

ISSN: 1988-2688

<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>

<http://dx.doi.org/10.5209/RCCV.55500>



Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2017 11(especial):204-209

ANTICUERPOS ANTI-ANISAKIS SP. EN EL SUERO DE PACIENTES CON SEPSIS ANTI-ANISAKIS SP. ANTIBODIES IN THE SERA OF PATIENTS WITH SEPSIS

Torres Chaves, J., Cuéllar del Hoyo, M. y González Fernández, J.

Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

jorgetor@ucm.es

RESUMEN

Se analizaron los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis* en pacientes sépticos y se relacionaron con los valores de linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, y con la gravedad de la enfermedad. Los niveles más bajos de anticuerpos totales, IgM e IgA se observaron en el grupo de pacientes con sepsis grave y shock séptico. Los niveles más bajos de IgE fueron detectados en el caso del grupo de shock séptico. Los valores de IgG anti-*Anisakis* aumentaron significativamente en el caso de pacientes con shock séptico comparados con el grupo control. Observamos correlaciones positivas entre los niveles de anticuerpos IgA anti-*Anisakis* y todas las subpoblaciones celulares T $\gamma\delta$.

Palabras clave: linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$; anticuerpos anti-*Anisakis*; sepsis

SUMMARY

We analyse the levels of anti-*Anisakis* antibodies in the serum of septic patients for comparison with healthy persons. Specific immunoglobulin levels were related to $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells and the severity of the disease. Significant differences were seen with respect to the groups of patients with severe sepsis and septic shock where lower antibody levels were observed (total immunoglobulins, IgM and IgA). The lowest IgE levels were detected in the case of the septic shock group. Values of IgG anti-*Anisakis* significantly increased in patients

with septic shock compared to the control group. We observed positive correlations among the anti-*Anisakis* IgA antibody levels and all $\gamma\delta$ T cell subsets.

Key words: $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells; anti-*Anisakis* antibodies; sepsis

INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune inicial en la sepsis es hiperinflamatoria (tormenta de citoquinas), pero la respuesta progresa rápidamente a una respuesta hipoinflamatoria (inmunosupresión).

Los linfocitos T están clasificados en $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ dependiendo del tipo de TCR. Mientras que las células T $\alpha\beta$ son las más frecuentes en sangre periférica, las células T $\gamma\delta$ representan sólo el 5-10%. Sin embargo, las células T $\gamma\delta$ representan más del 50% en las membranas mucosas y son muy comunes entre los linfocitos T intraepiteliales. Las células T $\gamma\delta$ tienen características comunes a las células del sistema innato y adaptativo, y son consideradas la primera línea de defensa frente a microorganismos comunes. La inmunosupresión en la sepsis reduce ambos subtipos de linfocitos T.

Anisakis sp. es un nematodo parásito que causa la anisakidosis, y cuya seroprevalencia es muy variable entre las diferentes regiones de España, con rangos que oscilan entre el 0,43% (Valiñas et al. 2001) al 22,1% (del Rey Moreno et al. 2006). Un estudio previo, demostró que un contacto previo con el parásito estaba relacionado con un descenso de todos los subtipos de linfocitos T $\gamma\delta$.

El objetivo del presente trabajo es analizar los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis* en el suero de pacientes con sepsis en comparación con el de personas sanas. Además, los niveles de inmunoglobulinas específicas fueron relacionados con células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y la gravedad de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de sueros fueron suministradas por el Dr. Juan Carlos Andreu Ballester. Se seleccionaron sueros de 114 pacientes sépticos. Todos los pacientes fueron admitidos en Emergencias y en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) en el Hospital Arnau de Vilanova, Valencia (España). El grupo control (97 pacientes) fue reclutado entre los familiares de los pacientes admitidos en el hospital, que no eran familiares de los pacientes sépticos. Cada participante en el estudio firmó un informe de consentimiento, y el Comité de Ética e Investigación de ambos Hospitales para la Investigación Clínica aprobó el estudio. Las poblaciones linfocitarias fueron determinadas en el Servicio de Hematología del Hospital Arnau de Vilanova, en Valencia (España) mediante citometría de flujo.

Las larvas de tercer estadio de *Anisakis* (L3) fueron extraídas de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*). Para la preparación del extracto crudo, las L3 se homogeneizaron y sonicaron, realizándose la extracción de proteínas en PBS. Cada pocillo de placas de ELISA de 96 pocillos (Costar, Corning, NY, EEUU) fue sensibilizado añadiendo 10 µg/ml de antígeno. Se incubaron los sueros a la dilución 1/100 en PBS-Tween con 0,1% de BSA por duplicado. Para la detección se utilizaron anticuerpos anti-Ig's, IgM, IgG e IgA humanos de origen caprino y conjugados con peroxidasa (HRP) (Biosource International, Camarillo, CA, USA). Para la determinación de IgE se emplearon los sueros a la dilución 1/2. Tras la incubación, se añadió un anticuerpo monoclonal de ratón contra una cadena épsilon de IgE humana (IgG1κ, E21A11, INGENASA, Madrid, Spain), seguido de anticuerpos de cabra anti-IgG1 (gamma) murina conjugados con HRP (Life Technologies, Grand Island, NY).

Se realizó un análisis estadístico de los resultados que se obtuvieron en ELISA y éstos se compararon con los datos disponibles de las poblaciones linfocitarias mediante SPSS.

RESULTADOS

Los niveles de inmunoglobulinas totales (Ig's) del grupo control y del grupo séptico sin complicaciones de órgano fueron similares. Se observaron diferencias significativas con respecto al grupo de pacientes con sepsis grave ($P = 0.001$) y de shock séptico ($P < 0.0001$) donde se observaron los niveles más bajos de anticuerpo. Una disminución similar fue observada en el caso de la IgM específica con diferencias significativas entre los grupos de control/sepsis sin complicaciones y los de sepsis grave ($P = 0.016$) y de shock séptico ($P = 0.002$). Estas diferencias fueron también apreciadas en el caso de la IgA específica ($P = 0.004$ y $P < 0.0001$, respectivamente) (Figura 1A). Los niveles más bajos de IgE se detectaron en el caso del grupo de shock séptico ($P = 0.003$) (Figura 1B).

Los valores de IgG anti-*Anisakis* aumentaron significativamente en el caso de pacientes con shock séptico comparados con el grupo control ($P = 0.038$) (Figura 1C). Igualmente, los porcentajes de positividad para IgG anti-*Anisakis* aumentaron de acuerdo a la gravedad de la enfermedad (Figura 1D).

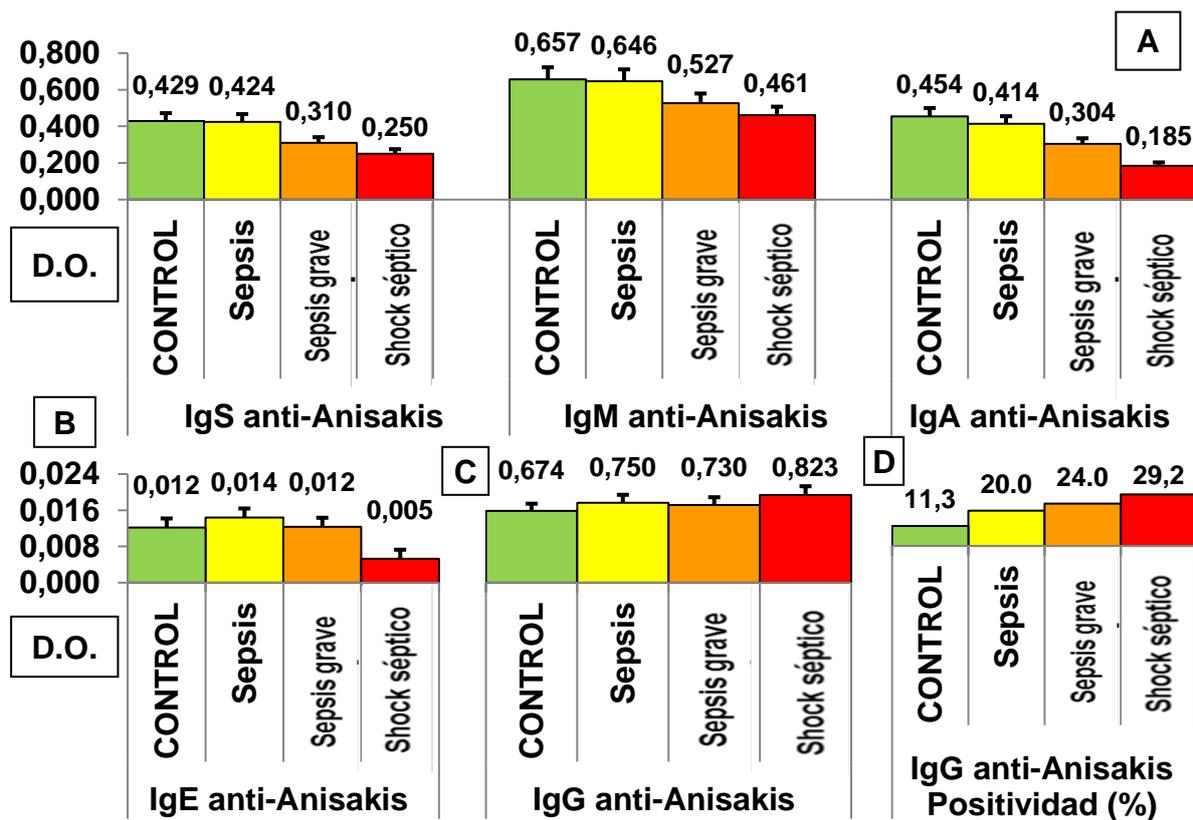


Figura 1. Niveles de anticuerpos anti-*Anisakis* conforme a la gravedad de la sepsis (panel A, B y C), y positividad en porcentajes de IgG anti-*Anisakis* (panel D).

Observamos correlaciones positivas entre los niveles de anticuerpos IgA anti-*Anisakis* y todas las subpoblaciones celulares T $\gamma\delta$, tal y como se indica a continuación: (Correlación de Pearson): CD3+ $\gamma\delta$ (+0,312, $P < 0,001$); CD3+CD4-CD8- $\gamma\delta$ (+0,324, $P < 0,001$); CD3+CD4+ $\gamma\delta$ (+0,359, $P < 0,001$); CD3+CD8+ $\gamma\delta$ (+0,267, $P = 0,004$); CD3+CD56+ $\gamma\delta$ (+0,282, $P = 0,002$).

De acuerdo a los valores que se analizaron en un estudio previo sobre las poblaciones de células T, con ambos tipos de receptores $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y sus subtipos; analizamos las diferencias en los niveles de anticuerpos anti-*Anisakis* con respecto al déficit de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ de pacientes con sepsis. Cuando se analizaron las variaciones de los niveles de Ig's observamos un descenso significativo en los pacientes con déficit de CD3+CD8+ $\gamma\delta$ y CD3+CD56+ $\gamma\delta$. Este hecho fue únicamente observado en células CD3+CD4+ $\alpha\beta$ en el caso de niveles de IgM anti-*Anisakis*. Los más bajos niveles de anticuerpos IgA anti-*Anisakis* fueron observados en pacientes con déficit de CD3+CD4+ $\alpha\beta$, CD3+CD8+ $\alpha\beta$ y todas las células T $\gamma\delta$. Estas

diferencias significativas fueron más patentes en el caso de los subtipos CD3+CD8+ $\gamma\delta$ y CD3+CD56+ $\gamma\delta$. En el caso de los isotipos IgG e IgE anti-*Anisakis* no se observaron diferencias significativas.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, los niveles elevados de IgG anti-*Anisakis* estuvieron relacionados con la gravedad de la enfermedad séptica, elevándose hasta un 30% en el grupo de pacientes con shock séptico. Esto sugiere que los pacientes que han estado previamente expuestos al parásito, podrían presentar un cuadro clínico séptico más grave. El incremento de IgG anti-*Anisakis* en nuestros pacientes sépticos, podría indicar una primoinfección o reinfecciones producidas por nuevos contactos con el parásito por la ingesta de pescado parasitado relacionado con la inmunodeficiencia producida en la sepsis.

La IgA es la inmunoglobulina más frecuentemente presente en las mucosas, donde la mayoría de los patógenos tratan de invadir el organismo y donde más células T $\gamma\delta$ están acumuladas. La relación directa encontrada en nuestro estudio entre IgA anti-*Anisakis* y linfocitos T $\gamma\delta$, confirma el papel de éstas células en la regulación de la síntesis de IgA a partir de linfocitos B específicos frente a antígenos de *Anisakis*.

Los linfocitos T $\gamma\delta$ están relacionados con la gravedad y el peor pronóstico de los pacientes sépticos (Andreu-Ballester JC et al. 2013). Estos hechos han sido observados en nuestro estudio (Figura 1A), donde el descenso de anticuerpos IgA anti-*Anisakis* fue mayor que el observado en el caso de otros isotipos específicos de acuerdo al empeoramiento del proceso. Los niveles de IgA anti-*Anisakis* observados en el grupo de pacientes con shock séptico eran un 50% más bajos que los observados en el grupo de pacientes sépticos sin complicaciones de órgano.

CONCLUSIONES

Los niveles de anticuerpos IgG anti-*Anisakis* están aumentados en los pacientes con enfermedad séptica más grave.

El resto de isotipos específicos testados, especialmente la IgA, descendió a medida que el proceso séptico empeoró. Este descenso resultó mayor en los pacientes con sepsis más grave. Hay una relación directa entre los niveles de IgA anti-*Anisakis* y los linfocitos T $\gamma\delta$. El descenso de los niveles de IgA anti-*Anisakis* está asociado con la gravedad de la sepsis.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al equipo médico y de enfermería de los Departamentos de Emergencias y Hematología del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Andreu-Ballester JC, Tormo-Calandín C, Garcia-Ballesteros C, Pérez-Griera J, Amigó, V, Almela-Quilis A, Ruiz del Castillo J, Peñarroja-Otero C, Ballester F. 2013. Association of $\gamma\delta$ T cells with disease severity and mortality in septic patients. *Clin Vaccine Immunol.*; 20:738–46. Doi: 10.1128/CVI.00752-12.
- del Rey Moreno, A., Valero, A., Mayorga, C., Gomez, B., Torres, M.J., Hernandez, J., Ortiz, M., Lozano-Maldonado, J., 2006. Sensitization to *Anisakis simplex* in a healthy population. *Acta Trop.* 97, 265–269. Doi: 10.1016/j.actatropica.2005.11.007
- Valiñas, B., Lorenzo, S., Eiras, A., Figueiras, A., Sanmartín, M.L., Ubeira, F.M., 2001. Prevalence and risk factors for IgE sensitization to *Anisakis simplex* in a Spanish population. *Allergy.* 56, 667–671. Doi: 10.1034/j.1398-9995.2001.00987.x