

M. D. Herrero^b,
M. Gómez^a, P. Ojeda^a,
I. Moneo^b y E. Alday^a

^aUnidad de Neumología y
Alergia Laboral. Instituto
Nacional de Seguridad e
Higiene en el Trabajo, Madrid

^bServicio de Inmunología.
Instituto de Salud Carlos III.
Madrid.

Original

Hipersensibilidad a crustáceos y detección de IgE específica

Fundamento: Las reacciones de hipersensibilidad relacionadas con la ingestión de marisco constituyen una de las alergias alimentarias más frecuentes en adultos. Se presenta el estudio realizado a tres pacientes, dos de ellos con historia de hipersensibilidad tras la ingesta con distintos crustáceos y el tercero con historia de hipersensibilidad por vía inhalatoria durante la cocción de nécora. **Métodos:** Se realizó un cuestionario clínico y *prick test* frente a una batería de neuroalergenos y crustáceos. Se determinó la IgE total y se realizó SDS-PAGE e inmunodetección IgE con antígeno de gamba, cigala, nécora, buey de mar y langostino tanto crudo como cocidos. **Resultados:** Las pruebas cutáneas fueron positivas en los tres pacientes con algunos de los distintos crustáceos. Se detectaron múltiples alérgenos de distintos pesos moleculares, aunque con mayor intensidad para pesos moleculares inferiores a 20 kDa y con los extractos hervidos en dos de ellos; en el tercer paciente sólo se detectaron 3 alérgenos de bajo peso molecular aproximadamente de 14 kDa en la nécora cocida y no se reconocieron otros alérgenos en los otros crustáceos testados. **Conclusiones:** El diagnóstico de hipersensibilidad a crustáceos debe realizarse siempre con extractos tanto crudos como hervidos y completarse con estudios inmunológicos de detección de IgE específica.

Palabras clave: Hipersensibilidad. Crustáceos. Inmunodetección. IgE.

Shellfish hypersensitivity and specific IgE detection

Background: Hypersensitivity reactions in relation to shellfish ingestion are among the most frequent food allergy reactions in the adult. We report the study carried out on three patients, two of them with a history of hypersensitivity manifestations after the ingestion of various shellfish and the third one with a history of inhalational hypersensitivity reactions during the preparation –boiling– of sea crabs (*Portunus puber* L.; Spanish: “nécora”). **Methods:** A clinical questionnaire was administered and prick tests performed with a panel of airborne allergens and shellfish. The total serum IgE levels were quantitated, and SDS-PAGE and IgE immunodetection was carried out with both raw and cooked shrimp, Norway lobster, sea crab (two species: *Portunus puber* L. and the “ox-crab” *Cancer pagurus* L.) and prawn antigens. **Results:** The skin tests were positive in all three patients with some of the shellfish tested. Multiple allergens with varying molecular weights were detected with the sera of two of the patients, but with greater intensity for those with molecular weights below 20 kDa and with the boiled extracts; in the third patient only three low-molecu-

Correspondencia:
Dra. María Gómez Martínez
Unidad de Neumología y Alergia
Laboral
Instituto Nacional de Seguridad e
Higiene en el Trabajo
Torrelaguna 73
28027 Madrid.
e-mail: ealday@mtas.es

lar weight (ca. 14 kDa) allergens were detected in the boiled crab extract, with no further allergen recognition in any other of the shellfish studied. *Conclusions:* The diagnosis of shellfish hypersensitivity must always be carried out using both raw and boiled extracts, and it must be complemented with specific IgE immunodetection studies.

Key words: Hypersensitivity. Shellfish. Immunodetection. IgE.

Las reacciones de hipersensibilidad tras la ingestión de marisco constituyen una de las alergias alimentarias más frecuentes en adultos¹. La mayoría son alergias a múltiples mariscos, tales como la langosta, cangrejo y camarón. Los individuos pueden desarrollar urticaria, angioedema, asma y cuadros de anafilaxia²⁻⁵. Hoffmann et al⁶ demostraron la presencia de antígenos termoestables y termolábiles en el camarón. El antígeno termoestable fue identificado con un peso molecular de unos 28 kDa. En estudios recientes se ha identificado el alergeno del camarón como una proteína muscular, la tropomiosina⁷⁻⁹. Hefle et al¹⁰, en un estudio realizado en 16 manipuladores de marisco y en dos cocineros, encontraron por detección de IgE específica varios alérgenos de cangrejo entre 25 y 45 kDa; dos de ellos sólo reconocían unas proteínas de unos 14 kDa y otros dos unos alérgenos de 97 kDa. Leung et al¹¹ caracterizaron el alergeno principal del cangrejo, *Cha f 1*, tropomiosina de unos 34 kDa. En el último simposio de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica se presentó un caso de una paciente que refería sintomatología de asma bronquial con la manipulación y la inhalación de partículas de la cocción de cigala y que presentaba, por detección de IgE específica, una única banda de 30,2 kDa con el extracto de cigala, y con gamba, mejillón, percebe y caracol una proteína de unos 46 kDa. Según los autores¹², ninguna de estas proteínas era la tropomiosina. Presentamos 3 pacientes con clínica con distintos mariscos y distintos patrones de reconocimiento de IgE específica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Casos clínicos

Caso 1. Varón de 26 años, que trabaja desde hace 10 años como pescadero y cuece mariscos. Hace 3 años, tras la ingestión de langostino cocido, presentó edema labial con pruri-

to palatino y lingual. El cuadro se ha repetido con bogavante, gamba y nécora (todos hervidos). Tolera la cigala y la gamba a la plancha; no ha comido langostino a la plancha. No ha probado camarón, centollo, buey de mar, cangrejo, percebe, mejillón, almeja, navaja, berberechos ni ostra. Tolera el calamar, la sepia y el pulpo cocidos y a la plancha.

Caso 2. Varón de 38 años de edad, que trabaja de camarero. Hace 20 años, tras la ingestión de centollo y buey de mar, presentó una erupción eritematosa generalizada con sensación de opresión torácica. El cuadro cedió tras tratamiento en un servicio de urgencia con corticoides y antihistamínicos. Con la ingestión de langosta, bogavante, cigala, langostino, gamba y nécora refiere prurito palatino y faríngeo y sensación de leve edema labial. Tolera los moluscos.

Caso 3. Mujer de 25 años de edad, con antecedentes personales de polinosis en tratamiento con inmunoterapia. Desde hace unos 6 años trabaja en una empresa dedicada a la cocción de distintos mariscos. Maneja pulpo, gamba, langostino, nécora y cangrejo. Desde hace unos 2 años, coincidiendo con los meses en que se cuece nécora en su puesto de trabajo, de septiembre a octubre, refiere disnea, sibilancias y tos seca al entrar en la empresa, con reagudizaciones nocturnas. También refiere lesiones urticariales en zonas de contacto con el líquido de cocción de la nécora; el resto del año está asintomática. Tolera la gamba y el langostino cocidos, nunca ha comido langosta, bogavante, cigala, quisquilla, camarón, centollo, buey de mar, nécora ni cangrejo. Tolera el pescado blanco y el azul.

Alérgenos

Para las pruebas cutáneas se prepararon extractos con carne de nécora, langostino, buey de mar y cangrejo crudos por trituración, extraídos en PBS y posterior centrifugación, a 4.500 g durante 15 minutos; se recogió el sobrenadante y finalmente para su esterilización se pasó a través de un filtro Millipore. Se obtuvo una concentración proteica final de 1 mg/ml.

Para los estudios *in vitro* se prepararon, además, extractos por trituración de la carne de los crustáceos mencionados anteriormente hervidos y crudos, extraídos en PBS y centrifugados a 4.500 g durante 15 minutos; el sobrenadante resultante se centrifugó a 16.000 g durante 10 minutos. Se presentó una concentración proteica de 1 mg/ml.

Pruebas cutáneas

Se realizaron pruebas cutáneas mediante el método de *prick test* para neumoalérgenos habituales (mezcla de

Dermatophagoides, mezcla de hongos, mezcla de gramíneas, mezcla de árboles, mezcla de malezas) y con cucaracha (Lab. ALK-Abelló Madrid). Se realizó la lectura inmediata a los 15 minutos y se consideró una prueba cutánea positiva cuando el diámetro mayor de la pápula era superior a 3 mm.

SD-PAGE

Se realizó electroforesis SDS-PAGE con acrilamida al 16% como gel separador con los extractos preparados¹³.

Detección de anticuerpos específicos IgE

Los anticuerpos IgE se detectaron tras electroforesis y difusión a nitrocelulosa, según técnica descrita por Moneo et al¹⁴. Posteriormente, las membranas se incubaron con los sueros y a continuación, con un anticuerpo monoclonal anti IgE. Tras la incubación con un antisuero anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con fosfatasa alcalina, las membranas se revelaron con BCIP-NBT¹⁴.

RESULTADOS

Pruebas *in vivo*

Las pruebas cutáneas para neuroalergenos resultaron negativas en los casos 1 y 2. El caso 3 presentó pruebas positivas para polen de gramíneas. El *prick test* con cucaracha sólo fue positivo en el caso 1. Los resultados para los distintos crustáceos probados se reflejan en la tabla I.

Pruebas *in vitro*

IgE específica (Allergocoat 6): Sólo en el caso 3 se hizo determinación de IgE para cangrejo, con resultado negativo (<0,35 AU/ml).

SDS-PAGE: Se observaron múltiples bandas proteicas en todas las calles, con menor número de bandas en las calles correspondientes a los extractos hervidos. Destacó la presencia en todas las calles de una banda principal

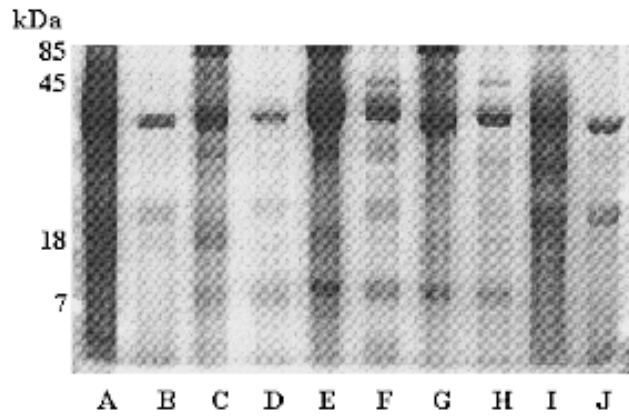


Fig. 1. SDS-PAGE. Calle A: gamba cruda; calle B: gamba cocida; calle C: cigala cruda; calle D: cigala cocida; calle E: nécora cruda; calle F: nécora cocida; calle G: buey de mar cruda; calle H: buey de mar cocido; calle I: langostino cruda; calle J: langostino cocido.

correspondiente a una proteína de peso molecular en torno a 39 kDa. En las calles de la E a la H se detectó una banda intensa con peso molecular aproximado a 14 kDa que no apareció en el resto de las calles (fig. 1).

Detección de anticuerpos IgE específicos: Se observó una gran heterogeneidad en el reconocimiento antigénico en los tres casos; destacó una mayor intensidad en la fijación de IgE en las calles correspondientes a los extractos hervidos (figs. 2 a 4). Hubo reconocimiento IgE desde pesos moleculares en torno a 14 kDa hasta mayores de 100 kDa y se produjo una mayor detección de IgE para pesos moleculares menores de 20 kDa.

En uno de los casos (fig. 3) sólo se detectó una intensa banda de fijación de IgE en la calle correspondiente a nécora hervida y para pesos moleculares menores de 20 kDa.

DISCUSIÓN

La sensibilización a marisco puede presentar manifestaciones clínicas muy diversas, desde urticaria, angioedema o asma hasta anafilaxia^{1-5, 12} y la vía de entrada puede ser tanto digestiva como respiratoria. En el presente estudio dos pacientes tenían sintomatología cutánea tras la in-

Tabla I. Pruebas cutáneas con extracto de crustáceos y determinación de IgE sérica total en los pacientes estudiados

Caso	Prick test nécora (mm)	Prick test langostino (mm)	Prick test buey de mar (mm)	Prick test cangrejo (mm)	IgE sérica total total (UI/ml)
1	5 x 5	Neg	Neg	Neg	50
2	10 x 5	8 x 5	6 x 5	5 x 5	694
3	10 x 8	Neg	Neg	10 x 5	25

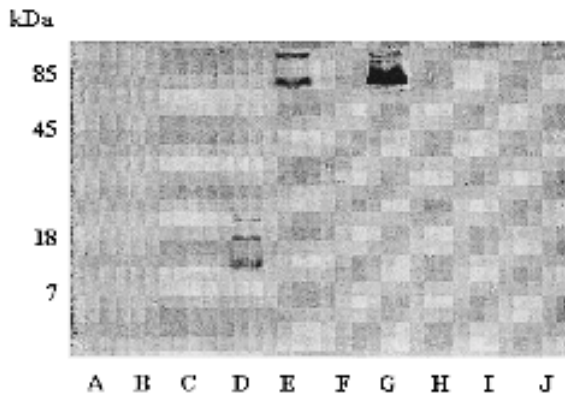


Fig. 2. Detección de IgE específica en el caso 1, mismo orden de calles que en la figura 1.

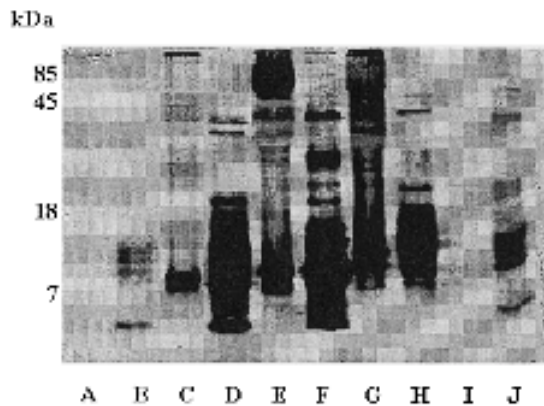


Fig. 3. Detección de IgE específica en el caso 2 mismo orden de calles que en la figura 1.

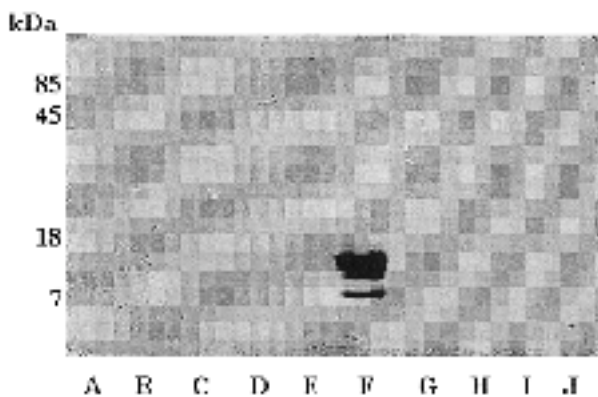


Fig. 4. Detección de IgE específica en el caso 3 mismo orden de calles que en la figura 1.

gesta de diversos crustáceos y el tercero, crisis de asma en relación con inhalación de vapores de cocción de nécora, en su puesto de trabajo.

En el estudio por SDS-PAGE (fig. 1) se encontró

una banda proteica común en todas las calles, que podría corresponder a una proteína con peso molecular similar a la tropomiosina. Leung et al¹¹ identificaron una proteína de 34 kDa denominada *Cha f 1* como el alérgeno principal del cangrejo y demostraron su similitud con la tropomiosina del camarón. Diversos estudios señalan a esta proteína como un importante panalérgeno en sensibilización cruzada entre crustáceos^{3,4, 6-8, 15}.

Sin embargo, esto no pudo ser demostrado en nuestros pacientes, ya que sólo en uno de ellos se produjo fijación de IgE a nivel de esta proteína, reconociendo además y con mayor intensidad otras proteínas con un peso molecular inferior a 20 kDa (fig. 2). En el resto de los pacientes se produjo una gran heterogeneidad en la fijación de IgE, lo que nos hizo pensar en la posibilidad de que pudieran existir otros alérgenos principales en crustáceos, diferentes a la tropomiosina y con pesos moleculares en torno a 14 kDa, donde se produjo de forma mayoritaria el reconocimiento por la IgE.

Se observó también una diferencia en la detección de IgE para extractos crudos y hervidos: se vio una mayor fijación en las calles correspondientes a los extractos hervidos a pesar de existir mayor cantidad de proteínas en los extractos crudos. Esto plantea la posibilidad de que un aumento de la temperatura pudiera producir un cambio de conformación de las proteínas que les haga expresar epítopos ocultos responsables del nuevo reconocimiento antigénico.

En el estudio destacó el caso 3 (fig. 3), donde no se detectó IgE específica, mientras que por inmunodetección se observó una intensa fijación de IgE de forma muy específica en la calle correspondiente al extracto de nécora hervida en peso molecular en torno a 14 kDa y menores. Clínicamente la paciente presentaba urticaria de contacto que podría deberse a la presencia de estas proteínas en el agua de cocción de dicho marisco y crisis de asma que pudieron ser causadas por la aerosolización del antígeno.

En este estudio, los pacientes no reconocieron la tropomiosina como el alérgeno principal y sin embargo hubo fijación de IgE a nivel de otros alérgenos con pesos moleculares de aproximadamente 14 kDa. Serían necesarios estudios en series más amplias de pacientes para determinar si pudieran ser alérgenos principales. El diagnóstico de sensibilización a marisco debería realizarse siempre con extractos crudos y hervidos, ya que se ha detectado una diferencia en el reconocimiento entre ambos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias a una beca de la fundación MAPFRE MEDICINA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leung PSC, Chu KH. Molecular and immunological characterization of shellfish allergens. *Front Biosci* 1998; 3: 306-312.
2. Daul CB, Slattery M, Lehrer SB. Shared antigenic/allergenic epitopes between shrimp Pen a I and fruitfly extract (abstract). *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 341.
3. Daul CB, Morgan JE, Lehrer SB. Hypersensitivity reactions to crustacea and mollusks. *Clin Rev Allergy* 1993; 11: 201-222.
4. Waring NP, Daul CB, Deshaza RD, McCants ML, Lehrer SB. Hypersensitivity reactions to ingested Crustacea: clinical evaluation and diagnostic studies in shrimp-sensitive individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 440-445.
5. Daul CB, Morgan JE, Waring NP, McCants ML, Hughes J, Lehrer SB. Immunologic evaluation of shrimp allergic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 716-722.
6. Hoffman DR, Day ED, Miller JS. The major heat stable allergen of shrimp. *Ann Allergy* 1981; 47: 17-22.
7. Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, Metcalfe DD, Subba Rao PV. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE binding Epitopes. *J Immunol* 1993; 151: 5354-5363.
8. Daul CB, Slattery M, Reese G, Lehrer SB. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1994; 105: 49-55.
9. Leung PSC, Chu KH, Chow WK, Ansari A, Bandea CI, Kwan HS, et al. Cloning, expression, and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat-stable shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 882-890.
10. Hefle SL, Bush RK, Lehrer SB, Malo JL, Cartier A. Snow crab allergy: identification of IgE-binding proteins (abstract). *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 322.
11. Leung PSC, Chen YC, Gershwin ME, Wong SH, Kwan HS, Chu KH. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 847-852.
12. De la Higuera R, López R, Bartolomé B, Guardia P, Delgado J, Palacios R, et al. Hipersensibilidad selectiva a cigala. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1999; 14: 13-14.
13. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
14. Moneo I, Caballero ML, Gómez F, Ortega E, Alonso MJ. Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *J Allergy Clin Immunol* (en prensa).
15. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate panallergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119: 247-258.