Padrões clínicos e laboratoriais na hipersensibilidade ao camarão e reactividade cruzada com *Dermatophagoides pteronyssinus*

Clinical and immunological patterns in patients with shrimp hypersensitivity and Dermatophagoides pteronyssinus *cross-reactivity*

Rev Port Imunoalergologia 2008; 16 (5): 449-466

Isabel Carrapatoso[1], Fernando Rodrigues[2], Luísa Geraldes[1], Emília Faria[1], Ana Todo-Bom[1], Carlos Loureiro[1], Celso Chieira[1]

[1] Serviço de Imunoalergologia / *Immunoallergology Department.*
[2] Serviço de Patologia Clínica / *Clinical Pathology Department.*
Hospitais da Universidade de Coimbra.

Nota: Prémio SPAIC-Schering Plough 2007 / *SPAIC-Schering Plough 2007 Award*

RESUMO

Objectivos: Investigar padrões clínicos em doentes com hipersensibilidade a camarão e a ocorrência de reactividade cruzada a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp). Caracterizar as principais proteínas envolvidas na reactividade a camarão, em estudos de *immunoblotting*. **Métodos:** Avaliaram-se 20 doentes com clínica de hipersensibilidade imediata, após ingestão de camarão. Aplicou-se um questionário estandardizado, foram efectuados testes cutâneos por *prick* a alimentos e aeroalergénios e procedeu-se à determinação de IgE específica a camarão e Dp por *UniCap* e *immunoblotting*. A existência de eventual reactividade cruzada imunológica entre camarão e Dp foi investigada por estudos de inibição de *immunoblotting*. **Resultados:** A média de idades dos doentes era de 33±16 anos, sendo 13 do sexo masculino. As manifestações clínicas após ingestão de camarão foram urticária e/ou angioedema generalizados em 8 doentes, síndrome de alergia oral em 9 e anafilaxia em 3. Para além do camarão, foi detectada em todos os doentes sensibilização a outros crustáceos com sintomas semelhantes. Outros alimentos reportados em que se confirmou sensibilização

foram moluscos-12 doentes e ovo-1. Em todos os doentes foi detectada sensibilização a Dp e sensibilização associada a barata em 12, a pólenes em 13, a cão em 5 e a gato em 5. Doseamentos de IgE específica a Dp e camarão superiores ou iguais a 3,5 KU/l foram encontrados, respectivamente, em 15 e 12 doentes. Considerando os estudos de *immunoblotting* a camarão, observou-se uma maior intensidade de ligação a bandas com peso molecular (PM) de 35-40 KDa em 14 doentes, 17 KDa em 2, 22 KDa em um e 43-50 KDa nos restantes 3. Os estudos de inibição de *immunoblotting* evidenciaram reactividade cruzada em 15 doentes, recíproca camarão-Dp em 10 e não recíproca em 5, não sendo possível demonstrar a sua existência em 5. **Conclusões:** O PM encontrado para as bandas de maior intensidade nos estudos de *immunoblotting* a camarão sugere o envolvimento de tropomiosinas na maioria dos doentes, reforçando o papel destes panalergénios como alergénios *major* na hipersensibilidade a camarão em doentes sensibilizados a ácaros. Sensibilização simultânea a camarão e Dp pode ocorrer na ausência de reactividade cruzada e diferentes padrões de sensibilização deverão ser considerados.

Palavras-chave: Camarão, *Dermatophagoides pteronyssinus*, hipersensibilidade, *immunoblotting*, inibição, reactividade cruzada.

ABSTRACT

Objectives: *To investigate the occurrence of cross-reactivity to Dermatophagoides pteronyssinus (Dp) in patients with shrimp IgE hypersensitivity and to characterise the major proteins involved in shrimp IgE hypersensitivity.* ***Patients and methods:*** *Twenty consecutive patients with immediate adverse reactions to shrimp were selected. A standardised questionnaire was used, and skin prick tests to food and airborne allergens and serum specific IgE and immunoblotting assays to shrimp and Dp were performed. The possible cross-reactivity between shrimp and Dp was investigated using immunoblotting inhibition assays.* ***Results:*** *The mean age of the patients was 33±16 years and 13 patients were male. The clinical manifestations after ingestion of shrimp were generalized urticaria and/or angioedema in eight patients, oral allergy syndrome in nine and severe anaphylaxis in three. In addition to shrimp, all patients were sensitised to other crustaceans and reported similar symptoms after their ingestion. Other foods implicated were molluscs in 12 patients and egg in one patient. All patients were sensitized to inhalant allergens (20 to Dp; 12 to cockroach, 13 to pollens, five to cat and five to dog. Serum specific IgE to Dp and to shrimp ≥3.5 KU/l was detected in 15 and in 12 patients respectively. In terms of immunoblotting assays to shrimp, IgE binding occurred predominantly at 35-40 KDa molecular weight (MW) protein regions in 14 patients, to a 17 KDa band in two patients, to a 22 KDa band in one patient and to 43-50 KDa proteins in the remaining three patients. Immunoblotting inhibition assays showed reciprocal cross-reactivity between shrimp and Dp in 10 patients. We could not prove the existence of cross-reactivity in 5 patients and it was not reciprocal in 5 patients.* ***Conclusions:*** *The molecular weight range for the highest frequency of IgE binding in immunoblotting assays to shrimp clearly suggests the involvement of tropomyosins. Our results confirm the role of these pan-allergens as major allergens in shrimp hypersensitivity in house-dust-mite-sensitized patients. Concurrent sensitization to shrimp and Dp can occur without cross-reactivity and different patterns of sensitization should be considered.*

Key-words: *Cross-reactivity,* Dermatophagoides pteronyssinus*, hypersensitivity, immunoblotting, inhibition, shrimp.*

INTRODUÇÃO

A alergia alimentar a marisco é relativamente frequente em países em que o seu consumo é elevado, particularmente nas zonas costeiras. Neste grupo, não taxonómico, estão incluídos os moluscos e artrópodes da classe dos crustáceos. O *Philum Mollusca* inclui cefalópodes como a lula e o polvo, bivalves como amêijoa e mexilhão ou gastrópodes como o caracol. O camarão, a lagosta, a gamba e o caranguejo são exemplos de crustáceos[1]. Estes animais possuem proteínas altamente preservadas ao longo da evolução, as tropomiosinas, que desempenham um papel fundamental na contracção muscular[1,2]. Três diferentes equipas de investigadores identificaram o alergénio *major* do camarão como sendo uma tropomiosina[3-5]. Estudos posteriores demonstraram que a tropomiosina é também o alergénio *major* de outros crustáceos, como a lagosta e o caranguejo[6,7]. Tropomiosinas alergénicas foram identificadas em moluscos e também em insectos, como a barata, ou aracnídeos, como os ácaros[8-10]. Com um peso molecular aproximado de 32-41 KDa, estas proteínas apresentam uma grande homologia na sequência de aminoácidos, representando panalergénios responsáveis por reactividade cruzada entre crustáceos, insectos, ácaros, nemátodos e moluscos[1,2,9,11,12]. As tropomiosinas encontram-se, assim, envolvidas não só em síndromes de reactividade cruzada entre alergénios alimentares mas, também, em síndromes de reactividade cruzada entre aeroalergénios e alergénios alimentares[11-14].

A presença de tropomiosinas em diversos aeroalergénios comuns é um facto que sugere a possibilidade de sensibilização primária por via inalatória. Em conformidade, estudos epidemiológicos demonstraram uma elevada frequência de sensibilização prévia a ácaros em doentes com alergia alimentar a crustáceos ou moluscos[13,15]. Um estudo curioso, realizado numa população de judeus ortodoxos que mantinha uma dieta em que se proibia a ingestão de marisco, demonstrou a existência de sensibilização a extracto de camarão em doentes com rinite alérgica perene sensibilizados a ácaros e/ou barata[16]. A possibilidade de indução de

INTRODUCTION

Food allergy to shellfish is relatively frequent in countries with high shellfish consumption, particularly in the coastal areas. This non-taxonomic group encompasses Mollusca and Crustacea - class Arthropoda. The *phylum Mollusca* includes squids, octopus, clams or mussels and Gastropoda as the snail. Crustacea include shrimp, lobster, prawn and crab[1]. These animals have tropomyosins, proteins which have been highly preserved throughout the evolutionary process and play a vital role in muscular contraction[1,2]. Three separate teams of researchers have identified tropomyosin as the *major* allergen in shrimp[3-5]. Subsequent studies showed that tropomyosin is also the major allergen of other crustaceans, such as lobster and crab[6,7]. Allergenic tropomyosins have been identified in molluscs and insects such as cockroach and in arachnids as the house-dust-mite[8-10]. These protein bands have an approximate MW of 32-41 KDa, and a homologous amino-acid sequence, representing pan-allergens responsible for cross reactivity among crustaceans, insects, house-dust-mites (HDM), nematodes and molluscs[1,2,9,11,12]. Thus, tropomyosins play a part in cross reactivity syndromes between both food allergens and between aeroallergens and food allergens[11-14].

The presence of tropomyosins in several common aeroallergens suggests a possible primary sensitisation via the inhalant route. Epidemiological studies have demonstrated a high frequency of underlying sensitisation to HDM in patients with food allergy to crustaceans or molluscs[13,15]. An interesting study undertaken in an Orthodox Jewish population (in whom ingestion of shellfish is forbidden) showed sensitisation to shrimp extract in patients with year-round allergic rhinitis sensitised to HDM and/or cockroaches[16]. Several authors have addressed the possibility of inducing food allergy via cross-reactive allergens, present in HDM extracts for specific

alergia alimentar por alergénios de reactividade cruzada, presentes em extractos para imunoterapia a ácaros, foi discutida por vários autores[17,18]. Para além da sensibilização por reactividade cruzada na alergia alimentar a marisco, admite-se, ainda, a possibilidade de uma sensibilização por via digestiva, já que as tropomiosinas são alergénios estáveis e resistentes à acção de temperaturas elevadas e de enzimas[2]. Estes dois mecanismos de sensibilização, para além de não exclusivos, poderão mesmo potenciar-se.

As manifestações clínicas de alergia a marisco são diversas, incluindo síndrome de alergia oral, urticária e angioedema, sintomas gastrintestinais e reacções anafilácticas. A exposição aos vapores de cozedura destes animais pode, também, determinar manifestações de urticária, angioedema e sintomatologia respiratória em indivíduos altamente sensibilizados[11,14,19]. Alergias ocupacionais foram descritas em trabalhadores da indústria alimentar expostos a proteínas de mariscos, através das vias respiratória e cutânea[19,20]. É importante salientar que, nos indivíduos mais sensíveis, o simples contacto com os alergénios poderá desencadear uma reacção. Foi descrito nos EUA o caso de uma reacção anafiláctica desencadeada numa jovem, imediatamente após ter beijado o namorado, que tinha comido camarão momentos antes. Esta jovem apresentava antecedentes de múltiplas reacções de urticária no contacto com pratos de camarão ou lagosta e, apesar de acautelar o contacto com estes crustáceos, não foi capaz de evitar uma reacção grave[21].

As reacções a crustáceos são mais frequentes do que as reacções a moluscos[11,13,19]. Na alergia alimentar aos crustáceos, a homologia entre as tropomiosinas é tão elevada que, para os alérgicos a uma determinada espécie de crustáceos, o risco de reacção a uma segunda espécie é de aproximadamente 75%[11,13].

Com este trabalho pretendemos investigar padrões clínicos em doentes com hipersensibilidade a camarão, observados consecutivamente numa consulta de alergia alimentar, caracterizar as principais proteínas envolvidas nesta hipersensibilidade e avaliar a ocorrência de reactividade cruzada a *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp).

immunotherapy[17,18]. In addition to the possibility of aeroallergens inducing a cross-reactive sensitisation to food allergens in patients allergic to shellfish, there is also the possibility of sensitisation via the digestive route, since tropomyosins are stable allergens, that are resistant to high temperature and enzyme action[2]. These two sensitisation mechanisms are not mutually exclusive and may even potentiate each other.

There is a wide range of clinical manifestations of shellfish allergy. They include oral allergy syndrome, urticaria and angioedema, gastrointestinal symptoms and anaphylactic reactions. Exposure to the steam emanating from cooking shellfish can also trigger urticaria, angioedema and respiratory symptoms in highly sensitised individuals[11,14,19]. Occupational allergies have been described in food industry workers exposed to shellfish proteins via the respiratory and cutaneous routes[19,20]. It is worth highlighting that even the simplest contact with the allergens can trigger a reaction in highly sensitised individuals. There was a case of a young woman in the USA who had an anaphylactic reaction immediately after she kissed her boyfriend. The boyfriend had eaten several shrimps just before the kiss. The woman had a clinical history of multiple urticarial reactions after touching shrimp and lobster dishes and although she was careful not to touch shrimp and lobster, she still experienced a severe reaction[21].

Reactions to crustaceans are more common than reactions to molluscs[11,13,19]. The homology between the tropomyosins is so high in crustacean allergies that those allergic to a specific species of Crustacea are at an approximately 75% risk of a cross-reaction to a second species[11,13].

The aims of this study were to investigate clinical patterns in patients with shrimp hypersensitivity seen consecutively in a food allergy clinic, to characterise the major proteins involved in this hypersensitivity and to investigate any cross-reactivity to *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dp*).

DOENTES E MÉTODOS

Incluíram-se num estudo prospectivo 20 doentes, com clínica de hipersensibilidade imediata após a ingestão de camarão, observados consecutivamente em consulta de alergia alimentar, num período de 2 anos. Após consentimento informado, os doentes responderam a um questionário estandardizado e foram submetidos a testes *in vivo* e *in vitro*.

Na colheita da história clínica valorizaram-se, particularmente, as primeiras manifestações de hipersensibilidade a camarão, sintomas após ingestão de outros alimentos e alergias relacionadas com sensibilização a aeroalergénios. Na descrição das reacções alimentares foram avaliados, com detalhe, o número de episódios, o tempo decorrido entre a ingestão e a ocorrência dos sintomas, a quantidade de alimento ingerida e o tratamento efectuado, nomeadamente a necessidade de recurso a tratamento de emergência.

Foram efectuados testes cutâneos por *prick* a extractos comerciais de alimentos (crustáceos, moluscos e outros, em função da história clínica) e de aeroalergénios (bateria GA2LEN) ALK-Abelló®. Como controlo positivo foi utilizado cloridrato de histamina (10 mg/ml) e, como controlo negativo, uma solução glicerosalina. As picadas foram realizadas na face anterior do antebraço, de acordo com metodologia recomendada, respeitando uma distância mínima de 2 cm entre cada extracto alergénico[22]. Utilizaram-se lancetas metálicas tipo Morrow-Brown (Prick Lancetter®, Hollister Stier Laboratories) e procedeu-se à leitura dos resultados aos 15 minutos, avaliando-se os diâmetros médios das pápulas. Consideraram-se positivos os testes correspondentes às pápulas com diâmetro médio igual ou superior em 3 mm ao controlo negativo[23]. Nos casos de elevada suspeição clínica e teste *prick* negativo com extractos comerciais, efectuou-se também teste *prick* com o alimento em natureza.

Procedeu-se à determinação de IgE específica a camarão e Dp por *UniCap* (Phadia®) e *Immunoblotting* (DPC Amerlab-Siemens Diagnostics®). A existência de eventual reactividade cruzada imunológica entre camarão e Dp foi investigada por estudos de inibição de *immunoblotting*.

PATIENTS AND METHODS

This prospective study had a population of twenty patients with shrimp hypersensitivity consecutively observed in a food allergy clinic over a two-year period. Patients gave their informed consent before answering a standardised questionnaire and undergoing *in vivo* and *in vitro* tests.

Patients' case history included details of the first manifestations of shrimp hypersensitivity, symptoms following ingestion of other foods and allergies related to aeroallergen sensitisation. Special attention was paid to the number of episodes, time elapsing between ingestion and onset of symptoms, amount of food ingested and treatment prescribed, particularly if the patient had needed Emergency Room services.

Skin prick tests (SPT) to commercial food extracts (crustaceans, molluscs and others, depending on the history) and to aeroallergens (GA2LEN battery, ALK-Abelló®) were performed. Histamine hydrochloride (10 mg/ml) was used as a positive control and glycerosaline solution as a negative. The pricks were made on the inner forearm according to the recommended guidelines, with a minimum 2 cm gap between each allergenic extract[22]. We used metallic Morrow-Brown (Prick Lancetter®, Hollister Stier Laboratories) lancets and read the results after 15 minutes by measuring the mean wheal diameters. Tests with mean wheal diameters equal to or larger by 3mm than the negative control were taken as positive[23]. Prick-prick skin tests with fresh foods were also performed when there was a high degree of suspicion and the SPT to commercial extracts were negative.

Serum specific IgE and immunoblotting assays to shrimp and *Dp* were performed using UniCap (Phadia®) and immunoblotting (DPC Amerlab-Siemens Diagnostics®). The possible cross-reactivity between shrimp and *Dp* was investigated using immunoblotting inhibition assays.

RESULTADOS

Na população estudada, constituída maioritariamente por adultos, os doentes apresentavam idades compreendidas entre os 6 e os 67 anos, sendo a média de idades de 33±16 anos. Sete doentes eram do sexo feminino e 13 do sexo masculino. No Quadro 1 registam-se os dados demográficos, as manifestações clínicas descritas após a ingestão de camarão e a existência de alergias relacionadas com aeroalergénios. Os resultados dos testes cutâneos a alimentos e aeroalergénio assim como dos doseamentos de IgE específica a camarão e Dp, são também indicados. A apresentação clínica mais frequente foi a síndrome de alergia oral (SAO) que ocorreu em 9 doentes: de forma isolada em 4 doentes ou associada a sintomatologia de rinoconjuntivite e angioedema da face em 5 doentes. A urticária e/ou angioedema generalizados foram as manifestações clínicas referidas por 8 doentes. Todos os doentes com clínica de urticária e/ou angioedema generalizados descreviam recurso a serviço de urgência hospitalar, em um ou mais episódios, com necessidade de administração de terapêutica parentérica. O doente 3, para além de urticária, referia, também, a ocorrência de rinoconjuntivite com a ingestão de camarão ou outros crustáceos e moluscos. Finalmente, 3 doentes descreviam reacções de anafilaxia grave com necessidade de administração de terapêutica de emergência, nomeadamente adrenalina. Estas doentes apresentavam as determinações mais elevadas de IgE específica a camarão (Quadro 1). Todos os doentes com manifestações clínicas de hipersensibilidade a camarão referiam sintomatologia semelhante após ingestão de outros crustáceos e também com moluscos em 12 doentes. A sensibilização a esses alimentos foi demonstrada pela positividade dos testes cutâneos (Quadro 1). Os doentes 6, 8 e 9, apesar de se encontrarem sensibilizados a moluscos, toleravam a sua ingestão. O doente 17 apresentava, ainda, antecedentes de SAO, urticária generalizada e dispneia sibilante após a ingestão de ovo, mantendo evicção a este alimento desde o primeiro ano de vida.

A realização de testes cutâneos a aeroalergénios demonstrou sensibilização em todos os doentes incluídos no estudo, sendo que a totalidade se encontrava sensibilizada a *Dermato-*

RESULTS

The mean age of the patients in our study population was 33±16 years, ranging from 6-67 years; seven patients were female, 13 were male. Table 1 shows the demographic profile, clinical manifestations described following shrimp ingestion, any aeroallergen related allergies and the results of the skin tests to foods and aeroallergens and serum specific IgE to shrimp and *Dp*.

Oral allergy syndrome (OAS) was the most common clinical presentation, occurring in nine patients: four in isolation and five associated to rhinoconjunctivitis and facial angioedema. Generalized urticaria and/ /or angioedema occurred in eight patients. All patients with generalized urticaria and/or angioedema had had prior recourse to Emergency Services during one or more previous episodes requiring parenteral therapy. Patient 3 had urticaria and rhinoconjunctivitis following ingestion of shrimp or other crustaceans or molluscs.

Three patients described severe anaphylactic reactions requiring emergency treatment, namely adrenaline. These patients had the highest values of shrimp specific IgE (Table 1). All patients with clinical shrimp hypersensitivity cited similar symptoms following ingestion of other crustaceans and also after molluscs (12 patients). Sensitisation to these foods was demonstrated by positive SPT (Table 1). Patients 6, 8 and 9 were sensitised to molluscs but tolerated their ingestion. Patient 17 presented OAS, generalized urticaria, wheezing and dyspnoea following ingestion of egg and has avoided egg intake since the age of one.

Skin tests to aeroallergens were positive in all patients in our population, with the total patient cohort sensitised to *Dp* and *Dermatophagoides farinae* (*Df*). Twelve patients were sensitised to cockroach, 13 to pollens and five to dog and cat dander (Table 1). Seventeen patients presented respiratory allergy

Quadro 1. População de doentes com hipersensibilidade a camarão

Doentes	Sexo	Idade	Manifestações clínicas (hipersensibilidade a camarão)	Alergias relacionadas com aeroalergénios	*Prick* teste (pápula em mm) AIK-Abelló®		IgE específica (KU/L) Unicap Phadia®	
					Alimentos	Aeroalergénios	Camarão	Dp
1	F	18	U	A	Camarão-4; gamba-4; caranguejo-4; lula-4;	Dp-8; Df-8; barata-6	1,8 (cl 2)	>100 (cl 6)
2	M	18	U+AE	A	Camarão-5; gamba-5; caranguejo-5; lula-4	Dp-11; Df-11; oliveira-4	3,2 (cl 2)	>100 (cl 6)
3	M	23	U+RC	A+R	Camarão-10; gamba-8; caranguejo-5; amêijoa-7; ostra-5; mexilhão-5	Dp-10; Df-8; barata-6; cão-4; gato-4; parietária-5	9,3 (cl 3)	46,3 (cl 4)
4	M	17	U+AE	E+A+RC	Camarão-8; gamba-6; lagosta-7; amêijoa-4	Dp-10; Df-7; gramíneas-5	29,3 (cl 4)	69,2 (cl 5)
5	F	21	U	Não	Camarão-12; gamba-11; caranguejo-12; amêijoa-6; ostra-4; lula-7;	Dp-6; Df-6; barata-4; gramíneas-5	1,3 (cl 2)	2,1 (cl 2)
6	M	58	U+AE	Não	Camarão-6; gamba-6; lagosta-6; amêijoa-5; ostra-4; lula-5	Dp-4; Df-3; barata-3; gramíneas-3	4,7 (cl 3)	2,6 (cl 2)
7	M	27	U+AE	R	Camarão-7; gamba-6; lagosta-6; caranguejo-7	Dp-10; Df-4; gramíneas-4	4,4 (cl 3)	93,9 (cl 5)
8	M	57	U+AE	Não	Camarão pp-5; gamba pp-4; amêijoa-3	Dp-7; Df-3	2,3 (cl 2)	1,5 (cl 2)
9	M	67	SAO+RC+AE	RC	Camarão-20; gamba-10; lagosta-8; mexilhão-6; amêijoa-4; ostra-5	Dp-5; Df-6; barata-7; parietária-7	2,3 (cl 2)	0,7 (cl 1)
10	M	41	SAO+RC+AE	A	Camarão-7; gamba-10; caranguejo-6; lula-7	Dp-4; Df-6; parietária -10	1,3 (cl 2)	0,7 (cl 2)
11	F	19	SAO	RC	Camarão-5; gamba-3; caranguejo-5;	Dp-12; Df-8; barata-7	2,6 (cl 2)	>100 (cl 6)
12	M	41	SAO+RC+AE	RC	Camarão-8; gamba-6; lagosta-5	Dp-12; Df-8; barata-7; gramíneas-8	2,2 (cl 2)	13,3 (cl 3)
13	M	36	SAO	A+R	Camarão-4; gamba-5; caranguejo-4	Dp-7; Df-7; cão-4; gramíneas-4	29,2 (cl 4)	19,7 (cl 4)
14	F	50	SAO+RC+AE	R	Camarão-6; gamba-6; caranguejo-6; amêijoa-5; ostra-5; lula-6	Dp-6; Df-6; barata-4 gramíneas-5	27,7 (cl 4)	23,3 (cl 4)
15	M	17	SAO+RC+AE	A+R	Camarão-5; gamba-5; caranguejo-4; amêijoa-7; ostra-5;	Dp-5; Df-9; barata-4	20,4 (cl 4)	6,2 (cl 3)
16	M	29	SAO	A+R	Camarão-12; gamba-7; caranguejo-14; amêijoa-7; lula-7;	Dp-5; Df-12; barata-8; gato-6; cão-3	13,3 (cl 3)	20,3 (cl 4)
17	M	6	SAO	A	Camarão-5; caranguejo-4; ovo-4	Dp-3; Df-5; gato-6; cão-5;	10,0 (cl 3)	71,2 (cl 5)
18	F	32	ANA	RC	Camarão-7; gamba-10; caranguejo-7; lula-5; amêijoa-5	Dp-8; Df-8; gramíneas-8; barata-4	57,9 (cl 5)	42,2 (cl 4)
19	F	45	ANA	A	Camarão-15; gamba-12; caranguejo-10; amêijoa-5	Dp-4; Df-4; gato-4	>100 (cl 6)	41,6 (cl 4)
20	F	20	ANA	E+A+R	Camarão-15; gamba-7; caranguejo-11; amêijoa-5; ostra-4; lula-15	Dp-16; Df-16; barata-6; gato-12; cão-6; gramíneas-10	81,1 (cl 5)	70,1 (cl 5)

Dados demográficos, caracterização clínica e resultados dos testes cutâneos a alimentos e aeroalergénios. Resultados dos doseamentos de IgE específica a camarão e *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp)
U – urticária; **AE** – angioedema; **RC** – rinoconjuntivite; **SAO** – síndrome de alergia oral; **ANA** – anafilaxia; **A** – asma brônquica; **R** – rinite; **E** – eczema atópico; ***pp*** – *prick-prick;* ***Df*** – *Dermatophagoides farinae;* **cl** – classe de IgE específica

Table 1. *Patient population with hypersensitivity to shrimp*

Patients	Sex	Age	Clinical manifestations (hypersensitivity to shrimp)	Aeroallergen-related allergies	Skin-prick-test (wheal mm) AIK-Abelló®		Specific IgE (KU/L) Unicap Phadia®	
					Foodstuffs	Aeroallergens	Shrimp	Dp
1	F	18	U	A	Shrimp-4; prawn-4; crab-4; squid-4;	Dp-8; Df-8; cockroach-6	1.8 (cl 2)	>100 (cl 6)
2	M	18	U+AO	A	Shrimp-5; prawn-5; crab-5; squid-4	Dp-11; Df-11; olive tree-4	3.2 (cl 2)	>100 (cl 6)
3	M	23	U+RC	A+R	Shrimp-10; prawn-8; crab-5; clam-7; oyster-5; mussel-5	Dp-10; Df-8; cockroach-6; dog-4; cat-4; pellitory-5	9.3 (cl 3)	46.3 (cl 4)
4	M	17	U+AO	E+A+RC	Shrimp-8; prawn-6; lobster-7; clam-4	Dp-10; Df-7; pollens-5	29.3 (cl 4)	69.2 (cl 5)
5	F	21	U	No	Shrimp-12; prawn-11; crab-12; clam-6; oyster-4; squid-7;	Dp-6; Df-6; cockroach-4; pollens-5	1.3 (cl 2)	2.1 (cl 2)
6	M	58	U+AO	No	Shrimp-6; prawn-6; lobster-6; clam-5; oyster-4; squid-5	Dp-4; Df-3; cockroach-3; pollens-3	4.7 (cl 3)	2.6 (cl 2)
7	M	27	U+AO	R	Shrimp-7; prawn-6; lobster-6; crab-7	Dp-10; Df-4; pollens-4	4.4 (cl 3)	93.9 (cl 5)
8	M	57	U+AO	No	Shrimp pp-5; prawn pp-4; clam-3	Dp-7; Df-3	2.3 (cl 2)	1.5 (cl 2)
9	M	67	OAS+RC+AO	RC	Shrimp-20; prawn-10; lobster-8; mussel-6; clam-4; oyster-5	Dp-5; Df-6; cockroach-7; pellitory-7	2.3 (cl 2)	0.7 (cl 1)
10	M	41	OAS+RC+AO	A	Shrimp-7; prawn-10; crab-6; squid-7	Dp-4; Df-6; pellitory-10	1.3 (cl 2)	0.7 (cl 2)
11	F	19	OAS	RC	Shrimp-5; prawn-3; crab-5;	Dp-12; Df-8; cockroach-7	2.6 (cl 2)	>100 (cl 6)
12	M	41	OAS+RC+AO	RC	Shrimp-8; prawn-6; lobster-5	Dp-12; Df-8; cockroach-7; pollens-8	2.2 (cl 2)	13.3 (cl 3)
13	M	36	OAS	A+R	Shrimp-4; prawn-5; crab-4	Dp-7; Df-7; dog-4; pollens-4	29.2 (cl 4)	19.7 (cl 4)
14	F	50	OAS+RC+AO	R	Shrimp-6; prawn-6; crab-6; clam-5; oyster-5; squid-6	Dp-6; Df-6; cockroach-4 pollens-5	27.7 (cl 4)	23.3 (cl 4)
15	M	17	OAS+RC+AO	A+R	Shrimp-5; prawn-5; crab-4; clam-7; oyster-5;	Dp-5; Df-9; cockroach-4	20.4 (cl 4)	6.2 (cl 3)
16	M	29	OAS	A+R	Shrimp-12; prawn-7; crab-14; clam-7; squid-7;	Dp-5; Df-12; cockroach-8; cat-6; dog-3	13.3 (cl 3)	20.3 (cl 4)
17	M	6	OAS	A	Shrimp-5; crab-4; egg-4	Dp-3; Df-5; cat-6; dog-5;	10.0 (cl 3)	71.2 (cl 5)
18	F	32	ANA	RC	Shrimp-7; prawn-10; crab-7; squid-5; clam-5	Dp-8; Df-8; pollens-8; cockroach-4	57.9 (cl 5)	42.2 (cl 4)
19	F	45	ANA	A	Shrimp-15; prawn-12; crab-10; clam-5	Dp-4; Df-4; cat-4	>100 (cl 6)	41.6 (cl 4)
20	F	20	ANA	E+A+R	Shrimp-15; prawn-7; crab-11; clam-5; oyster-4; squid-15	Dp-16; Df-16; cockroach-6; cat-12; dog-6; pollens-10	81.1 (cl 5)	70.1 (cl 5)

Demographic data, clinical characterisation and results of the skin test to foodstuffs and aeroallergens. Serum specific IgE to shrimp and Dermatophagoides pteronyssinus (Dp) *results*
U *– urticaria;* ***AO*** *– angiooedema;* ***RC*** *– rhinoconjunctivitis;* ***OAS*** *– oral allergy syndrome;* ***ANA*** *– anaphylaxis;* ***A*** *– bronchial asthma;* ***R*** *– rhinitis;* ***E*** *– allergic eczema;* ***pp*** *– prick-prick;* **Df** – Dermatophagoides farinae*;* ***cl*** *– specific IgE class*

phagoides pteronyssinus (Dp) e a *Dermatophagoides farinae* (Df). Sensibilização associada a barata foi detectada em 12 doentes, a pólenes em 13, a cão em 5 e a gato em 5 (Quadro 1). Dezassete doentes apresentavam clínica de alergia respiratória relacionada com a exposição a aeroalergénios: asma em 11 doentes e rinite e/ou rinoconjuntivite em 12. Apesar de se encontrarem sensibilizados a aeroalergénios, os doentes 5, 6 e 8 negavam qualquer tipo de manifestações sugestivas de alergia respiratória (Quadro 1). Em 15 doentes o início das manifestações respiratórias precedeu o início dos sintomas alimentares (Figura 1). O doente 9 iniciou sintomatologia de rinoconjuntivite persistente ligeira, tardiamente, aos 60 anos, e a doente 18 referia sintomas de rinoconjuntivite persistente moderada a grave desde os 14 anos, idade em que descrevia, também, a primeira manifestação de anafilaxia ao camarão.

Nos estudos de *immunoblotting* a camarão encontrámos, na população estudada, quatro padrões de reactividade que se apresentam na Figura 2. Na maioria dos doentes observou-se uma maior intensidade de ligação a bandas com peso molecular de 35-40 KDa, tal como se representa no *immunoblotting* efectuado no doente 13. Em 3 doentes, a maior inten-

on exposure to aeroallergens: 11 had asthma and 12 rhinitis and/or rhinoconjunctivitis. Although patients 5, 6 and 8 were sensitised to aeroallergens, they denied any manifestations suggesting respiratory allergy (Table 1). Respiratory manifestations preceded food allergy symptoms in 15 patients (Figure 1). Patient 9 had had late-onset mild persistent rhinoconjunctivitis symptoms, at the age of 60, and patient 18 had moderate to severe persistent rhinoconjunctivitis symptoms since the age of 14, the age at which the patient also had the first manifestation of anaphylaxis to shrimp.

Immunoblotting assays to shrimp showed four reactivity patterns (Figure 2). The majority of patients had IgE-binding bands occurring predominantly at 35-40 KDa, as immunoblotting assay showed in patient 13. In three patients, IgE-binding bands occurred predominantly at 43-50 KDa, as in patient 11's assay. In patients 1 and 18, we identified only one IgE-binding band, with an approximate MW of 17 KDa. Finally, IgE binding occurred predominantly to a 22 KDa band in patient 12.

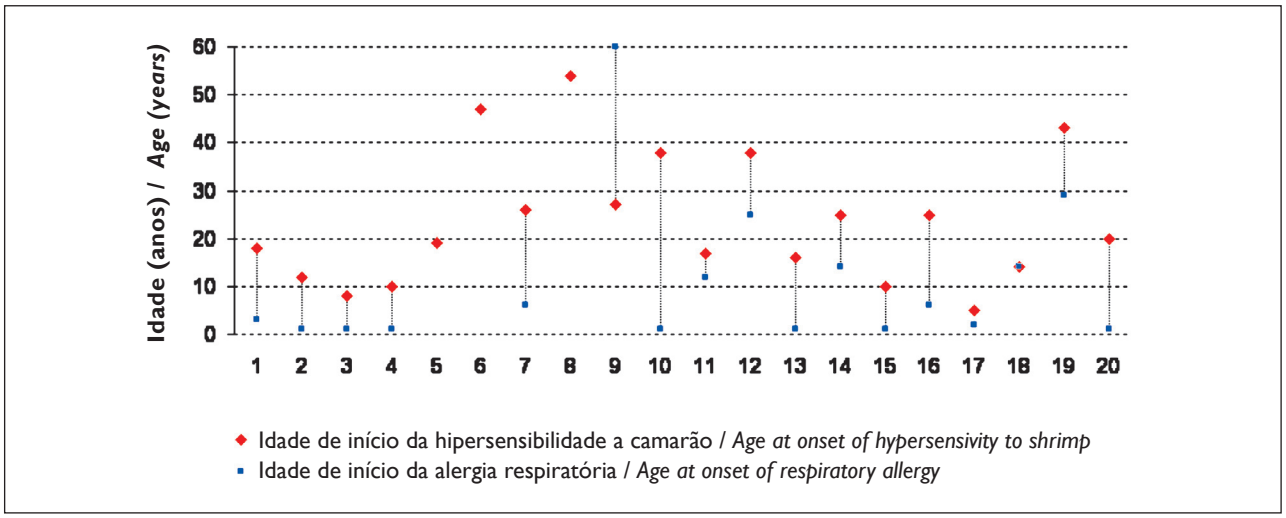

Figura 1. Gráfico representativo, para cada doente, da idade de início de hipersensibilidade a camarão e da idade de início das manifestações de alergia respiratória relacionadas com a exposição a aeroalergénios

Figure 1. *Graph showing age at onset of hypersensitivity to shrimp and age at onset of manifestations of respiratory allergy related to exposure to aeroallergens for each patient*

sidade de ligação ocorreu para bandas com peso molecular entre 43 e 50 KDa, tal como acontece na doente 11. Nas doentes 1 e 18 identificámos apenas uma banda no *immunoblotting* a camarão, com peso molecular aproximado de 17KDa. Finalmente, no doente 12 observou-se uma maior intensidade de ligação a uma banda com peso molecular de 22 KDa.

Immunoblotting inhibition assays were performed to show any immunological cross-reactivity between shrimp and *Dp*. Figures 3 to 5 show the cross-reactivity patterns found. Ten patients had the kind of reciprocal cross-reactivity pattern, which is shown for patient 4 in Figure 3. Immunoblotting inhibition assays

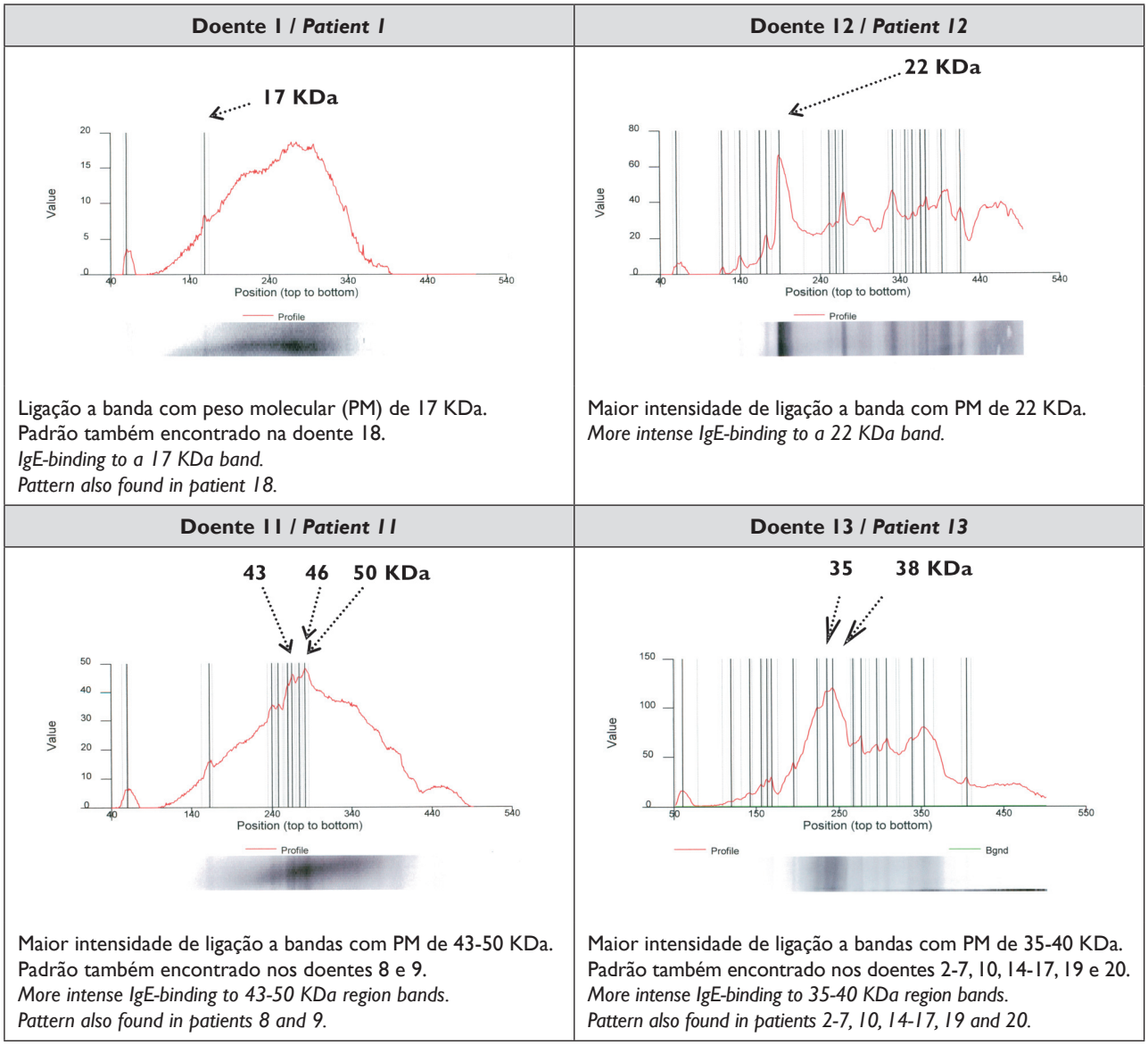

Figura 2. Padrões de reactividade nos estudos de *immunoblotting* a camarão
Figure 2. *Reactivity patterns of immunoblot assays to shrimp*

Efectuaram-se estudos de inibição de *immunoblotting* para investigar a eventual existência de reactividade cruzada imunológica entre camarão e Dp. Nas figuras 3 a 5 apresentam-se os resultados dos padrões de reactividade cruzada encontrados. Em 10 doentes encontrámos um padrão de reactividade cruzada recíproca, tal como se indica para o doente 4, na Figura 3. Assim, quando inibimos o *immunoblotting* a camarão com extracto de Dp observamos uma redução marcada da intensidade das bandas com peso molecular aproximado de 38 e 42KDa. Por outro lado, quando inibimos o *immunoblotting* a Dp com extracto de camarão registamos um desaparecimento total da banda com peso molecular de 32 KDa. Reactividade cruzada

to shrimp with *Dp* extract showed less binding to bands with approximate MW of 38 and 42KDa, while immunoblotting inhibition assays to *Dp* with shrimp extract showed total absence of binding to a 32 KDa band. Patients 1, 6 and 11 had non-reciprocal cross-reactivity in which extract of *Dp* inhibited immunoblotting to shrimp, but extract of shrimp did not inhibit immunoblotting to *Dp* (Figure 4). Finally, patients 13 and 16 presented a non-reciprocal cross-reactivity pattern in which the extract of *Dp* did not inhibit immunoblotting to shrimp. Immunoblotting inhibition assays to *Dp* with extract of shrimp showed total ab-

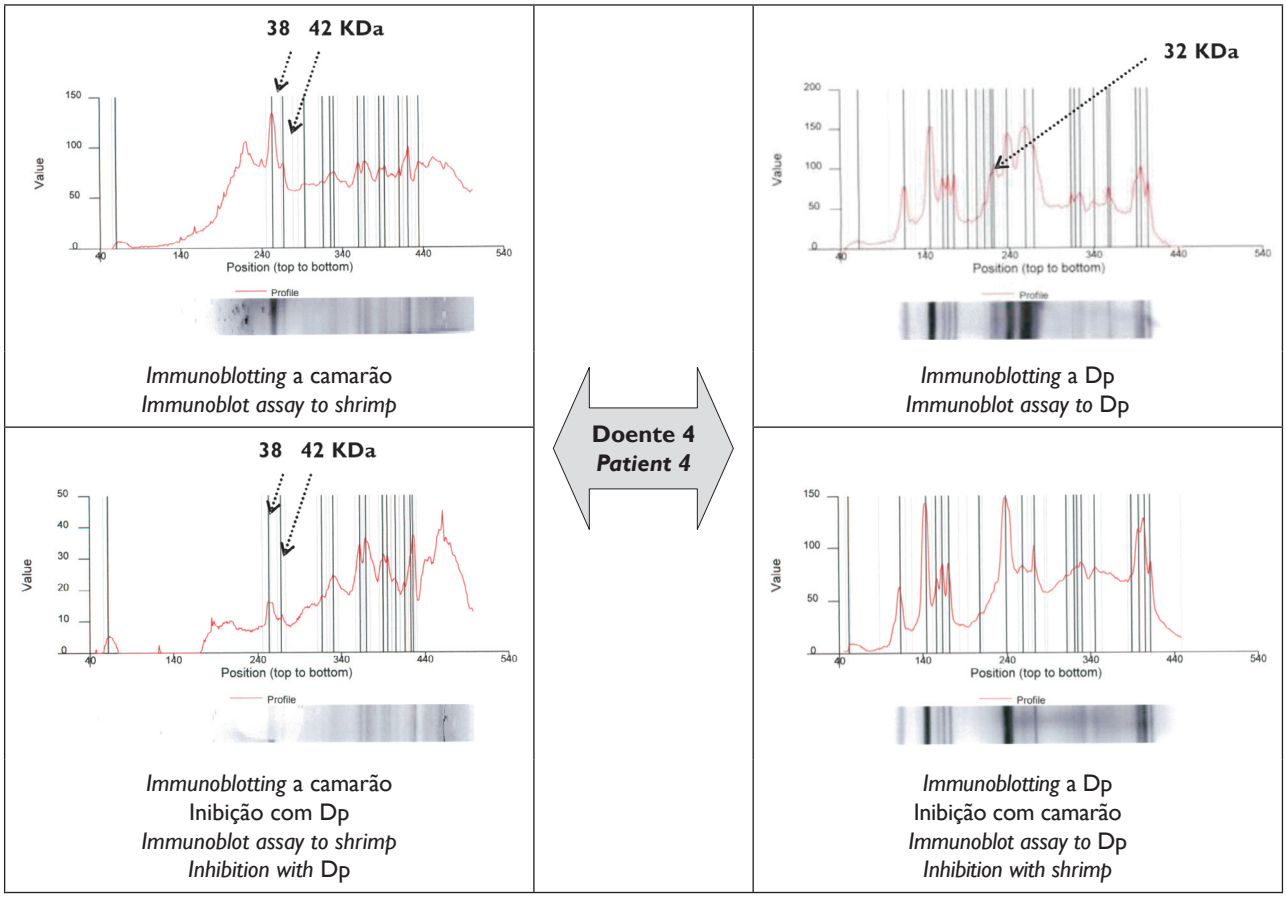

Figura 3. Reactividade cruzada recíproca camarão-Dp em estudos de inibição de *immunoblotting*. Este padrão foi também encontrado nos doentes 2, 3, 5, 10, 14, 17, 18, 19, 20. **Dp** – *Dermatophagoides pteronyssinus*

Figure 3. *Reciprocal shrimp-*Dp *cross-reactivity in immunoblotting inhibition assays. This pattern was also seen in patients 2,3,5,10,14,17,18,19 and 20.* **Dp** – *Dermatophagoides pteronyssinus*

não recíproca em que o extracto de Dp inibe o *immunoblotting* a camarão, mas em que o extracto de camarão não inibe o *immunoblotting* a Dp, foi demonstrada nos doentes 1, 6 e 11 (Figura 4). Finalmente, nos doentes 13 e 16 observamos um padrão de reactividade cruzada não recíproca em que o extracto de Dp não inibe o *immunoblotting* a camarão. Quando efectuamos o *immunoblotting* a Dp inibido com o extracto de camarão, observamos desaparecimento total de banda com peso molecular aproximado de 32 KDa, tal como se exemplifica para o doente 16, na Figura 5. Nos doentes 7, 8, 9, 12 e 15 não foi possível demonstrar a existência de reactividade cruzada, já que nos estudos de inibição de *immunoblotting* o extracto de Dp não inibiu o *immunoblotting* a camarão, e vice-versa.

sence of binding to a 32 KDa band, as illustrated in Figure 5.

We could not demonstrate the existence of cross-reactivity in patients 7, 8, 9, 12 and 15 since in the immunoblotting inhibition assays the *Dp* extract did not inhibit immunoblotting to shrimp and *vice-versa*.

DISCUSSION

The studied sample consisted of twenty, mostly adult, consecutive patients with immediate hypersensitivity after ingestion of shrimp, seen in a food allergy clinic. Our results

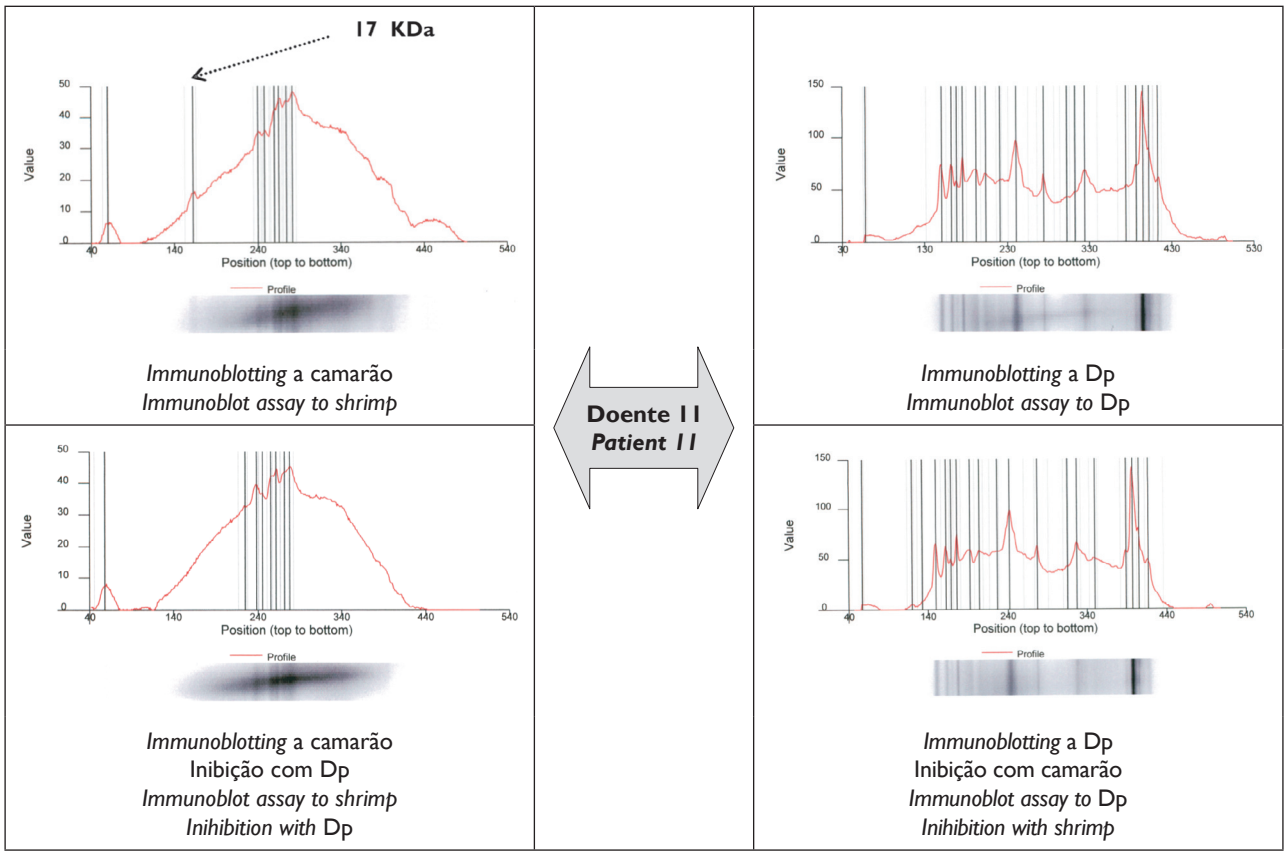

Figura 4. Reactividade cruzada não recíproca em estudos de inibição de immunoblotting. O extracto de camarão não inibe o *immunoblotting* a Dp. Este padrão foi também encontrado nos doentes 1 e 6

Figure 4. *Non reciprocal cross-reactivity in immunoblotting inhibition assays. Shrimp extract did not cross-react with* Dp. *This pattern was also seen in patients 1 and 6*

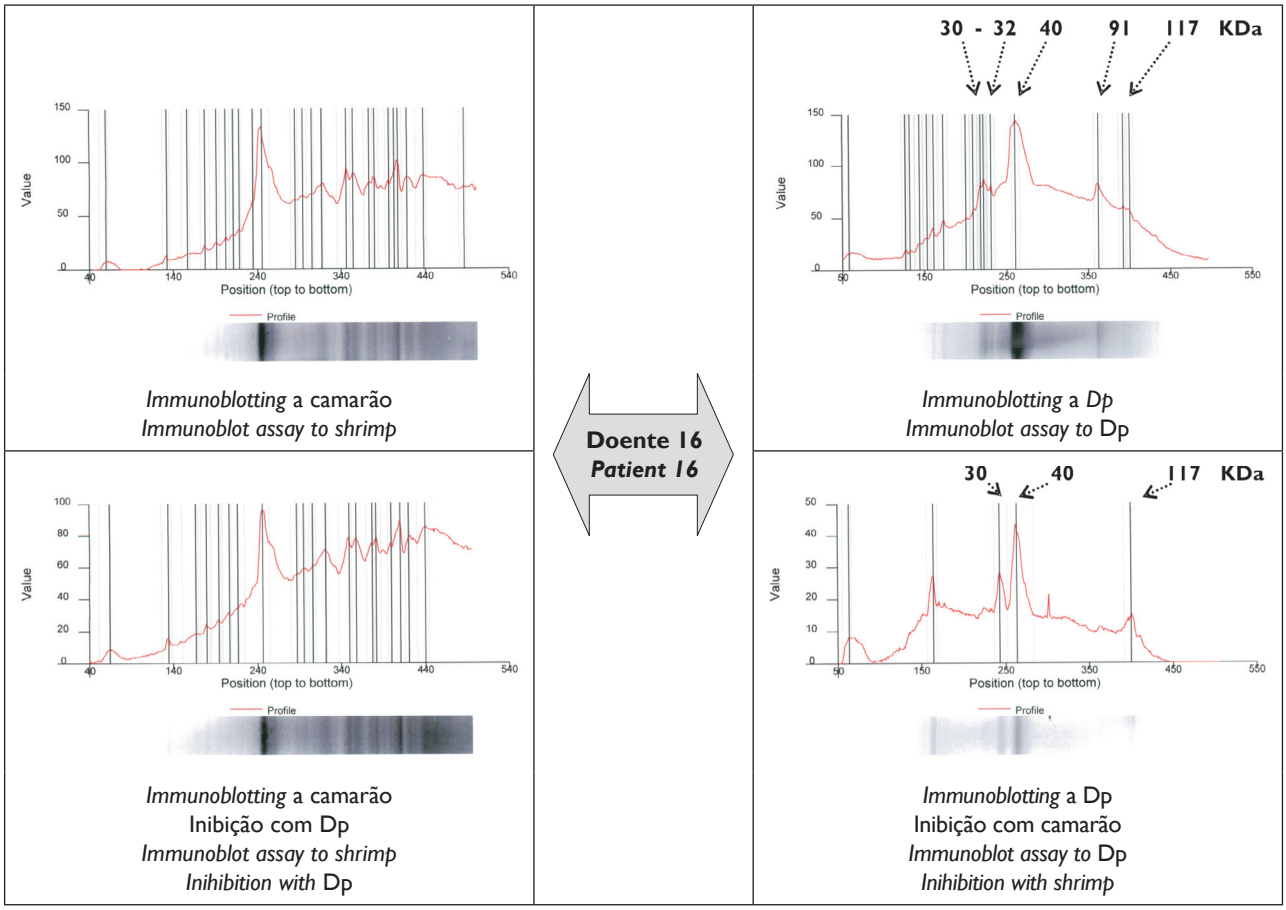

Figura 5. Reactividade cruzada não recíproca em estudos de inibição de *immunoblotting*. O extracto de Dp não inibe o *immunoblotting* a camarão. Este padrão foi também encontrado no doente 13

Figure 5. *Non-reciprocal cross-reactivity in immunoblotting inhibition assays.* Dp *extracts did not cross-react with shrimp. This pattern was also seen in patient 13*

DISCUSSÃO

A amostra estudada, constituída por doentes observados, consecutivamente, em consulta de alergia alimentar com clínica de hipersensibilidade imediata após ingestão de camarão, era composta maioritariamente por adultos. Os nossos resultados estão em concordância com os de outros autores que apontam para uma prevalência mais elevada de sensibilização a crustáceos neste grupo, comparativamente a grupos etários de indivíduos mais jovens[24,25]. Tal como se encontra descrito, encontramos um amplo espectro de manifestações clínicas

agree with those of other authors who present a higher rate of sensitisation to crustaceans in adults than younger people[24,25]. As in other studies, we found a wide range of clinical manifestations ranging from OAS, rhinoconjunctivitis, urticaria and/or angioedema – occurring in a greater number of patients – to more severe cases of anaphylaxis, seen in 3 patients[1,11,14,26].

All patients cited symptoms similar to those described for shrimp following ingestion of other crustacens, with skin test results confirming sensitisation to these foods. The great homology between major Crustacea allergens

que incluíram SAO, rinoconjuntivite, urticária e/ou angioedema, ocorrendo em maior número de doentes, até situações mais graves de anafilaxia, registadas em 3 doentes[1,11,14,26]. Todos os doentes referiam sintomatologia semelhante à descrita para o camarão, após a ingestão de outros crustáceos, tendo os resultados dos testes cutâneos confirmado sensibilização a esses alimentos. A elevada homologia entre os alergénios *major* dos crustáceos poderá explicar estes resultados, tal como já foi demonstrado por diversos grupos de investigadores[1-3,5-7]. Em 12 doentes ocorriam, também, manifestações clínicas de hipersensibilidade imediata com a ingestão de moluscos, para os quais os testes cutâneos demonstraram sensibilização. Reactividade cruzada com significado clínico entre crustáceos e moluscos foi também descrita[13,27]. Embora ainda não estabelecido, o risco de reacção a diversas espécies de moluscos parece ser menor quando comparado com o risco de reactividade entre crustáceos[13,28]. Na população estudada, 3 doentes encontravam-se sensibilizados a moluscos, não referindo qualquer sintomatologia com a sua ingestão. Não está ainda, também, clarificado qual o risco de reacção a moluscos em indivíduos com alergia a crustáceos[13]. Num artigo publicado recentemente, Taylor admite a necessidade de evicção de todos os moluscos nos indivíduos com alergia demonstrada a uma determinada espécie[19]. Neste artigo, defende que, embora pouco frequente, a alergia a moluscos se acompanha de uma extensa reactividade cruzada entre as tropomiosinas identificadas como alergénios *major* nas diversas espécies. Admite, também, a possibilidade de reactividade cruzada com as tropomiosinas de crustáceos, embora o seu significado clínico esteja menos clarificado.

Todos os doentes da população estudada encontravam-se sensibilizados a Dp e a Df. Estes resultados não nos surpreendem, já que existem dados que confirmam a existência de extensa reactividade cruzada entre tropomiosinas de crustáceos e as tropomiosinas Der p 10 e Der f 10 identificadas, respectivamente entre os alergénios de Dp e Df [1,2,10, 29,30]. Contudo, esta sensibilização cruzada nem sempre tem relevância clínica[2,13,16,29]. Apesar de se encontrarem sensibilizados a Dp e a Df, três doentes negavam qualquer tipo de manifestações sugestivas de alergia respiratória. Sensibilização associa-

could explain these results, as has been shown by several research groups[1-3,5-7]. Twelve patients had additional clinical manifestations of hypersensitivity immediately following mollusc ingestion and skin tests showed sensitisation. Cross-reactivity with clinical significance between crustaceans and molluscs has also been described[13,27]. Although it has not been established, the risk of reaction to diverse Mollusca species seems to be smaller than risk of reactivity between crustaceans[13,28]. Three patients in our sample sensitised to molluscs did not present any symptoms on mollusc ingestion. The degree of risk of reaction to molluscs in patients with crustacean allergy has not been established either[13]. In a recently published article, Taylor describes the need for individuals with a proven allergy to a specific species to avoid all molluscs[19]. The article admits that while infrequent, mollusc allergy goes hand-in-hand with extensive cross-reactivity between the tropomyosins identified as major allergens in the various species. It also states that cross-reactivity with crustacean tropomyosins is possible, although the clinical significance of this remains unclear.

All our patients were sensitised to *Dp* and *Df*. These results were not unexpected since existing data confirm extensive cross-reactivity between crustacean tropomyosins and the tropomyosins *Der p10* and *Der f10* in the allergens of *Dp* and *Df*[1,2,10,29,30]. However, this cross-sensitisation does not always have clinical relevance[2,13,16,29]. Although sensitised to *Dp* and *Df,* three patients denied any manifestations suggesting respiratory allergy. Twelve patients had associated cockroach sensitisation. Sensitisation to cockroach is common in patients with respiratory allergy who are sensitised to HDM[31]. On the other hand, tropomyosin allergens have also been identified in different cockroach species, with high homology with *Dp*, *Df* and shrimp tropomyosins[2,9,29,30]. In Brazil, a country in which sensitisation to cockroach has clinical relevance, cockroach tropomyosins have been identified as major allergens with potential clinical cross-reactivity with HDM and shrimp tropomyosins[9].

da a barata foi detectada em 12 doentes. A sensibilização a barata em doentes com alergia respiratória, sensibilizados a ácaros, é comum[31]. Por outro lado, foram também identificadas tropomiosinas alergénicas em diferentes espécies de barata, com elevada homologia com tropomiosinas de Dp, Df e camarão[2,9,29,30]. No Brasil, país em que a sensibilização a barata tem relevância clínica, as tropomiosinas de barata foram identificadas como alergénios *major* com potencial reactividade cruzada clínica com tropomiosinas de ácaros e camarão[9].

Dezassete doentes apresentavam clínica de alergia respiratória relacionada com a exposição a aeroalergénios e, em 15, o início das manifestações respiratórias precedeu o início dos sintomas alimentares. Estes resultados estão em concordância com os de outros autores que reportam uma elevada frequência de sensibilização prévia a ácaros, em doentes com alergia alimentar a crustáceos e moluscos[8,11,13]. Contudo, o processo de sensibilização poderá ocorrer de forma simultânea e não apenas por um mecanismo de reactividade cruzada. Os indivíduos atópicos apresentam, por definição, tendência para desenvolver sensibilização aos diversos alergénios com os quais contactam. Para além de sensibilizados a ácaros e barata, os doentes estudados apresentavam sensibilização a outros aeroalergénios.

A determinação de IgE específica, por estudos de *immunoblotting,* permitiu a identificação do peso molecular das proteínas envolvidas na reactividade a camarão. Na maioria dos doentes observou-se uma maior intensidade de ligação a bandas com peso molecular de 35-40 KDa. A proximidade destes pesos moleculares com o descrito para os alergénios *major* de camarão leva-nos a admitir, com grande probabilidade, estarmos perante uma alergia a tropomiosinas, o que é reforçado pela sensibilização simultânea a alergénios de ácaros, em todos os doentes, e de moluscos e barata na maioria dos doentes[1-5,8,29]. Alergénios com pesos moleculares distintos, variando entre 16 e 166 KDa, foram identificados em espécies de camarão, o que indica que, para além das tropomiosinas, outros alergénios estarão implicados na hipersensibilidade a este crustáceo[2,4,32]. Recentemente, um grupo de investigadores de Tóquio demonstrou uma

Seventeen patients presented respiratory allergy related to exposure to aeroallergens and the onset of respiratory manifestations preceded the onset of food-allergy symptoms in 15 patients. These results agree with those of other authors who report a high rate of previous sensitisation to HDM in patients with food allergy to crustaceans and molluscs[8,11,13]. The sensitisation process can occur simultaneously, however, and not just as mechanism of cross-reactivity. Atopic individuals have, by definition, a tendency to develop sensitisation to the various allergens with which they come into contact. Our patients presented sensitisations to other aeroallergens in addition to sensitisation to HDM and cockroaches.

Immunoblotting assays allowed identification of the molecular weight of the proteins involved in reactivity to shrimp. In the majority of patients a more intense IgE binding to bands with MW of 35-40 KDa was observed. The proximity of these molecular weights with those described for the major allergens of shrimp provide strong indications of allergy to tropomyosins. This is underlined by the simultaneous sensitisation to HDM allergens in all patients and to molluscs and cockroaches in the majority of patients[1-5,8,29]. Allergens with distinct molecular weights varying from 16 to 166 KDa bands were identified in species of shrimps. This indicates that allergens other than tropomyosins are implicated in hypersensitivity to these crustaceans[2,4,32]. A group of Tokyo researchers recently demonstrated a high frequency of IgE-binding to a protein with MW of 16.5 KDa in immunoblot studies of patients with shrimp hypersensitivity[32].

The concept of cross-reactivity is primarily an immunological one. It presupposes the existence of two allergens that are recognised by the same antibody. Clinically, a cross-reaction demands, in the majority of cases, a minimum identity of 70% in the amino-acid sequence, with a highly conformational homology at epitope level [33]. A high level of homology, close to 80%, between shrimp and *Dp* and *Df* tropomyosins has been described[2,29]. Cross-reacti-

elevada frequência na ligação a uma proteína com peso molecular de 16,5 KDa, em estudos de *immunoblotting* de doentes com hipersensibilidade a camarão[32].

O conceito de reactividade cruzada é primariamente imunológico, pressupondo a existência de dois alergénios que são reconhecidos pelo mesmo anticorpo. Clinicamente, uma reacção cruzada exige, na maioria dos casos, uma identidade mínima de 70% na sequência aminoacídica, sendo fundamental uma elevada homologia conformacional a nível de epitopos[33]. Está descrita uma elevada homologia, próxima de 80%, entre tropomiosinas de camarão e Dp e Df[2,29].

O diagnóstico de reactividade cruzada terá de se efectuar, sempre, com o recurso a técnicas laboratoriais. Através de métodos de inibição competitiva, é possível avaliar a capacidade de um alergénio em bloquear ou reduzir a ligação da IgE específica a outro alergénio. A existência de eventual reactividade cruzada imunológica entre camarão e Dp foi investigada por estudos de inibição de *immunoblotting*. Estes evidenciaram reactividade cruzada em 15 doentes: recíproca camarão-Dp em 10 doentes e não recíproca em 5, não sendo possível demonstrar a sua existência nos outros cinco doentes.

A relevância clínica da reactividade cruzada é variável para os diversos grupos de alimentos. Factores relacionados com as características das proteínas envolvidas, tais como estabilidade, solubilidade e homologia, e com a natureza da exposição, nomeadamente concentração de alergénio e via de exposição, parecem ser determinantes nesta variabilidade. Além disso, características intrínsecas ao próprio indivíduo, como o estado atópico, idade da primeira exposição, hábitos alimentares e ambiente poderão também influenciar a ocorrência de reactividade cruzada com significado clínico. A sensibilização às tropomiosinas parece ter uma importante relevância clínica, já que estas proteínas são termoestáveis e resistentes à acção das enzimas digestivas, exibindo sequências aminoacídicas bem conservadas que podem condicionar um alto grau de reactividade cruzada imunológica entre invertebrados. Trabalhos de diversos autores sugerem que a sensibilização primária a tropomiosinas ocorrerá, preferencialmente, por via inalatória[2,13,16]. Para além disso, o aumento

vity must always be diagnosed using laboratory means. Competitive inhibition makes it possible to evaluate an allergen's capacity for blocking or reducing specific IgE binding to another allergen. Immunoblotting inhibition assays were performed to study possible immunological cross-reactivity between shrimp and *Dp*, showing cross-reactivity in 15 patients: reciprocal shrimp-*Dp* reactivity in 10 and non-reciprocal in five. We could not prove the existence of cross-reactivity in the other five patients.

Clinical relevance of cross-reactivity varies for different foodgroups. Factors related to the characteristics of the proteins involved, such as stability, solubility and homology, and the nature of the exposure, namely allergen concentration and route of exposure, seems to determine this variability. In addition, the inherent characteristics of the individual in question can also influence the occurrence of cross-reactivity with clinical significance. These characteristics include the allergic stage, the age at first exposure, dietary habits and environment.

Sensitisation to tropomyosins seems to be clinically relevant, since these proteins are thermostable and resistant to the action of digestive enzymes and have well-preserved amino-acid sequences that can confer a high degree of immunological cross-reactivity between invertebrates. Several studies suggest that primary sensitisation to tropomyosins occurs preferentially through the inhalant route[2,13,16]. Moreover, increased exposure to HDM allergens by immunotherapy could have facilitated sensitisation to tropomyosins and food allergies[18]. Current knowledge of tropomyosins considers them an important cross-reactivity allergen, with clinical significance among arthropods such as crustaceans and HDM.

CONCLUSIONS

In our study, the molecular weight range found for the highest intensity brands in the immunoblotting assays to shrimp suggests the involvement of tropomyosins in

de exposição a antigénios de ácaros, através da imunoterapia, poderá ter facilitado a sensibilização a tropomiosinas e alergia alimentar[18]. Em concordância com os conhecimentos actuais, as tropomiosinas são consideradas como um importante alergénio de reactividade cruzada, com significado clínico, entre artrópodes, como crustáceos e ácaros.

the majority of patients, underlining the role of these pan-allergens as major allergens in shrimp hypersensitivity in house-dust-mite-sensitized patients. Concurrent sensitisation to shrimp and *Dp* may occur without cross-reactivity and different patterns of sensitisation should be considered.

CONCLUSÕES

No presente estudo, o peso molecular encontrado para as bandas de maior intensidade nos estudos de *immunoblotting* a camarão sugere o envolvimento de tropomiosinas na maioria dos doentes, reforçando o papel destes panalergénios como alergénios *major* na hipersensibilidade a camarão, em doentes sensibilizados a ácaros. Sensibilização simultânea a camarão e Dp pode ocorrer na ausência de reactividade cruzada e diferentes padrões de sensibilização deverão ser considerados.

Contacto / *Correspondence to:*
Isabel Carrapatoso
Serviço de Imunoalergologia – Hospitais da Universidade de Coimbra
Emails: icarrapatoso@netcabo.pt; icarrapatoso@gmail.com

REFERÊNCIAS / *REFERENCES*

1. Lehrer SB, Ayuso R, *et al*. Seafood allergy and allergens. A review. Mar Biotechnol (NY) 2003; 5(4): 339-48.
2. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan--allergen. Int Arch Allergy Immunol 1999; 119 (4): 247-58.
3. Shanti KN, Martin BM, Nagpal S, *et al*. Identification of tropomyosinas the major shrimp allergen and characterization of its IgE binding epitopes. J Immunol 1993; 151:5354-63.
4. Daul CB, Slattery M, Reese G, Lehrer SB. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. Int Arch Allergy Clin Immunol 1994; 105: 49-55.
5. Leung PS, Chu KH, Chow WK, *et al*. Cloning, expression and primary structure of Metapenaeus ensis tropomyosin, the major heat--stable shrimp allergen. J Allergy Clin Immunol 1994; 94:882-90.
6. Leung PS, Chen YC, Mykles DL, Chow WK, Li CP, Chu KH. Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen. Mol Mar Biol Biotechnol 1998; 7: 12-20.
7. Leung PS, Chen YC, Gershwin MR, Wong SH, Kwan HS, Chu KH. Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. J Allergy Clin Immunol 1998; 102: 847-52.
8. Leung PS, Chow WK, Duffey S, Kwan HS, Gershwin ME, Chu KH. IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. J Allergy Clin Immunol 1996; 98: 954-61.
9. Santos AB, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VP, Oliver C, *et al*. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergens. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 329-37.
10. Aki T, Kodama T, Fujikawa A, Miura K, Shigeta S, Wada T, *et al*. Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite, Dermatophagoides farinae. J Allergy Clin Immunol 1995; 96: 74-83.
11. Torres Borrego J, Martínez Cuevas JF, Tejero Garcia J. Reactividad cruzada entre pescados y mariscos. Allergol et Immunopathol 2003; 31(3): 146-51.
12. Santos AB, Rocha GM, Oliver C, Ferriani VP, Lima RC, Palma MS, *et al*. Cross-reactive IgE antibody responses to tropomyosins from *Ascaris lumbricoides* and cockroach. J Allergy Clin Immunol 2008; 121: 1040-6.

13. Sicherer SH. Clinical implications of cross-reactive food allergens. J Allergy Clin Immunol 2001; 108: 881-90.
14. Carrapatoso I. Grupos de alimentos com maior reactividade cruzada: artigo de revisão. Rev Port Imunoalergologia 2004; 12 (2): 103-13.
15. Van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Pajno GB, Barberio G, Corbetta L, *et al.* Asthma after consumption of snails in house-dust--mite-allergic patients: a case of IgE cross-reactivity. Allergy 1996; 51:387-93.
16. Fernandes J, Reshef A, Patton L, Ayuso R, Reese G, Lehrer SB. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews. Clin Exp Allergy 2003; 33: 956-61.
17. Carrillo T, de Castro FR, Blanco C, Castillo R, Quiralte J, Cuevas M. Anaphylaxis due to limpet ingestion. Ann Allergy 1994; 73:504-8.
18. van Ree R, Antonicelli L, Akkerdaas JH, Garritani MS, Aalberse RC, Bonifazi F. Possible induction of food allergy during mite immunotherapy. Allergy 1996; 51:108-13.
19. Taylor SL. Molluscan shellfish allergy. *Adv Food Nutr Res* 2008; 54:139-77.
20. Kalogeromitros D, Makris M, Gregoriou S, Chliva C, Katoulis A, Papaioannou D, *et al*. IgE-mediated sensitization in seafood processing workers. Allergy Asthma Proc 2006; 27: 399-403.
21. Steensma DP. The kiss of death: a severe allergic reaction to a shellfish induced by a good-night kiss. Mayo Clin Proc 2003; 78: 221-2.
22. Position paper: Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Allergy 1993; 48: 48-82.
23. Bernstein IL, Storms WW. Practice parameters for allergy diagnostic testing. Joint Task Force on Practice Parameters for the Diagnosis and Treatment of Asthma. The American Academy of Allergy, Asthma and Immunology and the American College of Allergy, Asthma and Immunology. Ann Allergy Asthma Immunol 1995; 75: 543-625.
24. Sampson HA. Update on food allergy. J Allergy Clin Immunol 2004; 113: 805-19.
25. Pascual CY, Crespo JF, Perez PG, Esteban MM. Food allergy and intolerance in children and adolescents, an update. Eur J Clin Nutr 2000; 54 (Suppl 1): S75-8.
26. Castillo R, Carrillo T, Blanco C, Quiralte J, Cuevas M. Shellfish hypersensitivity: clinical and immunological characteristics. Allergol Immunopathol (Madr) 1994; 22: 83-7.
27. Lehrer SB, McCants ML. Reactivity of IgE antibodies with crustaceae and oyster allergens: evidence for common antigenic structures. J Allergy Clin Immunol 1987; 80: 133-9.
28. Carrapatoso I, Morais Almeida M. Alergénios Alimentares. In: Ana Todo Bom, Ed. Atlas de Imunoalergologia. 1.ª ed. Lisboa: Euromédice; 2004: 47-68.
29. Ayuso R, Reese G, Leong-kee S, Plante M, Lehrer SB. Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE binding cross-reactivity epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. Int Arch Allergy Immunol 2002; 129: 38-48.
30. Witteman AM, Akkerdaas JH, Leeuwen J, Zee JS, Aalberse RC. Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects. Int Arch Allergy Immunol 1994; 105: 56-61.
31. Liccardi G, Salzillo A, Noschese P, Piccolo A, Calderaro F, D'Amato M, *et al*. Clinical significance of allergic sensitization to cockroaches in patients with mite related respiratory allergy. J Investig Allergol Clin Immunol 1996; 6: 283-7.
32. Samson KT, Chen FH, Miura K, Odajima Y, Iikura Y, Rivas MN, *et al*. IgE binding to raw and boiled shrimp proteins in atopic and nonatopic patients with adverse reactions to shrimp. Int Arch Allergy Immunol 2004; 133: 225-32.
33. Aalberse RC, Akkerdaas J, van Ree R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. Allergy 2001; 56(6): 478-90.