

Diagnóstico em Doenças Alérgicas Mediadas por IgE

Diagnosis in IgE-mediated Allergic Diseases

Silvia Daher¹, Clovis Galvão², Augusto Abe³, Renata Cocco⁴

Resumo

Doenças alérgicas são frequentes na população em geral e estão associadas à sensibilização a alérgenos do ambiente, como alimentos, pólenes, ácaros, fungos, insetos e medicamentos. A presença de anticorpos IgE específicos para alérgenos caracteriza a sensibilização alérgica.

Esta revisão aborda a orientação atual para correta avaliação das doenças alérgicas. São discutidos os principais métodos para o diagnóstico - determinação sérica de IgE específica e testes cutâneos com alérgenos - assim como, o teste de contato atópico e novas técnicas em desenvolvimento.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2009; 32(1):3-8 Diagnóstico em Alergia, alergia, IgE, RAST, teste cutâneo, teste de contato atópico.

Abstract

Allergic diseases are frequent conditions in general population. These diseases are linked to allergic sensitization to common environmental allergens, like pollens, mites, molds, foods, insects and drugs. Identification of allergen specific IgE antibody characterizes an allergic sensitization.

In this review is analyzed the current approach to diagnosis allergic conditions. The authors discuss major diagnostic methods, as serum specific IgE antibody and allergen skin test, atopy patch test and new techniques that are in development.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2009; 32(1):3-8 Diagnosis in Allergy, allergy, IgE, RAST, skin test, atopy patch-test

1. Profa. Adjunta da Disciplina de Obstetrícia Fisiológica e Experimental, Depto Obstetrícia, UNIFESP, Especialista em Alergia pela ASBAI
2. Professor Colaborador e Médico da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Médico Assistente do Serviço de Imunologia do Hospital das Clínicas de São Paulo, Responsável pelo setor de Provas Diagnósticas.
3. Prof. Auxiliar da Disciplina de Imuno-Reumatologia, Depto de Clínica Médica da Faculdade de Medicina, UFRJ e Médico responsável pelo Setor de Métodos Especiais do Serviço de Imunologia Clínica do HUCFF – UFRJ..
4. Médica; Mestre em Ciências; Pesquisadora Associada, Disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia, Depto de Pediatria, UNIFESP-EPM, Especialista pela ASBAI.

Série: Guia Prático de Alergia e Imunologia Clínica

Editor: Luiz Antonio Guerra Bernd- Professor Titular Disciplina de Imunologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Artigo submetido em 20.10.2008, aceito em 20.12.2008.

Introdução

Manifestações alérgicas são provocadas pela produção de anticorpos IgE específicos para alérgenos presentes no ambiente, como proteínas de ácaros, alimentos, veneno de insetos, pólenes e fungos, por exemplo. O diagnóstico das doenças alérgicas é feito primariamente por história clínica detalhada e pelo exame físico. Para a confirmação do diagnóstico é necessário demonstrar a presença de IgE específica contra alérgenos inalantes ou outros alérgenos envolvidos na história clínica e, quando possível, comprovar a participação deste(s) alérgeno(s) na provocação da manifestação clínica. No momento há grande variedade de métodos *in vivo* e *in vitro* para avaliar a presença de anticor-

pos antígeno-específicos da classe IgE.

IgE total

A determinação de IgE total costuma ser solicitada na avaliação das condições alérgicas. Numerosos fatores contribuem para o nível sérico de IgE e devem ser considerados para sua correta interpretação. Pode-se destacar a predisposição genética; fatores ambientais (ex. exposição a alérgenos); infecções; idade; sexo; poluição; tabagismo; tipo e intensidade de sensibilizações alérgicas. Níveis séricos de IgE total elevados são observados na maioria dos casos de dermatite/eczema atópico e/ou asma alérgica e, mais raramente, em pacientes com quadro exclusivo de rinite alérgica^{1,2}.

A determinação de IgE é realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA). O resultado é quantitativo, podendo ser expresso em unidades internacionais por mililitro (1 UI/mL), quilo unidades (1 kU/L), ou em nanogramas por mililitro (2,4 ng/mL de IgE)^{1,2}.

O nível sérico de IgE total é variável de acordo com a idade; costuma ser indetectável no neonato, atingindo concentrações máximas em adultos jovens. A determinação de IgE total auxilia no diagnóstico diferencial quando há suspeita de esofagite eosinofílica; alergia ocupacional de causa não esclarecida; aspergilose pulmonar alérgica; sinusite alérgica por fungos, etc^{1,2}.

Nível elevado de IgE não é sinônimo de presença de doença alérgica. IgE pode estar elevada em várias condições, como: parasitoses intestinais ou cutâneas, mieloma, síndrome de hiper-IgE, síndrome de Wiskott-Aldrich, aspergilose e filariose pulmonares, entre outras. No Brasil com regularidade são detectados níveis elevados de IgE total em indivíduos não-atópicos. Isto provavelmente reflete o grau de exposição pessoal a microorganismos em geral (bactérias, parasitas, fungos e vírus).

IgE específica

A determinação de IgE específica, genericamente denominada RAST (derivado da abreviatura da primeira técnica disponível para este fim – *radioallergosorbent test* –, é um parâmetro crítico para o diagnóstico de alergia mediada por IgE. A presença de anticorpos IgE indica sensibilização. A concentração de anticorpos IgE é um instrumento para identificar o alérgeno sensibilizante e para acompanhar a evolução da doença alérgica.

São condições clínicas com indicação para avaliação dos níveis séricos de IgE específica as doenças atópicas (rinite alérgica, asma, conjuntivite alérgica, dermatite atópica) e manifestações possivelmente desencadeadas por anticorpos IgE, como anafilaxia por insetos, reações a alimentos e, eventualmente, a medicamentos.

A determinação de IgE específica no soro tem a mesma finalidade dos testes cutâneos de leitura imediata. Com frequência esses procedimentos são comparados quanto à eficácia, sensibilidade, especificidade no diagnóstico clínico rotineiro. O teste *in vitro* apresenta algumas desvantagens quanto ao tempo de execução, custo e sensibilidade para alguns alérgenos. Por sua vez, existem algumas condições especiais em que o teste *in vitro* é a melhor alternativa²⁻⁵, como: pacientes que façam uso de anti-histamínicos ou outras medicações que possam interferir com testes cutâneos; pacientes com eczema ou dermatografismo; pós-quadro de anafilaxia (até seis semanas); quando o teste *in vivo* pode oferecer risco de reações sistêmicas: venenos de insetos, látex e alimentos; em situações em que é importante confirmar o teste cutâneo e quando não existe disponível extrato alérgico para teste cutâneo.

A disponibilidade de realização de IgE específica pode favorecer a má prática, como solicitação exagerada ou inadequada do exame. Certas atitudes devem ser evitadas, como: solicitação de IgE específica em reações que não são mediadas por IgE; para alérgenos que o paciente não tem contato ou para agentes que não induzem a produção de IgE (corantes, analgésicos e antiinflamatórios, p. exemplo). A seleção dos alérgenos a serem solicitados deve se basear na história clínica e no exame do paciente. A anamnese adequada direciona a solicitação e reduz o número de testes usados para o diagnóstico.

A eficiência da determinação de IgE específica e sua contribuição para a prática clínica dependem dos critérios utilizados para sua indicação e da qualidade técnica do laboratório responsável pelo exame.

Expressão de resultados (IgE específica)

Inicialmente os testes eram semi-quantitativos e os resultados distribuídos em classes. As classes compreendem uma faixa ampla de valores, definindo seis grupos principais como na tabela abaixo^{1,2}. Hoje é possível quantificar os níveis de IgE específica. Estes são expressos em kU / L.

Classes	Faixa (kU/L)	Resultados
0	Inferior a 0,35	Indetectável
1	0,35 a 0,70	Fraco
2	0,70 a 3,50	Moderado
3	3,50 a 17,50	Forte
4	17,50 a 50	Muito Forte
5	50 a 100	Muito Forte
6	Superior a 100	Muito Forte

A presença de anticorpos IgE específicos para alérgeno é um sinal de sensibilização alérgica, no entanto, deve-se estabelecer a relação entre manifestação clínica e o nível de anticorpos IgE específico. Isto é particularmente notável nos casos de alergia a alimentos.

Seleção dos alérgenos para pesquisa

A seleção dos alérgenos deve ser fundamentada pela avaliação do paciente, considerando quadro clínico e exposição a alérgenos de importância regional.

Os laboratórios de análises clínicas disponibilizam as seguintes opções para avaliação de IgE específica:

- alérgenos isolados, individuais, como *Blomia tropicalis*, leite de vaca, veneno de abelha, etc.
- "pool" de alérgenos (ex. mistura de poeira domiciliar e ácaros domésticos, alérgenos infantis, etc.)
- painéis de alérgenos relacionados (ex. painel de fungos, painel de gramíneas, etc.).

A pesquisa de *pool* ou painel de alérgenos pode ser útil para o monitoramento da presença de alergia. Os painéis desenvolvidos para este fim compreendem os alérgenos mais prevalentes agrupados; por ex. grupo de alimentos infantis ou de alérgenos inalantes^{5,6}. Resultado negativo ajuda no diagnóstico diferencial, poupa a execução de múltiplos testes. Em casos de resultado positivo deve-se prosseguir na investigação para identificação específica do agente sensibilizador^{1,2,4}.

É sempre importante ressaltar que a detecção de IgE específica somente indica que existe sensibilização. isto é, a determinação de IgE específica não faz diagnóstico de doença alérgica, portanto, o resultado deve ser avaliado à luz da história, do exame do paciente, das características alérgicas do local, etc.

A determinação da IgE específica pode auxiliar no monitoramento da evolução do paciente atópico. A exclusão de alimentos da dieta e a imunoterapia com veneno de insetos são situações que podem ser acompanhadas de alterações significativas na produção de IgE^{2,4}.

Portanto, a pesquisa *in vitro* de IgE específica oferece uma importante contribuição para o diagnóstico de alergia, porém para sua correta interpretação é fundamental considerar os resultados dos testes em conjunção com a história clínica.

TESTES CUTÂNEOS – PUNTURA (PRICK-TEST)

O teste cutâneo de leitura imediata é considerado o principal método para confirmar sensibilização alérgica mediada por IgE. É um procedimento pouco invasivo e quando realizado corretamente tem boa reprodutibilidade^{7,8}. O procedimento tem caráter educativo para os pacientes uma vez que permite visualizar na pele a resposta inflamatória alérgica que lhes acomete olhos, nariz, brônquios, e trato gastrointestinal.

Papel dos testes alérgicos cutâneos na prática clínica

Testes cutâneos são usados para confirmar a sensibilidade clínica induzida por grande variedade de alérgenos encontrados naturalmente no ambiente como aeroalérgenos (ácaros da poeira domiciliar, pólenes, alérgenos de animais, fungos, baratas) e alimentos.

Extratos alérgicos

Um importante pré-requisito para a realização de teste cutâneo com resultados confiáveis é a disponibilidade de preparações alérgicas estáveis e padronizadas, isto é, com potência, estabilidade e composição conhecidas. Os extratos alérgicos devem preencher as seguintes características: conter alérgenos ativos em quantidades proporcionais àquelas encontradas nas fontes naturais do alérgeno; a concentração deve ser conhecida e expressa em unidades biológicas definidas; não deve haver contaminação com outros alérgenos; os produtos finais não devem ter componentes irritantes ou tóxicos; deve ter estabilidade documentada dentro dos limites aceitáveis^{9,10}. A qualidade e a quantificação dos alérgenos presentes nos extratos é muito importante para interpretação e valorização dos tes-

tes alérgicos, todavia, não existe uniformidade nas concentrações disponíveis para uso clínico e tampouco equivalência entre as unidades utilizadas por laboratórios diversos¹¹.

Extratos alergênicos em solução aquosa perdem progressivamente a potência. A perda de potência pode ser retardada, mas não evitada pelo uso de conservantes. A albumina sérica humana a 0,03% é eficaz como estabilizante, sem ser irritante. Glicerina a 50% é mais eficaz que a albumina para evitar a perda de potência, e deve ser usado em todos os extratos armazenados para uso no teste de puntura. Os extratos alergênicos devem ser sempre mantidos sob refrigeração (2-8°C) quando não estão em uso¹².

Técnica de aplicação

- Puntura (prick-test)

A técnica de puntura é a mais usada pela boa reprodutibilidade e facilidade de aplicação. O teste de puntura é o preferido na avaliação inicial, pois é mais rápido de realizar, provoca menor desconforto, permite testar vários alérgenos ao mesmo tempo, e oferece menor risco de reações sistêmicas. Além disso, quando realizado com extratos adequados correlaciona-se com a sensibilidade clínica.

Uma gota de antígeno é aplicada sobre a pele. Faz-se passar uma agulha ou lanceta através desta gota e se provoca a ruptura da camada mais superficial da pele (no teste intradérmico o antígeno é injetado na derme). A leitura do resultado deve ser feita entre oito e dez minutos para a histamina e após 15 a 20 minutos para os alérgenos. Devem ser registrados a média (em mm) dos maiores e menores diâmetros da pápula e do eritema - anotar o diâmetro maior (em mm) e o diâmetro perpendicular no ponto médio do maior; somar e dividir por dois. Este é o valor em mm a ser registrado. Alguns sugerem que se marque com caneta os limites externos da reação e então se aplique uma fita adesiva que registrará e poderá ser conservada na ficha do paciente

As reações consideradas clinicamente relevantes e, portanto, como resultados positivos, apresentam pápula com 3mm ou mais de diâmetro médio e 10mm ou mais de eritema.

O número de alérgenos testados dependerá das características do paciente, como idade, quadro clínico, exposição a alérgenos regionais, entre outros⁹. O teste de puntura é um procedimento seguro embora, reações sistêmicas tenham sido observadas²

Para auxiliar a interpretação dos testes são necessários os controles negativo e positivo. As soluções usadas como controle negativo são geralmente os diluentes utilizados na conservação dos extratos, servindo para detectar dermatografismo e reatividade inespecífica da pele ao diluente e/ou ao puntor. O controle positivo ajuda a detectar a supressão por medicamentos ou doença e variações na performance dos técnicos, e é geralmente usado o fosfato de histamina, na concentração de 10mg/ml.

A resposta positiva no teste cutâneo reflete a presença de anticorpos alérgeno-específicos ligados aos mastócitos, entretanto, não demonstra que este alérgeno seja a causa das manifestações clínicas. Isto é, a resposta positiva reflete sensibilização, mas não necessariamente alergia clínica.

- Fatores que podem influenciar o resultado do teste

1. a idade do paciente – a partir dos três meses de idade, já se consegue uma reação com pápula e eritema, com predominância do eritema em crianças de pouca idade e baixa reatividade cutânea até os cinco anos. A reatividade cutânea volta a diminuir a partir dos 60 anos;
2. algumas drogas inibem a reatividade ao teste, principalmente os anti-histamínicos – a duração do efeito

inibitório está ligada à farmacocinética da droga e aos seus metabólitos ativos. Os anti-H1 clássicos reduzem a reatividade por vários dias. Recomenda-se que os pacientes evitem anti-histamínicos por quatro a cinco dias antes da aplicação dos testes de leitura imediata. O cetotifeno suprime a resposta cutânea por um período de até 30 dias. Antidepressivos tricíclicos inibem a pápula por algumas semanas. Pequenos cursos de corticosteróides sistêmicos não interferem na reatividade cutânea, no entanto, a aplicação de corticosteróides tópicos por uma semana pode reduzir tanto a fase imediata quanto tardia da reação cutânea⁸.

- Precauções que devem ser tomadas para a realização dos testes de puntura

O teste cutâneo é um procedimento médico. A aplicação, leitura e interpretação de testes cutâneos devem ser realizadas somente por médicos habilitados para sua execução. A exposição de paciente ao alérgeno sensibilizante, mesmo em quantidades diminutas oferece risco de reação sistêmica, portanto, também por razões de segurança, o procedimento deve ser realizado na presença de médico. Equipamento de emergência deve estar disponível, com equipe treinada para sua utilização. Testes cutâneos não devem ser aplicados em pacientes que estejam com sintomas não controlados¹⁴.

O Conselho Federal de Medicina publicou a Resolução CFM Nº 1.794/2006 na qual estabelece as normas mínimas para a utilização de extratos alergênicos para fins diagnósticos e terapêuticos nas doenças alérgicas⁹.

- Testes cutâneos na alergia a alimentos

Na investigação de alergia alimentar tem se demonstrado que existe relação entre o tamanho da reação ao teste cutâneo e/ou nível de IgE específica e a resposta positiva ao teste de provocação oral. Assim, aconselha-se observar os valores de *cutt-off* considerados na população.

Em estudo de 555 provocações com alimentos em 467 crianças se observou que teste cutâneo com diâmetro médio da pápula de pelo menos 8 mm para leite de vaca, 7 mm para clara de ovo e 8 mm para amendoim foi 100% diagnóstico para reações alérgicas usando determinados extratos comerciais. Em crianças menores de dois anos de idade, os diâmetros médios de pápulas correspondentes foram 6, 5 e 4mm respectivamente^{16,17}.

Alguns alérgenos alimentares perdem rapidamente suas propriedades antigênicas e os extratos correspondentes têm pouca atividade alérgica¹⁸, por isso, alguns alergistas preferem utilizar a técnica do *prick-to-prick* com alimentos frescos. Esta técnica apresenta algumas variações. A mais utilizada consiste em realizar puntura com uma lanceta no alimento, um pouco antes de realizar a puntura na pele do paciente, pois se mostrou uma técnica prática e com resultados reprodutíveis¹⁹. Alimentos com consistência mais sólida (p. ex., amendoim) podem ser macerados e diluídos em solução salina 1:3. Extratos com os alimentos frescos provocaram respostas mais sensíveis e mais fortes do que os extratos comerciais, e os seus resultados apresentaram melhor correlação com a provocação oral²⁰.

- Testes cutâneos com medicamentos

O diagnóstico etiológico na hipersensibilidade a drogas representa uma das maiores dificuldades na alergologia. Muitas vezes a história clínica não é suficiente para o diagnóstico, principalmente quando mais de uma droga está envolvida.

Os testes cutâneos de puntura podem ser usados na avaliação de reação de hipersensibilidade a drogas quando a suspeita é de uma reação IgE mediada. Isto é possível nas reações adversas aos antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas), relaxantes neuromusculares, in-

sulina, protamina, heparina, estreptoquinase e quimopainina, quando estas drogas estiverem relacionadas com sintomas imediatos de urticária/angioedema, rinite, conjuntivite, broncoespasmo e outros sintomas de anafilaxia. Podem ser considerados também na avaliação de hipersensibilidade a anestésicos locais, entretanto, neste caso o propósito seria mais excluir uma reação à preparação testada, do que confirmar a hipersensibilidade a droga^{21,22}.

Na área de reação a medicamentos os testes cutâneos com medicamentos devem ser considerados com muita cautela. Estão absolutamente proibidos em pacientes com história de hospitalização por reações a drogas, reações com perigo à vida e reações cutâneas graves como Steven-Johnson²³.

Teste de Contato Atópico (TCA, Atopy Patch-Test)

O teste de contato atópico consiste na aplicação de alérgeno - com o mesmo método dos testes de contato tradicionais para avaliar dermatite de contato alérgica, porém visando avaliar hipersensibilidade tardia a alimentos, aeroalérgenos e alguns medicamentos.

A valorização do TCA ainda é discutida. Embora a técnica seja conhecida há quase duas décadas^{24,25}, persistem dúvidas quanto à concentração ideal do alérgeno e o tempo de aplicação do teste na pele.

Indicações

O TCA foi inicialmente realizado em crianças com dermatite atópica para pesquisa de sensibilidade cutânea a alérgenos alimentares, como proteínas do leite e ovo. Posteriormente, alérgenos inalatórios foram introduzidos e passou-se a realizar os testes em pacientes com e sem dermatite. No momento, há sugestões do teste em reações alérgicas a medicamentos²⁶.

O TCA associado a teste de punção ou pesquisa de IgE específica, principalmente para proteínas do leite, ovo e trigo pode ser método substitutivo à dieta de exclusão na avaliação de alergia em casos de dermatite atópica^{27,28}.

Técnica sugerida: colocação do alérgeno na placa adesiva do teste de contato, na diluição que varia de 1/1 a 1/1000 em solução aquosa ou vaselina. Esta última induz a resposta mais intensa²⁹. Alguns pesquisadores chamam a atenção de que concentrações maiores do alérgeno podem levar a irritação cutânea induzindo a falso resultado positivo.

O alérgeno é aplicado em disco de papel de filtro ou alumínio de diâmetros de 8 ou 12mm. O disco de alumínio

normalmente disponível em nosso meio é o de 8mm, mas alguns estudos recomendam que o disco seja de 12mm²⁵. O teste é colocado, preferencialmente, na região dorsal do paciente. O tempo de permanência varia de 24 a 72 horas, realizando-se leituras 24 a 72 horas após a retirada^{25,30}. A oclusão por 48 horas parece ser a mais recomendável³¹.

A manutenção do adesivo por 72 horas, principalmente em crianças e no verão tropical é difícil, além disso, pacientes muito sensíveis a determinados alérgenos talvez não suportem a manutenção por 24-48 horas. A observação inicial por 20-30 minutos para verificar a tolerância, bem como orientação da retirada antecipada do teste em caso de prurido não suportável são recomendações importantes.

É valorizado desde o eritema até pápula, vesículas e bolhas³². Por se tratar de teste de resposta celular tardia, emprego de anti-histamínico não estaria contra-indicado. Entretanto, quando se valoriza o eritema, a suspensão prévia do anti-H1 é recomendável²⁵.

Diferente do teste de punção, o índice de positividade no TCA em crianças menores que dois anos é maior que em crianças com mais idade. Outro estudo comparando crianças e adultos também verificou índice maior em crianças^{32,33}.

Observações:

A aplicação de TCA para avaliação de sensibilização a alérgenos alimentares e ácaros ainda não pode ser incorporada como exame diagnóstico de rotina. Detalhes técnicos e alguns aspectos relacionados a interpretação dos resultados ainda não estão totalmente esclarecidos. Assim sendo, a indicação e realização destes testes ainda é restrita à área de pesquisa clínica^{34,35}.

Novas abordagens no diagnóstico da sensibilização alérgica mediada por IgE

Entre as reações de hipersensibilidade as condições associadas ao tipo I de Gel e Coombs (mediadas por anticorpos IgE) ocupam um lugar de destaque pela alta incidência e por seu potencial de gravidade. Devido ao baixo nível sérico desta imunoglobulina, os exames laboratoriais específicos para sua detecção demandam extrema sensibilidade.

Algumas vezes pode ser utilizada a mensuração dos mediadores inflamatórios consequentes à degranulação de mastócitos e basófilos como método indireto de detecção da IgE (tabela 1).

Tabela 1 - Testes laboratoriais que indicam a presença de sensibilização alérgica e a respectiva proteína responsável.

Objetivo do teste	Princípio do teste	Tecnologia básica	Exemplos
Detectar a presença de sensibilização do alérgeno específico	Anticorpos IgE/IgA/IgG são testados com alérgenos específicos	Diferentes ensaios utilizando uma fase sólida para se ligar a anticorpos alérgeno-específicos, detectados através de reagentes anti- IgE/IgA/IgG	UniCAP ELISA Imunoblot Microarray
Presença de mediadores inflamatórios de diferentes células	Histamina de mastócitos e basófilos	Fase sólida ligada a anticorpos e reagentes com marcadores "anti-reagentes"	UniCAP
	Triptase de mastócitos		UniCAP
	Leucotrienos e prostaglandinas		ELISA
	Mediadores de eosinófilos (ex: proteína catiônica eosinofílica)		UniCAP
	Mediadores de linfócitos (citocinas)		ELISA
Resposta imunológica celular	Proliferação de linfócitos T	Cultura de células T com estímulo alérgênico/antigênico específico; análise da proliferação celular	Cultura de células
	Ativação de basófilos		CAST* Citometria de fluxo

*CAST: teste de estimulação antigênica celular. Adaptado de referência 36.

A capacidade de um teste em detectar anticorpos específicos depende da quantidade de alérgenos presentes em seu sistema. Extratos naturais de alérgenos são usados na rotina dos especialistas para a realização de testes *in vivo* e *in vitro*. Estas preparações, no entanto, variam significativamente quanto a sua composição e alergenicidade, além disso, alguns pacientes podem não apresentar anticorpos para todo o alérgeno, mas para apenas alguns de seus componentes alergênicos, o que vem a ser de crucial relevância quando o objetivo for a imunoterapia específica. Como resposta a estas questões, os extratos recombinantes vêm sendo cada vez mais utilizados nos testes diagnósticos das doenças alérgicas. Centenas de alérgenos recombinantes já foram desenvolvidos e alguns deles já estão disponíveis no sistema ImmunoCAP®.

Outro método laboratorial que utiliza alérgenos recombinantes e rapidamente vem encontrando espaço em pesquisas é o sistema de *microarrays*. Sua principal vantagem é a de permitir que vários antígenos sejam mensurados ao mesmo tempo, necessitando de mínimas quantidades de sangue quando comparado aos exames convencionais.

A seguir serão abordados alguns métodos diagnósticos que embora ainda não sejam utilizados rotineiramente, representam avanços no diagnóstico das doenças alérgicas.

1- Marcadores celulares

A. Triptase e histamina:

Os mastócitos são as células mais abundantes durante os processos alérgicos. Quando ativadas, liberam vários mediadores pré-formados, como a histamina e a triptase, responsáveis pelos sintomas da reação alérgica. Ao contrário da triptase, a histamina é rapidamente degradada após sua liberação e não é considerada um bom marcador para reações imediatas como anafilaxia ou mastocitose³⁷. A triptase, no entanto pode ser utilizada como excelente marcador de ativação de mastócitos. Valores maiores que 20µg/L são considerados elevados e podem ser detectados até 3 a 6 horas após a degranulação do mastócito⁷.

B. Proteína catiônica eosinofílica (PCE):

A PCE é uma proteína altamente citotóxica encontrada nos grânulos de eosinófilos, células responsáveis pela perpetuação da reação inflamatória dos brônquios em indivíduos asmáticos. Ultimamente tem sido relacionada também com a lesão tecidual encontrada na esofagite eosinofílica³⁸ e é encontrada em altos níveis em crianças com alergia ao leite de vaca. Níveis elevados de PCE podem ser detectados no sangue, lavado bronco-alveolar e escarro. A determinação sérica da PCE pode servir como marcador da atividade inflamatória da asma, assim como, e ser utilizada como parâmetro para guiar o tratamento com corticosteróides³⁹.

2. - Immunoblotting

Eventualmente observam-se pacientes que apresentam história evidente de reação a certo tipo de alérgeno, mas seus anticorpos não são detectados pelos métodos convencionais. Nestes casos, quando a sensibilização a um determinado alérgeno é suspeita, o *immunoblotting* (ou *Western blotting*) pode ser realizado.

As proteínas do alérgeno suspeito são separadas por gel-eletroforese de acordo com seu peso molecular e então transferidas para uma membrana (*blotting*). Nesta fase sólida, o soro dos pacientes em análise permitirão a identificação do(s) alérgeno(s) através da ligação de seus anticorpos IgE com a respectiva proteína. Apesar de bastante sensível, o método demanda bastante tempo, requer o conhecimento molecular do alérgeno em questão e deve ser sempre comparado com um controle³⁶.

Alguns pesquisadores vêm tentando estabelecer uma relação direta entre o teste de ativação dos basófilos e o

status clínico do paciente, em especial nos casos de alergia alimentar. A análise da ativação dos basófilos pode ser útil se utilizada para comparar aspectos funcionais da IgE, sendo um bom parâmetro para o monitoramento das reações inflamatórias alérgicas. Embora não esteja padronizada, a detecção de CD63 e CD20c está sendo utilizada com sucesso em vários centros na avaliação de reações a medicamentos^{40,41}.

4- Quantificação de IgE específica:

Microarray

Nos últimos dez anos, uma nova tecnologia capaz de produzir seqüências de DNA ou de proteínas em miniaturas vem possibilitando a análise de centenas de amostras simultaneamente. A técnica é baseada em uma fase sólida onde são depositadas as proteínas (naturais, recombinantes ou purificadas) e o posterior contato com o soro dos pacientes a ser analisado. A quantidade de sangue necessária para o *screening* é um dos grandes diferenciais do *microarray*: com apenas 20-30µL de soro é possível quantificar dezenas de proteínas ao mesmo tempo⁴². A sensibilidade deste método é comparada às do RAST, ELISA e *Immunoblotting*^{43,44}.

Referências

- Hamilton RG, Adkinson NF. Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:S687-701.
- Kim JS; O'Gorman MRG. Common *In Vitro* Tests for Allergy and Immunology. *Allergy Asthma Proc* 2004; 25:S57-8.
- Hamilton RG, Adkinson NF. In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:213-25.
- Portnoy JM, Amado M. Evidence-based allergy diagnostic tests. *Curr Allergy Asthma Reports* 2006, 6: 455-61.
- Garcia-Marcos L, Sanchez-Solis M, Martinez-Torres AE, Moreno JML, Sastre VH. PhadiatopTM compared to skin-prick test as a tool for diagnosing atopy in epidemiological studies in school-children. *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 240-4.
- Ballardini N, Nilsson C, Lilja G. ImmunoCAPTM Phadiatop- Infant – a new blood test for detecting IgE sensitization in children at 2 years of age. *Allergy* 2006; 61: 337-343.
- Oppenheimer J, Nelson H. Skin testing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96(suppl 1):S6-S12.
- Bernstein IL, Li JT, Bernstein DI, Hamilton R, Spector SL, Tan R et al - Allergy Diagnostic Testing: An Updated Practice Parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008;100 :S1-S148.
- Indrajana T, Spieksma FThM, Voorhorst R. Comparative study of the intracutaneous, scratch and prick tests in allergy. *Ann Allergy* 1997; 29:639-650.
- Dreborg S. Skin tests used in type I allergy testing – Position paper. *Allergy* 1989;44(suppl 10):13-21.
- King MJ, Lockey RF. Allergen prick-puncture skin testing in the elderly. *Drugs Aging* 2003; 20:1011-1017.
- Nelson HS. Effect of preservative and conditions of storage on the potency of allergy extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 67:64-7.
- Turkeltaub PC. Percutaneous and intracutaneous diagnostic tests of IgE mediated diseases. In: Kemp SF, Lockey RF, eds. *Diagnostic testing of allergic disease*. Vol 15, New York: Marcel Dekker Inc, 2000: 53.
- Rosário Filho NA e cols.– Comissão de testes, imunoterapia e padronização de antígenos. Testes cutâneos em alergia. *Rev bras alergimunopatol* 2000;23:134-136.
- Conselho Federal de Medicina; www.portalmedico.org.br acessado em 2/janeiro/2009
- Hide DW. Food allergy in children. *Clin Exp Allergy* 1994;24:1-2.
- Hill DJ, Heine RG, HsKing CS. The diagnostic value of skin prick testing in children with food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15:435-441.
- Moneret-Vautrin DA. Food antigens and additives. *J Allergy Clin Immunol* 1986;78:1039-46.
- Dreborg S, Foucard T. Allergy to apple, carrot, and potato in children with birch pollen allergy. *Allergy*1983;38:167.

20. Rance F, Juchet A, Bremont F, Dutau G. Correlations between skin prick tests using commercial extracts and fresh foods, specific IgE and food challenges. *Allergy* 1997; 52:1031-1035.
21. Brockow K, Romano A, Blanca M, Ring J, Pichler W, Demoly P. General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. *Allergy* 2002; 57:47-51.
22. Blanca M, Veja M, Garcia J. Allergy to penicillin with good tolerance to other penicillins; study of the incidence in subjects allergic to betalactams. *Clin Exp Allergy* 1990; 20:475-481.
23. Schnyder B, Helbling A, Kappeler A, Pichler WJ. Drug induced papulovesicular exanthema. *Allergy* 1998;53:817-818.
24. Niggemann B, Reibel S, Wahn U. The atopy patch test (APT)- a useful tool for the diagnosis of food allergy in children with atopic dermatitis. *Allergy* 2000;55:281-5.
25. Turjanmaa K, Darsow U, Niggemann B, Rancé F, Vanto T, Werfel T. EAACI/GA2LEN position paper: present status of the atopy patch test. *Allergy* 2006; 61:1377-84.
26. Gex-Collet C, Helbling A, Pichler WJ. Multiple drug hypersensitivity-proof of multiple drug hypersensitivity by patch and lymphocyte transformation tests. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2005;15:293-6.
27. Roehr CC, Reibel S, Ziegert M, Sommerfeld C, Wahn U, Niggemann B. Atopy patch tests, together with determination of specific IgE levels, reduce the need for oral food challenges in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:548-53.
28. Kerschenlohr K, Decard S, Przybilla B, Wollenberg A. Atopy patch test reactions show a rapid influx of inflammatory dendritic epidermal cells in patients with extrinsic atopic dermatitis and patients with intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:869-74.
29. Oldhoff JM, Bihari IC, Knol EF, Bruijnzeel-Koomen CA, de Bruin-Weller MS. Atopy patch test in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome: comparison of petrolatum and aqueous solution as a vehicle. *Allergy* 2004;59:451-6.
30. Darsow U, Laifaoui J, Kerschenlohr K, Wollenberg A, Przybilla B, et al. The prevalence of positive reactions in the atopy patch test with aeroallergens and food allergens in subjects with atopic eczema: a European multicenter study. *Allergy* 2004;59:1318-25.
31. Rancé F. What is the optimal occlusion time for the atopy patch test in the diagnosis of food allergies in children with atopic dermatitis? *Pediatr Allergy Immunol* 2004; 15:93-6.
32. Heine RG, Verstege A, Mehl A, Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Niggemann B. Proposal for a standardized interpretation of the atopy patch test in children with atopic dermatitis and suspected food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2006;17:213-7.
33. Strömberg L. Diagnostic accuracy of the atopy patch test and the skin-prick test for the diagnosis of food allergy in young children with atopic eczema/dermatitis syndrome. *Acta Paediatr* 2002;91:1044-9.
34. Seidenari S, Giusti F, Bertoni L, Mantovani L. Combined skin prick and patch testing enhances identification of peanut-allergic patients with atopic dermatitis. *Allergy* 2003;58:495-9.
35. Novak K; Holt PG. In: In: Holgate ST. et al, *Allergy* 3rd. ed. 2006 chapter 19, p. 309-28.
36. Lopata AL. Specialized *in vitro* diagnostic methods in the evaluation of hypersensitivity – an overview. *Curr Allergy Clin Immunol* 2006;19:18-20.
37. Hogan AD, Schwartz LB. Markers of mast cell degranulation. *Methods* 1997; 13: 43-52.
38. Gupta SK, Fitzgerald JF, Kondratyuk T, HogenEsch H. Cytokine Expression in Normal and Inflamed Esophageal Mucosa: A Study into the Pathogenesis of Allergic Eosinophilic Esophagitis *JPGN* 2006;42:22–26.
39. Koller DY, Wojnarowski C, Herkner KR. High levels of eosinophil cationic protein in wheezing infants predict the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 752-756.
40. Boumiza R, Debard AL, Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin Mol Allergy* 2005; 3:9-14.
41. Shreffler WG. Evaluation of basophil activation in food allergy: present and future applications. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; 6:226–233.
42. Lin J, Renault N, Haasw H, Schramm G, Viethsz S, Vogelz L et al. A novel tool for the detection of allergic sensitization combining protein microarrays with human basophils. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1854–1862.
43. Hiller R, Laffer S, Harwanegg C. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002; 16:414–6.
44. Lin J, Shewry PR, Archer DB. The potential allergenicity of two 2S albumins from soybean (*Glycine max*): a protein microarray approach. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 141:91–102.

Correspondência:

Silvia Daher

Rua Bela Cintra Nº 1920 – Apto. 41 – Cerqueira Cesar

01415-002 - São Paulo - SP

Fone/Fax: OXX-11-5579.2353