

Microarray-immuno solid-phase allergen chip na avaliação do perfil de sensibilização às proteínas do leite de vaca

Immuno solid-phase allergen chip microarray for evaluation of cow's milk proteins' sensitisation profile

Data de receção / Received in: 09/04/2009

Data de aceitação / Accepted for publication in: 17/05/2009

Rev Port Imunoalergologia 2009; 17 (4): 325-342

Anna Sokolova¹, Ana Célia Costa¹, Manuel Pereira Barbosa¹, José Costa Trindade², Leonor Bento², Maria Conceição Pereira-Santos³

¹ Serviço de Imunoalergologia / *Immunoallergy Department*, Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE

² Departamento da Criança e da Família / *Family and Child Unit*, Centro Hospitalar Lisboa Norte, EPE

³ Unidade de Imunologia Clínica / *Clinical Immunology Unit*, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina de Lisboa

RESUMO

Introdução: As moléculas alergénicas purificadas têm sido largamente utilizadas na área da alergia respiratória, mas existe pouca experiência na sua utilização no diagnóstico de alergia alimentar. **Objectivo:** Avaliar a utilidade do método *immuno solid-phase allergen chip* (ISAC[®]) no diagnóstico de doentes com alergia às proteínas de leite de vaca (APLV), caracterizando o perfil de reconhecimento, por anticorpos IgE, de proteínas alergénicas, em diferentes fases de evolução da doença. **População:** Doentes com APLV mediada por IgE (n=37) divididos em dois grupos: Reactivos (Grupo I), subdivididos em Grupos Ia (idade superior a 6 anos, n=11) e Ib (idade inferior a 6 anos, n=6); e Tolerantes (Grupo II): 20 doentes com aquisição de tolerância às PLV, confirmada por PPO aberta numa dose cumulativa administrada de 200 ml. **Métodos:** Determinação de IgE específica para LV e suas fracções proteicas por ISAC[®] (α -lactoalbumina, albumina sérica bovina, cadeia pesada de IgG, caseína e suas fracções (α -S1, β e K), lactoferrina e β -lactoglobulina) e UniCAP[®] (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e caseína). **Resultados:** Todos os doentes do Grupo I apresentaram resultados positivos para a maioria dos alergénios testados por *microarray*. No Grupo Ia, as proteínas que desencadearam maior resposta IgE foram, por ordem crescente, caseínas (β < α -S1<K), β -LG e α -LA. No Grupo Ib

foram reconhecidas, em percentagem igual, a α -LA, a caseína e as suas fracções. No Grupo II, apenas o soro de dois doentes reconheceu PLV pelo método *microarray* ISAC[®]; no entanto, quinze doentes (75%) deste grupo mantinham IgE específica positiva para leite e/ou fracções proteicas determinada por UniCAP[®]. Não foi identificado perfil de sensibilização único nos doentes com APLV persistente. **Conclusão:** O método ISAC[®] permitiu distinguir doentes com APLV sintomática dos que adquiriram tolerância clínica. A caracterização do perfil de sensibilização dos doentes antes e depois da aquisição da tolerância às PLV poderá contribuir para a identificação de possíveis indicadores de prognóstico desta alergia alimentar.

Palavras chave: Alergia alimentar, diagnóstico, *microarray*, proteínas do leite de vaca, prognóstico, tolerância.

ABSTRACT

Introduction: Purified allergenic molecules have been extensively used in the area of respiratory allergy, but there is little experience of their use in diagnosing food allergies. **Aim:** To evaluate the usefulness of the Immuno Solid-phase Allergen Chip (ISAC[®]) method in diagnosing patients with cow's milk protein allergy (CMPA), characterising IgE recognition profile of allergenic proteins at different stages of the disease. **Population:** Patients with IgE-mediated CMPA (n = 37), split into 2 groups: Reactive (Group I): subdivided into Groups Ia (aged over 6 years old, n = 11) and Ib (aged below 6 years old, n = 6); and Tolerant (Group II): 20 patients with acquired tolerance to CMP, confirmed by negative open oral challenge test (OCT) with an administered cumulative dose of 200 ml. **Methods:** Specific IgE to CM and its protein fractions was determined by ISAC[®] (α -lactalbumin, bovine serum albumin, IgG heavy chain, casein and its fractions (α -SI, β and K), lactoferrin and β -lactoglobulin) and UniCAP[®] (α -lactalbumin, β -lactoglobulin and casein). **Results:** All patients in group I presented positive results to the majority of allergens tested by microarray. The proteins which triggered the biggest IgE response in group Ia were, in increasing order, caseins (β < α -SI < K), β -lactoglobulin and α -lactoalbumin. In group Ib, α -lactoalbumin, casein and its fractions were recognised, in equal percentage. In group II, only the serum of two patients recognised CMP using the ISAC[®] microarray method while fifteen patients (75%) of this group maintained specific IgE positive to milk and/or its protein fractions determined by UniCAP[®]. A single sensitisation profile in patients with persistent CMPA was not identified. **Conclusion:** The ISAC[®] method allowed patients with symptomatic CMPA to be distinguished from those with acquired clinical tolerance. Characterising patients' sensitisation profiles could contribute to identifying possible indicators of the prognosis of this food allergy.

Key-words: Cow's milk proteins, diagnosis, food allergy, microarray, tolerance.

INTRODUÇÃO

De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a alergia alimentar ocupa o 6.º lugar entre os principais problemas de saúde do mundo ocidental¹. Os estudos de prevalência são escassos e os dados existentes reflectem, provavelmente, os hábitos alimentares da população. No Reino Unido e nos EUA, a alergia alimentar mediada por IgE afecta 6 a 8% da população pediátrica². Nos lactentes e crianças, a alergia às proteínas de leite de vaca (APLV) constitui a alergia mais frequente, atingindo 2 a 7,5% na população em geral^{3,4}.

A maioria dos doentes tem APLV mediada por IgE, com um quadro clínico heterogéneo, podendo incluir sintomas cutâneos, gastrointestinais, respiratórios e, em alguns casos, reacções anafiláticas graves^{1,3,4}. Para alguns autores, aproximadamente 75 a 80% destes doentes adquirem tolerância aos 3 anos de idade, existindo, no entanto, poucos indicadores clínicos ou laboratoriais preditivos de aquisição de tolerância^{1,3,5}.

Cerca de 5 a 15% das crianças apresentam sintomas associados à ingestão de PLV mas sem envolvimento IgE⁴. Habitualmente estas crianças adquirem tolerância mais precocemente³.

O conteúdo proteico do leite de vaca e a sua relação com as reacções alérgicas tem motivado a realização de vários estudos. O leite de vaca contém cerca de 30 a 35 g de proteína por litro. A acção da quimosina ou a acidificação do pH para 4,6 desencadeia a separação do leite em duas fracções: soro (20%) e coalho (80%). O soro contém essencialmente proteínas globulares: as sintetizadas na glândula mamária, nomeadamente α -lactoalbumina (α -LA) e β -lactoglobulina (β -LG), e proteínas do soro, nomeadamente albumina sérica bovina (ASB), lactoferrina (LF), cadeias pesadas de IgG (CPIgG), lactoperoxidase e vestígios de várias outras proteínas. A principal proteína do coalho é a caseína, que constitui 78% do conteúdo proteico total do leite de vaca, sendo formada por 4 fracções proteicas: caseína α -S1, caseína α -S2, caseína β e caseína K na proporção aproximada de 40:10:35:12. As proteínas α -LA e β -LG representam apenas 3,5 e 7,5%, respectivamente^{6,7}.

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) places food allergy as the 6th leading health problem in the western world¹. Studies into its prevalence are scarce and the data probably reflect the population's eating habits. In the UK and USA, IgE-mediated food allergy affects 6-8% of the paediatric population². Allergy to cow's milk protein (CMPA) is the most frequently found allergy in infants and children, reaching 2-7.5% in the general population^{3,4}.

The majority of patients with IgE-mediated CMPA have a heterogeneous clinical picture which can include cutaneous, gastrointestinal and respiratory symptoms and, in some cases, severe anaphylactic reactions^{1,3,4}. While some authors claim that approximately 75-80% of these patients acquire tolerance by the age of 3, there are only a few clinical or laboratory indicators which predict acquisition of tolerance^{1,3,5}.

Approximately 5-15% of children present symptoms associated to CMP intake but without any IgE antibody involvement⁴. These children usually acquire tolerance earlier³.

The protein content of cow's milk and its relationship to allergic reactions has prompted several studies. Cow's milk contains around 30-35 g of protein per litre. Chymosin action or pH acidification to 4.6 triggers separation of milk into two fractions: whey (20%) and curds (80%). The whey essentially contains the globular proteins, those synthesised in the mammary gland, namely α -lactalbumin (α -LA) and β -lactoglobulin (β -LG), as well as serum proteins, namely bovine serum albumin (BSA), lactoferrin (LF), IgG heavy chains (CPIgG), lactoperoxidase and traces of several other proteins. Casein is the main protein found in curds, making up 78% of the total protein content of cow's milk. It is formed by 4 protein fractions: α_{S1} , α_{S2} , β and K caseins, in the approximate proportion of 40:10:35:12. α -LA and β -LG proteins represent only 3.5 and 7.5% of total CMP, respectively^{6,7}.

Embora a maioria dos estudos aponte para uma elevada importância das determinantes alergénicas das caseínas no prognóstico da APLV^{8,9}, outros referem que a β -LG e a α -LA são igualmente proteínas alergénicas importantes, sendo reconhecidas por anticorpos IgE na maioria dos doentes com APLV em idade pediátrica⁷. Ao contrário de observações prévias, um estudo, utilizando o método de SDS-PAGE *immunoblotting* e electroforese bidimensional, demonstrou a inexistência de resposta IgE para α -LA em doentes com APLV mediada por IgE⁹. Outros estudos realizados com o objetivo de caracterização do perfil de sensibilização dos doentes com APLV não incluíram a α -LA nos alergénios testados¹⁰ ou confirmaram a ausência de resposta a este alergénio¹.

As proteínas presentes em pequenas concentrações no leite de vaca, nomeadamente ASB, LF e CPIgG, são reconhecidas por anticorpos IgE em 35 a 50% dos doentes, sendo possível a existência de sensibilização isolada a uma destas fracções proteicas^{1,7,9}.

Actualmente, os métodos de diagnóstico *in vitro* utilizados na prática clínica (UniCAP[®]) permitem a determinação de IgE específica para leite total, α -LA, β -LG e caseína, não abrangendo as fracções da caseína e os outros alergénios referidos.

Em 2000, surgiram os primeiros estudos utilizando uma nova metodologia (*microarray* proteico), que permite a identificação simultânea de anticorpos IgE específicos para múltiplos alergénios purificados, recombinantes ou naturais¹¹. A utilização de moléculas alergénicas purificadas no diagnóstico em alergologia permite a identificação da molécula envolvida e não só a simples determinação da fonte alergénica. Este nível de abordagem do doente alérgico, *component-resolved diagnosis*, tem sido largamente utilizado na área de alergia respiratória, mas existe pouca experiência da sua utilização na área de alergia alimentar, nomeadamente na APLV¹².

O uso desta nova metodologia neste diagnóstico poderá permitir a identificação de perfis individuais de reconhecimento das várias proteínas¹. Estes perfis parecem ter grande variabilidade interpessoal, podendo condicionar a gravidade do quadro clínico e a idade de aquisição de tolerância.

Although the majority of studies show the great importance of casein allergenic determinants in CMPA prognosis^{8,9}, others state that β -LG and α -LA are also important allergenic proteins, recognised by IgE antibodies in the majority of paediatric age CMPA patients⁷. Unlike earlier observations, one study that used the SDS-PAGE immunoblotting method and bi-dimensional electrophoresis demonstrated the absence of IgE response to α -LA in patients with IgE-mediated CMPA⁹. Other studies undertaken aiming to characterise the sensitisation profile in CMPA patients did not include α -LA in the allergens tested¹⁰ or confirmed the lack of response to this allergen¹.

The proteins found in small concentrations in cow's milk, namely BSA, LF and CPIgG, are recognised by IgE antibodies in 35-50% of patients, with isolated sensitisation to one of these protein fractions possible^{1,7,9}.

Current methods of *in vitro* diagnosis used in clinical practice (UniCAP[®]) allow the determination of specific IgE to whole milk, α -LA, β -LG and casein, but not casein fractions and the other allergens referred to above.

In 2000, the first studies using a new methodology (protein microarray) that allows the simultaneous identification of specific IgE antibodies to multiple purified, recombinant or natural allergens appeared¹¹. The use of purified allergenic molecules in diagnosis in allergology allows identification of the molecule involved and not just the simple determination of the allergenic source. This level of approach to the allergic patient, component-resolved diagnosis, has been mainly used in respiratory allergy, but there is little experience of its use in food allergy, namely in CMPA¹².

The use of this new method in this diagnosis may permit the identification of the individual recognition profiles of the various proteins¹. These profiles seem to vary greatly among themselves and could influence the severity of the clinical picture and the age at which tolerance is acquired.

OBJECTIVOS

Este trabalho teve como objectivo avaliar a utilidade do método *in vitro* (ISAC®) – *immuno solid-phase allergen chip* no diagnóstico de doentes com APLV, caracterizando o perfil de reconhecimento, por anticorpos IgE, de fracções alergénicas do leite de vaca, em diferentes fases de evolução da doença, comparando-o com o método UniCAP®.

MATERIAL E MÉTODOS

População

Neste estudo foram incluídos 37 doentes seguidos na consulta de Alergia Alimentar que, no momento de diagnóstico, apresentavam quadro clínico compatível com APLV mediada por IgE, documentada por testes cutâneos em picada, e IgE específicas positivas (superiores a 0,35 KU/l) para leite total e/ou respectivas fracções proteicas (α -LA, β -LG e caseína). Os testes cutâneos em picada (TCP) foram realizados com extractos comerciais standardizados (Bial-Aristegui®, Espanha) de leite de vaca e fracções proteicas (α -LA, β -LG e caseína). Como controlo positivo foi utilizado cloridrato de histamina (10 mg/ml) e como controlo negativo uma solução glicero-salina. As picadas foram realizadas na face anterior do antebraço, de acordo com metodologia recomendada¹⁴. Utilizaram-se lancetas de tipo Morrow-Brown (Stallerpoint®, Stallergenes, França) e procedeu-se à leitura dos resultados aos 15 minutos, considerando-se positivos os testes com pápulas de diâmetro médio igual ou superior a 3 mm em relação ao controlo negativo.

Todos os doentes tiveram indicação de dieta de evicção. Os dados clínicos foram colhidos a partir dos processos da consulta. À data de estudo, todos os doentes foram reavaliados, sendo feita actualização dos dados clínicos, exame objectivo e colheita de sangue para determinação das IgE específicas. Os doentes que referiram anafilaxia após ingestão acidental de leite ou derivados foram considerados persistentes. Nos restantes doentes, o diagnós-

AIMS

This study aimed to evaluate the use of the *in vitro* Immuno Solid-phase Allergen Chip (ISAC®) method in diagnosing patients with CMPA, characterising the recognition profile by IgE antibodies of allergenic fractions of cow's milk at different stages of the disease, and comparing it with the UniCAP® method.

MATERIAL AND METHODS

Population

The study population included 37 patients followed in our Food Allergy Outpatient Clinic who, at the time of diagnosis, had a clinical picture compatible with IgE-mediated CMPA, documented by skin prick tests and positive specific IgE (greater than 0.35 KU/l) to whole milk and/or its protein fractions (α -LA, β -LG and casein). The skin prick tests (SPT) were performed with standardised commercial extracts (Bial-Aristegui®, Spain) of cow's milk and protein fractions (α -LA, β -LG and casein). Histamine hydrochloride (10 mg/ml) was used as a positive control and glycerol-saline solution as a negative. The skin prick tests were performed on the inner forearm, according to the recommended methodology¹⁴. We used Morrow-Brown (Stallerpoint®, Stallergenes, France) lancets and read the results in 15 minutes. We considered wheals' diameter 3 mm or more in relation to the negative control as positive tests.

All patients followed an elimination diet. The clinical data were collected from the patient' charts. All patients were re-evaluated at the time of study and their clinical data updated, a physical exam performed and blood taken to measure specific IgE. Patients complaining of anaphylaxis after accidental ingestion of milk or its derivatives were considered persistent. A diagnosis of persistent CMPA was confirmed in the remaining patients via a po-

tico de APLV persistente foi confirmado através de prova de provocação oral (PPO) positiva, realizada de acordo com as recomendações existentes^{15, 16}.

Os doentes foram divididos em dois grupos:

- Grupo I (reactivos): 17 doentes com APLV persistente, adicionalmente subdivididos de acordo com a idade em Grupo Ia (idade igual ou superior a 6 anos, n=11) e Grupo Ib (idade inferior a 6 anos, n=6);
- Grupo II (tolerantes): 20 doentes com aquisição de tolerância às PLV, confirmada por PPO aberta com leite de vaca numa dose cumulativa administrada de 200 ml.

O grupo-controlo foi constituído por 4 indivíduos atópicos, sem história de APLV e com ingestão diária de leite de vaca.

Determinação de IgE específica sérica

A determinação de IgE específica sérica para leite de vaca e diferentes fracções proteicas do leite foi realizada por dois métodos laboratoriais:

- Ensaio imunoenzimático, para leite total, α -LA, β -LG e caseína – UniCAP[®] (Phadia, Uppsala, Suécia), de acordo com a metodologia do fabricante;
- *Microarray* ISAC[®] (VBc-GENOMICS) com utilização de alérgenos moleculares purificados, naturais, para α -LA (Bos d 4), albumina sérica bovina (Bos d 6), cadeia pesada de IgG (Bos d 7), caseína (Bos d 8) e suas fracções (Bos d 8 α -S1, Bos d β , Bos d 8 K), lactoferrina (Bos d Lactoferrin) e β -LG (Bos d 5.0101) de acordo com a metodologia do fabricante^{17, 18}.

Prova de provocação oral.

A PPO foi realizada de acordo com a metodologia publicada¹⁶. A dose inicial administrada foi 0,1 ml, com posterior duplicação da dose e administração a intervalos de 30 minutos. Foi considerada positiva quando se objec-

sive oral challenge test (OCT), performed following current recommendations^{15, 16}.

The patients were split into two groups:

- Group I (reactive): 17 patients with persistent CMPA were further divided into subgroups depending on age: Group Ia was aged 6 years old or over (n = 11) and Group Ib was aged under 6 years (n = 6);
- Group II (tolerant): 20 patients with acquired tolerance to CMP, confirmed by a negative open OCT to cow's milk with an administered cumulative dose of 200 ml.

The control group consisted of 4 atopic individuals with no history of CMPA and who ingested cow's milk daily.

Determination of specific serum IgE

Determining specific serum IgE to cow's milk and its different protein fractions was performed using two laboratory methods:

- immunoenzymatic technique to whole milk, α -LA, β -LG and casein, UniCAP[®] (Phadia, Uppsala, Sweden), in accordance with the manufacturer's instructions;
- ISAC[®] (VBc-GENOMICS) microarray using natural purified allergen molecules to α -LA (Bos d 4), bovine serum albumin (Bos d 6), IgG heavy chain (Bos d 7), casein (Bos d 8) and its fractions (Bos d 8 α -S1, Bos d β , Bos d 8 K), lactoferrin (Bos d Lactoferrin) and β -LG (Bos d 5.0101) in accordance with the manufacturer's methodology^{17, 18}.

Oral challenge test

The OCT was performed in accordance with the published methodology¹⁶. The initial dose administered was 0.1 ml with posterior duplication of the doses and admi-

tivaram sintomas cutâneos (urticária/angioedema), respiratórios ou gastrointestinais (vómitos, diarreia).

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi efectuada no programa GraphPad Prism® versão 4.0, com utilização de teste de Mann Whitney. Os valores absolutos de IgE específica foram analisados só para os obtidos pelo método UniCAP®, uma vez que o *microarray* é um método semiquantitativo.

Resultados

As características demográficas e clínicas dos grupos estudados estão representadas no Quadro I. Nenhum dos doentes apresentou os sintomas de APLV após a primeira ingestão de leite de vaca. A maioria dos doentes teve os primeiros sintomas da doença entre os 3 e 6 meses de vida (devido ao carácter retrospectivo do estudo, não foi possível estabelecer a data precisa para todos os doentes).

nistration at 30-minute intervals. It was considered positive if cutaneous (urticaria/angioedema), respiratory or gastrointestinal (vomiting, diarrhoea) symptoms occurred.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using the GraphPad Prism® program version 4.0 with use of the Mann-Whitney test. Absolute specific IgE values were analysed only for data obtained via the UniCAP® method, since microarray is a semiquantitative method.

Results

Table I shows the demographic and clinical characteristics of the study groups. No patient presented CMPA symptoms on first ingestion of cow's milk. The majority of patients experienced their first symptoms between the ages of 3 and 6 months, with the study's retrospective nature making it impossible to establish a precise date for every patient.

Quadro I. Características demográficas e clínicas dos grupos estudados

	Reactivos (N=17)	Tolerantes (N=20)
Média de idade (mínimo – máximo)*	9,25 anos (2 – 19)	6,15 anos (2 – 22)
Distribuição por sexos	10 M (58,5%)	7 M (65%)
Início de sintomas		
Até 1 mês	6	2
1 – 6 meses	11	14
> 6 meses	0	4
Sintomas de APLV		
Urticária/angioedema	6 (35%)	6 (30%)
Urticária/eczema	2 (12%)	6 (30%)
Urticária/angioedema/eczema	0	2 (10%)
Urticária/angioedema/ queixas gastrointestinais (anafilaxia Grau II**)	0	3 (15%)
Urticária/angioedema/dispneia (anafilaxia Grau III**)	9 (53%)	3 (15%)

Legenda: M – sexo masculino; * idade na altura do estudo; ** classificação de anafilaxia de acordo com Mueller³¹

Table I. Demographic and clinical characteristics of the study groups

	Reactive (n = 17)	Tolerant (N = 20)
Mean age (minimum – maximum)*	9.25 years (2 – 19)	6.15 years (2 – 22)
Gender distribution	10 M (58.5%)	7 M (65%)
Onset of symptoms		
Up to 1 month	6	2
1 – 6 months	11	14
> 6 months	0	4
CMPA symptoms:		
Urticaria/angioedema	6 (35%)	6 (30%)
Urticaria/eczema	2 (12%)	6 (30%)
Urticaria/angioedema/eczema	0	2 (10%)
Urticaria/angioedema/ gastrointestinal complaints (Grade II** anaphylaxis)	0	3 (15%)
Urticaria/angioedema/dyspnoea (Grade III** anaphylaxis)	9 (53%)	3 (15%)

Legend: M – male; * age at study start; ** Mueller anaphylaxis classification³¹

No Grupo I (Reactivos), 5 doentes referiram ingestão acidental de leite de vaca ou derivados com início súbito urticária e /ou angioedema e dispneia em menos de 30 minutos após a ingestão. Os restantes realizaram a PPO, cujo resultado foi positivo: em 10 doentes (83%) com quadro de urticária e nos restantes 2 (17%) urticária e angioedema. Na maioria dos doentes, a dose cumulativa que desencadeou a resposta clínica foi entre 1,5 e 3,0 ml.

Todos os doentes do Grupo II (Tolerantes) foram submetidos a PPO, cujo resultado foi negativo. Em 50% dos doentes do Grupo II a aquisição de tolerância ocorreu entre os 3 e os 5 anos de idade. Em 2 doentes (10%) a tolerância foi adquirida até aos 2 anos de idade, em 2 (10%) entre os 2 e os 3 anos, em 4 (20%) entre os 5 e os 6 anos e em 2 doentes (10%) só após os 6 anos.

Os valores de IgE específica determinada pelo método UniCap[®] para leite de vaca, α -LA, β -LG e caseína,

Five group I (reactive) patients complained of accidental ingestion of cow's milk or its derivatives, with onset of urticaria and/or angioedema and dyspnea within less than 30 minutes of intake. The remaining patients underwent OCT, with positive results. Ten patients (83%) had urticaria and the remaining two (17%) had urticaria and angioedema. The cumulative dose which triggered a clinical response in the majority of patients was between 1.5 and 3.0 ml.

All group II (tolerant) patients underwent OCT which were negative. In 50% of these patients tolerance was acquired between the ages of 3 and 5 years. Two patients (10%) acquired tolerance before the age of 2 years, two (10%) between the ages of 2 and 3 years, four (20%) between 5 and 6 years of age and two (10%) only after the age of 6 years.

Table II displays the specific IgE values to cow's milk, α -LA, β -LG and casein using the UniCap[®] method. Fifteen group II patients (75%) maintained positive specific IgE (over 0.35 KU/l) to milk and/or its protein fractions (Figure 1). There was no statistically significant difference ($p > 0.05$)

Quadro 2. Distribuição do valor de IgE específica sérica, KU/l (UniCAP®, Phadia)

	Leite total			α-LA			β-LG			Caseína		
	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max.
Ia	90,7	3,61	100	7,7	1,44	66,6	6	0,9	67,4	88,9	3	100
Ib	22,2	4,1	100	5	0,25	100	10,9	2,79	15,9	28,9	1,49	100
II	1,3	0,01	10	0,5	0,01	2,88	0,4	0,01	4,3	0,5	0,01	2,44

Legenda: Med – mediana; Min – mínimo; Max – máximo; α-LA – alfa-lactoalbumina; β-LG – beta-lactoglobulina

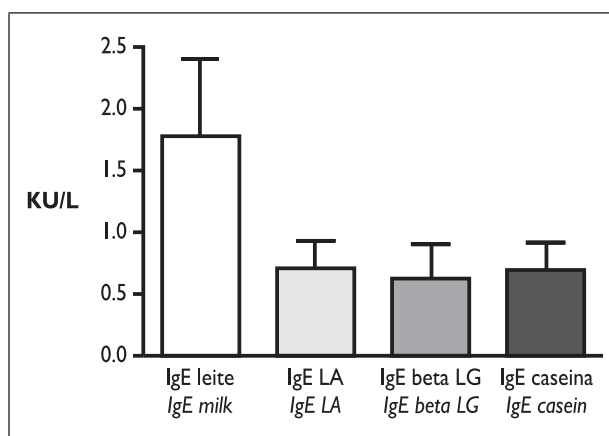
Table II. Distribution of the specific serum IgE values, KU/l (UniCAP®, Phadia)

	Whole milk			α-LA			β-LG			Casein		
	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max	Med	Min	Max
Ia	90.7	3.61	100	7.7	1.44	66.6	6	0.9	67.4	88.9	3	100
Ib	22.2	4.1	100	5	0.25	100	10.9	2.79	15.9	28.9	1.49	100
II	1.3	0.01	10	0.5	0.01	2.88	0.4	0.01	4.3	0.5	0.01	2.44

Legend: Med – median; Min – minimum; Max – maximum; α-LA – alpha-lactalbumin; β-LG – beta-lactoglobulin

estão representados no Quadro 2. No Grupo II, 15 doentes (75%) mantinham IgE específica positiva (superior a 0,35 KU/l) para leite e/ou fracções proteicas (Figura 1). Em relação aos valores de IgE específica para estes alérgenos, não se encontrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os Grupos Ia e Ib, sendo, no entanto significativa ($p < 0,0005$) quando se compararam os grupos I (Reactivos) e II (Tolerantes).

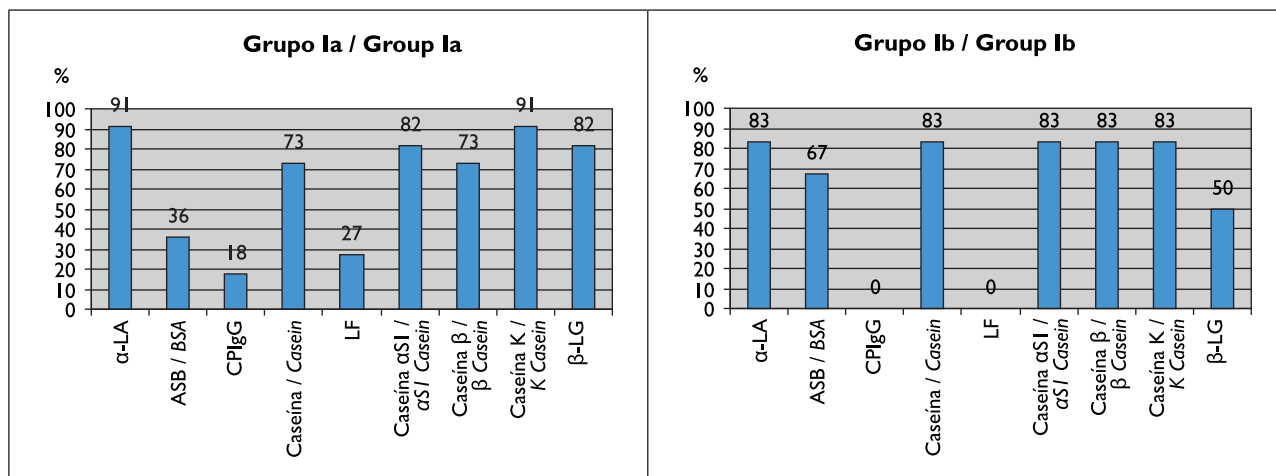
A identificação de IgE específica para α-LA, ASB, CPIgG, caseína e suas fracções proteicas (α-SI, β, K), lactoferrina e β-LG por *microarray* ISAC® (VBc-GENOMICS) nos Grupos Ia e Ib, está representada nas Figuras 2 e 3. Nenhum doente do Grupo I apresentou resultados negativos por metodologia *microarray*. O soro de cada doente reconheceu, pelo menos, duas proteínas do leite de vaca, variando entre duas (22%) até um máximo de sete proteínas (77%). As proteínas



Legenda / Legend: LA – lactoalbumina / lactalbumin; LG – lactoglobulina / lactoglobulin

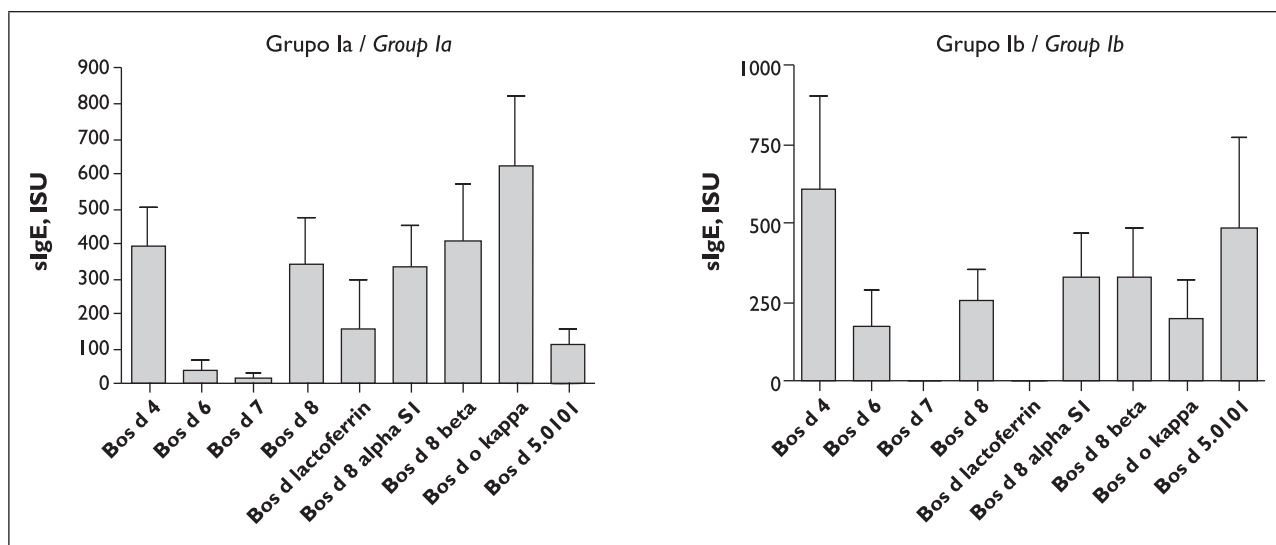
Figura 1. IgE específica (valor médio e desvio-padrão), KU/l (UniCAP®) nos doentes do Grupo II (n=20)

Figure 1. Specific IgE (mean value and standard deviation), KU/l (UniCAP®) in group II patients (n = 20)



Legenda / Legend: α -LA – α -lactoalbumina / α -lactalbumin; ASB / BSA – albumina sérica bovina / bovine serum albumin; CPIgG – cadeia pesada de IgG / IgG heavy chain; LF – lactoferrina / LF- lactoferrin; β -LG – β -lactoglobulina / β -lactoglobulin

Figura 2. Reconhecimento (%) das principais fracções das PLV por microarray ISAC® (VBc-GENOMICS) nos Grupos Ia (n=11) e Ib (n=6)
Figure 2. Recognition (%) of the main CMP fractions by ISAC® (VBc-GENOMICS) microarray in groups Ia (n = 11) and Ib (n = 6)



Legenda / Legend: sIgE – IgE específica / specific IgE; Bos d 4 – α -lactoalbumina / α -lactalbumin; Bos d 6 – albumina sérica bovina / bovine serum albumin; Bos d 7 – cadeia pesada de IgG / IgG heavy chain; Bos d 8 – caseína / casein; Bos d 8 alpha-S1, Bos d 8 beta, Bos d 8 kappa – fracções α -S1, beta e K de caseína / casein α -S1, beta and K fractions; Bos d lactoferrina – lactoferrina / lactoferrin; Bos d 5.0101 – beta-lactoglobulina / beta-lactoglobulin

Figura 3. IgE específica (valor médio e desvio-padrão) para as principais fracções das proteínas de leite de vaca por microarray ISAC® nos grupos Ia e Ib
Figure 3. Specific IgE (mean value and standard deviation) to the main cow's milk protein fractions by ISAC® microarray in groups Ia and Ib

mais reconhecidas foram: α -LA (10 doentes do grupo Ia (91%) e 5 doentes do Grupo Ib (83%)) e caseína K (10 doentes do Grupo Ia (91%) e 5 do Grupo Ib (83%)). No Grupo Ia, a lactoferrina foi reconhecida pelo soro de 3 doentes (27%) e a CPIgG pelo soro de 2 doentes (18%), não sendo reconhecidas por nenhum doente do Grupo Ib.

No Grupo II, apenas o soro de dois doentes reconheceu proteínas do leite de vaca por *microarray* ISAC®: em um doente observou-se o reconhecimento da α -LA, com IgE específica para esta fracção proteica medida por UniCAP® de 0,66 KU/l; o soro do outro doente reconheceu a lactoferrina, para a qual a determinação de IgE específica por UniCAP® não está disponível.

No grupo-controlo, os doseamentos de IgE específica para leite total e fracções proteicas foram sempre negativos, em ambos os métodos.

Avaliámos a sensibilidade e a especificidade destes dois métodos considerando o resultado positivo para pelo menos um alérgénio nos doentes do Grupo I, Grupo II e Grupo de controlo (Quadro 3). A sensibilidade foi de 100 % para os dois métodos (17/17) e a especificidade de 90,2% (22/24) por *microarray* e de 37,5% (9/24) por UniCAP®, para o nível de *cut-off* de 0,35 KU/L recomendado pelo fabricante.

in specific IgE values for these allergens between groups Ia and Ib, but significance was attained ($p < 0.0005$) when groups I (reactive) and II (tolerant) were compared.

Figures 2 and 3 show the identification of specific IgE for α -LA, ASB, CPIgG, casein and its protein fractions (α -S1, β , K), lactoferrin and β -LG by ISAC® (VBC-GENOMICS) microarray in groups Ia and Ib. All group I patients presented positive results using the microarray methodology. Each patient's serum recognised at least 2 cow's milk proteins, ranging from 2 (22%) to a maximum of 7 proteins (77%). The most frequently recognised proteins were α -LA (10 group Ia (91%) and five group Ib patients (83%)) and casein K (10 group Ia (91%) and five group Ib patients (83%)). Lactoferrin was recognised by three group Ia patients' serum (27%) and CPIgG by two group Ia patients' serum (18%). It was not recognised by any group Ib patients.

Only two group II patients' serum recognised cow's milk proteins using ISAC® microarray: one patient had recognition of α -LA with specific IgE for this protein fraction measured by UniCAP® at 0.66 KU/l and the other patient's serum recognised lactoferrin, for which UniCAP® determination of specific IgE is not available.

Measurements of specific IgE for whole milk and its protein fractions were always negative in the control group using both methods.

Quadro 3. Comparação dos sintomas clínicos com os resultados obtidos pelos métodos UniCAP® e *microarray* considerando como positivo o reconhecimento de pelo menos um alérgénio

		Resultado			
		Positivo		Negativo	
		<i>microarray</i>	UniCAP®	<i>microarray</i>	UniCAP®
Situação clínica	APLV sintomática (Grupo I) n=17	17	17	0	0
	Sem manifestações de APLV (Grupo II) n=20	2	15	18	5
	Grupo-controlo n=4	0	0	4	4

Table III. Comparison of the clinical symptoms with the results obtained by the UniCAP® and microarray methods considering recognition of at least 1 allergen as positive

		Result			
		Positive		Negative	
		microarray	UniCAP®	microarray	UniCAP®
Clinical situation	Symptomatic CMPA (Group I) n = 17	17	17	0	0
	No sign of CMPA (Group II) n = 20	2	15	18	5
	Control group n = 4	0	0	4	4

DISCUSSÃO

O diagnóstico da etiologia da doença alérgica com utilização de extractos alergénicos permite a identificação da fonte alergénica, mas não da molécula implicada¹⁹. Os avanços tecnológicos na área da biologia molecular permitiram a clonagem, sequenciação e produção de alérgenos da maioria das fontes alergénicas que mantêm as propriedades imunológicas das proteínas naturais²⁰. A sua utilização no diagnóstico em alergia permite a caracterização do perfil individual da resposta IgE às fracções proteicas da fonte alergénica. Estes dados são fundamentais para a compreensão dos mecanismos de alergia, de reatividade cruzada e para elaboração de uma eventual imunoterapia específica individualizada^{12,21,22}. Na prática clínica, esta caracterização poderá ser importante para determinação do prognóstico da doença, monitorização da evolução e da resposta à terapêutica.

O método laboratorial, *microarray* ISAC®, utilizado neste estudo, permite a identificação de IgE específica para nove fracções proteicas de leite de vaca, utilizando 20 µl de soro, enquanto o método utilizado actualmente na prática clínica, UniCAP®, se limita à identificação de IgE específica para três proteínas. Relativamente ao método *microarray* ISAC®, acresce ainda que a utilização de pequenas

We evaluated sensitivity and specificity of both methods in the three patient groups (I, II and control), considering positive the positive results to at least one allergen (Table III). Sensitivity was 100% for both methods (17/17) and specificity of 90.2% (22/24) by microarray and 37.5% (9/24) by UniCAP®, using the 0.35 KU/L cut-off level recommended by the manufacturer.

DISCUSSION

Diagnosing disease aetiology via the use of allergen extracts allows the identification of the allergenic source, but not of the molecule in question¹⁹. Advanced molecular biology techniques allow allergen cloning, sequencing and production of the majority of allergenic sources which maintain the immunological properties of the natural proteins²⁰. Their use in the diagnosis of allergy allows the characterisation of the individual profile of IgE response to the allergenic source's protein fractions. These data are fundamental for comprehension of the mechanisms of allergy and cross reactivity and for planning any individualised specific immunotherapy^{12,21,22}. This characterisation could be important in clinical practice to determine prognosis and monitor disease progression and response to treatment.

amostras de sangue capilar pode ser uma mais-valia na população pediátrica^{13,23,24}.

Ainda é pequena a experiência da utilização do *microarray* na área de alergia alimentar. Foram publicados estudos em doentes com alergia ao amendoim, soja, maçã e cenoura, com o objectivo de caracterização do perfil de sensibilização e identificação de alérgenos *major* em diferentes grupos de doentes. Os resultados foram idênticos aos obtidos pelas outras metodologias (micro-ELISA, UniCAP® e teste de desgranulação de basófilos)^{25,26,27,28}. Na APLV foram publicados apenas três estudos, cujos resultados serão discutidos a seguir^{1,10,13}.

No presente estudo foram incluídos 37 doentes com APLV mediada por IgE com diagnóstico confirmado por testes cutâneos, doseamento de IgE específicas e PPO.

Vários estudos recentes demonstraram a alteração da história natural de APLV nos últimos anos com a aquisição de tolerância a ocorrer mais tardiamente^{29,30}. De acordo com os dados do estudo de Skripak *et al*, apenas 19% dos doentes com APLV adquire a tolerância até aos 4 anos de idade, 42% até aos 8 anos, 64% até aos 12 e 79% até aos 16 anos²⁹. A nossa subdivisão do Grupo I em dois grupos etários teve como objectivo a tentativa de avaliação do perfil de sensibilização nos doentes com quadro persistente e foi baseada nos recentes dados da literatura^{29,30}. De forma particular, os doentes do Grupo Ib, por serem mais novos, tanto poderão evoluir para tolerância ou para persistência de alergia às PLV. Este grupo terá particular interesse para posterior avaliação analítica, podendo permitir a verificação da evolução do perfil de sensibilização e a sua eventual relação com alteração do quadro clínico.

A utilização do método UniCAP® para doseamento de IgE confirmou que nos doentes do Grupo Ia os níveis de IgE específica para leite total tinham um valor elevado (Quadro I), sendo este superior ao encontrado nos doentes dos outros grupos (diferenças com significância estatística em relação ao Grupo II e sem significância em relação ao Grupo Ib). Este parâmetro laboratorial parece ser um importante indicador de prognóstico associado à per-

The ISAC® microarray laboratory method used in this study allows identification of specific IgE for nine cow's milk protein fractions using 20 µl of serum, whereas the method currently used in clinical practice, UniCAP®, can only identify specific IgE for 3 proteins. Moreover, the use of small capillary blood samples in the ISAC® microarray method may be an added asset in the paediatric population^{13,23,24}.

Microarray is still infrequently used in food allergy. Studies have been published concerning patients with allergies to peanut, soya, apple and carrot, aiming to characterise sensitisation profiles and identify the major allergens in different patient groups. The results were identical to those using other methodologies (micro-ELISA, UniCAP® and basophil degranulation test)^{25,26,27,28}. Only 3 studies with CMPA have been published. Their results are discussed below^{1,10,13}.

Our study included 37 patients with IgE-mediated CMPA, with the diagnosis confirmed by skin prick tests, specific IgE measurements and OCT.

Several recent studies have shown alteration of the natural course of CMPA over recent years, with tolerance being acquired later^{29,30}. In accordance with the study data of Skripak *et al*, only 19% of patients with CMPA acquire tolerance by the age of 4 years old, 42% by the age of 8 years old, 64% by the age of 12 years old and 79% by the age of 16 years old²⁹. Our splitting of group I into two age groups was aimed at evaluating the sensitisation profile in patients with a persistent clinical picture and was based on recent data in the literature^{29,30}. In particular, group Ib patients, being younger, had an approximately equal chance of developing tolerance as they had of a persistent CMP allergy. This group is of particular interest for subsequent analytical evaluation; it could allow analysis of the evolution of their sensitisation profile and its possible relationship with a modified clinical picture.

Using the UniCAP® method confirmed that levels of specific IgE to whole milk were high in group Ia patients (Table I), higher than those found in patients in the other groups. These differences attained statistical significance in relation to group II and were without significance in relation to group Ib. This laboratory parameter seems to

sistência de alergia às PLV. No citado estudo de Skripak *et al* foi feita a avaliação da história natural da APLV e a identificação de factores clínicos e laboratoriais determinantes para o seu prognóstico, numa população de 807 doentes com APLV mediada por IgE²⁹. O valor máximo de IgE específica para leite total determinado ao longo da evolução da doença, definido como *peak* IgE, foi preditivo da sua evolução. Os autores apresentaram curvas de sobrevivência relacionando o valor máximo de IgE e resolução de APLV nos primeiros 18 anos de vida. Dividindo os doentes em três categorias de acordo com o valor máximo de IgE específica (< 5 KU/L, 5-19,9 KU/L, >20 KU/L), foi demonstrada a redução da probabilidade de aquisição de tolerância com o aumento deste parâmetro. Assistiu-se à persistência do quadro clínico de APLV, aos 18 anos de idade, em 60% dos doentes com valor máximo de IgE, superior a 50 KU/L, aos 4 anos, ou seja, valores elevados de IgE específica para leite total associaram-se a pior prognóstico. O valor de IgE específica para fracções de PLV não foi analisado no referido trabalho.

Em relação ao Grupo II, é de salientar que a maioria dos doentes (75%) mantinha IgE específica positiva (superior a 0,35 KU/L) para leite total e/ou fracções proteicas, apesar de tolerância comprovada pela PPO, confirmando a reduzida especificidade de valores relativamente baixos de IgE específica e sublinhando a importância da PPO como *gold standard* no diagnóstico de alergia alimentar.

Todas as proteínas estudadas por *microarray* foram reconhecidas no soro dos doentes do Grupo Ia. As que desencadearam maior resposta IgE foram, por ordem crescente, caseínas, β -LG e α -LA (73%, 82% e 91%, respectivamente). Entre as fracções proteicas das caseínas, a intensidade de resposta nos doentes do Grupo Ia teve a seguinte distribuição: caseína K > caseína α -SI > caseína β .

No Grupo Ib foram reconhecidas, em percentagem igual, a α -LA, a caseína e as suas fracções (83%). A ASB e a β -LG foram reconhecidas em menor percentagem (67% e 50% respectivamente). Não foi identificada no soro de nenhum dos doentes a IgE específica para CPIgG e a LF.

be an important indicator of prognosis associated with the persistence of CMPA. In the above mentioned study of Skripak *et al.*, an evaluation of the natural course of CMPA and the identification of the determining clinical and laboratory factors for its prognosis was made in a population of 807 patients with IgE-mediated CMPA²⁹. The maximum value of specific IgE for whole milk determined throughout the course of the disease, defined as *peak* IgE, was predictive of its evolution. The authors presented survival curves connecting the maximum IgE value to CMPA resolution in the first 18 years of life. Splitting patients into 3 categories according with the maximum specific IgE value (< 5 KU/L, 5-19.9 KU/L, > 20 KU/L) demonstrated the reduced probability of acquiring tolerance with increase in this parameter. They found a persistent clinical picture of CMP allergy at 18 years of age in 60% of patients with a maximum IgE value over 50 KU/L, at the age of 4 years old, that is, high levels of specific IgE to whole milk were associated with a worse prognosis. The value of specific IgE for CMP fractions was not analysed in that study.

It is highlighted that the majority of group II patients (75%) maintained specific IgE positive (over 0.35 KU/L) to whole milk and/or its protein fractions despite tolerance proven by OCT, confirming the reduced specificity of relatively low specific IgE values and underlining the importance of OCT as the gold standard in diagnosing food allergy.

All the proteins studied by microarray were recognised in group Ia patients' serum. Those which triggered the greatest IgE response were, in increasing order, caseins, β -LG and α -LA (73%, 82% and 91%, respectively). The intensity of response among the casein proteins was: casein K > casein α -SI > casein β .

Equal percentages of α -LA, casein and its fractions were recognised in group Ib (83%). Smaller percentages of BSA and β -LG were recognised (67% and 50%, respectively). Specific IgE for CPIgG and LF was not identified in the serum of any patient of this group.

No Grupo II foram encontradas IgE específicas para PLV no soro de apenas 2 doentes.

Um estudo semelhante com tecnologia de *microarray*, para identificação de IgE específica para péptidos de caseína α -S1, caseína α -S2, caseína K, caseína β e β -LG nas crianças com APLV, foi realizado, em Espanha, em população pediátrica¹⁰. Nestes doentes (n=31), divididos em dois grupos (“reactivos” e “tolerantes”), os autores concluíram haver uma elevada importância das caseínas e de β -LG como proteínas alergizantes em ambos os grupos. Entre as caseínas, a distribuição de reconhecimento no grupo dos doentes “reactivos” foi a seguinte: K (87,5%) > α -S1 = α -S2 = β (75%) e para β -LG em 81,3%, sendo estes resultados idênticos aos obtidos no presente estudo. A percentagem de reconhecimento de proteínas estudadas no grupo de doentes após aquisição de tolerância foi superior (13,3% – 40%), em comparação com os nossos resultados. Esta diferença poderá ser explicada pela idade dos doentes incluídos no grupo dos “tolerantes”, muito mais novos do que os doentes do Grupo II do estudo, bem como pela proximidade temporal da colheita do sangue relativamente ao momento da aquisição da tolerância. Adicionalmente, a α -LA, uma importante proteína alergénica, identificada na quase totalidade dos doentes com quadro persistente incluídos neste estudo (Figura 2), não foi avaliada no referido trabalho.

Um outro estudo recente, realizado em população pediátrica francesa por método de *microarray*, desenvolvido pelos próprios investigadores, incluiu a determinação de IgE específica para α -LA, β -LG, LF, ASB, caseína α -S1, caseína α -S2, caseína K, caseína β e leite de vaca, em 40 doentes com APLV mediada por IgE¹. Estes autores atribuíram uma maior importância alergénica à caseína α -S1, seguida da caseína α -S2, caseína K e caseína β . Em nenhum doente foram identificadas IgE específicas para α -LA e/ou β -LG por este método *microarray*; contudo, foram identificadas, e com valores significativos, por ELISA (em 70% dos doentes para β -LG e em 32% para α -LA), o que poderá revelar uma insuficiência técnica do *microarray* produzido pelos autores do trabalho. Adicionalmente, alguns dos doentes desenvolveram resposta IgE para LF (41% vs 27% no presente estudo). Foi referida maior gravidade

Specific IgE to CMP was recognised in the serum of only 2 group II patients.

A similar study with microarray technology to identify specific IgE to casein α -S1 peptides, casein α -S2, casein K, casein β and β -LG in children with CMPA was performed in a Spanish paediatric population¹⁰. The authors concluded that, in these patients (n = 31), who were split into 2 groups (‘reactive’ and ‘tolerant’), there was great importance of the caseins and β -LG proteins in both groups. Distribution of casein recognition in the reactive group was K (87.5%) > α -S1 = α -S2 = β (75%) and to β -LG in 81.3%. These results are identical to ours. The percentage of recognition of the proteins studied in the patient group after acquisition of tolerance was higher (13.3%-40%) than in our results. This difference may be explained by the age of the patients in the ‘tolerant’ group. They were a great deal younger than those in our group II. An additional explanation is the short time frame from collection of blood to time of acquisition of tolerance. Further, α -LA, an important allergenic protein identified in almost all patients with a persistent clinical picture in our study (figure 2), was not evaluated in that study.

Another recent study, performed in a French paediatric population using microarray developed by the researchers themselves, included measurement of specific IgE to α -LA, β -LG, LF, BSA, casein α -S1, casein α -S2, casein K, casein β and cow’s milk, in 40 patients with IgE-mediated CMPA¹. These authors attributed a greater allergenic importance to casein α -S1, followed by casein α -S2, casein K and casein β . Specific IgE to α -LA and/or β -LG were not identified in any patient using this microarray method, but they were identified, and in significant amounts, using ELISA (to β -LG in 70% and to α -LA in 32%), which may reveal a deficiency in the microarray technique developed by the study’s authors. Moreover, some patients developed IgE response to LF (41% vs. 27% in our study). Patients sensitised to LF had a greater clinical severity, despite the

clínica em doentes com sensibilização a LF, apesar de não terem sido descritos os dados clínicos do grupo em estudo. Os doentes não foram submetidos a PPO e o único dado para critério de inclusão foi o valor de IgE específica para leite total entre 3 e 190 KU/L. Em conclusão, ao contrário do estudo descrito, na nossa população observámos uma maior importância de α -LA e β -LG como proteínas alergisantes nos doentes com APLV, não sendo relevante a sensibilização à LF (Figura 2).

A importância de LF como proteína sensibilizante já tinha sido referida no estudo realizado por Natale *et al.* em que foi utilizada a técnica de *immunoblotting* e electroforese bidimensional para identificação de alergénios do leite de vaca⁹. Foram estudados 20 doentes com APLV comprovada por PPO, testes cutâneos positivos e IgE específica para leite total elevada doseada por CAP-RAST. Não foi identificada sIgE para α -LA em nenhum dos doentes estudados. As proteínas que desencadearam maior resposta IgE foram, por ordem crescente: ASB = β -LG (45%) < LF (50%) < CPIgG (95%), sendo as caseínas: β (15%) < K = α -S1 (50%) < α -S2 (90%). Mais uma vez, os resultados obtidos neste estudo diferem dos nossos, provavelmente pelos motivos mencionados e pela diferente metodologia utilizada.

O estudo não permitiu a identificação de um perfil idêntico nos doentes com APLV persistente. Será necessário realizar esta avaliação numa amostra maior e durante a evolução da doença, antes e depois da aquisição da tolerância.

O mesmo método *microarray* ISAC[®] (VBc-GENOMICS) foi utilizado no estudo de Ott *et al.*, com o objectivo da avaliação da sua utilidade no diagnóstico de alergia alimentar, em comparação com outros métodos de detecção de IgE específica¹². O estudo incluiu 130 crianças e lactentes com suspeita de APLV ou alergia a ovo, submetidos a doseamento de sIgE por UniCAP[®], testes cutâneos em picada, *microarray* e PPO. A sensibilidade do *microarray* (considerando os resultados combinados de caseína α , β e K, α -LA e β -LG) para diagnóstico de APLV foi de 59,5% e a especificidade de 83,7%, sendo no presente estudo de 100% e 90,2 %, respectivamente. Esta diferença pode ser explicada pelo pequeno número de doen-

clinical data of the study group not being described. The patients did not undergo OCT and the only inclusion criterion was the value of specific IgE to whole milk between 3 and 190 KU/L. In conclusion, unlike the study described, we saw a greater importance of α -LA and β -LG as allergenic proteins in patients with CMPA in our study and sensitisation to LF was not relevant (Figure 2).

The importance of LF as a sensitising protein had already been described in the study performed by Natale *et al.*, which used immunoblotting and bi-dimensional electrophoresis to identify cow's milk allergens⁹. Twenty patients with CMPA proven by OCT, positive skin tests and high specific IgE to whole milk measured by CAP-RAST were studied. sIgE to α -LA was not identified in any of the patients studied. The proteins which triggered the greatest response were, in increasing order, BSA = β -LG (45%) < LF (50%) < CPIgG (95%), and the caseins β (15%) < K = α -S1 (50%) < α -S2 (90%). Again, the results obtained in this study differ from ours, probably for the same reasons cited above and the different methodology used.

Our study did not allow the identification of an identical profile in patients with persistent CMPA. It will be necessary to perform this evaluation in a larger sample, and during the course of the disease, before and after acquisition of tolerance.

The same ISAC[®] (VBc-GENOMICS) microarray method was used in the study by Ott *et al.* aiming to evaluate its usefulness in diagnosing food allergy as compared with other methods of detecting specific IgE¹². The study population consisted of 130 children and infants with suspected CMPA or egg allergy who underwent UniCAP[®] sIgE measurements, skin prick tests, microarray and OCT. Sensitivity to microarray (considering the combined results of casein α , β and K, α -LA and β -LG) for a diagnosis of CMPA was 59.5% and specificity 83.7%, versus 100% and 90.2%, respectively, in our study. This difference can be explained by the small number of patients in our study.

tes incluídos neste trabalho. O método UniCAP[®], comparado com ISAC[®], apresentou baixa especificidade, uma vez que doentes com tolerância comprovada por PPO mantinham sIgE positivas. A utilização do limiar de positividade superior a 0,35 KU/l para doseamento de IgE específica por UniCAP[®] permitiria uma melhor especificidade, sem prejudicar a sensibilidade. Neste estudo, não foi possível a determinação deste limiar devido ao pequeno número de doentes envolvidos.

CONCLUSÃO

O método *microarray immuno solid-phase allergen chip* (ISAC[®]) foi utilizado na avaliação de um grupo de doentes com APLV, caracterizados clinicamente através de PPO, *gold standard* do diagnóstico de alergia alimentar. Foi possível, através desta metodologia, fazer a distinção entre doentes com APLV sintomática e os que adquiriram tolerância clínica. A caracterização do perfil de sensibilização dos doentes antes e depois da aquisição da tolerância à PLV poderá contribuir para a identificação de possíveis indicadores de prognóstico desta alergia alimentar.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento à Phadia Portugal pela colaboração e apoio

The UniCAP[®] method presented a lower specificity than ISAC[®], as the patients with tolerance proven by OCT maintained positive sIgE. The use of a positivity threshold greater than 0.35 KU/l for specific IgE dosing by UniCAP[®] would allow a better specificity without compromising sensitivity. However, it was not possible to determine this threshold due to the small number of patients in our study.

CONCLUSION

The Immuno Solid-phase Allergen Chip (ISAC[®]) microarray method was used to evaluate a group of patients with CMPA, clinically characterised using OCT, the gold standard in diagnosing food allergy. This method made it possible to distinguish between patients with symptomatic CMPA and those who acquired clinical tolerance. The characterisation of patient sensitisation profiles before and after acquisition of tolerance to CMP may contribute to the identification of possible indicators of prognosis of this food allergy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Phadia Portugal for their help and support

Contacto / Corresponding author:

Anna Sokolova

asokolova@netcabo.pt

Hospital de Santa Maria, Avenida Egas Moniz, Lisboa, 1700

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Gaudin J, Rabesona H, Choiset Y, Yeretssian G, Chobert J, Sakanyan V, et al. Assessment of the immunoglobulin E-mediated immune response to milk-specific proteins in allergic patients using microarrays. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 686-93.
2. Sampson H. Food allergy. Immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 717-28.
3. Skripak J, Matsui E, Mudd K, Wood R. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1172-7.
4. Vanderplas Y, Brueton M, Dupont C, Hill D, Isolauri E, Koletzko S, et al. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child* 2007; 92: 902-8.
5. Lack G. Food allergy. *N Engl J Med* 2008; 359: 1252-60.
6. Wal J. Structure and function of milk allergens. *Allergy* 2001; 56: 35-8.
7. Wal J. Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004; 93: 2-11.
8. Docena G, Fernandez R, Chirido F, Fossati C. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy* 1996; 51: 412-6.
9. Natale M, Bisson C, Monti G, Peltran A, Garoffo LP, Valentini S, et al. Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48: 363-9.
10. Cerecedo I, Zamora J, Shreffler WG, Lin J, Bardina L, Dieguez MC, et al. Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 589-94.
11. Mac Beath G, Schreiber S. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 2000; 289: 1760-3.
12. Vrtala A. From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment. *Allergy* 2008; 63: 299-309.
13. Ott H, Baron J, Heise R, Ocklenburg C, Stanzel S, Merk H et al. Clinical usefulness of microarray-based IgE detection in children with suspected food allergy. *Allergy* 2008; 63: 1521-8.
14. Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1993; 48: 48-82.
15. Niggemann B, Rolinck-Werninghaus C, Mehl A, Binder C, Ziegert M, Beyer K. Controlled oral food challenges in children – when indicated, when superfluous? *Allergy* 2005; 60: 865-70.
16. Bindslev-Jensen B, Ballmer-Weber B, Blanco C, Ebner C, Hourihane J, Knulst A, et al. Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods. Position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 2004; 59: 690-7.
17. Deinhofer K, Sevcik H, Balic N, Harwanegg C, Hiller R, Rumpold H et al. Microarrayed allergens for IgE profiling. *Methods* 2004; 32: 249-54.
18. Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays for the diagnosis of allergic diseases: state-of-the-art and future development. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1321-6.
19. Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hiller R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 1443-9.
20. Scheiner O, Kraft D. Basic and practical aspects of recombinant allergens. *Allergy* 1995; 50: 384-91.
21. Niederberger V, Valenta R. Molecular approaches for new vaccines against allergy. *Expert Rev Vaccines* 2006; 5: 103-10.
22. Valenta R, Twaroch T, Swoboda I. Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2007; 17: 88-92.
23. Fall B, Eberlein-Konig B, Behrendt H, Niessner R, Ring J, Weller MG. Microarrays for the screening of allergen-specific IgE in human serum. *Anal Chem* 2003; 75: 556-62.
24. Ott H, Schroder C, Stanzel S, Merk H, Baron J. Microarray-based IgE detection in capillary blood samples of patients with atopy. *Allergy* 2006; 61: 1146-7.
25. Shreffler W, Beyer K, Chu T, Burks A, Sampson H. Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 776-82.
26. Lin J, Shewry P, Archer D, Beyer K, Niggemann B, Haas H et al. The potential allergenicity of two 2S albumins from soybean (*Glycine max*): a protein microarray approach. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141: 91-102.
27. Ma Y, Zuidmeer L, Bohle B, Bolhaar ST, Gadermaier G, Gonzalez-Mancebo E, et al. Characterization of recombinant Mal d 4 and its application for component-resolved diagnosis of apple allergy. *Clin Exp Allergy* 2006; 36: 1087-96.
28. Ballmer-Weber B, Wangorsch A, Bohle B, Kaul S, Kundig T, Fotisch K, et al. Component-resolved diagnosis in carrot allergy: does the use of recombinant carrot allergens improve the reliability of the diagnostic in vitro procedure? *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 970-8.
29. Skripak J, Matsui E, Mudd K, Wood R. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120: 1172-7.
30. Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 1351-8.
31. Biló B, Rueff F, Mosbeck H, Bonifazi F, Oude-Elberink J. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2005; 60: 1339-49.