

Hypersensitivity to *Anisakis simplex* allergens in humans

Kochanowski M., Karamon J., Dąbrowska J., Cencek T., Bilka-Zajac E., Różycki M.,

Department of Parasitology and Parasitic Diseases, National Veterinary Research Institute in Pulawy

This paper presents some data on the antigenic properties of the *Anisakis simplex*. *A. simplex* is widely occurring parasite of marine fish and mammals. Human can become the accidental host of this nematode. Many antigens of *A. simplex* are strong allergens which can be dangerous for human health. In addition, some of these antigens remain allergenic even after treatment with high and low temperature or pepsin. Therefore allergic reactions in humans may occur even after the consumption of processed food. Currently, there are numerous studies carried out on detection of food allergens and allergy to *Anisakis simplex* in humans, but diagnostic methods are still relatively low sensitive and low specific.

Keywords: *Anisakis simplex*, allergens, fish parasites.

Anisakis simplex Rudolphi, 1809 jest kosmopolitycznym, pasożytniczym nicieniem, należącym do rzędu Ascaridida i rodziny Anisakidae. Jest również jednym z najczęściej występujących pasożytów ryb morskich. Jego żywicielem ostatecznym są liczne gatunki ssaków morskich,

Uczulenia ludzi na alergeny *Anisakis simplex*

Maciej Kochanowski, Jacek Karamon, Joanna Dąbrowska, Tomasz Cencek, Ewa Bilka-Zajac, Mirosław Różycki

z Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

a żywicielem pośrednim skorupiaki, głowonogi i ryby morskie. Zapłodnione jaja złożone przez samicę *A. simplex* są wydalone z kałem żywiciela ostatecznego i dostają się do wody. Z jaj tych po 20–27 dniach wylęgają się zdolne do pływania larwy I stadium. Następnie larwa ta jest połykana przez żywiciela pośredniego – skorupiaka lub głowonoga, dostaje się do jamy ciała i po 8 dniach linieje i przekształca się w larwę II stadium. Drugim żywicielem pośrednim są ryby. Po zjedzeniu zarażonego skorupiaka/głowonoga larwa przenika z jelit do jamy ciała, linieje i staje się larwą III stadium. Po zjedzeniu zarażonej ryby przez ssaka morskiego larwa wnika do błony śluzowej i podśluzowej żołądka, odbywa kolejną linkę i przekształca się w larwę IV stadium. Larwa następnie opuszcza błonę śluzową żołądka, w jego świetle odbywa czwartą linkę, po której ostatecznie dojrzewa (1). Człowiek może stać się

żywicielem przypadkowym po zjedzeniu zarażonych larwami L3 surowych ryb (np. w postaci sushi, sashimi, ceviche) lub poddanych obróbce, która nie powoduje zabicia wszystkich larw – ryby wędzone, marynowane, solone, peklowane, suszone (2).

Po dostaniu się do przewodu pokarmowego człowieka larwy L3 mogą powodować rozwój choroby – anisakiozy. W zależności od lokalizacji rozróżnia się różne postaci choroby: żołądkową, jelitową, gardłową oraz zlokalizowaną poza przewodem pokarmowym. Do najważniejszych należą anisakioza żołądkowa i jelitowa, w przebiegu których błonę śluzową tych narządów uszkodzają wnikające w nią larwy. Powoduje to powstanie obrzęku, a nawet martwicy ściany jelit oraz ziarniników eozynoficznych w miejscu wniknięcia larwy. Larwy L3 mogą powodować także niebezpieczne reakcje alergiczne, łącznie ze wstrząsem anafilaktycznym. Należy podkreślić,

że takie reakcje mogą wystąpić również w przypadku spożycia przetworzonych już produktów rybnych, w których stwierdza się obecność białek pasożyta (3). Alergeny *A. simplex* uważane są obecnie za najpowszechniej występujące w żywności tzw. ukryte alergeny (4).

Anisakis simplex stanowi poważne zagrożenie dla konsumenta ze względu na częste występowanie larw tego pasożyta u ryb (dotyczy 40–80% ryb morskich, zależnie od gatunku) (5). Szczególnie duże ryzyko zarażenia człowieka larwami *A. simplex* występuje w rejonach, w których istnieje tradycja spożywania ryb surowych. Ryzyko to dotyczy również polskich konsumentów. W badaniach przeprowadzonych przez Guza i wsp. (6) stwierdzono występowanie larw *L3 A. simplex* u 83,3% przebadanych wędzonych śledzi pochodzących z lubelskich hipermarketów. Szostakowska i wsp. (7) także stwierdzili larwy *A. simplex*, w tym również żywe, w marynowanych i wędzonych śledziach przeznaczonych do spożycia.

Ze względu na te zagrożenia istnieje potrzeba doskonalenia wykrywania *A. simplex* i jego antygenów (alergenów) w rybach i produktach rybnych. Zgodnie z regulacją UE nr 2074/2005, badanie parazytologiczne ryb i produktów rybnych przed ich wprowadzeniem do obrotu polega jedynie na wzrokowej kontroli wypatroszonych ryb – jamy brzusznej oraz wątroby i ikry przeznaczonej do spożycia przez człowieka oraz filetów rybnych. Jest to badanie, które nie powoduje zniszczenia produktu, jednak zarazem charakteryzuje się bardzo małą dokładnością (8). Zastosowanie badania wzrokowego jest niezwykle trudne w przypadku badania ryb o ciemnej tkance mięśniowej oraz nieprzydatne w stosunku do przetworzonych produktów rybnych. Dlatego też prowadzone są liczne badania nad opracowywaniem skutecznych metod wykrywania antygenów w produktach rybnych, w oparciu przede wszystkim o metody serologiczne i techniki biologii molekularnej.

Odpowiedź układu immunologicznego człowieka na zarażenie *A. simplex*

Po zjedzeniu ryb zarażonych larwami *A. simplex* larwy te uwalniane są z tkanek ryb i wnikają do błon śluzowej i podśluzowej żołądka lub jelit, uszkadzając je. Odbywa się to na drodze mechanicznej oraz w wyniku działania enzymów proteolitycznych wydzielanych przez gruczoły grzbietowe i komórki wydzielnicze larw *A. simplex* (proces ten może trwać od 4 h do 6 dni). W tym czasie enzymy, antygeny powierzchniowe i somatyczne pasożyta oraz wnikające w ścianę przewodu pokarmowego larwy powodują reakcje

układu immunologicznego u zarażonego człowieka. Po 7–14 dniach w miejscu wniknięcia larwy w ścianę przewodu pokarmowego powstaje ziarniniak, a nawet zmiany wrzodowe. Po 14 dniach larwa obumiera. Niekiedy może dochodzić do przebiccia ściany przewodu pokarmowego przez larwę *A. simplex* i jej przejścia do jamy otrzewnej. Larwy takie lokalizują się na otrzewnej lub w tkance podskórnej, tworząc guz przypominający ziarniniak lub wrzód (9).

Według Audicana i Kennedy (10) w wyniku kontaktu larwy z błoną śluzową przewodu pokarmowego aktywowana jest odpowiedź immunologiczna nieswoista. Komórki nabłonkowe wydzielają substancje cytotoksyczne, np. NO, a także chemokiny, cytokiny, które przyciągają netrofile, makrofagi, komórki dendrytyczne, bazoofile oraz eozynofile. W drodze odpowiedzi immunologicznej swoistej antygeny *A. simplex* są prezentowane komórkom dendrytycznym i stymulowana jest odpowiedź typów Th1 oraz Th2. Na podstawie różnic w profilach cytokin stwierdzono, że u pacjentów z objawami żołądkowo-jelitowymi oraz lekkimi objawami alergicznymi dominuje odpowiedź typu Th1 – z wysokim poziomem IFN γ . Natomiast u pacjentów z objawami alergicznymi, u których nie występowały objawy żołądkowo-jelitowe, dominuje odpowiedź Th2 z charakterystycznym wysokim poziomem IL-4, IL-5 oraz IgE (11). Cytokiny wytworzone przez limfocyty Th1 (IFN γ , TNF β , IL-2, IL-3) indukują wytwarzanie IgG2a, przeciwciał aktywujących dopełniacz, opsonizację, aktywują makrofagi, cytotoxiczność komórkową zależną od przeciwciał i nadwrażliwość późną. Cytokiny wytworzone przez limfocyty Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13) stymulują wytwarzanie IgG1, IgA oraz, poprzez stymulację limfocytów T, wytwarzane są specyficzne oraz nieswoiste, poliklonalne IgE. Dochodzi do rozwoju bazoofilii, mastocytozy i eozynofilii. Eozynofilia jest wywoływana przez czynniki chemotaktyczne uwalniane z komórek nabłonkowych, limfocytów T, mastocytów, bazoili oraz substancje pochodzące z pasożyta.

Znaczna część odpowiedzi immunologicznej na zarażenie larwami *A. simplex* ma charakter reakcji alergicznej.

Alergeny *A. simplex*

Jak dotąd wyróżniono 12 alergenów *A. simplex*. Zostały one podzielone na trzy grupy: ekskrecyjno-sekrecyjne, które są wydzielane przede wszystkim podczas wnikania larwy w ścianę przewodu pokarmowego gospodarza (Ani s 1, Ani s 4, Ani s 5, Ani s 6, Ani s 7, Ani s 8, Ani s 9), kutikularne chroniące larwę przed enzymami trawiennymi

oraz somatyczne, które występują w ciele larwy (Ani s 2, Ani s 3). Alergeny somatyczne i kutikularne oddziałują na żywiciela podczas wnikania larw w ścianę przewodu pokarmowego. Ponadto stwierdza się też w zanieczyszczonej żywności. Alergeny ekskrecyjno-sekrecyjne oddziałują zazwyczaj podczas wnikania larwy w tkanki żywiciela. Mogą też uwalniać się podczas endoskopowego usuwania żywej larwy z przewodu pokarmowego.

Wśród alergenów można wyróżnić główne – uczulają ponad 50% pacjentów oraz alergeny słabe – uczulające mniej niż 50%.

- **Ani s 1** 24 (kDa) – należy do głównych alergenów, występuje w wielu izoformach i jest wysoko odporny na wysokie temperatury. Wydzielany jest przez gruczoły wydzielnicze i należy do grupy seryn. Alergia na Ani s 1 jest jednym z najczęściej stwierdzanych alergenów *A. simplex*. Występuje u 67–86% uczulonych pacjentów (12). Anadón i wsp. (13) wskazują, że Ani s 1 może być wskaźnikiem wcześniej przebytego już zarażenia larwami *A. simplex*.
- **Ani s 2** (100 kDa), czyli paramiozyna, i **Ani s 3** (41 kDa) tropomiozyna występują w mięśniach larw i wykazują znaczną homologię z miozynami innych organizmów (14). Reakcję alergiczną na Ani s 2 stwierdza się u 88% pacjentów z alergią na *A. simplex* (15). Natomiast reakcję na Ani s 3 stwierdzono u jedynie 0–13% osób z objawami alergicznymi (16). Ponadto Ani s 2 i Ani s 3 zaliczane są do panalergenów, czyli występujących powszechnie substancji o podobnej budowie, odpowiedzialnych za występowanie reakcji krzyżowych. Według Guarneri i wsp. (17) Ani s 3 odgrywa istotną rolę jako alergen występujący w żywności.
- **Ani s 4** (9 kDa) jest termostabilną cystyną – cystatynowym inhibitorem proteaz, wytwarzaną przez gruczoły wydzielnicze i znajdowaną pod warstwą kutikuli. Odpowiedź na Ani s 4 była stwierdzana u 27% alergicznych pacjentów (18).
- **Ani s 5** (15 kDa) jest słabym alergenem, termostabilnym białkiem, odpowiedzialnym za reakcję krzyżową, wytwarzanym przez gruczoły wydzielnicze, żołądek oraz ścienną powierzchnię nabłonka jelitowego larwy. Jest białkiem homologicznym z białkami z rodziny SXP/RAL-2. W badaniach Kobayashi i wsp. (19) alergen ten był stwierdzany u 49% pacjentów z objawami alergii na *A. simplex*.
- **Ani s 6** (7 kDa) należy do alergenów słabych i jest inhibitorem protein serynowych. U 18% pacjentów stwierdzono reakcje na rekombinowany alergen rAni s 6 (20).

- **Ani s 7** (139 kDa) jest glikoproteiną odporną na wysokie temperatury oraz działanie pepsyny. Reakcję na Ani s 7 stwierdzano u 83–100% pacjentów z alergią wywołaną przez *A. simplex* (21). Wysoki poziom IgE przeciwko Ani s 7 jest wskaźnikiem nowego zarażenia.
 - **Ani s 8** (15 kDa) jest termostabilnym białkiem, należącym do rodziny SPX/RAL, odpowiedzialnym za reakcję krzyżową z innymi antygenami. Odpowiedź na Ani s 8 stwierdzono u 25% uczulonych pacjentów (20).
 - **Ani s 9** (14 kDa) jest termostabilnym i odpornym na działanie pepsyny białkiem należącym do grupy białek SXP/RAL-2. Odpowiedź na Ani s 9 stwierdzono u 13,8% uczulonych pacjentów (19).
 - **Ani s 10** (22 kDa) jest najprawdopodobniej antygenem somatycznym. Alergię na Ani s 10 stwierdzono u 39% badanych pacjentów (22).
 - **Ani s 11** (55 kDa), **Ani s 11-like protein**, **Ani s 12** – zostały ostatnio zidentyfikowane za pomocą chemiluminescencyjnego skriningu ekspresyjnej biblioteki cDNA *A. simplex*. Metoda ta charakteryzuje się większą czułością niż metody konwencjonalne. Według Kobayashi, reakcja na Ani s 11 i Ani s 12 występuje u ok. 50% pacjentów (23).
Z badań przeprowadzonych przez Baeza i wsp. (24) wynika, że alergeny ekskrecyjno-sekrecyjne charakteryzują się silniejszymi właściwościami alergennymi niż alergeny somatyczne *A. simplex*. W przeprowadzonym doświadczeniu wyciąg antygenów wydzielniczo-wydalniczych mocniej wiązał przeciwciała IgE i spowodował większą reakcję dodatnią testu skórniego niż wyciąg antygenów somatycznych o takim samym stężeniu białek. Może to wynikać z wyższego stężenia alergenów w wyciągu antygenów wydzielniczo-wydalniczych lub z większej zdolności tych antygenów do wiązania specyficznych przeciwciał IgE. Ostatecznej odpowiedzi na to pytanie autorzy jednak nie ustalili.
- Istnieją różne stanowiska badaczy wobec możliwości wywołania alergii zależnie od żywotności larw *A. simplex*. Ze względu na termostabilne właściwości niektórych alergenów *A. simplex* część autorów uważa, że martwe larwy mogą powodować reakcje alergiczne. W badaniach przeprowadzonych przez del Pozo i wsp. (25) z *A. simplex* sporządzono wyciągi i poddano je działaniu temperatury (40°C przez 10 minut oraz 100°C przez 20 minut), a następnie podano je pacjentom celem przeprowadzenia testu skórniego. Zaobserwowano dodatnie wyniki testu skórniego. Właściwości alergiczne wyciągu *A. simplex* zostały również potwierdzone

przez Rodríguez-Mahillo i wsp. (26) za pomocą testu aktywacji bazofilów (BAT). Ponadto zanotowano przypadki alergii u ludzi spowodowanej spożyciem mięsa kurczaków karmionych mączką rybną (27). Z kolei Anibarro i Seoane (28) stwierdzili, że pacjenci z alergią wobec *A. simplex* wykazują tolerancję na spożytą martwą larwę *A. simplex*. W badaniach tych podano liofilizowane larwy uczulonym pacjentom i nie zaobserwowano objawów alergii, przy czym u większości z tych pacjentów test prowokacji do spożycia martwej larwy, gdyż są uczuleni na antygeny wydzielnicze *A. simplex*, a ponadto liofilizacja może powodować utratę właściwości alergicznych antygenów (29, 30). Ten sposób podania antygenów nie odpowiada naturalnej drodze ekspozycji organizmu na alergen (30).

U części populacji można stwierdzić wysoki poziom swoistych przeciwciał IgE wobec *A. simplex*. Wynika to ze zjawiska reakcji krzyżowej antygenów. Alergeny *A. simplex* wykazują reakcję krzyżową z alergenami innych organizmów, jak np. roztoczy kurzu domowego (*Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*), karaluchów, rozwielitek, *Clonorchis sinensis*, muchówek i krewetki północnej (30). Badania przeprowadzone przez Guarneri i wsp. (17) wykazały, że Ani s 2 wykazuje reakcję krzyżową z antygenami roztoczy kurzu domowego, a Ani s 3 z licznymi antygenami skorupiaków, mięczaków, muchówek, karaluchów amerykańskich, rybników cukrowych. Występują również reakcje krzyżowe z innymi nicieniami z rodziny Ascaridae, jak np. *Ascaris suum*, *Toxocara canis* czy *Hysterothalcium aduncum* (31, 32). Antygenami reagującymi krzyżowo z alergenami *A. simplex* są również fosforylocholina oraz glikany występujące w glikoproteinach innych nicieni. Możliwość reakcji krzyżowych z innymi antygenami utrudnia diagnostykę serologiczną, bowiem jest przyczyną wyników fałszywie dodatnich.

Wykrywanie alergenów *A. simplex* w żywności

Jak już wspomniano, część alergenów *A. simplex* jest oporna na działanie wysokich temperatur oraz trawienie. Dlatego alergeny te mogą powodować uczulenie u ludzi po spożyciu produktów rybnych, nawet poddanych obróbce termicznej. Wykrywanie alergenów *A. simplex* opiera się głównie na metodach serologicznych i molekularnych.

Test ELISA jest najpowszechniej używaną immunologiczną metodą diagnostyczną służącą do ilościowego oznaczenia alergenów w żywności. Białka mogą ulec różnym przekształceniom pod wpływem procesów technologicznych. Dlatego też w badaniach nad sandwich ELISA do wykrywania białek *A. simplex* Werner i wsp. (33) użyli przeciwciał poliklonalnych, które zapewniają wykrycie martwych larw, jak i antygenów wydzielniczo-wydalniczych. Granica wykrywalności tej metody wyniosła 1,1 µg białka *A. simplex*/g próbki. Natomiast Arilla i wsp. (34) opracowali test sandwich ELISA do oznaczania alergenu Ani s 1 z zastosowaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych 4F2 oraz oznakowanych biotyną przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko Ani s 1. Granica wykrywalności opracowanego testu wyniosła 1,8 ng/ml. Ponieważ ilość Ani s 1 występująca w pojedynczej larwie wynosi ok. 244 ng, zatem granica wykrywalności odpowiada 25 larwom na 100 g próbki. Bezpośredni kompetencyjny test ELISA został opracowany przez Xu i wsp. (35). Został on oparty o specyficzne przeciwciała poliklonalne przeciwko wyciągowi z *A. simplex*. Na uwagę zasługuje fakt, że granicę wykrywalności ustalono na poziomie 5 larw na 1 kg próbki. Z kolei Rodríguez-Mahillo i wsp. (18) przedstawili metodę umożliwiającą wykrycie antygenów *A. simplex* w rybach świeżych, mrożonych, jak i gotowanych z zastosowaniem IgG immunoblottingu. Oznaczenie ilości antygenów zostało przeprowadzone metodą dot blot. Granica wykrywalności dla opracowanej metody wyniosła mniej niż 1 ppm antygeny *A. simplex*. Należy zaznaczyć, że głównymi ograniczeniami stosowania metod immunologicznych jest zjawisko reakcji krzyżowej antygenów, zwłaszcza z antygenami innych nicieni oraz degradacja alergenów w produktach poddanych procesom technologicznym.

Oprócz metod serologicznych testami o wysokiej czułości umożliwiającymi wykrycie obecności *A. simplex*, a szczególnie w przetworzonych produktach rybnych, są metody PCR. Metody te umożliwiają wykrycie DNA pasożyta, co jednak niekoniecznie jest związane z ilością alergenów, zwłaszcza w żywności poddanej procesom technologicznym (36). Espinera i wsp. (37) do wykrywania pasożytów z rodziny Anisakidae zastosowali metodę PCR-RFLP z użyciem analizy sekwencji ITS-1. Granica wykrywalności tej metody została oznaczona na mniej niż 0,016% tkanki pasożyta w stosunku do 300 mg materiału użytego podczas izolacji DNA. Natomiast Lopez i Pardo (38) dla testu real time PCR uzyskali granicę wykrywalności 40 ppm *A. simplex* w 25 g próbki.

Diagnostyka alergii wywołanej przez *A. simplex* u ludzi

Diagnoza alergii wywołanej przez *A. simplex* opiera się na trzech kryteriach: wystąpienie objawów alergicznych po spożyciu ryb, pozytywny wynik testu skórniego lub obecności w surowicy swoistych przeciwciał anty-*A. simplex* oraz brak reakcji alergicznych na mięso ryb. Test skórny polega na podaniu wyciągu *A. simplex* w roztworze fizjologicznym, w rozcieńczeniu 1:100. Odczyt testu wykonuje się po 15 minutach. Odczyn większy niż 3 mm uznaje się za wynik pozytywny. Test ten charakteryzuje wysoka czułość, lecz gorsza specyficzność – występuje znaczna liczba wyników fałszywie dodatnich (25, 39). Test CAP-FEIA (Pharmacia-Upjohn, Uppsala, Szwecja) umożliwia pomiar poziomu IgE anty-*A. simplex* w surowicy. Wynik powyżej 0,35 kU/l uważany jest za pozytywny. W badaniach Lorenzo i wsp. (39) test CAP uzyskał 100% czułość, lecz jednocześnie bardzo wysoki (50%) odsetek wyników fałszywie dodatnich, co najprawdopodobniej wynika z reakcji krzyżowych alergenów. Test antigen-capture ELISA (40) umożliwia pomiar poziomu przeciwciał IgE UA3 skierowanych przeciwko O-deglikozyłowanym antygenom *A. simplex*. Z przeprowadzonych przez Lorenzo i wsp. (39) porównań skuteczności testu skórniego, CAP-FEIA, antigen-capture ELISA i Western blot do wykrywania alergii wywołanych przez *A. simplex* wynika, że najwyższą skuteczność uzyskano dla testu ELISA. Wyniki przedstawione przez Andon i wsp. (15) wskazują, że określenie poziomu specyficznych przeciwciał IgE przeciwko rekombinowanemu alergenom *Anisakis Ani s 1* oraz *Ani s 7* jest obecnie najlepszą formą diagnostyki serologicznej. Metodę tę charakteryzuje najlepsza czułość i specyficzność. Podobnie jak w przypadku diagnostyki alergenów w żywności, metody serologiczne umożliwiające wykrywanie alergii u pacjentów są ograniczane przez zjawisko krzyżowej reakcji alergenów *A. simplex* z innymi antygenami.

Podsumowując, inwazja *A. simplex* stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia ludzi, szczególnie ze względu na silne właściwości alergiczne niektórych antygenów tego pasożyta. Warto podkreślić, że w opinii wydanej przez Europejską Agencję ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) dotyczącej oceny ryzyka narażenia konsumenta na obecność pasożytów w produktach rybnych szczególną uwagę zwrócono na zagrożenie, jakie stanowi *A. simplex* (41). Dotychczas opracowane metody charakteryzują się stosunkowo niską specyficznością, dlatego istnieje konieczność prowadzenia dalszych badań dotyczących właściwości antygenowych *A. simplex*.

Piśmiennictwo

- Prost M.: *Choroby ryb*. Wyd. 3, PTNW, Lublin 1994, s. 420
- Ruitenbergh E.J., Loendersloot H.J.: Histochemical properties of the excretory organ of *Anisakis* sp. larva. *J Parasitol*. 1971, **57**, 1149-50.
- Audicana L, Audicana M.T., Fernández de Corres L., Kennedy M.W.: Cooking and freezing may not protect against allergic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. *Vet Rec*. 1997, **1**, 140-235.
- Añibarro B., Seoane F.J., Múgica M.V. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 2007, **17**, 168-72.
- Yubero F.J.R., Auroux F.J.A., Lopez V.: Anisakidos parasitos de peces comerciales. *Anales de la Real Academia Nacional de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 2004, **17**, 173-196.
- Guz L., Studzińska M.B., Sadtzikowski A.B., Gundlach J.L.: Larwy *Anisakis simplex* w wędzonych śledziach. *Ann. UMCS Sectio DD Medicina Veterinaria*. 2005, **40**, 11.
- Szostakowska B., Myjak P., Wyszyński M., Pietkiewicz H., Rokicki J.: Prevalence of anisakin nematodes in fish from Southern Baltic Sea. *Pol. J. Microbiol.* 2005, **54**, 41-5.
- Llarena-Reino M., Piñero C., Antonio J., Outeirino L., Vello C., González Á.F., Pascual S.: Optimization of the pepsin digestion method for anisakids inspection in the fishing industry. *Vet. Parasitol.* 2013, **191**, 276-83.
- Acha P.N., Sztyfles B.: *Zoonoses and Communicable Diseases Man and Animals*. Pan American Health Organization, Scientific and Technical Publications, Washington 1987.
- Audicana M.T., Kennedy M.W.: *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol Rev*. 2008, **21**, 360-79.
- Gonzalez-Muñoz M., Rodriguez-Mahillo A.I., Moneo I.: Different Th1/Th2 responses to *Anisakis simplex* are related to distinct clinical manifestations in sensitized patients. *Parasite Immunol.* 2010, **32**, 67-73.
- Moneo I., Caballero M.L., Gómez E., Ortega E., Alonso M.J.: Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol.* 2000, **106**, 177-82.
- Anadón A.M., Rodríguez E., Gárate M.T., Cuéllar C., Romarís F., Chivato T., Rodero M., González-Díaz H., Ubeira F.M. Diagnosing human anisakiasis: recombinant Ani s 1 and Ani s 7 allergens versus the UniCAP 100 fluorescence enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol.* 2010, **17**, 496-502.
- Sereda, M.J., Hartmann, S., Lucius, R.: Helminths and allergy: the example of tropomyosin. *Trends Parasitol.* 2008, **24**, 272-278.
- Pérez-Pérez J., Fernández-Caldas E., Marañón F., Sastre J., Bernal M.L., Rodríguez J., Bedate C.A.: Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000, **123**, 120-9.
- Asturias J.A., Eraso E., Moneo I., Martínez A.: Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*? *Allergy* 2000, **55**, 898-9.
- Guarneri F., Guarneri C., Benvenega S.: Cross-reactivity of *Anisakis simplex*: possible role of Ani s 2 and Ani s 3. *Int. J. Dermatol.* 2007, **46**, 146-150.
- Rodríguez-Mahillo A.I., González-Muñoz M., Gomez-Aguado F., Rodríguez-Pérez R., Corcuera M.T., Caballero M.L., Moneo I.: Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *Int J Parasitol.* 2007, **37**, 907-17.
- Kobayashi Y., Ishizaki S., Shimakura K., Nagashima Y., Shiomi K.: Molecular cloning and expression of two new allergens from *Anisakis simplex*. *Parasitol Res.* 2007, **100**, 1233-41.
- Kobayashi Y., Shimakura K., Ishizaki S., Nagashima Y., Shiomi K.: Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. *Mol Biochem Parasitol.* 2007, **155**, 138-45.
- Anadón A.M., Romarís F., Escalante M., Rodríguez E., Gárate T., Cuéllar C., Ubeira F.M.: The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. *Clin Exp Immunol.* 2009, **156**, 471-8.
- Caballero M.L., Umpierrez A., Moneo I., Rodríguez-Pérez R.: Ani s 10, a new *Anisakis simplex* allergen: cloning and heterologous expression. *Parasitol Int.* 2011, **60**, 209-12.
- Kobayashi Y., Ohsaki K., Ikeda K., Kakemoto S., Ishizaki S., Shimakura K., Nagashima Y., Shiomi K.: Identification of novel three allergens from *Anisakis simplex* by chemiluminescent immunoscreening of an expression cDNA library. *Parasitol Int.* 2011, **60**, 144-50.
- Baeza M.L., Rodríguez A., Matheu V., Rubio M., Tornero P., de Barrio M., Herrero T., Santaolalla M., Zubeldia J.M.: Characterization of allergens secreted by *Anisakis simplex* parasite: clinical relevance in comparison with somatic allergens. *Clin Exp Allergy.* 2004, **34**, 296-302.
- del Pozo M.D., Moneo I., de Corres L.F., Audicana M.T., Muñoz D., Fernandez E., Navarro J.A., García M.: Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1996, **97**, 977-84.
- Rodríguez-Mahillo A.I., González-Muñoz M., de las Heras C., Tejada M., Moneo I.: Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen, and cooked fish muscle. *Foodborne Path. Dis.* 2010, **7**, 967-73.
- Armentia A., Martín-Gil F.J., Pascual C., Martín-Esteban M., Callejo A., Martínez C.: *Anisakis simplex* allergy after eating chicken meat. *J Invest. Allergol Clin Immunol.* 2006, **16**, 258-63.
- Añibarro B., Seoane F.J.: Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol.* 1998, **102**, 331-2.
- Ventura M.T., Tummoló R.A., Di Leo E., D'Ersasmo M., Arseni A.: Immediate and cell-mediated reactions in parasitic infections by *Anisakis simplex*. *J Invest. Allergol Clin Immunol.* 2008, **18**, 253-9.
- Pascual C.Y., Crespo J.F., San Martín S., Ornia N., Ortega N., Caballero T., Muñoz-Pereira M., Martín-Esteban M.: Cross-reactivity between IgE-binding proteins from *Anisakis*, German cockroach, and chironomids. *Allergy* 1997, **52**, 514-20.
- Iglesias R., Leiro J., Ubeira F.M., Santamarina M.T., Navarrete I., Sanmartín M.L.: Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol Res.* 1996, **82**, 378-81.
- Perteguer M.J., Cuéllar C., Guillén J.L., Aguilera C., Fenoy S., Chivato T., Laguna T.: Cross-reactivity between *Anisakis simplex* sensitization and visceral larva migrans by *Toxocara canis*. *Acta Trop.* 2003, **89**, 85-9.
- Werner M.T., Faeste C.K., Levens A., Egaas E.: A quantitative sandwich ELISA for the detection of *Anisakis simplex* protein in seafood. *Eur. Food Res. Technol.* 2011, **232**, 157-166.
- Arilla M.C., Ibarrola I., Martínez A., Monteseirín J., Conde J., Asturias J.A.: An antibody-based ELISA for quantification of Ani s 1, a major allergen from *Anisakis simplex*. *Parasitology* 2008, **135**, 735-40.
- Xu X., Sui J., Cao L., Lin H.: Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid screening of anisakid larvae in seafood. *J Sci Food Agric.* 2010, **90**, 877-81.
- Poms R.E., Klein C.L., Anklam E.: Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Adit Contam.* 2004, **21**, 1-31
- Espiñeira M., Herrero B., Vieites J.M., Santaclara F.J.: Detection and identification of anisakids in seafood by fragment length polymorphism analysis and PCR-RFLP of ITS-1 region. *Food Control* 2010, **21**, 1051-1060.
- Lopez I., Pardo M.A.: Evaluation of a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Anisakis simplex* parasite in a food-borne allergen source in seafood products. *J Agric Food Chem.* 2010, **58**, 1469-77.
- Lorenzo S., Iglesias R., Leiro J., Ubeira F.M., Ansetogui I., García M., Fernández de Corres L.: Usefulness of currently available methods for the diagnosis of *Anisakis simplex* allergy. *Allergy* 2000, **55**, 627-33.
- Lorenzo S., Iglesias R., Audicana M.T., García-Villaescusa R., Pardo F., Sanmartín M.L., Ubeira F.M.: Human immunoglobulin isotype profiles produced in response to antigens recognized by monoclonal antibodies specific to *Anisakis simplex*. *Clin Exp Allergy* 1999, **29**, 1095-101.
- EFSA: Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal* 2010, **8**, 1543.

Lek. wet. Maciej Kochanowski,
e-mail: maciej.kochanowski@piwet.pulawy.pl