

---

---



**“ESTUDIO DESCRIPTIVO DE ALERGIA A LARVAS DE  
CALLIPHORIDAE Y LOMBRIZ DE TIERRA EN  
PESCADORES DE CÁCERES. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES Y  
CARACTERIZACIÓN ALERGÉNICA”**

***Tesis Doctoral***

*Universidad de Alcalá de Henares*

*Departamento de Medicina*

***Sergio L. Porcel Carreño***

*Alcalá de Henares, Septiembre 2007*

---

*Melchor Alvarez de Mon Soto, Catedrático de Medicina y Director del Departamento de Medicina de la Universidad de Alcalá,*

**CERTIFICA QUE:**

En su opinión, el trabajo de investigación presentado por **D. Sergio L. Porcel Carreño**, realizado bajo mi dirección, y titulado **"Estudio descriptivo de alergia a larvas de calliphoridae y lombriz de tierra en pescadores de Cáceres. Identificación de especies y caracterización alérgico"**, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde proceda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Alcalá de Henares a cuatro de octubre del año dos mil siete.





Hospital Universitario  
Ramón y Cajal  
Comunidad de Madrid

Belén de la Hoz Caballer, Doctora en Medicina y Facultativo Especialista de Área del Servicio de Alergia del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, y M<sup>a</sup> Carmen Diéguez Pastor, Doctora en Medicina y Especialista del Servicio de Alergia del Hospital Ramón y Cajal de Madrid

CERTIFICAN: Que Sergio Luis Porcel Carreño, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado "Estudio descriptivo de alergia a larvas de calliphoridae y lombriz de tierra en pescadores de Cáceres. Identificación de especies y caracterización alérgica", para optar al grado de Doctor en Medicina. Dicho trabajo reúne a su juicio las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarios para ser sometido a lectura y discusión ante el tribunal correspondiente.

Para que conste y a los efectos oportunos, firman la presente certificación en Madrid a veinte de septiembre del 2007.

Dra. Belén de la Hoz Caballer

Dra. M<sup>a</sup> Carmen Diéguez Pastor

---

***A mi querida esposa, Ana y a mi princesita, Carolina.***

---

---

## **Agradecimientos**

Para el desarrollo de este proyecto, he necesitado de muchas ayudas, sin las cuales esta idea original no podría haberse llevado a cabo.

Tengo que agradecer, en primer lugar a la Dra. Eva M<sup>a</sup> Frontera Carrión, profesora del departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la UEX, que tomó este proyecto con gran entusiasmo, haciéndolo también suyo en cuanto a la identificación taxonómica se refiere. Agradezco mucho su continua disponibilidad y su paciencia ante un profano en la materia. Su capacidad de trabajo y su inquietud científica, han hecho que de este proyecto original hayan surgido nuevas ideas y proyectos a desarrollar en el futuro, de los cuales tengo el placer de formar parte.

En segundo lugar, he de agradecer la inestimable colaboración del Dr. Fernando Pineda de la Losa, del departamento I+D+I de los laboratorios Diater, en la realización de todo el estudio inmunológico *in vitro*. Pese a su gran volumen de trabajo, siempre encontró un hueco para mis demandas. Ha sido una de las personas más cercanas al estudio y con la que he mantenido numerosas conversaciones y debates para el desarrollo de esta tesis.

También siento un gran agradecimiento hacia mi colega Elena Rodríguez Martín, con la que he realizado una parte importante del trabajo de campo, tanto en la parte más ingrata de reclutamiento de pacientes, como en la elaboración de los cuestionarios clínicos. Gracias a ella, este arduo trabajo ha resultado mucho más liviano.

Al Dr. Alfonso Ramos Cantariño, por su ayuda en la parte del análisis estadístico de los resultados de esta tesis, y más allá de esto, por su rigor científico en la tarea de hacer compatible el mundo de la estadística con la práctica clínica médica.

---

---

Mi gratitud también, al personal de enfermería de la sección de Alergología del Complejo Hospitalario de Cáceres. A Estrella, Concha, Josefina y Toñi, por ser parte imprescindible en la realización de las técnicas *in vivo*, y por su comprensión, en momentos donde la presión asistencial de las consultas, hace más apreciable su colaboración.

Al jefe de la sección de Alergología del Complejo Hospitalario de Cáceres, F. Javier Hernández Arbeiza, por su compromiso y apoyo inicial en este proyecto. Gracias a él, hemos podido trabajar conjuntamente con el grupo de investigación del departamento de Parasitología de la UEX, y también gracias a su mediación nos fue posible establecer contacto con los productores de asticot en Zamora.

A Soledad Jiménez Timón, Manuela Alvarado Arenas, Ana Rodríguez Trabado y Víctor Medina Velasco, colegas de la sección de Alergología del CHC, por soportar mi exclusividad para con este estudio, que en ocasiones ha sido realizado conjuntamente con mi actividad asistencial.

Al Dr. Rafael Cobo López, pionero de la Alergología en Cáceres y primer jefe de sección de Alergología del CHC, que lamentablemente ya no se encuentra entre nosotros. Fue la persona que me dio la oportunidad para mi desarrollo profesional en tierras extremeñas, que confió en mí y me estimuló en todos mis proyectos de investigación. El ha sido una inspiración constante, y desde estas líneas deseo expresarle todo mi agradecimiento, mi admiración y respeto, y mi cariño.

A la Sociedad de Pescadores de Cáceres, por su amabilidad y colaboración en el envío de información del estudio a los socios, y por facilitar el acceso a los teléfonos de contacto de los mismos.

Deseo expresar en último lugar el agradecimiento a mis directoras de tesis, la Dra. Belén de la Hoz Caballer y M<sup>a</sup> Carmen Diéguez Pastor. Y lo hago en

---

---

último lugar porque han sido, sin ninguna duda, las responsables de la versión final de esta tesis. Sin su ayuda inestimable, en la difícil tarea de plasmar por escrito el trabajo realizado, y sin su ayuda en la redacción y organización, hubiera sido imposible proceder a la presentación de este estudio. He de agradecer su disponibilidad, las facilidades que me han dado para superar todos los inconvenientes, y la posibilidad de aprender de estos dos excelentes profesionales.

---



**Abreviaturas**

A:	asma.	ELISA:	<i>Enzyme Linked</i>
Aa:	aminoácidos.		<i>Immunosorbent Assay.</i>
µg:	microgramo.	Fig.	figura.
µl:	microlitro.	g:	gramo.
µm:	micrómetro.	h:	hora.
Abs:	absorbancia.	H <sub>2</sub> O:	agua.
Ac:	anticuerpo.	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	agua oxigenada.
Ag:	antígeno.	HCl:	ácido clorhídrico.
BSA:	Seroalbúmina bovina.	HEP:	unidad histamino equivalente por prick.
C:	Conjuntivitis.	HRP:	Peroxidasa de rábano picante.
CAPS:	ácido 3-[ciclohexilamino] -1-Propansulfónico.	Hz:	herzio.
cm:	centímetro.	IC:	índice de reactividad cutánea.
cm <sup>2</sup> :	centímetro cuadrado.	Ig:	inmunoglobulina.
cm <sup>3</sup> /s:	centímetro cúbico / segundo	IgE:	inmunoglobulina E.
Pa/cm <sup>3</sup> /s:	Pascales/centímetro cúbico/segundo.	IgG:	inmunoglobulina G.
PM:	Peso molecular.	KDa:	kilodaltons.
Prick test:	Pruebas Intraepidérmicas.	Kg:	kilogramo.
Cols:	colaboradores.	KU:	kilo unidades.
Da:	daltons.	L:	litro.
DNA:	ácido desoxido ribonucleico.	L 1:	Larva de estadio 1.

---

L 3:	Larva de estadio 3.	PEF:	Pico espiratorio flujo.
Log:	logaritmo	PM:	peso molecular.
M:	molaridad.	PNU:	unidad de nitrógeno proteico.
mA:	miliamperio.	PVDF:	Difluoruro de polivinilideno.
mg:	miligramo.	R:	rinitis.
min.:	minuto.	RAST:	Enzimoinmunoensayo con fase sólida en discos de celulosa ( <i>Radio Allergo Sorbent Test</i> ).
ml:	mililitro.	RC:	rinoconjuntivitis.
mM:	mili molar.	r.p.m.:	revoluciones por minuto.
mm:	milímetro.	SDS:	Dodecil sulfato sódico.
N:	normalidad.	SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico.
NaCl:	cloruro sódico.	TBS:	tampón tris salino.
ng:	nanogramo.	TEMED:	N, N, N', N'-tetrametil-etilendiamina.
nm:	nanómetro.	TLH:	Test de liberación de histamina.
° C:	grados centígrados.	TMB:	3,3',5,5' Tetramethylbenzidine liquid substrate system.
OD:	densidad óptica.	TPC:	prueba de provocación conjuntival.
p/v:	peso / volumen.	TPN:	prueba de provocación nasal.
Pa:	pascal.		
PBS:	tampón fosfato salino.		
PBS-T:	Solución tampón fosfato con Tween 20 al 0,05% (v/v).		
PBS-T-BSA:	Solución tampón fosfato con Tween 20 al 0,05% y BSA al 1%.		

---

Tris: Tris hidroximetil-  
Aminometano.

v/v: volumen/volumen.

V: voltios.

Tween-20: polioxietileno-sorbitan  
Monolaurato.

W: watios.

WB: western blot.

UC: urticaria de contacto.

X g: Fuerza centrífuga relativa;

UI: unidad internacional.

Número de veces la aceleración de  
la gravedad.

UV: ultravioleta.

---

**BACKGROUND**

Asticot maggot is the most important live fish bait used for angling in our country. Asticot, is a name native from France of the blowfly larvae (*Calliphoridae* family). These maggots are almost identical, and it is so difficult to distinguish that the name asticot is used without worrying about the exact species concerned. *Calliphora* and *Lucilia* species are implicated in the majority of respiratory allergy cases among amateur fishermen or occupationally exposed workers. In 1982, Stockley et al reported the first case of hypersensitivity to fly larvae belonging to *Calliphoridae* family in an angler with contact urticaria and late asthmatic responses associated with handling this maggot.

**OBJECTIVES**

Our objective was to study the fishing customs, prevalence and associated factors of asticot allergy, in population of amateur fishermen.

**MATERIALS AND METHODS**

72 randomized selected patients (belonging to Angler's Society of Cáceres) completed a specific questionnaire based in ECRHS and ISAAC questionnaires with some modifications, including questions about history of atopy, fishing habits and the presence of skin, upper and/or lower airway symptoms related with live fish bait handling.

In the same day, blood samples were taken and processed to get serum and then stored at -20°C. After blood test, skin prick test (SPT) with aqueous extracts of asticot and common earthworm were performed in all patients.

Specific IgE levels, as determined by ELISA method, were measured at the end of patient's recruitment.

---

Aqueous extracts of imported larvae samples (appâts Bonnet S.A. France); *Protophormia terraenovae*, *Calliphora vomitoria* and *Lucilia sericata* larvae, and *Lumbricus terrestris*, were used for ELISA and in vitro characterization of allergens.

The main allergens in these species were identified by means of SDS-PAGE immunoblot studies, using sera of live fish bait allergic patients (patients with symptoms related to fish bait handling together with positive skin prick test and/or specific IgE to one or more of the species tested).

ELISA and blot inhibition studies were performed in order to identify possible cross-reactive allergens.

Local asticot samples were obtained for taxonomic identification.

Data were analysed using the Statistical Package for the Social Sciences (SSPS, version 12.0)

## **RESULTS**

Analysis of the 3th stage larvae and adult flies of local asticot samples, identified *P. terraenovae* as the main isolated specie.

SPT to asticot extract was positive in 8 patients (11.1%), and 4 patients had positive SPT to common earthworm (5.5%). Negative responses were observed in controls.

Specific IgE were tested in 68 patients. Sensitization to *P. Terraenovae* was found in 59% patients. Sensitization to *C. vomitoria*, *L. sericata* and *L. terrestris* only appears in 3, 2 and 1 patients respectively. Specific IgE to *P. terraenovae* showed more intense responses.

5 patients (7%) reported allergic symptoms caused by asticot maggots. Rhinitis and conjunctivitis were the most frequent symptoms. Patients usually fish on weekends, during spring and summer.

---

There was an association between duration of exposure ( $p=0.0197$ ), and asticot sensitization. No associated factors for allergy to asticot could be observed.

IgE immunoblotting identified 3 main allergens in *P. terraenovae* (15.3, 22.8 y 69.3 kDa), 5 main allergens in *C. vomitoria* and *L. sericata* (14, 26-27, 39-40, 44-45 y 72 kDa) and one of 15.5 kDa in *L. terrestris*. One allergenic band with approximately 14-15 kDa, was recognized at least by 50% of patients, to the 3 species of *Calliphoridae* larvae and *L. terrestris*.

ELISA and blot inhibition studies demonstrated the presence of cross-reactivity, mainly between *P.terraenovae* and *L. terrestris*.

## **CONCLUSIONS**

- 1.** Asticot is the main allergenic source among our fishermen.
  - 2.** Commercially available asticot, in Cáceres, is composed by *P. terraenovae* larvae (*Diptera. Calliphoridae*).
  - 3.** *P. terraenovae* seems to be a more potent sensitizer than other *Calliphoridae* species and *L. terrestris*.
  - 4.** 7% of amateur fishermen develop allergic symptoms resulting from contact with asticot maggots.
  - 5.** The most common symptoms are rhinoconjunctivitis immediately in type
  - 6.** Duration of exposure (in years) is associated to asticot sensitization
  - 7.** There is allergenic cross-reactivity between *P. terraenovae* and *L. terrestris*.
  - 8.** Western blot assays show a dense IgE binding band of MW approximately 15-16 kDa, in extracts of *P. terraenovae* and *L. terrestris*. We think that these allergens could coincide with the range described for the hemoglobins.
-

---

## **ÍNDICE**

---

---

<b><u>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>21</b>
<b>1. PESCA DEPORTIVA DE AGUA DULCE</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1. Generalidades</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2. Tipos de cebo vivo</b> .....	<b>23</b>
<b>2. MOSCAS DE LA FAMILIA CALLIPHORIDAE</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1. Clasificación taxonómica</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2. Biología</b> .....	<b>28</b>
<b>2.3. Utilidades</b> .....	<b>30</b>
<b>2.4. Patología</b> .....	<b>30</b>
<b>3. LOMBRICES DE TIERRA</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1. Clasificación taxonómica</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2. Biología</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3. Utilidades</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4. Patología</b> .....	<b>35</b>
<b>4. CEBO VIVO: ASTICOT Y LOMBRIZ DE TIERRA</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1. Asticot. Cadena de producción</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2. Lombriz de tierra</b> .....	<b>40</b>
<b>5. REACCIONES ALERGICAS POR CEBO VIVO</b> .....	<b>41</b>
<b>5.1. Alergia a Califóridos</b> .....	<b>41</b>
<b>5.2. Alergia a lombrices de tierra</b> .....	<b>51</b>
<b>5.3. Dificultades diagnósticas de la patología alérgica por cebos</b> .....	<b>54</b>
<b>6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b> .....	<b>58</b>
<b><u>CAPÍTULO 2. OBJETIVOS</u></b> .....	<b>60</b>



---

<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
<b>1. OBTENCIÓN DE MATERIAL PARA PRUEBAS DIAGNÓSTICAS</b> .....	<b>63</b>
<b>1.1. Obtención de la materia prima</b> .....	<b>63</b>
<b>1.2. Identificación taxonómica del Asticot comercializado en tiendas de artículos de pesca de Cáceres</b> .....	<b>64</b>
1.2.1. Identificación larvaria .....	64
1.2.2. Cría y pupación de las larvas para la obtención de imagos .....	65
<b>1.3. Elaboración de extractos diagnósticos</b> .....	<b>68</b>
1.3.1. Homogeneización .....	68
1.3.2. Extracción .....	68
1.3.3. Purificación .....	68
1.3.4. Estabilización .....	68
1.3.5. Determinación de la concentración proteica .....	71
<b>2. ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLOGICO</b> .....	<b>70</b>
<b>2.1. Población de estudio</b> .....	<b>71</b>
<b>2.2. Protocolo de estudio</b> .....	<b>71</b>
<b>2.3. Cuestionario clínico</b> .....	<b>74</b>
<b>2.4. Pruebas cutáneas</b> .....	<b>74</b>
<b>2.5. Determinaciones de IgE específica (ELISA)</b> .....	<b>75</b>
<b>2.6. Provocaciones específicas en mucosas</b> .....	<b>78</b>
2.6.1. Prueba de provocaciones conjuntival .....	78
2.6.2. Prueba de provocación nasal .....	79
<b>2.7. Análisis estadístico</b> .....	<b>81</b>

<b>3. CARACTERIZACIÓN ALERGÉNICA .....</b>	<b>82</b>
<b>3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de docecilsulfatosódico (SDS PAGE) .....</b>	<b>82</b>
3.1.1. Fundamento teórico .....	82
3.1.2. Descripción .....	83
<b>3.2. Transferencia de bandas proteicas separadas por electroforesis a membranas de PVDF .....</b>	<b>84</b>
3.2.1. Fundamento teórico .....	84
3.2.2. Descripción .....	85
3.2.3. Método de transferencia semiseco .....	85
<b>3.3. Inmunodetección de proteínas transferidas .....</b>	<b>86</b>
<b>3.4. Procedimiento de evaluación de bandas en SDS PAGE e Inmunodetección .....</b>	<b>87</b>
<b>3.5. Estudios de reactividad cruzada .....</b>	<b>87</b>
3.5.1. ELISA-Inhición .....	88
3.5.2. SDS PAGE - Western Blot-Inhibición .....	88
 <b>4. ESTANDARIZACIÓN BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DIAGNÓSTICOS .....</b>	 <b>90</b>
 <b><u>CAPÍTULO 4. RESULTADOS</u> .....</b>	 <b>92</b>
<b>1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA .....</b>	<b>93</b>
<b>1.1. Asticot local .....</b>	<b>93</b>
<b>1.2. Especies importadas .....</b>	<b>93</b>
<b>1.3. Observaciones anatómicas en larvas 3 y adultos .....</b>	<b>94</b>
1.3.1. <i>Protophormia terraenovae</i> .....	94
1.3.2. <i>Calliphora vomitoria</i> .....	96
1.3.3. <i>Lucilia sericata</i> .....	98

<b>2. EXTRACTOS ALERGÉNICOS DE DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>100</b>
<b>3. ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO .....</b>	<b>101</b>
<b>3.1. Reclutamiento de la muestra .....</b>	<b>101</b>
<b>3.2. Clasificación de los pacientes .....</b>	<b>101</b>
<b>3.3. Características clínicas .....</b>	<b>102</b>
<b>3.4. Pruebas cutáneas .....</b>	<b>103</b>
<b>3.5. Mediciones de IgE específica .....</b>	<b>104</b>
<b>3.6. Análisis estadístico .....</b>	<b>105</b>
<b>4. ESTUDIO ALERGOLÓGICO. SERIE CLÍNICA .....</b>	<b>107</b>
<b>4.1. Pruebas cutáneas .....</b>	<b>107</b>
<b>4.2. Provocaciones específicas con alérgeno .....</b>	<b>107</b>
<b>4.3. Determinaciones de IgE específica .....</b>	<b>108</b>
<b>5. CARACTERIZACIÓN DE ALÉRGENOS .....</b>	<b>109</b>
<b>5.1. Análisis electroforético de extractos diagnósticos .....</b>	<b>109</b>
<b>5.2. Determinación de bandas de reconocimiento de IgE .....</b>	<b>111</b>
5.2.1. Selección de sueros .....	111
5.2.2. <i>Protophormia terraenovae</i> .....	111
5.2.3. <i>Calliphora vomitoria</i> .....	115
5.2.4. <i>Lucilia sericata</i> .....	119
5.2.5. <i>Lumbricus terrestris</i> .....	121
<b>5.3. Ensayos de reactividad cruzada .....</b>	<b>124</b>
5.3.1. Elisa inhibición .....	124
5.3.2. Inmunoblot inhibición .....	126
<b>6. ESTANDARIZACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS   DIAGNÓSTICOS .....</b>	<b>131</b>

<b><u>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN</u></b> .....	<b>133</b>
<b><u>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES</u></b> .....	<b>154</b>
<b><u>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA</u></b> .....	<b>157</b>
<b><u>CAPITULO 8. ANEXOS</u></b> .....	<b>167</b>
<b>8.1. Anexo 1:</b> Modelo de consentimiento informado .....	168
<b>8.2. Anexo 2:</b> Cuestionario clínico .....	171
<b>8.3. Anexo 3:</b> Informe del Comité Ético .....	174
<b>8.4. Anexo 4:</b> Tampones y soluciones. SDS-PAGE y western blot .....	176
<b>8.5. Anexo 5:</b> Datos clínicos y hábitos de pesca. Pacientes de la Sociedad de Pescadores de Cáceres.....	180
<b>8.6. Anexo 6:</b> Estudio alergológico <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Pacientes de la Sociedad de Pescadores de Cáceres.....	183
<b>8.7. Anexo 7:</b> Datos clínicos y hábitos de pesca. Pacientes de la serie clínica .....	186
<b>8.8. Anexo 8:</b> Estudio alergológico <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Pacientes de la serie clínica .....	188
<b>8.9. Anexo 9:</b> Valores de absorbancia en estudio de ELISA inhibición .....	190

---

## **INTRODUCCIÓN**

## **1. PESCA DEPORTIVA DE AGUA DULCE**

La pesca deportiva en agua dulce, sin fines lucrativos, es una de las principales aficiones de los extremeños. Según datos publicados por la Junta de Extremadura, en el período comprendido entre los años 1998 y 2001 se concedieron hasta 14.000 licencias de pesca mensuales <sup>1</sup>. Existen además 42 asociaciones o agrupaciones de pescadores registradas en la provincia de Badajoz y 12 en la provincia de Cáceres.

Esta importante actividad es debida a la gran masa de agua de esta comunidad, ya que Extremadura esta atravesada al norte (Cáceres) por la cuenca hidrográfica del Tajo y al Sur (Badajoz) por la del Guadiana, que constituyen las dos cuencas con mayor porcentaje de agua embalsada del País. La provincia de Cáceres dispone de 37.000 hectáreas de superficie cubierta por agua y de casi un centenar de presas.

### **1.1 Generalidades**

La pesca en lagos, embalses y grandes ríos, se realiza generalmente a nivel de la orilla o en pequeñas embarcaciones, mientras que para la pesca en ríos pequeños o en arroyos, los pescadores se introducen en el agua con ropa impermeable y botas especiales.

El material necesario para la pesca consiste en caña, carrete, sedal, anzuelo y cebos. Los cebos se dividen en cebos naturales y cebos artificiales:

Los cebos artificiales están hechos de madera, plástico, goma o metal, e imitan la comida habitual de los peces. La pesca con mosca es un tipo de pesca con cebo artificial, en la que la mosca está hecha con plumas o material sintético imitando al insecto del que se alimentan los peces.

Los cebos naturales, son los más utilizados por los pescadores extremeños <sup>1</sup>, y a su vez se dividen en los de origen vegetal y los de origen animal. Como cebo

vegetal puede usarse el cañamón, trigo, patata cocida, pan de molde y con mucha frecuencia el maíz dulce. Las masillas suelen hacerse con estas materias primas aunque también pueden llevar componentes de origen animal. Los cebos de origen animal suelen ser cebos vivos, y los más usados son la lombriz de tierra y el “gusano de la carne”, también llamado asticot (larvas de dípteros). Se ha demostrado que estos cebos provocan un elevado porcentaje de muertes de ejemplares de peces, motivo por lo cual se ha prohibido su uso en algunas comunidades autónomas.

### **1.2 Tipos de cebo vivo.**

Los pescadores de agua dulce, pueden utilizar multitud de cebos animales, cebos que suelen ser comida habitual de los peces. En Extremadura, los más utilizados son el asticot y la lombriz de tierra<sup>1</sup>. Al hablar de asticot, hacemos referencia a larvas de la “mosca de la carne”. Las “moscas de la carne”, o moscas que depositan sus huevos generalmente en carne o material orgánico en descomposición, engloban muchas especies de diferentes familias (*Calliphoridae*, *Sarcophagidae*, *Muscidae*), aunque generalmente, con fines a su comercialización como cebo vivo, se utilizan moscas de la familia *Calliphoridae*.

También se usan, aunque con mucha menos frecuencia, larvas de otros insectos, que se citan a continuación:

- Coleópteros: Larva del escarabajo molinero (*Tenebrio molitor*). Contamina la harina de los cereales.
- Lepidópteros: Polilla de la cera o de las abejas. Larva de *Galleria mellonella*. Son plagas de los panales de abejas, excavando túneles e incluso alimentándose de abejas pequeñas.

- Otros dípteros:
  - Larva de la mosca doméstica común. *Musca domestica*.
  - Larva de la mosca *Ophyra aenescens*. Mosca de la familia *Muscidae* (moscas domésticas).
  - Larva de la mosca *Sarcophaga carnaria*. De un tamaño mayor que las larvas de asticot, pertenecen a la familia *Sarcophagidae*.
  - Larva de mosquito rojo, Quironómidos. Se comercializan con el nombre de ver de vase o fouilli. Son conocidos comúnmente como “gusanos del cieno o del lodo” y tienen un color rojo intenso.
  
- Ortópteros: Saltamontes, grillos, langostas, etc.

El uso de pez vivo (tencas), es utilizado en la pesca de depredadores como el lucio o la perca americana.

Se usan también, aunque generalmente más en pesca de mar, algunos crustáceos como gamba, langostino, cangrejo y camarón.

A continuación, se describen las características principales de las familias con mayor interés para la pesca de agua dulce.



## **2. MOSCAS DE LA FAMILIA CALLIPHORIDAE.**

### **2.1. Encuadre taxonómico de las moscas del estudio.**

Según la clasificación de Sistema Naturae 2000 <sup>2</sup>, los géneros de las moscas de este estudios, se encuadran según la siguiente lista:

**Phylum Arthropoda Latreille, 1829**

**Clase Insecta Linnaeus, 1758**

**Orden Díptera**

Suborden Nematocera (=Mosquitos)

**Suborden Brachicera**

Infraorden Tabanomorpha (=Tábanos)

**Infraorden Muscomorpha (=Moscas)**

**Superfamilia Oestroidea**

**Familia Calliphoridae**

**Género: Calliphora, Lucilia, Protophormia**

### ***Phylum Arthropoda.***

Los artrópodos son animales provistos de patas divididas en segmentos articulados, particularidad a la que hace referencia la etimología del nombre (*arthron*, articulación; *podos*, pie). Su cuerpo está constituido por una serie lineal de anillos, segmentos o metámeros diferentemente modificados para realizar funciones especializadas. Su cubierta corporal más externa, la cutícula, es una estructura acelular conocida como exoesqueleto, por dar rigidez al cuerpo y servir de punto de inserción a los haces musculares. Es también una barrera protectora.

Los artrópodos son unisexuales y la reproducción sexual es la norma. Durante su desarrollo juvenil cambian varias veces de cutícula (ecdisis), que sustituyen

por una nueva, más grande, a fin de posibilitar el desarrollo corporal; durante la misma etapa experimentan también procesos de metamorfosis, o lo que es lo mismo, cambios bruscos de forma o de paso rápido hacia la fase adulta.

Todos los artrópodos poseen unos sistemas de órganos (nervioso, digestivo, excretor, circulatorio, respiratorio, muscular, inmunitario, etc.) construidos, al menos algunos de ellos, según un plan distinto del común en vertebrados. Los artrópodos de interés médico y veterinario se dividen principalmente en 2 grandes grupos: los arácnidos y los insectos.

### ***Clase Insecta.***

La clase *Insecta* se calcula que reúne a unas 800.000 especies, muchas de ellas vectores de enfermedad. El cuerpo está dividido en cabeza, tórax y abdomen. La cabeza tiene un par de antenas dorsales y segmentadas, ojos compuestos y tres pares de apéndices bucales: mandíbulas, maxilas-1 y maxilas-2 (labio). El tórax está constituido por tres segmentos (pro, meso y metatórax), cada uno de ellos con un par de patas. El abdomen está desprovisto de apéndices (salvo los copulatorios). Esta clase incluye varios órdenes, entre los que se incluyen el orden *Díptera*.

### ***Orden Díptera.***

Insectos con un solo par de alas; las del segundo par (metatorácicas) se hallan transformadas en unos pequeños órganos en forma de maza, conocidos con el nombre de salterios o balancines. Los aparatos bucales son de tipos diversos, en función del tipo de alimentación. El desarrollo es de tipo holometábolo (metamorfosis completa). Hay muchas familias de interés; en unas las formas parásitas son los adultos y en otras las larvas (el parasitismo por estas segundas se conoce con el nombre de miasis).

**Infraorden *Muscomorpha*.**

Hace referencia a las moscas clásicas. Tienen antenas de 3 segmentos y las larvas son ápodas y acéfalas (cabeza indiferenciada del resto del cuerpo). Dentro del Infraorden *Muscomorpha*, la subdivisión *Schizophora* se caracteriza por presentar una sutura en U alrededor de la base de las antenas, y dentro de ella, la sección *Calyptrata*, por presentar una sutura longitudinal en el segundo segmento de las antenas.

**Familia *Calliphoridae*.**

Se engloba dentro de la superfamilia *Oestroidea*, que comprende las familias *Calliphoridae*, *Sarcophagidae*, *Taquinidae*, *Mystacinobiidae*, *Rhinophoridae* y *Oestridae*. Los Califóridos son moscas caliptradas, de tamaño medio a grande (4 a 16 mm), típicamente bastante compactas, con un abdomen redondeado u oval y frecuentemente de color verde o azul metálicos.

***Protophormia terraenovae*.**

Es la especie de mosca, perteneciente a la familia *Calliphoridae*, que adquiere una mayor importancia a lo largo del desarrollo de todo este estudio.

La *P. terraenovae*, junto a *Phormia regina*, el género *Protocalliphora* y otros pocos géneros, forman la tribu *Phorminii*. Esta mosca es muy común en las partes más frías de la región holártica <sup>3</sup>, donde reemplaza a las especies de *Chrysomya* de las regiones subtropicales y tropicales. Así, esta especie es una de las más identificadas en carroña de animales en estudios de Centroeuropa <sup>4</sup> y de Norte América <sup>5,6</sup>. Sin embargo, autores argentinos han descrito, cómo especies de *Protophormia* han sido importadas desde regiones holárticas a través de las rutas marítimas, y cómo se distribuyen fundamentalmente en la zona más austral de la tierra de fuego (región antártica) <sup>7</sup>. España forma parte de la región holártica, pero sólo se ha demostrado la existencia de unos pocos

ejemplares silvestres de *P. terraenovae* en el pirineo aragonés <sup>53</sup>. Tampoco la *P. terraenovae* figura en la relación de especies citadas como causantes de miasis en animales o en humanos en España, en los últimos 100 años <sup>8</sup>.

Es una mosca saprófaga y suele aparecer en la primavera temprana. Prefiere relativamente bajas temperaturas para su cría y es capaz de sobrevivir en condiciones climáticas extremas <sup>9</sup>, lo cual explicaría su abundancia especialmente en las regiones frías, y su presencia en las zonas de mayor altitud en las regiones templadas.

## **2.2. Biología.**

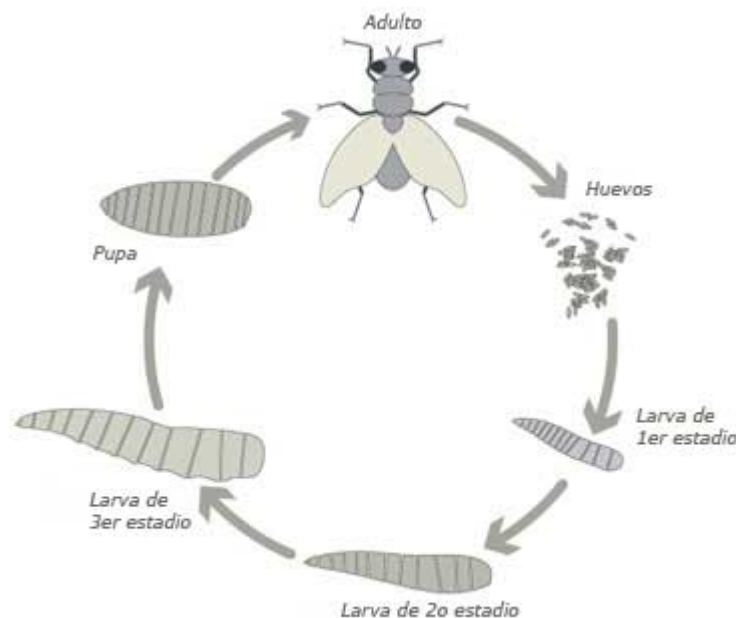
Existen más de 1000 especies de Califóridos a nivel mundial, agrupadas en 150 géneros y 8 subfamilias <sup>10</sup>, no llegando en España a las 50 especies conocidas <sup>11</sup>. En la literatura anglosajona, se denominan comúnmente “*blow-flies*”, nombre que deriva de una antigua expresión inglesa que hacía referencia al aspecto que tenía la carne cuando habían sobrevolado moscas sobre ella, dejando huevos. Las hembras depositan sus huevos, en gran cantidad, en carroña fresca solo algunos minutos después de la muerte. Los Califóridos están casi en cualquier parte y frecuentemente visitan basura, frutas en fermentación, flores, excrementos y carroña.

### **Ciclo biológico.**

La hembra necesita ingesta de proteínas para que su ovario adquiera su configuración definitiva. Este es el proceso de maduración ovárica o vitelogénesis, período durante cual se acumulan proteínas, lípidos, glucógeno y otros polisacáridos, como materiales de reserva.

Tras la cópula y fecundación, comienza la embriogénesis. Los huevos tienen un tamaño aproximado de 1.5 mm x 0.4 mm, son amarillentos o blancos, con un aspecto como de granos de arroz. Cada hembra suele poner entre 150-200

huevos, y hasta 2000 huevos durante toda su vida. Desde el huevo hasta la primera fase larvaria suelen pasar entre 8 y 24 horas. A partir de aquí, comienza la fase larvaria o desarrollo postembrionario, regulado por dos familias de hormonas; la ecdisona (activa el proceso de muda) y sus derivados, las hormonas juveniles (inhiben el desarrollo impidiendo la muda). El desarrollo postembrionario tiene tres estadios, hasta llegar a larva 3 “postalimentaria”. Las larvas suelen vivir entre 3 y 19 días, dependiendo de la cantidad de materia orgánica disponible, temperatura y competencia con otras larvas. Tras la fase larvaria, estas caen al suelo y forman una pupa o crisálida completando su metamorfosis en unos 3-7 días. Tras ello, se produce la emergencia de las moscas adultas que tardan unas 24-36 horas en tener una cutícula completamente esclerotizada. El imago o adulto, suele tener una vida media de 1 mes. En la figura 1 se esquematiza el ciclo biológico de una mosca de la familia *Calliphoridae*.



**Fig. 1. Ciclo biológico. *Calliphoridae* (tomado de [www.flycontrol.novartis.com](http://www.flycontrol.novartis.com))**

El estado pupal puede pasar por una fase de desarrollo detenido, más o menos prolongado (diapausa pupal), regulado por las hormonas juveniles. Los inductores son los cambios ambientales.

### **2.3. Utilidades.**

El desarrollo de todo el proceso de maduración de estas moscas, es altamente dependiente de las condiciones atmosféricas. Si la temperatura de un entorno es conocida, expertos entomólogos son capaces de predecir la fase de desarrollo en que se encuentran los individuos alojados en un cadáver en descomposición. Pueden indicar, por ejemplo, el intervalo post-mortem y otras circunstancias de interés para las investigaciones sobre un crimen, y por ello, estas especies son consideradas de un gran valor en medicina forense.

Existen varios trabajos que hacen referencia a la terapia con gusanos (larvas de Califóridos) en úlceras de decúbito, y otras heridas profundas, incluso en osteomielitis <sup>12,13</sup>. La introducción de estas larvas vivas en heridas no cicatrizadas, permite una limpieza a fondo de los tejidos necróticos de la misma y promueve su curación.

### **2.4. Patología en humanos y animales.**

Como se comentará en la revisión bibliográfica, expuesta a continuación, las larvas de Califóridos son capaces de producir enfermedades alérgicas en aficionados a la pesca.

Algunas pocas Califóridos son plagas importantes y merecen atención especial<sup>14</sup>.

Las larvas de la familia *Calliphoridae* pueden ser causantes de miasis en ganado e incluso en humanos, en determinadas circunstancias <sup>15,16</sup>. Generalmente producen miasis cutánea y raramente miasis en orificios naturales (fosas nasales, oídos, boca) aprovechando discontinuidades

traumáticas de la piel. Son por lo tanto miasis secundarias, accidentales, producidas por dípteros oportunistas, que no son capaces de penetrar a través de piel intacta (salvo los géneros *Chrysomya* y *Cochliomyia*). Necesitan incluso, un cierto grado de descomposición bacteriana. Los géneros descritos como causantes de miasis cutánea son *Calliphora spp*, *Lucilia spp*, *Phormia spp*, *Chrysomya spp*, y *Cochliomyia spp*.

Las larvas de *Cochliomyia hominivorax*, o gusano barrenador del nuevo mundo, han sido causa de epidemias importantes en toda América <sup>17</sup>. La *Chrysomya bezziana*, gusano barrenador del viejo mundo y pertenece a la misma subfamilia que la *C. hominivorax*, causa plagas similares a la cochliomiasis, en Asia<sup>18</sup>. *Lucilia cuprina*, es la especie de mosca que causa mayor número de miasis en las ovejas australianas, produciendo pérdidas de millones de dólares anuales <sup>19</sup>.

Las consecuencias de las miasis en el ganado, suelen ser una disminución de la producción láctea, e incluso pérdidas de cabezas de ganado por complicaciones, debido a la sobreinfección bacteriana.

En humanos, hay descritas miasis por larvas de Califóridos, generalmente en el contexto de plagas a nivel veterinario, afectando tanto a la piel como a todo tipo de cavidades naturales (oftalmológicas, auriculares, nasofaríngeas, uterinas, vaginales, entérica, urogenital...) y pueden incluso llegar a producir la muerte por invasión de la masa encefálica desde miasis óticas y nasales <sup>16</sup>. La *Lucilia sericata*, por ejemplo, es una causa frecuente de miasis cutáneas en heridas preexistentes de población marginal de Estados Unidos <sup>20</sup>.

### **3. LOMBRIZ DE TIERRA.**

#### **3.1. Clasificación taxonómica.**

Según el sistema de clasificación taxonómica Naturae 2000 <sup>2</sup>, la familia *Lumbricidae* forma el conjunto de las lombrices de tierra.

Phylum ***Annelida*** Lamarck, 1809

Superclase ***Clitellata***

Clase ***Oligochaeta***

Orden ***Opisthopora***

Suborden ***Lumbricina***

Superfamilia ***Lumbricoidea***

Familia ***Lumbricidae*** Rafinesque-Schmaltz, 1815 – lombrices de tierra

Subfamilia ***Lumbricinae***

Género ***Lumbricus*** Linnaeus, 1758

***Lumbricus castaneus***

***Lumbricus rubellus*** Hoffmeister

***Lumbricus terrestris***

Las lombrices de tierra, pertenecen al *Phyllum* de los Anélidos (Latín *anulus=annulus*: anillo), animales con cuerpo constituido por una serie de anillos o metámeros, en los que se repiten las mismas estructuras. La segmentación es externa e interna por medio de tabiques.

Los anélidos engloban cerca de 15.000 especies, que se clasifican en tres clases principales en función de la presencia o ausencia de sedas o quetos (pelos), que recorren todo el cuerpo del individuo en la parte ventral y lateral, y que sirven como zonas de agarre durante el desplazamiento. Así, tenemos la clase de los Poliquetos (numerosas sedas), que engloban la mayor parte de los gusanos marinos, los Oligoquetos (escasos pelos) que incluye la familia



*Lumbricidae*, y la clase de los Hirudineos, Aquetos (sin pelos) comúnmente denominadas sanguijuelas.

Dentro de la familia *Lumbricidae*, existen varios géneros de lombrices de tierra. *Lumbricus terrestris* es la lombriz común de la tierra, de distribución mundial, y es una especie enmarcada dentro del Genus *Lumbricus*. *Eisenia foetida* es una especie de lombriz de tierra, englobada dentro del género *Eisenia*, con una gran importancia económica por su comercialización para técnicas de lumbricultura.

### **3.2 Biología.**

La lombriz de tierra, vive en la tierra húmeda, en la que excava galerías, habitualmente en forma de “U”. El movimiento lo realiza mediante la contracción de las fibras musculares situadas bajo la piel, usando las sedas como punto de anclaje. Se abre paso tragando la tierra, aprovechando las sustancias orgánicas que contiene, a su paso por el tubo digestivo, y expulsando detritus en la superficie en forma de pequeños montículos, o en el interior de los propios túneles. Suelen vivir en las capas superiores de la tierra, enterrándose más para evitar temperaturas extremas. Las lombrices de tierra rehuyen la luz del día, y sólo salen a la superficie en condiciones excepcionales, pero durante la noche, salen con frecuencia para alimentarse de residuos vegetales.

La respiración, se realiza a través de la piel, favorecida por la hemoglobina (disuelta en la sangre) y una red de capilares, que se distribuyen hasta la epidermis. La circulación se produce gracias a las contracciones musculares de la lombriz, que movilizan la sangre de los grandes vasos (ventral y dorsal) hacia todo el organismo.

El sistema nervioso es ganglionar. Posee un par de ganglios suprafaríngeos, (cerebro), de los que parte un cordón ventral, con ganglios en cada segmento.

**Ciclo biológico (Fig. 2).**

La lombriz es hermafrodita, ya que posee órganos de los dos sexos, pero no existe autofecundación. Para el apareamiento, ponen sus cuerpos juntos con sus cabezas en direcciones opuestas y cada lombriz coloca los espermatozoides (que salen de sus vesículas seminales) en las espermatecas de la compañera. Una vez terminado el intercambio, se separan. En el clitelo, se segrega una sustancia viscosa que forma un capullo (ooteca), en donde se depositan los óvulos. Dentro de la galería, la lombriz se mueve hacia atrás, haciendo que el capullo se deslice hacia delante arrastrando en el camino los espermatozoides recibidos. Cada capullo contiene entre tres y veinte huevos fecundados. Tras un periodo de incubación, que dura entre 25 y 30 días, según la temperatura del medio, surgirán unas lombrices de pequeño tamaño, que tardarán entre 60 y 90 días en lograr su maduración completa.

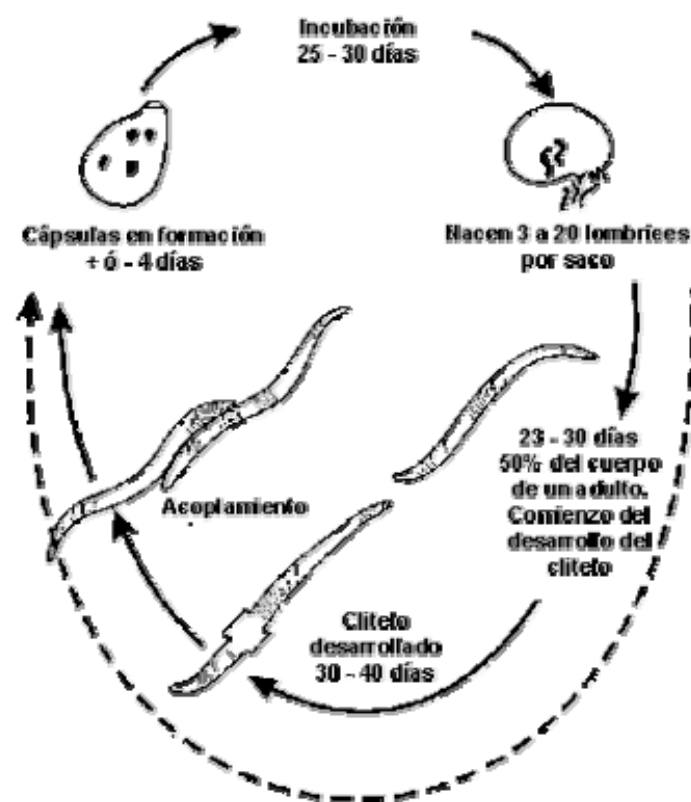


Figura 2. Ciclo biológico de la lombriz de tierra. Tomado de [www.donmanuel.s5.com/cria2.htm](http://www.donmanuel.s5.com/cria2.htm).

### **3.3 Utilidades.**

La lombricultura, es una biotecnología que utiliza a una especie domesticada de lombriz, generalmente *Eisenia foetida*, para reciclar materia orgánica y obtener humus. El lombricomposto, o humus de lombriz, es un abono orgánico y natural, biorregulador y corrector del suelo, cuya característica fundamental es la bioestabilidad, pues no da lugar a fermentación o putrefacción. El humus de lombriz posee una elevada carga microbiana, contribuyendo a la protección de la raíz de bacterias y nematodos sobre todo, para el cual está especialmente indicado. Es un fertilizante de primer orden; protege al suelo de la erosión, mejorando las características físico-químicas del suelo, aumentando la retención hídrica, regulando el incremento y la actividad de los nitritos del suelo, y la capacidad de almacenar y liberar los nutrientes requeridos por las plantas de forma equilibrada (nitrógeno, fósforo, potasio, azufre y boro).

La carne de lombriz puede ser utilizada en la alimentación animal, de forma cruda o a través de la elaboración de harina de lombriz para ser mezclada con otros productos, pero también, desde la antigüedad ha sido utilizada por algunas culturas para consumo humano, y actualmente, Filipinas es uno de los mayores productores de harina de lombriz para consumo humano. Es una harina, que por sus propiedades (ausencia de olor y sabor) podría competir con otras harinas como las de pescado.

### **3.4 Patología.**

No producen patología en humanos ni en animales, no son transmisores de enfermedades. No obstante, se han descrito reacciones alérgicas en pescadores, por el uso de lombrices como cebo vivo, que comentaremos a continuación.

#### **4. CEBO VIVO: ASTICOT Y LOMBRIZ DE TIERRA.**

##### **4.1. Asticot.**

Asticot es un nombre originario de Francia, utilizado en la comercialización de larvas de mosca como cebo vivo para la pesca. Las empresas que crían estas larvas para su uso como cebo de pesca, suelen utilizar moscas de la familia *Calliphoridae*, denominadas “*blow-flies*” en la literatura anglosajona. En muchas ocasiones, como es el caso de Extremadura, y probablemente de muchas más comunidades autónomas del territorio nacional, el asticot, que se puede comprar en cualquier tienda de artículos de pesca, no viene identificado taxonómicamente.

En publicaciones especializadas de pesca y en la literatura científica, el nombre de “*greenbottle*” (moscardas verdes) suele asociarse a las especies de *Lucilia sericata*, *Lucilia caesar* o *Lucilia cuprina*, y el nombre de “*bluebottle*” (moscardas azules), a las especies de *Calliphora vomitoria* y *Calliphora erythrocephala* (actualmente *Calliphora vicina*).

El asticot, ha desplazado a cebos más clásicos como la lombriz de tierra; es uno de los más utilizados en la actualidad en la pesca amateur y el más utilizado en pesca de competición en agua dulce, con una gran avidez para todo tipo de pescado. El uso de asticot, sin embargo, ha sido prohibido en algunas comunidades autónomas, por la elevada tasa de mortalidad, de ejemplares inmaduros de peces, que produce. La muerte del individuo, se produce generalmente por los daños que se producen tras la extracción del anzuelo, ya que el pez debe tragarse todo el anzuelo para que la picada tenga éxito<sup>1</sup>.

Se puede adquirir en grandes cantidades en tiendas de pesca, en cualquier época del año, y su conservación es muy sencilla con un poco de serrín y en frigorífico, durante varios días, ya que con las bajas temperaturas se ralentiza

el metabolismo de las larvas, retrasando la pupación. No obstante, la pupa (“Caster” en argot de pesca), también puede ser utilizada como cebo y también se comercializa, aunque su uso en España es limitado.

El asticot, se pincha en el anzuelo de manera superficial, sin atravesarlo completamente, por la parte más gruesa. Los pescadores suelen cebar el agua cogiendo varios puñados de larvas de asticot, y arrojándolos al agua antes de comenzar con una jornada de pesca, lo cual atrae a los peces al lugar. En ocasiones, se utilizan colas especiales para formar “bolas” con numerosos individuos y poder lanzarlas a larga distancia.

### **Cadena de producción.**

En líneas generales, el sistema de producción comienza con las moscas adultas, las cuales se mantienen en unas cajas cerradas, ventiladas, con temperatura y humedad controladas, así como alimentadas con glucosa, con el fin de que estos imagos puedan crecer y madurar. En unos días se les añade hígados de pollo en gran cantidad, con el fin de que las hembras tengan la cantidad de proteína necesaria para realizar la puesta de huevos, que se realizará directamente sobre esos hígados (Fig. 3).

De los huevos saldrá una larva en estadio 1, de pequeño tamaño, que se irá alimentando progresivamente de los hígados hasta llegar aproximadamente a fase de larva 2. En ese momento, se traslada todo (larvas y resto de hígados) a unas salas, con parcelaciones dispuestas a ras de suelo, donde las larvas se seguirán alimentando, hasta alcanzar el tamaño idóneo para su comercialización (Fig. 4 y 5).

La alimentación complementaria está basada en despojos de pescado y carne obtenidos de los de mercados y mataderos de la zona. Una vez que las larvas alcanzan su tamaño adecuado, se mezclan con serrín, con el fin de absorber al máximo la humedad y de que puedan separarse unas de otras.



**Figura 3. Puesta de huevos de Califóridos en hígados de pollo.**

A continuación, se transfieren a unos rodillos que actúan a modo de hormigoneras, con un sistema de filtros, tal y como se muestra en las imágenes (Fig. 6 y 7), de tal forma que puedan separarse los restos de serrín y otros materiales no deseables, de las larvas que van a ser comercializadas.



**Fig. 4. Zona de desarrollo larvario.**



**Fig.5. Detalle, larvas en estadio 3.**



**Fig. 6. Rodillo con sistema de filtros gruesos para el cribado de larvas de Asticot.**



**Fig. 7. Rodillo con filtro fino.**

## **4.2 Lombriz de tierra.**

Hasta la aparición del asticot, la lombriz de tierra era el cebo vivo más utilizado para la pesca de agua dulce, e incluso de agua salada, por su capacidad para atraer a multitud de especies. Generalmente, los pescadores las obtienen de las tierras húmedas, cerca de ríos o lagunas, idealmente tras tormentas o crecidas del río. Se conservan fácilmente a temperatura entre 8-10°C, en tierra humedecida y estercolada hasta su uso. Para su colocación en el anzuelo, suele ser atravesada por 3 ó 4 sitios.

Existen muchas especies de lombrices de tierra, lo cual hace difícil conocer cual está usando un pescador que las ha recolectado de su entorno, pero la más común es *Lumbricus terrestris*, conocida vulgarmente como lombriz de tierra común. La lombriz roja californiana es la especie comercializada con más frecuencia, de fácil cultivo, usada en técnicas de lombricultura. Su nombre científico es *Eisenia foetida* y puede encontrarse en tiendas especializadas.



## **5. REACCIONES ALÉRGICAS POR CEBO VIVO.**

La patología alérgica en relación con la exposición a cebos de pesca vivo es una entidad relativamente reciente. En lo que respecta a los cebos más utilizados para la pesca de agua dulce en Extremadura, Sastre y cols. en 1963, describieron el primer caso sensibilización a lombrices de tierra <sup>21</sup>, aunque posteriormente no se han publicado nuevos casos hasta 1989, por el grupo de Valero <sup>22</sup>. En el caso de las larvas de Califóridos, desde el primer caso descrito en 1980 por Zuchi <sup>24</sup>, se han ido publicando diversos estudios, de manera esporádica, que han puesto de manifiesto el perfil de presentación de esta enfermedad alérgica, con afectación fundamentalmente respiratoria.

En la revisión de Valero y Pérez-Santos (2004) <sup>23</sup> sobre los cebos descritos como causa de alergia, las larvas de dípteros, y en especial las de la familia *Calliphoridae*, son las citadas con más frecuencia. Aparte de otros dípteros, como *Musca domestica* y *Sarcophaga carnaria*, se recogían un total de 19 especies implicadas en reacciones alérgicas en pescadores, incluyendo larvas de polillas (*G. mellonella*), larvas de escarabajos (*T. mollitor*), lombrices de tierra, y otros gusanos *Poliquetos* marinos, usados generalmente para pesca de mar.

### **5.1 Alergia a Califóridos.**

Las primeras comunicaciones sobre reacciones alérgicas por moscas de la familia *Calliphoridae*, hacían referencia a pacientes aficionados a la pesca, que presentaban síntomas respiratorios en relación con la manipulación de las larvas de estas moscas, utilizadas como cebos vivos para la pesca en agua dulce.

En 1980 Zuchi y cols., describieron 2 casos en pescadores aficionados, con clínica de rinoconjuntivitis, asma y urticaria de contacto de manera inmediata al manejo de larvas de la mosca de la carne, sin identificación taxonómica <sup>24</sup>.

El estudio inmunológico, mediante pruebas cutáneas y técnicas de RAST, permitió confirmar una respuesta de hipersensibilidad tipo I frente a dichas larvas. Los autores, asumieron que podía tratarse de *Calliphora erythrocephala* (actualmente *C. vicina*) por la coloración azul del tórax.

Stockley y cols., en 1982 pusieron en entredicho el mecanismo responsable de estas reacciones alérgicas por larvas de Califóridos, al describir un paciente aficionado a la pesca con larvas del género *Calliphora*, que presentaba reacciones asmáticas tardías confirmadas mediante registro de PEF. Las pruebas cutáneas (*prick test*), con intensa respuesta tardía, y la evidencia de Ac IgG<sub>1</sub> específicos contra dichas larvas, mediante técnicas de hemaglutinación, hizo sospechar de la existencia de un mecanismo mixto de hipersensibilidad tipo I por IgE, y tipo III, por inmunocomplejos <sup>25</sup>. Además, el paciente desarrolló, en sucesivas temporadas de pesca, síntomas sugerentes de enfermedad por inmunocomplejos, con fiebre, artralgias y hematuria entre 48-72 horas tras una jornada de pesca. No obstante, en los casos descritos posteriormente, ningún autor ha observado dicha evolución clínica, aunque sí la presencia de síntomas de asma tardía. Tampoco se ha confirmado un mecanismo de hipersensibilidad de tipo III en otros trabajos.

Son grupos de investigadores italianos, los que han descrito con más frecuencia reacciones alérgicas, por el uso de estas larvas, en pescadores. Sgambato y cols.<sup>26</sup> (1987) reprodujeron una respuesta asmática inmediata tras una provocación bronquial específica, mediante exposición a larvas de la mosca de la carne. Sestini (1987), hizo una referencia especial a la presentación clínica en forma de reacciones asmáticas tardías <sup>27</sup>. La confirmación diagnóstica, en los 2 pacientes descritos por este autor, se realizó mediante pruebas cutáneas, RAST y provocaciones bronquiales con larvas, mediante la técnica del bandejeo, que consistió en hacer que el

pacienta agitara 200 g de larvas vivas, desde una bandeja hasta otra, en una pequeña sala de provocación, durante un tiempo de 10 minutos, con controles espirométricos y de PEF tras la exposición. La especie implicada fue *C. erythrocephala*.

Fue el grupo italiano de Siracusa, en 1989, el que describió a la *Lucilia caesar* (otra especie de la familia *Calliphoridae*), como causante de reacciones alérgicas en 5 pacientes <sup>28</sup>. El patrón clínico de respuestas alérgicas a estos cebos podía presentarse de manera inmediata o tardía, y aunque los pacientes manejaban otro tipo de cebos vivos, *L. caesar* fue la especie con mayor capacidad para inducir sensibilización. Esta sospecha, se confirmó en un estudio posterior del mismo grupo, realizado sobre 14 pacientes en donde predominaban los síntomas de rinoconjuntivitis y asma en relación con la manipulación de cebos vivos. Tras la realización de pruebas cutáneas e IgE específica frente a extractos acuosos de larvas de *L. caesar*, *G. mellonella*, y *T. mollitor*, se observó, cómo *L. caesar* fue la especie con mayor número de respuestas positivas en ambas pruebas, en más del 90% de ellos, y sin embargo, menos del 25% de los pacientes respondían a los otras dos especies <sup>29</sup>.

Siracusa, en otro trabajo reciente, para valorar su importancia como alérgenos ocupacionales, estudió a 50 pacientes que trabajaban en granjas de cría de estos cebos (5 granjas de *C. vomitoria* (“*Bluebottle*”), 2 de *G. mellonella* y 1 de *T. mollitor*), 18 pacientes de un centro de investigación entomológica expuestos a *T. mollitor* y *G. mellonella*, y 8 pacientes dependientes de tiendas locales de artículos de pesca expuestos a *L. caesar*. Se realizaron cuestionarios clínicos, que identificaron un 9.2% de pacientes (7) con síntomas en relación con su trabajo con las 3 especies (2 con *C. vomitoria*, 3 con *G. mellonella*, y 2 con *T. mollitor*). Mediante el *prick test* y las mediciones de IgE específica frente a *C.*

*vomitória*, *G. mellonella* y *T. mollitor*, se volvió a observar como la especie que obtenía un mayor número de pacientes sensibilizados, pertenecía a la familia *Calliphoridae*, en este caso *C. vomitória*, aunque existía un porcentaje elevado de sensibilizaciones también a *G. mellonella*. La especie con mayor número de respuestas positivas en el *prick test*, tanto en pacientes sintomáticos (71.4%) como asintomáticos (20.3%), fue *C. vomitória*. La sensibilización *in vitro* fue de casi un 43% frente a *C. vomitória* y *G. mellonella*, en pacientes sintomáticos. Según los autores, la presencia de sensibilización a estos cebos se asociaba estadísticamente con el desarrollo de enfermedad alérgica laboral, aunque existían pocos casos <sup>30</sup>.

Diversos autores españoles, entre los cuales se encuentra nuestro grupo, han comunicado casos clínicos de alergia respiratoria en pescadores en relación con el uso de larvas de Califóridos, en ocasiones sin una identificación taxonómica a nivel de especie, entre las que se encontraban *C. vomitória* (Escribano <sup>31</sup>), *asticot* (Alvarado <sup>32</sup>, González <sup>33</sup>, Porcel <sup>34</sup>), *C. erythrocephala* (Cabrera <sup>35</sup>), *Calliphora spp* (Rosado <sup>36</sup>) y *Protophormia terraenovae* (Cabañes <sup>37</sup>). Cabe destacar los estudios de Cabrera <sup>35</sup>, en los que se describió mediante técnicas de inhibición, reactividad cruzada entre varios dípteros (*C. erythrocephala*, *P. terraenovae*, *Ceratitis*, *Drosophila*) así como con *Ascaris spp* (Nematodo). También apuntar que el grupo de Cabañes <sup>37</sup>, ha sido el primero que ha descrito a la especie *P. terraenovae* como cebo vivo causante de alergia respiratoria.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes, descritas por todos los autores, consistían en síntomas de rinoconjuntivitis, asma de presentación inmediata, tardía o dual, y urticaria de contacto. No obstante, también se ha implicado a la *C. vomitória* en 2 casos de dermatitis de contacto proteica <sup>38,39</sup>, con el desarrollo de lesiones eccematosas en pulpejos de los dedos.

De lo expuesto hasta ahora, se refleja que las larvas de Califóridos utilizadas como cebos vivos de pesca, deben ser consideradas un alérgeno importante, a tener en cuenta en pacientes aficionados a la pesca, pero también en pacientes expuestos de manera ocupacional, a lo largo de la cadena de producción industrial de estos cebos. En las tablas 1A y 1B se puede observar la relación de los estudios publicados sobre reacciones alérgicas a Califóridos.

El grupo australiano de Kaufman y Baldo ha realizado varios estudios exhaustivos sobre alergia ocupacional por *Lucilia cuprina* (moscarda de la oveja).

El primer caso descrito de alergia a *L. cuprina* fue publicado por Kaufman en 1986 <sup>40</sup>, en un entomólogo que trabajaba con esta especie de Califórido, y que desarrolló síntomas progresivos de rinoconjuntivitis y asma. El estudio demostró sensibilización frente a los extractos de todas las fases del desarrollo de la mosca, y además también frente a *Chrysomya bezziana* (gusano barrenador del viejo mundo), también perteneciente a la familia *Calliphoridae*, pero en otra subfamilia (*Chrysomyinae*). Pese a haber trabajado con esta última especie, el paciente nunca desarrolló síntomas alérgicos, lo que sugería fenómenos de reactividad cruzada por alérgenos compartidos entre especies filogenéticamente cercanas. Es el mismo grupo, el que años más tarde realizó un estudio, para valorar la importancia de la *L. cuprina* en el desarrollo de alergia ocupacional, en trabajadores de un centro de investigación entomológica de Australia <sup>41</sup>. Los autores demostraron que 15 de los 54 pacientes entrevistados (28%) presentaban síntomas en relación con *L. cuprina*, y 9 pacientes (17%) con otros insectos. Los síntomas más frecuentes eran de rinoconjuntivitis, que solía preceder o coincidir con el desarrollo de asma bronquial. No se realizaron pruebas cutáneas con *L. cuprina*, pero

Reacciones alérgicas por larvas de Califóridos								
Autor	Año	nº pac	Tipo de exposición	Especie	Anamnesis	In vivo	In vitro	Alérgenos
L. Zuchi	1980	2	Pesca amateur	mosca de la carne	RC,A,U inmediatos	ID +	RAST IgE +	
R. Stockley	1982	1	Pesca amateur	<i>Calliphora</i>	U, A, Fiebre, artralgias	Prick+ PEF patrón asmático tardío	Hemaglut. + Ac IgG1	
G. Kaufman	1986	1	Ocupacional	<i>L. cuprina</i>	RC, A inmediatos	Prick + larva e imago de <i>L. cuprina</i> y <i>C. bezziana</i>	RAST IgE + a mosca y larva de <i>L. cuprina</i> y <i>C. bezziana</i>	
F. Sambato	1987	1	Pesca amateur	mosca de la carne	RC, A inmediatos	Prick + PIE: asma inmediata	RAST IgE + clase 4	
P. Sestini	1987	2	Pesca amateur	<i>C. erythrocephala</i>	Asma tardía	ID + PIE: asma tardía	RAST IgE (2) clase 4	
A. Siracusa	1989	5	Pesca amateur / ocupacional	<i>Lucilia caesar</i>	RC, A, U	Prick+ (3/4) PEF asma laboral	RAST IgE + (4/5)	
W. Ehl	1991	1	Pesca amateur	<i>C. erythrocephala</i>	R, A, U	Scratch test +	RAST IgE +	WB-IgE 30-94 kDa
A. Siracusa	1994	14	Pesca amateur / ocupacional	<i>L. caesar</i> <i>G. mellonella</i> <i>T. mollitor</i>	RC (14) A (13) U (3)	Prick + Lc (12), Gm (2) Ytm (3) PEF: A inmediata (2) A tardía (3)	RAST IgE + LC (12), + TM ó GM (6) RAST inh: no react cruzada	
N. Cabañes	1996	1	Ocupacional	<i>P. terraenovae</i>	RC, A, U	Prick +, TPO + PEF: patrón ocupacional TPBE: asma dual	RAST IgE + clase 4	WB-IgE: 80 y 22 kDa
M. Alvarado	1996	1	Pesca amateur	mosca de la carne	RC inmediata	Prick +	RAST IgE + clase 3	WB-IgE: 38.3, 37.7, 11.8, 10.2 kDa
M. Cabrera	1997	1	Pesca amateur	<i>C. erythrocephala</i>	RC inmediata A tardía	Prick + <i>C. erythrocephala</i> y <i>P. terraenovae</i> PEF: variabilidad 30% TPN +	ELISA IgE + a <i>C. erythrocephala</i> y <i>P. terraenovae</i> ELISA inh: reactividad cruzada con <i>ascaris</i>	WB-IgE 80 Kda en Ce y Pt. 12 y 15 kDa en Ce

Tabla 1A. Relación de publicaciones sobre reacciones alérgicas a Califóridos.

Reacciones alérgicas por larvas de Califóridos								
Autor	Año	nº pac	Tipo de exposición	Especie	Anamnesis	In vivo	In vitro	Alérgenos
M. Escribano	1997	1	Pesca amateur	<i>C. vomitoria</i>	RC,AE,U inmediata	Prick +	RAST IgE -	
I. González	1999	1	Pesca amateur	Asticot	RC,A,tardía	Prick +		
A. Virgili	2001	1	Pesca amateur	<i>C. vomitoria</i> ??	DPC en manos	Rub test +, test uso+, prick-prick + parche abierto y cerrado negativos		
S. Porcel	2003	1	Pesca amateur	Asticot	RC,AE, inmediata	Prick-prick positivo Prick test positivo TPN +	ELISA IgE +	WB-IgE 60 kDa
A. Siracusa	2003	50	Ocupacional (granjas de cría)	<i>C. vomitoria</i> (5) <i>G. mellonella</i> (2) <i>T. molitor</i> (1)	Historia de Alergia ocupacional. 9.2%	Prick + (31.6%) <i>C. vomitoria</i> especie más sensibilizante	<i>C. vomitoria</i> especie más sensibilizante	
M. Pazzaglia	2003	1	Ocupacional (cría de larvas)	<i>C. vomitoria</i>	DPC en manos	Prick-prick positivo Parche abierto y cerrado negativo		
J. Pérez Formoso	2003	2	Pesca amateur	<i>M. domestica</i> Asticot ???	RC, A	Prick + (2)	RAST + (2)	WB-IgE Md: 24,14,7 kD Asticot: 10 kDa
A. Rosado	2003	3	Pesca amateur	<i>Calliphora</i> spp	RC inmediata	Prick + (3) TPO + (3)	ELISA IgE + (2/3)	WB-IgE 70 y 90 Kda (2) 119 y 152 kDa (1)

Tabla 1B. Relación de publicaciones sobre reacciones alérgicas a Califóridos.

sí extracciones sanguíneas, para la determinación de IgE específica frente a extractos de larva y de mosca adulta, mediante técnica de RAST, observando un 67% de positivos entre los alérgicos, si bien hasta un 33% de trabajadores asintomáticos mostraron sensibilización a este insecto. Ni la atopia (definida por los autores como la presencia de una historia personal de rinitis alérgica, asma o eccema no relacionada con la exposición a insectos), ni los años de exposición, fueron factores de riesgo para el desarrollo de alergia a estas moscas.

Sin contar los estudios que demostraron la presencia de algunos alérgenos individuales frente a varias especies de Califóridos (tablas 1A y 1B), existen dos estudios que han intentado identificar los alérgenos responsables de esta patología. Los estudios de Baldo y Panzani <sup>42</sup> incluían un grupo de pacientes heterogéneo, con “alergia por inhalación a insectos”, sensibilizados a varias especies de dípteros, coleópteros, lepidópteros, lepidismátidos, e incluso arañas. De estos pacientes, se escogieron 6 para la realización de estudios de western blot con 6 especies de moscas (*M domestica*, *C stygia*, *C augur*, *L cuprina*, *C bezziana* y *Parasarcophaga*), observando, como hallazgo más significativo, la existencia de una banda de 37 kDa común en todas las especies de moscas, aunque no reconocida por todos los pacientes. El otro estudio, realizado también por Baldo y cols. <sup>43</sup>, incluyó 35 pacientes con IgE específica positiva a *L. cuprina*, y consistió en la realización de técnicas de western blot IgE con extractos de huevos, larva y mosca adulta de *L. cuprina*. Se observó, como existía un mayor número de reconocimiento de bandas proteicas, por IgE, cuanto mayor era el grado de desarrollo evolutivo. Se detectó un alérgeno mayor, de aproximadamente 67 kDa, frente al extracto de mosca adulta (70% de los pacientes). Este mismo alérgeno era el más reconocido en los extractos de larva, aunque sólo en el 25% de los pacientes. Destacaba la existencia



también de un alérgeno de 37 kDa en el extracto de mosca adulta, reconocido por el 40% de los pacientes. Estos estudios, son los más completos hasta la fecha en la descripción de los posibles alérgenos en especies de Califóridos. Hay que tener en cuenta, que la sensibilización en los diferentes estadios, puede ser frente a alérgenos distintos o frente a alérgenos comunes, conservados a lo largo del desarrollo de todo el ciclo biológico del insecto. Los estudios más importantes, en cuanto a la descripción de los alérgenos principales de algunas especies de Califóridos, se resumen en la tabla 2.

Caracterización de alérgenos frente a especies de Califóridos					
Autor	Año	nº de exposición	Especie	Anamnesis	In vivo / In vitro / Alérgenos
Baldo BA	1988	41	Múltiples insectos (dípteros, coleópteros, lepidópteros, lepidismátidos)	Pacientes con síntomas de alergia por inhalación de insectos domiciliarios	ID + mezcla de insectos ID + mezcla de insectos domiciliarios RAST IgE. Mayor nº de respuestas a <i>M. domestica</i> , <i>C. stygia</i> , <i>C. augur</i> , <i>L. cuprina</i> , <i>C. bezziana</i> , <i>Parasarcophaga</i> presentan alérgenos >35 kDa. Bandas de 37 kDa común a todas ellas. Sueros que reaccionan a múltiples insectos, poca especificidad.
G. Kaufman	1989	53	Ocupacional (investigación entomológica) <i>L. cuprina</i>	15 pacientes (28%) con síntomas alérgicos en relación con <i>L. cuprina</i> : 6 (A), 13 (R), 11 (C) 6 (U).	NO RAST IgE con mosca adulta y larva: 67% + en pacientes con historia + 33% + en asintomáticos
Baldo BA	1988	35	Ocupacional (investigación entomológica) <i>L. cuprina</i>	Pacientes seleccionados del estudio de Kauman (1989)	NO IgE + a extractos de huevos, larva o mosca de <i>L. cuprina</i> <b>WB-IgE (35 sueros) <i>L. cuprina</i>:</b> <b>Mosca: 21 bandas.</b> Alérgeno mayor 67 kDa (70%), 37 kDa (40%), 40 y 28 kDa (23%), 75 y 94 kDa (17%) <b>Larva: 18 bandas</b> 67 kDa (25%), 60,40,33,28 y 10 kDa. 14 kDa (13%) <b>Huevos: 9 bandas</b> 60 kDa (15%), 67,28,25,12 kDa WB-IgE (6 sueros) otros dípteros. Concordancia <i>C. stygia</i> y <i>C. augur</i> Concordancia <i>M. domestica</i> y <i>C. rubifacies</i> Banda común de 20 kDa ( <i>C. augur</i> , <i>C. stygia</i> , <i>C. rubifacies</i> , <i>M. vetucissima</i> , <i>A. infusa</i> , <i>D. trial</i> )

**Tabla 2. Estudios de caracterización alérgica en especies de Califóridos.**

## 5.2. Alergia a lombrices de tierra.

El primer caso de reacción alérgica por lombriz de tierra, fue descrito por el Dr. Sastre y cols. <sup>21</sup> en 1963. Mediante la positividad de la prueba cutánea con el extracto acuoso de lombriz, demostró la sensibilización en un paciente aficionado a la pesca con síntomas de coriza nasal, asma y urticaria de contacto en relación con la manipulación de lombriz común de tierra. Posteriormente, no fue hasta 1989, cuando Valero y cols. describieron un caso de rinitis, asma y angiodema por alergia a *Eisenia foetida* <sup>22</sup>, también perteneciente a la familia *Lumbricidae*. La prueba cutánea, el test de liberación de histamina y los estudios de RAST, confirmaron un mecanismo alérgico por IgE, y la provocación nasal específica confirmó la causalidad de dicha especie. Hasta la actualidad, incluyendo los casos descritos, sólo se han publicado 9 casos clínicos de reacciones alérgicas por lombrices de tierra, y se han implicado 3 especies, a saber, *Lumbricus terrestris* <sup>21,44,45,46,47,48</sup>, *Eisenia foetida* <sup>22,49</sup> y *Eisenia vegeta*<sup>50</sup>. En la tabla 3, se resumen los datos fundamentales de los estudios sobre alergia a lombrices de tierra.

En realidad, no existen artículos originales con un mayor número de pacientes, y esto contrasta con el amplio uso que se tiene de la lombriz de tierra como cebo vivo, o en lumbricultura. No obstante en los casos descritos, los síntomas más importantes consistían en la aparición inmediata de rinoconjuntivitis, asma (en ocasiones con presentación tardía) y/o urticaria de contacto, casi siempre asociados, aunque recientemente se ha descrito un caso de síntomas cutáneos aislados por contacto directo con *Lumbricus terrestris*, sin manifestaciones respiratorias <sup>48</sup>.

Nuestro grupo, mediante técnicas de western blot IgE, consiguió identificar un único alérgeno de un PM aproximado de 20 kDa en el extracto de *L. terrestris* <sup>47</sup>, en un caso de un pescador con síntomas de rinoconjuntivitis, asma y

urticaria de contacto tras una jornada de pesca con este cebos. Este alérgeno, podría corresponderse con el que ha sido descrito por Blasco en *E. foetida*<sup>49</sup>, y más recientemente por de Castro y cols.<sup>48</sup> en *L. terrestris*, también de 20 kDa. Estos últimos autores, además, demostraron mediante técnicas de inhibición la presencia de reactividad cruzada entre *L. terrestris* y *Anisakis simplex* (Nematodo parásito del pescado).

Reacciones alérgicas por lombrices							
Autor	Año	nº pacientes exposición	Tipo de Especies	Anamnesis	In vivo	In vitro	Alérgenos
Sastre A	1963	1	Amateur Lombriz tierra	RC, A, U	Prick+		
Valero A	1989	1	Amateur <i>E. foetida</i>	R, AE, A	Prick+	THL +	
Mc Morrow N	1993	1	Amateur <i>L. terrestris</i>	RC, U	TPN +	RAST +	
Simón K	1996	1	Amateur <i>E. vegeta</i>	RC, A	Prick+		WB-IgE 30-40 kDa
Blasco A	1999	1	Amateur <i>E. foetida</i>	RC, U	Prick+		WB-IgE 20-28 kDa
Camino E	2002	1	Amateur Lombriz tierra	RC, U, A	Prick-prick+	EAST +	WB-IgE 15 y 18 kDa
Tripodi S	2002	1	Amateur Lombriz tierra	RC, A, AE	Prick-prick+	RAST +	
Porcel S	2005	1	Amateur <i>L. terrestris</i>	RC, A, UC	Prick+	ELISA +	WB-IgE <i>L. terrestris</i> : 20 kDa
De Castro FJ	2007	1	Amateur <i>L. terrestris</i>	AE, C	Prick-prick+	ELISA +	WB-IgE <i>L. terrestris</i> : 100 y 20 kDa WB-IgE inhibición: Reactividad cruzada con <i>A. simplex</i>

Tabla 3. Relación de estudios sobre alergia a lombrices de tierra.

### **5.3 Dificultades en el diagnóstico de la patología alérgica por cebos de pesca.**

Como se desprende de la revisión bibliográfica, las reacciones alérgicas por el uso de cebos vivos para la pesca, se manifiestan fundamentalmente en forma de clínica respiratoria. La enfermedad alérgica respiratoria, es producida por la inhalación de aeroalérgenos y puede afectar a las vías respiratorias superiores e inferiores. Si bien, clásicamente se ha hecho una división entre las enfermedades alérgicas de las vías respiratorias superiores e inferiores, cada vez está más presente el concepto de una vía respiratoria única y de una única enfermedad alérgica respiratoria; y es que, la rinitis y el asma están frecuentemente asociadas, y tienen una etiología y fisiopatología común. La respuesta de hipersensibilidad tipo I, mediada por IgE, que se produce en un individuo alérgico, tras el contacto con los alérgenos, produce una inflamación similar en todo el árbol respiratorio, y con ello manifestaciones clínicas a distintos niveles, en forma de rinitis o asma, expresión de la alergia respiratoria global.

La rinitis alérgica, es la forma de presentación más frecuente, y en ocasiones la única, de alergia respiratoria. Se manifiesta en forma de prurito nasal, estornudos, rinorrea y obstrucción nasal, de forma aislada o conjunta. Suele ir asociada a la presencia de conjuntivitis alérgica, con síntomas de prurito, hiperemia conjuntival, lagrimeo y en ocasiones edema palpebral. Los 4 síntomas cardinales de asma bronquial son: disnea (síntoma más frecuente), tos, sibilancias y opresión torácica.

Para el diagnóstico de las enfermedades alérgicas respiratorias, la prueba cutánea mediante la técnica del *prick*, es la prueba inicial y de elección, y cuando existe una buena correlación con la historia clínica, la determinación de IgE específica, mediante técnicas *in vitro*, no suele ser necesaria <sup>51</sup>. Esta

técnica, suele tener una mayor sensibilidad que las pruebas *in vitro*, y está indicada principalmente para el diagnóstico etiológico de pacientes con alergia respiratoria por aeroalérgenos. La determinación de IgE específica es un método complementario a las pruebas cutáneas, de utilidad en caso de no poder realizar las pruebas cutáneas (por interferencia con medicación o por enfermedades dermatológicas) o en el caso de pacientes sensibilizados a múltiples alérgenos, con el fin de intentar discriminar la relevancia de cada uno de ellos. Además, permite la realización de múltiples determinaciones con una sola extracción sanguínea.

Pero, la fiabilidad diagnóstica, tanto de las pruebas cutáneas, como de las mediciones de IgE específica, depende mucho de la calidad de los extractos utilizados. Para obtener extractos diagnósticos de calidad deberemos considerar tres aspectos:

1. La materia prima debe ser de calidad y reproducible, en cuanto al suministro de la fuente alérgica. Debe estar por lo tanto bien identificada, y se debe evitar la contaminación con otros alérgenos. Este es un proceso complicado, en el caso de larvas de Califóridos, por varias causas: En el proceso de producción puede haber contaminación con otras especies; la identificación taxonómica de especies a nivel larvario es compleja, necesariamente realizada por entomólogos expertos, y precisa en la mayoría de las ocasiones del desarrollo completo de la mosca.

2. Es necesario que los extractos estén estandarizados, para que la actividad biológica sea reproducible en los diferentes lotes de extracto. En los estudios descritos sobre reacciones alérgicas por cebos vivos, los extractos se han realizado mayoritariamente en unidades peso/volumen, y es sabido, que dos extractos con el mismo P/V pueden tener una variabilidad en su sensibilidad diagnóstica entre 0% y 100%, por variaciones en su actividad biológica. La

falta de estandarización de los extractos puede ser causa de falsos negativos, tanto en pruebas cutáneas como en determinaciones de IgE específica.

**Estandarización biológica.**

El extracto alergénico es un material heterogéneo que contiene numerosos componentes inmunológicamente activos. La selección de la materia prima y el proceso de extracción de los extractos, puede generar muchas variaciones de la actividad alergénica, por diferencias en la composición y concentración en cuanto a los principales alérgenos.

Con la estandarización biológica se obtendrán los extractos de referencia, los cuales tienen asignado un determinado número de unidades biológicas. Las unidades biológicas de un extracto se determinan mediante la realización de pruebas cutáneas (*prick test* en algunos métodos, e intradermorreacciones en otros) en un número suficiente de pacientes (generalmente 20-30 pacientes), sensibilizados al extracto en cuestión. La media de la respuesta cutánea en los pacientes seleccionados (tamaño de pápula o de eritema, dependiendo del método), comparada, o no, con la respuesta a un control positivo (histamina 10 mg/ml), nos da un número determinado de unidades biológicas, asociado a una actividad alergénica concreta.

Una vez que se dispone de un extracto con una actividad conocida, expresado en unidades biológicas, la actividad de los sucesivos lotes de extractos, utilizados para el diagnóstico o el tratamiento de las enfermedades alérgicas, se determina tras su comparación con ese primer extracto, de referencia. Dicha comparación se realiza mediante técnicas *in vitro* de inhibición de la respuesta IgE, como el RAST o el ELISA inhibición. Por lo tanto, tendremos extractos con capacidad para producir siempre la misma respuesta en los pacientes alérgicos, independientemente de la variabilidad inicial en la composición alergénica de los mismos.



3. La caracterización de un extracto es, por último, un paso muy importante es este objetivo de calidad. La caracterización alérgica, consiste en la identificación y purificación de los diferentes alérgenos de un extracto. La identificación de alérgenos relevantes, o alérgenos mayoritarios, de una fuente alérgica bien identificada, se logra mediante técnicas *in vitro*, que tienen su fundamento en el reconocimiento inmunológico, mediante Ac IgE, que los pacientes alérgicos tienen frente a esos alérgenos. Fundamentalmente, se utilizan técnicas de electroforesis, inmunotransferencia, inmunodetección e inhibición, en un grupo suficiente de pacientes alérgicos a dicha fuente alérgica. El conocimiento del patrón de alérgenos mayoritarios (reconocidos al menos por el 50% de los pacientes alérgicos a una especie) y minoritarios, de un extracto, nos servirá para identificar al mayor número de individuos alérgicos. En la mayoría de los estudios descritos, los extractos no han sido caracterizados; el número de pacientes estudiados era pequeño o sencillamente no se realizaron técnicas para la caracterización.

## **6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.**

Como se ha visto, la pesca de agua dulce constituye una importante actividad lucrativa entre los extremeños. El cebo vivo, y en concreto el asticot o “gusano de la carne” es el más usado para esta actividad y, como se desprende de la revisión bibliográfica, estas larvas son capaces de producir reacciones alérgicas por contacto y por inhalación en pescadores. Los casos existentes, describen reacciones frente a varias especies de la familia *Calliphoridae*, en pacientes aficionados a la pesca deportiva, y también en pacientes expuestos de manera ocupacional. Sin embargo, teniendo en cuenta la frecuencia de su uso, no existen estudios epidemiológicos que valoren la relevancia alérgica de estos cebos en población de pescadores aficionados.

Las dificultades para el diagnóstico de la patología alérgica por estos cebos, se basan fundamentalmente en los problemas para la selección e identificación de la materia prima y en la falta de extractos estandarizados biológicamente. Con respecto al primer punto, las dudas en cuanto a la identificación taxonómica de las diferentes especies de Califóridos, y con ello el primer paso para la obtención de extractos de calidad, han sido una constante, tras el análisis de todos los estudios publicados hasta la fecha. En muchos trabajos, se habla de asticot o “mosca de la carne” de manera genérica, sin identificación de ninguna especie concreta; y ningún trabajo describe las claves utilizadas para la identificación de las especies estudiadas. Esta primera premisa, junto con el pequeño número de pacientes estudiados, alérgicos a especies concretas, son las causas de que hasta hoy en día no existan extractos estandarizados biológicamente de estos cebos.

Se desconoce el patrón de alérgenos relevantes en la mayoría de las especies estudiadas. Sólo el grupo Australiano de Baldo ha realizado estudios válidos de caracterización alérgica en un extracto de *Lucilia cuprina*, utilizado en

trabajadores de un centro de investigación entomológica. Existen otros estudios en los que la selección de los pacientes es más heterogénea, y donde se investiga la sensibilización a numerosas especies de insectos (no sólo moscas), a las que los pacientes no están expuestos realmente. El resto de los estudios, en los que se menciona algún alérgeno concreto, incluyen generalmente 1 ó 2 casos clínicos, y por lo tanto, sólo nos dan información de alérgenos reconocidos de manera individual, no comparables con los de otros estudios, por diferencias en las especies estudiadas y en la metodología utilizada. La presencia de los alérgenos mayoritarios en un extracto (reconocidos por más del 50% de los pacientes alérgicos al extracto completo) es necesaria, para que, el mismo, sea representativo de la fuente alérgica de la que procede y con ello identificar al mayor número de pacientes posible.

Estas observaciones, se traducen en los objetivos fundamentales de este estudio, los cuales se enumeran a continuación.

---

## **OBJETIVOS**

**Objetivo principal.**

Elaboración de un estudio descriptivo sobre reacciones alérgicas a cebos de pesca en población de pescadores de Cáceres. Se analizarán los siguientes aspectos:

1. Hábitos de pesca entre nuestros pescadores.
2. Patrones de presentación clínica.
3. Frecuencia de sensibilización y alergia a los cebos implicados.
4. Análisis de posibles factores de riesgo para el desarrollo de alergia a cebos de pesca vivos.

**Objetivos secundarios.**

1. Identificación taxonómica de las especies de dípteros comercializadas como asticot en tiendas de artículos de pesca Cáceres.
2. Caracterización alergénica. Identificación de los alérgenos mayoritarios en las especies de Califóridos y lombriz de tierra utilizadas por los pescadores de Cáceres.
3. Elaboración de extractos diagnósticos estandarizados biológicamente de las diversas especies identificadas.

---

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1. OBTENCIÓN DE MATERIAL PARA PRUEBAS DIAGNÓSTICAS.**

La selección de la materia prima, a la que se encontraban expuestos los pescadores estudiados en este trabajo, y la identificación taxonómica de las especies que componían esa materia prima fueron los primeros pasos para la elaboración de extractos diagnósticos de calidad.

### **1.1. OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA.**

Las larvas de moscas, conocidas con el nombre genérico de asticot (no hay identificación taxonómica), se comercializan en grandes cantidades en tiendas de artículos de pesca de cualquier ciudad. Se venden en tarrinas o bolsas de plástico, que incluyen varios centenares de individuos y que se conservan en serrín a bajas temperaturas (en frigorífico). El distribuidor de asticot para toda Extremadura nos puso en contacto con los productores ubicados en Zamora, los cuales no tenían constancia de la identificación como especie de estos cebos.

Para la identificación taxonómica del asticot, utilizado por los pescadores de este estudio, se recogieron varias muestras de 3 tiendas de la ciudad de Cáceres. También se recogieron muestras de lombriz de tierra común que los comerciantes recolectaban de los alrededores de la ciudad.

Por otro lado, en tiendas de Deporte Decathlon, Madrid, se importaban varias especies de asticot, a través de un distribuidor francés (Verminiere de L'ouest. Tremblay). Con el nombre de asticot, venían identificadas las larvas de *Protophormia terraenovae*, “le gozzer” identificaba a larvas de *Calliphora vomitoria* y “le pinkie” a larvas de *Lucilia caesar*. Se solicitaron muestras de estas tres especies comercializadas y, previamente a la realización de extractos diagnósticos, se realizó la confirmación taxonómica de especie y la investigación de posibles contaminaciones con otras especies.

## **1.2 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ASTICOT COMERCIALIZADO EN TIENDAS DE ARTÍCULOS DE PESCA DE CÁCERES.**

### **1.2.1 Identificación larvaria.**

Una vez recogidas las muestras (vendidas en bolsas o tarrinas de plástico. Fig. 8), se trasladaron a la Unidad de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura (UEX), donde fueron analizadas e identificadas bajo la supervisión de la Dra. Eva M<sup>a</sup> Frontera Carrión.



**Fig. 8. Larvas de Asticot comercializadas en Cáceres.**

De cada una de las muestras, se analizaron un total de 50 larvas de tercer estado, estableciendo una primera clasificación provisional (por la gran dificultad en la diferenciación a nivel de especie en esta forma larvaria), hasta su confirmación definitiva una vez emergido el imago.

En el caso de los dípteros Califóridos, se ha seguido la nomenclatura y clasificación utilizada en Martínez-Sánchez y cols.<sup>11</sup> Las larvas fueron



identificadas usando las claves de Zumpt (1965) y Smith (1986)<sup>52</sup>. En cuanto a la identificación de los adultos las claves utilizadas para su identificación han sido: González-Mora & Peris (1988)<sup>53</sup>, González-Mora (1989)<sup>54</sup>, y Peris & González-Mora (1991)<sup>55</sup>.

### **1.2.2. Cría y pupación de las larvas para la obtención de imagos.**

Para asegurar la correcta identificación de las especies de dípteros existentes en las muestras de asticot, se procedió al seguimiento de su ciclo biológico hasta la obtención del imago (adulto).

Para ello, se tomaron un total de 125 larvas de asticot comercial de cada una de las muestras. Estas larvas se mantuvieron en una estancia climatizada con una temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , a una humedad relativa de  $55 \pm 5\%$  y un ciclo de luz de 16 horas y 8 horas de oscuridad.

Las larvas fueron depositadas en recipientes abiertos, a su vez introducidas en terrarios (30x20x20 cm), donde una capa de arena previamente autoclavada (90 minutos a  $121^\circ\text{C}$  y una atmósfera de presión) cubría el fondo. Las larvas que se venden como cebo vivo, están en su última fase de desarrollo (L-3) por lo que en 1 o 2 días, se desplazaban fuera del recipiente (Fig. 9) y la pupación ocurría en la arena (Fig. 10).

Una vez que todas las larvas habían pupado, la arena era filtrada para recoger las pupas. Algunas muestras se individualizaron en placas Petri y otras se dispusieron en un vaso de 50 ml, que se introducía en otro terrario (donde se disponía de agua y azúcar), hasta la emergencia de los adultos.

Tras 48 horas de haber eclosionado, las moscas adultas se introducían directamente en un congelador a  $-20^\circ\text{C}$  y se mantenían 24 horas, para que se produjera la muerte de las mismas.



**Fig. 9. Desplazamiento de las larvas al exterior del recipiente para el desarrollo de la pupa.**



**Fig. 10. Pupas de Califóridos.**

Una vez que las moscas se secaron, se procedió a su conservación para poder identificarlas correctamente, según las claves anteriormente indicadas. Para ello, se “pincharon” cuidadosamente mediante alfileres entomológicos, identificando cada ejemplar con su correspondiente etiqueta identificativa (Fig. 11).



**Fig. 11. Moscas adultas familia *Calliphoridae*.**

### **1.3. ELABORACIÓN DE EXTRACTOS DIAGNÓSTICOS.**

#### **1.3.1. Homogeneización.**

Pesado, lavado para eliminar material añadido (serrín, tierra), y troceado de los individuos en un aparato Politron PT 2100 (Kinematica AG) durante 6 minutos.

#### **1.3.2. Extracción.**

El homogeneizado fue sometido a extracción hidrosoluble en cámara fría (4-8 °C) por agitación magnética suave (1000 rpm) en tampón fosfato (PBS Merck) al 50% p/v, durante 2 horas, manteniendo un pH entre 7,5-8,5.

#### **1.3.3. Purificación.**

La fracción hidrosoluble se sometió a centrifugación a 10.000 rpm, durante 30 minutos, en una centrífuga Rotanta RS (Hettich), tras la cual se descartó el sedimento. El sobrenadante resultante se pasó a través de filtros Watman.

Dicho filtrado, se dializó en membrana de diálisis Visking 7000 Daltons, durante 12 horas a 4°C, frente a 10 volúmenes de agua ultrapura y en agitación magnética, realizando un mínimo de tres cambios para la eliminación completa de sales.

El extracto resultante de la diálisis, se filtró a vacío, en un conjunto de embudo Buchner y matraz Kittasato, a través de filtros de profundidad Millipore GS de 0,45 µm. Posteriormente se procedió a su congelación a -20°C (Sanyo MDF - 235) hasta el siguiente proceso de liofilización.

#### **1.3.4. Estabilización.**

La estabilización se realizó mediante un proceso de liofilización en una planta Liogamma Telstar 20/40 (Telstar); una receta específicamente diseñada, cuyas características se expresan en la tabla 4.

El almacenamiento de los extractos liofilizados se realizó en un desecador con silicagel hasta su utilización.

DESCRIPCION	TEMPERATURA (°C)	VACÍO (mbar)	h: min.
Preparación bandejas	- 30		
Congelación	- 40		0:30
Congelación	- 40		3:00
Prep. Condensador	- 50		0:10
Vacío Cámara		0.200	
Secado primario	- 5	0.200	5:00
Secado primario	10	0.200	8:00
Secado primario	30	0.300	8:15
Secado primario	30	0.300	7:0
Test final secado primario	30	0.300	0:5
Secado secundario	30		4:0
Secado secundario	30		5:0
Test final secado secundario	30		0.5

**Tabla 4. Receta de liofilización.**

**1.3.5. Determinación de la cantidad de proteína en los extractos.**

El procedimiento de cuantificación de proteínas, está basado en el método diseñado por Bradford<sup>56</sup>, que aprovecha la capacidad del azul de Coomasie para unirse de manera no covalente a las proteínas. Se preparó una solución estándar de albúmina, conteniendo 10 mg disueltos en 10 ml de NaCl 0.15 M. La concentración de albúmina en la solución se comprobó con un análisis espectrofotométrico a 278 nm en el espectro UV; la absorbancia a esta longitud de onda, debe ser de 0.66, si este dato no se obtiene es necesario ajustar la concentración. Las soluciones, conteniendo de 10 a 100 µg de estándar de albúmina, se pipetearon en tubos de 12 x 100 mm y en un volumen de 0.1 ml. A continuación, se agregaron 5 ml de reactivo (azul de Coomasie) Una vez realizado todos los pasos, se dibujó una gráfica patrón de

proteínas: cantidad de albúmina (eje de las abscisas) contra absorbancia, obtenida a una longitud de onda de 595 m (eje de las ordenadas).

La solución problema se diluyó con NaCl 0.15 M. Se pipeteó en cada tubo un volumen de 0.1 ml de la solución problema y se le agregaron 5 ml de reactivo, realizando la lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 595 nm. Se preparó también un blanco que contuviera 0.1 ml de NaCl 0.15 M más 5 ml de reactivo. La absorbancia resultante del problema se interpoló a la curva patrón, y se extrapoló de esta al eje de las X, para conocer la cantidad de proteína contenida en la muestra.

## **2. ESTUDIO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO.**

Estudio descriptivo sobre prevalencia de sensibilización y alergia a los cebos de pesca vivos utilizados por pescadores de Cáceres. Los pacientes seleccionados fueron estudiados desde junio del 2005 hasta febrero del 2006.

### **2.1. Población de estudio.**

Para la selección de la muestra, se partió de los miembros que pertenecían, en este periodo, a la Sociedad de Pescadores de Cáceres. De los 1774 socios, el tamaño muestral calculado y necesario para conseguir una probabilidad de error en el estudio lo más significativa posible, y para una frecuencia de enfermedad esperada del 10%, fue de 316 pacientes. La elección de la muestra, se realizó mediante un muestreo aleatorio simple sobre el listado de socios por orden alfabético suministrado por la Sociedad de Pescadores, utilizando tablas de números aleatorios diseñadas para tal efecto.

Por otro lado, como parte del estudio clínico y de caracterización alérgica, se seleccionaron los pacientes que habían sido valorados por las consultas externas de la sección de Alergología del Complejo Hospitalario de Cáceres, desde su creación en el año 1989 hasta el año 2006, con diagnóstico de alergia por manipulación de cebos vivos de pesca (asticot y/o lombriz). Estos pacientes constituyeron nuestra serie clínica.

### **2.2. Protocolo de estudio (Fig. 12).**

A todos los pacientes seleccionados, se les realizó una historia clínica detallada. Para dar uniformidad a dicha historia clínica, se desarrolló un cuestionario sobre síntomas alérgicos y su posible relación con el manejo de cebos de pesca vivos. Se sospechó la existencia de una reacción alérgica, mediada por IgE, frente a cebos de pesca vivos, cuando el paciente presentaba síntomas cutáneos (prurito, urticaria, angioedema), conjuntivales (prurito,

lagrimeo, hiperemia, quemosis), o respiratorios (rinorrea, congestión nasal, estornudos, disnea, tos, sibilancias) tras el contacto con el cebo en cuestión.

Una vez realizado el cuestionario, se obtuvo una muestra sanguínea de cada paciente para la obtención de suero, que fue congelado hasta su utilización para la determinación de IgE específica frente a las especies de cebos utilizadas en el estudio, y también en algunos casos para la caracterización alérgica mediante estudios de western blot.

Tras la extracción sanguínea, a todos los pacientes se les hicieron pruebas de *prick test* con los extractos de asticot y lombriz según se describirá a continuación.

En función del resultado de las pruebas cutáneas e IgE específica se obtendrían tres grupos de pacientes:

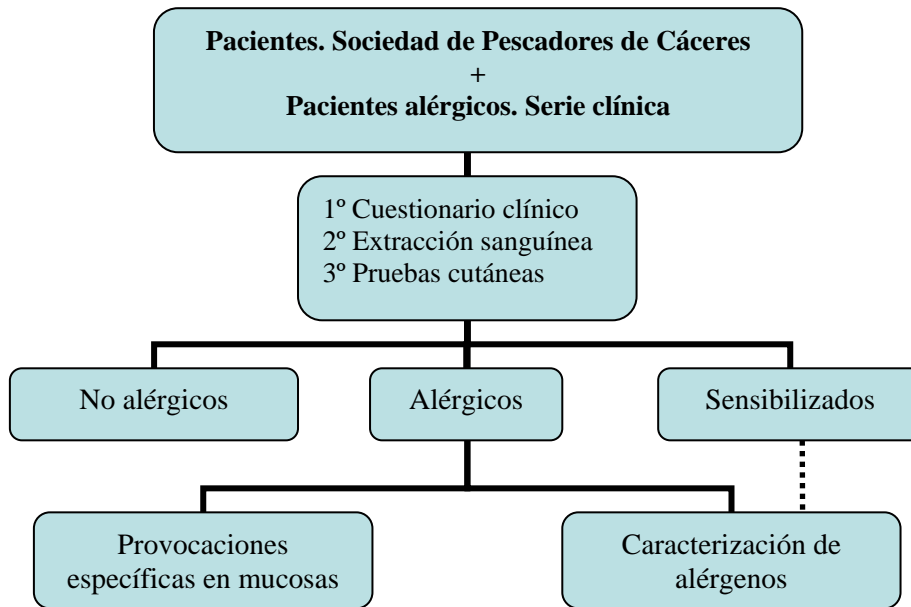
1. Grupo 1. Pacientes alérgicos. Son pacientes que presentaban síntomas compatibles con una reacción alérgica mediada por IgE frente a los cebos, junto con una prueba cutánea y/o IgE específica positiva/s, a alguna de las especies
2. Grupo 2. Pacientes sensibilizados. Presentaban una prueba cutánea y/o IgE específica positiva/s, pero no tenían síntomas en relación con el manejo de los cebos.
3. Grupo 3. Pacientes no alérgicos. Ausencia de clínica y de respuesta IgE en el estudio.

Los pacientes alérgicos de la serie clínica (diagnosticados en la sección de Alergología del Complejo Hospitalario de Cáceres), también fueron sometidos al cuestionario clínico y a la prueba cutánea con extractos de asticot y lombriz. A los pacientes, se les propuso también, la realización de una provocación nasal o conjuntival con extracto de asticot y lombriz. Por último, el suero obtenido de estos pacientes, junto con el de algunos pacientes del



estudio epidemiológico, realizado en miembros de la Sociedad de Pescadores de Cáceres, fue utilizado para estudios de caracterización de alérgenos.

**Figura 12. Algoritmo de estudio.**



Tanto en las pruebas cutáneas, como en las provocaciones específicas y en las determinaciones de IgE específica, se realizaron controles en pacientes atópicos y en pacientes sanos no expuestos.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes o de sus tutores, en los menores de edad, según el modelo que figura en el anexo 1, antes de la realización del estudio. En él, se exponían brevemente los objetivos del estudio, su descripción y posibles riesgos.

El estudio se presentó al Comité Ético del Complejo Hospitalario de Cáceres con dictamen favorable (anexo 2).

### **2.3. Cuestionario clínico.**

Este cuestionario, se ha basado en los cuestionarios epidemiológicos de rinitis, asma y enfermedades alérgicas de los estudios internacionales ISAAC <sup>57</sup> y ERCHS <sup>58</sup>, con una serie de modificaciones, que incluían preguntas sobre las relaciones con la exposición a cebos de pesca (anexo 3).

Los cuestionarios recogían las siguientes variables:

a) Relacionadas con el paciente:

- Sexo.
- Fecha de nacimiento, fecha de inclusión en el estudio.
- Lugar de residencia.
- Antecedentes personales médicos, antecedentes personales y familiares de patologías alérgicas.

b) Relacionados con la afición a la pesca:

- Años de afición, tipo de cebo utilizado, frecuencia de uso de los cebos

c) Relacionados con las manifestaciones clínicas:

- Síntomas de asma, rinoconjuntivales o cutáneos.
- Posible relación de los síntomas con el manejo de cebos vivos.

### **2.4. Pruebas cutáneas.**

Las pruebas cutáneas se realizaron mediante la técnica del *prick test*, según el procedimiento descrito por Osterballe <sup>59</sup> en la cara anterior del antebrazo, usando lancetas desechables de precisión de 1 mm de punta, descritas por Morrow Brown y cols <sup>60</sup>. Su empleo está recomendado a la vez para *prick test* de rutina, así como para la estandarización biológica de alérgenos, y su reproducibilidad ha sido establecida por Mailing y cols <sup>61</sup>. Brevemente, la punción se realizó con la lanceta en un ángulo de 90° sobre la superficie cutánea y a través de la solución de extracto diagnóstico, el control negativo

(NaCl 0.9%) y el control positivo de clorhidrato de histamina a 10 mg/ml; 54.3 mM/L. Tras la punción se retiró el exceso de líquido sin presionar ni frotar, con una gasa, y se valoró la repuesta a los 15 minutos. Se consideraron positivas las respuestas en forma de habón, con un diámetro mayor mínimo de 3 mm.

El *prick test* se realizó con los extractos liofilizados de asticot y lombriz. También se realizaron *prick test* con extractos de una batería de alérgenos inhalantes convencionales de uso habitual (mezcla de gramíneas, Dactilis, Olea, Plantago, Plátano, Artemisia, Helianthus, *Dermatophagoides pteronyssinu*, *Alternaria*, *Aspergillus*, epitelio de perro, epitelio de gato. Laboratorios Diater, España).

### **2.5. Cuantificación de niveles de IgE específica. ELISA (Enzyme Linked Inmuno-Sorbent Assay).**

Los enzimoimmunoensayos (EIA) son técnicas inmunológicas que emplean reacciones antígeno anticuerpo en las que el marcaje de los mismos se realiza con enzimas. Así, a la reacción inmune sigue una reacción indicadora (normalmente con aparición de color) en la que se determina fotométricamente la actividad del enzima marcador.

El ELISA, es un tipo de enzimoimmunoensayo en el que se utilizan soportes sólidos a los cuales se adhiere el complejo Ag-Ac, eliminándose el reactivo marcado libre mediante lavados.

Los valores de IgE específica de los sueros de los pacientes del estudio fueron medidos tal y como describen Boluda y cols con algunas modificaciones <sup>62,63</sup>:

a) Para la preparación de la fase sólida, las placas de microtitulación (placa microtitter de poliestireno de 96 pocillos) se tapizaron con 0.250 mg/ml de los diferentes extractos obtenidos y se incubó toda la noche a 4°C.

b) Para evitar la posibilidad de uniones inespecíficas, todos los pocillos de la placa fueron bloqueados con 100 µL tampón de ensayo (BSA 1% en PBS Tween al 0,05%) durante 1h.

c) Posteriormente, se añadió una muestra de 50 µL de suero de cada paciente a cada pocillo y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.

d) La unión de la IgE fue detectada por un anticuerpo monoclonal anti-IgE humano biotinilado (1:1000; 50 µL/pocillo; Operon, España) seguido de una incubación con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con streptavidin-peroxidasa (1: 5000; 50 µL/pocillo; Sigma).

e) El siguiente paso se desarrolló usando 50 µL/pocillo de una solución de TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system supersensitive; Sigma T 4444). La reacción colorimétrica se paró con ácido sulfúrico y la lectura de los valores de absorbancia (en un lector Multiskan Acent V1.23) se realizó a una longitud de onda de 450 nm.

f) Los datos de absorbancia observados, fueron trasladados a una curva patrón, obtenida con la utilización de unos sueros de referencia con concentraciones de IgE humana conocida (100, 17.5, 3.5, 0.7 y 0.35 UI/ml) siguiendo las especificaciones de la OMS (IRP2 75/502) y utilizando el Kit comercial de Hycor. (Hycor Biomedical Inc. California. USA).

Con ello, se obtuvieron mediciones en UI/ml, según la relación que se observa en la tabla 5.

<b>IgE (IU/mL)</b>	<b>100</b>	<b>17,5</b>	<b>3,5</b>	<b>0,7</b>	<b>0,35</b>
	1,941	1,462	0,717	0,3	0,203
	2,034	1,595	0,773	0,314	0,19
<b>Absorbancia promedio</b>	<b>1,9875</b>	<b>1,5285</b>	<b>0,745</b>	<b>0,307</b>	<b>0,196</b>

**Tabla 5. Correspondencia entre grado de absorbancia y niveles de IgE.**

Para la interpretación de los niveles de IgE específica, se utilizó la graduación clásica que establece una división en clases de IgE, según la tabla 6.

<b>Clase de IgE</b>	<b>UI/ml</b>	<b>Nivel de Ac.</b>
0	<0.35	No detectable
1	0.35-0.7	Bajo
2	0.7-3.5	Moderado
3	3.5-17.5	Alto
4	17.5-50	Muy alto
5	50-100	Muy alto
6	>100	Muy alto

**Tabla 6. Graduación en clases de IgE.**

La clase 1, niveles de IgE entre 0.35 y 0.7 UI/ml, es considerada en muchos ensayos como insignificante, en el umbral más bajo de las concentraciones de IgE específica, y que puede dar lugar a muchos falsos positivos, sobre todo en el estudio de nuevos alérgenos. Es por ello, que las recomendaciones de las Nordic Guidelines, en cuanto a estandarización biológica de extractos alérgenos, sólo permiten la inclusión de pacientes con niveles de IgE específica clase 2 o superiores <sup>64,65</sup>. Por lo tanto, en este estudio, se consideraron positivos los niveles de IgE específica > 0.7 UI/ml frente al alérgeno correspondiente.

## **2.6. Pruebas de provocación específica con alérgeno.**

El objetivo de las pruebas de provocación específica con alérgenos, es reproducir los síntomas clínicos que refiere el paciente alérgico, mediante la exposición controlada a los mismos. En este estudio, las provocaciones oculares o nasales específicas, se usaron como prueba de confirmación de los alérgenos responsables de rinoconjuntivitis, dentro de la investigación de nuevos alérgenos.

### **2.6.1. Prueba de provocación ocular específica.**

La prueba consiste en la instilación de un extracto alérgico en el fondo de saco conjuntival inferior del ojo, y la valoración de la respuesta objetiva mediante la presencia de signos y síntomas de conjuntivitis, en los pacientes alérgicos al extracto en cuestión.

El paciente debía estar asintomático y no debía estar bajo tratamiento con antihistamínicos ni corticoides, como norma general, en la semana anterior a la prueba.

Los extractos liofilizados estudiados, fueron reconstituidos, en el momento previo al estudio, con diluyente a base de suero salino (NaCl 0.9%).

En primer lugar, se procedió a la aplicación de una gota de control negativo (NaCl 0,9%) en el ojo derecho. Si no se observaba ningún tipo de reacción, se procedía a la aplicación del alérgeno en el ojo izquierdo, a concentraciones crecientes, cada 15 minutos, siempre que no hubiera existido reacción con la dilución anterior.

Tras la instilación de cada dilución de alérgeno, se valoró la intensidad de la reacción <sup>66</sup>, según la escala de valores descrita en la tabla 7. Si el valor total de los síntomas era mayor o igual a 5, la prueba se consideraba positiva.

<b>SINTOMAS</b>	<b>ESCALA DE VALORES</b>
<b>Hiperemia conjuntival</b>	0 = ninguno 1 = leve 2 = moderado 3 = grave
<b>Quemosis</b>	0 = ninguna 1 = leve (sólo detectable con lámpara de hendidura) 2 = moderada (la conjuntiva se separa de la esclerótica en la zona inferior. Visualmente evidente) 3 = grave (distensión de la conjuntiva)
<b>Epifora</b>	0 = ninguna 1 = leve (ojos ligeramente llorosos) 2 = moderada (el paciente se suena la nariz) 3 = grave (las lágrimas caen por las mejillas)
<b>Prurito (evaluado por el paciente)</b>	0 = ninguno 1 = leve (sensación de cosquilleo intermitente) 2 = moderado (sensación continua, sin deseo de frotarse) 3 = grave (sensación continua, con deseo de frotarse los ojos) 4 = picor incapacitante

**Tabla 7. Escala de valoración de síntomas en provocación ocular.**

### **2.6.2. Prueba de provocación nasal específica.**

La prueba de provocación nasal, consiste en la aplicación intranasal de diferentes diluciones de un alérgeno, para la reproducción de los síntomas de rinitis, en los pacientes alérgicos al mismo.

#### **Rinomanometría.**

La rinomanometría es una técnica de exploración que analiza las resistencias de las estructuras nasales al paso de la columna de aire. Es útil para la valoración objetiva del resultado de una provocación nasal específica.

Se utilizó la técnica de la rinomanometría anterior activa, usando un rinomanómetro Rhinospir 164, siguiendo las recomendaciones del Comité internacional para la estandarización de la rinomanometría <sup>67</sup>, que se describen brevemente a continuación:

- El paciente debía suspender toda medicación que interfiriera en los resultados (antihistamínicos y corticoides, orales o tópicos).
- Se limpiaron las ventanas nasales y se aplicó una oliva en cada fosa nasal. La oliva conectada al tubo que mide las presiones se aplicó en la fosa nasal contraria a la que se quería explorar. A través de la otra oliva, conectada al neumotacógrafo, se detectó el flujo correspondiente a la fosa nasal que queríamos explorar.
- Se inició la prueba indicando al paciente que respirara normalmente. Cuando los valores del flujo inspiratorio a 150 Pa son estables, el rinomanómetro comienza a hacer mediciones de presión y flujo. Al finalizar el registro, se intercambiaron las olivas para la exploración de la fosa nasal contralateral, repitiendo las mismas maniobras.
- Concluida la toma de muestras de ambas fosas nasales, aparecía un gráfico FLUJO/PRESIÓN en cuadrantes (figura 13). El informe nos daba los valores de flujo ( $\text{cm}^3/\text{s}$ ) y resistencia ( $\text{Pa}\cdot\text{s}/\text{cm}^3$ ) de cada fosa nasal, para las presiones estandarizadas de 75, 100, 150 y 300 Pa.

### **Prueba de provocación nasal.**

Para la provocación nasal específica con alérgenos, el extracto alérgico se instilaba mediante un dispensador de aire que liberaba 0.1 ml por pulsación.

Se realizó una rinomanometría basal según el método descrito anteriormente. Si era normal (flujo total  $\geq 700 \text{ cm}^3/\text{s}$ , resistencias  $< 0.43 \text{ Pa}/\text{cm}^3/\text{s}$ ), se aplicaba suero salino en la fosa nasal elegida (la que presentaba menor resistencia) y se realizaba un control rinomanométrico a los 10 minutos.

Si no había alteraciones significativas, se procedía con la instilización de concentraciones crecientes del extracto cada 20 minutos hasta la aparición de una respuesta positiva, definida como un incremento de las resistencias del 100% con respecto al basal.



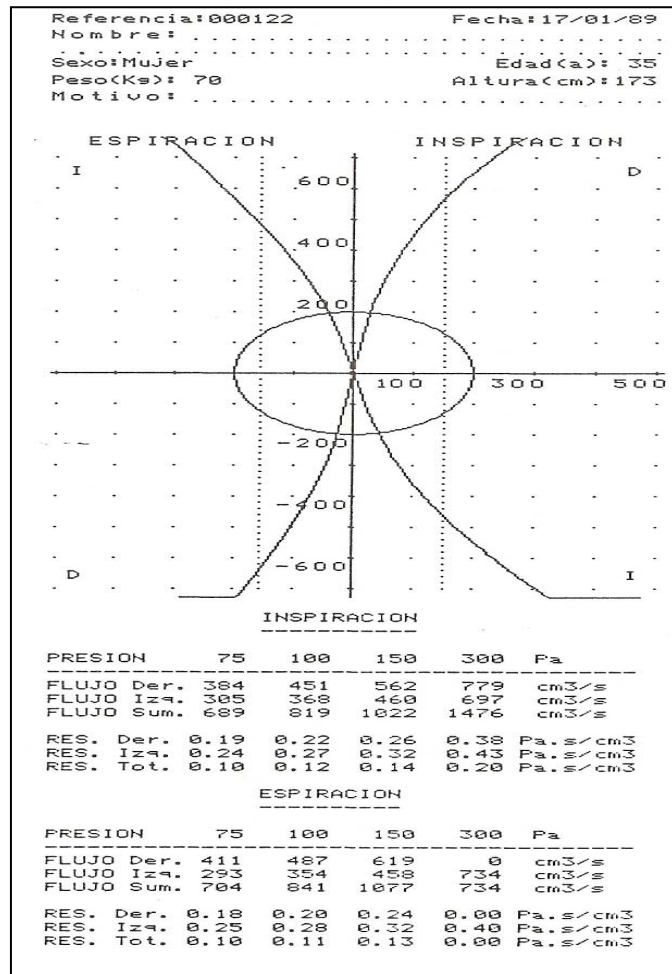


Fig. 13. Rinomanometría Gráfico Flujo/Presión.

**2.7. Análisis estadístico.**

Se llevó a cabo un estudio descriptivo (media, máximo, mínimo, desviación estándar) de las variables aleatorias de interés.

Se realizaron tablas de contingencia para valorar la posible relación o influencia de algunas de estas variables, con la presencia de sensibilización y/o alergia a los cebos vivos de pesca estudiados.

El análisis de los datos se realizó utilizando el software SPSS 12.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

### **3. CARACTERIZACIÓN ALERGÉNICA DE LOS EXTRACTOS.**

La caracterización alérgica, consiste en la identificación y purificación de los diferentes alérgenos de un extracto. En este trabajo, se realizaron técnicas de electroforesis, inmunotransferencia, inmunodetección e inhibición, que pasan a describirse a continuación.

#### **3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfatosódico (SDS-PAGE).**

##### **3.1.1. Fundamento teórico.**

Cualquier molécula cargada, se desplaza al ser expuesta en un campo eléctrico. Dado que las proteínas son moléculas con carga neta a cualquier pH distinto del punto isoelectrico, estas migran en un campo eléctrico, dependiendo de su densidad de carga (relación entre carga y masa). De este modo, se utiliza esta característica de las proteínas para llevar a cabo su separación. Actualmente, los soportes más utilizados son los que participan activamente en el proceso de separación, al interactuar físicamente con las partículas de migración (almidón, azarosa, poliacrilamida), cuyo tamaño de poro es del orden del tamaño de las moléculas a separar, y que proporcionan, por tanto, la posibilidad de separar proteínas según su carga y tamaño. Entre ellos, el soporte de acrilamida es el que mayores ventajas ofrece.

La mayoría de los estudios que emplean electroforesis zonal de proteínas, lo hacen mediante el empleo de condiciones desnaturizantes, de modo que las proteínas son disociadas y analizadas en sus unidades polipeptídicas individuales. Estos métodos, conocidos como electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) son ampliamente utilizados y se encuentran muy estandarizados.

### **3.1.2. Descripción de la SDS PAGE.**

Básicamente, se empleó el método originalmente propuesto por Laemmli <sup>68</sup> con ligeras modificaciones introducidas por los fabricantes de los equipos de electroforesis horizontal, utilizados para Mini-Protean II (Bio-Rad). Se utilizó un porcentaje de acrilamida del 12,5%.

El material utilizado se describe en el anexo 4.

#### **Preparación de las muestras.**

Las muestras se disolvieron en el tampón de muestra, a una concentración de 0,5 a 2 mg/mL de proteína calculada según el método Bradford <sup>58</sup>, llevándose a una temperatura de 100° C durante 5 minutos. Tras su enfriamiento, los restos insolubles se eliminaron por centrifugación a 14.000 r.p.m, en una centrifuga Micro (Hettich) durante 5 minutos, descartándose el precipitado.

#### **Condiciones electroforéticas.**

Tras el rellenado de la cubeta interior con el tampón de electroforesis y añadiendo el resto a la cubeta; se dispuso el patrón y las muestras en las calles con una pipeta en un volumen de 10 µL. La electroforesis se desarrolló a voltaje constante de 200 voltios durante 30 – 45 minutos. En ese momento se desconectó la fuente y se extrajo el gel de entre las dos placas.

#### **Tinción.**

El gel se colocó en una placa de Petri y se añadió la solución colorante de Coomassie. El exceso de colorante fue retirado mediante la solución decolorante, hasta que el fondo del gel quedó casi transparente (1 – 3 horas) y pudieron ser visualizadas las bandas del patrón y de las muestras.

#### **Determinación de Pesos Moleculares.**

Se realizó de acuerdo al método propuesto por Weber y Osborn<sup>69</sup>, construyendo una recta de calibrado, que representa la movilidad (en mm) de una serie de proteínas frente al logaritmo de su peso molecular (PM conocido).

La movilidad se midió desde el comienzo del gel separador hasta el punto medio de la banda. El peso molecular de las proteínas o péptidos de la muestra problema se determinó a partir de sus movilidades.

El patrón de proteínas, con PM de referencia, utilizado en este estudio, se puede ver en la tabla 8 (Amersham Biosciences).

<b>Proteínas</b>	<b>Pesos moleculares (kDa)</b>
Fosforilasa b	97.
Seroalbúmina bovina	66.
Ovoalbúmina	45.
Anhidrasa carbónica	30.
Inhibidor de tripsina	20.1
Lisozima	14.4

**Tabla 8. Estándares de pesos moleculares utilizados para técnicas de SDS-PAGE.**

### **3.2. Transferencia de bandas proteicas, separadas por electroforesis, a membranas inmovilizantes. Western blot.**

#### **3.2.1. Fundamento teórico.**

El proceso se define como la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a un filtro (matriz o membrana de inmovilización), que puede ser sometido a los tratamientos necesarios para la identificación de las manchas o bandas <sup>70</sup>. Las membranas de difluoruro de polivinilideno, como por ejemplo Immobilon P (Millipore, PVDF), presentan una mayor capacidad de adsorción y fijación de proteínas que las convencionales de nitrocelulosa y/o nylon.

### **3.2.2. Descripción. Inmunotransferencia (Western blot).**

La inmunotransferencia se basa en la electroelución de las proteínas del gel hacia los filtros, en condiciones que no necesitan corrientes eléctricas impracticablemente altas. Esta técnica fue usada por primera vez por Arnheim y Southern en 1977 <sup>71</sup>.

El método empleado en estos experimentos fue el método descrito por Towbin y cols <sup>72</sup>, que requiere de un equipo de transferencia Bio-Rad.

Los materiales utilizados se detallan en el anexo 4.

### **3.2.3. Método de transferencia semiseco.**

El gel de poliacrilamida, una vez finalizada su electroforesis, se sumergió en el tampón de transferencia, durante al menos 10 minutos, para retirar las sales y restos de detergente.

La membrana de PVDF y el papel de filtro se cortaron a la misma dimensión que el gel de poliacrilamida. Así, los componentes de la transferencia, en la placa del aparato, quedaron como sigue: papel de filtro (protean XL size. Bio-Rad) embebido en el tampón de transferencia - membrana de PVDF - gel de poliacrilamida - papel de filtro.

La transferencia se llevó a cabo mediante la aplicación de un voltaje entre 10 – 15 V (3 mA/cm<sup>2</sup>) durante un máximo de 45 minutos.

Una vez finalizado el proceso de transferencia, se retiró la membrana de PVDF, bien para ser teñida o procesada para inmunodetección.

**3.3. Inmunodetección de proteínas transferidas a membranas de PVDF.**

Se procedió de acuerdo al protocolo de Shen <sup>73</sup>, con ligeras modificaciones:

- a) Las membranas de PVDF transferidas se prepararon mediante tratamiento con metanol durante 10 segundos y posterior lavado en agua destilada durante 1 minuto.
- b) Posteriormente, se cortaron las diversas calles, que fueron incubadas individualmente.
- c) Se procedió a la saturación de la membrana con BSA 1% PBS-Tween durante 1 hora, en agitación suave y a temperatura ambiente, para evitar las uniones inespecíficas.
- d) La incubación de las membranas de PVDF, con el suero de los pacientes, se realizó durante 12 – 16 horas, en agitación constante y a una temperatura de 4° C. Los sueros de los pacientes, pueden emplearse individualmente (sin diluir) o agrupados (diluidos a 1:2, 1:5 y 1:10). Los anticuerpos no fijados se eliminaron mediante 4 lavados con tampón PBS.
- e) La adición del conjugado anti IgE humana marcada con peroxidasa de rábano (HRP-anti Ig E Dakopatt), diluida previamente 1:5000 en Tampón PBS-Tween 0.1%; a la membrana de PVDF, se realizó manteniéndose durante 2 horas en agitación y a temperatura ambiente.
- f) Los conjugados no fijados fueron eliminados, mediante lavados con tampón PBS, en agitación y a temperatura ambiente.
- g) El revelado del inmunocomplejo, se realizó usando un reactivo de detección quimioluminiscente, siguiendo las instrucciones que recomienda el fabricante (Western lightning plus. Perkin Elmer, Boston, USA).

### **3.4. Evaluación de bandas en SDS-PAGE e Inmunodetección.**

El peso molecular y la intensidad de las distintas bandas fueron evaluadas mediante un sistema de tratamiento de imagen, en base al empleo de un densitómetro Bio-Rad (Calibrated Imaging Densitometer GS 710) equipado con un sistema específico de análisis de imagen (Bio Rad Diversity Data Base). Mediante este equipo pudimos obtener las imágenes de los geles de electroforesis de poliacrilamida o de las membranas de PVDF, y la integración de los datos nos permitió conocer los pesos moleculares de cada banda, en función de sus movilidades comparadas respecto del patrón o estándar empleado, haciendo un análisis de regresión lineal entre las variables logaritmo del peso molecular y logaritmo de la movilidad, medido en “pixels”, exigiéndose una correlación  $r > 0.90$  entre ambas variables.

### **3.5. Estudios de reactividad cruzada *in vitro*.**

Los estudios de reactividad cruzada *in vitro*, se basan en la capacidad de los Ac IgE para unirse a proteínas o extractos proteicos distintos. Dichas proteínas, comparten determinantes antigénicos similares (epítomos B) que son capaces de reaccionar con el mismo sitio de unión del anticuerpo <sup>74</sup>.

Mediante las técnicas utilizadas en este estudio, se fijó un extracto A, a un soporte sólido y se estudió como reaccionaban frente a ese extracto, las IgE presentes en los sueros analizados, preincubados con diferentes concentraciones de un extracto B, en fase libre (líquida). Se utilizó una técnica global (análisis cuantitativo) como el ELISA inhibición y una técnica específica (análisis cualitativo), como el SDS-PAGE Inmunoblot inhibición, que realiza una separación electroforética de los componentes proteicos del extracto, antes de su adición a la fase sólida.

**3.5.1. ELISA inhibición.**

- a) El alérgeno en fase sólida se fijó a las placas microtiter de poliestireno de 96 pocillos a una concentración de 250 µg/ml.
- b) La fase libre se preparó mediante una batería de tubos con diferentes concentraciones del alérgeno inhibidor.
- c) En cada tubo se pusieron 200 µl de un pool de sueros, excepto en un tubo, en el que sólo se añadieron 200 µl de tampón de incubación. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 3 horas y en agitación orbital.
- d) Tras la adición de una solución de bloqueo, se añadieron 50 µl de la fase libre inhibidora, a diferentes concentraciones, a los pocillos seleccionados, y se dejó la placa en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente.
- e) La detección de la respuesta IgE y la medición de absorbancias, se realizó según los pasos previamente descritos en la técnica ELISA. (apartado 2.5)

La recta obtenida con los porcentajes de inhibición, a las diferentes concentraciones de cada alérgeno inhibidor, se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = 1 - \text{OD alérgeno inhibidor} / \text{OD sin inhibidor} \times 100$$

Una vez obtenida la recta de inhibición, se procedió al cálculo de la concentración del alérgeno inhibidor capaz de producir un 50% de inhibición (Ag 50).

**3.5.2. SDS-PAGE, inmunotransferencia e inmunotransferencia inhibición.**

Las bandas separadas electroforéticamente, en geles desnaturizantes de acrilamida al 12,5% en presencia de SDS (Sulfatododecil sódico), de las diferentes especies estudiadas, se transfirieron a una membrana de PVDF (Hybond P, Amersham Pharmacia Biotech. Uppsala, Suecia) de acuerdo a lo



descrito anteriormente por Towbin <sup>72</sup>. A continuación, la membrana se bloqueó con PBS-Tween 0,1% (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. Un pool de sueros de pacientes seleccionados, se añadió a la membrana en una proporción 1:10 con tampón de bloqueo y se dejó en agitación durante toda la noche a 4°C.

Para la técnica de western blot inhibición, el pool de sueros se preincubó con diferentes concentraciones de los extractos alérgicos de las especies seleccionadas, antes de su adición a las membranas de PVDF transferidas con las proteínas del extracto utilizado como fase sólida. Así, se obtuvieron 3 carriles en cada ensayo de blot inhibición; un primer carril en donde se añadió a la membrana el pool de sueros sin preincubar, y otros 2 carriles en los que se añadió el suero preincubado a varias concentraciones del extracto inhibidor en fase libre, durante 3 horas, a temperatura ambiente y en proporción 1/1.

Las siguientes fases; inmunodetección de la respuesta IgE y evaluación de las bandas alérgicas, se realizaron tal y como se ha descrito en los apartados previos 3.3 y 3.4.

#### **4. ESTANDARIZACIÓN BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DIAGNOSTICOS.**

La actividad biológica de los extractos alergénicos, se valoró mediante *prick test* en 20 pacientes alérgicos, de acuerdo al método de Aas <sup>64</sup> modificado por Mailing <sup>75</sup>, siguiendo los criterios de selección para estandarización de extractos alergénicos del estudio de Dreborg <sup>76</sup>.

Los extractos utilizados se diluyeron en solución salina fenolada 0.3% con glicerina al 50% y fueron probados por duplicado a tres concentraciones de 20, 2 y 0,2 mg/ml. Se realizaron pruebas cutáneas con la técnica de *prick* utilizando lancetas estandarizadas de 1 mm de punta (Dome Hollister, Leverkusen, Alemania) en la cara volar del antebrazo de los pacientes seleccionados, siguiendo las recomendaciones previamente descritas por Osterballe <sup>59</sup>. Las pruebas se realizaron en la cara anterior del antebrazo, por duplicado y disponiéndose en línea, con una separación de 3 cm. y desde 3 cm. debajo de la zona de flexión del codo, hasta 5 cm. antes de la zona de flexión de la muñeca. En el antebrazo opuesto y por duplicado y en sentido inverso se realizaron las pruebas de las tres diluciones, más el control positivo de histamina. Ningún paciente recibió medicación que interfiriera con la respuesta cutánea.

Se dibujó el contorno de las pápulas obtenidas con un rotulador de punta fina (Staedler F), sin estirar la piel, y se transfirió mediante una cinta adhesiva transparente (Scotch magic tape) a papel milimetrado para el cálculo de las áreas por planimetría mediante un programa específico (AUTOCAD), que expresaba las superficies en mm<sup>2</sup>.

Una vez obtenidas las áreas de cada pápula, correspondiente a cada una de las pruebas realizadas con los extractos y la histamina a 10 mg/ml, se definió el IC o Índice Cutáneo, como medida de la sensibilidad cutánea:

$$\text{IC} = \text{Área pápula de alérgeno} / \text{Área de histamina}$$

El valor HEP (Histamina Equivalente por Prick), se estableció sobre la base de la realización de las medias aritméticas de las áreas de las pápulas inducidas por las diferentes concentraciones del extracto, comparadas con las medias aritméticas de las áreas obtenidas con el clorhidrato de histamina 10 mg/ml, y mediante la realización de una recta de regresión entre las áreas de las pápulas y la concentración del extracto, que muestra el citado área de clorhidrato de histamina.

---

## **RESULTADOS**

## **1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.**

### **1.1. Muestras locales de Asticot.**

Como ya se describió en el apartado de obtención e identificación de la fuente alérgica (apartados 1.1, 1.2, materiales y métodos), se analizaron varias muestras de asticot, procedentes de 3 tiendas de artículos de pesca de la ciudad de Cáceres.

Tras el análisis anatómico pormenorizado, tanto de las larvas de tercer estadio, como de los imagos emergentes, se observó que el 100 % de los individuos pertenecían a la especie *Protophormia terraenovae*.

### **1.2. Especies importadas.**

Se procedió a la confirmación taxonómica de las especies de larvas de moscas importadas de Francia a través de las tiendas de deporte Decathlon (Madrid).

Las muestras venían identificadas con su nombre comercial y su correspondiente nombre científico como sigue:

Asticot..... *Protophormia terraenovae*.

Le Gozzer ..... *Calliphora vomitoria*.

Le Pinkie ..... *Lucilia caesar*.

Al analizar estas 3 muestras, se confirmó la presencia de dichas especies en cada lote correspondiente, excepto en el caso de “*le pinkie*” cuya especie no era *L. caesar*, sino *L. sericata*.

En los tres lotes analizados, no se observó, tras la identificación de un gran número de individuos, tanto en fase larvaria (n=50) como en su desarrollo posterior (n=125), contaminación con otras especies.

Por lo tanto, las especies de Califóridos analizadas a lo largo de este estudio se ordenaron taxonómicamente como sigue:

**Familia Calliphoridae.**

- Subfamilia *Calliphorinae*.
  - Genus: *Calliphora* (Robineau-Desvoidy, 1830).
    - Especie: ***Calliphora vomitoria*** (Linnaeus, 1758).
- Subfamilia *Chrysomyinae*.
  - Tribu Phormiini.
  - Genus: *Protophormia* (Townsend, 1908).
    - Especie: ***Protophormia terraenovae*** (Robineau-Desvoidy, 1830).
- Subfamilia *Luciliinae*.
  - Genus: *Lucilia* (Robineau-Desvoidy, 1830).
    - Especie: ***Lucilia sericata*** (Meigen, 1826).

**1.3. Observaciones anatómicas de las larvas en estadio 3 y de las moscas adultas.**

Se describen a continuación las características anatómicas diferenciales más significativas, observadas tras el análisis de las 3 especies de Califóridos.

**1.3.1. *Protophormia terraenovae*.****Larva 3.**

La longitud de las larvas analizadas llegó hasta los 17 mm (Fig. 14), algo más pequeñas que *C. vomitoria*, pero más grandes que *L. sericata*.

El último segmento de la larva tenía unos tubérculos puntiagudos muy desarrollados (Fig.15). Se observaron también unos espiráculos posteriores, con un débil botón peritremal (Fig.16) y unos espiráculos anteriores con 9-12 branquias cada uno (Fig.17).



**Fig. 14. Visión macroscópica: L 3 de *P. terraenovae*.**



**Fig 15. Tubérculos posteriores.  
*P.terraenovae*.**



**Fig. 16. Espiráculos posteriores.  
*P.terraenovae*.**

**Adulto.**

El cuerpo de los imagos analizados tenía un color azul metálico oscuro. La escama alar era marrón oscura y poblada de pelos negros en su mitad posterior, mientras que la escama torácica era de color oscuro y desnuda (Fig. 18).



**Fig. 17. Espiráculos anteriores.  
L 3. *P. terraenovae*.**



**Fig. 18. Escamas torácica y alar.  
Imago. *P. terraenovae*.**

### **1.3.2. *Calliphora vomitoria*.**

#### **Larva 3.**

Las mediciones realizadas, reflejaron tamaños de hasta 19 mm (Fig. 19). La cabeza de la larva presentaba los dos ganchos bucales iguales entre sí, con un pequeño esclerito entre ellos en forma de bastón (Fig. 20). El anillo peritremal era completo y bien quitinizado (Fig. 21) y los espiráculos anteriores presentaban entre 7-10 branquias cada uno (Fig. 22).

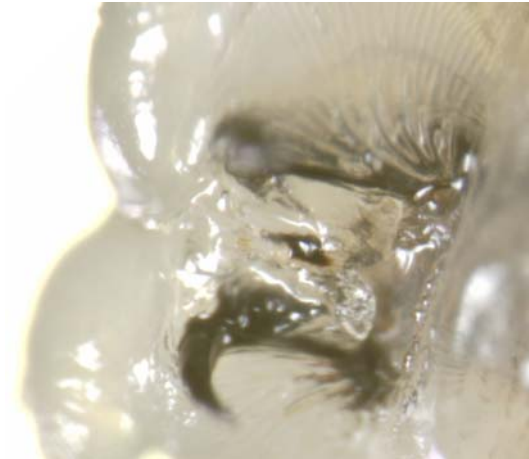
#### **Adultos.**

Los individuos analizados tenían una basicosta de color negro (Fig. 23). El tórax era azul oscuro y en la escama torácica pudo observarse como existían pelos oscuros y largos en su superficie dorsal (Fig. 24).





**Fig. 19. Visión macroscópica.  
L 3. *C. vomitoria*.**



**Figura 20. Ganchos bucales.  
L 3. *C. vomitoria*.**



**Fig 21. Espiráculos posteriores.  
L 3, *C. vomitoria*.**



**Fig 22. Espiráculos anteriores.  
L 3, *C. vomitoria*.**



**Fig. 23. Basicosta. Imago *C. vomitoria*.**



**Fig. 24. Escama torácica. Imago *C. vomitoria*.**

**1.3.3. *Lucilia sericata*.****Larva 3.**

Las larvas maduras midieron hasta 16 mm. Era la más pequeña de las especies analizadas (Fig. 25). Los espiráculos anteriores presentaban entre 7-8 branquias cada uno.

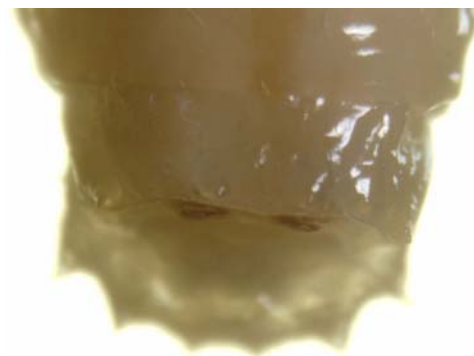


**Fig. 25. Visión macroscópica. L 3, *L. sericata*.**

Las fotografías tomadas de la parte posterior de estas larvas, revelaron unos espiráculos posteriores con un anillo peritremal estrecho y poco desarrollado, con un cuerpo radiado en cada uno de los ocales (Fig. 26).



**Fig. 26. Espiráculos posteriores.  
L 3, *L. sericata*.**



**Fig 27. Tubérculos posteriores.  
L. 3. *L. sericata*.**

También se observó, como la distancia entre los tubérculos interiores era casi igual a la distancia entre los interiores y los medios (Fig. 27).

**Adultos.**

Las características observadas más significativas fueron, el color verdoso metálico (Fig. 28), una escama torácica desnuda y una basicosta amarilla (Fig. 29).



**Fig. 28. Imago. *L. sericata*.**



**Fig. 29. Basicosta. Imago. *L. sericata*.**

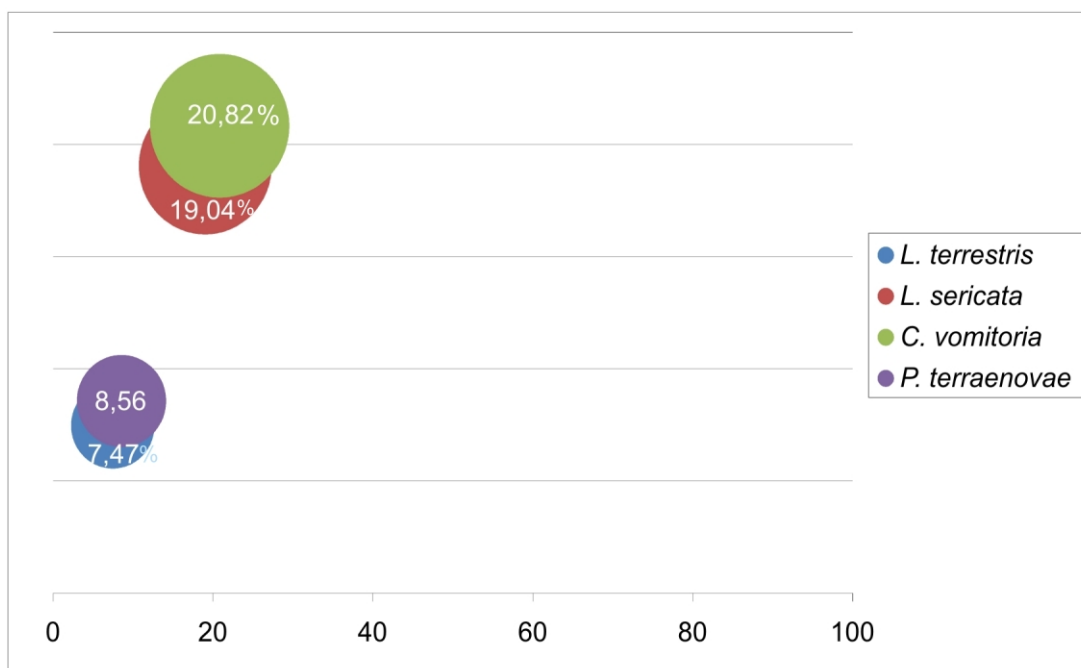
## 2. EXTRACTOS ALERGÉNICOS DE DIAGNÓSTICO.

Una vez seleccionada la materia prima y realizada la identificación taxonómica, se obtuvieron los siguientes extractos alergénicos, mediante la técnica descrita en el apartado 1.3 de materiales y métodos:

- Extracto de asticot local (*P. terraenovae*).
- Extracto de lombriz de tierra local.
- Extractos de *P. terraenovae*, *C. vomitoria*, *L. sericata* y *L. terrestris* obtenidos de las muestras importadas, compradas en tiendas de deporte Decathlon, Madrid.

Todos los extractos se conservaron liofilizados y se reconstituyeron en suero salino a 5 mg/ml para su uso en los estudios *in vivo* e *in vitro*.

En la siguiente gráfica (Fig. 30), podemos ver el porcentaje de proteína, calculada mediante el método Bradford, de los 4 extractos utilizados en el diagnóstico.



**Fig. 30. Contenido proteico de los extractos liofilizados. Método Bradford.**

### 3. ESTUDIO CLINICO-EPIDEMIOLOGICO.

#### 3.1. Reclutamiento de pacientes.

De los 316 pacientes seleccionados aleatoriamente del listado de la Sociedad de Pescadores de Cáceres, sobre un total de 1774 asociados, 72 no tenían teléfono de contacto, por lo que se realizó la comunicación a través de correo ordinario, sin obtener respuesta. Con ello, se partió de una muestra real de 244 socios con los que se contactó vía telefónica para explicarles el diseño experimental del proyecto, y la posibilidad de colaboración en el mismo. 72 pacientes mostraron su conformidad para su inclusión en el proyecto, aunque 4 pacientes no dieron su consentimiento para la extracción sanguínea.

#### 3.2. Clasificación de los pacientes.

En la figura 31, se expone como quedaron distribuidos los 72 pacientes seleccionados, tras la realización de los cuestionarios clínicos, las pruebas cutáneas y las determinaciones de IgE específica. Las pruebas cutáneas se realizaron con los extractos de asticot local (*P. terraenovae*) y lombriz de tierra local. Para las determinaciones de IgE específica se utilizaron los extractos de *P. terraenovae*, *C. vomitoria*, *L. sericata* y *L. terrestris*.

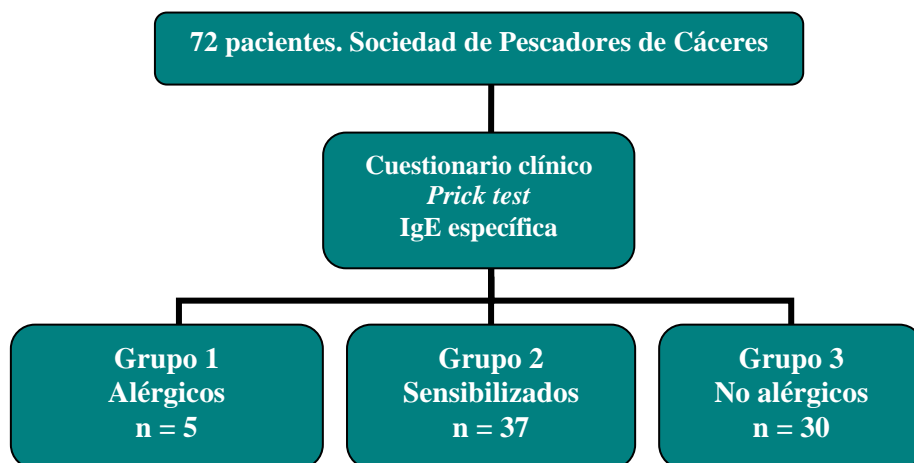


Fig. 31. Clasificación de los pacientes del estudio epidemiológico.

Del total de los 72 pacientes, se obtuvieron un 57% de sensibilizaciones a *P. terraenovae* y un 7% a lombriz de tierra. Por otro lado, hubo un 7% de pacientes alérgicos a *P. terraenovae* y ningún paciente alérgico a lombriz.

### **3.3. Características clínicas y hábitos de pesca.**

Se exponen a continuación los datos más relevantes, extraídos de la aplicación de los cuestionarios clínicos, en los 72 pacientes seleccionados de la Sociedad de Pescadores de Cáceres (Anexo 5).

65 eran hombres (90.3%) y 7 eran mujeres (9,7%), siendo la edad media de 43 años (6-80 años. Desviación estándar, 19 años).

El 94% de los pacientes utilizaban asticot como cebo principal. El 90% de los pacientes también declaró usar lombriz, aunque de manera ocasional, con mucha menos frecuencia que el asticot. Su afición se limitaba generalmente a los fines de semana (56% de los pacientes), durante los meses de primavera y verano (68%).

Un 42% de los pescadores (30 individuos) presentaba sintomatología de tipo respiratorio (rinitis y/o asma), con predominio de la afectación nasal aislada en un 56% (17 individuos) de los anteriores.

Del total de pacientes, 22 (31%) fueron atópicos, definidos como aquellos pacientes con al menos una reacción positiva en las pruebas cutáneas estándar con inhalantes convencionales. 17 de ellos presentaban síntomas de rinitis y/o asma.

5 pacientes (7%) relacionaron sus síntomas con la manipulación de cebos. Todos ellos utilizaban fundamentalmente asticot como cebo, y relacionaban sus síntomas con el mismo, aunque también utilizaban lombriz de tierra de manera ocasional. El síntoma más frecuente fue la conjuntivitis en forma de prurito, hiperemia conjuntival y lagrimeo, referido por 4 pacientes. 3 pacientes presentaron síntomas de rinitis y 1 paciente síntomas cutáneos (urticaria de

contacto). Ninguno desarrolló síntomas de asma bronquial. Los síntomas, de uno o dos años de evolución, aparecían tras haber usado este tipo de cebos durante 10 años o más.

**3.4. Resultado de las pruebas cutáneas.**

En el anexo 6, pueden observarse los resultados de las pruebas cutáneas con los extractos de asticot y lombriz en los 72 pacientes.

En la tabla 9, se muestra la distribución de los pacientes.

	<i>Prick Asticot</i>			<i>Prick Lombriz</i>		
	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>	<b>Total</b>	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>	<b>Total</b>
<b>Pacientes con historia clínica positiva (n=5)</b>	5	0	5	1	4	5
<b>Pacientes con historia clínica negativa (n=67)</b>	3	64	67	3	64	67
<b>Total</b>	8	64	72	4	68	72

**Tabla 9. Distribución de pacientes de la Sociedad de Pescadores en función de los resultados de las pruebas cutáneas con extracto de asticot y lombriz.**

Todos los pacientes que presentaron una historia clínica positiva de alergia a cebos de pesca, tuvieron una prueba cutánea positiva con el extracto de asticot. Un total de 8 pacientes mostraron pruebas cutáneas positivas frente al extracto de asticot (11.1%) y cuatro pacientes frente a extracto de lombriz (5.5%). 2 de los pacientes tuvieron una respuesta positiva frente a ambos extractos. De los ocho pacientes con una prueba cutánea positiva a asticot, 5 (pacientes 23, 27, 36, 61 y 65) presentaban síntomas relacionados con el uso de este cebo, y otros 3 (pacientes 6, 16, 51) se presentaron como sensibilizados asintomáticos. El paciente 61, con respuesta positiva a ambos

extractos, presentaba síntomas relacionados con el asticot. El resto de los pacientes con prueba cutánea positiva a lombriz (8, 51, 71) no comentaba síntomas con ningún cebo.

La prueba cutánea con asticot (*P. terraenovae*) obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad de 95.5% respecto a la historia clínica.

Como controles, no expuestos a cebos de pesca, se realizaron pruebas cutáneas con el extracto de asticot y lombriz en 20 pacientes consecutivos (10 pacientes atópicos y otros 10 no atópicos), que acudieron a la sección de Alergología del Complejo Hospitalario de Cáceres, con resultado negativo.

**3.5. Determinaciones de IgE específica.**

En la tabla 10, se resumen los resultados de determinaciones de IgE específica frente a los extractos de *P. terraenovae*, *C. vomitoria*, *L. sericata* y *L. terrestris*. Los datos de todas las determinaciones quedan reflejados en el anexo 6.

IgE específica UI/ml (ELISA)												
	<i>P. terraenovae</i>			<i>C. vomitoria</i>			<i>L. sericata</i>			<i>L. terrestris</i>		
	+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total
Historia positiva	5	0	5	1	4	5	0	5	5	0	5	5
Historia negativa	35	28	63	2	61	63	2	61	63	1	62	63
Total	40	28	68	3	65	68	2	66	68	1	67	68

**Tabla 10. Resultados de las determinaciones de IgE específica frente a *P. terraenovae*, *C. vomitoria*, *L. sericata* y *L. terrestris*.**

Considerando como positiva una prueba con unos valores  $\geq 0.7$  UI/ml, se observó que la *P. terraenovae* fue prácticamente la única especie con capacidad para inducir sensibilización, con evidencia de anticuerpos IgE



específicos en 40 de los 68 sueros analizados (58.8 %). Únicamente se obtuvieron 3 respuestas positivas a *C. vomitoria*, 2 frente a *L. sericata* (pacientes que también respondían a *P. terraenovae*) y 1 frente a *L. terrestris*. Sólo hubo 2 pacientes (nº 51 y 52) con IgE específica frente a las 3 especies de Califóridos, y ninguno de ellos reaccionó a *L. terrestris*. El único paciente que presentó IgE específica frente a *L. terrestris* (nº 66), no estaba sensibilizado a las especies de Califóridos.

Un porcentaje muy importante de las sensibilizaciones *in vitro* frente a *P. terraenovae*, mediante esta técnica, se correspondieron con pacientes que no presentaban síntomas alérgicos en relación con el uso de asticot (55.5% de sensibilizaciones asintomáticas). La especificidad de la determinación de IgE específica con *P. terraenovae* fue de un 44%, en relación con la historia clínica, aunque, como en las pruebas cutáneas, obtuvo una sensibilidad del 100%. Sólo un paciente, de los 5 con historia clínica positiva, presentó IgE específica positiva a *C. vomitoria* y ninguno a *L. sericata* y *L. terrestris* con lo que la sensibilidad de estos extractos fue insignificante.

Las determinaciones de IgE específica, en los 68 sueros analizados, demostraron unos niveles generalmente moderados (Clase 2 en el 97% de los pacientes) y ocasionalmente altos (Clase 3 en los pacientes 51 y 52).

Los controles realizados en pacientes sanos, no expuestos a cebos de pesca, fueron negativos.

### **3.6 Factores de riesgo.**

Se analizaron las posibles relaciones entre las variables demográficas, de atopia, y las relacionadas con los hábitos de pesca, con la presencia de sensibilización y/o alergia a asticot o lombriz de tierra.

Con respecto a la edad, los individuos fueron agrupados en ocho categorías diferentes. Sólo se observó una relación significativa entre edad y el desarrollo

de sensibilización a lombriz ( $p=0.0455$ ), aunque el número de pacientes sensibilizados fue muy pequeño. Así, 3 de los 5 pacientes sensibilizados, se encontraban en el grupo de edad entre los 13 y los 22 años.

Otro de los factores analizados fue la atopia. La presencia de sensibilización a aeroalérgenos convencionales, no predispuso a la sensibilización o al desarrollo de alergia a asticot y/o lombriz.

Los individuos fueron categorizados en 6 clases diferentes, en función del tiempo de exposición a estos cebos vivos. Se observó una relación positiva entre años de afición y sensibilización a asticot ( $p=0.0197$ ). A partir de los 20 años de afición a la pesca el número de pacientes sensibilizados (24) fue el doble que el de pacientes no sensibilizados. Por otro lado, no se encontró ninguna asociación entre el tiempo de exposición y el desarrollo de alergia a asticot, así como con la sensibilización o alergia a lombriz.

No se evidenció ningún tipo de asociación entre la frecuencia de uso del cebo (estructurado en 4 categorías: diario, semanal, mensual y anual) y las variables de sensibilización y/o alergia a ninguno de los cebos. Tampoco se halló relación significativa con el tipo de cebo utilizado, aunque existía un número muy pequeño de pacientes que utilizara sólo un tipo de cebo de manera exclusiva. Así, la mayoría de los pacientes quedaban englobados en el grupo de los que usaban asticot y lombriz (esta última, generalmente con mucha menos frecuencia).

#### **4. ESTUDIO ALERGOLÓGICO EN PACIENTES DE LA SERIE CLÍNICA.**

La serie clínica de pacientes alérgicos a cebos vivos de pesca se compuso de 12 pacientes. Los datos clínicos y los hábitos de pesca de los mismos, quedan expuestos en el anexo 7.

Todos eran varones, con edades comprendidas entre 15 y 45 años. El asticot fue el cebo más utilizado, con una frecuencia de uso semanal. Los pacientes presentaban síntomas de rinoconjuntivitis y/o urticaria de contacto, tras el uso de estos cebos, en casi todos los casos. Sólo hubo 2 pacientes con síntomas de asma bronquial.

El resultado de las pruebas realizadas en los 12 pacientes queda detallado en el anexo 8.

##### **4.1. Resultado de las pruebas cutáneas.**

Todos los pacientes tuvieron una prueba cutánea positiva con el extracto de asticot, con una media de 8.8 mm de diámetro mayor. 10 pacientes (83%) tuvieron una prueba cutánea positiva con el extracto de lombriz, con una media de 6.4 mm de diámetro mayor. Estos 10 pacientes también tuvieron la prueba positiva con asticot, ya que no hubo ningún paciente que respondiera solamente al extracto de lombriz.

##### **4.2. Provocaciones alérgeno-específicas en mucosas.**

Para las provocaciones específicas se utilizaron los extractos de asticot local (*P. terraenovae*) y lombriz de tierra local.

Se realizaron 9 provocaciones conjuntivales con asticot, obteniendo 8 resultados positivos. La concentración necesaria para conseguir una respuesta positiva fue 100 veces menor (0.05 mg/ml) que la utilizada para las pruebas cutáneas, en 6 de los pacientes.

Las 7 provocaciones conjuntivales con extracto de lombriz de tierra fueron positivas, en general a una concentración de 5 mg/ml.

7 de los 8 pacientes, en los que se realizaron provocaciones específicas con asticot y lombriz, reaccionaron a los dos extractos. De los 7 pacientes con provocaciones positivas a lombriz, sólo el n° 6 y el 9 no sabían precisar cuál era el cebo que le producía los síntomas. El resto, relacionaba sus síntomas claramente con el asticot.

Se realizó una provocación nasal con asticot en el paciente 1, que fue positiva a una concentración de 0.5 mg/ml. También se realizó una provocación nasal con extracto de lombriz en el paciente 8, que fue positiva a 0.5 mg/ml.

Las provocaciones conjuntivales, realizadas en 3 miembros del personal de la sección de Alergología, con los extractos de asticot y lombriz de tierra, a la máxima concentración (5mg/ml), fueron todas negativas.

#### **4.3. Cuantificación de niveles de IgE específica.**

La *P. terraenovae* fue la especie que obtuvo un mayor número de pacientes (7) con respuesta IgE específica >0.7 UI/ml. 4 pacientes presentaron IgE específica frente a *C. vomitoria*, 2 pacientes a *L. sericata* y 1 paciente a *L. terrestris*. Además, fue también la *P. terraenovae* la especie frente a la que se observaron niveles más elevados de anticuerpos IgE, con valores entre 1.3 y 13.7 UI/ml, presentando 4 pacientes niveles entre 11 y 14 UI/ml.

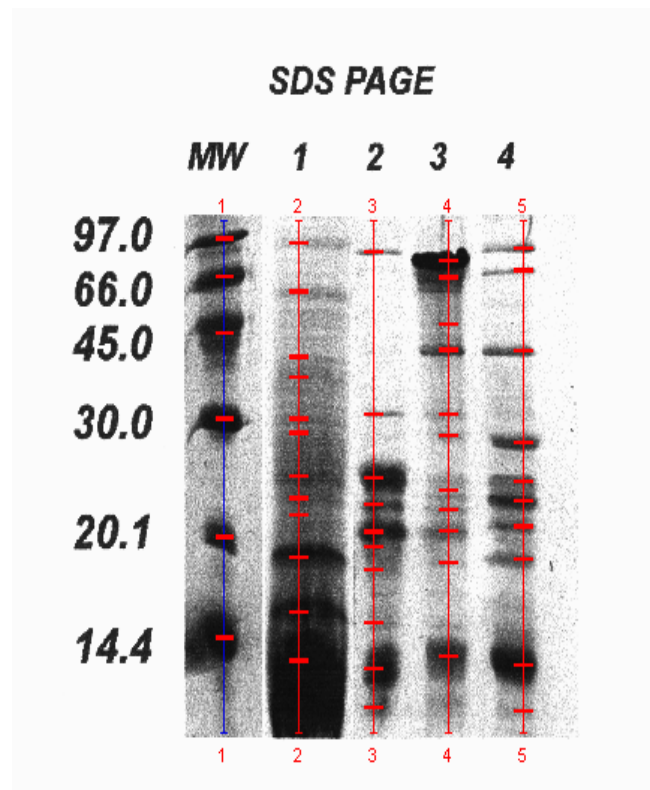
Sólo el paciente n° 3 presentó IgE específica frente a las tres especies de Califóridos y *L. terrestris*. Se observó, como 4 pacientes tuvieron Ac. IgE específicos dirigidos contra 2 o más especies (pacientes 2, 3, 6 y 7). Estos 4 pacientes fueron a su vez los mismos que tuvieron los niveles más altos de títulos de IgE frente a *P. terraenovae*.

## 5. CARACTERIZACIÓN DE ALÉRGENOS.

Se utilizaron para estos estudios los extractos de las especies importadas de *P. terraenovae*, *C. vomitoria*, *L. sericata* y *L. terrestris*.

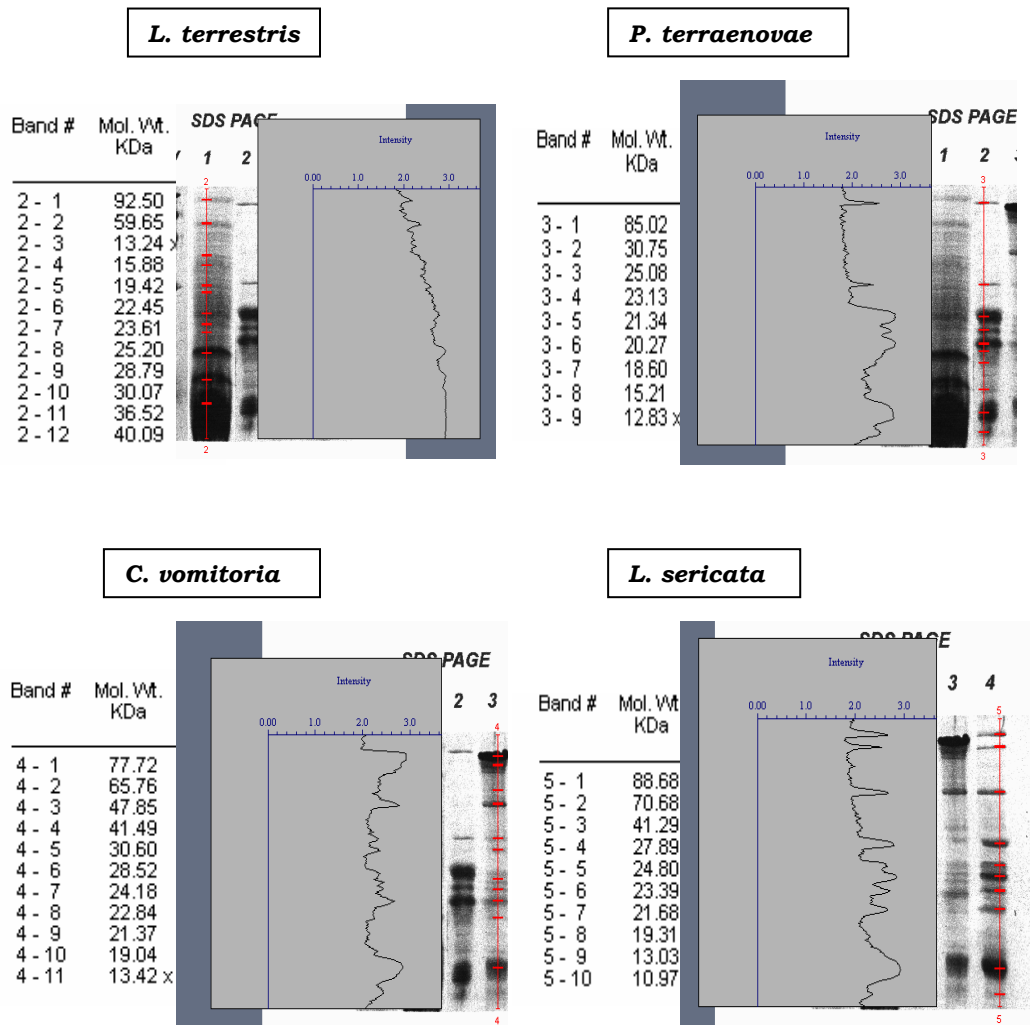
### 5.1. Análisis electroforético de extractos diagnósticos.

En la figura 32, se muestra el perfil de pesos moleculares obtenidos por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie, de los componentes proteicos presentes en los extractos de *P. terraenovae*, *C. vomitoria*, *L. sericata* y *L. terrestris*.



**Fig. 32. Electroforesis mediante técnica de SDS-PAGE.**  
MW: Pesos moleculares standard, 1: *L. terrestris*,  
2: *P. terraenovae*, 3: *C. vomitoria*, 4: *L. sericata*.

El patrón de pesos moleculares, fue muy similar en las 3 especies de Califóridos. El análisis de las bandas proteicas mediante el sistema Diversity Data Base de Bio Rad, se puede observar en la figura 33.



**Fig. 33. Análisis de concentraciones relativas (Bio Rad. Diversity Data Base). SDS-PAGE. Extractos de *L. terrestris*, *P. terraenovae*, *C. vomitoria* y *L. sericata*.**

Se observaron 12 componentes en el extracto de *L. terrestris* con PM entre 13.2 y 92.5 kDa. Se pudieron identificar 9 proteínas en el extracto de *P. terraenovae* (12.8-85 kDa), 11 en *C. vomitoria* (13.4-77.7 kDa) y 10 en *L. sericata* (10.9-88.6 kDa). Más del 60% de las proteínas se situaron en un rango inferior a los 30 kDa, en las 4 especies analizadas.

## **5.2. Determinación de bandas de reconocimiento de IgE.**

### **5.2.1. Selección de sueros.**

Para los estudios de identificación de alérgenos relevantes frente a cada una de las especies estudiadas, se seleccionaron sueros de pacientes con un diagnóstico de certeza de alergia a asticot y/o lombriz, de acuerdo con los síntomas clínicos y las pruebas complementarias.

Para ello se seleccionaron 11 pacientes de la serie clínica, con pruebas cutáneas e IgE específica positivas, así como provocaciones específicas en mucosas positivas en 10 de ellos (se correspondieron con los carriles 1-10 y 23 de los estudios de western blot).

Por otro lado, se cogieron otros 12 sueros provenientes del estudio epidemiológico realizado en miembros de la Sociedad de Pescadores, en base a los siguientes criterios: los pacientes 8, 16, 23, 27, 36, 39, 51, 61, 65 y 71 presentaron una prueba cutánea positiva con asticot y/o lombriz. El paciente 55 se escogió por sus altos niveles de IgE específica frente a *P. terraenovae* y el paciente 66 por ser el único con IgE específica frente a *L. terrestris*. Estos sueros se correspondieron con los carriles 11-22 de los estudios de western blot.

### **5.2.2. *Protophormia terraenovae*.**

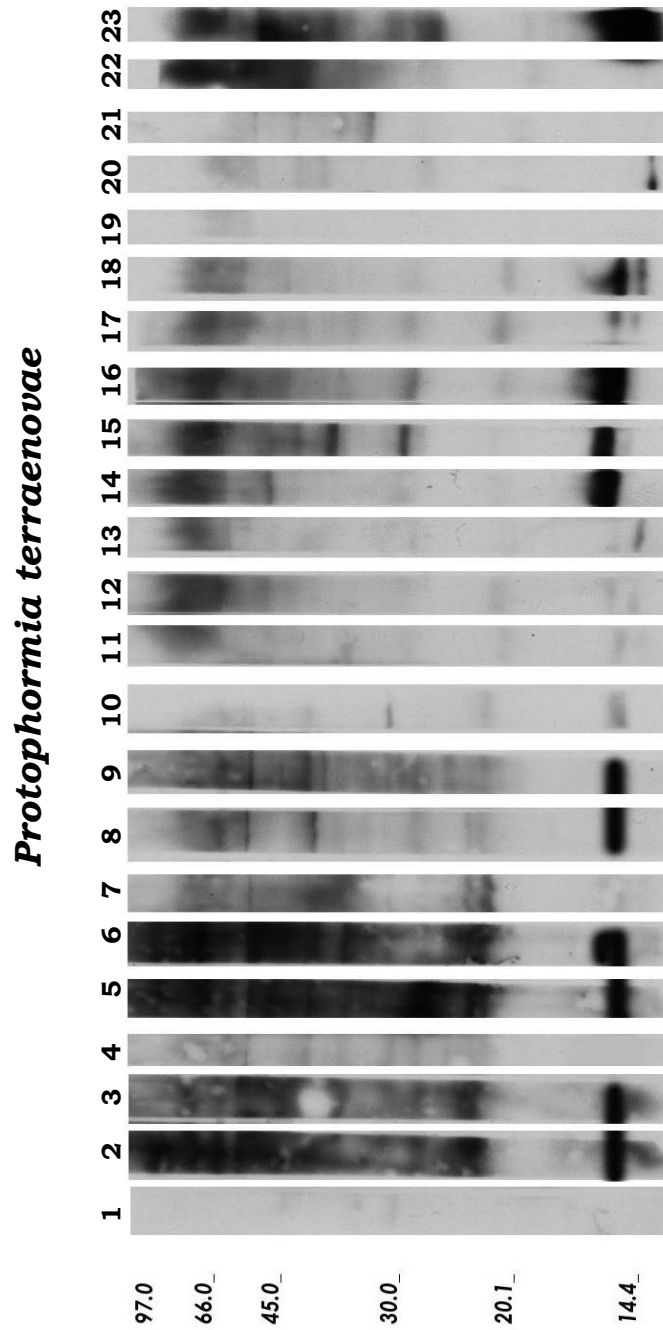
En la imagen de western blot frente al extracto de *P. terraenovae* (Fig. 34), se pudo observar como existía una banda alérgica claramente identificable en torno a los 15 kDa. Mediante el análisis con el software Diversity Database (tabla 11), esta banda tenía unos pesos moleculares que variaban en torno a 14.1 y 15.9 kDa con una media de 15.29 kDa, y que fue reconocida por 15 pacientes. También pudimos observar un alérgeno de entre 20 y 25 kDa reconocido por 8 pacientes.

Y por último, se pudo discriminar un alérgeno en un rango de 65.1-72.3 kDa reconocido por 10 pacientes.

En resumen, los alérgenos más significativos fueron:

1. 15.29 kDa (14.14-15.93)-----15 pacientes.
2. 69.29 kDa (65.13-72.34)-----10 pacientes.
3. 22.854 kDa (20.727-25.09)----- 8 pacientes.





**Fig. 34. SDS PAGE e Inmunoblot IgE del extracto de *P. terraenovae*. Carriles 1-10 y 23: Pacientes 1-10 y 11 respectivamente (serie clínica). Carriles 11-22: Pacientes 8, 16, 23, 27, 36, 51, 61, 65 y 71, 39, 52, 66 (Sociedad Pescadores).**



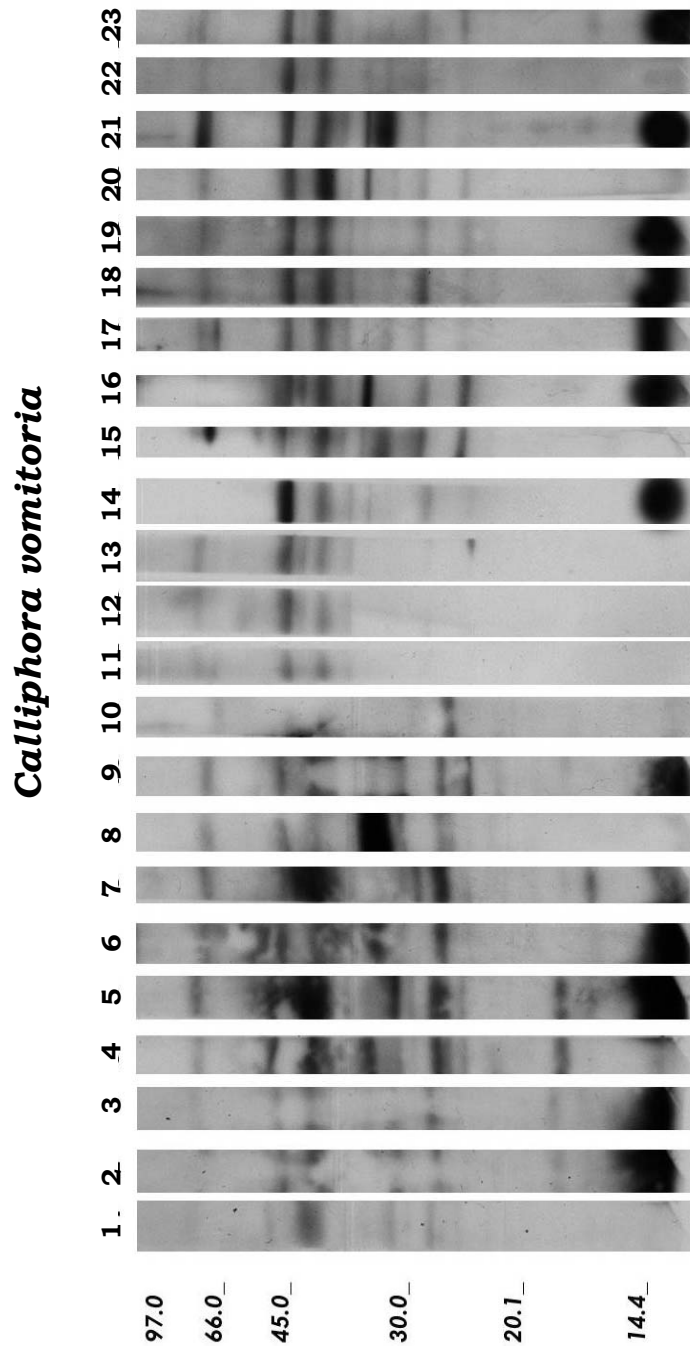
**5.2.3. *Calliphora vomitoria*.**

Podemos ver la imagen de los estudios con *C. vomitoria* (Fig 35) así como el análisis de las bandas con el software Diversity Database (tabla 12).

El patrón de reconocimiento de proteínas con capacidad para fijar la IgE de los sueros de los pacientes, parecía más claro que con *P. terraenovae* y se reconocieron 5 bandas principales. Destacó una intensa banda entre 13.32-14.75 kDa (media 14 kDa) reconocida por 15 pacientes. También una banda en torno a los 72 kDa reconocida por otros 14 sueros.

Las bandas más significativas se exponen a continuación:

1. 72.66 kDa (69.6-75.8)-----14 pacientes.
2. 45.82 kDa (44.205-48.848) -----13 pacientes.
3. 40.28 kDa (38.994-42.085) ----- 13 pacientes.
4. 27.98 kDa (28.733-27.056) -----17 pacientes.
5. 13.98 kDa (13.32-14.751)-----15 pacientes.



**Fig. 35. SDS PAGE e Inmunoblot IgE del extracto de *C. vomitoria*. Carriles 1-10 y 23: Pacientes 1-10 y 11 respectivamente (serie clínica). Carriles 12-22: Pacientes 8, 16, 23, 27, 36, 51, 61, 65 y 71, 39, 52, 66 (Sociedad Pescadores).**

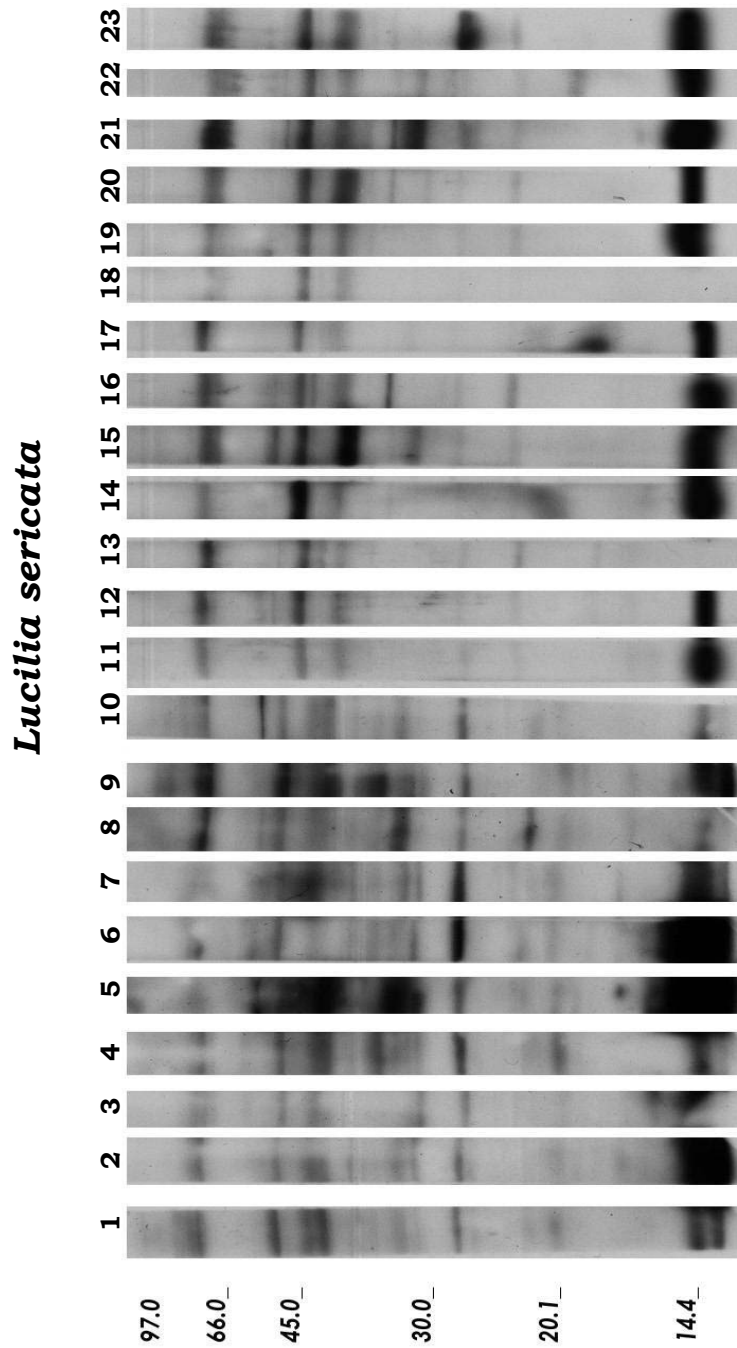


**5.2.4. *Lucilia sericata*.**

Se observaron 2 alérgenos principales o alérgenos mayores, reconocidos por 20 y 19 de los sueros, de 72 y 14 kDa respectivamente. Estos alérgenos, junto con otros 3, de aproximadamente 43, 39 y 26 kDa, conformaron un patrón de reconocimiento IgE muy similar al obtenido con *C. vomitoria* (Fig. 36).

En la siguiente lista se describen los principales alérgenos de *L. sericata* en nuestros pacientes (tabla 13):

1. 72.83 kDa (65.282-78.180)-----20 pacientes.
2. 43.79 kDa (42.813-44.974) -----17 pacientes.
3. 38.95 kDa (38.207-40.350)-----16 pacientes.
4. 26.83 kDa (26.518-27.997) -----14 pacientes.
5. 14.35 kDa (13.942-15.071)-----19 pacientes.



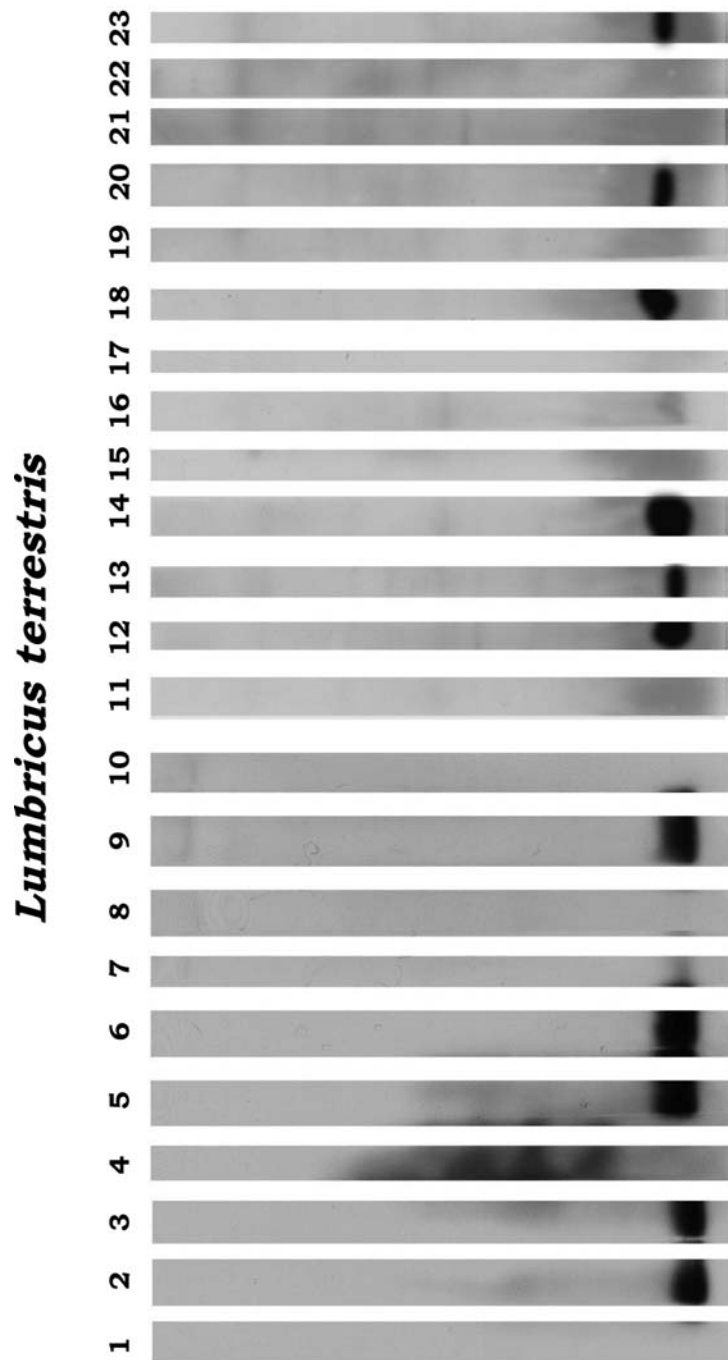
**Fig. 36. SDS PAGE e Inmunoblot IgE del extracto de *L. sericata*.  
Carriles 1-10 y 23: Pacientes serie clínica.  
Carriles 12-22: miembros Sociedad de Pescadores.**





**5.2.5. *Lumbricus terrestris*.**

En el western blot con extracto de *L. terrestris*, únicamente pudimos considerar un alérgeno en torno a los 15.5 kDa (rango entre 15.1-16.1), reconocido por 13 de los pacientes (Fig. 37, tabla 14). Era una banda que se reconocía de una manera muy intensa.



**Fig. 37. SDS PAGE e Inmunoblot IgE del extracto de *L. terrestris*.  
Carriles 1-10 y 23: Pacientes serie clínica.  
Carriles 12-22: Pacientes Sociedad Pescadores.**

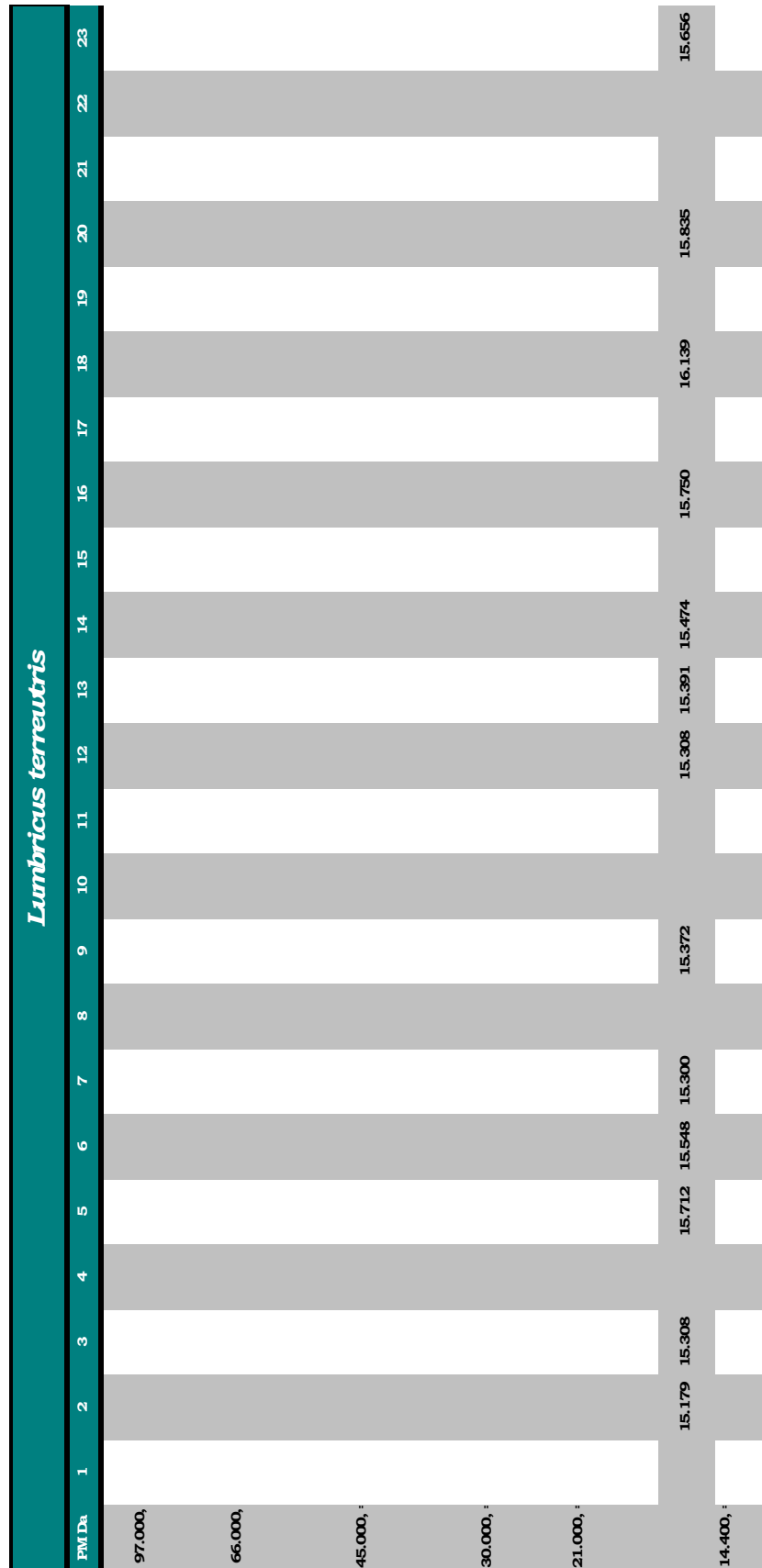


Tabla 14. Análisis de bandas fijadoras de IgE. Diversity Database. Extracto de *L. terrestris*.

### **5.3. Ensayos de reactividad cruzada.**

Los estudios realizados en nuestra serie clínica, pusieron de relieve una importante asociación inmunológica entre asticot y lombriz de tierra. Aunque la mayoría de los pacientes presentaba síntomas con el uso del asticot, muchos de ellos, tenían pruebas cutáneas y/o IgE específica positiva a asticot y lombriz, así como provocaciones específicas positivas con ambos. El uso de lombriz de tierra, era anecdótico en estos pacientes y dicha asociación, se sospechó que podría ser debida a alérgenos similares compartidos entre los dos tipos de cebo.

#### **5.3.1 ELISA inhibición.**

Como fase sólida se escogió el extracto de *P. terraenovae*, ya que, como se ha comentado anteriormente, fue con el que se alcanzaron mayor número de respuestas IgE específicas y niveles más elevados de dichos anticuerpos en los sueros analizados. Los alérgenos inhibidores en fase líquida, fueron los extractos de *P. terraenovae* (homólogo), *C. vomitoria*, *L. sericata* y *L. terrestris*.

El elemento trazador utilizado para este ensayo fue un pool de los 23 sueros utilizados para los estudios de western blot.

En la figura 38, se muestra la inhibición homóloga (*P. terraenovae* – *P. terraenovae*) y heteróloga (*L. sericata* – *P. terraenovae*, *C. vomitoria* – *P. terraenovae* y *L. terrestris* – *P. terraenovae*).

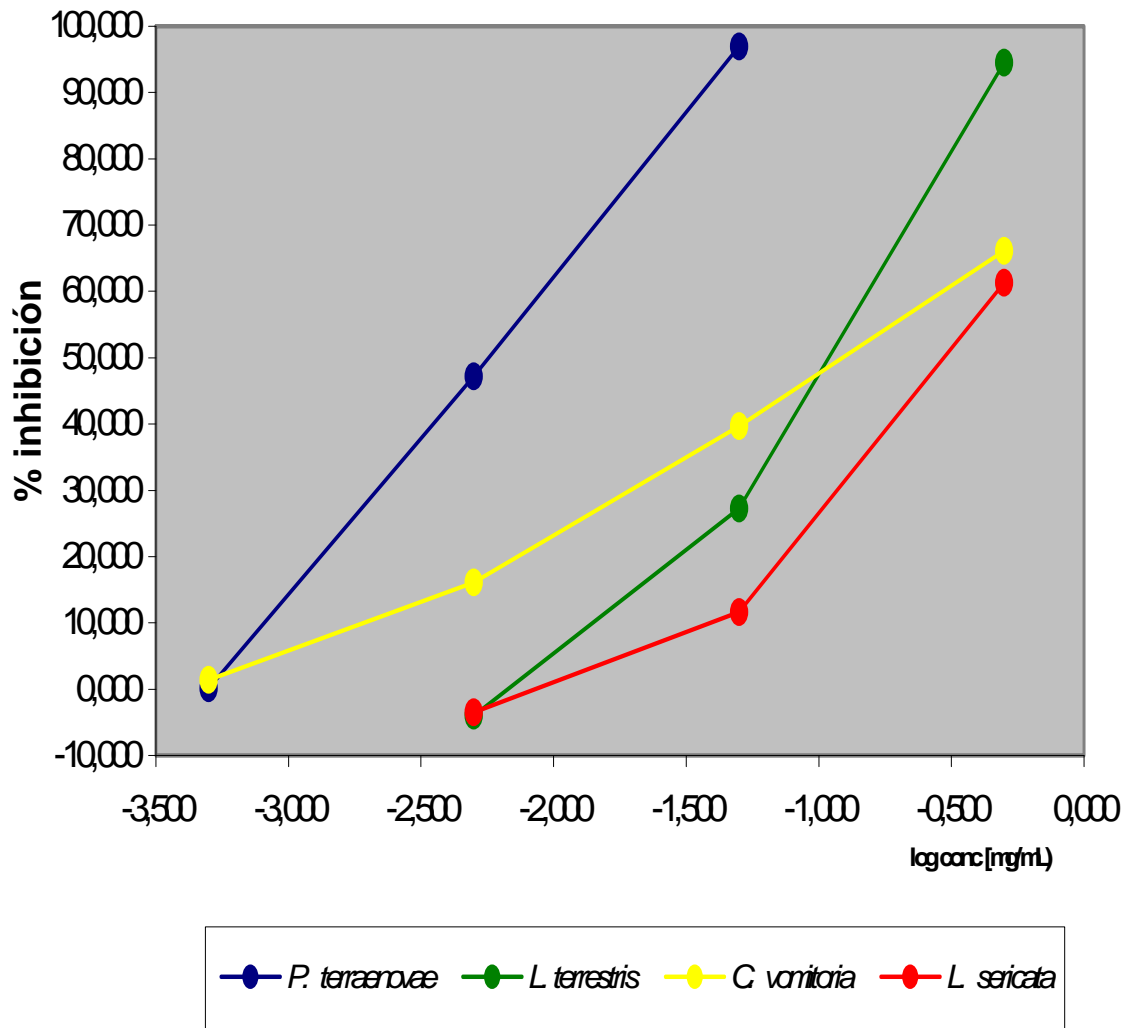
El homólogo, consiguió la inhibición más potente, con un 97% de inhibición a una concentración de 0.05 mg/ml. *Lumbricus terrestris* fue el segundo alérgeno con mayor potencia de inhibición de la respuesta frente a *P. terraenovae*, alcanzando casi el 95% de inhibición a la máxima concentración utilizada (0.5 mg/ml). Necesitó, por lo tanto, una concentración 10 veces mayor que el homólogo para conseguir una inhibición prácticamente

completa. Las otras dos especies de Califóridos, *C. vomitoria* y *L. sericata*, consiguieron un porcentaje de inhibición similar, 66% y 61% respectivamente, a la máxima concentración de 0.5 mg/ml (Tabla de datos en anexo 9).

El valor de la concentración de cada alérgeno que fue necesaria para conseguir una inhibición de la respuesta IgE del 50%, y expresado como Ag50, se presenta en la siguiente lista:

Ag50 <i>P. terraenovae</i> -----	5 µg/ml
Ag50 <i>L. terrestris</i> -----	81 µg/ml
Ag 50 <i>C. vomitoria</i> -----	117 µg/ml
Ag 50 <i>L. sericata</i> -----	286 µg/ml

*L. terrestris* necesitó una concentración 1.4 y 3.5 veces menor que *C. vomitoria* y *L. sericata* respectivamente para conseguir una inhibición del 50%. A su vez *L. terrestris* necesitó una concentración 16 mayor que el homólogo *P. terraenovae* para conseguir dicho grado de inhibición.



**Fig. 38. ELISA inhibición IgE. Fase sólida: *P. terraenovae*.  
Fase libre: *P. terraenovae*, *L. terrestris*, *C. vomitoria*, *L. sericata*.**

**5.3.2. SDS PAGE Inmunoblot IgE inhibición.**

Para dichos estudios, se utilizó un pool de 8 sueros de pacientes con pruebas cutáneas, provocación en mucosas e IgEs específicas positivas a asticot y lombriz. Fueron los pacientes 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 y 11 de la serie clínica.

Se hicieron 2 ensayos:

- Ensayo 1. Se utilizaron como fases sólidas los extractos de *P. terraenovae*, *C. vomitoria*, *L. sericata* y *L. terrestris*, separados electroforéticamente. El pool de sueros se preincubó con diferentes concentraciones del extracto de *L. terrestris*, que actuaba como fase libre inhibidora, antes de añadirlo a las membranas de PVDF transferidas.
- Ensayo 2. La fase sólida estaba formada por *L. terrestris*, y las fase libres utilizadas, fueron los extractos de *L. terrestris*, *P. terraenovae*, *C. vomitoria* y *L. sericata* a diferentes concentraciones, preincubadas con el pool de sueros antes de su adición a las membranas.

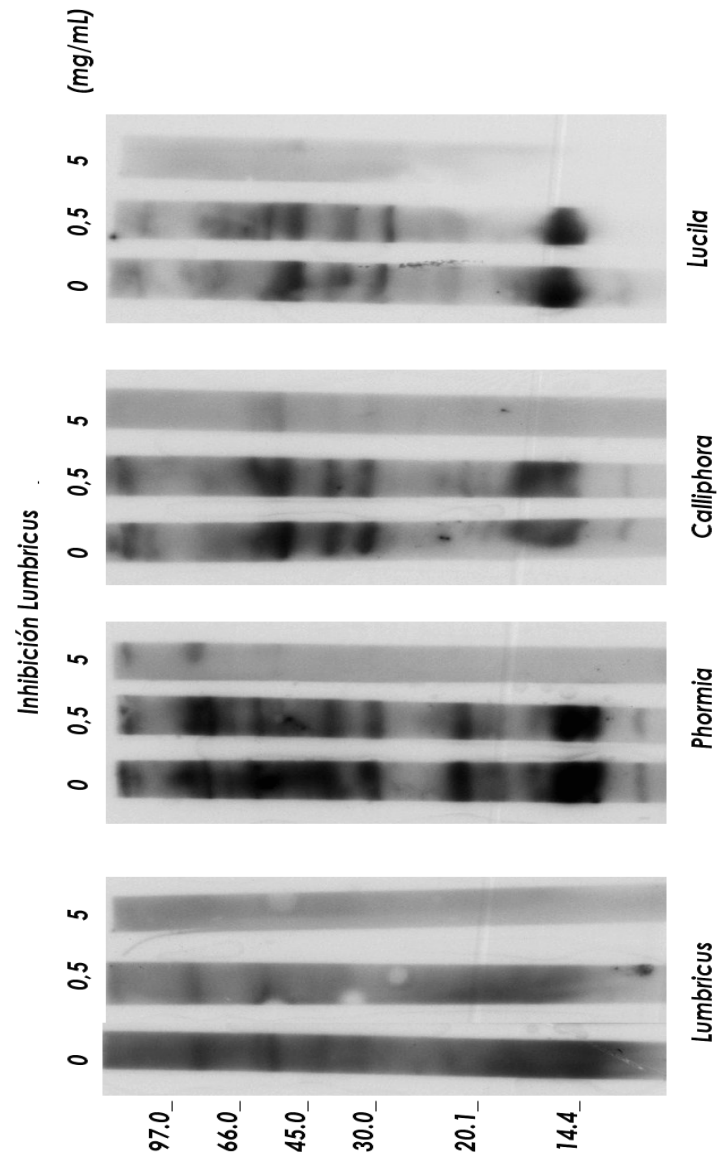
Los blots se hicieron por triplicado, con el pool de sueros sin preincubar (carril 1°), y tras preincubación con el alérgeno en fase libre a 0.5 y 5 mg/ml (carriles 2° y 3° respectivamente).

En la imagen (Fig. 39) podemos ver los resultados del ensayo 1. Se observó, como *L. terrestris* fue capaz de inhibir completamente la respuesta frente a su homólogo a una concentración de 5 mg/ml. También pudo inhibir completamente las bandas IgE específicas frente a los extractos de *L. sericata*. En el caso de *C. vomitoria*, *L. terrestris* a 5 mg/ml fue capaz de inhibir bandas con PM aproximado de 129, 16.5 y 15.1 kDa, persistiendo el reconocimiento (aunque con menor intensidad) de 3 bandas de 56, 40 y 32 kDa. *L. terrestris*, a la concentración de 5 mg/ml, también fue capaz de inhibir varias bandas de reconocimiento IgE frente al extracto de *P. terraenovae*. En este caso

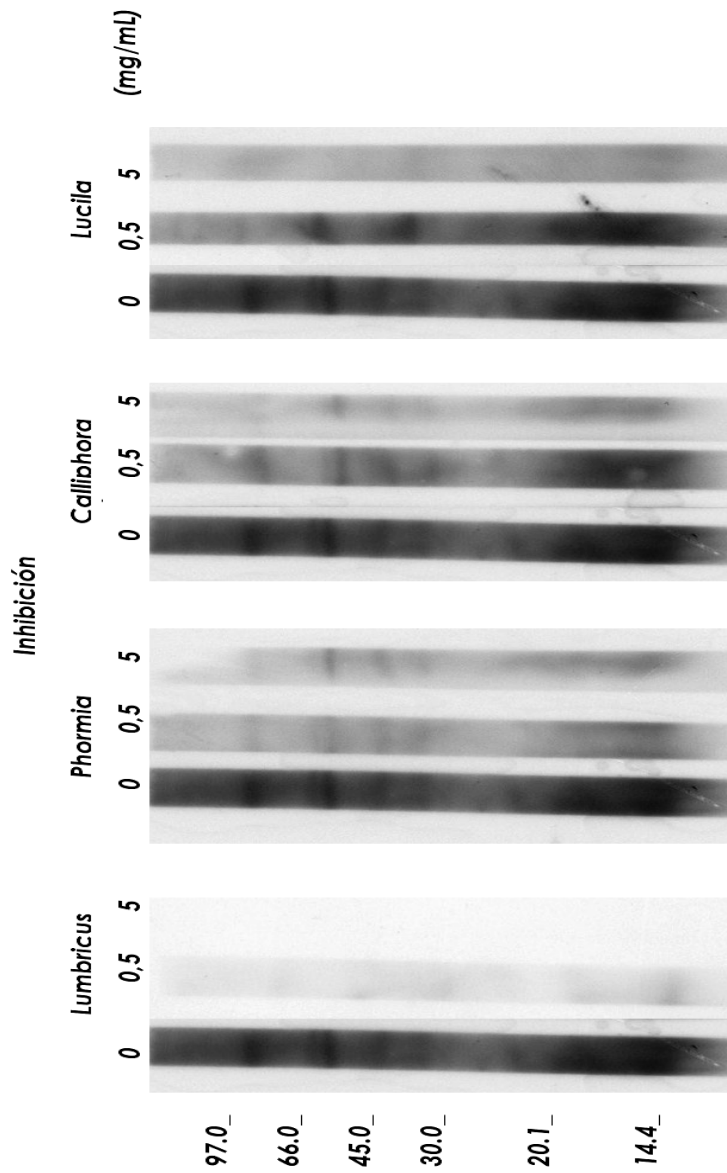
persistieron 2 bandas de 124 y 82 kDa y desaparecieron las bandas con PM aproximado de 65, 55, 48, 40, 30, 22, 19, 16.8 y 14.5 kDa.

En el ensayo 2. (Fig. 40), se pudo apreciar, como *L. terrestris* era capaz de inhibir completamente a su homólogo. Sin embargo, salvo *L. sericata*, los Califóridos estudiados sólo inhibían el área de reconocimiento entre los 15-20 kDa, persistiendo el reconocimiento de bandas en torno a los 85, 57, 44 y 36 kDa.





**Fig. 39.** Inmunoblot IgE inhibición. Fase sólida: extractos de *L. terrestris*, *P. terraenovae*, *C. vomitoria* y *L. sericata*. Fase libre: *L. terrestris* a 0.5 y 5 mg/ml.

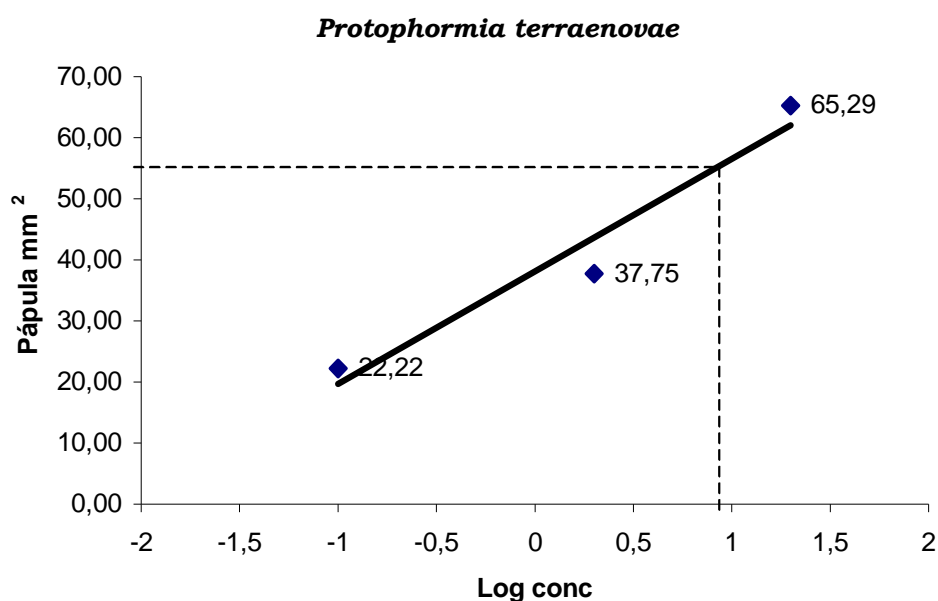


**Fig. 40. Inmunoblot IgE inhibición. Fase sólida: *L. terrestris*. Fase libre: *L. terrestris*, *P. terraenovae*, *C. vomitoria* y *L. sericata* (0.5 y 5 mg/ml).**

## 6. ESTANDARIZACIÓN BIOLÓGICA DE EXTRACTOS.

Con las concentraciones utilizadas, se pudieron estandarizar biológicamente los extractos de *P. terraenovae* y *C. vomitoria*. En el caso de *L. sericata*, el valor medio del área de la pápula producida por histamina, superó al obtenido por la máxima concentración del extracto, de 20 mg/ml. El extracto de *L. terrestris* no se pudo estandarizar, dado que no disponíamos de pacientes alérgicos a lombriz.

En la figura 41, se observa el valor HEP del extracto de *P. terraenovae*. Los tres puntos representan los datos de la media aritmética en mm<sup>2</sup> de las áreas de las pápulas, obtenidas en los 20 pacientes a las 3 concentraciones descritas de 0.2, 2 y 20 mg/ml (expresados como logaritmo de la concentración de alérgeno: -1, 0.3 y 1 respectivamente). Sobre esos tres puntos se trazó la línea de tendencia y sobre esa línea se aplicó el valor de la media aritmética obtenida con el control positivo de histamina, en los 20 pacientes descritos.

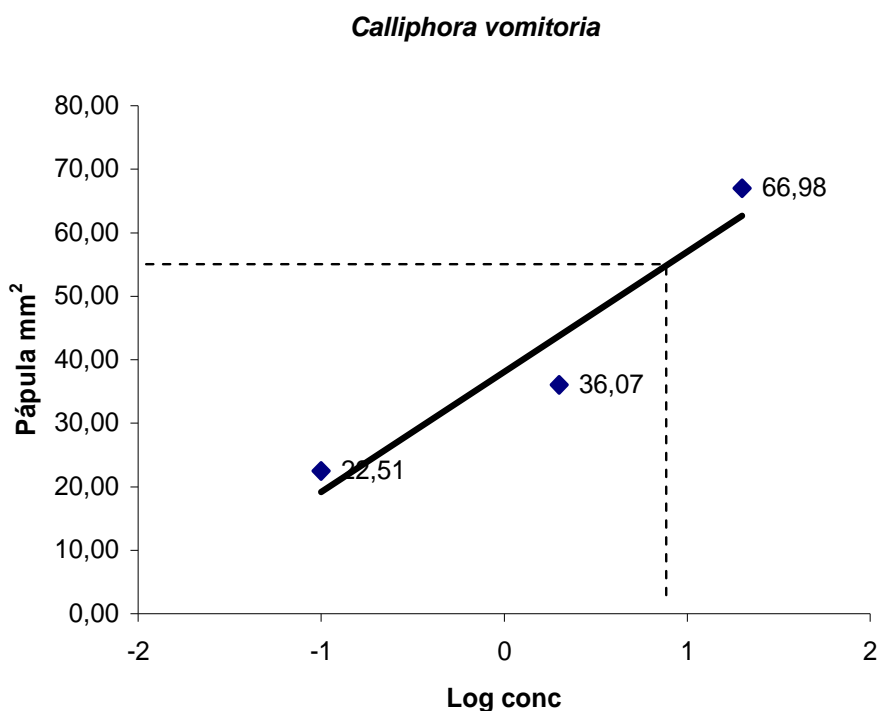


**Fig. 41. Estandarización biológica. Extracto *P. terraenovae*.**

En este caso, la media aritmética del control de histamina fue de 53.94 mm<sup>2</sup> y ello se correspondía con 0.83 Log concentración alérgeno, que fue igual a una concentración de 6.76 mg/ml. Por lo tanto, el valor HEP, o valor de concentración de alérgeno capaz de producir una respuesta igual a histamina, para el extracto de *P. terraenovae* fue de 6.76 mg/ml.

Los índices de reactividad cutánea (IC) serían 1.21, 0.69 y 0.41, para las concentraciones de 20, 2, y 0.2 mg/ml de extracto respectivamente.

La estandarización biológica del extracto de *C. vomitoria* nos dio un valor HEP de 0.88 Log concentración de alérgeno = 7.57 mg/ml (Fig. 42).



**Fig. 42. Estandarización biológica. Extracto *C. vomitoria*.**

El área media de pápula obtenida con histamina a 10 mg/ml fue de 55.91 mm<sup>2</sup>. Por lo tanto, los IC fueron de 1.19, 0.64 y 0.4 para las concentraciones de 20, 2 y 0.2 mg/ml del extracto de *C. vomitoria*, respectivamente.

---

## **DISCUSIÓN**

### **1. IMPORTANCIA ALERGÉNICA DEL CEBO VIVO EN PESCADORES.**

Todos los años, se publica algún caso clínico o se presentan comunicaciones sobre reacciones alérgicas a cebos de pesca vivos. Entre colegas, no es raro el cruce de información sobre pacientes con reacciones alérgicas por el uso de cebo vivo, sobre todo en Extremadura, con un alto grado de afición a la pesca. Alvarado (1996)<sup>32</sup> en Mérida y González (1999)<sup>33</sup> en Badajoz, describen los primeros casos en Extremadura de reacciones alérgicas por larvas de la “mosca de la carne” o asticot. Los primeros estudios de nuestro grupo sobre alergia a asticot <sup>34</sup> y a lombriz de tierra <sup>47</sup>, fueron el primer paso para plantearnos un estudio descriptivo que valorara la importancia real del uso del asticot, y otros cebos vivos, como fuente alergénica en pescadores de Cáceres. Hasta la fecha, aunque se han comunicado casos, generalmente de 1 ó 2 pacientes, de reacciones alérgicas por larvas de moscas en pescadores, no existe ningún tipo de estudio epidemiológico, realizado en población de aficionados a la pesca de agua dulce, expuestos a cebo vivo. No obstante, si que existen 2 estudios importantes, que engloban a un número similar de pacientes al del estudio objeto de esta tesis, y que valoraban la repercusión de algunas especies de Califóridos, en el desarrollo de alergia ocupacional <sup>30, 41</sup>. El presente trabajo, nos ha permitido conocer la frecuencia de presentación de las reacciones alérgicas por cebos vivos en pescadores, la forma de presentación de estas reacciones, y los cebos implicados, además de los hábitos de pesca en Cáceres.

#### **Frecuencia de reacciones alérgicas por *P. terraenovae*.**

En nuestro estudio, con 72 pacientes aficionados a la pesca, y grados de exposición a cebos muy variable, tras analizar los resultados de los cuestionarios clínicos, se obtuvo un 7% de pacientes (5) con síntomas relacionados con el uso de *P. terraenovae*. Ninguno de estos pacientes

asociaba sus síntomas con el uso de lombriz, y el uso de otros cebos de pesca era anecdótico en la muestra analizada. Es un porcentaje de pacientes similar al obtenido en el estudio de Siracusa (9.2%)<sup>30</sup>, e inferior al del estudio de Kaufman (28%)<sup>41</sup>, teniendo en cuenta las diferencias en el tiempo y tipo de exposición, y en la cantidad de cebo utilizado. En estos casos, los trabajadores estaban expuestos en cámaras o habitaciones estancas, durante 5 horas o más diarias y a una producción de miles de litros de cebo. Por lo tanto, la intensidad de la exposición no era comparable a la de los pescadores, que limitaban su actividad deportiva a los fines de semana, en meses de primavera y al aire libre.

### **Manifestaciones clínicas.**

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la alergia a *P. terraenovae*, consistieron en la aparición de síntomas de rinoconjuntivitis, de presentación inmediata al inicio de una jornada de pesca, lo cual se corresponde con las observaciones previas de Kaufman y Siracusa <sup>30,41</sup>. La urticaria de contacto, referida por uno de nuestros pacientes, también era una forma frecuente de presentación, descrita por los mismos autores, y en ocasiones manifestada en forma de angioedema palpebral, por contacto mano-ojo. La mayoría de los pacientes de la serie clínica presentaba también síntomas de urticaria de contacto o edema palpebral. No tuvimos ningún paciente con síntomas de asma, probablemente por el poco número de pacientes sintomáticos, y el poco tiempo de evolución de los síntomas, entre 1 y 2 años. En el estudio de Kaufman <sup>41</sup>, sus autores observaron que los síntomas de rinitis solían preceder al comienzo de los síntomas de asma. Este patrón de evolución es común en la patología alérgica respiratoria producida por aeroalérgenos. Así, la rinitis generalmente precede clínicamente o coincide con los síntomas de asma, en adolescentes y adultos. Además, la rinitis alérgica constituye un

factor de riesgo para el desarrollo de asma bronquial <sup>77</sup>. Por lo tanto, no es de extrañar, que en un seguimiento evolutivo, los pescadores alérgicos comiencen a presentar síntomas de asma bronquial, si continúan con la exposición a estos cebos. En este sentido es de un gran interés el diagnóstico etiológico precoz, con el que conseguiríamos frenar la evolución natural de la enfermedad.

### **Resultados de las pruebas cutáneas.**

Mediante la técnica del *prick test*, se obtuvieron un 11.1% de sensibilizaciones a *P. terraenovae* (8 pacientes) y un 5.5% (4 pacientes) a lombriz de tierra. No se pudo establecer una correlación clínica en los pacientes sensibilizados a lombriz de tierra, a pesar del uso que hacían de este cebo. Existían 3 pacientes con historia clínica negativa y una prueba cutánea positiva a *P. terraenovae*, lo que supuso un 4.1% de sensibilizaciones asintomáticas. No obstante, este dato no nos sorprende, en tanto que puede traducir la presencia de Ac IgE específicos frente a estos cebos, pero no necesariamente el desarrollo de una respuesta alérgica tras el contacto, así como sucede con otros alérgenos. Sería un reflejo de la exposición a estos alérgenos, si bien es difícil predecir la evolución hacia el desarrollo de síntomas, al no conocerse la historia natural de la enfermedad. Además, el porcentaje de falsos positivos fue bastante menor que el obtenido por otros autores <sup>30</sup>. El resultado negativo de las pruebas cutáneas en los pacientes controles, descartó un mecanismo irritativo.

La prueba cutánea con *P. terraenovae* se reveló como una técnica muy sensible, ya que todos los pacientes sintomáticos tenían la prueba positiva (sensibilidad 100%). Con ello, este extracto, utilizado en prueba cutánea, fue el ideal para confirmar el diagnóstico de alergia a asticot en esta población. La especificidad se redujo un poco, al 95.5%, debido a la existencia de 3 falsos



positivos. En los estudios de Siracusa <sup>30</sup>, la prueba cutánea con *C. vomitoria* fue positiva en 5 de los 7 pacientes sintomáticos y en 14 pacientes de los 69 asintomáticos. Por ello, la sensibilidad (71.4%) y especificidad (79.7%) de la prueba cutánea con este extracto, fue menor que la obtenida con el extracto de *P. terraenovae* de nuestro estudio. Esto puede ser debido a que en ese estudio se seleccionaron pacientes expuestos a diferentes tipos de cebos, y se dio el caso de que los extractos utilizados no siempre se correspondían con la especie a la que realmente estaban expuestos. Sin embargo, la población de pescadores de Cáceres era más uniforme en cuanto a la fuente de exposición, ya que la inmensa mayoría de los pacientes utilizaban asticot (94%) y lombriz (90%).

#### **Mediciones de IgE específica.**

Mediante las determinaciones de IgE específica frente a las 3 especies de *Califóridos* y *L. terrestris*, se observó como la especie *P. terraenovae* fue la especie con mayor capacidad sensibilizante. Se obtuvieron un 59% de sensibilizaciones mediante esta técnica. No obstante, se observaron un 55.5% de resultados positivos en pacientes con historia clínica negativa.

Pese al elevado porcentaje de sensibilizaciones asintomáticas, destacaba el hecho de que en el mismo grupo de pacientes no se produjera prácticamente respuesta a las otras 3 especies (aunque se haya comprobado reactividad cruzada entre ellas), lo cual, junto a los estudios negativos en los controles, descartaría la falta de validez de la técnica. Además, se repitieron las determinaciones a todos los pacientes en un segundo análisis, obteniendo resultados similares. En todo caso, este resultado confirmaría inmunológicamente, que nuestros pacientes están principalmente expuestos (y por ello sensibilizados) a larvas de *Protophormia terraenovae*, en concordancia con los estudios de identificación taxonómica comentados anteriormente.

Los pacientes 51 y 52 fueron los únicos que presentaron IgE específica a las 3 especies de dípteros, pero curiosamente no presentaban síntomas alérgicos en relación con el manejo de asticot. Además el paciente 51 tenía los niveles más elevados de IgE específica frente a *P. terraenovae* (6.32 UI/ml), y también una prueba cutánea positiva frente a *P. terraenovae* y lombriz. Se trataba de un paciente atópico, con antecedentes de rinoconjuntivitis y asma por pólenes de gramíneas y *Plantago*. La posible presencia de síntomas de alergia al asticot podría pasar desapercibida para este paciente, ya que la temporada de pesca coincide con la primavera. Al revisar individualmente todos los casos, esta podría ser la misma situación de otros pacientes (pacientes 24 y 57). Sin embargo el caso del paciente 52 era el de un paciente no atópico, con un resultado negativo en las pruebas cutáneas con *P. terraenovae* y lombriz, y con unos niveles moderados de IgE frente a *P. terraenovae* (3.59 UI/ml), que traducían una sensibilización subclínica, con un probable riesgo para el desarrollo de alergia a asticot en un futuro.

La sensibilidad de la determinación de IgE específica frente a *P. terraenovae*, mediante técnica de ELISA, fue del 100%, al igual que la obtenida con la prueba cutánea, pero en este caso a costa de un porcentaje muy elevado de falsos positivos, y como consecuencia una especificidad muy baja, del 44.5 %. Por lo tanto, esta técnica también resultó de utilidad para la confirmación del diagnóstico en pacientes con síntomas por el uso de asticot. Sin embargo, los extractos de *C. vomitoria* y *L. sericata*, no permitieron confirmar la sensibilización en estos pacientes y por lo tanto, no fueron válidos para el diagnóstico *in vitro*.

Esta falta de especificidad de las determinaciones de IgE frente a extractos de estas moscas, es comparable a los resultados obtenidos por el grupo de

Kaufman <sup>41</sup>, en donde hubo hasta un 33% de sensibilizaciones a *L. cuprina* en pacientes asintomáticos.

### **Características epidemiológicas.**

Mediante el análisis estadístico, se observó una asociación entre el número de años de afición a la pesca y el riesgo de sensibilización a *P. terraenovae*.

En un intento de conseguir información acerca de la intensidad de la exposición, se clasificó a los pacientes en expuestos diariamente, semanalmente, mensualmente y anualmente. Teniendo en cuenta la limitación de esta clasificación, no habiéndose estimado el tiempo de exposición diaria (por lo variable, al ser una afición no sometida a un horario de trabajo), no existieron diferencias significativas en ninguno de los grupos con respecto a la variable de sensibilización o alergia a los cebos. Los estudios de Siracusa <sup>30</sup>, tampoco demostraron relación entre el grado de exposición y la presencia de alergia a estas moscas.

La atopia, al igual que en los 2 estudios previos <sup>30,41</sup>, no aparecía como factor de riesgo para el desarrollo de sensibilización o alergia a asticot o lombriz.

El tipo de cebo utilizado no se pudo analizar como factor de riesgo, ya que la mayoría de los pacientes declaraban usar varios tipos, fundamentalmente asticot y lombriz (aunque esta última con mucha menos frecuencia).

No se pudieron establecer factores de riesgo para el desarrollo de alergia a asticot.

### **Potencial alergénico de *P. terraenovae*.**

Considerando en conjunto los resultados de los cuestionarios clínicos, las pruebas cutáneas y las mediciones de IgE específica, hubo un 7% de prevalencia de alergia a *P. terraenovae*.

Si aplicamos nuestros criterios para considerar a un paciente alérgico a los estudios de Siracusa<sup>30</sup> y Kaufman<sup>41</sup>, la prevalencia de reacciones alérgicas por

Califóridos, en pacientes expuestos de manera ocupacional, es en ocasiones menor que en este trabajo. En el estudio de Siracusa <sup>30</sup>, se observaron sólo 2 casos de pacientes alérgicos a *C. vomitoria* (pese a ser el cebo más utilizado), un 2.6% del total, si bien, sí que era la especie más sensibilizante, con un 24% de pruebas cutáneas positivas en el total de la muestra. En el estudio de Kaufman <sup>41</sup>, siguiendo los mismos criterios, del 28% de pacientes inicial con síntomas alérgicos en relación con *L. cuprina*, solo se pudo confirmar un mecanismo IgE en 10 pacientes, un 18% del total. Nos encontramos, por lo tanto dentro de los rangos de prevalencia de reacciones alérgicas por Califóridos, descrita por dichos autores.

El potencial alergénico de la *P. terraenovae* parece ser mayor que el de otros Califóridos, siendo capaz de producir reacciones alérgicas en pescadores aficionados, con un grado de exposición mínimo. Sin embargo, hasta la fecha, la mayoría de los autores sólo han descrito especies de los géneros *Calliphora spp* y *Lucilia spp*, y al centrarnos en los estudios de los autores españoles sólo se describen larvas del género *Calliphora spp* como causantes de reacciones alérgicas en pescadores. Sólo existe una comunicación a nivel regional (Sesiones interhospitalarias. Sociedad de Madrid-Castilla la Mancha de Alergología e Inmunología Clínica) de la Dra. Cabañes (1996)<sup>37</sup>, que hacía referencia a una dependienta de una tienda de artículos de pesca, con síntomas de rinoconjuntivitis y asma en relación con la exposición a la zona donde se almacenaba el cebo vivo, identificado por el departamento de entomología de la UCM como *P. terraenovae*.

Por lo tanto, nuestro grupo es el primero en reflejar la importancia de la *P. terraenovae*, como nueva especie alergénica a tener en cuenta en aficionados a la pesca deportiva de agua dulce.

## **2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.**

Uno de nuestros objetivos, fue la identificación taxonómica de la o las especies que componían el asticot, comercializado en tiendas de artículos de pesca de Cáceres. La falta de identificación de la fuente de exposición, y de la materia prima utilizada para la elaboración de extractos diagnósticos, constituye un doble problema, que puede generar errores en cuanto a la importancia alérgica de algunos cebos vivos.

Este problema se traslada a los estudios realizados por los diversos autores. Unos hacían referencia a la larva de la mosca de la carne <sup>26,38</sup>, a asticot <sup>33,34</sup> o a un género completo <sup>25,36</sup>, sin identificación de la especie de mosca concreta. Otro autores, identificaban varias especies, como *C. erythrocephala* <sup>27,35,78</sup>, *C. vomitoria* <sup>24,30,31,39</sup>, *L. caesar* <sup>28,29</sup>, *P. terraenovae* <sup>37</sup> y *Musca domestica*.<sup>79,80</sup>, pero en ninguno de ellos existía constancia de las claves de identificación taxonómica utilizadas, o de si la identificación había sido hecha por expertos. Varios autores, identificaban a la “mosca azul” (“*bluebottle*” en la literatura anglosajona) con la especie *Calliphora vomitoria* <sup>36,41,49</sup> y a la “mosca verde” (“*greenbottle*”) con la especie *Lucilia caesar* <sup>28,29</sup>. La característica del color verde, por ejemplo, puede aplicarse a todo el género *Lucilia spp*, pero no es exclusiva de este género. Además, las diferencias entre una especie y otra, dentro de un mismo género, como por ejemplo entre *Lucilia sericata* y *L. caesar* pueden variar sólo en la coloración de la basicosta (segunda escama lisa situada en la base del ala), siendo las dos, por supuesto, de una coloración verde metálica.

Incluso, en estudios bien documentados como el de Siracusa <sup>30</sup>, sobre trabajadores en granjas de cría de estas larvas, la referencia a “*bluebottle*” como *C. vomitoria*, podría no ser correcta. Los autores no especificaban si la información sobre dicha especie provenía de la misma empresa o si se realizó

una identificación por expertos. Y es que, la información suministrada por las empresas que se dedican a la cría de este tipo de cebos, puede ser errónea. Las experiencias obtenidas de este estudio constituyen un ejemplo. Al ponernos en contacto con el productor de asticot a nivel nacional (ubicado en Zamora), pudimos comprobar, que no tenía constancia de la especie concreta de mosca que estaba criando, e incluso, nos dio información contradictoria, ya que hizo referencia a la especie *Sarcophaga carnaria*, como especie originaria de Francia con la que inició su producción. La cadena de producción del asticot, descrita en el apartado 4.1 de la introducción, se basa en la breve información suministrada directamente por el productor, ya que no tuvimos acceso a la fábrica en donde se realizaba la producción diaria, siendo conscientes, por lo tanto, de que este sistema descrito podría no coincidir plenamente con el que se está llevando a cabo en la actualidad. Por otro lado, el análisis de las muestras de asticot, importadas por las tiendas de deporte Decathlon, confirmó un error en el etiquetado, ya que la especie *L. caesar* era realmente *L. sericata*, lo que nos hizo reafirmarnos en nuestra sospecha inicial. Debido a todo ello, pensamos que no se puede utilizar la información suministrada por los fabricantes de cebo para identificar las especies.

Además, la identificación de una mosca en fase larvaria siempre es más complicada, (aunque se han expuesto las claves de identificación más significativas en las tres especies de Califóridos) y fue necesario esperar al desarrollo completo del individuo para la confirmación taxonómica definitiva. Aún así, esta identificación sólo puede ser llevada a cabo por expertos, y el único grupo que cumplía este requisito, en estudios de reacciones alérgicas por Califóridos, fue el grupo de Kaufman y Baldo<sup>40,41,43</sup>, ya que los pacientes estudiados eran entomólogos que formaban parte de un proyecto de investigación sobre *L. cuprina*.

El análisis del asticot comercializado en Cáceres, tanto de la fase larvaria como de la mosca adulta demostró que nos encontrábamos *ante P. terraenovae*. Por lo tanto, nuestros pescadores se hallaban expuestos a una especie de Díptero Califórico, la *P. terraenovae*, que no forma parte de la entomofauna autóctona, pero que puede estar siendo introducida en grandes cantidades en nuestro ecosistema, sin ningún tipo de control. Esta especie “importada”, ha comenzado a producir reacciones alérgicas entre nuestros pescadores y probablemente comience a aparecer como causante de miasis en cabezas de ganado o en casos de entomología forense en nuestra región.

El proceso de investigación, para la selección e identificación de las especies de dípteros, responsables del desarrollo de patología alérgica respiratoria en los pescadores de Cáceres, ha sido laborioso. La recogida de muestras asticot de varias tiendas locales de artículos de pesca, se siguió de la visita a la empresa productora de asticot. Al no obtener información fidedigna, sólo la identificación taxonómica de las muestras, realizada por expertos, y llevada a cabo tras el desarrollo del ciclo biológico completo de las moscas, permitió conocer la especie concreta de mosca que manejaban los pescadores. Por otro lado, el sorprendente hallazgo de varias especies de Califóricos importadas, comercializadas para su uso como cebo vivo, y su confirmación taxonómica posterior, hizo que dispusiéramos de materia prima bien identificada para la realización de los estudios *in vitro*.

Los resultados de sensibilidad de las determinaciones de IgE específica frente a los extractos de *C. vomitoria* y *L. sericata*, en la población estudiada, suponen un ejemplo del incremento de falsos negativos que podríamos obtener, si no se hubiera hecho una buena selección e identificación de la fuente alérgica, a la cual estaban expuestos los pacientes. No se demostró una reactividad cruzada completa (identidad alérgica total) entre *P.*

*terraenovae*, *C. vomitoria* y *L. sericata*, por lo que existían alérgenos específicos de especie. Por lo tanto, la elección de cualquier otra especie de Califórido, prácticamente indiferenciable a nivel larvario, que no fuera *P. terraenovae*, podría dar errores en el diagnóstico.

### **3. CARACTERIZACIÓN ALERGÉNICA.**

En los estudios de western blot, hemos podido observar, cómo existía un patrón de reconocimiento prácticamente especular frente a los extractos de larvas de *C. vomitoria* y *L. sericata*. Se observaron 5 alérgenos mayoritarios de PM en torno a 14, 26-27, 39-40, 44-45 y 72 kDa. Por otro lado, los resultados obtenidos del western blot, con el extracto de *P. terraenovae*, reflejaron un alérgeno mayoritario en torno a los 15 kDa y otros 2 alérgenos de 22 y 69 kDa, que en principio no se correspondían con los observados para *C. vomitoria* y *L. sericata*. Por último, sólo existía un alérgeno significativo reconocido por 13 pacientes en el extracto de *L. terrestris* con un PM promedio de 15.5 kDa y que se situaba en un área muy similar al de 15.3 kDa presente en *P. terraenovae*. La presencia de estos alérgenos de PM similares en varias de las especies de Califóridos estudiadas y en *L. terrestris*, no significa que sean las mismas proteínas, pero sugiere la posibilidad de un alto grado de homología estructural.

En el único caso clínico previo descrito de alergia a *P. terraenovae*, los estudios de inmunoblot demostraron la presencia de un alérgeno de 80 y otro de 22 kDa. Ese alérgeno de 22 kDa podría corresponderse con el observado en este estudio, y sin embargo, no parece ser relevante en los otros dos Califóridos.

En la segunda parte del estudio de Baldo y Kaufman <sup>43</sup>, sobre la identificación de alérgenos en *Lucilia cuprina* y otras especies de moscas, se puso de manifiesto, cómo esta especie era capaz de producir sensibilización en



cualquiera de los estadios de desarrollo, desde el huevo, pasando por la fase larvaria hasta el adulto, si bien, parecía que cuanto mayor era el grado de desarrollo, había un mayor reconocimiento antigénico, y que también existían alérgenos específicos de cada estadio. Ese estudio es el único comparable al nuestro, ya que engloba pacientes expuestos a una especie concreta de mosca, y no pacientes con diagnóstico de alergia por inhalación a insectos muy heterogéneos y no especificados <sup>42</sup>. En ese estudio, aunque se analizaron otras especies, sí que se obtuvieron datos sobre la identificación de alérgenos de moscas del genus *Lucilia* y *Calliphora*. El alérgeno mayoritario, tanto en extractos de mosca adulta como en larvas de *L. cuprina*, de 67 kDa, podría corresponderse con el que hemos observado de 69 kDa en *P. terraenovae* (rango entre 65 y 72 kDa). Probablemente existirían más analogías, si hiciéramos comparaciones de los resultados obtenidos por el grupo de Kaufman, con los alérgenos individuales de cada uno de los pacientes seleccionados. No obstante, parece muy aventurado si quiera, asumir una identidad alérgica en base a la similitud en el peso molecular, al comparar con otros estudios en los que se valoran pacientes expuestos a otras especies de moscas, y ni que decir tiene cuando se comparan nuestros resultados con los de otros autores, en los que ni siquiera tenemos constancia de a qué insectos estaban expuestos realmente.

#### **Reactividad cruzada.**

Los resultados obtenidos tras el estudio de los pacientes alérgicos a cebos vivos, pusieron de relieve la posible existencia de reactividad cruzada inmunológica entre *P. terraenovae* y *L. terrestris*. Ninguno de los pacientes de la Sociedad de Pescadores, implicaba a la lombriz en el desarrollo de sus síntomas, y tampoco los pacientes de la serie clínica, excepto uno. Sin embargo 10 pacientes de la serie clínica presentaron una prueba cutánea

positiva a *P. terraenovae* y a lombriz, y 7 pacientes, provocaciones específicas positivas con ambos. Además, la intensidad de la respuesta observada al extracto de *P. terraenovae*, era mayor que al extracto de lombriz de tierra, tanto en prueba cutánea como en provocación específica. Tampoco, en la literatura médica, parece que la lombriz de tierra tenga una gran potencia alergénica, como la que se está observando frente a larvas de Dípteros Califóridos. Todos estos datos hicieron sospechar, que, tras una sensibilización primaria a *P. terraenovae*, se podría haber producido una sensibilización a lombriz, por la existencia de componentes alergénicos comunes, con reacción cruzada ante las misma moléculas de IgE de estos pacientes. Por otro lado, la existencia de una banda de reconocimiento IgE de 15 kDa, de morfología similar en los extractos de *P. terraenovae* y *L. terrestris*, confirmaba dicha sospecha.

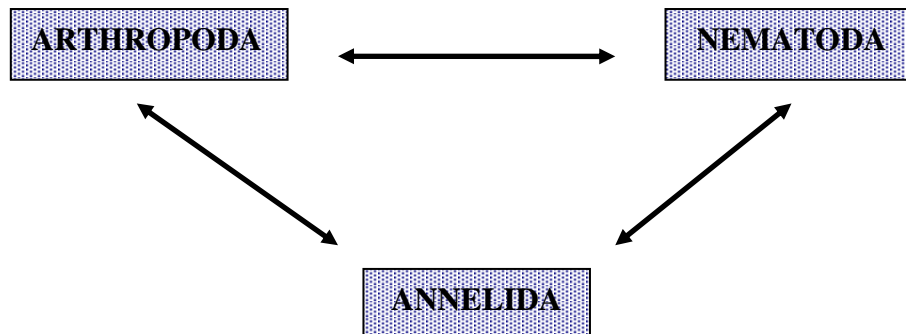
Los estudios de ELISA inhibición confirmaron definitivamente la existencia de dicha reactividad cruzada inmunológica. Se pudo comprobar, como *L. terrestris* era capaz de inhibir casi completamente la respuesta IgE específica frente a *P. terraenovae*, con una potencia de inhibición incluso mayor que la de las otras dos especies de Califóridos. Este mismo fenómeno se observó al analizar los estudios de inmunoblot inhibición. *L. terrestris*, actuando como fase libre, era capaz de inhibir de manera importante la respuesta frente a las proteínas separadas electroforéticamente de los extractos de las 3 especies de Califóridos, sin embargo la preincubación del pool de sueros con extractos de Califóridos sólo conseguía la inhibición de algunos alérgenos de *L. terrestris*, dentro del rango de los 15-20 kDa.

En el estudio de Baldo y cols <sup>43</sup>, pacientes diagnosticados de alergia por inhalación a insectos, eran capaces de reconocer alérgenos presentes en un número muy importante de insectos, como Dípteros (entre los que se incluían

*M. domestica*, *C. stygia*, *C. augur*, *L. cuprina*, *C. bezziana* y *Parasarcophaga*), Lepidópteros, Derméstidos, y cucarachas. Los estudios de inmunoblot, reflejaron la existencia de un alérgeno de 37 kDa común a todas las especies de moscas. En este sentido, es bien conocido como la tropomiosina, de un peso molecular entre 34-38 kDa, que se encuentra en numerosos artrópodos y otros invertebrados, se ha implicado como una causa importante de reactividad cruzada, incluso entre especies no relacionadas filogenéticamente. Martínez y cols.<sup>81</sup>, mediante estudios de inmunoblot con una mezcla de sueros de pacientes con alergia a artrópodos domésticos, demostraron la presencia de tropomiosina en extractos de insectos, ácaros, crustáceos, moluscos e incluso parásitos como *Anisakis simplex* y *Ascaris lumbricoides* (Nematodos). Esta reactividad cruzada entre Nematodos y Dípteros ha sido demostrada por Pascual y cols.<sup>82</sup>, en pacientes sensibilizados a *Anisakis*, *B. germánica* (cucaracha) y Quironómidos, posiblemente por la tropomiosina. También, los estudios de Cabrera<sup>35</sup> obtuvieron una mayor respuesta IgE específica frente a extractos de *C. erythrocephala* y *P. terraenovae* en pacientes sensibilizados a *Ascaris*, con evidencia de reactividad cruzada en estudios de ELISA inhibición. Se especula, cómo en zonas endémicas de infestación por *A. lumbricoides*, la sensibilización a la tropomiosina puede predisponer a una respuesta alérgica frente a inhalantes convencionales, como ácaros y cucarachas, con tropomiosinas muy similares, y con ello favorecer el desarrollo de inflamación y de asma<sup>83</sup>. Con todo ello, no parece que los alérgenos más relevantes frente a especies de Califóridos y *L. terrestris*, en los pescadores de Cáceres, sean pertenecientes al grupo de las tropomiosinas. En cualquier caso, no todas las reacciones alérgicas por inhalación de partículas de Dípteros, están en el contexto de una panalergia a insectos<sup>84</sup>.

Hasta la fecha, no se ha descrito la existencia de reactividad cruzada entre Dípteros y Anélidos, en ninguno de los artículos sobre reacciones alérgicas por larvas de Califóridos, haciéndose extensivo a los estudios que describen cualquier tipo de reacción alérgica por Dípteros. No obstante, como se ha comentado anteriormente, si se ha descrito reactividad cruzada entre Artrópodos y Nemátodos, y de Castro demostró reactividad cruzada entre *Anisakis simplex* (Nematodo) y *L. terrestris* (Anélido) <sup>48</sup>, aunque en este caso el alérgeno responsable de dicha reactividad cruzada, de 20 kDa, no se encuentre dentro del rango conocido para las diversas tropomiosinas.

Con los resultados de nuestro estudio, la posible existencia de panalérgenos se amplía al Phylum de los Anélidos, y el círculo quedaría cerrado tal y como se refleja en la siguiente figura:



La reactividad cruzada entre *L. terrestris* y *Califóridos* no parece tener una base filogenética clara. Aunque clásicamente, Cuvier (1812)<sup>85</sup> estableció una clasificación de Articulata, que englobaba a Artrópodos y Anélidos, basándose en una estructura segmentada común, autores más modernos han desechado esa teoría. Sin embargo, si han descrito relación filogenética entre Artrópodos y Nemátodos (lo cual podría justificar la reactividad cruzada descrita en otros estudios) y por otro lado entre Anélidos y Moluscos <sup>86, 87</sup>.

Una posible explicación de este hallazgo, deriva de la existencia de una banda muy intensa de reconocimiento IgE, en los estudios de western blot, en torno a los 15-16 kDa, para los extractos de *P. terraenovae* y *L. terrestris*. Pensamos que este alérgeno se podría corresponder con una hemoglobina, por varias razones:

- La lombriz de tierra posee hemoglobinas extracelulares, denominadas eritrocruorinas, implicadas en el intercambio gaseoso de oxígeno. Esta proteína, de la familia de las globinas, se compone de 12 subunidades que conforman una estructura hexagonal. Cada subunidad se forma de la unión de un trímero (cadenas A, B, y C) y un monómero (cadena D). Se ha conseguido identificar la secuencia de aminoácidos de ambas fracciones, representando el trímero (globina extracelular 2), una fracción de 145 aa con un PM de 16.254 Da <sup>88</sup> y el monómero (globina extracelular 1), una fracción de 142 aa con un PM de 16.130 Da <sup>89</sup>.
- Por otro lado, las hemoglobinas extracelulares de los Quironómidos (mosquitos no picadores. *Diptera*, *Nematocera*) han sido descritas y caracterizadas como importantes alérgenos ambientales y ocupacionales <sup>90</sup>. Así, el alérgeno mayor del *Chironomus thumi thumi*, Chi t 1, es una eritrocruorina con un PM de 16.3 kDa. (UniProtKB/Swiss-Prot taxonomy database). Si bien, es cierto que clásicamente la existencia de hemoglobinas en los dípteros ha pasado desapercibida (salvo en el caso de los Quironómidos), por la existencia de un sistema traqueal bien desarrollado, estudios recientes, con diversas especies de *Drosophila* (*Diptera*, *Brachicera*, familia *Drosophilidae*), han puesto de manifiesto la existencia de genes de hemoglobinas que se expresan fundamentalmente en las células traqueales, tanto en las larvas como en los adultos de estas especies <sup>91</sup>. Además, estos mismos autores, relacionaron filogenéticamente

la globina 1 de *Drosophila* con la hemoglobina intracelular de la larva de la mosca *Gasterophilus intestinalis* (Diptera, Brachicera, familia Oestridae) y con la hemoglobina extracelular de los Quironómidos.

El papel de la hemoglobina en *Drosophila* todavía no es conocido, pero es de suponer que sirva para facilitar el transporte de oxígeno desde las traqueolas a los tejidos. En el caso de los quironómidos, la hemoglobina permite a las larvas vivir en zonas con concentraciones de oxígeno muy pobres, como en las profundidades de los lagos.

La presencia de hemoglobina en *Drosophila* y en *G. intestinalis* (perteneciente a la misma superfamilia *Oestroidea* que los Califóridos de nuestro estudio) hace pensar en que también esté presente en el resto de los dípteros. La sospecha, aunque de manera indirecta, de la existencia de hemoglobina en las larvas de *P. terraenovae*, podría explicar la reactividad cruzada con *L. terrestris*, observada en este trabajo. No obstante, solo mediante técnicas de purificación, aislamiento y secuenciación de estos alérgenos, podremos confirmar, en proyectos futuros, si estas proteínas son hemoglobinas y si son realmente las responsables de dicha reactividad cruzada.

#### **4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DIAGNÓSTICOS DE CALIDAD.**

El primer requisito para la obtención de extractos diagnósticos de calidad, es la obtención de una buena materia prima, que sea realmente la responsable de los síntomas referidos por los pacientes. Ya se han comentado previamente, las dudas surgidas, en cuanto a la identificación de las especies, en los diversos artículos publicados sobre reacciones alérgicas por larvas de Califóridos. En este trabajo, la identificación de la *P. terraenovae* en las muestras de asticot local, nos permitió conocer la especie concreta de mosca a la que se encontraban expuestos los pescadores, y la confirmación taxonómica

de las especies importadas de Francia, 100% puras (no existía contaminación con otras especies en los lotes de producción analizados), nos permitió disponer de materia prima suficiente para la realización de los estudios específicos de cada especie.

La estandarización biológica de los extractos alérgicos, es otro requisito imprescindible en la búsqueda de esa calidad diagnóstica. La respuesta biológica (en este caso, a nivel de la piel) varía en función de la concentración de alérgeno, y esta puede ser muy diferente en extractos con una misma concentración peso/volumen. Incluso conociendo y ajustando los extractos por concentración de proteínas totales, los alérgenos generalmente son sólo una mínima parte de esas proteínas, y pueden estar en una concentración muy desigual en los diferentes lotes. Por lo tanto, con la estandarización biológica conseguiremos extractos ajustados, lote a lote, a un mismo grado de actividad alérgica. Hasta la fecha, ningún grupo ha estandarizado biológicamente extractos de Califóridos, ni se han comercializado este tipo de extractos por ningún laboratorio. Con el número adecuado de pacientes alérgicos a asticot, obtenidos de los miembros de la Sociedad de Pescadores de Cáceres y de los pacientes diagnosticados en la sección de Alergología, se consiguió estandarizar biológicamente los extractos de *P. terraenovae* y *C. vomitoria*. En el caso de *L. sericata*, el valor HEP superaba la concentración de 20 mg/ml, que era la concentración máxima utilizada, con lo que sólo se puede hipotetizar, al extrapolar en las curvas de tendencia, siendo el resultado en este caso de 29.51 mg/ml. La potencia biológica del extracto de *P. terraenovae* (HEP = 6.76 mg/ml) era mayor que la del extracto de *C. vomitoria* (HEP = 7.57 mg/ml).

Por otro lado, hemos observado, que el extracto de *P. terraenovae* tenía una mayor rentabilidad diagnóstica que los extractos de las otras dos especies de

Califóridos, ya que conseguía una sensibilidad del 100%. Además, los mejores resultados se obtuvieron mediante la técnica del prick, con mayor especificidad que la técnica ELISA.

Por lo tanto, para la confirmación de una respuesta de hipersensibilidad tipo I (mediada por IgE) frente a asticot, en un paciente con sospecha de síntomas alérgicos por su uso, es suficiente con la realización de una prueba cutánea *en prick* con el extracto de *P. terraenovae*, estandarizado biológicamente, lo cual concuerda con lo descrito para el diagnóstico de la patología alérgica respiratoria por aeroalérgenos <sup>51</sup>. Aunque no hemos encontrado ningún caso, la determinación de IgE específica quedaría relegada a aquellos casos con historia clínica positiva pero con prueba cutánea negativa. Las pruebas de provocación ocular específica con *P. terraenovae*, no parecen necesarias en pacientes con historia clínica positiva y prueba cutánea positiva, ya que una prueba cutánea positiva a *P. terraenovae*, con un habón mínimo de 3 mm, fue suficiente para obtener una respuesta positiva en una provocación conjuntival en los pacientes de la serie clínica.

Resumiendo los hallazgos del presente estudio, la *P. terraenovae*, comercializada como cebo vivo para la pesca deportiva (asticot), se comporta como un aeroalérgeno, capaz de producir patología alérgica respiratoria en un 7% de los pescadores de Cáceres. Las dificultades para el diagnóstico, en los estudios previos, se debían a la falta de extractos de calidad y esta falta, a su vez, era debida a los problemas para la selección e identificación de la materia prima y a la falta de estudios con un número importante de pacientes alérgicos. Una vez que se consiguió obtener, en este trabajo, un extracto de calidad de *P. terraenovae*, una prueba cutánea positiva con dicho extracto fue suficiente para la confirmación de un mecanismo de hipersensibilidad



mediado por IgE, en los pacientes con anamnesis sugerente de alergia a asticot.

No se han identificado factores de riesgo para el desarrollo de alergia a *P. terraenovae*. Desconocemos la evolución natural de la enfermedad, aunque las evidencias de otros autores y la clásica evolución natural de la patología alérgica por otros aeroalérgenos, indica que nuestros pacientes podrían tener un riesgo para el desarrollo de asma bronquial alérgico en un futuro. Por ello, la posibilidad de un diagnóstico precoz, ante los primeros síntomas de enfermedad, podría evitar dicha evolución natural. La sensibilización a *P. terraenovae*, en pacientes con historia clínica negativa, podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de alergia respiratoria, pero es algo que tendrá que ser evaluado en estudios prospectivos mediante el seguimiento de estos pacientes.

Hemos podido comprobar la existencia de una reactividad cruzada inmunológica entre *P. terraenovae* y *L. terrestris*. Sin embargo, esto no se traduce en una reactividad cruzada clínicamente relevante, ya que los pescadores no experimentaban síntomas alérgicos con el uso de lombriz. No obstante, la presencia de alérgenos similares en ambas especies puede llegar a generar una respuesta clínica a lombriz de tierra, siempre que se alcance un alto nivel de exposición (lo cual no sucede en los pescadores estudiados), como se refleja en los estudios de provocación conjuntival con *P. terraenovae* y lombriz. Es posible que los alérgenos responsables de dicha reactividad cruzada, sean hemoglobinas presentes en Anélidos y en Dípteros.

---

## **CONCLUSIONES**

1. El asticot comercializado en tiendas de artículos de pesca de la ciudad de Cáceres se corresponde con larvas de *Protophormia terraenovae*, Díptero de la familia *Calliphoridae*.
2. El cebo vivo causante de reacciones alérgicas por contacto o por inhalación en los pescadores de la provincia de Cáceres, es la larva de *P. terraenovae*.
3. La prevalencia observada de alergia a *P. terraenovae* es de un 7% en población de pescadores de la provincia de Cáceres.
4. Las manifestaciones clínicas más características entre los pacientes alérgicos a asticot, son los síntomas de rinoconjuntivitis al comienzo de una jornada de pesca.
5. El tiempo de exposición a *P. terraenovae*, es un factor de riesgo para el desarrollo de sensibilización al mismo.
6. Para el diagnóstico inmunológico de un paciente con síntomas alérgicos por la manipulación de asticot, en esta población, es suficiente con una prueba cutánea en *prick* con el extracto de *P. terraenovae*.
7. El potencial alérgico de *P. terraenovae* es muy elevado, en comparación con otros Dípteros Califóridos y con *Lumbricus terrestris*.

8. Se ha demostrado reactividad cruzada inmunológica entre *P. terraenovae* y otras especies de Dípteros Califóridos (*C. vomitoria* y *L. sericata*).
9. Existe una importante reactividad cruzada inmunológica entre *P. terraenovae* y *L. terrestris*. Este es el primer estudio que refleja este fenómeno entre los Phylum *Annelida* y *Díptera*.
10. Se ha identificado una banda de reconocimiento IgE entre 15-16 kDa frente a *P. terraenovae* y *L. terrestris*, que se corresponde con el peso molecular de las hemoglobinas descritas para diversas especies. Este alérgeno podría ser uno de los implicados en la reactividad cruzada observada.
11. Se han estandarizado biológicamente los extractos diagnósticos de *P. terraenovae* y *C. vomitoria*.

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Pérez Bote JL, Roso Romero R, Julián Pula H. Los hábitos de pesca en Extremadura: implicaciones en la gestión y conservación de la fauna piscícola. Rev estudios extremeños. Diputación provincial de Badajoz. 2004; 60 (3): 1241-54.
2. Brands, S.J. 1989-2007. Systema Naturae 2000. *The Taxonomicon*. Universal Taxonomic Services, Amsterdam, The Netherlands. [<http://sn2000.taxonomy.nl/Taxonomicon/>].
3. Erzinçlioğlu Y. Z. The larvae of the species of *Phormia* and *Boreellus*: Northern, cold-adapted blowflies (Diptera: Calliphoridae) Journal of Natural History. 1988; 22 (1): 11 – 16.
4. Grassberger M, Frank C. Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central European urban habitat. J Med Entomol. 2004 May; 41(3): 511-23.
5. Hobischak N R, VanLaerhoven S L, Anderson G S. Successional patterns of diversity in insect fauna on carrion in sun and shade in the Boreal Forest Region of Canada, near Edmonton, Alberta. Canadian Entomologist 138: 376-383.
6. Mavárez-Cardozo MG, Espina AI, Barrios FA, Ferira JL. La entomología forense y el neotrópico. Cuad Med Forense 2005; 11: 23-33.
7. Mariluis J C, Mulieri, P R. La distribución de las Calliphoridae en la Argentina (Diptera). Rev. Soc. Entomol. Argent. 2003; 62: 85-97.
8. Soler MD. El estudio de las miasis en España en los últimos 100 años. Ars Pharmaceutica. 2000; 41: 19-26.

9. Grassberger M, Reiter C. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int.* 2002; 128(3): 177-82.
10. Rognes K. Blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica.* 1991; 24: 272.
11. Martínez Sánchez A, Rognes K. (2002) "Calliphoridae" en "Catálogo de los dípteros de España, Portugal y Andorra (Insecta)." ISBN: 84-932807-0-4, Sociedad Aragonesa de Entomología: 204-205.
12. Reames MK, Christensen C, Luce E. The use of maggots in wound debridement. *Annals of Plastic Surgery* 1988; 21(4): 388-391.
13. Sherman RA, Pechter EA. Maggot Therapy: A review of the therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. *Medical and Veterinary Entomology.* 1988; 2(3): 225-230.
14. Reina D, Alcalde M, Frontera E, Porcel S. Principales miasis que afectan a los pequeños rumiantes: su importancia sanitaria y económica. *Producción animal* 2006; 222: 28-40.
15. Toure SM. Myiasis of economic importance. *Rev Schi Tech* 1994; 13; 1053-73.
16. Valderrama R. Miasis en humanos. *IATREIA* 1991; 4: 60-70.
17. Tannahill FH, Coppengde JR, Wendell J. Screw-worm (Diptera: Calliphoridae): Myiasis on Curazao. Reinvasion after 20 years. *J Med Entomol.* 1980; 17: 265-7.
18. Siddig A, Al Jowary S, Al Izzi M, Hopkins J, Hall MJ, Slingenbergh J. Seasonality of Old World screwworm myiasis in the Mesopotamia valley in Iraq. *Med Vet Entomol.* 2005; 19(2):140-50.
19. Watts JE, Murray MD, Graham NP. The blowfly strike problem of sheep in New South Wales. *Aust Vet J.* 1979; 55: 325-34.

20. Sherman RA. Wound myiasis in urban and suburban United States. Arch Intern Med 2000; 160: 2004-14.
21. Sastre Castillo A, Merchante A, Marinnunez F. Sensitivity to the earthworm. Rev Clin Esp. 1963; 15;91:37-9.
22. Valero A, Huguet J, Sanosa J, Malet A, Garcia P. Angioedema, rhinitis and asthma provoked by fishing bait (*Eisenia foetida*). Allergol Immunopathol. 1989; 17: 331-335.
23. Valero Santiago A, Pérez Santos C. Alergia a cebos de pesca. UCB Pharma S.A. eds. Madrid 2004.
24. Zucchi L. Asma bronchiale da sensibilizzazione a larve di mosca carnaria. Riv Pat Clin Tuberc e Pneumol. 1980; 51: 287-291.
25. Stockley R. Asthma associated with a circulating IgG antibody to *Calliphora* maggots. Clinical Allergy. 1982; 12: 151-55.
26. Sgambato F, Pedicini A, De Rienzo D, Falangiani P. Allergia inalatoria a larve di mosca carnaria. Caso clinico. Boll. Ist Siercer, Milan. 1987; 66: 411-415.
27. Sestini P. Late asthmatic reactions due to larvae of *Calliphora erythrocephala* used as fishing bait. Allergol Immunopathol. 1987; 15: 25-28.
28. Siracusa A. Asthma caused by *Lucilia Caesar* (green bottle) larvae. Clinical and immunological studies. Med Lav. 1989; 80: 489-497.
29. Siracusa A. Asthma caused by live fish bait. J Allergy Clin Immunol. 1994; 93: 424-30.
30. Siracusa A. Prevalence of occupational allergy due to live fish bait. Clin Exp Allergy. 2003; 33: 507-510.



31. Escribano M. Allergy to maggots. *Allergy* 1997; 52: 1038.
32. Alvarado M, Prados M, Bartolomé B. Hipersensibilidad a cebos de pesca. *Rev Esp Alergol Immunol Clin.* 1996; 11 (ext 2): 241.
33. González I. Rhinoconjunctivitis and asthma provoked by *Asticot* maggots. *Allergol Immunopathol.* 1999; 27: 232-5.
34. Porcel Carreño S, Jiménez-Timón S, Cámara Hijón C, Rodríguez Trabado A, Rodríguez Martín E, Fletes Peral C, Hernández Arbeiza J, Cobo López R. Allergy to *Asticot* maggots. Identification of allergens. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2003; 31(5):265-9.
35. Cabrera M. Rinitis y Asma por alergia a dípteros. Sesiones interhospitalarias Sociedad Madrid Castilla la Mancha de Alergología e Inmunología clínica. n° 6. Curso 96-97. 181-193.
36. Rosado A. Rhinoconjunctivitis caused by *Calliphora* larvae. A study of three cases. *Allergy* 2003; 58 (supp 74): 26.
37. Cabañes N. Asma ocupacional por cebos de pesca vivos. Sesiones interhospitalarias Sociedad Madrid Castilla la Mancha de Alergología e Inmunología clínica. n° 5. Curso 95-96. 289-296.
38. Virgili A. Protein contact dermatitis in a fisherman using maggots of a flesh fly as bait. *Contact dermatitis.* 2001; 44: 262.
39. Pazzaglia M. Occupational protein contact dermatitis due to *Calliphora vomitoria* larvae (maggot) bred as fishing bait. *Contact Dermatitis.* 2003; 48(3): 176.
40. Kaufman GL, Baldo BA, Tovey ER, Bellas TE, Gandevia BH. Inhalant allergy following occupational exposure to blowflies. *Clinical Allergy* 1986; 16: 65-71.

- 
41. Kaufman GL, Gandevia BH, Bellas TE, Tovey ER, Baldo BA. Occupational allergy in an entomological research centre. I Clinical aspects of reactions to the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. British J Industrial Med. 1989; 46: 473-8.
42. Baldo BA, Panzani RC. Detection of IgE antibodies to a wide range of insects species in subjects with suspected inhalant allergies to insects. Int Archs Allergy Appl Immun. 1988; 85: 278-287.
43. Baldo BA, Bellas TE, Tovey ER, Kaufman GL. Occupational allergy in an entomological research centre II. Identification of IgE binding proteins from developmental stages of the blowfly *Lucilia cuprina* and other species of adult flies. Clin Exp Allergy. 1988; 19: 411-417.
44. Mc Morrow N, Goodman G, Mueller k, Knutsen A, Slavin R, Dykewicz M. Fisherman's rhinitis: IgE mediated sensitivity to earthworms (*Lumbricus terrestris*). J Allergy Clin Immunol. 1993; 93: 301 (1).
45. Camino E, Bernaola G, Bartolomé B. Rinoconjuntivitis, asma y urticaria de contacto por alergia a cebo de pesca (lombriz de tierra). Alergol Clin Immunol. 2002; 17: 21-22.
46. Tripodi S, Falangiani P, Perinelli T, Dell'Omo F, Cristaldi A. Allergy to fishing bait. Allergy. 2002; 57: 653.
47. Porcel S, Cámara C, Rodríguez A, Fletes C, Jiménez S, Rodríguez E, Alvarado M, Hernández J, Pereira L, Cobo R. Allergens involved in a case of IgE mediated hypersensitivity to common earthworm, *Lumbricus terrestris*. Allergy Clin Immunol Int. 2005; 17: 246-8.
48. De Castro FJ, Tovar V, Pérez S, Baez ML, Moya L, de Barrio M. Contact angioedema and conjunctivitis caused by *Lumbricus terrestris*: cross-reactivity with *Anisakis simplex*. Allergy. 2007; 62: 84-85.
49. Blasco A, Lobera T, Lombardero M, del Pozo M. Sensitization to bait fishing (*Eisenia foetida*). Allergy. 1999; 54(52): 122.

50. Simón Jara K. Hipersensibilidad a cebos de pesca. A propósito de dos casos. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin*. 1996; 11 (Ext 2): 241.
51. Bernstein IL, Storms WW. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint Task Force on Practice Parameters for the Diagnosis and Treatment of Asthma. The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology and the American College of Allergy, Asthma and Immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1995; 75: 543-625.
52. Smith, KGV. A manual of Forensic Entomology. The Trustees of the British Museum (Natural History). 1986. London, 256.
53. González-Mora D, Peris SV. Los Calliphoridae de España: 1: Rhiniinae y Chrysomyinae (Díptera). *Eos* 1988; 64: 91-139.
54. González-Mora MD. Los Calliphoridae de España, II: Calliphorini (Díptera). *Eos*. 1989; 65 (1): 39-59.
55. Peris SV, González Mora D. Los Calliphoridae de España, III Luciliini (Díptera). *Bol R Soc Española Hist Nat*. 1991; 87 (1-4): 187-207.
56. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Analytical Biochem*. 1976; 72: 248-254.
57. Asher MI, Keil U, Anderson HR; Beasley R, Crane J, Martínez F, et al. International study of asthma and allergy in childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J*. 1995; 8: 483-491.
58. Burney PG, Luczynska C, Chinn S, Jarvis D. The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J*. 1994; 7: 954-960.
59. Osterballe O, Weeke B. A new lancet for skin prick testing. *Allergy*. 1979;34(4):209-12.
60. Morrow Brown HS, Thantrey N. Prick testing for allergens standardized by using a precision needle. *Clin Allergy*. 1981; 11: 95-98.

61. Malling HJ, Andersen CE, Boas MB, Holgersen F, Munch EP, Weeke B. The allergy pricker. Qualitative aspects of skin prick testing using a precision needle. *Allergy*. 1982; 37(8): 563-7.
62. Boluda L, Alonso C, Fernández Caldas E. Purification, characterization and partial sequencing of 2 new allergens of *Olea europaea*. *J Allergy Clin Immunol*. 1998; 101: 210-216.
63. Boluda L, Sastre J, Casanovas M, Fernandez Caldas E. Determination of Ole e 1 by enzyme immunoassay and scanning densitometry. Validation by skin-prick testing. *J Immunol Methods*. 1999; 223: 17-26.
64. Aas K, Backman A, Belin L, Weeke B. Standardization of allergen extracts with appropriate methods. The combined use of skin prick testing and radio-allergosorbent tests. *Allergy*. 1978; 33(3): 130-7.
65. Nordic Guidelines. Registration of Allergen preparations. 1989 Nordiska Läkemedelsnämnden. Nordic Council on Medicine, Uppsala. Sweden.
66. Abelson MD, Chambers WA, Smith LM. Conjunctival allergen challenge. A clinical approach to studying allergic conjunctivitis. *Arch Ophthalmol*. 1990; 108: 84-88.
67. Clement PA. Committee report on standardization of rhinomanometry. *Rhinology*. 1984; 22: 151-55.
68. Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.
69. Weber K, Osborn T. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*. 1969; 244: 4406-12.
70. Gershoni JM, Palade GE. Protein blotting: Principles and applications. *Anal. Biochem*. 1983; 131: 1-15.

71. Arnheim N, Southern EM. Heterogeneity of the ribosomal genes in mice and men. *Cell*. 1977; 11(2): 363–370.
72. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc Natl Acad sci USA* 1979; 76: 4350-4354.
73. Shen HD, Wang SR, Tang RB, Chang ZN, Su SN, Han SH. Identification of allergens and antigens of Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) pollen by immunoblot analysis. *Clin Allergy*. 1988 Jul; 18(4): 401-9.
74. Bartolomé Zabala B. “Reactividad cruzada in vitro: conceptos y métodos” en *Reactividad cruzada en alergia a alimentos*. ISBN: 84-88865-89-9. Anna Cisteró, Ernesto Enrique eds: 21-37.
75. Mailing HJ. Skin prick test: Methodological studies and clinical applications. Linköping University Medical dissertation n° 239. 1987.
76. Dreborg S, Frejw AJ. Allergen standardization and skin test. *Allergy*. 1993; 48:49-54.
77. Guerra S, Serril D, Martínez F, Barbee R. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 109: 419-25.
78. Ehl W, Wahl R. Rhinitis and urticaria caused by fishing bait (maggot of *Calliphora erythrocephala*). *Schweiz med Wschr*. 1991; 121 suppl 40: 93.
79. Buisseret P. Seasonal asthma in an angler. *Lancet*. 1978; 25: 668.
80. Pérez-Formoso JL, Puente Y, Maraví A, Daza J, Vega A, Chacón P et al. Sensitization to different kinds of live fish bait. *Allergy*. 2003; 58 (supp 74): 29.
81. Martínez A, Martínez J, Palacios R, Panzani R. Importance of tropomyosin in the allergy to household arthropods. Cross-reactivity with other invertebrate extracts. *Allergol et Immunopathol*. 1997; 25: 118-126.

- 
82. Pascual C, Crespo J, San Martin S, Ornia N, Ortega N, Caballero T, et al. Cross-reactivity between IgE-binding proteins of Anisakis, German cockroach and chironomids. *Allergy*. 1997; 52: 514-520.
83. Arruda LK. Tropomyosin in Parasites. A crossreactive IgE-binding Protein?. *Allergy Clin Immunol Int*. 2005; 17: 243-5.
84. Focke M, Hemmer W, Wöhrl S, Götz M, Jarisch R, Kofler H. Specific sensitization to the common housefly (*Musca domestica*) not related to insect panallergy. *Allergy*. 2003; 58: 448-451.
85. Cuvier G. Sur un nouveau rapprochement à établir entre les classes qui composent le Règne Animal. *Ann Mus Hist*. 1812; 19: 73-84.
86. Eernisse D J, Albert J S, Anderson F E. Annelida and Arthropoda are not sister taxa: A phylogenetic analysis of spiralian metazoa morphology. *Syst Biol*. 1992; 41: 305-330.
87. Giribert G, Ribera C. The position of arthropods in the animal kingdom: A search for a reliable outgroup for internal arthropod phylogeny. *Mol Phylog Evol*. 1998; 9: 481-488.
88. Garlick RL, Riggs AF. The amino acid sequence of a major polypeptide chain of earthworm hemoglobin. *J Biol Chem*. 1982; 257: 9005-9015.
89. Shishikura F, Snow JW, Gotoh T, Vinogradov SN, Walz DA. Amino acid sequence of the monomer subunit of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. *J Biol Chem*. 1987; 262: 3123-3131.
90. Baur X, Liebers V. Insect hemoglobins (Chitinase 1) of the diptera family chironomidae are relevant environmental, occupational and hobby related allergens. *Int arch Occup Environ Health*. 1992; 64: 185-8.
91. Burmester T, Storf J, Hasenjäger A, Klawitter S, Hankein T. The hemoglobin genes of *Drosophila*. *FEBS Journal*. 2006; 273: 468-480.

---

**ANEXOS**

---

**Anexo 1. Modelo de consentimiento informado**



Apellidos
Nombre
DNI/ N° Seguridad social

## Consentimiento informado

Nombre del familiar, Allegado o Representante	DNI
Nombre del médico	N° Colegiado

### ESTUDIO DE REACCIONES ALÉRGICAS A CEBOS DE PESCA VIVOS

#### Objetivo:

Determinar el porcentaje de personas aficionadas a la pesca, que presentan síntomas alérgicos en relación con la manipulación de cebos de pesca vivos y llegar a un mejor conocimiento inmunológico de estos alérgenos.

#### Descripción:

Se realizará en una sola visita. En primer lugar, un cuestionario para la identificación de síntomas de rinitis, asma y afectación cutánea así como para la valoración de la implicación de los cebos de pesca vivos en el desarrollo de los mismos. Posteriormente, se realizarán unas pruebas cutáneas en prick con alérgenos habituales así como con extractos de larvas de Asticot y de lombriz. En función de los resultados de estas pruebas en algunas ocasiones será necesaria la extracción de una muestra sanguínea.

#### Riesgos típicos:

La mayoría de los pacientes no tienen ningún síntoma en relación con las pruebas cutáneas (salvo la aparición de un habón en la zona de punción), excepcionalmente se han descrito reacciones alérgicas más graves con otros alérgenos, aunque si esto ocurre el paciente será inmediatamente tratado. La extracción sanguínea no supone en general ningún riesgo, salvo en ocasiones formación de hematoma o cuadros sincopales en individuos predispuestos.

---

**Riesgos Personales:**

El paciente expuesto a esta intervención, sobre la base de sus circunstancias y antecedentes personales que se conozcan:  NO presenta riesgos sobreañadidos en la realización de la misma.

SI presenta riesgos sobreañadidos, consistiendo estos en: \_\_\_\_\_

**Su participación es voluntaria**

Si interviene en este estudio, debe saber que en cualquier momento puede decidir no seguir participando, comunicándose a su médico del estudio sin tener que manifestar razón alguna para ello.

**Protección de datos**

Los datos personales son los necesarios para los objetivos del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre, identidad o información de carácter personal que pueda ser identificable. Estos datos quedarán bajo custodia de los investigadores. Los resultados del estudio podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones.

**Si tiene alguna duda o desea mayor información, le rogamos nos lo haga saber**

<b>ACEPTACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>		
<p><b><u>El abajo firmante declara:</u></b> Que he recibido clara, suficiente y satisfactoria información sobre el estudio y sus riesgos anteriormente expuestos, y a la vez me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.</p> <p>En cualquier caso, deseo que se respeten las siguientes condiciones: <input type="checkbox"/> NINGUNA</p> <p><input type="checkbox"/> CONDICIONES: _____</p> <p><b><u>Y DOY mi consentimiento expreso</u></b> para someterme a la realización de esta intervención.</p> <p>Libremente en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar este Consentimiento Informado que ahora presto mediante mi firma correspondiente:</p> <p>Cáceres a ____ de _____ de _____</p>		
<b>Fdo. El Paciente</b>	<b>Fdo. El Médico</b>	<b>Fdo. el familiar o representante</b>

<b>NO ACEPTACIÓN (REVOCACIÓN) CONSENTIMIENTO INFORMADO</b>		
<p>El abajo firmante manifiesta que NO DOY mi Consentimiento Expreso para someterme a la realización de este estudio, dejando sin efecto mi Consentimiento Informado prestado y firmado en su fecha en el apartado anterior.</p> <p>Cáceres a ____ de _____ de _____</p>		
<b>Fdo. El Paciente</b>	<b>Fdo. El Médico</b>	<b>Fdo. el familiar o representante</b>

---

**Anexo 2. Cuestionario clínico**

---

## CUESTIONARIO DE SÍNTOMAS ALÉRGICOS EN RELACIÓN CON LA MANIPULACIÓN DE CEBOS DE PESCA VIVOS

Cuestionario nº \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

### 1. DATOS DE FILIACIÓN

Nombre: \_\_\_\_\_ Apellidos: \_\_\_\_\_

Sexo: Hombre  Mujer

Edad: \_\_\_\_\_ Año de nacimiento: \_\_\_\_\_

Lugar de residencia habitual: \_\_\_\_\_

Teléfono/s \_\_\_\_\_

### 2. ANTECEDENTES PERSONALES MÉDICOS

HTA, DM, Dislipemias \_\_\_\_\_

Intervenciones quirúrgicas \_\_\_\_\_

Fumador  Exfumador  No fumador

Medicación que toma actualmente: \_\_\_\_\_

### 3. ANTECEDENTES PERSONALES DE ATOPIA

¿Ha presentado en alguna ocasión rinitis, picor de nariz, estornudos o conjuntivitis?

SI  NO  ¿Desde cuando? \_\_\_\_\_

¿Ha presentado en alguna ocasión tos, dificultad para respirar, opresión en el pecho, "pitos"? SI  NO  ¿Desde cuando? \_\_\_\_\_

¿Ha presentado en alguna ocasión eccema, urticaria, habones o dermatitis?

SI  NO

¿Tiene alergia a algún alimento? SI  NO

¿Tiene alergia a algún medicamento? SI  NO

¿Ha tenido alguna reacción alérgica con picadura de avispas/abejas? SI  NO

### 4. ANTECEDENTES FAMILIARES DE ATOPIA

¿Alguien de su familia tiene patología alérgica? \_\_\_\_\_

¿Qué clínica tiene? \_\_\_\_\_

### 5. CLINICA DE ASMA

1. ¿Ha tenido alguna vez pitos o silbidos en el pecho en los últimos 12 meses?

SI  NO  Si responde NO, pasar a la pregunta 2

1.1 ¿Ha tenido dificultad respiratoria asociada a la presencia de pitos en el pecho? SI  NO

1.2 ¿Ha tenido estos pitos cuando no estaba acatarrado? SI  NO

1.3 ¿Cuántos episodios de pitos en el pecho ha tenido en los últimos 12 meses?  
Ninguno  1-3  4-12  >12

1.4 ¿Con qué frecuencia como media se ha afectado su sueño debido a los pitos?

Nunca se ha despertado por sibilancias

< 1 noche a la semana

Una o más noches a la semana

1.5 ¿Ha tenido pitos en el pecho durante o después del ejercicio físico en los últimos 12 meses? SI  NO

- 
2. ¿Se ha despertado por la noche con sensación de opresión en el pecho en los últimos 12 meses? SI  NO
  3. ¿Se ha despertado por la noche a causa de algún ataque de falta de aire en los últimos 12 meses? SI  NO
  4. ¿Se ha despertado por un ataque de tos en alguna ocasión en los últimos 12 meses? SI  NO
  5. ¿Ha tenido algún ataque de asma en los últimos 12 meses? SI  NO
  6. ¿Toma actualmente algún medicamento (aerosoles, inhaladores, pastillas) para el asma? SI  NO

#### 6. CLINICA NASO-CONJUNTIVAL

1. ¿Ha tenido alguna alergia nasal incluida fiebre del heno? SI  NO   
¿A qué edad presentó los primeros síntomas?
2. ¿Ha tenido alguna vez problemas de estornudos, moco como agüilla, congestión de nariz no asociado a catarro o gripe?  
SI  NO
3. ¿Ha tenido problemas de estornudos, agüilla, congestión de nariz no asociado a catarro o gripe en los últimos 12 meses?  
SI  NO 
  - 3.1 ¿En qué mes del año ocurren estos síntomas?
  - 3.2 ¿Estos síntomas nasales se acompañan de picor o lagrimeo ocular?  
SI  NO
4. ¿Ha tomado alguna medicación (spray nasal pastillas) para sus síntomas nasales? SI  NO   
¿La ha tomado en los últimos 12 meses?
5. ¿En los últimos 12 meses, cuantas veces sus problemas nasales interfieren con sus actividades diarias?  
Nunca  Poco  Frecuente  A menudo

#### 7. SINTOMAS CUTANEOS

1. ¿Ha presentado alguno de estos síntomas en los últimos doce meses?  
- Sequedad  -Enrojecimiento  - Habones  - Eccema  - Picor

#### 8. RELACIÓN DE LOS SÍNTOMAS CON LOS CEBOS DE PESCA

1. ¿Desde hace cuanto tiempo es aficionado a la pesca? \_\_\_\_\_
2. ¿En qué época del año va a pescar? \_\_\_\_\_
3. ¿Utiliza cebos de pesca vivos? SI  NO 
  - 3.1 ¿Qué tipo?  
ASTICOT  LOMBRIZ  Larva Polilla  Larva de escarabajo   
Otros  \_\_\_\_\_
  - 3.2 ¿Con qué frecuencia hace uso de estos cebos?  
Diario  Semanal  Mensual  Anual
  - 3.3 ¿Desde cuando utiliza estos cebos? \_\_\_\_\_
4. ¿Relaciona los síntomas nasales, oculares, respiratorios o cutáneos con la manipulación de estos cebos? SI  NO 
  - a. ¿Cuándo comenzaron los primeros síntomas tras iniciar su afición a la pesca?  
\_\_\_\_\_
  - b. ¿Tenía estos síntomas antes de comenzar con el uso de estos cebos?  
SI  NO
5. ¿En qué época del año está peor? \_\_\_\_\_  
¿Coincide con la temporada de pesca? SI  NO

---

**Anexo 3. Informe del Comité Ético del Complejo Hospitalario de Cáceres**



## **INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

M<sup>a</sup> Aquilina Sánchez Rubio, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Cáceres,

### **CERTIFICA**

Que este Comité, con fecha 25 de mayo de 2006, ha evaluado la documentación relativa a proyecto de investigación titulado "Los Asticots: ¿Un problema emergente en la salud Pública, Veterinaria y Medioambiental?"

Que el citado proyecto se corresponde con solicitud de Ayuda para la realización de Proyectos de Investigación, Desarrollo e Innovación en el ámbito de la Comunidad Autónoma de Extremadura, convocada por Orden de 6 de Abril de 2006, por la Consejería de Infraestructuras y Desarrollo Tecnológico (DOE nº 44 de 15 de Abril).

Que, se trata de un Proyecto de Investigación y no de un Protocolo de Investigación en sentido estricto, que pretende determinar la capacidad alergénica de las especies implicadas, en población de pescadores, mediante la elaboración de extractos alergénicos para la realización de estudios in vivo e in vitro, en el que consideramos recomendable contemplar aspectos importantes en el mismo vinculados a: custodia de bases de datos de pacientes, Información al paciente, consentimiento informado y confidencialidad de los datos.

Que, analizada la documentación presentada pensamos reúne los requisitos sobre los aspectos éticos requeridos y que el proyecto está justificado de forma adecuada siendo los objetivos del mismo interesantes y viables con la metodología propuesta.

Que, consideramos igualmente la capacidad de los investigadores y la de los Centros para la evaluación de las actividades previstas.

Que, como consideración general, podemos concluir que es un Proyecto de calidad, correcto tanto desde el punto de vista científico como ético, al recoger cuestiones de interés en este tipo de estudios. No parece imprescindible, mientras no sean aprobados, la aportación de otros requisitos de Protocolos de Investigación propiamente dichos como son: Pólizas de seguros o indemnización.

Por todo ello, este Comité emite dictamen favorable a este Proyecto, a realizar por el Dr. D<sup>o</sup> Sergio Porcel Carreño, en colaboración con la Sección de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura

En Cáceres a 26 de mayo de 2006.

Fdo.: M<sup>a</sup> Aquilina Sánchez Rubio

---

**Anexo 4. Tampones y soluciones utilizados para las técnicas de SDS-PAGE y Western blot.**



---

**1.5 M Tris-HCl; pH: 8.8 (Running)**

Tris base	27.23 g (18.15/100 mL)
Agua destilada	150 mL
Ajuste a pH 8.8 con HCl 1 N	
Almacenamiento a 4° C.	

**0.5 M Tris-HCl; pH: 6.8 (Stacking)**

Tris base	6 g
Agua destilada	100 mL
Ajuste a pH 6.8 con HCl 1 N	
Almacenamiento a 4° C	

**SDS (dodecilsulfatosódico) al 10%**

SDS	10 g
Agua destilada	100 mL

**Tampón de tratamiento (Sample buffer)**

Agua destilada	4 mL
0.5 M Tris-HCl; pH: 6.8	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10%	1.6 mL
2-β-mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol 0.5%	0.2 mL

**Tampón de electrodos pH: 8.3 (5X)**

Tris base	9 g (15 g/ L)
Glicina	43.2 g (72 g/L)
SDS	3 g (5 g/L)
Agua destilada	600 mL

Almacenamiento a 4° C y se calienta a 37° C si se produce precipitación

Se diluyen 60 mL de tampón stock 5X con 240 mL de agua destilada.

---

### **Solución de Azul de Coomassie (Tinción)\***

Azul de Coomassie R-250	1 g
Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	500 mL

Tiempo de tinción: 60 minutos a 50° C o 12 horas a temperatura ambiente. Si se emplea la tinción propuesta por el fabricante “Biosafe de Coomassie” (Bio-Rad), el gel debe previamente lavarse 3 veces con agua destilada y añadir posteriormente la tinción, manteniéndola durante 1 hora y desteñir a continuación el gel con agua.

### **Solución decolorante**

Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Agua destilada	500 mL

Tiempo de decoloración: entre 1 y 3 horas.

### **Preparación de los geles: Sistema discontinuo**

**Gel Separador (porcentaje de acrilamida 12.5%) => cantidad para 2 geles de 0.75 mm**

Acrilamida (40%) 29:1	2.8 mL
Tris HCl 1.5 M pH: 8.8	1.7 mL
Agua destilada	2 mL
SDS 10%	66 µL

desgasificación 10 minutos => Polimerización:

Persulfato amónico (fresco)	70 µL (30 mg/mL)
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	14 µL
Cantidad por placa	3.2 mL
Tiempo de polimerización	10 minutos

INTERFASE: 40 µL de Butanol/agua por cada lado de la placa

---

## **Preparación del Tampón de Transferencia (Bjerrum y Schafer-Nielsen).**

### **Técnica western blot**

- Glicina 39 mM	5.82 g
- Tris 48 mM	2.93 g
- SDS 1.3 mM	3.75 mL al 10%
- Metanol 20% (v/v)	200 mL
- Agua destilada completar hasta	1 L

pH del tampón 9.2; que nunca debe de ajustarse con ácidos o bases y puede almacenarse a 4° C.

### **Tinción de membranas de PVDF. Transferencia directa**

a) Solución de tinción Negro Amido (Amido Black 10 B; Panreac, al 0.1%):

Amido Negro 10 B	0.2 g
Solución decolorante	200 mL

b) Solución decolorante:

Metanol	900 mL
Ácido acético glacial	20 mL
Agua destilada	80 mL

---

**Anexo 5. Datos clínicos y hábitos de pesca. Pacientes de la Sociedad de Pescadores de Cáceres**

n°	Nombre	Sexo	Edad (años)	AP atopía	Prick standard	Años afición	Tipo de cebo	Epoca año	Frec. uso	Síntomas	
										relacionados con el uso de cebo vivo	Tiempo de evolución
1	MBA	V	44	RC,A	Gramíneas	20	Ast, Lom	Prim, Ver	Anual	NO	NO
2	JBP	M	37	NO	(-)	9	Ast	Prim, Ver	Semanal	NO	NO
3	JBR	V	63	NO	(-)	40	Ast, Lom	Prim, Ver, Ot	Diario	NO	NO
4	CBS	V	65	NO	(-)	50	Ast, Lom	Prim, Ver	Mensual	NO	NO
5	CCJ	V	48	R	Artemisia	40	Ast, Lom	Prim, Ver	Anual	NO	NO
6	FCG	V	72	NO	NR	60	Ast, Lom	Prim, Ver, Ot	Semanal	NO	NO
7	JRGS	V	30	NO	(-)	10	Ast, Lom	Ver	Mensual	NO	NO
8	DGP	V	64	NO	(-)	25	Lom	Prim, Ver	Mensual	NO	NO
9	AUG	V	15	NO	(-)	10	Ast, Lom	Prim, Ver	Anual	NO	NO
10	AGI	V	54	RAM	(-)	28	Ast, Lom	Todo el año	Semanal	NO	NO
11	JLGA	V	66	NO	Olea	56	Ast, Lom	Todo el año	Semanal	NO	NO
12	JA-JL	V	53	R,E	(-)	40	Lom seca	Todo el año	Mensual	SI (E)	NO
13	CLR	V	71	RC	(-)	60	Ast	Prim, Ver	Mensual	NO	NO
14	JJUS	V	39	RAM	(-)	30	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	NO	NO
15	IGM	V	40	NO	(-)	30	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	NO	NO
16	FCS	V	13	A,E	Art, Ole	10	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	NO	NO
17	AMC	V	32	RC,E	Gram, Ole, Alt	20	Ast, Lom	Todo el año	Anual	NO	NO
18	PMM	V	42	NO	Par, Art	30	Ast, Lom, vd-vas	Prim, Ver	Semanal	NO	NO
19	AJF	V	9	A	Dpt, Olea	3	Ast, Lom	Prim, Ver	Mensual	NO	NO
20	EOO	V	9	RC	(-)	4	Ast, Lom	Prim, Inv	Mensual	NO	NO
21	EMO	M	43	NO	(-)	3	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	NO	NO
22	MTMB	M	63	RAM	(-)	10	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	NO	NO
23	CPV	M	48	RC	(-)	18	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	NO	NO
24	JPSF	V	20	R	Par, Art	13	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	NO	NO
25	FRM	V	56	E	(-)	50	Ast, Lom, Gm	Todo el año	Diario	NO	NO
26	LFPF	V	39	NO	Olea	27	Ast, Lom, Pez	Todo el año	Semanal	NO	NO
27	DPC	V	63	RC,A	(-)	10	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	SI (C)	NO
28	VRR	V	62	NO	(-)	40	Ast, Lom	Todo el año	Semanal	NO	NO
29	CSA	V	73	R,A	(-)	40	Ast, Lom, Gm	Todo el año	Anual	NO	NO
30	MBC	M	43	E	(-)	21	Ast, Lom	Prim	Mensual	NO	NO
31	MSM	V	51	R	(-)	40	Ast, Lom	Prim, Ver	Mensual	NO	NO
32	JVC	V	18	NO	(-)	10	Ast, Lom	Prim, Ver	Mensual	NO	NO
33	AAS	V	80	NO	(-)	9	Ast	Prim, Ver	Semanal	NO	NO
34	AHD	V	60	NO	(-)	30	Lom	Prim	Anual	NO	NO
35	RCL	V	15	RC	Gram	3	Ast	Prim	Mensual	NO	NO
36	CTS	V	39	R,C	Dpt	30	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	SI (C)	NO
37	CTB	M	6	NO	(-)	2	Ast, Lom	Prim	Mensual	NO	NO
38	FLSB	V	49	NO	(-)	45	Ast, Lom	Todo el año	Semanal	NO	NO

n°	Nombre	Sexo	Edad (años)	A P atopía	Prick standard	Años afición	Tipo de cebo	Epoca año	Frec. uso	Síntomas	
										relacionados con el uso de cebo vivo	Tiempo de evolución
39	JUNC	V	62	Fruto manos	Gram	20	Ast,Lom	Todo el año	Mensual	SI	
40	AMC	V	32	R	(-)	25	Ast, Lom	Todo el año	Anual	NO	
41	JDH	V	75	A	(-)	20	Ast, Lom	Todo el año	Mensual	NO	
42	FTP	V	60	NO	(-)	26	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	NO	
43	FJTP	V	29	NO	Gram,Art, Ole,Plat	15	Ast,Lom	Prim,Ver	Semanal	NO	
44	JLTG	V	51	R	(-)	40	Ast, Lom	Ver	Semanal	NO	
45	JLCM	V	43	NO	(-)	33	Ast, Lom	Todo el año	Semanal	NO	
46	FPS	V	78	NO	(-)	30	Ast, Lom	Prim, Verano	Semanal	NO	
47	MFCM	V	25	NO	(-)	20	Ast, Lom	Ver	Semanal	NO	
48	LLS	V	65	E	(-)	60	Ast, Lom	Prim, Ver	Semanal	NO	
49	MCGC	M	34	NO	(-)	7	Ast	Prim, Ver	Semanal	NO	
50	VBF	V	77	C	(-)	50	Ast	Todo el año	Semanal	NO	
51	JPB	V	19	RC,A,RAM	Gram, Plant, Plat	15	Ast,Lom, vas	V-d- Prim, Ver	Semanal	NO	
52	PMV	V	33	NO	Perro	20	Ast,Lom	Todo el año	Semanal	NO	
53	PRB	V	20	RC,A,Him	(-)	17	Ast, Lom	Todo el año	Semanal	NO	
54	JGC	V	43	R	(-)	30	Ast,Lom	Prim,Ver	Semanal	NO	
55	SRM	V	51	NO	(-)	10	Ast,Lom	Prim,Ver	Mensual	NO	
56	FRLL	V	71	A,U	(-)	50	Ast,Lom	Prim, Ver	Diario	NO	
57	FJTR	V	15	R,A	Gram, Far, Plant, Art, Gir, Ariz, At, Gato,Perro	13	Ast, Lom, Gusano marino, Pez	Todo el año	Semanal	NO	
58	FOS	V	47	NO	Gram, Art	25	Ast, Lom	Prim, Ver	Mensual	NO	
59	JPS	V	43	Him	No realizado	8	Ast,Lom	Prim,Ver	Semanal	NO	
60	JPFM	V	30	U	Art	27	Ast,Lom	Todo el año	Semanal	NO	
61	JPC	V	13	RAM, U	(-)	10	Ast,Lom	Prim,Ver	Diario	SI (RC)	1 año
62	JJCS	V	30	R	Olea	3	Ast,Lom	Todo el año	Mensual	NO	
63	RMIB	V	37	NO	(-)	27	Ast,Lom	Ver	Diario	NO	
64	FCT	V	27	R	(-)	15	Ast	Prim, Ver	Mensual	NO	
65	APS	V	54	RC,A	(-)	10	Ast,Lom	Prim, Ver	Semanal	SI (R,U)	2 años
66	JJPG	V	32	RC,A	Gram,Plant, Gir,Ole	25	Ast,Lom	Prim,Ver	Semanal	NO	
67	JGP	V	55	R	Dot	20	Lom	Prim	Anual	NO	
68	SSM	V	37	NO	(-)	32	Ast,Lom	Todo el año	Mensual	NO	
69	ABP	V	38	RC,A	Dot	20	Ast,Lom	Prim,Ver	Semanal	NO	
70	MAFM	V	42	NO	(-)	30	Ast,Lom	Todo el año	Semanal	NO	
71	MAM/G	V	13	NO	Olea	3	Ast,Lom	Prim, Ver	Semanal	NO	
72	MAMV	V	53	NO	(-)	3	Lom	Prim,Ver	Semanal	NO	

---

**Anexo 6. Estudio alergológico *in vivo* e *in vitro*. Pacientes de la Sociedad de Pescadores de Cáceres.**

nº	IgE específica UI/ml (ELISA)					
	Prick Asticot	Prick Lombriz	<i>P. terraenovae</i>	<i>C. vomitoria</i>	<i>L. sericata</i>	<i>L. terrestris</i>
1	(-)	(-)	0,451	0,135	0,040	-0,239
2	(-)	(-)	0,462	0,081	0,004	-0,203
3	(-)	(-)	0,515	0,146	0,058	-0,203
4	(-)	(-)	0,398	-0,008	-0,073	-0,245
5	(-)	(-)	0,644	-0,037	-0,031	-0,233
6	(+)	(-)				
7	(-)	(-)	0,515	-0,008	-0,120	-0,168
8	(-)	(+)	0,451	0,046	-0,144	-0,280
9	(-)	(-)	0,462	-0,073	-0,126	-0,292
10	(-)	(-)				
11	(-)	(-)	0,709	-0,014	-0,108	-0,304
12	(-)	(-)	0,609	0,052	-0,073	-0,239
13	(-)	(-)	0,726	0,135	0,087	-0,037
14	(-)	(-)	0,785	0,075	0,117	0,046
15	(-)	(-)	1,037	0,117	0,028	-0,215
16	(+)	(-)	1,372	0,123	0,140	-0,209
17	(-)	(-)	0,451	0,135	0,235	0,004
18	(-)	(-)	1,296	0,105	0,081	-0,067
19	(-)	(-)				
20	(-)	(-)	0,867	0,075	-0,014	-0,138
21	(-)	(-)	0,451	-0,031	-0,049	-0,251
22	(-)	(-)	0,709	0,081	0,081	-0,156
23	(+)	(-)	0,809	0,022	0,028	-0,316
24	(-)	(-)	1,102	0,111	0,093	0,034
25	(-)	(-)	1,431	0,117	0,324	-0,020
26	(-)	(-)	1,102	0,081	0,004	-0,150
27	(+)	(-)	1,026	0,063	0,034	-0,079
28	(-)	(-)	1,120	-0,031	0,022	-0,126
29	(-)	(-)	1,026	0,129	0,016	-0,049
30	(-)	(-)	1,296	0,022	-0,091	-0,215
31	(-)	(-)	0,451	-0,043	-0,114	-0,298
32	(-)	(-)	0,568	0,016	-0,091	-0,114
33	(-)	(-)	1,049	0,283	0,229	-0,191
34	(-)	(-)	0,721	0,010	0,004	-0,197
35	(-)	(-)	0,462	0,081	-0,120	-0,191
36	(+)	(-)	2,551	1,842	0,467	-0,114



nº	IgE específica UI/ml (ELISA)					
	Prick Asticot	Prick Lombriz	<i>P. terraenovae</i>	<i>C. vomitoria</i>	<i>L. sericata</i>	<i>L. terrestris</i>
37	(-)	(-)				
38	(-)	(-)	0,867	0,099	0,063	-0,049
39	(-)	(-)	0,515	0,200	0,378	-0,108
40	(-)	(-)	0,861	0,046	0,111	0,069
41	(-)	(-)	1,079	0,117	0,129	-0,002
42	(-)	(-)	0,656	0,052	-0,085	-0,227
43	(-)	(-)	0,832	0,093	-0,037	-0,132
44	(-)	(-)	0,768	0,052	-0,108	-0,197
45	(-)	(-)	0,656	0,087	0,052	-0,257
46	(-)	(-)	0,985	0,052	0,040	-0,221
47	(-)	(-)	2,774	0,040	-0,008	-0,191
48	(-)	(-)	0,785	0,140	0,022	-0,221
49	(-)	(-)	1,049	0,146	0,229	-0,079
50	(-)	(-)	0,996	0,152	0,152	-0,031
51	(+)	(+)	6,319	1,480	1,166	0,158
52	(-)	(-)	3,590	1,136	0,858	0,046
53	(-)	(-)	0,345	0,093	0,010	-0,144
54	(-)	(-)	0,814	0,063	-0,067	-0,168
55	(-)	(-)	0,656	-0,002	-0,126	-0,168
56	(-)	(-)	0,861	0,295	0,028	-0,251
57	(-)	(-)	1,847	0,028	-0,126	-0,132
58	(-)	(-)	1,049	0,164	0,223	-0,020
59	(-)	(-)	0,662	0,069	-0,061	-0,203
60	(-)	(-)	0,644	-0,037	-0,108	-0,091
61	(+)	(+)	1,706	0,164	0,117	-0,067
62	(-)	(-)	0,527	0,058	0,111	-0,031
63	(-)	(-)	0,715	0,022	0,028	-0,245
64	(-)	(-)	0,398	0,004	0,004	-0,174
65	(+)	(-)	2,950	0,111	0,040	0,099
66	(-)	(-)	0,462	0,247	0,099	1,077
67	(-)	(-)	0,415	0,081	-0,067	-0,085
68	(-)	(-)	0,703	-0,020	-0,073	-0,108
69	(-)	(-)	0,674	-0,014	-0,049	-0,097
70	(-)	(-)	0,509	0,028	0,140	-0,168
71	(-)	(+)	0,985	-0,025	-0,108	-0,251
72	(-)	(-)	0,433	0,058	-0,097	-0,227

---

**Anexo 7. Datos clínicos y hábitos de pesca. Pacientes de la serie clínica.**

n°	Nombre	Sexo	Edad	AP	atopia	Prick standard	Años afición	Cebos utilizados	Epo ca año	F rec. uso	H Clínica	T evol
1	CJUG	V	15	RC,A,U	Gram,Alt	10	Ast		Prim,Ver	Semanal	RC, edema palpebral con asticot	5 años
2	APG	V	24	RC,U	(-)	7	Ast, Lom		Prim, Ver	Semanal (Lombriz anual)	RC, UC en manos con asticot	3 años
3	JAB	V	43	RC,U,DAC	Gram, Perro	30	Ast, Lom		Prim, Ver	Semanal (Lombriz anual)	RC, UC en manos con asticot	1 año
4	JLSB	V	38	RC,U	(-)	35	Ast, Lom, V d Vas		Todo el año	Semanal (Lombriz)	RC por asticot	6 años
5	FJSO	V	22	RC,U	(-)	15	Ast, lom		Todo el año	Semanal (Lombriz anual)	RC, UC y edema palpebral asticot	3 años
6	SGP	V	38	RC,U	(-)	30	Ast, Lom		Todo el año	Semanal (Prim, Ver)	RC, UC en manos	8 años
7	IMC	V	24	RC,A,U,Alim,DA	Gram,Olea	6	Ast, Lom		Prim, Ver	Semanal	RC,A, UC asticot	?
8	JAR	V	42	RC,A,	(-)	30	Ast, Lom		Todo el año	Semanal	RC,A, UC cuello con lombriz	8 años
9	CPC	V		RC,U	Gram	10	Ast,Lom		Prim, Ver	Semanal	RC, U contacto cuello y cara	3 años
10	JTDR	V	45	RC	Gram, plant, gato	37	Ast,Lom		Prim, Ver, Otoño	Asticot semanal. Lombriz anual	RC (no lo relaciona). UC en manos con asticot	?
11	CAPD	V	17	RC	(-)	4	Asticot		Prim, Ver	Semanal	RC, edema palpebral con asticot	2 años
12	RPB	V	26	RC	Gram	20	Ast, Lom, mo squito		Prim, Ver	Diario	U contacto, edema palp con asticot	8 años

**Anexo 8. Estudio alergológico *in vivo* e *in vitro*. Pacientes de la serie clínica.**

IgE específica (ELISA)									
	Prick Asticot	Prick Lombriz	TPM Asticot	TPM Lombriz	P.terraenovae	C.vomitória	L.sericata	L.terrestris	
1	3mm	3mm	TPN (+) 0.5 mg/ml	TPC (+) 5 mg/ml	1,298	0,411	0,165	0,429	
2	8mm	9mm	TPC (+) 0.05 mg/ml	TPC (+) 0.05 mg/ml	13,700	0,703	0,484	0,455	
3	11mm	9mm	TPC (+) 0.05 mg/ml	TPC (+) 5mg/ml	12,918	1,383	1,144	0,891	
4	4 mm	(-)	TPC (+) 0.05 mg/ml	NO	0,388	0,063	-0,145	-0,274	
5	15 mm	5 mm	TPC (+) 0.5 mg/ml	TPC (+) 5mg/ml	12,676	1,203	1,304	0,495	
6	8 mm	4 mm	TPC (+) 0.05 mg/ml	TPC (+) 5 mg/ml	11,167	0,910	0,288	0,563	
7	13mm	5 mm	TPC (+) 0.05 mg/ml	TPC (+) 5mg/ml	2,692	-0,233	0,177	0,459	
8	4mm	9mm	TPC (-)	TPN (+) 0.5 mg/ml	0,457	-0,210	0,347	0,418	
9	10 mm	4 mm	TPC (+) 0.05 mg/ml	TPC (+) 0.5 mg/ml	7,835	0,145	0,356	0,573	
10	8 mm	(-)	TPC (+) 5 mg/ml	No realizado	0,178	-0,117	-0,190	0,108	
11	12 mm	5 mm	No realizado	No realizado		No realizado			
12	10 mm	11mm	No realizado	No realizado		No realizado			

**Anexo 9. ELISA IgE inhibición. Valores de absorbancia frente a extracto de *P. terraenovae*, tras preincubación con concentraciones crecientes del alérgeno inhibidor.**

Concentración	-0,301	-1,301	-2,301	-3,301	-4,301	-5,301	-6,301
Alérgeno inhibidor	0,5	0,05	0,005	0,0005	0,00005	0,000005	0,0000005
	0,256	0,584	0,657	0,738	0,737	0,765	0,674
<i>L. sericata</i>	0,248	0,566	0,653	0,75	0,731	0,747	0,685
	0,247	0,565	0,697	0,745	0,755	0,727	0,685
Absorbancia	0,250	0,572	0,669	0,744	0,741	0,681	0,681
% union	38,711	88,402	103,454	115,103	114,588	105,361	105,361
% inhibicion	<b>61,289</b>	11,598	-3,454	-15,103	-14,588	-5,361	-5,361
	0,031	0,467	0,684	0,671	0,65	0,685	
<i>L. terrestris</i>	0,04	0,47	0,677	0,656	0,696	0,686	
	0,035	0,474	0,656	0,684	0,679	0,71	
Absorbancia	0,035	0,470	0,672	0,670	0,675	0,694	
% union	5,464	72,732	103,969	103,660	104,381	107,268	
% inhibicion	<b>94,536</b>	27,268	-3,969	-3,660	-4,381	-7,268	
	0,228	0,392	0,521	0,637	0,665	0,624	
<i>C. vomitoria</i>	0,213	0,381	0,552	0,633	0,639	0,618	
	0,217	0,398	0,555	0,642	0,603	0,632	
Absorbancia	0,219	0,390	0,543	0,637	0,636	0,625	
% union	33,918	60,361	83,918	98,557	98,299	96,598	
% inhibicion	<b>66,082</b>	39,639	16,082	1,443	1,701	3,402	
		0,016	0,337	0,652	0,663	0,549	0,601
<i>P. terranova</i>		0,016	0,333	0,645	0,627	0,564	0,592
		0,027	0,355	0,641	0,606	0,59	0,625
Absorbancia		0,020	0,342	0,646	0,632	0,568	0,606
% union		3,041	52,835	99,897	97,732	87,784	93,711
% inhibicion		<b>96,959</b>	47,165	0,103	2,268	12,216	6,289