



Universidad de Valladolid



Facultad de Medicina

**URTICARIA DE CONTACTO,
ASMA Y ANAFILAXIA EN
AGRICULTORES E INGENIEROS
AGRÓNOMOS POR PARÁSITOS
DE LEGUMBRES**

Trabajo fin de grado

Grado en Medicina

Curso 2020-2021

Autor: Jesús Díaz García

Tutoras: Alicia Armentia Medina y Sara Martín Armentia
Departamento de Medicina, Dermatología y toxicología
Servicio de Inmunopatología y alergia
Hospital Universitario Río Hortega



Tabla de contenido

Resumen	2
1 Introducción	3
2 Objetivo e hipótesis.....	5
3 Material y métodos.....	6
3.1 Tipo de estudio.....	6
3.2 Pacientes	6
3.3 Identificación de plagas	7
3.4 Extractos de diagnóstico	7
3.5 Prueba de punción cutánea.....	9
3.6 Pruebas de parche	9
3.7 Prueba abierta (open test).....	10
3.8 Test de provocación bronquial.....	10
3.9 Test de provocación oral	11
3.10 Determinación de IgE específica y diagnóstico por componentes	11
3.11 IgE inmunoblotting (Inmunotransferencia de IgE)	12
4 Resultados.....	13
5 Discusión	15
6 Conclusión.....	18
7 Bibliografía.....	19
8 Anexos.....	21
Anexo 1.....	21



Resumen

Antecedentes: La alergia causada por parásitos de las legumbres es un campo escasamente estudiado y con pocos artículos publicados al respecto.

Objetivo: Determinar el origen de los síntomas alérgicos (urticaria de contacto, asma y anafilaxia) presentados por un grupo de trabajadores agrarios que trabajaban en contacto con guisantes, los cuales habían sido tratados con fosfuro de aluminio (EPA) como plaguicida, y estudiar si los mismos están relacionados con una reacción de hipersensibilidad contra proteínas específicas del parásito, o del propio guisante.

Material y métodos: Se realizó un estudio observacional, analítico, de casos y controles retrospectivo. 6 pacientes que trabajaban expuestos al contacto directo y al polvo de los guisantes y 5 controles con síntomas de alergia a legumbres, fueron seleccionados para participar en el estudio. Se prepararon extractos de guisantes sanos e infestados, tratados y no tratados con EPA, de cuerpos enteros de *B. pisorum* y de *B. lentis*, los cuales fueron usados para pruebas de prick cutáneos, provocación bronquial y oral. Asimismo, se llevaron a cabo una prueba abierta, pruebas de parche con insecticidas comunes, un análisis molecular y una inmunotransferencia de IgE mediante la técnica de Western blot.

Resultados: Tanto las pruebas in vivo como in vitro mostraron resultados positivos al contacto de proteínas de *B.pisorum* con los pacientes. La inmunotransferencia IgE reveló una banda significativa, común a todos los pacientes que habían trabajado con los guisantes infestados tratados con EPA. No se detectó respuesta a proteínas específicas del guisante en ninguna de las pruebas en los pacientes. Los controles, por el contrario, sí que mostraban respuestas positivas a extractos de legumbres. La prueba de provocación oral fue negativa en todos los casos.

Conclusiones: *Bruchus pisorum* es responsable de la urticaria de contacto que presentaban los pacientes, y podría ser causa del asma profesional y de las reacciones anafilácticas presentes en nuestros pacientes. Las reacciones pueden deberse tanto al contacto directo con la piel, como a la inhalación de partículas del insecto.

Palabras Clave: *Bruchus pisorum*, guisante, urticaria de contacto, alergia profesional.



1 | Introducción

Alrededor del mundo, las legumbres son una parte fundamental de la dieta de muchas culturas, por lo que el cultivo y cuidado de estas plantas tiene una gran importancia tanto alimentaria como económica. La familia de las leguminosas es amplia e incluye el cacahuete y la soja, dos de las causas más frecuentes de alergia alimentaria en nuestro medio (1). Como muchos de los cultivos realizados por el ser humano, las legumbres son habitualmente infestadas por parásitos específicos, cuyas proteínas pueden ser causa de reacciones de hipersensibilidad en personas susceptibles, tanto por el contacto directo con la piel, como por la inhalación de partículas con potencial alergénico procedentes del parásito. En la literatura se recogen múltiples casos de reacciones adversas tras la ingestión de legumbres, e incluso esta descrita la aparición de asma tras la inhalación de vapores de cocción de ciertas legumbres, pero las descripciones de este tipo provocadas por los parásitos son muy raras (2,3).

El guisante (*Pisum sativum*) es la segunda leguminosa de grano templado más cultivada del mundo y la primera de Europa. Como la mayoría de los cultivos, el guisante puede resultar dañado por una variedad de plagas y enfermedades. Las múltiples especies de *Bruchus* parasitan habitualmente las legumbres y pueden ser causa de pérdidas sustanciales de los cultivos. Una de las plagas más intratables y dañinas en todo el mundo es el escarabajo del guisante (*Bruchus pisorum*, Coleoptera: Bruchidae, Bp) que causa pérdidas de rendimiento de semillas de hasta el 50% (4). Los ejemplares adultos, que miden entre 3.5 y 5 mm de largo y se pueden distinguir a simple vista, tienen la capacidad de volar y pueden emitir espículas para defenderse. Las distintas especies de estos escarabajos infestan distintos tipos de cultivos, siendo los más importantes: *Bruchus lentis* en lentejas, *Bruchus rufimanus* en alubias y *Bruchus pisorum* en guisantes (Figura1) (5).

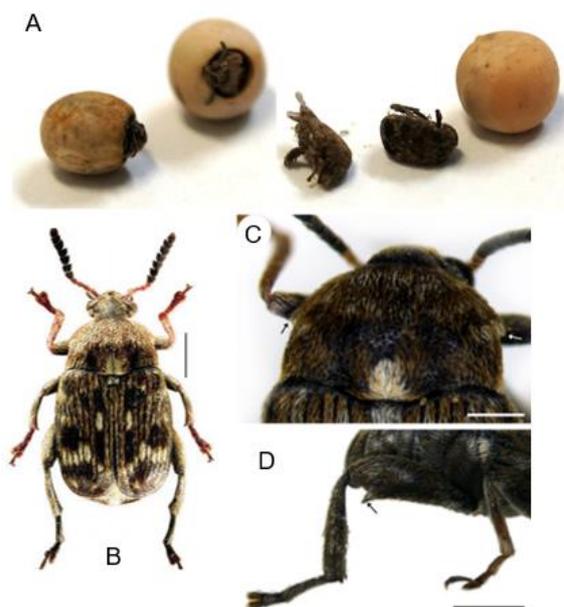


FIGURA 1 Representación del *Bruchus pisorum*, dentro y fuera del guisante (A). Vista general de un adulto (B). Detalle del pronoto, mostrando dientes que sobresalen (flecha) (C). Detalle del fémur posterior con una larga espícula (flecha)(D).

Bruchus pisorum es una especie proveniente de Asia menor, pero que a raíz del desarrollo del comercio internacional se distribuyó por todo el mundo, incluyendo las regiones mediterráneas de Europa, como España (6). El impacto de las invasiones biológicas de especies exóticas (no autóctonas) en la conservación de la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas nativos es cada vez más evidente y constituye un problema en crecimiento. Este problema reside en el delicado equilibrio entre el deterioro ecológico y las sustanciales pérdidas económicas debido a las plagas (6,7).

Establecer un diagnóstico diferencial entre la alergia debida a la inhalación de partículas de la propia leguminosa, y la alergia provocada por proteínas específicas del parásito no es sencillo debido a la alta resistencia a la digestión de las proteínas de cubierta de las legumbres, y a la falta de extractos estandarizados de los parásitos.

Los guisantes verdes son la verdura procesada más comúnmente consumida tanto en los Estados Unidos, como en el Reino Unido (8). Están descritos los siguientes alérgenos de los guisantes: Pis s1, una proteína de 44kDa y 7S, parecida a la viciclina (8); Pis s2, una convinciclina de 63kDa (8); Pis sIFR, una isoflavina reductasa (9) y Pis s8, una profilina (10). La mayoría de los síntomas alérgicos causados por los guisantes, son debidos a la fracción de albúmina, aunque las fracciones de las globulinas y las glutelinas también contribuyen a su poder alérgico. Estas y otras proteínas con morfologías y características muy similares se encuentran en otros tipos de legumbres, lo que explica la reactividad alérgica cruzada entre algunos de estos alimentos (8). Una característica diferencial de algunos de estos alérgenos de legumbres es su gran resistencia a la degradación térmica, química e incluso proteolítica (11).



La albúmina mantiene su reactividad, incluso después de calentarla a 60°C durante 30 minutos o hervirla a 100°C durante 5 minutos.

Los guisantes han provocado asma tras la inhalación de sus vapores de cocina (12) y asma ocupacional tras la exposición a la harina de guisantes (13). Se ha descrito la aparición de asma profesional en granjeros e ingenieros agrónomos causado por el parásito de las lentejas *Bruchus lentis* (Coleoptera: Bruchidae) (5,14). En estos artículos se demostró que tanto las pruebas cutáneas como las pruebas de provocación eran positivas cuando se aplicaban extractos de guisantes infectados, o del insecto, pero resultaban negativas cuando se aplicaban extractos de guisantes sanos, tanto hervidos como crudos.

En este trabajo estudiamos pacientes con síntoma de hipersensibilidad inmediata (urticaria de contacto, asma y anafilaxia) en relación con la inhalación de partículas de guisantes infestados por *Bruchus pisorum* (Figura 1). Se estudiaron alérgenos distintos que pudieran ser causantes de la sintomatología, y al igual que en estudios previos, se realizaron pruebas tanto in vitro como in vivo.

2 | Objetivo e hipótesis

Determinar el origen de los síntomas alérgicos (urticaria de contacto, asma y anafilaxia) presentados por un grupo de trabajadores agrarios que trabajaban en contacto con guisantes. Planteamos la hipótesis de que esta sintomatología pueda estar en relación con un insecto que parasita habitualmente esta planta (*Bruchus pisorum*) (Figura1). Se trata de discernir si el sustrato alérgico es derivado de los antígenos propios del parásito, o si se debe a proteínas específicas del guisante.



3 | Material y métodos

3.1 | Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional analítico de casos y controles retrospectivo, con los pacientes que acudieron al servicio de Inmunopatología y alergia del HURH de Valladolid presentado síntomas de asma ocupacional, urticaria de contacto y anafilaxia.

3.2 | Pacientes

Seleccionamos seis pacientes, tres agricultores y tres ingenieros agrónomos, con síntomas de alergia inmediata (urticaria de contacto, asma y anafilaxia) tras el contacto con polvo de guisantes infestados por *Bruchus pisorum* y se estudió su posible hipersensibilidad mediada por inmunoglobulina IgE. Las lesiones cutáneas eran papulosas, tipo habón, y aparecieron tras la exposición de la piel a *Bruchus pisorum* vivo, desapareciendo por completo a los 30 minutos. También presentaron lesiones en las yemas de los dedos que desaparecieron totalmente en unas horas (Figura 2).

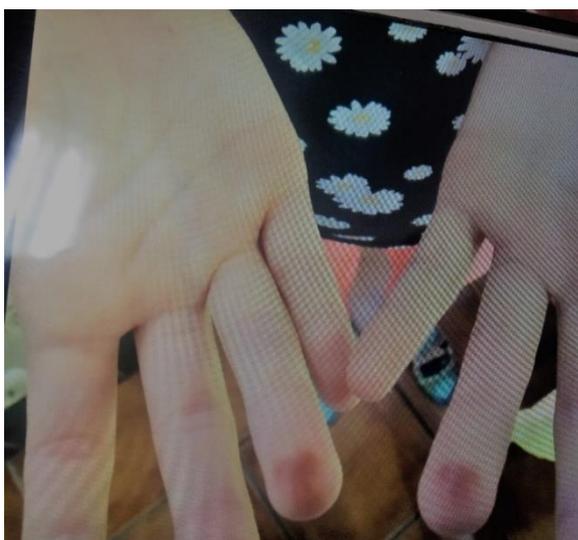


FIGURA 2 Lesiones presentes en las yemas de los dedos de un ingeniero agrónomo después de manipular guisantes infestados con *Bruchus pisorum*. El eritema, que se acompañó de prurito, apareció justo tras el contacto con los guisantes, lo que sugiere una urticaria de contacto.

Estos pacientes, debido a sus profesiones, habían trabajado durante años con guisantes sanos e infestados sin presentar ninguna sintomatología. En esta ocasión, los síntomas comenzaron tras el uso de un plaguicida nuevo para controlar la infestación de la planta del guisante, el **fosforo de aluminio**. Este es un fosfato, que al contacto con el agua libera H₃P, fosfano en estado gaseoso, la cual tiene actividad insecticida y rodenticida.

Todos los pacientes manipulaban los guisantes sin guantes, ya que nunca había sido necesario, no habiendo presentado problemas anteriormente.



Asimismo, todos los pacientes consumían guisantes y otras legumbres en su dieta de forma habitual, sin presentar problemas. A modo de controles, se incluyeron en el estudio cinco pacientes con sensibilidad a otras legumbres (lentejas y cacahuetes). Las características clínicas tanto de los pacientes como de los controles se detallan en la Tabla 1. Todos los participantes firmaron consentimientos informados por escrito.

3.3 | Identificación de plagas

Se recogieron especímenes vivos de parásitos procedentes de guisantes con los que trabajaban los pacientes y se identificaron como *Bruchus pisorum* (Frölich 1799), de la orden de las Coleopteras, siguiendo las claves dicotómicas de Yus-Ramos et al. (Figura1) (6). Para el análisis microscópico se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido.

3.4 | Extractos de diagnóstico

Los extractos usados para las pruebas fueron preparados a partir de guisantes (*Pisum sativum*) sano e infestados, tanto crudos como hervidos. Los guisantes tratados con fosforo de aluminio (EPA, ISO, código CA DPR Chem code 3541. Cas no.7803.51-2), los infestados con *Bruchus pisorum* (Figura 1) y con el parásito de las lentejas *Bruchus lentis* fueron usados para las pruebas de prick cutáneo (SPT), de provocación bronquial (BCT), de provocación oral y para las determinaciones in vitro.

Los guisantes sanos y aquellos infestados por parásitos vivos tratados con fosforo de aluminio, fueron reducidos a un fino polvo. Se prepararon los extractos (guisantes infestados, no infestados y cuerpos enteros de *Bruchus*) en una solución salina tamponada con fosfato al 5% PBS (del inglés phosphate-buffered saline). Se centrifugaron después estos preparados a 17700g durante 30 minutos y, después de una diálisis (peso molecular de corte en 3.5 kDa), se esterilizaron pasándolos a través de un filtro con un poro de 0.22 μm el cual evita el paso de endotoxinas a los sueros finales. Determinamos la concentración de proteínas de los extractos usando el método de Lowry (15). Una parte de los extractos fueron glicerizados para ser usados en pruebas de prick cutáneo (SPT). Otra parte se ajustó a 1mg/ml con solución salina estéril al 0.9% para la prueba de provocación bronquial (BCT). El resto se utilizó para la realización de los estudios in vitro. Para el preparado usado en la prueba de provocación oral, los guisantes puros e infestados fueron hervidos durante 30 minutos. La concentración proteica de los extractos obtenidos se encuentra detallada en la Tabla 2.

**Tabla 1** Datos clínicos y demográficos de los pacientes y los controles seleccionados. Resultados de las pruebas in vivo e in vitro.

Paciente/ Sexo/Ocupación	Edad (años)	Síntomas Etapa CU	Prick Guisantes sanos crudos/hervidos	Prick Guisante infestado (crudo/hervido) Tratado con EPA	Prick <i>Bruchus pisorum</i>	OAT Con <i>Bruchus vivos</i>	OC Guisantes infestados	BC con extracto de guisante infestado	BC con extracto de <i>Bruchus</i>	Patch T Pesticidas 48/h/72H
1. ABC/M/ agrónomo	43	Asma	-/-	6x6/3x3	4x4	+	NR	+	+	-
2. AIG/F/ agrónomo	47	Urticaria de contacto VK-M estadio 3	-/-	5x5/3x3	5x7	+	-	+	+	-
3. IAC/F/ agrónomo	42	Asma/ urticaria de contacto VK-M estadio 2	-/-	5x5/3x3	5x5	+	-	-	+	-
4. GHT/M/ agricultor	54	Urticaria de contacto VK-M estadio 2	-/-	3x3/3x3	3X3	+	-	+	+	-
5. JCC/M/ agricultor	57	Anafilaxia/urticaria de contacto VK-M estadio 3	-/-	3x3/3x3	2x2	+	-	+	+	-
6. IDG/M/ agricultor	56	Asma/Urticaria de contacto VK-M estadio 1	-/-	5x5/3x3	5x5	+	-	+	+	-
7. Control	32	Urticaria/asma provocada por lentejas	+/+	-/-	-	-	-	-	-	-
8. Control	37	Urticaria-Esofagitis por cacahuets	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-
9. Control	18	Asma y anafilaxia por lentejas	+/+	-/-	-	-	NR	+	-	-
10. Control	42	Urticaria por cacahuets	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-
11. Control	30	Urticaria por lentejas	-/-	-/-	-	-	-	+	+	-

Abreviaturas: BC: Bronquial challenge (provocación bronquial). CU: Contact urticaria (urticaria de contacto). NR: No realizado. OAT: Open application test (test abierto de aplicación). OC: oral challenge (provocación oral). Patch T pesticides: test de parche para otros pesticidas y productos de uso agrícola. VK-M: von Krogh G, Maibach HI.



Tabla 2 Concentración proteica de los diferentes extractos obtenidos para las pruebas de diagnóstico.

Extracto alergénico	mg proteína/mL de extracto
Guisantes sanos hervidos	5.19
Lentejas sanas hervidas	6.22
Guisantes parasitados por <i>B. pisorum</i> y NO tratados con fosforo de aluminio	2.90
Guisantes parasitados por <i>B. pisorum</i> y tratados con fosforo de aluminio	3.20
<i>Bruchus pisorum</i>	1.00
<i>Bruchus lentis</i>	0.47
Lentejas parasitadas por <i>Bruchus lentis</i>	3.33

3.5 | Prueba de punción cutánea

Para realizar las pruebas de pinchazo, o prick, cutáneas, se utilizó una batería estándar de extractos comerciales de ALK-Abelló (Madrid, España) que contiene compuestos de polen, ácaros, caspa animal, alimentos y mohos. Por otra parte, se utilizaron los extractos previamente preparados con guisantes sanos y guisantes infestados, y extracto del cuerpo entero de *Bruchus pisorum* a una concentración de 1mg/ml de proteínas. Incluimos asimismo extractos de ácaros de almacén, *Bruchus lentis*, y de lentejas infestadas por *Bruchus lentis* que se prepararon como se describió anteriormente (14).

Se considero como respuesta positiva a la inoculación un área de habón media mayor de 7mm², o un diámetro mayor de 5mm, pasados 15 minutos del pinchazo. Como controles internos de la prueba se utilizaron: Fosfato de histamina (10 mg/ml) como control positivo, y solución salina estéril al 0.9% como control negativo.

3.6 | Pruebas de parche

Tanto los pacientes como los controles fueron expuestos a una batería compuesta por los insecticidas más comúnmente usados en los cultivos de leguminosas (propiconazol, metaldehído, formaldehído, mercaptobenzotiazol, cipermetrina e isoproturon). Los resultados se recogieron los días 2, 3 y 4 tras la aplicación del parche.

Los insecticidas fueron testados a una concentración de 0.01% de acuerdo con el consejo del comité de ética del hospital; sin embargo, no se puede excluir la presencia de falsos negativos.



Un resultado negativo no excluye por completo la posibilidad de dermatitis de contacto alérgica. Las series estándar incluyen solo sustancias estadísticamente relevantes, pero no se puede excluir la posibilidad de un agente sensibilizante raro, exótico o nuevo, o la presencia de algún factor externo que falsee o dificulte la interpretación correcta de los resultados (16,17).

No se realizaron las pruebas de parche con fosforo de aluminio, ni con fosfano (EPA; CA DPR Chem code 3541) ya que pueden resultar potencialmente mortales al contacto con la piel, en caso de ingestión o de inhalación accidental, y son productos que únicamente han de ser manipulados por personal capacitado y con las medidas de protección adecuadas.

3.7| Prueba abierta (open test)

También se llevó a cabo una prueba abierta: se aplicaron ejemplares vivos de *Bruchus pisorum* sobre zonas de piel de aspecto normal, de 3x3 cm² de área, en la parte superior de la espalda o sobre la cara flexora del antebrazo. Los resultados se midieron, en un primer tiempo, pasados 20, 40 y 60 minutos para estar seguros de detectar cualquier posible reacción positiva, las cuales se caracterizan por pápulas y eritema en la zona de aplicación. La erupción típica ocurre en los casos positivos, entre los 15 o 20 primeros minutos tras la exposición, pero se puede prolongar hasta los 45 o 60 minutos. En un segundo tiempo, buscamos encontrar posibles reacciones tardías, por lo que se comprueban las zonas a las 7, 48, 72 y 96 horas.

3.8| Test de provocación bronquial

Las pruebas de provocación bronquial (BCT) se llevaron a cabo con la misma metodología que en estudios previos de este tipo (14). Se inicio con una concentración de extracto de 0.01 mg/ml diluido en solución salina estéril 0.9%, que se usó como amortiguador. Se usaron los preparados de guisantes infestados y de cuerpo entero de *Bruchus pisorum*.

Dos pacientes atópicos, con asma causado por *Bruchus lentis*, y tres pacientes con urticaria de contacto causada por legumbres fueron también expuestos a los preparados actuando como controles.



3.9|Test de provocación oral

La provocación oral se llevó a cabo usando un diseño de doble ciego con placebo (DBPCFCs por sus siglas en inglés) con guisantes infestados por parásitos, no tratados con EPA. Se siguieron las reglas propuestas en las últimas publicaciones (11) al respecto de la realización de este tipo de pruebas en pacientes con anafilaxis, descritas por Müller (18) después de que todos los participantes firmaran el consentimiento informado. Durante la semana previa se preparó a los integrantes del estudio, evitando consumir de forma estricta cualquier alimento sospechoso de poder causar los síntomas y no tomando ninguna medicación para el control sintomático de la alergia. Durante la prueba se tomaron las medidas oportunas para tratar reacciones graves potencialmente mortales.

Los guisantes infestados se molieron hasta obtener un polvo fino, el cual fue introducido en cápsulas opacas. La dosis de partida para la provocación dependería de la respuesta previa de cada paciente. En el paciente que presentó anafilaxia, se comenzó con una dosis baja de 5mg, que fue aumentada gradualmente hasta alcanzar los 500mg en una sola cápsula. Si no había reacción, la dosis total acumulada administrada sería al menos equivalente a la cantidad que el paciente había ingerido previamente. (cuando tuvo la reacción por la que consulta). Como placebo se prepararon capsulas idénticas, igualmente opacas, pero rellenas de sacarosa en polvo que fueron distribuidas aleatoriamente a los participantes a lo largo de la prueba. Un paciente y uno de los controles no firmaron el consentimiento para la provocación oral con guisantes infestados. Todos los signos objetivos y síntomas subjetivos fueron registrados al comienzo de cada ronda de provocación.

3.10|Determinación de IgE específica y diagnóstico por componentes

Se determinó la IgE específica contra legumbres usando CAP (Thermo Fisher Scientific, Uppsala, Suecia). Las IgE contra Pis s1, Pis s6 y Pis s8 se determinaron con la plataforma de Bayer Diagnostics, ADVIA-Centaur (Tarrytown, Nueva York).

La proteína Pis s1 fue purificada y preparada marcándola con biotina y analizada en el Centaur de acuerdo a como se hizo en el estudio de Petersen (19). Posteriormente se realizó un diagnóstico resuelto por componentes (CRD) usando un panel tipo ISAC 112 (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El diagnóstico resuelto por componentes en las alergias alimentarias es un enfoque utilizado para caracterizar los componentes moleculares de cada alérgeno involucrado en una respuesta mediada por IgE específica.



El CRD puede mejorar la precisión del diagnóstico y ayudar al médico en muchos aspectos del estudio de la alergia. Esta técnica permite la sensibilización discriminadora de los fenómenos de sensibilización cruzada y puede ser útil para estratificar el riesgo clínico asociado con un patrón de sensibilización específico (20).

3.11 | IgE immunoblotting (Immunotransferencia de IgE)

El primer paso fue separar las proteínas de los sueros a estudiar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15% en condiciones reductoras. En cada carril se cargaron 0.5 µg de los extractos proteicos de guisantes sanos, guisantes infestados, lentejas, lentejas infestadas, *Bruchus pisorum* y *Bruchus lentis*. Las proteínas obtenidas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Bioscience, Little Chalfont, Reino Unido). Posteriormente se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con una dilución 1/5 de los sueros de los pacientes, y con una dilución 1/1000 de suero de ratón con anticuerpos anti-IgE humanos (Mouse Anti-Human IgE Fc-HRP, Southern Biotech, Birmingham, Alabama). Las proteínas de unión a IgE se detectaron por reacción inmunológica, utilizando quimioluminiscencia mejorada (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, Massachusetts) siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. Como control negativo se utilizaron blots con proteínas del extracto electrotransferidas, se incubaron en BSA en vez de en suero de pacientes.



4 | Resultados

Los resultados de las pruebas realizadas a los participantes del estudio se exponen en la [Tabla 1](#). Todos los agricultores eran varones, dos de los agrónomos eran mujeres y el resto varones. Todos los pacientes tenían más de 10 años de experiencia trabajando con guisantes. La edad media de los pacientes fue de 49 años.

La urticaria de contacto fue el síntoma más repetido, asociado a asma en tres de los pacientes. Las lesiones más frecuentes fueron la urticaria papular en el abdomen y las lesiones en las yemas de los dedos tras separar los guisantes ([Figura 2](#)), ambas compatibles con una urticaria de contacto. Los síntomas aparecieron 15 minutos después del contacto de los pacientes con los guisantes infestados, y consistieron en dolor punzante y prurito. Los pacientes presentaban lesiones eritematosas con picor inmediato en las yemas de los dedos y lesiones habonosas, de forma predominante en el abdomen, las cuales sugerían una urticaria de contacto por vía aérea. Habitualmente estos trabajadores manipulaban los guisantes sin guantes ni otras medidas de protección, ya que nunca se habían hecho necesarias. Llegado el momento de la presentación de los síntomas, se hizo patente la importancia del contacto con las proteínas, tanto de las legumbres como del parásito. Los agrónomos trabajaban en mesas de clasificación, donde los agricultores vaciaban grandes sacos de guisantes para su separación y clasificación. Los agrónomos encontraban con frecuencia insectos vivos sobre ellos que saltaban desde las mesas al manipular las semillas, o cuando se cargaban las maquinas sembradoras. Uno de los pacientes presentó anafilaxia tras abrir una de las bolsas de guisantes, dos pacientes respondieron a *Anisakis*, uno a himenópteros (sin asociarse a ninguna picadura) y tres al polen.

Todos los pacientes reaccionaron de forma positiva a los SPT correspondientes a los extractos de guisantes infestados con *Bruchus pisorum*, tanto crudos como hervidos, y al extracto de *Bruchus pisorum* entero. Las pruebas cutáneas fueron, por el contrario, negativas para los preparados de guisantes sanos en todos los pacientes. Cinco pacientes asmáticos tuvieron reacciones positivas en los test de provocación bronquial con guisantes infestados por *Bruchus*. Todas las pruebas de provocación oral fueron negativas en todos los pacientes y controles para guisantes infestados. Los test de parches con batería de pesticidas comerciales fueron también negativas. El test abierto se realizó en cinco pacientes, presentando la totalidad de ellos reacciones cutáneas en los primeros 20 minutos tras la aplicación, las cuales desaparecieron en las 24 horas siguientes.



En los tres agrónomos que ejercían clasificando los frutos en las mesas, se reprodujeron las mismas lesiones en el abdomen que referían haber sufrido en los episodios ocurridos mientras trabajaban.

Los resultados del inmunoblotting IgE se muestran en la [Figura 3](#), y de forma más ampliada, en el [Anexo1](#). Las pruebas llevadas a cabo con suero preparado a partir de los extractos de *Bruchus* y guisantes infestados, revelaron la presencia de proteínas reactivas a la IgE del suero en todos los pacientes y tres de los controles. Por el contrario, los pacientes no tenían IgE contra las proteínas específicas del guisante, según puso de manifiesto la inmunotransferencia y la prueba de IgE específica para Len c1. Dos controles fueron positivos para la presencia de lentejas infestadas (7 y 9).

En todos los pacientes se detectó la presencia común de tres bandas: una primera banda de 25 kDa de masa molecular, presente en los dos tipos de guisantes infestados, pero no así detectada en los parásitos aislados (*B. pisorum* y *B. lentis*); una banda de 18 kDa, relacionada con asma y urticaria de contacto inmediata, ya descrita en estudios previos de asma debido a *Bruchus lentis* (14), se halló en todos los pacientes y en el control 7 (este control presenta asma y urticaria de contacto desencadenado por lentejas) y el control 9 (este participante tenía antecedentes de anafilaxia y asma relacionado también con las lentejas). Los controles 7 y 9 tuvieron reacción bronquial positiva a la exposición a extracto de guisantes parasitados; una banda de 30 kDa aproximadamente, con los guisantes infestados y *Bruchus pisorum* en todos los pacientes y en el control 9, cuyos síntomas comenzaron al empezar a trabajar en un

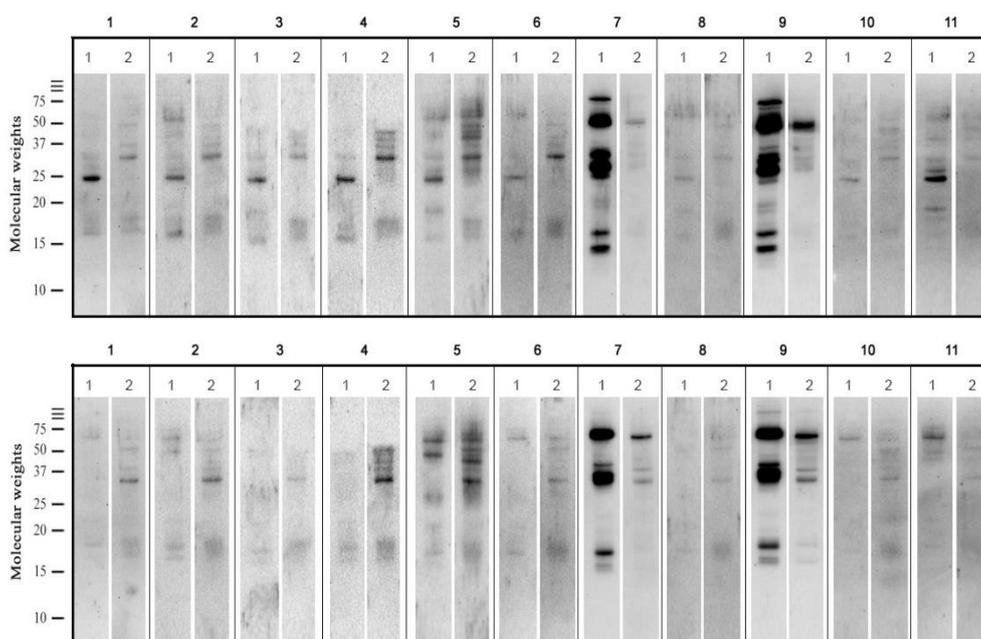


FIGURA 3 Resultado de la inmunotransferencia de IgE con el suero de los pacientes.



depósito donde se almacenaban legumbres. Parece razonable pensar que puede haber proteínas alergénicas compartidas entre las dos especies de Bruchidos, que no serían termoestables, al contrario que las vinciclinas. Sin embargo, en las pruebas cutáneas, se objetivaron reacciones tanto para guisantes crudos como para aquellos que fueron cocinados. El habón del prick test es más pequeño cuando el guisante infestado se cocina, aunque es positivo tanto si se cocina como si no. El control 11 tuvo reacción con la provocación bronquial, pero no salió banda en el análisis de IgE, por lo que no se incluyó.

5 | Discusión

Tras analizar los resultados de las pruebas realizadas, se diagnosticó a los trabajadores que manipulaban guisantes infestados con *Bruchus pisorum*, de urticaria de contacto, asma y anafilaxia. Estas reacciones se desencadenaron tras cambiar el agente plaguicida utilizado habitualmente por fosforo de aluminio (EPA), lo cual pudo inducir ciertos cambios en el parásito que finalmente provocaron los síntomas de los pacientes. *B. pisorum* es una de las plagas más importantes en cuanto al cultivo del guisante, y el estudio de mecanismos de resistencia, producidos por la propia planta, contra este parásito sería clave para la selección de cepas resistentes evitaría gran cantidad de problemas derivados del uso de pesticidas o de los propios parásitos (21).

Todos los pacientes del estudio habían trabajado con guisantes durante un largo periodo de tiempo, y además presentaban signos y síntomas de atopia. Las legumbres son una gran causa de alergia alimentaria tanto en edad pediátrica como en adultos sensibilizados. Ya se habían descrito casos de alergia a los vapores de cocción de los guisantes (3), asma ocupacional por exposición a harina de leguminosas (13) o asma y rinoconjuntivitis mediada por IgE en pacientes que inhalan o ingieren lentejas parasitadas por *Bruchus lentis* (5). El problema de nuestro estudio radica en establecer el diagnóstico diferencial entre una alergia causada por el escarabajo *B. pisorum*, y una causada por las propias proteínas del guisante, ya que este insecto se alimenta mayoritariamente de guisantes, y por tanto puede haber sido tan solo un vehículo del potencial alergénico de la planta.



Los resultados sugieren que los síntomas presentes en los pacientes eran, en efecto causados por el contacto directo del insecto sobre la piel sin protección, o tras la inhalación de partículas de *Bruchus pisorum* presentes en el ambiente de trabajo de estas personas. Esto explica las lesiones aparecidas en las yemas de los dedos al manipular guisantes infestados (Figura 2), o la aparición de lesiones papulares/habonosas en el abdomen de los agrónomos, y que muchas veces encontraban insectos vivos en su regazo. De la misma manera, no se puede descartar que partes alergénicas del cuerpo del parásito penetraran la piel, ya que, aunque estos pequeños insectos no poseen las estructuras anatómicas necesarias para picar, sí que pueden morder y provocar microtraumatismos por los que un alérgeno pudiera penetrar, lo que es una posibilidad improbable debido a su pequeño tamaño.

De esta forma, la explicación más razonable es que el contacto directo o la inhalación sean los dos mecanismos que con mayor probabilidad causen la urticaria de contacto y el resto de los síntomas alérgicos. Esta hipótesis se refuerza al notificar que ninguno de los pacientes presentó signos de hipersensibilidad a las legumbres ni a alérgenos de reacción cruzada, pero si tuvieron resultados positivos tras el contacto con legumbres parasitadas en las SPT y BCT.

Como recomendaciones, se les sugirió a los pacientes comenzar a utilizar equipos de protección (guantes, mascarillas, gafas y buzos con cuello y puños sellados) durante la manipulación de las cosechas. Al paciente que presentó el episodio anafiláctico se le instruyó en el uso de jeringuillas de adrenalina autoinyectables. Los síntomas de la urticaria de contacto se trataron con metilprednisolona y antihistamínicos a dosis decrecientes, mejorando notablemente. No fue este el caso de los síntomas asmáticos, ya que los pacientes que lo sufrieron siguieron presentando episodios y sintomatología, aunque de menor gravedad que en anteriores ocasiones. Con todas estas recomendaciones e intervenciones, todos los pacientes pudieron seguir trabajando con normalidad.

Durante los años previos a la aparición de los síntomas, el insecticida utilizado para el control de plagas era el fosfato de magnesio. Según la normativa del Ministerio de Agricultura en el momento del estudio, el insecticida usado era, exclusivamente, fosfuro de aluminio (EPA, ISO.21), que es un compuesto muricida que fue utilizado para controlar la plaga de topillos que transmitían la tularemia en nuestra región en años anteriores. Este químico no pudo usarse en las pruebas con pacientes debido a su alta toxicidad si es inhalado, ingerido, o al contacto con piel y mucosas.

Las pruebas de contacto con insecticidas comerciales comunes que pueden causar dermatitis de contacto fueron negativas (22), lo que concuerda con el tipo de lesión presentada, ya que no es tanto una dermatitis, sino una urticaria de contacto, que si es explicable tras el contacto, la mordedura, la inhalación o la penetración en la piel de las espículas presentes en el cuerpo de *Bruchus pisorum* (Figura 4).

El uso de productos químicos para el control de plagas se ha hecho necesario para el cultivo de extensión a gran escala necesario para satisfacer la demanda de productos agrícolas, pero también son fuente de toxicidad directa, y como se está demostrando, tienen la capacidad de inducir cambios proteínicos en algunos parásitos, multiplicando su poder alergénico. Ahora mismo se están buscando alternativas más seguras que los pesticidas para el control de los parásitos de las leguminosas, como la selección de cepas con resistencias intrínsecas a estos insectos. Esta vía de la selección de cepas, tras la identificación genética de marcadores de resistencia, presenta resultados preliminares prometedores. Para descifrar el control genético subyacente a las resistencias previamente identificadas en *P. sativum ssp. Syriacum*, (RIL F), se han desarrollado líneas endogámicas recombinantes, después de la identificación genética de siete genes potenciales localizados con QTL (Identificación de loci de rasgos cuantitativos) (4).

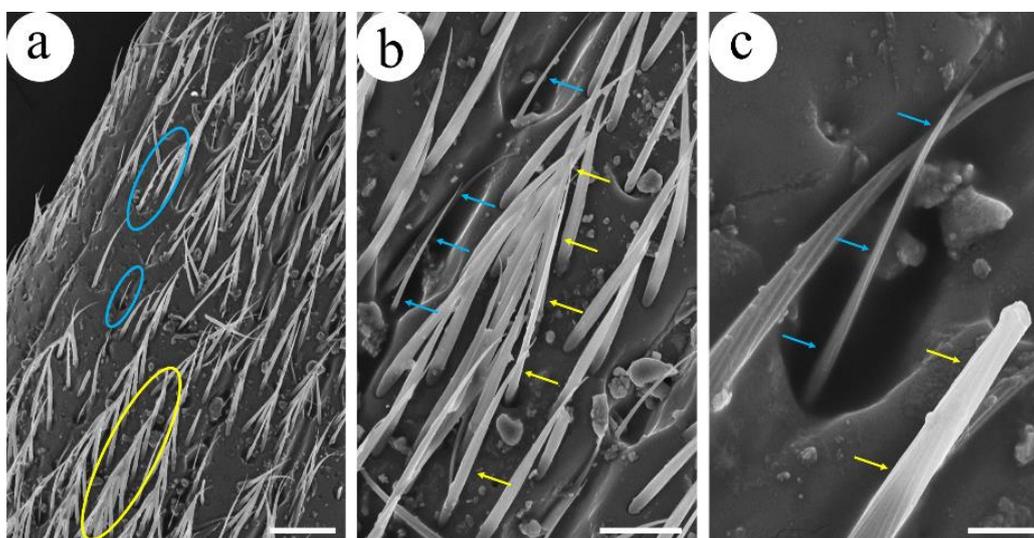


FIGURA 4 (a) dos tipos de espículas en las elytras de *B. pisorum*: agrupadas (amarillo) y solitarias (azul). (b) Detalle ampliado de la morfología de las espículas. (c) Detalle de una espícula solitaria.



6| Conclusión

Las proteínas específicas de *Bruchus pisorum* pueden causar urticaria de contacto mediada por IgE, asma y anafilaxia en pacientes que inhalen partículas de guisantes infestados. Sugerimos que nuestros pacientes tuvieran urticaria de contacto inmunológica, la cual ocurre con más frecuencia en pacientes atópicos (todos nuestros pacientes eran atópicos). Es necesaria la exposición previa al alérgeno para provocar la sensibilización; en nuestro caso todos los pacientes trabajaban con guisantes. Dentro de las enfermedades profesionales, la urticaria de contacto tiene una frecuencia baja (<0.4%), pero puede progresar al desarrollo de una reacción anafiláctica (23). La urticaria de contacto, provocada por la inhalación de partes del insecto, puede preceder al asma y a la anafilaxia, por lo que el conocimiento de que legumbres podrían estar infestadas, así como los métodos para evitar que esto ocurra son potencialmente importantes.



7| Bibliografía

1. Kalogeromitros D, Armenaka M, Galatas I, Capellou O, Katsarou A. Anaphylaxis induced by lentils. *Ann Allergy Asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy Asthma Immunol*. diciembre de 1996;77(6):480-2.
2. Vitaliti G, Pavone P, Spataro G, Giunta L, Guglielmo F, Falsaperla R. Legumes steam allergy in childhood: Update of the reported cases. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1 de marzo de 2015;43(2):196-202.
3. Vitaliti G, Morselli I, Di Stefano V, Lanzafame A, La Rosa M, Leonardi S. Urticaria and anaphylaxis in a child after inhalation of lentils vapours: a case report and literature review. *Ital J Pediatr*. 13 de diciembre de 2012; 38:71.
4. Aznar-Fernández T, Barilli E, Cobos MJ, Kilian A, Carling J, Rubiales D. Identification of quantitative trait loci (QTL) controlling resistance to pea weevil (*Bruchus pisorum*) in a high-density integrated DArTseq SNP-based genetic map of pea. *Sci Rep [Internet]*. 8 de enero de 2020 [citado 19 de mayo de 2021];10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6949260/>
5. Armentia A, Lombardero M, Blanco C, Fernández S, Fernández A, Sánchez-Monge R. Allergic hypersensitivity to the lentil pest *Bruchus lentis*. *Allergy*. septiembre de 2006;61(9):1112-6.
6. Yus-Ramos R, Ventura D, Bensusan K, Coello-García P, György Z, Stojanova A. Alien seed beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in Europe. *Zootaxa*. 1 de julio de 2014;3826(3):401-48.
7. Southgate BJ. Biology of the Bruchidae. *Annu Rev Entomol*. 1979;24(1):449-73.
8. Wensing M, Knulst AC, Piersma S, O’Kane F, Knol EF, Koppelman SJ. Patients with anaphylaxis to pea can have peanut allergy caused by cross-reactive IgE to vicilin (Ara h 1). *J Allergy Clin Immunol*. febrero de 2003;111(2):420-4.
9. Vieths S, Frank E, Scheurer S, Meyer HE, Hrazdina G, Haustein D. Characterization of a new IgE-binding 35-kDa protein from birch pollen with cross-reacting homologues in various plant foods. *Scand J Immunol*. Marzo de 1998;47(3):263-72.
10. Ree R van, Voitenko V, Leeuwen A van, Aalberse RC. Profilin Is a Cross-Reactive Allergen in Pollen and Vegetable Foods. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;98(2):97-104.
11. Lallès JP, Peltre G. Biochemical features of grain legume allergens in humans and animals. *Nutr Rev*. abril de 1996;54(4 Pt 1):101-7.
12. García Ortiz JC, López-Asunsolo A, Cosmes P, Duran AM. Bronchial asthma induced by hypersensitivity to legumes. *Allergol Immunopathol (Madr)*. febrero de 1995;23(1):38-40.
13. Bhagat R, Swystun VA, Cockcroft DW. Occupational Asthma Caused by Pea Flour. *Chest*. junio de 1995;107(6):1772.
14. Armentia A, Lombardero M, Barber D, Castrodeza J, Calderón S, Gil FJM, et al. Occupational asthma in an agronomist caused by the lentil pest *Bruchus lentis*. *Allergy*. noviembre de 2003;58(11):1200-1.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. noviembre de 1951;193(1):265-75.
16. Rietschel RL, Fowler JF, Fisher AA. Fisher’s Contact Dermatitis. PMPH-USA; 2008. 892 p.



17. Lazzarini R, Duarte I, Ferreira AL. Patch tests. *An Bras Dermatol*. 2013;88(6):879-88.
18. Muller BA. Minimizing latex exposure and allergy. How to avoid or reduce sensitization in the healthcare setting. *Postgrad Med*. abril de 2003;113(4):91-7.
19. Petersen AB, Gudmann P, Milvang-Grønager P, Mørkeberg R, Bøgestrand S, Linneberg A, et al. Performance evaluation of a specific IgE assay developed for the ADVIA centaur immunoassay system. *Clin Biochem*. octubre de 2004;37(10):882-92.
20. Calamelli E, Liotti L, Beghetti I, Piccinno V, Serra L, Bottau P. Component-Resolved Diagnosis in Food Allergies. *Medicina (Mex)* [Internet]. 18 de agosto de 2019 [citado 17 de mayo de 2021];55(8). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6723663/>
21. Nikolova I. Pea weevil damage and chemical characteristics of pea cultivars determining their resistance to *Bruchus pisorum* L. *Bull Entomol Res*. abril de 2016;106(2):268-77.
22. Sharma A, Mahajan VK, Mehta KS, Chauhan PS, Sharma V, Sharma A, et al. Pesticide contact dermatitis in agricultural workers of Himachal Pradesh (India). *Contact Dermatitis*. octubre de 2018;79(4):213-7.
23. Süß H, Dölle-Bierke S, Geier J, Kreft B, Oppel E, Pfoehler C, et al. Contact urticaria: Frequency, elicitors and cofactors in three cohorts (Information Network of Departments of Dermatology; Network of Anaphylaxis; and Department of Dermatology, University Hospital Erlangen, Germany). *Contact Dermatitis*. noviembre de 2019;81(5):341-53.



8 | Anexos

Anexo 1. Tabla con los resultados tipificados, simplificados y ordenados de la inmunotransferencia IgE (Inmunoblotting).

Paciente		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
Guisantes (A)	<i>B. pisorum</i> (B)	(A)	(B)																				
75 kDa														x					x				
55 kDa											x								x				
48 kDa			x	x						x	x	x		x	x				x	x			x
42 kDa				x	x		x		x		x		x						x	x		x	x
37 kDa			x		x		x		x		x		x						x	x		x	x
35 kDa		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
28 kDa														x					x				x
25 kDa		x			x		x		x		x		x			x			x			x	
22 kDa														x					x				
21 kDa														x					x				x
20 kDa										x				x		x			x				x
19 kDa		x	x	x	x	x	x	x	x														
17 kDa		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x			x		x	
15 kDa																				x			
14 kDa																				x			
13 kDa																				x			
Patient		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
Lentejas (C)	<i>B. lentis</i> (D)	(C)	(D)	(C)	(D)	(C)	(D)	(C)	(D)	(C)	(D)	(C)	(D)	(C)	(D)	(C)	(D)	(C)	(D)	(C)	(D)	(C)	(D)
100 kDa																			x	x			
60 kDa		x		x						x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x
48 kDa			x		x		x	x	x			x	x		x	x			x		x		x
42 kDa									x		x		x	x	x				x	x		x	x
37 kDa			x		x				x		x		x	x	x				x	x		x	
35 kDa			x		x		x		x		x		x	x	x			x	x	x		x	
18 kDa		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x		x	x	x	x	
17 kDa			x		x		x		x		x		x						x	x			

URTICARIA DE CONTACTO, ASMA Y ANAFILAXIA EN AGRICULTORES E INGENIEROS AGRÓNOMOS POR PARÁSITOS DE LEGUMBRES



Autor: Jesús Díaz García Tutora: Dra. Alicia Armentia Medina
Co-Tutora: Dra. Sara Martín Armentia

Departamento de Medicina, Dermatología y Toxicología, Servicio de Inmunopatología y alergia
Universidad de Valladolid

INTRODUCCIÓN

- Las legumbres son un alimento muy consumido en todo el mundo, y de igual forma, representan una de las causas más comunes de reacciones alérgicas.
- Las leguminosas son habitualmente infestadas por parásitos específicos, cuyas proteínas pueden ser causa de reacciones de hipersensibilidad tipo I en personas susceptibles.
- En el sur de Europa la plaga más importante del guisante es el *Bruchus pisorum*.
- Aunque en la literatura científica se han descrito ampliamente reacciones de hipersensibilidad a las legumbres, rara vez se han descrito casos de alergia al propio parásito.
- Tras un brote urticaria de contacto, asma y anafilaxia entre trabajadores que manipulaban guisantes, se plantea la hipótesis de si el origen de este brote está en el guisante o en su parásito.



FIGURA 1. (Arriba) *B.pisorum* dentro de semillas de guisante, en estado de larva (izquierda) y en forma adulta (derecha). (Abajo) Aspecto macroscópico general de *B.pisorum* adulto.

OBJETIVO

Determinar la causa de urticaria, asma y anafilaxia en agricultores y agrónomos que trabajan manipulando guisantes. Discernir si el sustrato alérgico es derivado de los antígenos propios del parásito (*Bruchus pisorum*), o si se debe a proteínas específicas del propio guisante.



RESULTADOS

Tabla 1. Datos demográficos de casos y controles y resultados de las pruebas in vivo.

Paciente/ Sexo/Ocupación	Edad (años)	Prick Guisantes sanos (crudo/hervido)	Prick Guisante infestado (crudo/hervido) Tratado con EPA	Prick <i>Bruchus pisorum</i>	OAT Con <i>Bruchus</i> vivos	OC Guisantes infestados	BC con extracto de guisante infestado	BC con extracto de <i>Bruchus</i>	Patch T Pesticidas 48h/72h
1. ABC/M/ agrónomo	43	-/-	6x6/3x3	4x4	+	NR	+	+	-
2. AIG/F/ agrónomo	47	-/-	5x5/3x3	5x7	+	-	+	+	-
3. IAC/F/ agrónomo	42	-/-	5x5/3x3	5x5	+	-	-	+	-
4. GHT/M/ agricultor	54	-/-	3x3/3x3	3x3	+	-	+	+	-
5. JCC/M/ agricultor	57	-/-	3x3/3x3	2x2	+	-	+	+	-
6. IDG/M/ agricultor	56	-/-	5x5/3x3	5x5	+	-	+	+	-
7. Control	32	+/+	-/-	-	-	-	-	-	-
8. Control	37	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-
9. Control	18	+/+	-/-	-	-	NR	+	-	-
10. Control	42	-/-	-/-	-	-	-	-	-	-
11. Control	30	-/-	-/-	-	-	-	+	+	-

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo un estudio observacional analítico de casos y controles retrospectivo de pacientes que acudieron al servicio de Alergología del HURH de Valladolid.

Se seleccionaron seis pacientes con síntomas de hipersensibilidad inmediata (urticaria de contacto, asma y anafilaxia) después de la inhalación de polvo de guisantes infestados por *Bruchus pisorum*.

Como controles se escogieron 5 pacientes con síntomas alérgicos inmediatos debido a la sensibilización previa de la lenteja y el cacahuete.



Figura 2. Lesión en las yemas de los dedos en un agrónomo que manipulaba guisantes infestados por *B.pisorum* vivo.

CONCLUSIONES

Las proteínas alergénicas de *Bruchus pisorum* son capaces de provocar urticaria de contacto mediada por IgE, anafilaxia y asma profesional en aquellos pacientes que inhalan partículas de guisantes infestados o por contacto directo con el parásito.

Conocer las plagas que infestan los cultivos de leguminosas, no solo tiene una especial importancia económica, sino que puede ayudar a identificar y prevenir enfermedades profesionales que afectan a los trabajadores de este sector.

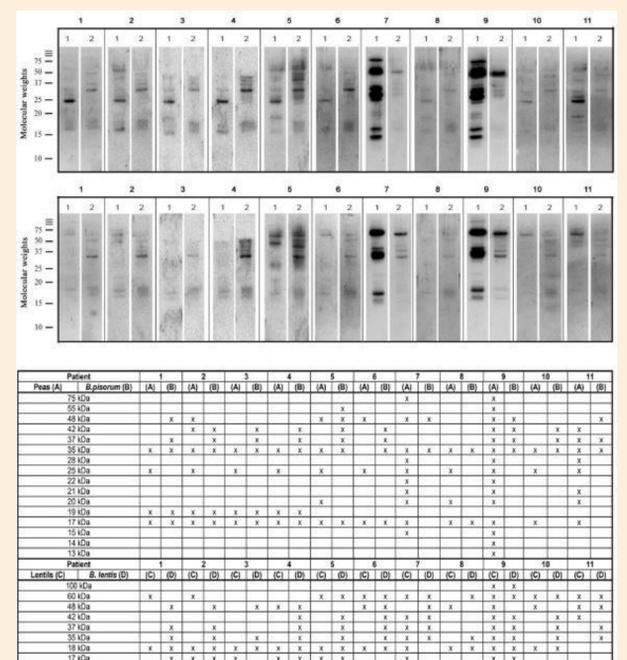


Figura 3. Resultados de la inmunodetección de IgE.

Las pruebas llevadas a cabo con suero preparado a partir de los extractos de *Bruchus* y guisantes infestados, revelaron la presencia de proteínas reactivas a la IgE del suero en todos los pacientes y dos de los controles (7 y 9). Por el contrario, los pacientes no tenían IgE contra las proteínas específicas del guisante.

BIBLIOGRAFIA DESTACADA

- Armentia A, Lombardero M, Blanco C, Fernández S, Fernández A, Sánchez-Monge R. Allergic hypersensitivity to the lentil pest *Bruchus lentis*. Allergy. septiembre de 2006;61(9):1112-6.
- Vitaliti G, Pavone P, Spataro G, Giunta L, Guglielmo F, Falsaperla R. Legumes steam allergy in childhood: Update of the reported cases. Allergol Immunopathol (Madr). 1 de marzo de 2015;43(2):196-202.
- Yus-Ramos R, Ventura D, Bensusan K, Coello-García P, György Z, Stojanova A. Alien seed beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in Europe. Zootaxa. 1 de julio de 2014;3826(3):401-48.
- Armentia A, Lombardero M, Barber D, Castrodeza J, Calderón S, Gil FJM, et al. Occupational asthma in an agronomist caused by the lentil pest *Bruchus lentis*. Allergy. noviembre de 2003;58(11):1200-1.
- García Ortiz JC, López-Asunsolo A, Cosmes P, Duran AM. Bronchial asthma induced by hypersensitivity to legumes. Allergol Immunopathol (Madr). febrero de 1995;23(1):38-40.

In vivo

- Prick test
- Pacht test
- Open test
- Broncprovocación
- Provocación oral

In vitro

- Determinación IgE específica
- Diagnóstico molecular por componentes
- Inmunodetección IgE