente, una vez que el homogenado es sonicado, se procede a su fraccionamiento mediante centrifugación y se selecciona solamente el sobrenadante.

15 La reducción del pH se lleva a cabo mediante la adición de un ácido con el objeto de conseguir un pH por debajo de 3. Se debe mantener en incubación a ese pH. La incubación se realiza preferiblemente a temperatura ambiente de entre 16°C y 27°C. El objeto de reducir el pH por debajo de 3 es recuperar de forma específica aquellos antígenos que permanecen solubles a un pH menor de 3, ya que este pH se aleja del punto isoelectrico (PI) de las proteínas antigénicas (PI de Ani s 4 = 5,6) que se pretenden detectar pero no es necesario que las larvas estén vivas. En el pH que coincide con el PI de una proteína, ésta se encuentra en las condiciones de menor solubilidad y por tanto, para poder recuperar las proteínas en su forma soluble es necesario alejarse lo suficiente del PI de los antígenos de interés.

20 A continuación se neutraliza el pH alcanzando un valor de entre 6 y 8. Preferiblemente la reducción del pH se lleva a cabo por medio de ácido clorhídrico (HCl). Asimismo, la neutralización del pH se lleva a cabo preferiblemente por medio de NaOH.

25 El análisis del extracto crudo se lleva a cabo por medio de técnicas inmunoquímicas. Las técnicas inmunoquímicas permiten la detección de antígenos del género *Anisakis*. Parte de los antígenos que se pueden detectar mediante el método descrito son alérgenos.

Un antígeno es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmune.

30 Un alérgeno es una sustancia que puede inducir en un individuo una reacción de hipersensibilidad en personas susceptibles. En estas personas se reconoce el alérgeno como sustancia “extraña” y ajena al organismo en el primer contacto. En exposiciones posteriores, el sistema inmunológico reacciona a la exposición de forma exagerada, con liberación de sustancias que alteran la homeostasis del organismo, lo que da lugar a los síntomas propios de la alergia.

35 La inmunoquímica se basa en la utilización de un anticuerpo específico (policlonal o monoclonal), previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima (preferiblemente por conjugación) que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra. El complejo antígeno-anticuerpo así formado, mediante la utilización de alguna de las enzimas específicas (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc), permite ser localizado e identificado dentro de las muestras obtenidas. El análisis

40 del extracto crudo mediante técnicas inmunoquímicas puede permitir la detección (presencia) o no (ausencia) de antígenos de *Anisakis* en cualquiera de sus fases de desarrollo reconocidos por anticuerpos específicos.

Una realización preferida es el método descrito donde además se lleva a cabo la concentración del extracto crudo obtenido. La concentración se lleva a cabo preferiblemente mediante precipitación por un alcohol. Preferiblemente el alcohol es etanol 100% (o etanol absoluto) y se añade al extracto crudo en una relación de 1:5 a 1:9 (extracto

45 crudo:etanol).

En otra realización preferida del método, el análisis se lleva a cabo mediante la utilización de anticuerpos policlonales anti-antígeno de *Anisakis* y de anticuerpos policlonales anti-Ani s 4.

50 Utilizando anticuerpos policlonales frente a un extracto crudo de *Anisakis*, se detectan diferentes proteínas del parásito permitiendo la identificación del mismo incluso en los casos en que la inspección veterinaria no lo detecte. La utilización de anticuerpos policlonales dirigidos frente al alérgeno Ani s 4, permite detectar la presencia del alérgeno y debido a sus propiedades físico-químicas (bajo peso molecular, termoestabilidad, resistencia a pepsina y a altas presiones, etc.), se puede identificar en muestras procesadas industrialmente o en diferentes procesos culinarios.

Otra realización preferida es el método donde el análisis se lleva a cabo por medio o bien de *western blot* o bien de *dot blot*. El *western blot* permite la separación de proteínas desnaturalizadas mediante la implementación de la electroforesis. Las proteínas son transferidas desde el gel hacia la membrana (preferiblemente de nitrocelulosa),

60 donde son examinadas utilizando los anticuerpos específicos para la proteína. El *dot blot* permite la detección de las proteínas antigénicas de interés mediante la aplicación de la mezcla de proteínas o extracto crudo a una membrana como un punto (*dot*) y seguidamente se aplican anticuerpos específicos. El *dot blot* permite ahorrar tiempo al no tener que emplear cromatografía o electroforesis, sin embargo, no ofrece información acerca de los antígenos detectados, de modo que solamente se puede confirmar la presencia o ausencia de dichos antígenos. El análisis puede ser llevado

65 a cabo además, sin limitarse, o bien por medio de la técnica ELISA o bien por medio de tiras inmunocromatográficas.

Según otra realización preferida más, la muestra de alimento se obtiene o bien de pescado o bien de cualquier alimento que contenga cualquier derivado de pescado.

ES 2 340 978 B1

Teniendo en cuenta que los parásitos del género *Anisakis* tienen un ciclo vital que afecta a los peces y mamíferos marinos, la muestra de alimento puede ser pescado fresco, elaborado, conservado o cocinado, sin limitarse a estos tipos de pescado. Además, la muestra de alimento también puede obtenerse de cualquier producto alimentario que contenga cualquier derivado de pescado, entendiéndose como derivado de pescado cualquier producto procesado que comprenda cualquier parte del pescado incluyendo proteínas o extractos de pescado.

El término “pescado” tal como usa en la presente invención hace referencia a los peces (pescado vertebrado) o a las especies acuáticas invertebradas (pescado invertebrado) como por ejemplo, sin limitar, a los cefalópodos, que han sido extraídos de un medio natural o artificial en el que se estas especies pasan alguna de las etapas de su ciclo de vida.

En una realización más preferida, la muestra de alimento se obtiene de un pescado del género *Merluccius* o *Engraulis*. Preferiblemente la muestra de alimento se selecciona o bien pescado de la especie *Merluccius merluccius*, o bien pescado de la especie *Engraulis encrasicolus*. La merluza (*Merluccius merluccius*) y el boquerón (*Engraulis encrasicolus*) son los principales alimentos relacionados en los casos de alergia por *Anisakis*, según la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC).

Según otra realización preferida la muestra de alimento se obtiene de un pienso. El pienso puede contener cualquier derivado de pescado y/o puede estar destinado a la alimentación de especies de acuicultura u otras especies destinadas a consumo humano.

En otra realización preferida de cualquiera de los métodos anteriores se extraen y detectan antígenos de la especie *Anisakis simplex*.

Según otra realización preferida, el método se emplea para evaluar la eficacia de los tratamientos de los alimentos para matar o eliminar parásitos del género *Anisakis* o inactivar o suprimir sus alérgenos. Los tratamientos de los alimentos comprenden el tratamiento térmico (congelación o alta temperatura), alta presión hidrostática, succión por vacío o electrocución, sin limitarse a estos tratamientos.

Según la legislación nacional, se fija la obligatoriedad, para los establecimientos que sirven comida, de someter todos los pescados que se vayan a servir en crudo o casi crudos a una temperatura igual o inferior a -20°C durante 24 horas una vez que el producto ha alcanzado esta temperatura. Esto incluye productos de la pesca que han sido sometidos a un proceso de ahumado en frío en el que la temperatura central del producto no ha sobrepasado los 60°C. Igualmente estarán obligados a garantizar la congelación en las mismas condiciones si se trata de productos de la pesca en escabeche o salados, cuando este proceso no baste para destruir las larvas. Mediante el método de la presente invención se puede evaluar la eficacia de dichos tratamientos en la elaboración y/o preparación de los productos de la pesca así como determinar la presencia o ausencia de alérgenos tales como Anisakis 4.

Otro aspecto de la presente invención es un kit para la extracción y detección de antígenos del género *Anisakis* que comprende solución hipotónica, soluciones para cambiar el pH de los productos obtenidos, anticuerpos policlonales anti-antígeno de *Anisakis* y anticuerpos policlonales anti-Anisakis 4.

Las soluciones para cambiar el pH de los productos obtenidos tal como se describe a lo largo de esta explicación de la invención, comprenden una solución que reduzca el pH por debajo de 3 y una solución que neutralice el pH ácido conseguido tras adicionar la solución anterior.

Según una realización preferida, el kit comprende, además, instrucciones para llevar a cabo la extracción y detección de antígenos del género *Anisakis*. En las citadas instrucciones se indica el volumen que ha de añadirse a los productos obtenidos y el orden de adición, así como los pasos intermedios que han de llevarse a cabo de acuerdo con el principal aspecto de la presente invención. Es decir, en las instrucciones se describirá el protocolo que ha de seguirse para llevar a cabo tanto la extracción de antígenos de *Anisakis* como la detección de los mismos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra el proceso de extracción de proteínas del parásito en muestras de peces.

M: Muestra.

H: Homogeneización.

S: Sonicación.

SOL: solución hipotónica, pH neutro.

ES 2 340 978 B1

B: Bajar el pH del sobrenadante.

N: Neutralizar.

5 E: Extracto crudo para analizar.

Fig. 2. Muestra la detección de antígenos de *Anisaki* y del alérgeno *Ani s 4* en diferentes pescados de consumo humano.

10

M: *Merluccius merluccius* (Merluza).

E: *Engraulis encrasicolus* (Boquerón).

15

S: *Sardina pilchardus* (Sardina).

Mu: *Mullus* spp. (Salmonete).

20

Anti-E: Anticuerpos anti extracto crudo.

Anti-*Ani s 4*: Anticuerpos anti-*Ani s 4*.

25

Fig. 3. Muestra la presencia de antígenos y del alérgeno de *Ani s 4* de *Anisakis* por western blot en diferentes partes de un mismo pescado.

V: Ventresca. C: Cola.

30

Anti-E: Anticuerpos anti extracto crudo.

Anti-*Ani s 4*: Anticuerpos anti-*Ani s 4*.

35

Fig. 4. Muestra la presencia de antígenos de *Anisakis* y del alérgeno *Ani s 4* por dot blot en diferentes pescados.

M: *Merluccius merluccius* (Merluza).

40

E: *Engraulis encrasicolus* (Boquerón).

M1 a M10 y B1 a B10: muestras correspondientes a distintos ejemplares de merluza (M) y boquerón (E).

45

Anti-E: Anticuerpos anti extracto crudo.

Anti-*Ani s 4*: Anticuerpos anti-*Ani s 4*.

50

Fig. 5. Muestra la sensibilidad de detección de *Ani s 4* y recuperación en ensayos de adición.

A: Recuperación y detección de *Ani s 4* recombinante inyectado en músculo de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*).

55

B: Recuperación y detección de *Ani s 4* para determinar la recuperación del alérgeno.

Fig. 6. Muestra el efecto del pH en la extracción de *Ani s 4*.

60

A: extracción de *Ani s 4* en *Micromesistius poutassou* (bacaladilla) a pH <3.

B: extracción de *Ani s 4* en *Micromesistius poutassou* (bacaladilla) a pH 7.

C: extracción de *Ani s 4* en *Engraulis encrasicolus* (boquerón) a pH <3.

65

D: extracción de *Ani s 4* en *Engraulis encrasicolus* (boquerón) a pH =7.

ES 2 340 978 B1

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen el método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis*.

5

Ejemplo 1

Extracción de antígenos de Anisakis. Obtención del extracto crudo

10

Se mezclaron 10 g de músculo de bacaladilla con 30 mL de 30 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 6,8. Se homogeneizó hasta obtener una mezcla homogénea y sin grumos. La mezcla se sometió a sonicación durante 30 segundos a 18 watts y se incubó en agitación orbital vertical durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó durante 30 minutos a 4000 g y 20°C, el sedimento se descartó y 5 mL de sobrenadante se pasaron a un tubo limpio. Se añadió HCl 5N hasta obtener un pH de 2. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y el pH se neutralizó con NaOH 5N. Seguidamente se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se centrifugó durante 15 minutos a 3000 g y 20°C. El sobrenadante fue el extracto en el que se encontraban los antígenos de *Anisakis* (extracto crudo). Este proceso puede verse resumido en la Fig. 1.

15

20

Un paso alternativo es la concentración del extracto. Para ello se tomó una alícuota de 1 ml del extracto crudo y se mezcló con 9 ml de etanol absoluto en reposo y temperatura ambiente, durante 15 minutos. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 3000 g y 20°C. Se Descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 μ l de tampón de muestra de electroforesis.

25

Ejemplo 2

Detección de proteínas de Anisakis o de Ani s 4 por western blot

30

La detección de proteínas del parásito o del alérgeno Ani s 4 por *western blot* se llevó a cabo mediante los siguientes pasos:

35

1. Se hizo un gel de acrilamida al 16%.
2. Se prepararon las muestras diluyéndolas en un volumen adecuado de tampón de carga. El tampón de carga de muestras para geles de SDS-PAGE estaba compuesto por: 12.5 ml Tris 1 M pH 6.8 (concentración final 125 mM), 40 ml SDS 10% (concentración final 4%), 20 ml Glicerol (concentración final 20%), 2 ml Azul de Bromofenol 0.2% (concentración final 0.042%), se llevó hasta un volumen final de 100 ml con H₂O destilada. En caso de requerirse condiciones reductoras, se añadió 5% de 2-Mercaptoetanol fresco.
3. Se cargaron las muestras en los pocillos del gel de acrilamida.
4. Se realizó la electroforesis a 40 V/gel (1.2 V/cm²).
5. Se equilibró el gel y la nitrocelulosa (NC) en tampón de transferencia sometándolo a agitación orbital durante 15 minutos (Composición del tampón de transferencia: 50 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.4).
6. Se llevó a cabo la transferencia por difusión durante toda la noche, temperatura ambiente y agitación.
7. Se Incubó la NC en el detergente no iónico Nonidet P-40 (NP-40) 3% en solución salina tamponada con fosfato (ClNa 0,15 M, Tampón fosfato pH 7.0) (PBS) a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos.
8. Se lavó la NC en PBS a temperatura ambiente en agitación durante 5 minutos y se repitió hasta un total de 3 veces.
9. Se incubó con antisuero de conejo anti-extracto crudo del parásito o con antisuero de conejo anti-Ani s 4 diluidos 1/8000 en solución diluyente durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación (Composición de la solución diluyente: 10 mM Tris-salino, 5% de Suero de Ternera Fetal (STF), 1% Tween 20, pH 7.4).
10. Se lavó en solución de lavado a temperatura ambiente en agitación durante 5 minutos y se repitió hasta un total de 3 veces (Composición de la solución de lavado: 0.5M NaCl, 2 mM Tris-Cl pH 7.4, 0.1% Tween 20).
11. Se incubó con Antisuero Anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1/5000 en Solución Diluyente durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación.

40

45

50

55

60

65

ES 2 340 978 B1

12. Se lavó en solución de lavado a temperatura ambiente en agitación durante 5 minutos y se repitió hasta un total de 4 veces.
13. Se lavó en solución salina a temperatura ambiente en agitación durante 1 minuto. Composición de la solución salina: 0.15 mM NaCl.
14. Se incubó con BCIP-NBT (*5-Bromo-4-Choro-3-Indolyl Phosphate-Nitro Blue Tetrazolium*) a temperatura ambiente durante 30 minutos.
15. Finalmente se paró la reacción con H₂O o PBS y se analizó.

Un ejemplo de los resultados cuando se analizaron diferentes peces se muestra en la Fig. 2. En la Fig. 3 se muestra los resultados cuando se analizaron diferentes muestras extraídas del mismo pez.

Ejemplo 3

Detección de proteínas de Anisakis por dot blot

La detección de proteínas del parásito o del alérgeno Ani s 4 por *dot blot* se llevó a cabo mediante los siguientes pasos:

1. Se aplicaron 10 μ l del extracto crudo en una membrana de NC.
2. Se dejó secar la NC durante 30 minutos a 25°C.
3. Se lavó la NC en PBS a temperatura ambiente en agitación durante 5 minutos y se repitió hasta 3 veces.
4. se incubó con antisuero de conejo anti-extracto crudo o con antisuero de conejo anti-Ani s 4 diluidos 1/8000 en solución diluyente durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Composición de la solución diluyente: 10 mM Tris-salino, 5% STF, 1% Tween 20, pH 7.4.
5. Se lavó en solución de lavado a temperatura ambiente en agitación durante 5 minutos y se repitió hasta 3 veces. Composición de la solución de lavado: 0.5M NaCl, 2 mM Tris-Cl pH 7.4, 0.1% Tween 20.
6. Se incubó con Antisuero Anti-IgG conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1/5000 en solución diluyente durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
7. Se lavó en solución de lavado a temperatura ambiente en agitación durante 5 minutos y se repitió hasta 3 veces.
8. Se lavó en solución salina temperatura ambiente en agitación durante 1 minuto. Composición de la solución salina: 0.15 mM NaCl.
9. Se incubó con BCIP-NBT (*5-Bromo-4-Choro-3-Indolyl Phosphate-Nitro Blue Tetrazolium*) a temperatura ambiente durante 10 minutos.
10. Finalmente se paró la reacción con H₂O o PBS y se analizó.

Un ejemplo de los resultados se muestra en la Fig. 4.

Ejemplo 4

Determinación de la efectividad de extracción y de la sensibilidad en la detección de antígenos de Anisakis en Micro-mesistius poutassou

Se prepararon diferentes muestras de 10 gr de bacaladilla. A cada una se le inyectó una cantidad determinada de Ani s 4 recombinante (4 μ g, 2 μ g, 1 μ g y 0 μ g), para obtener las siguientes concentraciones del alérgeno: 0,4 ppm, 0,2 ppm y 0,1 ppm. El recombinante se inyectó en diferentes zonas de cada muestra de músculo de pescado. El extracto se preparó y concentró como se ha detallado previamente. La detección de Ani s 4 recombinante se realizó como el ejemplo 2. Como control, se prepararon diferentes concentraciones (0,4 ppm, 0,2 ppm y 0,1 ppm) de Ani s 4 en PBS con BSA al 0,5% y se introdujo en los pocillos correspondientes del gel. La recuperación de Ani s 4 recombinante superó el 65% y la sensibilidad de detección fue < 1 ppm como se puede observar en la Fig. 5.

ES 2 340 978 B1

Ejemplo 5

Efecto del pH en la extracción de antígenos

5 Para valorar el efecto del pH en la extracción de antígenos, se inyectó la misma concentración de Ani s 4 recombinante en muestras de bacaladillas y boquerones ($4 \mu\text{g}$ de recombinante en 10 gr de pescado; volumen de solución inyectada = $250 \mu\text{l}$ repartidos en 4 puntos de inyección por muestra de pescado). Se siguió el proceso de extracción descrito en el ejemplo 1. Una vez que las muestras fueron homogeneizadas, sonicadas y centrifugadas, el sobrenadante obtenido se dividió en dos alícuotas de 15 ml. Una de ellas se mantuvo a pH neutro, mientras que la otra se acidificó a pH <3 . Los siguientes pasos se realizaron como se ha descrito previamente.

10 La detección se realizó por inmunoblot con antisuero específico anti-Ani s 4 como se describe en el ejemplo 2. En la Fig. 6 se observa una gran diferencia en el rendimiento de la extracción entre los dos pHs, siendo claramente superior la extracción a pH ácido.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de extracción y detección de antígenos del género *Anisakis* en un alimento destinado al consumo humano y/o animal que comprende:
- 10 a. Obtener la muestra de alimento,
 - b. añadir una solución hipotónica a la muestra del apartado (a) y homogeneizar,
 - 10 c. sonicar el homogenado del apartado (b),
 - d. separar el sobrenadante del producto del apartado (c),
 - 15 e. reducir el pH del sobrenadante del apartado (d) hasta un valor igual o menor de 3,
 - f. incubar el sobrenadante del apartado (e) y neutralizar el pH,
 - g. separar el sobrenadante del producto del apartado (f) (extracto crudo) y
 - 20 h. analizar el extracto crudo del apartado (g) por medio de técnicas inmunoquímicas.
- 25 2. Método según la reivindicación 1 donde además se lleva a cabo la concentración del extracto crudo obtenido en el apartado (f) antes del apartado de análisis (h).
- 3 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde el análisis se lleva a cabo mediante la utilización de anticuerpos policlonales anti-antígeno de *Anisakis* y de anticuerpos policlonales anti-Ani s 4.
- 30 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el análisis se lleva a cabo por medio o bien de *western blot* o bien de *dot blot*.
- 5 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la muestra de alimento se obtiene o bien de cualquier parte procedente de pescado o bien de cualquier alimento que contenga cualquier derivado de pescado.
- 35 6. Método de según la reivindicación 5, donde la muestra de alimento se obtiene de un pescado del género *Merluccius*, *Micromesistius* o *Engraulis*.
- 40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la muestra de alimento se obtiene de un pienso.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde los antígenos extraídos y detectados son de *Anisakis simplex*.
- 45 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para evaluar la eficacia de los tratamientos de los alimentos contra parásitos del género *Anisakis*.
- 50 10. Kit para la extracción y detección de antígenos del género *Anisakis* que comprende solución hipotónica, solución para cambiar el pH de los productos obtenidos, anticuerpos policlonales anti-antígeno de *Anisakis* y anticuerpos policlonales anti-Ani s 4.
- 55 11. Kit según la reivindicación 10 que además comprende instrucciones para llevar a cabo la extracción y detección de antígenos del género *Anisakis*.
- 60
- 65

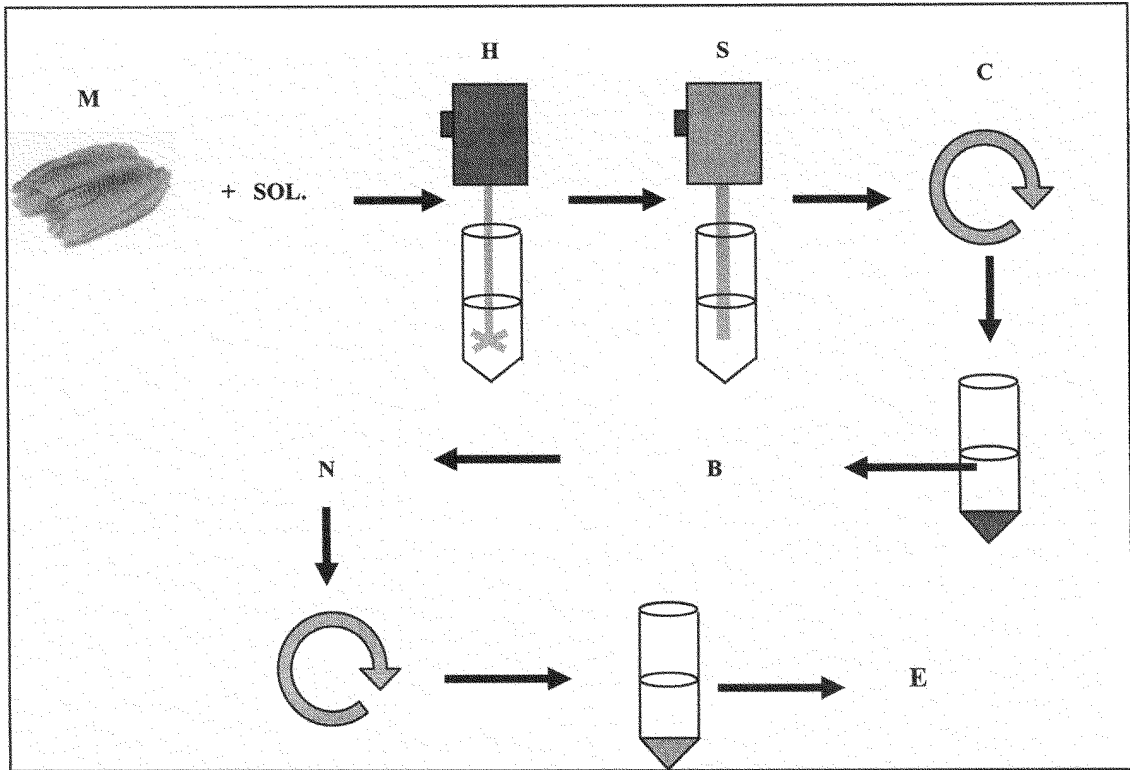


FIG. 1

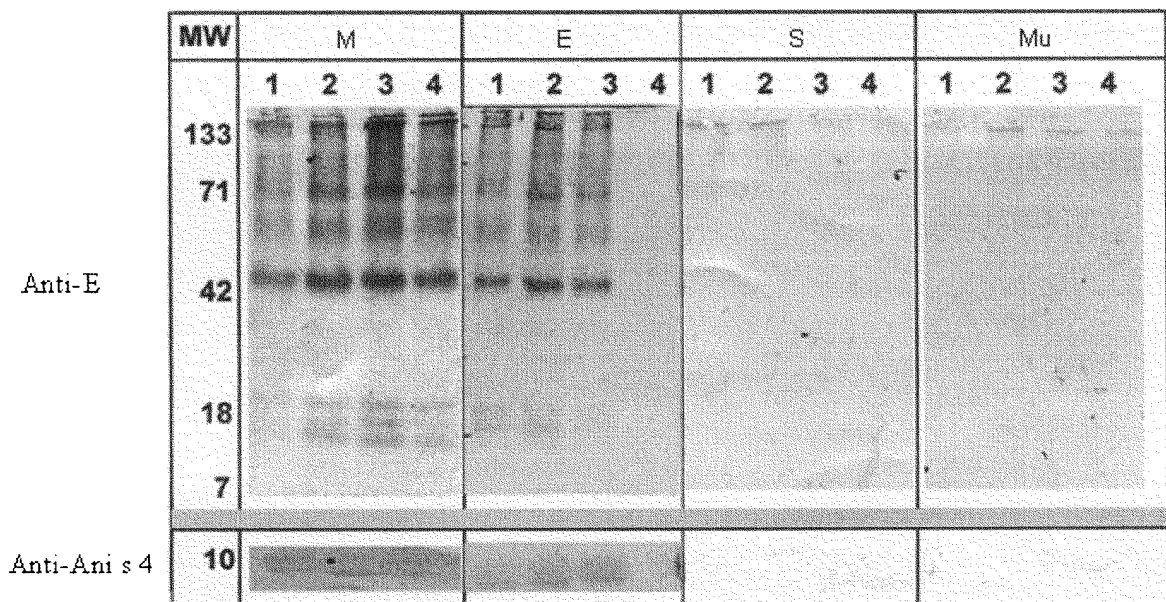


FIG. 2

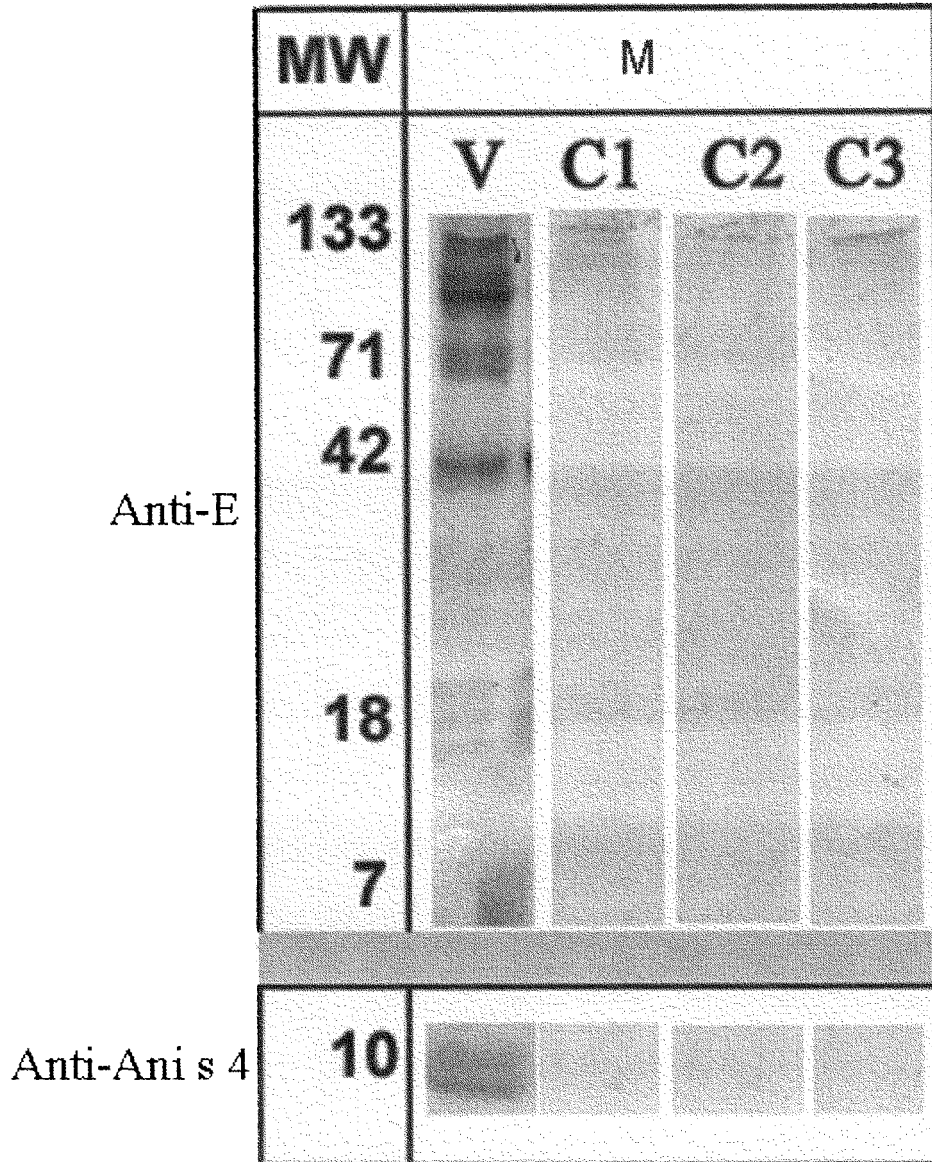


FIG. 3

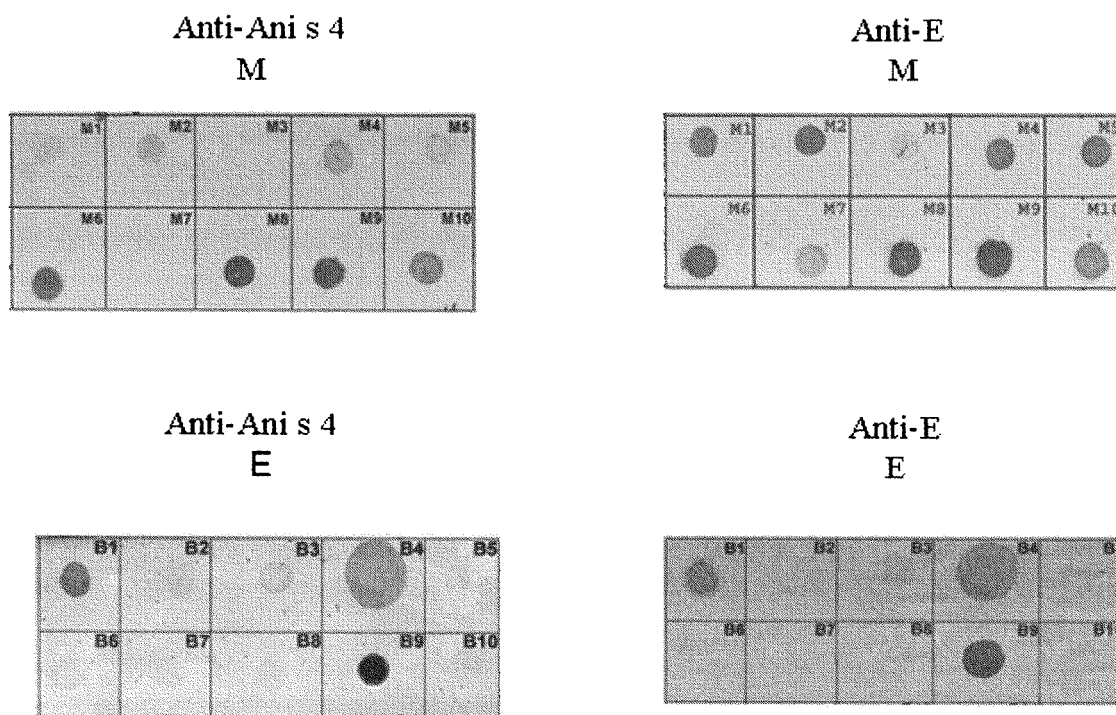


FIG. 4

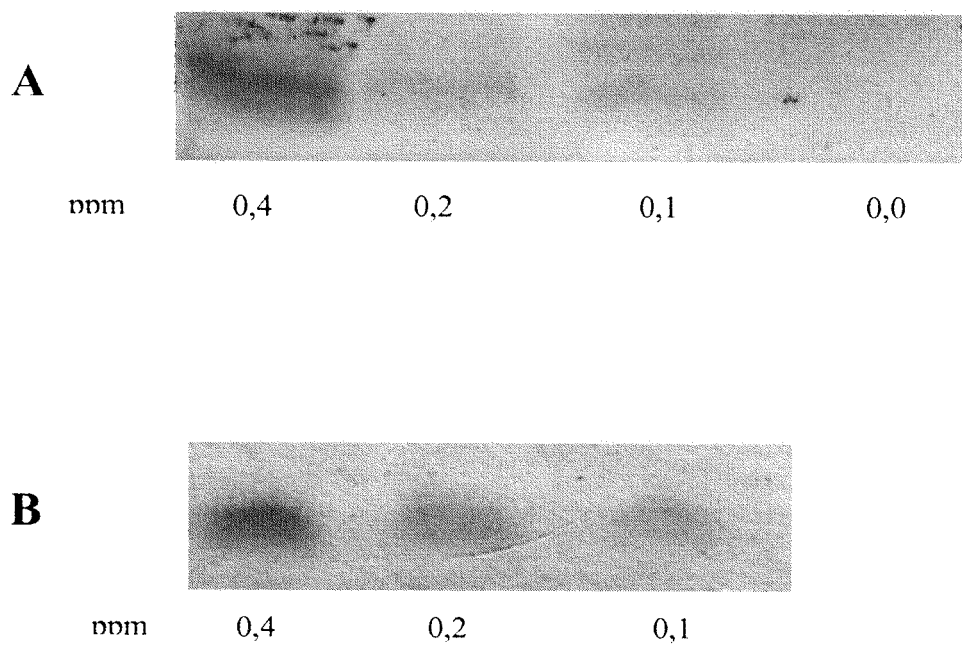


FIG. 5

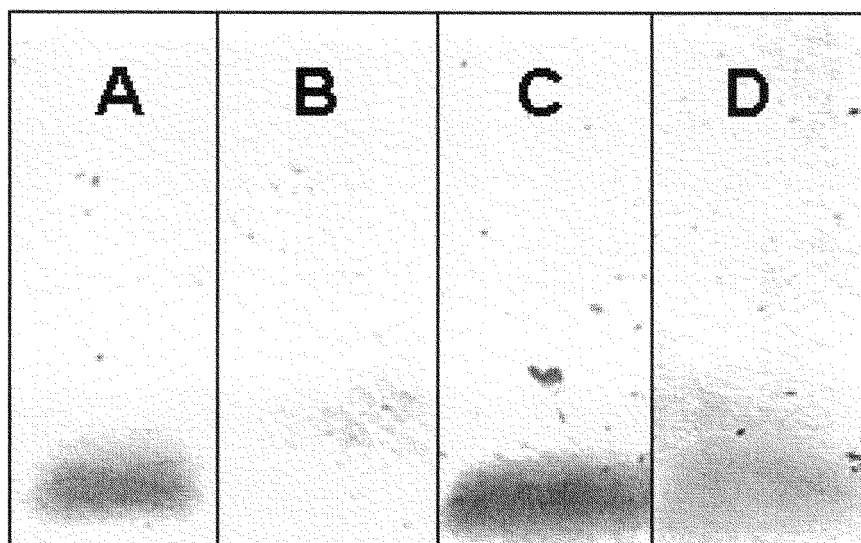


FIG. 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 978

② N° de solicitud: 200803495

③ Fecha de presentación de la solicitud: 10.12.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | WO 2008006927 A1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 17.01.2008, reivindicaciones 25,30. | 1,5,6,8, 10 |
| A | BAEZA, M.L. et al. Characterization of allergens secreted by Anisakis simplex parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. Clin. Exp. Allergy, 2004, vol. 34, páginas 296-302. | 1,3,8 |
| A | MONEO, I. et al. Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite Anisakis simplex. Parasitol. Res., 2005, vol 96, páginas 285-289. | 1-4,8 |
| A | MONEO, I. et al. Sensitization to the fish parasite Anisakis simplex: clinical and laboratory aspects. Parasitol. Res., 2007, vol. 101, páginas 1051-1055. | 1-4,8 |
| A | ES 2209592 A1 (INSTITUTO DE SALUD CARLOS III) 16.06.2004, todo el documento. | 1-3,8 |
| A | SOLAS, et al. Anisakis antigens detected in fish muscle infested with Anisakis simplex L3. Journal of food protection, junio 2008, vol. 71, páginas 1273-1276. | 1,3,5,6, 8 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

15.04.2010

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI. FSTA, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.04.2010

Declaración

| | | |
|--|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-11 | SÍ |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-11 | SÍ |
| | Reivindicaciones | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-------------------------------------|-------------------|
| D01 | WO2008/006927 | 17-01-2008 |
| D02 | BAEZA et al. | 2004 |
| D03 | MONEO et al. | 2005 |
| D04 | MONEO et al. | 2007 |
| D05 | ES2209592 | 16-06-2004 |
| D06 | SOLAS et al. | 2008 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La reivindicación independiente 1 de la solicitud se refiere a un método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos. El método comprende una serie de pasos: añadir a la muestra a examinar una solución hipotónica, homogenizar, sonicar, separar el sobrenadante, bajar el pH hasta un valor menor que 3, incubar el sobrenadante, neutralizar el pH, separar el sobrenadante y analizarlo con técnicas inmunoquímicas. También se reivindica un kit para extracción y detección de antígenos de *Anisakis* que contiene una solución hipotónica, una solución para cambiar el pH, anticuerpos policlonales anti antígeno de *Anisakis* y anticuerpos policlonales anti Ani s-4 (reivindicación 10).

El informe hace referencia a los siguientes documentos que muestran el estado de la técnica:

En el documento D01 se emplean técnicas inmunoquímicas para la detección de antígenos de *Anisakis* de la muestra problema y se reivindica asimismo un kit para su detección (reivindicaciones 25 y 30). Sin embargo, no se describe un método de extracción de los antígenos a partir de la muestra como el de la reivindicación 1.

En el documento D02 se diferencian dos tipos de alérgenos de *Anisakis simplex*: los somáticos y los de excreción/secreción siendo estos últimos más adecuados para el diagnóstico. Además, se comprueba que el pH no influye en la unión IgE con los antígenos excretados/secretados.

En el documento D03 se aísla y purifica un alérgeno de *Anisakis simplex* del tipo de los de excreción/secreción, el Ani s-4, resistente al calor y, por tanto, con capacidad para producir alergias en individuos sensibilizados que ingieran pescado cocinado o en lata.

En el documento D04 se describen diferentes métodos de obtención de antígenos de *Anisakis* ninguno de los cuales es el definido en la reivindicación 1.

El documento D05 es un método para producir antígenos excretados/secretados de *Anisakis simplex* que consiste en incubar las larvas de dicho parásito en un pH igual o inferior a 5. En este medio ácido y a una temperatura adecuada se produce una liberación rápida de antígenos excretados/secretados. Estos antígenos son útiles como reactivo de diagnóstico mediante técnicas inmunoquímicas.

En el documento D06 se comprueba la presencia del antígeno Ani s-4, en tejidos de pescado después de congelado por técnicas inmunohistoquímicas.

Ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, revelan la invención tal y como está definida en las reivindicaciones 1 a 11. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por estas reivindicaciones. Por consiguiente, se considera que las reivindicaciones 1 a 11 cumplen el requisito de novedad y de actividad inventiva.