

# Síndrome LTP: Caracterização do perfil clínico e molecular de sensibilização – Método ALEX<sup>®</sup> MacroArray

## *LTP syndrome: Characterization of the clinical and molecular sensitization profile – ALEX<sup>®</sup> MacroArray method*

Data de receção / Received in: 26/11/2020

Data de aceitação / Accepted for publication in: 17/2/2021

Rev Port Imunoalergologia 2021; 29 (4): 253-262

Maria Inês T. Silva<sup>1</sup> , Marisa Paulino<sup>1</sup> , Célia Costa<sup>1</sup> , Fátima Cabral Duarte<sup>1</sup> , Manuel Pereira Barbosa<sup>1,2</sup> ,  
Maria Conceição Pereira Santos<sup>2,3</sup> 

<sup>1</sup> Serviço de Imunoalergologia, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

<sup>2</sup> Clínica Universitária de Imunoalergologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

<sup>3</sup> Unidade de Imunologia Clínica, Faculdade de Medicina, Instituto de Medicina Molecular, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

### RESUMO

**Introdução:** A alergia alimentar afeta milhões de pessoas globalmente. As proteínas de transferência lipídica (LTP) são panalergénios presentes em alimentos vegetais cujos sintomas de sensibilização variam de síndrome de alergia oral (SAO) a anafilaxia. **Objetivo:** Caracterização do perfil de sensibilização clínica e molecular de doentes com história de reação prévia a alimentos contendo LTP. **Material e métodos:** Estudo retrospectivo incluindo 15 doentes com história de reação sistémica a alimentos contendo LTP. Os doentes foram caracterizados quanto a sintomas e sensibilização em testes cutâneos por picada (TCP) com extrato comercial e alimentos em natureza (TC PP). Foi realizado *MacroArray Allergy Explorer-ALEX<sup>®</sup>* para avaliação de valores de IgE total, IgE específica para componentes moleculares (IgEcm) e extratos totais (IgEet). **Resultados:** Quinze doentes, 73% mulheres, média de idades 30,7±13,7 anos. Média de idades no primeiro episódio foi 21,8±10,5 anos, manifestando-se como anafilaxia n=8 (maçã, pêssigo, frutos secos), urticária/angioedema n=4 (maçã, pêssigo, amendoim) e SAO n=3 (maçã, pêssigo, amendoim). IgE total média: 430,5kU/L. Identificaram-se as seguintes LTP (N; IgEcm média±desvio padrão-kU/L): *Pru p 3* (15; 15,7±21,5), *Ara h 9* (10; 2,9±4), *Mal d 3* (9; 1,5±1,7), *Act d 10* (6; 0,6±1), *Vit v 1* (6; 1,8±2,5), *Cor a 8* (4; 0,1±0,2), *Sola l 6* (1; 0,88). Com pêssigo todas

<http://doi.org/10.32932/rpia.2021.12.070>

as associações entre clínica, testes cutâneos e valores de IgE tiveram concordância  $k=1$ ; concordância da clínica com TCP e TC PP foi superior para maçã ( $k=0,44$ ;  $p=0,03$ ); concordância da clínica com IgEet foi superior para amendoim ( $k=0,87$ ;  $p<0,01$ ); concordância da clínica com IgEcm foi superior para avelã ( $k=0,70$ ;  $p<0,01$ ) e uva ( $k=0,55$ ;  $p=0,02$ ). **Conclusões:** O método ALEX<sup>®</sup> permitiu identificar simultaneamente a IgE total, IgEet e IgEcm, simplificando a interpretação e correlação clínica dos resultados. Neste estudo demonstramos que, para diferentes alimentos, o método diagnóstico com maior concordância com a clínica é variável e dependente do alimento. Será necessário um estudo prospetivo mais alargado para aferir a sensibilidade e especificidade deste teste.

**Palavras-chave:** ALEX<sup>®</sup> MacroArray, IgE específica, proteínas de transferência lipídica, síndrome LTP.

© 2021 Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica. Publicado por Publicações Ciência & Vida. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## ABSTRACT

**Introduction:** Food allergy affects millions of people globally. Lipid transfer proteins (LTP) are panallergens present in plant foods and sensitization symptoms vary from oral allergy syndrome (OAS) to anaphylaxis. **Objective:** Characterization of clinical and molecular sensitization profile of patients with history of previous reaction to foods containing LTP. **Material and methods:** Retrospective study including 15 patients with history of systemic reaction to foods containing LTP. Patients were characterized for symptoms and sensitization in skin prick tests (SPT) with commercial extract and food in nature (SPT prick-prick). MacroArray Allergy Explorer-ALEX<sup>®</sup> was performed to evaluate total IgE, specific IgE for molecular components (IgEcm) and total extracts (IgEte) values. **Results:** Fifteen patients, 73% women, mean age  $30.7\pm 13.7$  years old. Mean age in first episode was  $21.8\pm 10.5$  years old, manifesting as: anaphylaxis  $n=8$  (apple, peach, nuts), urticarial/angioedema  $n=4$  (apple, peach, peanut) and OAS  $n=3$  (apple, peach, peanut). Mean total IgE:  $430.5\text{ kU/L}$ . The following LTP (N; IgE mean  $\pm$  standard deviation - kU/L) were identified: Pru p 3 ( $15; 15.7\pm 21.5$ ), Ara h 9 ( $10; 2.9\pm 4$ ), Mal d 3 ( $9; 1.5\pm 1.7$ ), Act d 10 ( $6; 0.6\pm 1$ ), Vit v 1 ( $6; 1.8\pm 2.5$ ), Cor a 8 ( $4; 0.1\pm 0.2$ ), Sola l 6 ( $1; 0.88$ ). For peach, all associations between symptoms, cutaneous tests and IgE values obtained a correlation of  $k=1$ ; furthermore, symptoms agreement with SPT+SPT prick-prick was higher for apple ( $k=0.44$ ,  $p=0.03$ ); symptoms agreement with IgEte was higher for peanut ( $k=0.87$ ,  $p<0.01$ ); symptoms agreement with IgEcm was higher for hazelnut ( $k=0.70$ ,  $p<0.01$ ) and grape ( $k=0.55$ ,  $p=0.02$ ). **Conclusions:** ALEX<sup>®</sup> method allows simultaneous identification of total IgE, IgEte and IgEcm, simplifying the interpretation and clinical correlation of the results. In this study we demonstrate for different foods that the diagnostic method with greater correlation with clinic is variable and dependent on the food. A broader prospective study is needed to assess the sensitivity and specificity of this test.

**Keywords:** ALEX<sup>®</sup> MacroArray, lipid transfer protein, LTP syndrome, specific IgE.

© 2021 Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica. Published by Publicações Ciência & Vida. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## INTRODUÇÃO

Alergia alimentar afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo e a sua prevalência está a aumentar nos países industrializados, devido, sobretudo, a alterações ambientais e socioeconómicas, hábitos alimentares e padrões de exposição polínica<sup>1-3</sup>. A alergia ao pêssego é a alergia alimentar mais frequente na idade adulta no Sul da Europa, incluindo Portugal<sup>4</sup>.

As proteínas de transferência lipídica (LTP) são panalergénios presentes em frutos, vegetais, sementes, látex e pólenes de árvores e ervas, pelo que reações de hipersensibilidade associadas a LTP podem ir muito além da alergia a alimentos vegetais<sup>1-7</sup>.

De acordo com a sua afinidade para os fosfolípidos, as LTP podem ser classificadas como específicas ou não específicas, sendo as últimas subdivididas em LTP-1 e LTP-2 consoante o seu peso molecular de 9-kDa e 7-kDa, respetivamente. Fazem parte de uma superfamília de proteínas, as prolaminas, que contém mais de 3000 proteínas e a sensibilização a LTP na bacia do Mediterrâneo é muito prevalente, com uma taxa que ronda os 70%<sup>1,5,6</sup>, estando maioritariamente envolvidos os frutos frescos (rosáceas e kiwi), os frutos secos e o amendoim. As LTP-1 são consideradas as proteínas alergénicas<sup>8-10</sup>.

A sua sensibilização pode acontecer por via oral, inalatória ou cutânea, com possibilidade de reatividade cruzada entre os vários alimentos de origem vegetal e entre estes e os pólenes. A presença de sintomas com dois ou mais alimentos, por sensibilização a LTP, é designada de Síndrome LTP<sup>3-7</sup>. Estudos anteriores encontraram uma associação entre alergia ao pêssego e sensibilização a pólenes de várias espécies taxonomicamente não relacionadas, como por exemplo *Betula*, *Artemisia*, *Chenopodium*, *Plantago*, *Parietaria*, podendo estar associadas a manifestações mais graves<sup>2,3,4</sup>. Os principais alergénios do pólen de *Parietaria* (*Par j 1* e *2*) pertencem à família LTP, bem como de *Artemisia* (*Art v 3*) e *Olea* (*Ole e 7*), bastante comuns na área do Mediterrâneo, pelo que é

lícito considerar a possibilidade de uma ligação entre a sensibilização inalatória ao pólen LTP e alergia alimentar a LTP, nomeadamente como via de sensibilização primária a LTP<sup>4,11,12</sup>.

Os sintomas de sensibilização podem ser mais ligeiros e restritos à orofaringe – síndrome de alergia oral (SAO) – ou sistémicos, desde cutâneos, respiratórios, gastrintestinais, a anafilaxia, uma vez que as LTP são resistentes à temperatura e à pepsina, aumentando a probabilidade de absorção sistémica<sup>2,3,8,13</sup>.

As LTP apresentam maior concentração na pele dos frutos, sendo que a sua polpa tem uma concentração bastante inferior, pelo que alguns doentes toleram a ingestão destes alimentos sem pele. No entanto, a concentração de LTP varia conforme a cultura e maturação dos alimentos, bem como com as condições de armazenamento dos mesmos<sup>1,14</sup>.

A *Pru p 3* (LTP do pêssego) é a LTP mais representativa deste grupo de alergénios, sendo a causa de alergia alimentar mais comum em Espanha, Itália e Portugal associada a esta proteína<sup>5,6</sup>.

O diagnóstico é baseado numa história clínica detalhada, confirmação de sensibilização através da realização de testes cutâneos por picada (TCP) com extrato comercial dos alimentos suspeitos e da LTP do pêssego (*Pru p 3*) e com o alimento em natureza (TC PP), culminando com a confirmação por prova de provocação oral. No entanto, é considerado relevante complementar o diagnóstico com a avaliação *in vitro* das respetivas moléculas purificadas, nomeadamente o doseamento de IgE específicas, quer para o extrato nativo quer para os componentes moleculares, permitindo uma melhor interpretação e correlação clínica dos resultados. Desta forma, poder-se-á distinguir entre verdadeira sensibilização ou reatividade cruzada, fator bastante importante na alergia alimentar para evitar dietas restritivas<sup>15,16</sup>.

O objetivo do estudo foi caracterizar, através do método ALEX® MacroArray, o perfil clínico e molecular de sensibilização numa amostra de doentes com história de reação prévia a alimentos que contêm LTP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### População e desenho do estudo

Foi realizado um estudo observacional retrospectivo, num hospital central, em que foram selecionados aleatoriamente soros de doentes com história de reação sistémica prévia a alimentos contendo LTP, nomeadamente frutos frescos, frutos secos e amendoim, seguidos na consulta de Alergia Alimentar.

### Caracterização clínica

Os doentes foram caracterizados quanto a dados demográficos, sintomas e alimentos contendo LTP envolvidos na reação associada à sua ingestão e sensibilização nos TCP com extrato comercial e com o alimento em natureza.

Na maioria dos doentes foram realizados TCP com extrato comercial (Roxall®, Bilbao, Espanha) de *Pru p 3* e dos alimentos suspeitos, incluindo amendoim, avelã, kiwi, maçã, pêssago, tomate e uva, bem como TC PP com estes alimentos em natureza, se TCP negativo. Em alguns doentes foram realizados TC PP com o mesmo fruto, ainda que já apresentassem o TCP positivo, de forma a poder ser avaliada a sensibilização a pele e polpa, cuja distinção nem sempre existe no extrato comercial. Nos doentes que não mantiveram seguimento não foi possível concluir o estudo. Foram, também, realizados em todos os doentes TCP com bateria de aeroalergénios: ácaros domésticos e de armazenamento, gramíneas selvagens e cultivadas, oliveira, parietária, artemísia, plátano, plantago, epitélios de cão e gato e fungos (*Alternaria* e *Aspergillus*). Foi utilizado cloreto de sódio a 0,9% como controlo negativo e histamina 10mg/mL como controlo positivo. Os resultados foram lidos após 15 minutos e considerados positivos se o maior diâmetro da pápula fosse igual ou superior a 3mm<sup>17,18</sup>.

### IgE total e IgE específica

Foi efetuado um ensaio enzimático colorimétrico através do método *MacroArray Allergy Explorer* – ALEX®

(*MacroArrayDX*, Viena, Áustria) para avaliação, nas mesmas unidades (kU<sub>A</sub>/L) de valores de IgE total e IgE específica para componentes moleculares e para extratos totais, de acordo com as indicações do fabricante. O ALEX® é um teste *multiplex in vitro* que quantifica simultaneamente a IgE total e a IgE específica para 126 alergénios moleculares e para 156 extratos totais de alergénios (Quadro 1).

Os extratos totais dos alimentos com LTP incluídos no ALEX® são de maçã, kiwi, pêssago, avelã, amendoim,

**Quadro 1.** Resumo de composição dos alergénios presentes no método ALEX®<sup>15,16</sup>

Alergénio	Número total	Número de extratos	Número de componentes moleculares
CCD	2	0	2
Ácaros	24	9	15
Epitélios	20	11	9
Fungos	15	5	10
Gramíneas	14	7	7
Árvores	31	19	12
Ervas	17	10	7
Látex	7	1	6
Himenópteros	9	4	5
Vegetais	18	13	5
Peixe/marisco	17	12	5
Frutos secos	25	9	16
Frutos frescos	25	16	9
Leguminosas	9	5	4
Cereais e sementes	19	15	4
Leite	8	5	3
Ovo	7	2	5
Carne	8	7	1
Condimentos	7	6	1

ALEX® – *MacroArray Allergy Explorer*; CCD – Determinantes de reatividade cruzada de hidratos de carbono

tomate e aipo; os extratos totais de pólenes com LTP são de *Artemisia vulgaris* e de *Parietaria judaica*. Dos alérgenos moleculares dos alimentos com LTP fazem parte *Mal d 3* (maçã), *Act d 10* (kiwi), *Pru p 3* (pêssego), *Cor a 8* (avelã), *Ara h 9* (amendoim), *Sola l 6* (tomate), *Api g 2* (aipo), *Api g 6* (aipo) e *Vit v 1* (uva); os alérgenos moleculares de pólenes com LTP são *Art v 3* (*Artemisia vulgaris*) e *Par j 2* (*Parietaria judaica*).

Os diferentes alérgenos e componentes estão acoplados numa membrana de nitrocelulose e são incubados em agitação, com uma solução de diluente e respetivos soros, durante 2 horas, ao fim das quais são extensamente lavados, sendo posteriormente adicionado o anticorpo (IgE anti-humana marcada com fosfatase alcalina) que é incubado mais 30 minutos. De seguida, é feito um novo ciclo de lavagem e adicionado o substrato enzimático e, posteriormente, a solução de paragem, ficando a reação completa. A imunofluorescência de cada alérgeno é medida por um software informático que a transforma em dados numéricos, sendo os intervalos de leitura os seguintes:  $<0,3kU_A/L$ ;  $0,3-1kU_A/L$ ;  $1-5kU_A/L$ ;  $5-15kU_A/L$ ; e  $>15kU_A/L$ <sup>15,16</sup>.

### Análise estatística

A análise estatística foi executada com o software IBM SPSS® v.20. A análise descritiva incluiu a frequência de resultados positivos (em percentagem) para variáveis qualitativas e a média±desvio-padrão para variáveis quantitativas. Foi calculado o valor do coeficiente de concordância kappa de Cohen (k) ajustado aos intervalos de confiança de 95%, sendo que os valores foram considerados significativos para  $p<0,05$ .

## RESULTADOS

Analisamos um total de 15 doentes: 11 mulheres (73,3%). A média de idades na primeira consulta foi de  $30,7\pm 13,7$  anos. Catorze (93,3%) doentes tinham antecedentes de atopia: 14 (93,3%) rinite alérgica, 6 (40%) asma e 4 (26,7%) eczema atópico.

Todos os doentes apresentavam sintomas com pêssego, embora nem todos no primeiro episódio de manifestação da síndrome LTP.

O primeiro episódio de sintomas foi em média aos  $21,8\pm 10,5$  anos e manifestou-se como anafilaxia em 8 (53,3%) doentes com a ingestão de pêssego (n=3), maçã (n=3), avelã (n=1) e noz (n=1); urticária e/ou angioedema em 4 (26,7%) doentes com a ingestão de pêssego (n=2), maçã (n=1) e amendoim (n=1); e SAO em 3 (20%) doentes com a ingestão de pêssego (n=1), amendoim (n=1) e maçã (n=1).

Os três doentes que tiveram SAO como primeira manifestação da síndrome LTP desenvolveram posteriormente reação sistémica, nomeadamente anafilaxia, com os mesmos alimentos.

Todos os doentes tiveram reação imediata após a ingestão do fruto fresco/seco/amendoim, sendo que 9 (60%) apresentaram sintomas durante a ingestão, 4 (26,7%) apresentaram sintomas com um intervalo inferior a 30 minutos após a ingestão e em 2 (13,3%) os sintomas surgiram num intervalo superior a 30 e inferior a 60 minutos após a ingestão.

Os resultados dos testes *in vivo* com o extrato comercial e com o alimento em natureza encontram-se representados no Quadro 2, bem como a identificação dos sintomas e frutos envolvidos na primeira reação.

Na população em estudo foi identificada, através do método ALEX®, sensibilização às seguintes LTP de alimentos (N; IgEcm média±desvio-padrão - kU/L): *Pru p 3*, *Ara h 9*, *Mal d 3*, *Act d 10*, *Vit v 1*, *Cor a 8* e *Sola l 6*, sendo a LTP do pêssego (*Pru p 3*) identificada em 100% dos doentes (15;  $15,7\pm 21,5$ ), seguida do amendoim (*Ara h 9*) em 66,7% (10;  $2,9\pm 4$ ), da maçã (*Mal d 3*) em 60% (9;  $1,5\pm 1,7$ ), do kiwi (*Act d 10*) em 40% (6;  $0,6\pm 1$ ), da uva (*Vit v 1*) em 40% (6;  $1,8\pm 2,5$ ), da avelã (*Cor a 8*) em 26,7% (4;  $0,1\pm 0,2$ ) e do tomate (*Sola l 6*) em 6,7% (1; 0,88).

Foram também identificadas as seguintes LTP de pólenes (N; IgEcm média±desvio-padrão - kU/L): *Art v 3* em 46,7% dos doentes (7;  $1,5\pm 1,1$ ) e *Par j 2* em 6,7% (1; 5,41).

**Quadro 2.** Testes *in vivo* na amostra populacional com identificação dos sintomas e frutos envolvidos na primeira reação

Doente	Alergénio Clínica Fruto	Amendoim		Avelã		Kiwi		Maçã		Pêssego		Tomate		Uva	
		TCP	TC PP	TCP	TC PP	TCP	TC PP	TCP	TC PP	TCP	TC PP	TCP	TC PP	TCP	TC PP
1	Anafilaxia Maçã	+		+		+		+	+	+		+			
2	Anafilaxia Maçã	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	
3	SAO Pêssego	-		-						+					
4	SAO Amendoim	+		+		+		+	+	+		+	+	+	
5	Anafilaxia Pêssego	-	-	-	-		-	+		+	+			-	
6	Anafilaxia Avelã	+		+		-		-		+		-		-	
7	Angioedema Amendoim	+		+				+		+		-		-	
8	Urticária Pêssego	-		-				-		+					
9	Anafilaxia Maçã				-			+	+	+	+				-
10	Anafilaxia Pêssego		-						+	+	+				
11	Angioedema Pêssego	+			+			-	+	+					
12	Anafilaxia Pêssego	-		-		-		+		+	+			-	
13	SAO Maçã	-		+		-		+	+	+	+	-			
14	Urticária + Angioedema Maçã	+		+		+		+	+	+	+	-	+	-	
15	Anafilaxia Noz	-	-	-		-		-	+	+	+				+

SAO – Síndrome de alergia oral; TCP – Testes cutâneos por picada com extrato comercial; TC PP – Testes cutâneos por picada com alimento em natureza. Código de cores: cinzento-escuro – positivo; cinzento-claro – negativo; branco – não realizado

Os resultados da quantificação da IgE específica para o extrato total, componentes moleculares das LTP e IgE total encontram-se representados no Quadro 3.

A análise dos testes *in vivo* e *in vitro* permitiu verificar que todos os doentes apresentaram teste cutâneo positivo para o pêssego, tendo sido a IgE específica para o ex-

trato total de pêssego e componente molecular (*Pru p 3*) a que apresentou valores mais elevados, seguindo-se o amendoim e a maçã.

Os doentes que tinham valores de IgE específica para *Pru p 3* mais elevada ( $>15\text{kU}_A/\text{L}$ ) correspondiam a doentes que apresentaram reações sistémicas (urticária/an-

**Quadro 3.** Testes *in vitro*: avaliação de IgE total e IgE específica de extrato total e componentes moleculares (LTP)

Doente	Amendoim		Avelã		Kiwi		Maçã		Pêssego		Tomate		Uva		IgE Total (kU/L)
	IgEet (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEcm (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEet	IgEcm (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEet (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEcm (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEet (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEcm (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEet (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEcm (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEet (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEcm (Ku <sub>A</sub> /L)	IgEet	IgEcm (Ku <sub>A</sub> /L)	
1	0,94	1,62					0,9	0,37	9,77	12,04					62
2	3,19	13,74			0,83	2,09	6,67	5,57	11,94	17,58				6,4	88
3	1,48	5,38				0,49	4,73	3,55	4,51	5,85				5,21	58
4	1,68	4,72		0,38	1,69	3,15	4,21	3,09	12,21	11,91				3,68	703
5		0,5		0,37			3,68	2,43	30,22	34,32				1,41	3115
6	2,48	8,26		0,36		1,39	3,1	3,2	6,08	8,41		0,88		5,68	245
7		1,75		0,3	0,3	1,01	0,62	0,7	1,49	2,54					28
8	0,39	1,46							2,63	3,08					121
9		0,5							2,75	3,73					41
10					0,35	1,2			8,81	9,96					641
11	1,54	6,72					3,61	1,95	25,05	27,71					999
12									6,53	8,4					28
13									5,1	4,96					103
14							3,16	1,83	12	18,58				4,9	77
15							0,31		4,93	6,1					149

IgE – Imunoglobulina E; IgEet – Extrato total; IgEcm – Componente molecular; LTP – Proteína de transferência lipídica. Código de cores: branco – <0,3kU<sub>A</sub>/L (negativo); cinzento-claro – 0,3-1kU<sub>A</sub>/L (nível IgE baixo); cinzento – 1-5kU<sub>A</sub>/L (nível IgE moderado); cinzento-escuro – 5-15kU<sub>A</sub>/L (nível IgE alto); preto – >15kU<sub>A</sub>/L (nível IgE muito alto); IgE total – cinzento-claro <100kU/L; cinzento-escuro – >100kU/L

gioedema n=2 e anafilaxia n=2) como primeira manifestação da síndrome LTP, bem como valores de IgE total mais elevados (>500kU/L).

O valor médio de IgE total foi de 430,5±799,9kU/L, com um valor mínimo de 28kU/L e máximo de 3115kU/L (Quadro 3).

Relativamente à concordância (k) com a clínica, para o pêssego todas as associações obtiveram concordância k=1. A seguir, a combinação dos testes cutâneos com extrato comercial e com o alimento em natureza foi superior para a maçã (k=0,44, p=0,03), a IgE para extrato total foi superior para o amendoim (k=0,87, p<0,01), e a IgE para componentes moleculares foi superior para a avelã (k=0,70, p<0,01) e para a uva (k=0,55, p=0,02).

## DISCUSSÃO

Os alergénios alimentares pertencentes ao grupo da superfamília das prolaminas, das quais as LTP fazem parte, são importantes alergénios em sementes de plantas. No entanto, estas moléculas representam uma exceção, uma vez que têm sido isoladas em frutas, folhas, raízes e pólenes e a sua abrangência ultrapassa a alergia a alimentos vegetais. Tal evidencia-se no presente estudo, onde além das LTP dos alimentos, foram também identificadas LTP de pólenes em 8 doentes (*Artemisia vulgaris* em 7 doentes e *Parietaria judaica* num doente), demonstrando a possibilidade de reatividade cruzada<sup>8,12</sup>.

Neste estudo verificámos que a manifestação de apresentação mais frequente foi a reação sistémica grave

(anafilaxia) em mais de metade da amostra (53,3%), sendo que as reações foram na sua totalidade imediatas, com mais frequência durante a ingestão do alimento causador, e estando o pêssego envolvido em todos os tipos de reação (ainda que nem sempre como primeira manifestação e com as diferentes gravidades), o que está de acordo com outros estudos publicados<sup>3-8,10,12</sup>.

Das LTP identificadas nesta amostra populacional, a sensibilização a *Pru p 3* foi a mais prevalente (100% dos doentes), o que está de acordo com os dados existentes na literatura, que referem ser o pêssego o principal alimento envolvido na síndrome LTP. No entanto, é de realçar que também outros alimentos que contêm LTP foram responsáveis por reações, locais e sistémicas, na nossa população, demonstrando a variabilidade dos alimentos envolvidos na síndrome LTP e a elevada possibilidade de reatividade cruzada nesta grande família de alimentos *Rosaceae*<sup>9,13,14</sup>.

A quase totalidade dos doentes (93,3%) apresentava antecedentes de atopia, sendo a patologia mais frequente a rinite alérgica, o que está de acordo com o referido na literatura<sup>5,6,9,13</sup>. A tal facto se acrescenta a cossensibilização a LTP de pólenes em 53,3% dos doentes, podendo ter sido esta a via de sensibilização primária nestes doentes.

Observou-se uma elevada correspondência entre os resultados dos testes cutâneos com os da IgE específica para extratos totais e componentes moleculares na sensibilização aos alimentos maçã, pêssego e amendoim. Estes resultados também se verificaram noutros estudos, o que pode dever-se, não só à escolha de componentes moleculares potencialmente relevantes, mas também à utilização do mesmo imunoabsorvente e de inibidores de determinantes de hidratos de carbono (CCD), reduzindo o reconhecimento de IgE não específicas<sup>15,16</sup>. A maioria dos testes com alérgenos de plantas ou insetos contém CCD, glicoeptopos capazes de partilhar homologias estruturais significativas com outras famílias de proteínas responsáveis por reatividade cruzada. Neste contexto, anticorpos IgE contra CCD reagem contra as proteínas que contenham estes epitopos, não apresentando, no

entanto, significado laboratorial nem clínico, mas levando à identificação de falsos positivos em até cerca de 25% dos doentes<sup>19-24</sup>. O ALEX<sup>®</sup> é atualmente o único teste no mercado que oferece o bloqueio automático dos anticorpos anti-CCD, facilitando a verdadeira interpretação e aumentando a especificidade deste teste<sup>16</sup>.

É importante uniformizar e estandardizar os métodos diagnósticos o mais possível, de forma a que possa ser oferecido aos doentes o mais personalizado e adequado tratamento. As orientações internacionais indicam a história clínica, o exame objetivo e os testes cutâneos como os primeiros passos na marcha diagnóstica de todas as patologias alérgicas (ensaio de primeiro nível)<sup>15,18,23</sup>. Com o aparecimento da medicina de precisão foi possível evoluir para a deteção das IgE dos extratos totais e dos componentes moleculares (ensaios de segundo e terceiro níveis, respetivamente), de forma a ser possível distinguir entre verdadeira sensibilização ou reatividade cruzada. O método ALEX<sup>®</sup> é capaz de fornecer resultados de extratos totais de alérgenos (ensaio de segundo nível), bem como dos seus componentes moleculares (ensaio de terceiro nível) relevantes e ainda valores de IgE total, tudo no mesmo ensaio, com a vantagem de possuir um inibidor de CCD, permitindo um resultado positivo apenas quando o reconhecimento do alérgeno é específico para a própria proteína, aumentando a especificidade do teste<sup>15,16,19-24</sup>.

A literatura disponível globalmente acerca deste inovador método de diagnóstico é ainda bastante escassa<sup>15,23,24</sup>, sendo este o primeiro estudo publicado a nível nacional, o que os autores consideram ser uma mais-valia para toda a comunidade científica.

## CONCLUSÕES

Neste estudo, a análise da concordância com a clínica dos diferentes métodos de diagnóstico, individualmente ou em associação, para diferentes alimentos, foi variável, quer utilizando o método diagnóstico *in vivo* e/ou *in vitro*, quer em diferentes associações.



Das LTP identificadas nesta amostra populacional, a Pru p 3 foi a mais prevalente (100% dos doentes), tendo havido ainda concordância para o pêssego em todas as variáveis, entre a clínica e os testes cutâneos para a maçã, entre a clínica e a IgE total para o amendoim e entre a clínica e os componentes moleculares para a avelã e a uva.

O método ALEX® MacroArray permite, através da utilização de uma pequena amostra de soro, a identificação de IgE total, IgE específica para extrato total e respetivos componentes moleculares simultaneamente, permitindo uma melhor interpretação e correlação clínica dos resultados. A utilização de um inibidor de CCD permite a eliminação de falsos negativos e positivos. Contudo, será necessário um estudo prospetivo mais alargado para aferir a sensibilidade e especificidade deste teste.

### Conflito de interesses

Os autores declaram que não existem conflitos de interesses.

### ORCID:

Maria Inês T. Silva  0000-0002-8041-1306

Marisa Paulino  0000-0002-2568-3333

Célia Costa  0000-0001-8313-1505

Fátima Cabral Duarte  0000-0002-0323-9936

Manuel Pereira Barbosa  0000-0002-4662-1369

Maria Conceição Pereira Santos  0000-0003-0689-7317

*Autor correspondente:*

Maria Inês T. Silva

Serviço de Imunoalergologia, Hospital Santa Maria

Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte

Avenida Professor Egas Moniz

1649-035, Lisboa

Email: inescerca92@gmail.com

### REFERÊNCIAS

1. Egger M, Hauser M, Mari A, Ferreira F, Gadermaier G. The role of lipid transfer proteins in allergic diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010;10:326-35. doi: 10.1007/s11882-010-0128-9.
2. Carvalho S, Lourenço T, Cosme J, Cabral Duarte F, Spínola Santos A, Costa AC, et al. LTP (Pru p 3) sensitisation in skin prick test: which means in clinical practice? *Clin Transl Allergy* 2016;6(Suppl 2):P5
3. Silva PM, Pestana L, Costa AC, Barbosa MP. Frequency of lipid transfer protein (Pru p 3) and profilin (Pru p 4) sensitization in 1052 patients referenced to an Imunoalergology Department in Lisbon. *Allergy* 2013;3(Suppl 3):59.
4. Rodrigues-Alves R, Lopes A, Pereira-Santos MC, Lopes-Silva S, Spínola-Santos A, Costa C, et al. Clinical, anamnestic and serological features of peach allergy in Portugal. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149:65-73. doi: 10.1159/000176308.
5. Costa AC, Duarte F, Pedro E, Campos A, Pereira-Barbosa M, Pereira Santos MC. Imunoterapia sublingual com pêssego (Pru p 3) – Eficácia e segurança. *Rev Port Imunoalergologia* 2015;23(4):211-22.
6. Costa AC, Melo A, Duarte F, Pereira-Barbosa M, Pereira Santos MC. Eficácia e tolerância de imunoterapia sublingual com Pru p 3 em doentes com alergia grave ao pêssego – evolução clínica e imunológica ao longo de 12 meses. *Rev Port Imunoalergologia* 2015;23(1):11-19.
7. Luz S, Lopes A, Spínola Santos A, Costa A, Pereira Barbosa M, Pereira Santos MC. Tree nut allergy: LTP sensitization as a possible increasing risk factor for systemic symptoms. *Allergy* 2010;65(Suppl 92): P401.
8. Gomez F, Bogas G, Gonzalez M, Campo P, Salas M, Diaz-Perales A, et al. The clinical and immunological effects of Pru p 3 sublingual immunotherapy on peach and peanut allergy in patients with systemic reactions. *Clin Exp Allergy* 2017;(47):339-50. doi: 10.1111/cea.12901.
9. Moura AL, Pereira C, Regateiro FS, Azevedo J, Todo Bom A, Carrapatoso I. Pru p 3 sublingual immunotherapy ultra-rush protocol is safe and clinically effective. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2019;51:206-12. doi: 10.23822/EurAnnACI.1764-1489.99.
10. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Ollert M. *Molecular allergology user's guide*, 1.ª ed. Zurich: European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2016.
11. Egger M, Mutschlechner S, Wopfner N, Gadermaier G, Briza P, Ferreira F. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy* 2006; 61:461-76. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.00994.x.
12. Lombardero M, Garcia-Selles FJ, Polo F, Jimeno L, Chamorro MJ, Garcia-Casado G, et al. Prevalence of sensitization to artemisia allergens Art v 1, Art v 3 and Art v 60 kDa: cross-reactivity among Art v 3 and other relevant lipid-transfer protein allergens. *Clin Exp Allergy* 2004;34:1415-21. doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.02053.x.
13. Fernández-Rivas M, Garrido Fernández S, Nadal JA, Alonso Díaz de Durana MD, García BE, González-Mancebo E, et al. Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy* 2009; 64:876-83. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01921.x.

14. Pascal M, Muñoz-Cano R, Reina Z, Palacín A, Vilella R, Picado C, *et al.* Lipid transfer protein syndrome: clinical pattern, cofactor effect and profile of molecular sensitization to plant-foods and pollens. *Clin Exp Allergy* 2012;42:1529-39. doi: 10.1111/j.1365-2222.2012.04071.x.
15. Heffler E, Puggioni F, Peveri S, Montagni M, Canonica W, Melioli G. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organization Journal* 2018;11(1):7. doi: 10.1186/s40413-018-0186-3.
16. MacroArray Diagnostics, Wien, Austria [citado 2020 Nov 2]. Disponível em: <https://www.macroarraydx.com/>;
17. Heinzerling L, Mari A, Bergmann KC, Bresciani M, Burbach G, Darsow U, *et al.* The skin prick test – European standards. *Clin Transl Allergy* 2013;3:3. doi: 10.1186/2045-7022-3-3.
18. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, Papadopoulos NG, Bousquet PJ, Burney PG, *et al.* Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 2012;67:18-24. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02728.x.
19. Malandain H. IgE-reactive carbohydrate epitopes - classification, cross-reactivity, and clinical impact. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2005;37(4):122-8.
20. Malandain H, Giroux F, Cano Y. The influence of carbohydrate structures present in common allergen sources on specific IgE results. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2007;39(7):216-20.
21. Ebo DG, Hagendorens MM, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. Sensitization to crossreactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profilin: mimickers of allergy. *Clin Exp Allergy* 2004;34:137-44. doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.01837.x.
22. Foetisch K, Westphal S, Lauer I, Retzek M, Altmann F, Kolarich D, *et al.* Biological activity of IgE specific for crossreactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:889-96. doi: 10.1067/mai.2003.173.
23. Bojcukova J, Vlas T, Forstenlechner P, Panzner P. Comparison of two multiplex arrays in the diagnostics of allergy. *Clin Transl Allergy*. 2019;9:31.
24. Buzzulini F, Da Re M, Scala E, Martelli P, Conte M, Brusca I, *et al.* Evaluation of a new multiplex assay for allergy diagnosis. *Clinica Chimica Acta*. 2019;493:73-8. doi: 10.1016/j.cca.2019.02.025.