

ImmunoCAP ISAC[®]: Tecnologia *microarray* no estudo da alergia alimentar em contexto de reactividade cruzada

ImmunoCAP ISAC[®]: Microarray technology in the study of the role of cross-reactivity in food allergy

Data de receção / Received in: 20/05/2010

Data de aceitação / Accepted for publication in: 18/06/2010

Rev Port Imunoalergologia 2010; 18 (4): 331-352

Susana Carvalho¹, Ângela Gaspar¹, Sara Prates¹, Graça Pires¹, Isabel Silva¹, Vitória Matos², Virgínia Loureiro², Paula Leiria-Pinto¹

¹ Serviço de Imunoalergologia, Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central / *Immunology Department, Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central*

² Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central / *Clinical Pathology Department, Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central*

RESUMO

Introdução: O ImmunoCAP ISAC[®] (*Immuno Solid-phase Allergen Chip*) é um teste *in vitro* que visa identificar e determinar semiquantitativamente a presença de anticorpos específicos de classe IgE (sIgE) no soro ou plasma humano para múltiplos componentes alergénicos (imobilizados num substrato sólido, em *microarray*). **Objectivo:** Avaliar o contributo deste método no estudo de doentes com alergia alimentar no contexto de provável fenómeno de reactividade cruzada. **Métodos:** Seleccionaram-se doentes seguidos na consulta de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia com quadros clínicos sugestivos das principais síndromes de reactividade cruzada, ácaros-crustáceos-moluscos, látex-frutos, pólenes-frutos/vegetais e alergia a frutos da família *Rosaceae*. Os doentes foram avaliados por história clínica detalhada, testes cutâneos por picada (com extracto comercial e/ou alimento em natureza) e doseamento de sIgE (UniCAP[®]100). Procedeu-se à determi-

nação de sIgE para componentes alérgicos nos respectivos soros, através da metodologia ImmunoCAP ISAC®. **Resultados:** Incluíram-se 24 doentes (7 com síndrome ácaros-crustáceos-moluscos, 8 com síndrome látex-frutos, 8 com síndrome pólenes-frutos/vegetais e 1 com alergia a frutos *Rosaceae*), com idade média de 25,5 anos ($\pm 12,4$) e relação sexo M:F de 1:1. Identificaram-se anticorpos sIgE para: tropomiosinas (Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Hel as 1, Per a 7, Ani s 3) em 4/7 doentes com síndrome ácaros-crustáceos-moluscos; alérgenos do látex implicados na reactividade cruzada com alimentos (Hev b 6.02, Hev b 5, Hev b 11) em 7/8 doentes com síndrome látex-frutos; profilinas (Bet v 2, Cyn d 12, Hev b 8, Mer a 1) e proteínas de transferência de lípidos – LTPs (Par j 2, Pru p 3) em, respectivamente, 2/8 e 4/8 doentes com síndrome pólenes-frutos/vegetais; LTPs (Pru p 3) no doente com alergia a frutos *Rosaceae*. **Conclusões:** A identificação dos panalérgenos implicados nas síndromes clínicas de reactividade cruzada em 18 doentes com alergia alimentar vem demonstrar a utilidade deste novo teste diagnóstico *in vitro* como adjuvante na confirmação deste tipo de situações.

Palavras-chave: Alérgenos moleculares, alergia alimentar, diagnóstico, *microarray*, panalérgeno, reactividade cruzada.

ABSTRACT

Background: ImmunoCAP ISAC® (Immuno Solid-phase Allergen Chip) is an *in vitro* test designed to identify and determine semi-quantitatively, in the human serum or plasma, the presence of specific IgE (sIgE) antibodies to multiple allergenic components (immobilized in a solid substrate by *microarray*). **Purpose:** To evaluate the contribution of this method in the study of patients with food allergy probably related to cross-reactivity. **Methods:** We selected patients followed in the Outpatient Department of Immunodermatology at Dona Estefânia Hospital with clinical symptoms suggestive of the most important cross-reactivity syndromes, house-dust mite-crustaceans-molluscs, latex-fruit, pollen-food and allergy to *Rosaceae* fruits. All patients were evaluated through detailed clinical history, skin prick tests (commercial extract and/or fresh food) and sIgE determination (UniCAP® 100). Subsequently, sIgE to allergen components was determined in all sera using ImmunoCAP ISAC® methodology. **Results:** A total of 24 patients were included in the study (seven with house-dust mite-crustaceans-molluscs syndrome, eight with latex-fruit syndrome, eight with pollen-food syndrome and one with allergy to *Rosaceae* fruits), with mean age of 25.5 years (± 12.4) and M:F ratio of 1:1. We identified sIgE antibodies to: tropomyosins (Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Hel as 1, Per a 7, Ani s 3) in 4/7 patients with house-dust mite-crustaceans-molluscs syndrome; latex allergens related to cross-reactivity with foods (Hev b 6.02, Hev b 5, Hev b 11) in 7/8 patients with latex-fruit syndrome; profilins (Bet v 2, Cyn d 12, Hev b 8, Mer a 1) and lipid transfer proteins – LTPs (Par j 2, Pru p 3) in, respectively, 2/8 and 4/8 patients with pollen-food syndrome; LTPs (Pru p 3) in the patient with allergy to *Rosaceae* fruits. **Conclusions:** The identification of the panallergens implicated in the clinical syndromes of cross-reactivity in 18 patients with food allergy demonstrates the usefulness of this new *in vitro* diagnostic test as an adjuvant in the confirmation of this type of situations.

Key-words: Component-resolved diagnosis, cross-reactivity, diagnosis, food allergy, *microarray*, panallergen.

INTRODUÇÃO

Alergia alimentar constitui um importante problema de saúde, estimando-se que afecte cerca de 4% da população geral¹. Identificam-se dois padrões de alergia alimentar, distintos entre si pelo quadro clínico associado, tipo de alérgenos envolvidos e mecanismos imunológicos subjacentes. Assim, na alergia alimentar de classe I, a sensibilização ocorre através da via gastrointestinal, sendo que os alérgenos envolvidos são gastro-resistentes. A alergia alimentar de classe II ocorre secundariamente à sensibilização a alérgenos inalantes, tendo por base um mecanismo imunológico de reactividade cruzada IgE-mediada. Os alérgenos envolvidos neste tipo de reacções possuem características diversas, podendo desencadear desde sintomatologia ligeira do tipo síndrome de alergia oral (SAO) até quadros de anafilaxia^{2,3}. São múltiplos os determinantes da relevância clínica da reactividade cruzada: (i) relacionados com a resposta imune (afinidade do anticorpo IgE, concentração de IgE); (ii) relacionados com as características das proteínas (homologia, solubilidade, estabilidade); (iii) relacionados com a exposição (concentração, via de contacto – oral ou respiratória, cofactores associados – exercício, álcool)⁴.

O aumento da prevalência de sensibilização a aeroalérgenos, nomeadamente ácaros e pólenes, tem sido reflectido não só no aumento de manifestações alérgicas respiratórias, mas também no aumento de fenómenos de reactividade cruzada com alérgenos alimentares⁴.

O reconhecimento da reactividade cruzada na alergia alimentar remonta a meados do século XX. São múltiplos os trabalhos publicados desde então demonstrando a presença de anticorpos IgE desenvolvidos em resposta a proteínas inaladas, com capacidade para reagir com proteínas de alimentos^{5,6}. Proteínas que possuam mais de 35% de homologia em 80 aminoácidos, ou que tenham 6 aminoácidos consecutivos idênticos, têm potencial para induzir reactividade cruzada⁶. Contudo, estes critérios podem conduzir a muitas situações de falsa positividade, o que leva a maioria dos autores a advogarem a necessidade de 50-75% de ho-

INTRODUCTION

Food allergy is an important health problem, estimated to affect around 4% of the population at large¹. Two distinct patterns of food allergy have been identified, each with its own associated clinical picture, type of allergens involved and underlying immunological mechanisms. In class I food allergy, sensitisation occurs via the gastrointestinal tract, with gastro-resistant allergens involved. Class II food allergy is secondary to sensitisation to inhaled allergens, with an IgE-mediated cross-reactivity immunological mechanism as its base. The allergens involved in this type of reactions have a diverse set of characteristics and can trigger from mild symptoms of oral allergy syndrome (OAS) type to anaphylactic reactions^{2,3}. There are multiple determinants of the clinical relevance of cross-reactivity. They can be related to: (i) the immune response (affinity of IgE antibody, IgE concentration); (ii) the characteristics of the proteins (homology, solubility, stability); (iii) the exposure (concentration, route of contact – oral or respiratory, and associated cofactors – exercise, alcohol)⁴.

The increase in prevalence of sensitisation to aeroallergens, namely mites and pollens, has been reflected in both the increasing manifestations of respiratory allergy and phenomena of cross-reactivity to food allergens⁴.

The recognition of cross-reactivity in food allergy emerged in the middle of the twentieth century. Since then, there has been several published studies, which has shown that IgE antibodies that develop in response to inhaled proteins are able to react to food proteins^{5,6}. Proteins with over 35% homology in 80 amino acids, or which have 6 identical consecutive amino acids, are able to induce cross-reactivity⁶. These criteria can lead to many false positives, however, leading the majority of authors to argue in favour of the need for 50-75% homology between proteins, so the likelihood of clinically relevant cross-reactivity can be predicted with greater precision⁶. In this analysis the three-dimensional structure of pro-

mologia entre proteínas para que se possa prever com maior exactidão a possibilidade de ocorrência de reactividade cruzada clinicamente relevante⁶. Nesta análise terá também de se ter em conta a estrutura tridimensional das proteínas, e não apenas a estrutura linear, uma vez que os epitopos conformacionais estão envolvidos numa percentagem significativa das ligações da IgE ao alérgénio^{6,7}. Estão ainda descritas proteínas alergénicas amplamente distribuídas na natureza (sobretudo no reino vegetal) envolvidas em situações de reactividade cruzada IgE-mediada entre antígenos de espécies taxonomicamente distintas, os panalergénios^{3,8,9}.

O fenómeno da reactividade cruzada no contexto da alergia alimentar tem importantes implicações em termos de diagnóstico e de terapêutica⁶. Assim, perante um caso de suspeita de alergia alimentar, é fundamental: (i) a identificação do alimento suspeito; (ii) a prevenção de reacções alérgicas causadas pela ingestão de alimentos com reactividade cruzada; (iii) a evicção de restrições dietéticas desnecessárias¹⁰.

Uma das principais dificuldades com que o clínico se depara no diagnóstico da alergia alimentar, sobretudo quando existe uma elevada probabilidade de reactividade cruzada subjacente, é a presença quer de falsos positivos quer de falsos negativos. No primeiro caso, conduzindo a evicções desnecessárias. No segundo caso, falhando a detecção de alérgénios com potencial para desencadear reacções em futuros contactos, sendo imperativa a realização de provas de provocação oral, idealmente em dupla ocultação controladas com placebo, para a confirmação dos resultados dos testes cutâneos e/ou serológicos^{1,6}.

Neste sentido, tem havido uma preocupação crescente nas últimas décadas no que diz respeito aos métodos de diagnóstico *in vitro*, no intuito de aumentar a sua precisão, optimizando a eficácia da terapêutica a instituir, sem aumentar os custos associados¹¹. Até à data, a maioria dos extractos usados na prática clínica para a avaliação diagnóstica *in vivo* (testes cutâneos) e *in vitro* (IgE específica) correspondem a extractos proteicos complexos obtidos a partir de fontes alergénicas naturais, os quais apresentam variabilidade a

teins, and not just the linear structure, has to be considered, as conformational epitopes are involved in a significant percentage of IgE bindings to the allergen^{6,7}. And there are also allergenic proteins amply distributed in nature, particularly in the vegetable kingdom, involved in IgE-mediated cross-reactivity between antigens of taxonomically distinct species – the panallergens^{3,8,9}.

Cross-reactivity in food allergy has important repercussions on diagnosis and treatment⁶. When food allergy is suspected, it is, thus, vital to: (i) identify the suspect foods; (ii) prevent allergic reactions caused by the ingestion of foods with cross-reactivity; (iii) avoid an unnecessarily restricted diet¹⁰.

One of the main difficulties that a physician faces in diagnosing food allergy, particularly when there is a great likelihood of underlying cross-reactivity, is that of false positives and false negatives. False positives lead to unnecessary eviction diets and false negatives fail to detect allergens capable of triggering reactions in future contacts, making it imperative to perform oral challenge tests, ideally double-blinded placebo-controlled tests, to confirm the results of cutaneous and/or serology tests^{1,6}.

Accordingly, the last few decades have seen a rising concern over *in vitro* diagnostic methods, aiming for their greater accuracy and optimising treatment efficacy without increasing associated costs¹¹. So far, the majority of extracts used in the clinical practice for *in vivo* (cutaneous tests) and *in vitro* (specific IgE) diagnostic evaluation have been complex protein extracts obtained from natural allergenic sources, which have a variable composition and allergenicity¹². In this way, information on the source is obtained, but the allergenic molecule triggering the symptoms is not identified. This identification is only possible using purified natural allergens or recombinant allergens^{13,14}. This has implications on diagnosis and treatment because the identification of the allergenic component involved in IgE binding, would be of vital interest for a more accurate diagnosis and even for a correct determination of the composition of the vaccines

nível da sua composição e alergenicidade¹². Deste modo, obtém-se informação relativa à fonte, mas não se identifica a molécula alergénica que desencadeia os sintomas, o que só é possível recorrendo a alergénios naturais purificados ou a alergénios recombinantes^{13,14}. Isto acarreta implicações em termos diagnósticos e terapêuticos, uma vez que não permite a identificação do componente alergénico envolvido na ligação à IgE, o que teria vital interesse para um diagnóstico mais preciso e, mesmo, para uma correcta determinação da constituição da vacina alergénica para a imunoterapia específica¹². As técnicas imunológicas de inibição clássicas (RAST, ELISA, *immunoblotting*) permitem demonstrar a reactividade cruzada, mas são mais difíceis de executar na prática clínica. A tecnologia molecular tem permitido a clonagem e a produção de alergénios das principais fontes alergénicas em formas recombinantes, que mantêm as propriedades imunológicas das proteínas naturais^{13,15}, com consequente aumento da sensibilidade diagnóstica¹⁶. Surge então o conceito de *component-resolved diagnosis* (CRD)^{17,18}, posteriormente aliado à tecnologia por *biochip*, com o desenvolvimento de testes de alergia miniaturizados (*microarray*). Os testes de IgE baseados em *microarray* vêm permitir: (i) acelerar o diagnóstico (analisam em simultâneo vários parâmetros); (ii) utilizar uma amostra mínima de soro do doente (20-50 µL/teste)¹¹; (iii) determinar o padrão de sensibilização de cada doente; (iv) adoptar medidas profiláticas, quando aplicável, em termos de reactividade cruzada; (v) otimizar o diagnóstico de situações particulares, como a alergia alimentar e a alergia ao látex; (vi) elaborar uma imunoterapia específica adequada a cada doente, de acordo com o seu perfil de sensibilização^{11,13,17}.

OBJECTIVO

O objectivo deste estudo foi avaliar o contributo da metodologia ImmunoCAP ISAC® no estudo de doentes com alergia alimentar no contexto de provável fenómeno de reactividade cruzada.

for specific immunotherapy¹². Classic immunological inhibition techniques (RAST, ELISA, immunoblotting) allow cross-reactivity to be shown, but are difficult to perform in the clinical practice. Molecular technology has made it possible to clone and produce the allergens of the main allergenic sources in recombinant forms, which maintain the immunological properties of the natural proteins^{13,15}, with consequent increased diagnostic sensitivity¹⁶. The concept of component-resolved diagnosis (CRD)^{17,18} has emerged, which was afterwards allied to biochip technology, with the development of miniaturised allergy tests (*microarray*). *Microarray*-based IgE tests allow: i) accelerated diagnosis (multiple allergen measurement simultaneously); ii) low patient serum sample requirement (20-50 µL per assay)¹¹; iii) determination of a sensitisation pattern for each patient; iv) cross-reactivity prophylactic measures to be taken, when applicable; v) optimised diagnosis in particular situations, such as food allergy and latex allergy; vi) tailored immunotherapy plan to be drawn up for each patient, in line with their sensitisation profile^{11,13,17}.

AIM

The aim of this study was to evaluate the contribution of ImmunoCAP ISAC® in the study of patients with food allergy probably related to cross-reactivity.

MATERIAL AND METHODS

We selected 24 patients followed-up in the Outpatient Department of Immunoallergy of Dona Estefânia Hospital with clinical symptoms suggestive of the three main cross-reactivity syndromes, house-dust mite-crustaceans-molluscs syndrome ($n = 7$), latex-fruit syndrome ($n = 8$), pollen-food syndrome ($n = 8$) and allergy to *Rosaceae* fruits ($n = 1$). All patients underwent detailed

MATERIAL E MÉTODOS

Foi efectuada uma análise retrospectiva de 24 doentes seguidos na consulta de Imunoalergologia do Hospital de Dona Estefânia com quadros clínicos sugestivos das três principais síndromes de reactividade cruzada, síndrome ácaros-crustáceos-moluscos (n=7), síndrome látex-frutos (n=8), síndrome pólenes-frutos/vegetais (n=8) e com alergia a frutos da família *Rosaceae* (n=1). A todos os doentes foi efectuada avaliação clínica e alergológica detalhada, que consistiu em: (i) história clínica; (ii) testes cutâneos por picada para aeroalergénios, com extractos comercializados standardizados (ALK-Abelló®, Hørsholm, Dinamarca; Laboratórios Leti®, Madrid, Espanha) – (bateria composta por *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Euroglyphus maynei*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Alternaria alternata*, *Olea europaea*, *Platanus acerifolia*, *Betula verrucosa*, *Cupressus sp.*, mistura de gramíneas, *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago lanceolata*, *Chenopodium album*, *Salsola kali*, látex, mistura de baratas, epitélio de gato e epitélio de cão); (iii) testes cutâneos por picada para alimentos suspeitos, identificados pela história clínica do doente, com extracto comercial e/ou alimento em natureza (se extracto comercial negativo com clínica sugestiva de reacção alérgica, ou se extracto comercial não disponível); (iv) doseamento de IgE específica (slgE) por UniCAP® 100 (Phadia, Uppsala, Suécia). Os resultados foram expressos de forma quantitativa em kU/L, considerando-se como *cut-off* de positividade a existência de valores de slgE $\geq 0,35$ kU/L.

Os testes cutâneos foram realizados na face anterior do antebraço, de acordo com metodologia recomendada¹⁹, utilizando lancetas metálicas com 1 mm de penetração (Prick Lancetter®, Hollister-Stier Laboratories, Spokane, EUA), controlo positivo (histamina 10mg/mL) e controlo negativo (solução salina). A leitura dos resultados foi efectuada aos 15 minutos, avaliando-se a área das pápulas e considerando como *cut-off* de positividade a existência de um diâmetro médio da pápula ≥ 3 mm em relação ao controlo negativo¹⁹.

clinical and allergological evaluation consisting of clinical history and skin prick tests to aeroallergens with standardised commercial extract (ALK-Abelló®, Hørsholm, Denmark; Laboratórios Leti®, Madrid, Spain). The battery was composed of *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*, *Blomia tropicalis*, *Euroglyphus maynei*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Alternaria alternata*, *Olea europaea*, *Platanus acerifolia*, *Betula verrucosa*, *Cupressus sp.*, grass mix, *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris*, *Plantago lanceolata*, *Chenopodium album*, *Salsola kali*, latex, cockroach mix and cat and dog epithelium. Skin prick tests to the suspect foods identified by the patient's clinical history were performed, using the commercial extract and/or the fresh food (if the commercial extract was negative or not available). We also performed specific IgE determination (slgE) using UniCAP® 100 (Phadia, Uppsala, Sweden). The results were expressed in quantitative form in kU/L, using as a positive cut-off slgE ≥ 0.35 kU/L.

Skin tests were performed on the anterior part of the forearm, in line with the recommended methodology¹⁹, using metal lancets of 1 mm penetration (Prick Lancetter®, Hollister-Stier Laboratories, Spokane, USA), positive control (histamine 10mg/mL) and negative control (saline solution). The results were read after 15 minutes by examining the wheal area and a mean wheal diameter ≥ 3 mm than the negative control was considered positive¹⁹.

Evaluating clinical history of respiratory symptoms, we used the criteria defined by the ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma)²⁰ and GINA (Global Initiative for Asthma)²¹ guidelines, for rhinitis and asthma, respectively. Food allergy was defined when there was a suggestive clinical history (allergic symptoms following food ingestion) and positive skin and/or laboratory tests. When there was doubt, oral challenge tests were performed, unless these were contraindicated.

After obtaining the informed written consent of patients or their legal representatives, we moved on to identifying the slgE antibodies in patient sera using the Im-

Na avaliação anamnésica dos sintomas respiratórios, foram utilizados os critérios definidos pelos *guidelines*ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*)²⁰ e GINA (*Global Initiative for Asthma*)²¹, respectivamente para a rinite e para a asma. Definiu-se alergia alimentar na presença de história clínica sugestiva (sintomas alérgicos após a ingestão do alimento) e testes cutâneos e/ou laboratoriais positivos. Em caso de dúvida foram efectuadas provas de provocação orais, na ausência de contra-indicação à sua realização.

Após obtenção do consentimento informado dos doentes ou seus representantes legais, procedeu-se à identificação de anticorpos de sIgE nos respectivos soros, através da metodologia ImmunoCAP ISAC® (versão CRD-89, VBC-Genomics, Viena, Áustria). O ImmunoCAP ISAC® é um imunoensaio de fase sólida, que permite a detecção e determinação semiquantitativa de sIgE para componentes alérgicos moleculares (naturais ou recombinantes). Os componentes alérgicos estão imobilizados num substrato sólido, na forma de *microarray*, sendo incubados com 20 µL de soro para a detecção de anticorpos sIgE. A ligação entre estes anticorpos e os componentes alérgicos é detectada pela adição de um anticorpo anti-IgE, com marcação fluorescente. Com a utilização de um leitor de *biochips*, consegue-se uma imagem que permite, através da intensidade de fluorescência (valores FI), obter o resultado dos testes, com a ajuda de *software* adequado – MIA (*Microarray Image Analysis Software*) – de acordo com a metodologia do fabricante (Figura 1). Os resultados foram expressos em *ISAC Standardized Units* (ISU), sendo o cut-off de positividade considerado 0,3 ISU.

RESULTADOS

Os 24 doentes incluídos tinham uma idade média de 25,5 anos ($\pm 12,4$), variando entre 7 e 47 anos, sem diferenças na distribuição por sexos (relação M:F de 1:1).

Em 7 casos o quadro clínico era compatível com síndrome ácaros-crustáceos-moluscos – apresentavam asma e/ou rinite/rinoconjuntivite alérgica quando expostos a

munocAP ISAC® (version CRD-89, VBC-Genomics, Vienna, Austria) methodology. ImmunoCAP ISAC® is a solid phase immunoarray which allows detection and semiquantitative determination of the sIgE of molecular allergenic components, natural or recombinant. The allergenic components are immobilised on a solid support in a microarray form. These are incubated with 20µL of serum to detect sIgE antibodies. The binding between these antibodies and the allergenic components is detected by adding a fluorescence-labeled anti-IgE antibody. Using a biochip scanner, an image is seen which allows the test result to be obtained through fluorescence intensity (FI values) with the help of suitable software, MIA (*Microarray Image Analysis Software*), in line with the manufacturer's instructions (Figure 1). The results were given in ISAC Standardized Units (ISU), with 0.3 ISU taken as a positive cut-off.

RESULTS

The 24 patients in the sample had a mean age of 25.5 years (± 12.4), ranging from 7 to 47 years old, with no difference in sex distribution (M:F ratio 1:1).

In seven cases the clinical picture was compatible with the house-dust mite-crustaceans-molluscs syndrome, presenting allergic asthma and/or rhinitis/rhinoconjunctivitis on exposure to house-dust mites, in addition to OAS, urticaria/angioedema, rhinoconjunctivitis or anaphylaxis on ingestion of crustaceans or molluscs. All had positive skin/sIgE tests to mites and crustaceans or molluscs (Table 1).

Eight patients had a clinical picture suggesting latex-fruit syndrome, presenting allergic asthma, rhinitis/rhinoconjunctivitis and/or anaphylaxis on exposure to latex, in addition to OAS, urticaria/angioedema, rhinoconjunctivitis or anaphylaxis on ingestion of foods with reported cross-reactivity to latex. All had positive skin/sIgE tests to latex and the foods in question (Table 2).

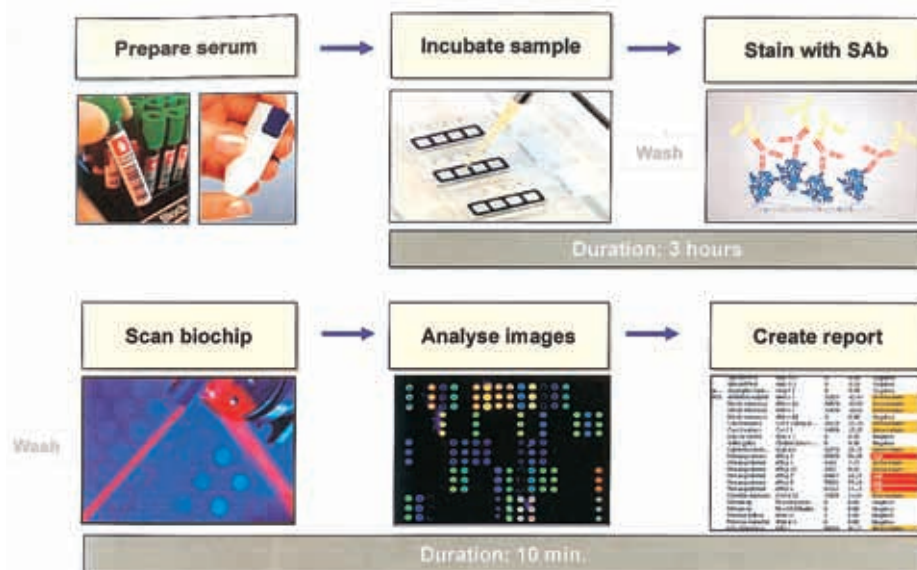


Figura 1. ImmunoCAP ISAC®: resumo ilustrado do procedimento da técnica, de acordo com a metodologia do fabricante (Phadia).

Figure 1. ImmunoCAP ISAC®: a brief illustration of the technique procedure, in line with the manufacturer's instructions (Phadia).

ácaros, bem como SAO, urticária/angioedema, rinoconjuntivite ou anafilaxia após ingestão de crustáceos ou moluscos, para além de testes cutâneos / sIgE positivos para ácaros e crustáceos ou moluscos (Quadro 1).

Oito doentes tinham quadro clínico sugestivo de síndrome látex-frutos – apresentavam asma, rinite/rinoconjuntivite alérgica e/ou anafilaxia quando expostos ao látex, bem como SAO, urticária/angioedema, rinoconjuntivite ou anafilaxia após ingestão de alimentos com reatividade cruzada descrita com o látex, para além de testes cutâneos / sIgE positivos para látex e alimentos referidos (Quadro 2).

Em 8 casos o quadro clínico era compatível com síndrome pólenes-frutos/vegetais, traduzido por asma e/ou rinite/rinoconjuntivite alérgica quando da exposição a pólenes, bem como SAO, urticária/angioedema, rinoconjuntivite ou anafilaxia após ingestão de frutos ou outros vegetais com reatividade descrita com os pólenes implicados, para além de testes cutâneos / sIgE positivos para pólenes e alimentos referidos (Quadro 3).

In eight cases the clinical picture was compatible with pollen-fruit/vegetables syndrome, shown by allergic asthma and/or rhinitis/rhinoconjunctivitis on exposure to pollens, in addition to OAS, urticaria/angioedema, rhinoconjunctivitis or anaphylaxis on ingestion of fruits or other vegetables with reported cross-reactivity to the pollen in question. All had positive skin/sIgE tests to pollen and the foods in question (Table 3).

One patient presented IgE-mediated allergy to *Rosa-ceae* fruits, with anaphylaxis triggered by ingestion of apple, and labial oedema on ingestion of peach, with no associated pollinosis (Table 3).

Table 4 summarises the results obtained using the ImmunoCAP ISAC® methodology. We found sIgE antibodies to: i) tropomyosins (Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Hel as 1, Per a 7, Ani s 3) in 4/7 patients with house-dust mite-crustaceans-molluscs syndrome; ii) latex allergens related to cross-reactivity with foods (Hev b 6.02, Hev b 5, Hev b 11) in 7/8 patients with latex-fruit syndrome; iii)

Quadro 1. Características dos 7 doentes com alergia alimentar no contexto de provável síndrome ácaros-crustáceos-moluscos

Doente	Idade (anos), sexo	Alergia alimentar (alimento/clínica)	TC positivos aeroalergénios	slgE positivas aeroalergénios (kU/L)	TC positivos alergénios alimentares	slgE positivas alergénios alimentares (kU/L)
1	14, M	Camarão, perceves, caracol, lula, choco: SAO, angioedema, rinoconjuntivite	Ácaros, baratas	Der p, Der f >100 <i>Blatella</i> – 37,3	Camarão, perceves, caranguejo, caracol, amêijoia, mexilhão, lula, choco, polvo	Camarão – 85,2 caracol – 20 amêijoia – >100 lula – 6,41 polvo – 38,6
2	47, M	Camarão, lagosta: urticária	Ácaros	Der p – 25,6 Der f – 19,4	Camarão, lagosta, caranguejo	não (slgE camarão, lagosta e caranguejo negativas)
3	22, M	Camarão: anafilaxia Lula, polvo, choco: SAO	Ácaros, baratas, gramíneas, gato	Der p – 8,5 Der f – 8,6 <i>Lolium</i> – 5,74 <i>Phleum</i> – 1,60	Camarão, caranguejo, lula, polvo, choco, caracol, amêijoia	Camarão – 2,9 caranguejo – 4,11 polvo – 1,17 caracol – 0,4 amêijoia – 0,47
4	16, F	Caracol: anafilaxia	Ácaros	Der p – 3,32 Der f – 1,16	Caracol	Caracol – 0,59
5	31, F	Camarão: SAO Caracol: asma	Ácaros, gramíneas, gato, cão	Der p, Der f >100 <i>Lolium</i> – 25,7 <i>Phleum</i> – 15,1 gato – 1,8 cão – 0,53	Camarão, caracol, polvo	Camarão – 1,05
6	20, M	Caracol, lapa: anafilaxia Camarão: asma	Ácaros, baratas, gramíneas	Der p, Der f >100 <i>Blatella</i> – 1,34 <i>Lolium</i> – 22,3 <i>Phleum</i> – 6,43	Caracol, lapa, camarão, lagosta, caranguejo, lula	Caracol – 1,03 camarão – 9,65 lagosta – 11 caranguejo – 8,18 amêijoia – 0,58 polvo – 0,63 lula – 0,37
7	9, M	Polvo: asma, rinoconjuntivite; Pescada: vômitos; Leite: anafilaxia; Grão: urticária	Ácaros	Der p, Der f >100	Camarão, caranguejo, lagosta, caracol, lula, polvo, bacalhau, pescada, leite de vaca, grão, ervilha, lentilha, amendoim, amêndoa, avelã, pistácio	Camarão, amêijoia e polvo >100 bacalhau – 16,1 pescada – 10 leite de vaca – 5,43 grão – 17,1 ervilha – 4,49 lentilha – 13,8 amendoim – 2 amêndoa – 10,1 avelã – 9,3 pistácio – 16

TC: testes cutâneos por picada; Der p: *Dermatophagoides pteronyssinus*; Der f: *Dermatophagoides farinae*

Table 1. Characteristics of the seven patients with food allergy within the context of likely house-dust mite-crustaceans-molluscs syndrome

Patient	Age (yrs), sex	Food allergy (food / clinical picture)	SPT positive to aeroallergens	slgE positive to aeroallergens (kU/L)	SPT positive to food allergens	slgE positive to food allergens (kU/L)
1	14, M	Shrimp, barnacle, snail, squid: OAS, angioedema, rhinoconjunctivitis	Mites, cockroaches	Der p, Der f >100 Blatella – 37.3	Shrimp, barnacle, crab, snail, clam, mussel, squid, octopus	Shrimp – 85.2 snail – 20 clam – >100 squid – 6.41 octopus – 38.6
2	47, M	Shrimp, lobster: urticaria	Mites	Der p – 25.6 Der f – 19.4	Shrimp, lobster, crab	no (slgE negative to shrimp, lobster and crab)
3	22, M	Shrimp: anaphylaxis Squid, octopus: OAS	Mites, cockroaches, grass, cat	Der p – 8.5 Der f – 8.6 Lolium – 5.74 Phleum – 1.60	Shrimp, crab, squid, octopus, snail, clam	Shrimp – 2.9 crab – 4.11 octopus – 1.17 snail – 0.4 clam – 0.47
4	16, F	Snail: anaphylaxis	Mites	Der p – 3.32 Der f – 1.16	Snail	Snail – 0.59
5	31, F	Shrimp: OAS Snail: asthma	Mites, grass, cat, dog	Der p, Der f >100, Lolium – 25.7 Phleum – 15.1 cat – 1.8 dog – 0.53	Shrimp, snail, octopus	Shrimp – 1.05
6	20, M	Snail, limpet: anaphylaxis Shrimp: asthma	Mites, cockroaches, grass	Der p, Der f >100, Blatella – 1.34 Lolium – 22.3 Phleum – 6.43	Snail, limpet, shrimp, lobster, crab, squid	Snail – 1.03 shrimp – 9.65 lobster – 11 crab – 8.18 clam – 0.58 octopus – 0.63 squid – 0.37
7	9, M	Octopus: asthma, rhinoconjunctivitis; Whiting: vomiting; Milk: anaphylaxis; Chick-pea: urticaria	Mites	Der p, Der f >100	Shrimp, crab, lobster, snail, squid, octopus, cod, whiting, cow's milk, chick-pea, pea, lentil, peanut, almond, hazelnut, pistachio	Shrimp, clam and octopus >100 cod – 16.1 whiting – 10 cow's milk – 5.43 chick-pea – 17.1 pea – 4.49 lentil – 13.8 peanut – 2 almond – 10.1 hazelnut – 9.3 pistachio – 16

SPT: skin prick tests; Der p: *Dermatophagoides pteronyssinus*; Der f: *Dermatophagoides farinae*

Quadro 2. Características dos 8 doentes com alergia alimentar no contexto de provável síndrome látex-frutos

Doente	Idade (anos), sexo	Alergia alimentar (alimento / clínica)	TC positivos aeroalergénios	slgE positivas aeroalergénios (kU/L)	TC positivos alergénios alimentares	slgE positivas alergénios alimentares (kU/L)
8	44, F	Castanha, banana, maracujá: anafilaxia Pêssego, ananás, ameixa, espinafre, tomate: urticária	Látex	Látex – 22,3	Castanha, banana, maracujá, pêssego, ananás, ameixa, abacate, manga, figo, espinafre, tomate	Maracujá – 0,65
9	31, F	Castanha, abacate: SAO	Látex, gato	Látex – 27,3 gato – 5,57	Castanha, abacate, maracujá	não (slgE castanha, abacate e maracujá negativas)
10	44, F	Castanha: anafilaxia Kiwi: asma	Látex	Látex – 51,9	Castanha, kiwi, maracujá, ananás	Castanha – 0,5 maracujá – 5,48
11	46, F	Pêssego: urticária	Látex, ácaros	Látex – 8,86 Der p – 66,1 Der f – 26,1	Pêssego, abacate, castanha, maracujá	Pêssego – 14,2 Maracujá – 0,36
12	29, F	Castanha, maracujá: anafilaxia Banana: SAO	Látex, ácaros	Látex – 16,5 Der p – 8,84 Der f – 1,77	Castanha, maracujá, banana, kiwi, abacate, papaia, pêssego, espinafre	Maracujá – 1
13	30, F	Uva: anafilaxia	Látex	Látex – 3,76	uva	não (slgE uva negativa)
14	10, F	Coco: urticária Kiwi: SAO	Látex, ácaros, gramíneas	Látex – 2,35 Der p, Der f >100 Lolium – 19,4 Phleum – 2,74	Coco, kiwi, banana, ananás, melão, manga	Coco – 15,1 kiwi – 0,9
15	29, F	Castanha: urticária	Látex	Látex – 4,03	Castanha	NR

TC: testes cutâneos por picada; Der p: *Dermatophagoides pteronyssinus*; Der f: *Dermatophagoides farinae*; NR: não realizado

Um doente apresentava alergia IgE-mediada a frutos da família *Rosaceae*, com anafilaxia desencadeada pela ingestão de maçã e edema labial com a ingestão de pêssego, sem polinose associada (Quadro 3).

Os resultados obtidos com a metodologia ImmunoCAP ISAC® encontram-se sumarizados no Quadro 4. De realçar a presença de anticorpos slgE para: tropomiosina (Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Hel as 1, Per a 7, Ani s 3) em 4 dos 7 doentes com síndrome ácaros-crustáceos-moluscos; alergénios do látex implicados na reactividade cruzada com alimentos (Hev b 6.02, Hev b 5, Hev b 11) em 7 dos 8

profilins (Bet v 2, Cyn d 12, Hev b 8, Mer a 1) and lipid transfer proteins – LTPs (Par j 2, Pru p 3) in, respectively, 2/8 and 4/8 patients with pollen-fruit/vegetable syndrome; iv) LTPs (Pru p 3) in the patient with allergy to *Rosaceae* fruits.

In selected cases, the study was complemented with UniCAP®100 investigation into molecular allergens. In patients 2, 4 and 5, shrimp (rPen a 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (rDer p 10) tropomyosins were investigated, in patients 16 and 20 birch (rBet v 2) and *Phleum pratense* (rPhl p 12) profilins; all with negative results.

Table 2. Characteristics of the eight patients with food allergy within the context of likely latex-fruit syndrome

Patient	Age (yrs), sex	Food allergy (food / clinical picture)	SPT positive to aeroallergens	slgE positive to aeroallergens (kU/L)	SPT positive to food allergens	slgE positive to food allergens (kU/L)
8	44, F	Chestnut, banana, passion fruit: anaphylaxis Peach, pineapple, plum, spinach, tomato: urticaria	Latex	Latex – 22.3	Chestnut, banana, passion fruit, peach, pineapple, plum, avocado, mango, fig, spinach, tomato	Passion fruit – 0.65
9	31, F	Chestnut, avocado: OAS	Latex, cat	Latex – 27.3 cat – 5.57	Chestnut, avocado, passion fruit	no (slgE negative to chestnut, avocado and passion fruit)
10	44, F	Chestnut: anaphylaxis Kiwi: asthma	Latex	Latex – 51.9	Chestnut, kiwi, passion fruit, pineapple	Chestnut – 0.5, Passion fruit – 5.48
11	46, F	Peach: urticaria	Latex, mites	Latex – 8.86 Der p – 66.1 Der f – 26.1	Peach, avocado, chestnut, passion fruit	Peach – 14.2 Passion fruit – 0.36
12	29, F	Chestnut, passion fruit: anaphylaxis Banana: OAS	Latex, mites	Latex – 16.5 Der p – 8.84 Der f – 1.77	Chestnut, passion fruit, banana, kiwi, avocado, papaya, peach, spinach	Passion fruit – 1
13	30, F	Grape: anaphylaxis	Latex	Latex – 3.76	grape	no (slgE negative to grape)
14	10, F	Coconut: urticaria Kiwi: OAS	Latex, mites, grass	Latex – 2.35 Der p, Der f > 100 Lolium – 19.4 Phleum – 2.74	Coconut, kiwi, banana, pineapple, melon, mango	Coconut – 15.1 kiwi – 0.9
15	29, F	Chestnut: urticaria	Latex	Latex – 4.03	Chestnut	NP

SPT: skin prick tests; Der p: Dermatophagoides pteronyssinus; Der f: Dermatophagoides farinae; NP: not performed

doentes com síndrome látex-frutos; profilinas (Bet v 2, Cyn d 12, Hev b 8, Mer a 1) e proteínas de transferência de lípidos – LTPs (Par j 2, Pru p 3) em, respectivamente, 2 e 4 dos 8 doentes com síndrome pólenes-frutos/vegetais; LTPs (Pru p 3) no doente com alergia a frutos *Rosaceae*.

Em casos seleccionados, o estudo foi complementado com a pesquisa de alérgenos moleculares por UniCAP® 100: nos doentes 2, 4 e 5 foi pesquisada tropomiosina de ca-

DISCUSSION

House-dust mite-crustaceans-molluscs syndrome is a clinical entity whose basis is the phenomenon of cross-reactivity between aeroallergens and food allergens, classically attributed to the panallergen tropomyosin. Tropomyosins, muscular proteins found throughout the animal kingdom with a molecular weight of 32-41 kDa, are im-

Quadro 3. Características dos 8 doentes com alergia alimentar no contexto de provável síndrome pólenes-frutos/vegetais e do doente com alergia a rosáceas sem polinose associada.

Doente	Idade (anos), sexo	Alergia alimentar (alimento / clínica)	TC positivos aeroalergénios	slgE positivas aeroalergénios (kU/L)	TC positivos alergénios alimentares	slgE positivas alergénios alimentares (kU/L)
16	17, M	Maçã, melão, pêra, laranja, uva: SAO	Gramíneas, oliveira, plantago, bétula, ácaros, alternária	<i>Lolium</i> – 6,28 <i>Phleum</i> – 4,43	Maçã, melão, pêra, meloa, laranja, uva, banana, cereja, pinhão	não (slgE maçã, melão, pêra, laranja e uva negativas)
17	39, F	Manga: anafilaxia Melão, banana, cenoura: SAO	Artemísia, gramíneas, parietária, plantago, quenopódio, ácaros, cão	Artemísia – 94,3 <i>Lolium</i> – 4,03 <i>Phleum</i> – 0,47 Der p – 0,6	Manga, cenoura	não (slgE manga, cenoura, banana e melão negativas)
18	17, M	Pêssego: SAO	Gramíneas, ácaros	<i>Lolium</i> – 1,78 <i>Phleum</i> – 1,03 Der p – 15,3 Der f – 4,8	Pêssego	Pêssego – 0,64
19	17, M	Pêssego, laranja: SAO Melão: angioedema Amendoim: vômitos	Gramíneas, artemísia, quenopódio, plátano, ácaros	<i>Lolium</i> – 7 <i>Phleum</i> – 3 Der p – 13,5	Pêssego, amendoim, amêndoa, avelã, noz, pistácio, pinhão	Pêssego – 2,8 amendoim – 1,41 avelã – 3,33 noz – 0,5
20	7, M	Kiwi: urticária	Gramíneas, parietária, plátano, bétula, ácaros	<i>Lolium</i> – 3,51 <i>Phleum</i> – 2,06 parietária – 2,5 Der p – 78,1	Kiwi	Kiwi – 3,46
21	12, M	Salsa, coentros, hortelã, feijão verde: urticária Agrião, espinafre: eczema Ervilha, aipo: recusa alimentar	Artemísia	Artemísia – 7,84	Salsa, coentros, hortelã, feijão verde, agrião, espinafre, ervilha, aipo	Salsa – 3,3 coentros – 0,6 feijão verde – 9,5 espinafre – 1 ervilha – 0,6 aipo – 0,55
22	28, F	Pêssego, maçã: urticária Romã: angioedema Amêndoa, noz: SAO	Parietária, gramíneas	Parietária – 77,9 <i>Lolium</i> – 6,05 <i>Phleum</i> – 1,79	Pêssego, maçã, cereja, romã	Pêssego – 0,79
23	35, M	Melão, meloa, pêssego, manga: SAO	Gramíneas, parietária, oliveira, ácaros	<i>Lolium</i> – 6,36 <i>Phleum</i> – 4,53 parietária – 3,32 oliveira – 2,56 Der p – 9,9 Der f – 10,7	Melão, manga	NR
24	17, M	Maçã: anafilaxia Pêssego: angioedema	não (TC aeroalergénios negativos)	NR	Maçã, pêssego, cereja, ameixa	Maçã – 0,54 pêssego – 0,93 cereja – 1,28 ameixa – 0,68

TC: testes cutâneos por picada; Der p: *Dermatophagoides pteronyssinus*; Der f: *Dermatophagoides farinae*; NR: não realizado

Table 3. Characteristics of the eight patients with food allergy within the context of likely pollen-fruit/vegetable syndrome and the patient with allergy to Rosaceae fruits with no associated pollinosis

Patient	Age (yrs), sex	Food allergy (food / clinical picture)	SPT positive to aeroallergens	slgE positive to aeroallergens (kU/L)	SPT positive to food allergens	slgE SPT positive to food allergens (kU/L)
16	17, M	Apple, melon, pear, orange, grape: OAS	Grass, olive, plantain, birch, mites, alternaria	Lolium – 6.28 Phleum – 4.43	Apple, melon, pear, honey melon, orange, grape, banana, cherry, pine nut	no (slgE apple, melon, pear, orange and grape negative)
17	39, F	Mango: anaphylaxis Melon, banana, carrot: OAS	Mugwort, grass, pellitory plant, plantain, chenopod, mites, dog	Mugwort – 94.3 Lolium – 4.03 Phleum – 0.47 Der p – 0.6	Mango, carrot	no (slgE mango, carrot, banana and melon negative)
18	17, M	Peach: OAS	Grass, mites	Lolium – 1.78 Phleum – 1.03 Der p – 15.3 Der f – 4.8	Peach	Peach – 0.64
19	17, M	Peach, orange: OAS Melon: angioedema Peanut: vomiting	Grass, mugwort, chenopod, plane tree, mites	Lolium – 7 Phleum – 3 Der p – 13.5	Peach, peanut, almond, hazelnut, walnut, pistachio, pine nut	Peach – 2.8 peanut – 1.41 hazelnut – 3.33 walnut – 0.5
20	7, M	Kiwi: urticaria	Grass, pellitory plant, plane tree, birch, mites	Lolium – 3.51 Phleum – 2.06 Pellitory plant – 2.5 Der p – 78.1 Der f – 87.9	Kiwi	Kiwi – 3.46
21	12, M	Parsley, coriander, mint, green bean: urticaria Cress, spinach: eczema Pea, celery: refusal to eat	Mugwort	Mugwort – 7.84	Parsley, coriander, mint, green bean, cress, spinach, pea, celery	Parsley – 3.3 coriander – 0.6 green bean – 9.5 spinach – 1 pea – 0.6 celery – 0.55
22	28, F	Peach, apple: urticaria Pomegranate: angioedema Almond, walnut: OAS	Pellitory plant, grass	Pellitory plant – 77.9 Lolium – 6.05 Phleum – 1.79	Peach, apple, cherry, pomegranate	Peach – 0.79
23	35, M	Melon, honey melon, peach, mango: OAS	Grass, pellitory plant, olive, mites	Lolium – 6.36 Phleum – 4.53 Pellitory plant – 3.32 Olive – 2.56 Der p – 9.9 Der f – 10.7	Melon, mango	NP
24	17, M	Apple: anaphylaxis Peach: angioedema	no (SPT negative to aeroallergens)	NP	Apple, peach, cherry, plum	Apple – 0.54 peach – 0.93 cherry – 1.28 plum – 0.68

SPT: skin prick tests; Der p: Dermatophagoides pteronyssinus; Der f: Dermatophagoides farinae; NP: not performed

Quadro 4. Resultados positivos no ImmunoCAP ISAC® (versão CRD-89, VBC-Genomics, Viena, Áustria)

Table 4. Positive results using ImmunoCAP ISAC® (version CRD-89, VBC-Genomics, Vienna, Austria)

Doente/ Patient	ImmunoCAP ISAC®/ImmunoCAP ISAC®
SÍNDROME ÁCAROS-CRUSTÁCEOS-MOLUSCOS*/ HOUSE-DUST MITE-CRUSTACEANS-MOLLUSCS SYNDROME*	
1	Der p 2, Der f 2, Pla a 2, Api m 4, Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Hel as 1, Per a 7, Ani s 3
2	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2, Der s 1
3	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2, Fel d 1, Lol p 1, Phl p 1, Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Hel as 1, Per a 7, Ani s 3
4	Der p 1, Der f 1, Der s 1, Fel d 1
5	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2, Der s 1, Lol p 1, Phl p 1, Can f 1
6	Der p 2, Der f 2, Phl p 1, Pla a 2, Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Ani s 3
7	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2, Phl p 7, Pla a 1, Pla a 2, Hev b 5, Gal d 2, Gal d 3, Bos d 4, Bos d 5, Bos d 6, Bos d lactoferrin, Asp f 1, Can f 3, Pru p 3, Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Ani s 3
SÍNDROME LÁTEX-FRUTOS*/LATEX-FRUIT SYNDROME*	
8	Hev b 6.02, Hev b 5
9	Der f 2, Fel d 1, Hev b 6.02, Hev b 5
10	Hev b 6.02, Hev b 5, Hev b 11
11	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2, Der s 1, Lol p 1, Phl p 1
12	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2, Hev b 6.02, Hev b 5
13	Hev b 6.02, Hev b 5
14	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2, Der s 1, Lol p 1, Phl p 1, Hev b 6.02
15	Hev b 5, Hev b 6.02
SÍNDROME PÓLENES-FRUTOS/VEGETAIS*/POLLEN-FRUIT/VEGETABLE SYNDROME*	
16	Phl p 2, Alt a 1, Api m 4
17	Lol p 1, Phl p 1, Art v 1, Gal d 4, Api m 4, Cyn d 12
18	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2, Der s 1, Phl p 1, Pru p 3
19	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2, Lol p 1, Phl p 1, Pru p 3
20	Der p 1, Der f 1, Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Hel as 1, Per a 7, Ani s 3, Lol p 1, Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Hor v 17, Cup a 1, Ole e 1, Pla a 2, Act d 1, Act d 7, Ana c 2, Gal d 4, Api m 1, Api m 4
21	Pru p 3
22	Phl p 1, Api m 4, Par j 2, Pru p 3
23	Der p 1, Der p 2, Der f 1, Der f 2, Phl p 1, Phl p 5, Ole e 1, Bet v 2, Hev b 8, Mer a 1
ALERGIA A FRUTOS DA FAMÍLIA ROSACEAE*/ ALLERGY TO ROSACEAE FRUITS*	
24	Pru p 3

* Os alérgenos implicados na síndrome clínica de reactividade cruzada estão realçados a **negrito** / The allergens implicated in the clinical cross-reactivity syndrome are highlighted in **bold**

marão (rPen a 1) e de *Dermatophagoides pteronyssinus* (rDer p 10); nos doentes 16 e 20 foi pesquisada profilina de bétula (rBet v 2) e de *Phleum pratense* (rPhl p 12) – todos os resultados foram negativos.

DISCUSSÃO

A síndrome ácaros-crustáceos-moluscos constitui uma entidade clínica que tem por base um fenómeno de reactividade cruzada entre aeroalergénios e alergénios alimentares, classicamente atribuído a um panalergénio – tropomiosina. As tropomiosinas, proteínas musculares ubíquias no reino animal, com um peso molecular de 32–41 kDa, são alergénios importantes em várias espécies de invertebrados: artrópodes (crustáceos, aracnídeos e insectos), moluscos e nemátodos²²⁻²⁴. Deste modo, comportam-se como panalergénios envolvidos em fenómenos de reactividade cruzada entre estes animais, podendo a sensibilização primária ocorrer por via inalatória (aeroalergénios) ou digestiva (são estáveis e resistem a temperaturas elevadas e à acção enzimática digestiva)^{9,22,25}. Constituem alergénios *major* na alergia alimentar a invertebrados do filo *Arthropoda* (crustáceos) e do filo *Mollusca* (gastrópodes, bivalves e cefalópodes) que representa, na nossa população, a principal causa de alergia alimentar em idade adulta. Os sintomas variam desde SAO, urticária, angioedema, até anafilaxia^{9,22} e podem ocorrer após ingestão, contacto mucocutâneo ou inalação de vapores de cozedura.

Foi identificada uma outra proteína alergénica *major* de 40 kDa no camarão *Penaeus monodon* (Pen m 2) e *Litopenaeus vannamei* (Lit v 2), que corresponde a uma arginina cinase²⁶. Alguns autores apontam a possibilidade desta arginina cinase se tratar de um panalergénio existente noutros invertebrados como barata (Bla g 9, Per a 9) e bicho-da-seda (Bomb m 1)^{26,27}. Ayuso e colaboradores demonstraram a existência de um outro alergénio *major* do camarão *Litopenaeus vannamei*: uma proteína de 20 kDa, identificada como pertencente à cadeia leve da miosina (Lit v 3), com elevada homologia de aminoácidos com a Bla g 8 da barata²⁸.

portant allergens in various invertebrate species, such as arthropods (crustaceans, arachnids and insects), molluscs and nematodes²²⁻²⁴. They behave as the panallergens involved in cross-reactivity phenomena between these animal allergens, with primary sensitisation likely to occur via inhalation (aeroallergens) or digestion. They are stable and resistant to high temperatures and to the digestive enzyme action^{9,22,25}. They are the *major* allergens found in food allergy to invertebrates of the phylum *Arthropoda* (crustaceans) and *Mollusca* (gastropods, bivalves and cephalopods), which represent in our population the main cause of food allergy in adults. Symptoms range from OAS, urticaria, angioedema and even anaphylaxis^{9,22} and can occur on ingestion, mucocutaneous contact or inhalation of steam from cooking.

Another *major* allergenic protein of 40 kDa has been identified in shrimp *Penaeus monodon* (Pen m 2) and *Litopenaeus vannamei* (Lit v 2), corresponding to an arginine kinase²⁶. Some authors feel this arginine kinase is a panallergen existing in other invertebrates such as cockroach (Bla g 9, Per a 9) and silkworm (Bomb m 1)^{26,27}. Ayuso *et al.* demonstrated the existence of another *major* shrimp *Litopenaeus vannamei* allergen: a protein of 20 kDa, belonging to the myosin light chain (Lit v 3), with high homology with the Bla g 8 of cockroach²⁸.

In the group of seven patients whose symptoms suggested house-dust mite-crustaceans-molluscs syndrome, antibodies for tropomyosins (Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Hel as 1, Per a 7, Ani s 3) were detected in four cases (patients 1, 3, 6 and 7). The identification of this panallergen using ImmunoCAP ISAC® technology allowed confirmation in these patients of the clinical suspicion of cross-reactivity, obviating recourse to inhibition techniques which are more difficult to perform in routine clinical practice, with important implications, namely in terms of eviction diets. The likely explanations for the remaining three cases (patients 2, 4 and 5), in whom the determination of recombinant tropomyosin (rPen a 1, rDer p 10) was also negative, are: (i) cross-reactivity involving other allergenic

No grupo de 7 doentes com sintomatologia sugestiva de síndrome ácaros-crustáceos-moluscos foram detectados anticorpos para tropomiosinas (Der p 10, Pen i 1, Pen m 1, Hel as 1, Per a 7, Ani s 3) em 4 casos (doentes 1, 3, 6 e 7). A identificação deste panalergénio através da tecnologia ImmunoCAP ISAC® permitiu confirmar, nestes doentes, a suspeição clínica da existência de reactividade cruzada, obviando o recurso a técnicas imunológicas de inibição mais difíceis de executar na prática clínica diária, com importantes implicações, nomeadamente em termos de dietas de evicção. As explicações possíveis para os restantes 3 casos (doentes 2, 4 e 5), em que a determinação de tropomiosina recombinante (rPen a 1, rDer p 10) foi também negativa, são: (i) reactividade cruzada envolvendo outros componentes alergénicos, como a arginina cinase, não incluídos no painel testado^{26,29}; (ii) ausência de algumas tropomiosinas do painel de alergénios testados^{22,29}; (iii) sensibilizações independentes, não estando subjacente mecanismo de reactividade cruzada²⁹.

A síndrome látex-frutos resulta da reactividade cruzada entre proteínas existentes no látex e em vários frutos e outros vegetais. Até à data estão identificados e caracterizados 13 alergénios do látex, denominados Hev b 1 a Hev b 13³⁰. As proteínas envolvidas na maioria das situações de reactividade cruzada entre o látex e vários frutos e vegetais pertencem ao grupo das proteínas de defesa (PR) e comportam-se como panalergénios: Hev b 2 (β -1,3-glucanase) e Hev b 6 (heveína) são alergénios *major* do látex; Hev b 7 (patatina), Hev b 11 (quitinase de classe I) e Hev b 12 (LTP) são alergénios *minor*. Hev b 5, proteína estrutural, cuja concentração é superior no látex processado relativamente ao látex natural, é um alergénio *major* que tem sido também implicado na reactividade cruzada com alimentos. Hev b 8 é um alergénio *minor* do látex pertencente ao grupo das profilinas (proteínas estruturais), sendo responsável por fenómenos de reactividade cruzada com profilinas da banana e de pólenes – bétula, ambrósia e gramíneas; apesar de responsável por reactividade cruzada imunológica, não apresenta habitualmente implicações clínicas³⁰.

components, such as arginine cinase, which are not included in the panel tested^{26,29}; (ii) the absence of some tropomyosins from the panel of allergens tested^{22,29}; (iii) independent sensitisations, with no underlying cross-reactivity mechanism²⁹.

Latex-fruit syndrome results from the cross-reactivity between the proteins in latex and in various fruits and other vegetables. Thirteen latex allergens have been identified and characterised to date – Hev b 1 to Hev b 13³⁰. The proteins involved in the majority of situations of cross-reactivity between latex and various fruits and vegetables belong to the group of defence proteins (PR) and behave as panallergens: Hev b 2 (β -1,3-glucanase) and Hev b 6 (hevein), which are *major* latex allergens and Hev b 7 (patatin), Hev b 11 (class I chitinase) and Hev b 12 (LTP), which are *minor* allergens. Hev b 5, a structural protein whose concentration is higher in processed than natural latex, is a *major* allergen that has also been implicated in cross-reactivity with foods. Hev b 8 is a *minor* latex allergen belonging to the group of profilins (structural proteins), responsible for phenomena of cross-reactivity with profilins of banana and pollen of birch, ambrosia and grass and, although responsible for immunological cross-reactivity, does not normally have clinical implications³⁰.

The different routes of exposure that can lead to sensitisation allow us to consider risk groups with specific latex sensitisation patterns³⁰. When sensitisation occurs by occupational exposure, with contact maintained via cutaneous and inhalatory routes (as in healthcare professionals), the *major* latex allergens are Hev b 2, Hev b 5, Hev b 6 and Hev b 13 and the latex-fruit syndrome frequently occurs and manifests in the majority of cases by anaphylaxis³¹. In spina bifida patients (exposure by multiple surgeries performed at an early age), the *major* latex allergens are Hev b 1 and Hev b 3 and the latex-fruit syndrome is rare and when it occurs is not usually the cause of severe allergic reactions³¹.

In seven of the eight patients whose clinical pictures suggested latex-fruit syndrome, corresponding almost all

As diferentes vias de exposição que podem conduzir à sensibilização permitem-nos considerar grupos de risco com padrões de sensibilização específicos a determinadas proteínas do látex³⁰. Quando a sensibilização ocorre por exposição ocupacional, com contacto mantido por via cutânea e inalatória (como nos profissionais de saúde), os alérgenos *major* do látex são Hev b 2, Hev b 5, Hev b 6 e Hev b 13 e, a síndrome látex-frutos é frequente e manifesta-se na maioria dos casos por anafilaxia³¹. Nos doentes com espinha bífida (exposição por múltiplas cirurgias, efectuadas em idade precoce), os alérgenos *major* do látex são Hev b 1 e Hev b 3 e a síndrome látex-frutos é rara e quando ocorre raramente é causa de reacções alérgicas graves³¹.

Em 7 dos 8 doentes com situações clínicas sugestivas da síndrome látex-frutos, correspondendo na quase totalidade a doentes alérgicos ao látex por exposição ocupacional, confirmou-se a presença de anticorpos sIgE para alérgenos do látex implicados na reactividade cruzada com alimentos (Hev b 6.02, Hev b 5 e Hev b 11). A identificação destes alérgenos pelo ImmunoCAP ISAC[®] teve importantes repercussões clínicas, reforçando a instituição de dietas de evicção rigorosas, pela gravidade associada, e seleccionando potenciais candidatos para imunoterapia específica ao látex.

A síndrome de reactividade cruzada pólenes-frutos/vegetais engloba múltiplas associações^{24,32} (como, por exemplo, bétula-maçã, artemísia-aipo-cenoura-especiarias, gramíneas-Rosaceae), tendo subjacente à maioria dos casos panalergénios: proteínas PR-10 (homólogas à Bet v 1), LTPs, profilinas, proteínas de armazenamento e determinantes carbo-hidrato envolvidos em reactividade cruzada (CCD)⁴. É crescente o número de alimentos envolvidos nestas síndromes, bem como a necessidade de conhecer os mecanismos moleculares subjacentes⁴. A classificação dos alérgenos de origem vegetal em famílias e superfamílias com base nas suas características estruturais e funcionais oferece um importante contributo para o estudo e previsão de potenciais alérgenos³³.

O espectro de manifestações clínicas é vasto, indo desde reacções ligeiras, como SAO, até anafilaxia, dependendo

to latex allergic patients by occupational exposure, the presence of sIgE antibodies to latex allergens implicated in cross-reactivity to foods was confirmed (Hev b 6.02, Hev b 5 and Hev b 11). The identification of these allergens using ImmunoCAP ISAC[®] had important clinical repercussions, underlining the institution of strict eviction diets and selecting potential candidates for specific immunotherapy to latex.

The pollen-fruit/vegetables cross-reactivity syndrome comprises multiple associations^{24,32} (such as, for instance, birch-apple, mugwort-celery-carrot-spices, grass-Rosaceae), with panallergens underlying the majority of cases: PR-10 proteins (homologous to Bet v 1), LTPs, profilins, storage proteins and carbohydrate determinants involved in cross-reactivity (CCD)⁴. The number of foods involved in these syndromes is increasing, as is the need to understand the underlying molecular mechanisms⁴. The classification of the origin of vegetable allergens in families and superfamilies, based on their structural and functional characteristics, is an important contribution to the study and prediction of potential allergens³³.

The spectrum of clinical manifestations is vast, ranging from mild reactions such as OAS to anaphylaxis, depending on the panallergen implicated. In pollen-fruit/vegetable cross-reactivity cases, the institution of specific immunotherapy for pollens using recombinant allergens may lead to both a marked improvement in pollinosis-related respiratory symptoms and those related to food allergy^{3,5}.

In the group of eight patients with symptoms suggesting pollen-fruit/vegetable syndrome, antibodies for profilins (Bet v 2, Cyn d 12, Hev b 8, Mer a 1) were detected in two cases (patients 17 and 23) and antibodies for LTPs (Par j 2, Pru p 3) in four (patients 18, 19, 21 and 22). The identification of these allergens allowed confirmation of suspected food allergy cross-reactivity, with implications for eviction diets. These are of stricter necessity in the cases in which the LTPs, risk markers of greater clinical severity, are the panallergens implicated and in the selection of

do panalergénio implicado. Nos casos de reactividade cruzada pólenes-frutos/vegetais, admite-se que a instituição de imunoterapia específica para pólenes utilizando recombinantes alergénicos conduza não só a uma melhoria significativa dos sintomas respiratórios relacionados com a polinose, mas também dos sintomas relacionados com a alergia alimentar^{3,5}.

No grupo de 8 doentes com sintomatologia sugestiva de síndrome pólenes-frutos/vegetais foram detectados anticorpos para profilinas (Bet v 2, Cyn d 12, Hev b 8, Mer a 1) em 2 casos (doente 17 e 23) e anticorpos para LTPs (Par j 2, Pru p 3) em 4 casos (doentes 18, 19, 21 e 22). A identificação destes alergénios permitiu confirmar a suspeição de alergia alimentar em contexto de reactividade cruzada, com implicações em termos de dietas de evicção, necessariamente mais rigorosas nos casos em que as LTPs, marcador de risco de maior gravidade clínica, são os panalergénios implicados e na selecção de potenciais candidatos a imunoterapia específica. Como referido anteriormente, algumas explicações possíveis para os resultados obtidos nos outros 2 casos (doentes 16 e 20) prendem-se com a possibilidade da reactividade cruzada envolver outros componentes alergénicos que não estão incluídos no painel testado ou de se tratar de sensibilizações independentes, não estando subjacente mecanismo de reactividade cruzada.

Os frutos da família *Rosaceae* incluem o pêssego, alperce, ameixa, amêndoa e cereja (subfamília *Prunoideae*), maçã e pêra (subfamília *Pomoideae*), morango e amora (subfamília *Rosoideae*). Constituem parte integrante da dieta mediterrânica, estando associados a reacções alérgicas quer em contexto de sensibilização primária, quer de reactividade cruzada com aeroalergénios (polinose) ou com outros frutos/vegetais^{9,34}. Os alergénios predominantemente implicados na alergia a rosáceas pertencem a 3 grandes grupos de proteínas homólogas:

(i) proteínas homólogas da Bet v 1 (PR-10). São exemplos a Mal d 1 (alergénio *major* da maçã), Pyr c 1 (pêra), Pru ar 1 (alperce) e Pru av 1 (cereja). Estão envolvidas na

potential candidates for specific immunotherapy. As stated above, some possible explanations for the results gleaned in the other two cases (patients 16 and 20) centre on the likelihood of cross-reactivity involving other allergenic components which are not part of the panel tested or they may be independent sensitisations, with no underlying cross-reactivity mechanism.

Fruits of the *Rosaceae* family include peach, apricot, plum, almond and cherry (*Prunoideae* subfamily), apple and pear (*Pomoideae* subfamily), strawberry and blackberry (*Rosoideae* subfamily). They are an integral part of the Mediterranean diet and are associated with allergic reactions in terms of both primary sensitisation and cross-reactivity with aeroallergens (pollinosis) or with other fruit/vegetables^{9,34}. The allergens predominantly implicated in allergy to *Rosaceae* fruits belong to 3 large groups of homologous proteins:

- (i) Homologous proteins to Bet v 1 (PR-10). Examples are Mal d 1 (apple *major* allergen), Pyr c 1 (pear), Pru ar 1 (apricot) and Pru av 1 (cherry). They are involved in cross-reactivity with aeroallergens, particularly birch pollen (relevant in central and northern Europe), and the most characteristic clinical manifestation is OAS;
- (ii) Homologous proteins to Bet v 2 (Profilins). Examples are Mal d 2 (apple), Pyr c 4 (pear), Pru av 4 (cherry) and Pru p 4 (peach). They are responsible for cross-reactivity with aeroallergens, particularly grass pollen (relevant in Mediterranean countries), also often giving rise to OAS;
- (iii) Lipid transfer proteins – LTPs (PR-14). Examples are Mal d 3 (apple), Pru p 3 (peach), Pru ar 3 (apricot), Pru av 3 (cherry) and Pru d 3 (plum). They are plant defence proteins, resistant to high temperatures, acid pH and digestive enzymes, involved in cross-reactivity with aeroallergens (mugwort pollen) and with other fruits and vegetables. These panallergens are usually the cause of severe systemic reactions^{9,34,35}.

reactividade cruzada com aeroalergénios, sobretudo pólen de bétula (relevante na Europa Central e do Norte), cuja manifestação clínica mais característica consiste na SAO;

- (ii) proteínas homólogas da Bet v 2 (profilinas). São exemplos a Mal d 2 (maçã), Pyr c 4 (pêra), Pru av 4 (cereja) e Pru p 4 (pêssego). São responsáveis por reactividade cruzada com aeroalergénios, sobretudo pólen de gramineas (relevante nos países mediterrânicos), também originando frequentemente SAO;
- (iii) proteínas de transferência de lípidos – LTPs (PR-I4). São exemplos a Mal d 3 (maçã), Pru p 3 (pêssego), Pru ar 3 (alperce), Pru av 3 (cereja) e Pru d 3 (ameixa). São proteínas de defesa, resistentes a temperaturas elevadas, ao pH ácido e a enzimas digestivas, envolvidas na reactividade cruzada com aeroalergénios (pólen de artemisia) e com outros frutos e vegetais. Estes panalergénios são geralmente causadores de reacções sistémicas graves^{9,34,35}.

Relativamente ao doente 24, com alergia a frutos da família *Rosaceae*, sem polinose associada, confirmou-se a presença de anticorpos IgE para LTP de pêssego (Pru p 3), conforme vem descrito na literatura e supra-mencionado.

CONCLUSÕES

A análise simultânea de múltiplos alergénios em *microarray* fornece informações importantes acerca de potenciais relações imunológicas entre moléculas alergénicas homólogas, permitindo identificar ou excluir padrões de reactividade clínica e orientar a abordagem diagnóstica e terapêutica.

A identificação dos panalergénios implicados nas síndromes clínicas de reactividade cruzada em 18 doentes com alergia alimentar, vem demonstrar a utilidade deste novo teste diagnóstico *in vitro* como adjuvante na confirmação deste tipo de situações, obviando o

In patient 24, with allergy to *Rosaceae* fruits with no associated pollinosis, the presence of IgE antibodies for peach LTP (Pru p 3) was confirmed, in line with that described in the literature and above mentioned.

CONCLUSIONS

The simultaneous microarray analysis of multiple allergens supplies important information on possible immunological relationships between homologous allergenic molecules, allowing the identification or ruling out of clinical reactivity patterns and guiding the diagnostic approach and treatment.

The identification of the panallergens implicated in the cross-reactivity syndromes in 18 patients with food allergy demonstrates the usefulness of this new *in vitro* diagnostic test in the confirmation of this type of situations, obviating recourse to immunological inhibition techniques that are more difficult to perform in routine clinical practice, being usually restricted to investigation centres. The microarray test reveals a whole picture comprehensive analysis, which allows each patient's sensitisation pattern to be determined.

ACKNOWLEDGEMENT

To Phadia Portugal for the collaboration and support.

Funding: None.

Conflict of interest disclosure: None.

recurso a técnicas imunológicas de inibição mais difíceis de executar na prática clínica, habitualmente apenas efectuadas em centros de investigação. O teste diagnóstico em *microarray* disponibiliza uma visão holística, permitindo determinar o padrão de sensibilização de cada doente.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento à Phadia Portugal pela colaboração e apoio.

Financiamento: Nenhum.

Declaração de conflitos de interesse: Nenhum.

Contacto/Contact:

Ângela Gaspar

Serviço de Imunoalergologia, Hospital de Dona Estefânia

Rua Jacinta Marto, 1169-045 Lisboa

Telefone: +351 213126653; Fax: +351 213126654

E-mail: angela.gaspar@sapo.pt

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:805-19.
2. Breiteneder H, Ebner C. Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 27-36.
3. Egger M, Mutschlechner S, Wopfner N, Gadermaier G, Briza P, Ferreira F. Pollen-food syndromes associated with weed pollinosis: an update from the molecular point of view. *Allergy* 2006; 61: 461-76.
4. Sicherer SH. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 881-90.
5. Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 2004; 59:243-67.
6. Bonds R, Midoro-Horiuti T, Goldblum R. A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2008; 8: 82-6.
7. Aalberse RC, Akkerdaas J, van Ree R. Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens. *Allergy* 2001; 56:478-90.
8. Yagami T. Allergies to cross-reactive plant proteins latex-fruit syndrome is comparable with pollen-food allergy syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128:271-9.
9. Carrapatoso I. Grupos de alimentos com maior reactividade cruzada: artigo de revisão. *Rev Port Imunoalergologia* 2004; 12:103-13.
10. Asero R. Plant food allergies: a suggested approach to allergen-resolved diagnosis in the clinical practice by identifying easily available sensitization markers. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138:1-11.
11. Harwanegg C, Hiller R. Protein microarrays in diagnosing IgE-mediated diseases: spotting allergy at the molecular level. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4:89-98.
12. Wöhrl S, Vigl K, Zehetmayer S, Hiller R, Jarisch R, Prinz M, et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy* 2006; 61:633-9.
13. Jahn-Schmid B, Harwanegg C, Hillerw R, Bohle B, Ebner C, Scheiner O, et al. Allergen microarray: comparison of microarray using recombinant allergens with conventional diagnostic methods to detect allergen-specific serum immunoglobulin E. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:1443-9.
14. Pauli G, Metz-Favre C, Fontaine JF. Food allergens that cross-react with pollen allergens. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 2006; 46:153-7.
15. Pittner G, Vrtala S, Thomasw WR, Weghofer M, Kundiz M, Horak F, et al. Component-resolved diagnosis of house-dust mite allergy with purified natural and recombinant mite allergens. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:597-603.
16. Lopes A, Pereira-Santos MC. Alergia alimentar: IV. Doseamentos de IgE específica e estudo da reactividade cruzada. *Rev Port Imunoalergologia* 2009; 17(Supl 1):24-9.

17. Valenta R, Lidholm J, Niederberger V, Hayek B, Kraft D, Grönlund H. The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT). *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 896-904.
18. Kazemi-Shirazi L, Niederberger V, Linhart B, Lidholm J, Kraft D, Valenta R. Recombinant marker allergens: diagnostic gatekeepers for the treatment of allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127: 259-68.
19. 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.
20. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update. *Allergy* 2008; 63 (Suppl 86): 8-160.
21. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008; 31: 143-78.
22. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119: 247-58.
23. Lehrer SB, Ayuso R, Reese G. Seafood allergy and allergens: a review. *Mar Biotechnol* (NY) 2003; 5: 339-48.
24. Borrego LM, Gaspar A, Pires G. Reactividade cruzada. In: Rosado Pinto J, Morais de Almeida M (Eds.). *A criança asmática no mundo da alergia*. Miraflores: Euromédice Edições Médicas Lda; 2003: 313-8.
25. Marinho S, Morais-Almeida M, Gaspar A, Santa-Marta C, Pires G, Postigo I, et al. Barnacle allergy: allergen characterization and cross-reactivity with mites. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006; 16: 117-22.
26. García-Orozco K, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, Calderón-de-la-Barca AM, Sotelo-Mundo RR. Molecular characterization of arginine cinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 144: 23-8.
27. Zhigang L, Lixin X, Yulan W, Qingyou X, Jiajie C, Kenneth R. Identification and characterization of an arginine cinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *Int Arch Allergy Immunol* 2009; 150: 8-14.
28. Ayuso R, Grishina G, Bardina L, et al. Myosin light chain is a novel shrimp allergen, Lit v 3. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 795-802.
29. Lopata AL, Lehrer SB. New insights into seafood allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009; 9: 270-7.
30. Gaspar A. Alergénios do látex/Padrões de sensibilização. *Rev Port Imunoalergologia* 2005; 13(Suppl 1): 13-7.
31. Gaspar A, Pires G, Matos V, Loureiro V, Morais-Almeida M, Rosado-Pinto J. Prevalência e factores de risco para a síndrome látex-frutos em doentes com alergia ao látex. *Rev Port Imunoalergologia* 2004; 12: 209-23.
32. Kelso JM. Pollen-food allergy syndrome. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 905-7.
33. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 821-30.
34. Fernández-Rivas M, van Ree R, Cuevas M. Allergy to Rosaceae fruits without related pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 728-33.
35. Borges JP, Barre A, Culierrier R, Granier C, Didier A, Rougé P. Lipid transfer proteins from Rosaceae fruits share consensus epitopes responsible for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365: 685-90.