

**UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA**



MONOGRAFIA

**DIAGNÓSTICO DAS ALERGIAS: O PAPEL DO LABORATÓRIO DE
ANÁLISES CLÍNICAS**

Orientação: Prof.^a Doutora Maria Cristina Marques

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Carina Sofia Medeiros Pavão

Lisboa, 2015

Índice

Resumo/Abstract	5
Lista de abreviaturas	6
1. Introdução	8
2. Hipersensibilidade, alergia e atopia	9
3. Fisiopatologia da alergia	10
4. Diagnóstico da alergia	13
4.1. Determinação da IgE sérica	14
4.1.1. IgE total	14
4.1.2. IgE específica - RAST	15
4.1.2.1. ImmunoCAP [®] – Ensaio imunoenzimático fluorescente	17
4.1.2.2. Limitações da metodologia RAST	19
4.1.2.3. Marcha atópica e Painéis de alergénios - Phadiatop [®]	19
4.2. Determinação de mediadores da resposta alérgica e de marcadores de ativação	21
4.2.1. Ativação de basófilos por estimulação com alergénios	21
4.2.1.1. Libertação de histamina e sulfidoleucotrienos	21
4.2.1.2. Marcadores de ativação e citometria de fluxo	22
4.2.2. Proteína Catiónica Eosinofílica (ECP)	23
4.2.2.1. Teste ImmunoCAP [®] ECP	24
4.2.3. Triptase	25
4.3. Outras metodologias laboratoriais	26
4.3.1. <i>Immunoblotting</i>	26
4.3.2. Hemograma	26
4.3.3. Análise de secreções	27
4.3.3.1. Quantificação de eosinófilos	27
4.3.3.2. Exame microbiológico de secreções	27
4.4. Alergologia molecular: uma nova era no diagnóstico	28
4.4.1. Diagnóstico resolvido por componentes e tecnologia <i>microarray</i>	28
4.4.1.1. Tecnologia <i>microarray</i> – ImmunoCAP [®] ISAC	29
5. Conclusões e perspetivas futuras	32
6. Referências Bibliográficas	34

Índice de figuras

Figura 1 – Fisiopatologia da reação alérgica	10
Figura 2 – Fase de provocação com o alérgeno	12
Figura 3 – Comparação entre Immulite [®] 2000 e ImmunoCAP [®]	16
Figura 4 – FEIA (Thermo Scientific)	17
Figura 5 – Marcha atópica	20
Figura 6 – Plataforma e esquema de hibridação do <i>microarray</i>	30
Figura 7 – Expressão semiquantitativa dos resultados do ISAC [®]	30

Índice de tabelas

Tabela 1 – Patologias que cursam com IgE total elevada	15
Tabela 2 – Interpretação de valores de IgE específica (ImmunoCAP®)	18
Tabela 3 –IgE específica (kU/L) no soro em crianças com valor preditivo de reação clínica superior a 95%	18
Tabela 4 – Propriedades funcionais da ECP.....	24
Tabela 5 – Vantagens e desvantagens de ISAC®, ImmunoCAP® e testes cutâneos	31

Resumo

Um diagnóstico preciso da alergia pode ser completado por testes *in vivo* ou *in vitro* depois da realização de uma completa e clara história clínica. O laboratório de análises clínicas detém um papel importante no diagnóstico e monitorização do paciente alérgico, sobretudo nas situações em que os testes *in vivo* não podem ser realizados ou são inconclusivos.

O exame laboratorial mais utilizado no diagnóstico da alergia é a determinação das IgE específicas no soro e a sua determinação pode ser feita por *singleplex* (monocomponentes) com a tecnologia ImmunoCAP ou, mais recentemente, por *multiplex*, através da tecnologia ISAC (ImmunoCAP Solid-Phase Allergen Chip).

Além desta, existem outras metodologias laboratoriais disponíveis, como o teste de ativação de basófilos com citometria de fluxo, realizado em laboratórios especializados; a medição dos níveis de triptase, que podem confirmar ou excluir uma reação anafilática e a ECP no soro, que pode ser utilizada como indicador de ativação eosinofílica em asmáticos. Este trabalho pretende fazer uma revisão atualizada das metodologias laboratoriais atualmente disponíveis para o diagnóstico da alergia.

Abstract

An accurate allergy diagnosis can be made by means of *in vivo* or *in vitro* tests, after producing a thorough and comprehensive clinical history. Clinical laboratory is of foremost importance for diagnosing and monitoring an allergic patient, especially when *in vivo* tests cannot be conducted or are inconclusive.

The most widely used laboratory test for allergy diagnosis consists in measuring the specific IgE in the serum. The test can be done either by *singleplex* technology or, more recently, by *multiplex*, using ImmunoCAP[®] Solid-Phase Allergen Chip technology.

Other laboratory methodologies can also be used, namely the basophil activation test with cytometry flow, which is performed in specialized laboratories; the measuring of the tryptase levels, which may confirm or rule out an anaphylactic reaction, and the identification of ECP in the serum, which can serve as an indicator of eosinophilic activation in patients suffering from asthma.

This study makes an updated review of laboratory methodologies currently used for allergy diagnosis.

Lista de Abreviaturas

AMP	Adenosina mono-fosfato
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BAT	Teste de ativação de basófilos
Ca	Cálcio
CAST	<i>Cellular allergosorbent test</i>
CD	Cluster of differentiation (nomenclatura para antígenos de membrana)
CRD	<i>Component Resolved Diagnosis</i>
Da	Daltons
EAACI	<i>European Academy of Allergy and Clinical Immunology</i>
ECP	Proteína catiónica eosinofílica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FAST	<i>Flow Cytometric Cellular Allergen Stimulation Test</i>
FcεRI	Recetor de alta afinidade para IgE
FEIA	Ensaio imuno-enzimático fluorescente
gp	glicoproteína
Ig	Imunoglobulina
ISAC	ImmunoCAP [®] <i>Solid-Phase Allergen Chip</i>
ISU-E	<i>ISAC Standardized Units</i>
sIgE	Imunoglobulina do tipo E específica
IL	Interleucina
kU/mL	Kilo unidades por mililitro
LAMP-3	<i>Lysosyme associated membrane protein</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
LT	Leucotrieno
MHC	Complexo major de histocompatibilidade
mm	Milímetro
Ng/mL	Nanogramas por mililitro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas
PD2	Prostaglandina D2

RAST	<i>Radioalleergosorbent test</i>
SPT	<i>Skin Prick test</i>
Th1	Linfócito T <i>helper</i> do tipo 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
WAO	<i>World Allergy Organization</i>
µg/L	Micrograma por litro

1. Introdução

As reações alérgicas atravessam importantes áreas da medicina e atingem na sua heterogeneidade diferentes órgãos e sistemas, como a pele, as vias respiratórias e digestivas ^[1]. Estão associadas à sensibilização a alérgenos do ambiente, como alimentos, pólenes, ácaros, fungos, insetos e medicamentos. As doenças alérgicas mais importantes incluem a asma, rinoconjuntivite, anafilaxia, urticária, eczema e angioedema, bem como alergias alimentares e a fármacos ^[2].

As alergias são frequentes na população em geral ^[3] e têm vindo a aumentar consideravelmente ao longo das últimas duas décadas ^[4]. Atualmente, as doenças alérgicas representam o 5º grupo de doenças crónicas mais frequentes a nível do grupo de países desenvolvidos, no qual Portugal se integra. Afetam cerca de 35-40% da população e são consideradas uma das epidemias da civilização moderna ^[3].

A ausência de diagnóstico e de tratamento adequado tem sido uma realidade em todas as áreas da doença alérgica e representa dificuldades acrescidas para a qualidade de vida de quem sofre destas patologias ^[5]. O diagnóstico da alergia é algumas vezes complexo e a história clínica requer a consideração de muitos fatores, e em determinadas situações o laboratório tem um papel importante na confirmação da alergia. Alguns estudos sugerem que, quando o clínico utiliza apenas a história clínica e anamnese na avaliação de uma possível doença alérgica, a precisão do diagnóstico raramente excede os 50% ^[6].

Neste trabalho pretende-se fazer uma revisão atualizada das metodologias analíticas que auxiliam no diagnóstico das alergias, disponíveis no laboratório de análises clínicas.

2. Hipersensibilidade, alergia e atopia

O termo *alergia* nem sempre correspondeu à mesma condição, pelo que a nomenclatura sempre foi variável e pouco unânime. De modo a assegurar uma abordagem segura, uniforme e rigorosa entre os profissionais de saúde, a padronização da nomenclatura foi proposta pela *European Academy of Allergy and Clinical Immunology* (EAACI) em 2001 e atualizada mais tarde, em 2003, pela Comissão de revisão de nomenclatura da *World Allergy Organization* (WAO) ^[7,8].

Atualmente a alergia é considerada como um tipo de reação de hipersensibilidade. A hipersensibilidade é definida como sinais ou sintomas objetivamente reprodutíveis, desencadeados pela exposição a estímulos conhecidos, numa dose que é tolerada pelos indivíduos normais. As reações de hipersensibilidade nem sempre envolvem mecanismos imunológicos podendo, por exemplo, resultar de uma deficiência enzimática ^[3].

O termo “atopia” foi criado em 1923 pelos investigadores americanos Arthur Coca e Robert Cooke ^[3] e o seu significado etimológico pode ser entendido como uma tendência pessoal ou familiar para produzir anticorpos IgE em resposta a doses baixas de alérgenos e a desenvolver sintomas típicos tais como asma, rinite, conjuntivite ou eczema/dermatite ^[7].

A alergia é, então, definida como uma reação de hipersensibilidade mediada por mecanismos imunológicos ^[3,7,9]. Quando existe alergia, essa reatividade anormal do nosso sistema imunitário pode envolver mecanismos IgE mediados (e falamos então de doenças atópicas, quando existe uma predisposição associada) ^[3,11] ou mecanismos de outros tipos (IgG, células citotóxicas linfocitárias), pelo que podem existir situações de alergia sem atopia, como sucede em muitos casos de alergia a medicamentos. Por vezes pode verificar-se a coexistência de mecanismos IgE mediados e não mediados (tipo misto) ^[3].

3. Fisiopatologia da alergia

A grande maioria das alergias é mediada por anticorpos da classe IgE. A reação alérgica mediada por IgE (Hipersensibilidade tipo I ou imediata) [4] resulta da produção de anticorpos IgE específicos para alérgenos presentes no ambiente, como proteínas de ácaros, alimentos, veneno de insetos, pólen e fungos [2].

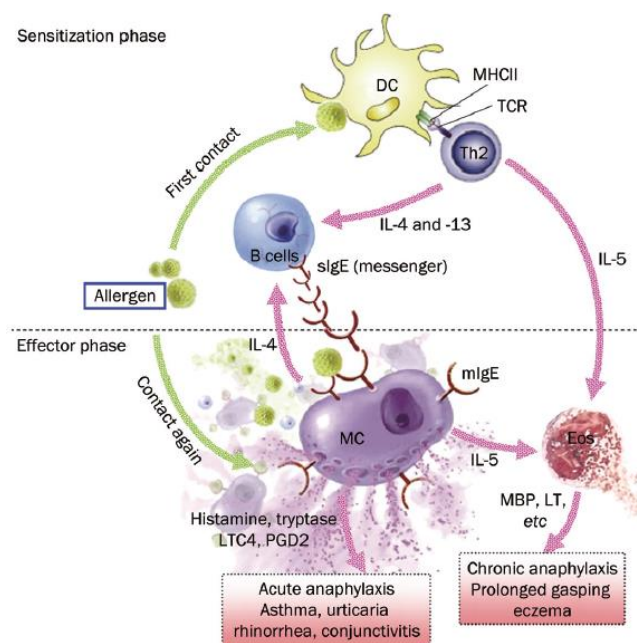


Figura 1- Fisiopatologia da reação alérgica. Extraído de <http://www.nature.com/aps/journal/v34/n10/full/aps201388a.html>

Este tipo de reação caracteriza-se sumariamente pelo desvio funcional do fenótipo linfocitário Th1 para o fenótipo Th2 [1] e desenvolve-se em duas fases: a fase de sensibilização e a fase de provocação (Figura 1).

Durante a fase de **sensibilização**, o alérgeno é processado pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), fundamentalmente macrófagos e células dendríticas, que estão na linha da frente para o processamento e destruição destes alérgenos. Após o processamento, os péptidos obtidos são apresentados através do complexo major de histocompatibilidade (MHC) a linfócitos Th2, que se multiplicam e sintetizam citocinas, como interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13. Tanto a IL-4 como a IL-13 induzem nos linfócitos B a mudança de isótipo para IgE e a IL-5 induz a proliferação e uma maior sobrevivência dos eosinófilos. As IgEs recém-formadas entram em circulação e vão ligar-se a receptores de alta afinidade, FcεRI, presentes na membrana de basófilos e mastócitos,

através da sua porção Fcε. Esta ligação de alta afinidade protege a IgE da destruição por proteínas séricas [12,13].

A fase de **provocação** (Figura 2) inicia-se quando o mesmo alergénio forma uma ligação cruzada com duas IgEs ligadas à superfície do basófilo/mastócito. Esta ligação leva à despolarização da membrana celular, influxo de Ca^{2+} extracelular e posterior libertação de Ca^{2+} intracelular, culminando com a ativação de enzimas, como a miosina quinase e a fosfolipase A2, além da queda dos níveis de intracelulares de AMP cíclico [14].

A ativação do mastócito resulta em três tipos de resposta biológica: a secreção de grânulos (mediadores primários), síntese e secreção de mediadores lipídicos, como as prostaglandinas D2 (PD2) ou leucotrienos (LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) e citocinas (mediadores secundários) [14].

Os mediadores pré-formados contidos nos grânulos são os primeiros a serem libertados da célula, e podem ser divididos em três categorias: aminas vasoativas, enzimas e proteoglicanos. A amina mais importante é a histamina. Em conjunto com os restantes mediadores pré-formados promove uma reação imediata com aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e edema. Estes fenómenos são responsáveis pelas manifestações clínicas preliminares das reações alérgicas, ocorrendo pouco depois da exposição ao alergénio [13]. As enzimas (quimase, triptase e hidrolases ácidas) estão contidas na matriz do grânulo e causam lesão tecidual [14].

Os principais mediadores lipídicos são sintetizados por reações sequenciais na membrana celular dos mastócitos e levam à ativação da fosfolipase A2, uma enzima que age sobre os fosfolípidos da membrana produzindo ácido araquidónico, a partir do qual serão produzidos os leucotrienos e as prostaglandinas. Os leucotrienos C_4 e D_4 são os mais potentes agentes vasoativos e espasmogénicos conhecidos. O leucotrieno B_4 é altamente quimiotático para neutrófilos, monócitos e eosinófilos. A prostaglandina causa broncoespasmo intenso, bem como a quimiotaxia de neutrófilos. O fator ativador de plaquetas (PAF) causa quimiotaxia e ativação de leucócitos, bem como broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e agregação plaquetária [14].

As citocinas incluem: TNF, que recruta leucócitos e estimula a inflamação; IL-4 e IL-13, que estimulam a produção de IgE e a produção de muco; IL-5, que participa na

produção e ativação de eosinófilos e IL-3 na proliferação de mastócitos ^[15,16].

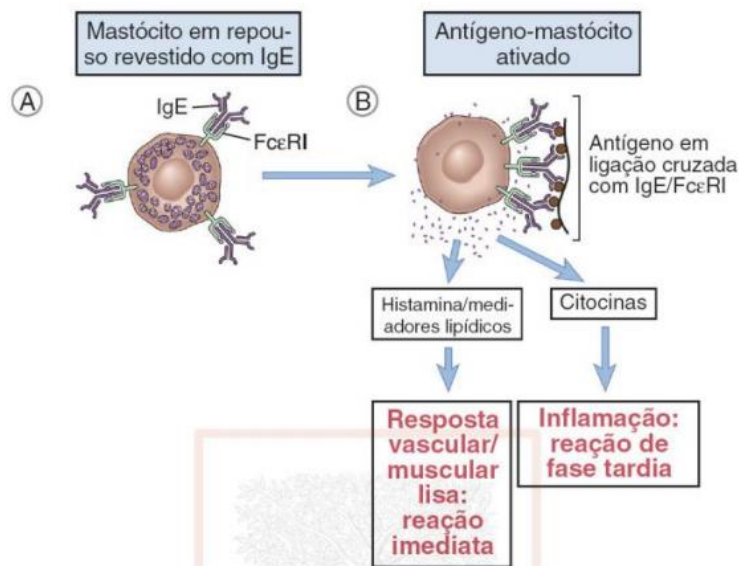


Figura 2 - Fase de provocação com o alérgeno. Fonte:
ABBAS. Imunologia Celular e Molecular. 6ª edição. Cap. 19.

Os sinais e sintomas poderão manifestar-se sobre a forma de: reações cutâneas (urticária, prurido, angioedema, hiperémia e eritema perioral), reações gastrointestinais (edema e prurido de lábios, língua e palato, náuseas, vômitos, cólicas e diarreia), reações respiratórias (prurido nasal, espirros), reações cardiovasculares (taquicardia, hipotensão) e reações sistêmicas (choque anafilático) ^[15,16]. No entanto, é importante referir que a sensibilização com produção de IgE específica não conduz necessariamente a manifestações clínicas quando ocorre exposição ao alérgeno ^[1].

4. Diagnóstico da alergia

No diagnóstico de doença alérgica é necessário recolher a história clínica do doente, tendo em especial atenção a existência de uma história familiar de patologia alérgica. O diagnóstico clínico é de fundamental importância no esclarecimento das causas, pois através da história clínica do paciente podem ser identificados fatores ambientais ou hábitos alimentares desencadeadores das reações alérgicas ^[11,17,18]. Contudo, poderá haver necessidade de efetuar um exame físico rigoroso e realizar exames *in vivo* (testes cutâneos de alergia, testes de provocação) e/ou laboratoriais (*in vitro*), quando a história clínica não é conclusiva ^[17].

Os **testes cutâneos** (SPT- *skin prick tests*), realizados pelo alergologista, avaliam a sensibilização do indivíduo ao alérgeno depositado na pele do antebraço que, após picada com uma lanceta, penetra na derme ^[19]. A libertação de histamina pelos mastócitos cutâneos ativados leva à formação de pápula e eritema locais, indicando a presença de IgE específica ^[17]. O diâmetro da pápula formada é medido, sendo necessário comparar esta reação com a do controlo positivo (solução de histamina) e ausência de pápula no controlo negativo (soro fisiológico) ^[19].

As técnicas de diagnóstico laboratorial tratam, por um lado, de identificar o alérgeno responsável pelos sinais e sintomas do paciente e, por outro lado, de determinar o mecanismo imunológico subjacente à reação alérgica ^[9,20]. Os testes *in vitro* têm vindo a mostrar-se de grande utilidade em situações em que os testes cutâneos são inconclusivos ou não podem ser utilizados. Além disso, os testes cutâneos são desconfortáveis para o paciente, sofrem interferência de anti-histamínicos e, em alguns pacientes hiperalérgicos, podem produzir choque anafilático ^[6,21].

De seguida são descritos alguns procedimentos realizados no laboratório de análises clínicas que podem auxiliar no diagnóstico das alergias.

4.1. Determinação da IgE sérica

No final dos anos 60, a descoberta da **imunoglobulina E (IgE)** facultou um marcador específico que poderia então ser usado no auxílio à identificação da doença alérgica ^[22]. Nos dias de hoje, a análise que mais habitualmente se solicita ao laboratório para o diagnóstico da alergia mediada pela IgE é a determinação de imunoglobulinas do tipo IgE específico ^[1,21].

As IgEs humanas são uma classe de anticorpos ^[9] com peso molecular aproximado de 190.000 Da que circulam no sangue periférico como monómeros, durante 2 ou 3 dias. A sua concentração em circulação depende da idade e constitui aproximadamente 0,0005% do total das imunoglobulinas séricas no adulto ^[11,21]. As suas principais funções são ao nível da participação em reações alérgicas e na defesa contra parasitas, sobretudo intestinais ^[11].

4.1.1. IgE total

A determinação de **IgE total** é frequentemente solicitada na clínica, sobretudo na avaliação de distúrbios respiratórios e cutâneos de etiologia possivelmente alérgica ^[2,23]. O aumento dos níveis de IgE total pode sugerir a presença de uma reação alérgica, no entanto o seu aumento não é específico, uma vez que depende de fatores como a idade, o sexo, tabagismo, história familiar e poderá estar presente num elevado número de patologias ^[2,4] (Tabela 1), como parasitoses intestinais ou cutâneas, malignidades (mieloma, linfoma de Hodgkin), imunodeficiências primárias (síndrome de Hiper IgE, de Wiskott-Aldrich, de Nezelof), doenças infecciosas (aspergilose e filariose pulmonares), entre outras ^[2].

Por outro lado, mais de metade dos doentes alérgicos apresenta valores séricos de IgE total dentro dos limites da normalidade, condicionando, por isso, o seu valor preditivo ^[23]. Trata-se de um teste útil mas com condicionantes importantes com especial destaque para o rastreio, onde a sua utilização está fortemente limitada pelo que atrás se expôs.

Tabela 1 – Patologias que cursam com IgE total elevada.

Doenças de maior prevalência
<ul style="list-style-type: none">• Doença alérgica• Infecção parasitária• Cirrose hepática• Mononucleose
Doenças de menor prevalência
<ul style="list-style-type: none">• Aspergilose broncopulmonar alérgica• Infecções: candidíase sistêmica, Lepra, SIDA• Doenças cutâneas• Neoplasias: mieloma IgE, Doença de Hodgkin• Transplante de medula óssea• Imunodeficiências: Síndrome de híper IgE, de Wiskott-Aldrich• Outras: Hemosiderose pulmonar primária, fibrose quística

Adaptado de

<http://www.seqc.es/dl.asp?184.149.202.241.0.20.10.3.101.159.3.113.230.194.71.4.207.151.68.232.249.7.73.214.142.72.182.32.48.9.7.156.10.207.207.95.26.217.62.77.236.87.234.134.212.190.32>

Em geral, os testes para o doseamento total de IgE no soro são baseados na metodologia de **ELISA** ^[2]. O princípio básico da maioria dos testes compreende o uso de um anticorpo específico para IgE fixado num suporte onde é colocado o soro do paciente e feita a incubação. Posteriormente é feita a lavagem do suporte, para que os anticorpos não ligados sejam removidos e, em seguida é adicionado um outro anticorpo específico para IgE marcado, que se ligará a outra porção da IgE ^[24]. O resultado é quantitativo, podendo ser expresso em unidades internacionais por mililitro (U/ml), quilo unidades (kU/L), ou em nanogramas por mililitro (ng/mL de IgE) ^[2]. Esta standardização rigorosa das unidades veio permitir a concordância dos resultados entre os diferentes ensaios comerciais existentes no mercado ^[11].

4.1.2. IgE específica – RAST

Foram desenvolvidos testes para a determinação de **IgE específica** para determinado alérgeno, genericamente denominados **RAST**, derivado da abreviatura da primeira técnica disponível para este fim – *Radioallergosorbent test* (RAST, Pharmacia, Uppsala, Sweden)^[2,25].

O método consistia na determinação das IgE de soro de pacientes com determinados antígenos depositados em discos de celulose, através de marcadores radioativos e imunoradiometria^[17]. Entretanto, os métodos radioisotópicos foram substituídos por métodos imunoenzimáticos e novas metodologias têm-se desenvolvido progressivamente de modo a obterem-se testes cada vez mais sensíveis e específicos^[26]. A detecção das IgEs pode ser feita através de ensaios únicos por amostra (*singleplex*) e, mais recentemente, através de múltiplos ensaios por amostra (*multiplex*), que serão abordados no capítulo “Alergologia molecular: uma nova era no diagnóstico”. A plataforma *singleplex* permite selecionar os alérgenos necessários para um diagnóstico baseado na história clínica do paciente^[22].

Atualmente, existem vários métodos disponíveis no mercado, como o Immulite[®] 2000 da Siemens e o ImmunoCAP[®] da Thermo Scientific^[23,25,26].

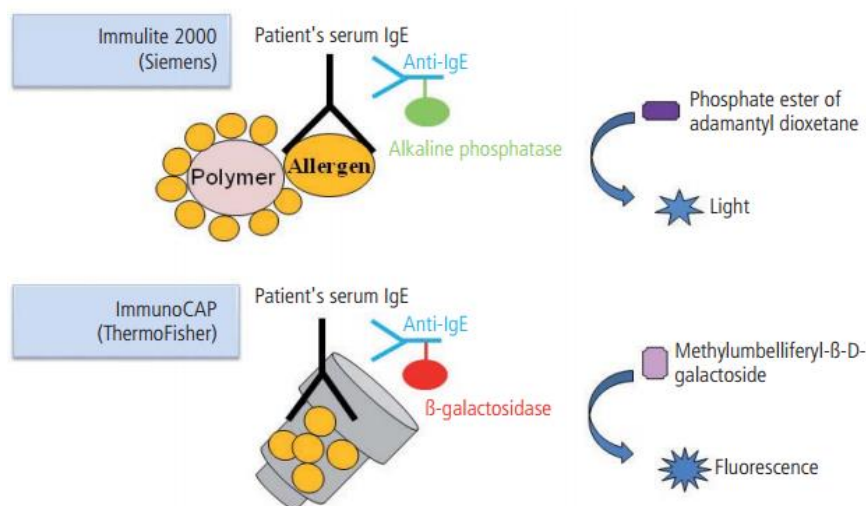


Figura 3 - Comparação entre Immulite[®] 2000 e ImmunoCAP[®]. Adaptado de <http://www.jiaci.org/issues/vol23issue7/1.pdf>

O que vai variar entre estes dois métodos é a matriz onde está acoplado o alérgeno de interesse, a enzima que está ligada ao anticorpo e o substrato da reação (Figura 3). No sistema ImmunoCAP[®], o alérgeno está covalentemente ligado a uma fase sólida, que consiste num polímero hidrofílico ativado. O anticorpo marcado está ligado à enzima β-galactosidase, e a intensidade da fluorescência depende da concentração de IgE acoplada ao alérgeno. O sistema Immulite[®], no entanto, utiliza alérgenos ligados covalentemente a polímeros solúveis numa fase fluida. O anticorpo marcado é conjugado a uma fosfatase alcalina, e a reação emite um sinal quimioluminescente^[26].

No momento, o método de referência para determinar a IgE específica, por ser considerado o mais sensível, específico, quantitativo e reprodutível [15], é o **ensaio imuno-enzimático fluorescente (FEIA)**, realizado pelo equipamento ImmunoCAP®. É calibrado com o padrão internacional de referência para IgE da Organização Mundial de Saúde (OMS) expresso em kU/L [23,27].

4.1.2.1. ImmunoCAP® - Ensaio imuno-enzimático fluorescente

Este método (Figura 4) consiste na incubação do soro numa fase sólida onde está acoplado o alergénio de interesse. O alergénio, acoplado ao ImmunoCAP, reage com a IgE específica da amostra do doente. Após a lavagem das IgEs não específicas, adicionam-se anticorpos contra a IgE marcados (fluoróforo), para formação de complexos. Após incubação, a enzima-anti-IgE não ligada é lavada, procedendo-se à ligação do complexo ligado com o substrato. Após paragem da reação, mede-se a fluorescência do eluído. Quanto mais alto o valor da resposta, maior a presença de IgE específica na amostra [18].

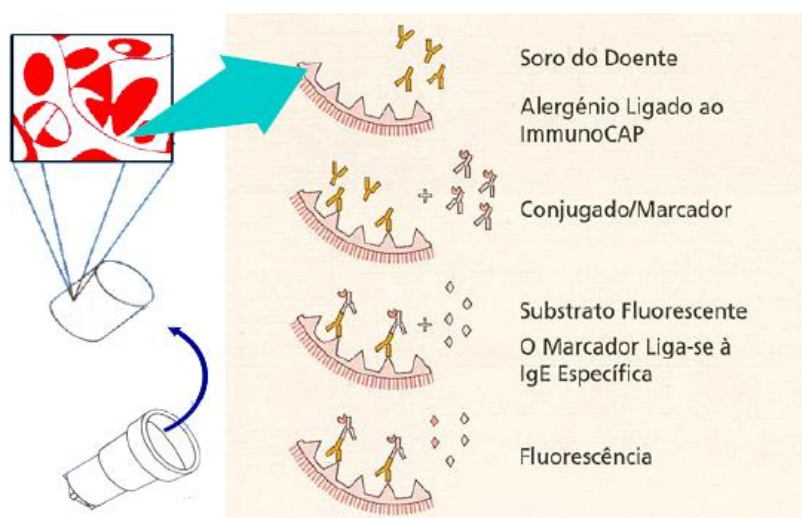


Figura 4- FEIA (Thermo Scientific). Fonte: Manual de Imunoalergologia 2003, Thermofisher

Para avaliar os resultados do ensaio, a resposta das amostras dos doentes é convertida em unidades específicas dos alergénios: UA (unidade específica do alergénio) = U (i.e Unidade internacional de IgE) [28], em que 1 U equivale a 2,42 ng de proteína IgE. O resultado do teste de IgE específica deverá ser cuidadosamente interpretado para cada alergénio.

Tabela 2 - Interpretação de valores de IgE específica (ImmunoCAP[®], Thermo Scientific).

RAST (kU/L)	Nível de IgE	Interpretação
< 0.10	Indetetável	Considerar outras causas para a explicação dos sintomas.
0,10-0,35	Detetável, baixo	Em situações raras, baixos níveis de IgE poderão estar relacionados com a sintomatologia.
0,36-0,69	Baixo	Níveis aumentados de IgE apenas indicam sensibilização. O diagnóstico de alergia mediada por IgE requer evidências de reatividade clínica
0,70-3,49	Moderado	
3,50-17,40	Alto	
17,50-49,0		
50.0-99,0	Muito alto	
>100,0		

Adaptado de Allergy investigations- PathCare 2014. Disponível em http://www.pathcare.co.za/webfiles/files/Allergy_Investigations_June2014.pdf

Níveis sanguíneos detetáveis de IgE específica podem indicar **alergia** quando associados a uma reatividade clínica, ou apenas **sensibilização** se o doente tolera o alergénio. O valor de sIgE poderá também fornecer alguma informação quanto ao risco da intensidade de reação a esse alergénio. Por exemplo, um valor de 2,5 kU/L de sIgE ao amendoim pode estar associado a um risco de reação anafilática grave ou poderá apenas indicar sensibilização. No entanto, a probabilidade de reação clínica aumenta com uma concentração crescente de sIgE ^[1]. Valores de *cutoff* de sIgE preditivos de reatividade clínica estão disponíveis para alguns alergénios alimentares (Tabela 3).

Tabela 3: IgE específica (kU/L) no soro em crianças com valor preditivo de reação clínica superior a 95% (Cap System).

Alimento	IgE específica (kU/L)
Leite	>15 Todas as idades
	>5 Se idade inferior a 2 anos
Ovo	>7 Todas as idades
	>2 Se idade inferior a 2 anos
Amendoim	>15

Adaptado de: Bom AT, et al. Alergia Alimentar. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2013

4.1.2.2. Limitações da metodologia “RAST”

A determinação da IgE específica através da metodologia RAST é utilizada sobretudo na confirmação de uma suspeita da presença de doença alérgica, motivada por sintomatologia clínica e exame físico característicos. Devem ter-se em atenção alguns fatores como:

- Concentração sérica baixa de IgE, comparada com outras imunoglobulinas (IgE em µg/L e IgG em g/L);
- Cada proteína alergénica contém vários epítomos que podem ser reconhecidos pelas IgE.

Deste modo, a determinação da IgE específica através da metodologia “RAST” apresenta algumas limitações que poderão comprometer o seu valor de diagnóstico, como a **reatividade cruzada**, que poderá resultar em resultados positivos clinicamente irrelevantes ^[4]. A reatividade cruzada é um conceito imunológico que pressupõe a existência de dois alergénios que são reconhecidos pelo mesmo anticorpo IgE, devido à homologia estrutural entre eles, com presença de epítomos comuns ^[29].

Poderão também ocorrer resultados **falsamente negativos**, uma vez que nem todos os alergénios naturais e componentes alergénicos estão caracterizados e disponíveis comercialmente. Além disso, um resultado positivo num teste RAST, por si só, não comprova a presença de alergia nem prevê a severidade de uma reação alérgica ^[4]. A interpretação do resultado deve ser sempre feita na base de um juízo clínico experiente, alicerçado numa história clínica bem colhida e pormenorizada ^[3,26].

O teste ideal para a determinação da IgE específica daria resultados, positivos ou negativos, com uma especificidade e sensibilidade de 100%. Infelizmente, apesar do aperfeiçoamento das técnicas laboratoriais ser bastante promissor, o papel do laboratório no diagnóstico das alergias permanece limitado ^[4]. Foram realizados numerosos estudos que demonstram que a sensibilidade desta técnica varia entre 84 e 95% e a especificidade vai de 85 a 94% ^[30].

4.1.2.3. Marcha atópica e Painéis de alergénios – Phadiatop[®]

Frequentemente, as manifestações clínicas da atopia iniciam-se nos primeiros anos de vida, sendo fundamental a identificação das crianças de risco para implementação de

medidas preventivas e o controlo da doença. Estas manifestações clínicas seguem um padrão evolutivo característico denominado **marcha atópica**, com início pela dermatite atópica, seguida pela alergia alimentar e, posteriormente, pelos sintomas respiratórios decorrentes da asma e rinite [17].

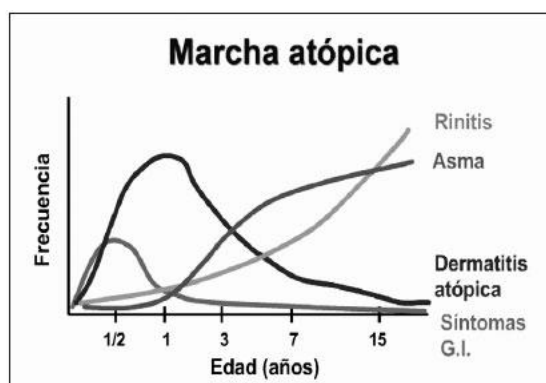


Figura 5: Marcha atópica. Adaptado de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062013000400012

O laboratório poderá ter um papel preponderante no rastreio da atopia, através do doseamento de IgE. No entanto, os doseamentos de IgE específica individualizados não são um bom método de rastreio, relacionando-se com custos muito elevados, devendo estar reservados para avaliações diferenciadas, tendo em conta a história clínica e o resultado dos testes cutâneos. Para obviar os custos referidos, desenvolveram-se testes de rastreio, constituídos por misturas de vários alérgenos definidos pelos fabricantes, existindo painéis para vários tipos de alérgenos (ex: AlaTOP® e Phadiatop®) [25].

O Phadiatop® é uma técnica *in vitro* **qualitativa** que confirma ou exclui a presença de sensibilização mediada por IgE a determinados painéis de alérgenos. Numa segunda fase, se a prova for positiva, o laboratório quantificará a IgE específica frente aos alérgenos contidos naquele painel. Com esta estratégia, melhora-se a relação custo/benefício da determinação das IgE específicas [27,31].

O Phadiatop® apresenta-se em duas formas comercialmente disponíveis. Uma contém os alérgenos inaláveis mais prevalentes (ácaros, pólenes, epitélios de cão e gato, fungos), responsáveis por mais de 90% das alergias em indivíduos acima dos 5 anos de idade. A outra (Phadiatop Infant®) contém alérgenos inaláveis e alimentares (leite, ovo, soja, camarão) que, em conjunto, representam cerca de 98% dos antígenos responsáveis pelas alergias em crianças com menos de 5 anos [31].

4.2. Determinação de mediadores da resposta alérgica e de marcadores de ativação

Nos doentes alérgicos, a necessidade de identificar alternativas de diagnóstico seguras é de grande importância, podendo-se adicionalmente recorrer a outros testes complementares *in vitro* para fazer o diagnóstico final ^[1]. O estudo dos mediadores e da sua determinação como marcadores da inflamação pode auxiliar no diagnóstico das doenças alérgicas ^[32].

4.2.1. Ativação dos basófilos por estimulação com alérgenos

Os testes de ativação de basófilos (BAT), estudos dinâmicos *in vitro*, não se efetuam habitualmente na rotina laboratorial. São realizados em laboratórios especializados, são dispendiosos e não estão disponíveis para a maioria dos clínicos ^[1]. Contudo, os basófilos são células efectoras facilmente acessíveis, cuja reatividade pode ser mais específica do que a presença de IgE ^[15].

Os basófilos, quando ativados, libertam vários mediadores, como a histamina e os sulfidoleucotrienos, mas também aumentam a expressão de determinados marcadores, que podem ser detetados por citometria de fluxo. Alguns BAT baseiam-se na libertação de mediadores como a histamina e o LTC₄, outros baseiam-se na observação microscópica direta da desgranulação dos basófilos, outros ainda na avaliação da expressão por citometria de fluxo de marcadores de ativação como o CD63 ^[1].

4.2.1.1. Libertação de histamina e sulfidoleucotrienos

Os testes de libertação de histamina pelos basófilos e o *celular allergosorbent test* (CAST) envolvem medições quantitativas de histamina pré-formada ou sulfidoleucotrieno C₄ produzido *de novo* respetivamente, que são libertados quando o alérgeno estabelece uma ponte entre duas moléculas de IgE na superfície dos basófilos. Contudo, o consumo de tempo e o custo destes ensaios em dois tempos (incubação celular e quantificação de mediadores no sobrenadante) tem limitado a sua aplicação ^[33,34].

4.2.1.2. Marcadores de ativação e citometria de fluxo

A descoberta do marcador de ativação dos basófilos, CD63, foi responsável pelo desenvolvimento do FAST (*Flow Cytometric Cellular Allergen Stimulation Test*), também denominado genericamente de teste de ativação de basófilos, BAT ^[10]. Nos últimos anos a sua aplicação clínica expandiu-se, principalmente no estudo de alergias a medicamentos e a himenópteros, na monitorização da eficácia da imunoterapia em alergias alimentares e no estudo de reações alérgicas que não se conseguem detetar pelos métodos convencionais ^[12,33,34,35].

O fundamento da técnica é baseado no facto de que os basófilos, ao serem sensibilizados pela ligação da IgE ao recetor de superfície FcεRI, ativam-se na presença do alérgénio e expressam na membrana citoplasmática uma alta concentração de marcadores de superfície ^[20,33], como CD45, CD63, CD69 e CD203c. Presentemente, os marcadores mais utilizados são o CD63 e o CD203c ^[33,34].

O CD63 (gp53 ou *Lysosome associated membrane protein* – LAMP-3) é uma glicoproteína de 53 Da que pertence à superfamília transmembrana-4 e é expressa em diferentes células, como basófilos, mastócitos, macrófagos e plaquetas ^[12,36]. Nos basófilos em repouso, este marcador está localizado nas membranas dos grânulos intracitoplasmáticos e praticamente ausente da superfície celular. Durante a exocitose, quando as membranas dos grânulos se fundem com a membrana celular, é transportado para a superfície celular ^[1]. A intensidade de expressão desta molécula tem demonstrado uma boa correlação com a libertação de histamina pelos basófilos, sendo considerada um bom marcador indireto desta libertação ^[37]. É considerado o marcador de ativação de basófilos mais estudado na deteção de alergia ^[1].

O CD203c (*neural cell surface differentiation antigen*, E-NPP3) é uma molécula transmembranar glicosilada do tipo II que pertence à família das enzimas ectonucleotidase/pirofosfatase/fosfodiesterases ^[36], expressa exclusivamente pelos basófilos e células precursoras. A sua produção aumenta em resposta à ligação dos alérgénios a duas moléculas de IgE na superfície celular ^[34].

A quantificação dos marcadores é efetuada por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos anti-CD63 e anti-CD203c marcados com fluorocromos, que vão ligar-se a estes marcadores ^[20]. Os fluorocromos são usualmente

excitados por luz laser e a fluorescência é emitida e quantificada por um ou vários fotomultiplicadores, permitindo a detecção simultânea de um ou vários fluorocromos [34].

Apesar de ser uma técnica promissora, as condições experimentais não estão padronizadas, já que dependem do alérgeno que se pretende testar [38]. A amostra poderá ser de sangue total colhido em anticoagulante ou apenas o *buffy coat*. O tipo de anticoagulante irá variar consoante o protocolo escolhido pelo laboratório para a realização da técnica. Para a obtenção do *buffy coat*, é necessária a separação das células com um gradiente de densidade a partir de sangue total anti-coagulado. As células isoladas são incubadas com controlo negativo (apenas o tampão), controlo positivo (anti-IgE) e alérgenos a testar, por um período de tempo definido e com um número pré-definido de concentrações [34,39].

Na interpretação dos resultados do BAT avaliam-se os *dot-plots* e os histogramas, e a comparação com os controlos é determinada em termos de percentagem de basófilos que expressaram o marcador de ativação definido (normalmente utilizada para o CD63) ou através da média da intensidade de fluorescência (normalmente utilizado para o CD203c). Os critérios de positividade e valores de *cut off* variam consoante o tipo de alérgeno analisado [10].

Existem *kits* comerciais disponíveis para a realização desta técnica, como é o caso do Basotest® (OPREGEN *Pharma*, Heidelberg, Alemanha) [35].

4.2.2. Proteína Catiónica Eosinofílica (ECP)

A proteína catiónica do eosinófilo foi purificada por Olsson e Venge em 1974. É uma glicoproteína de cadeia única e constitui cerca de 30% da proteína existente ao nível dos grânulos do eosinófilo ativado. Desempenha funções citotóxicas e não citotóxicas (Tabela 4), como a indução da libertação de histamina pelos mastócitos e basófilos, bem como a fibrose através da síntese de proteoglicanos [40].

Doentes asmáticos com inflamação eosinofílica têm níveis aumentados de ECP no sangue e outros fluidos biológicos (expetoração e LBA), antecipando-se à sintomatologia. O valor aumentado de ECP no soro é uma medida objetiva do estado da inflamação na asma [28]. Por outro lado, a ECP tem sido relacionada com a lesão

tecidual encontrada na esofagite eosinofílica e encontra-se aumentada em crianças com alergia ao leite de vaca ^[2].

Tabela 4 - Propriedades funcionais da ECP.

Efeitos citotóxicos
<ul style="list-style-type: none">• Destruição de parasitas e células tumorais;• Neurotoxicidade;• Danos ao nível do epitélio respiratório;• Atividade antibacteriana e antiviral.
Efeitos não citotóxicos
<ul style="list-style-type: none">• Inibição da proliferação de linfócitos T;• Libertação de histamina pelos basófilos;• Ativação das células mastocitárias do coração;• Alteração da produção de proteoglicanos pelos fibroblastos;• Estimulação da secreção de muco nas vias aéreas;• Alterações na cascatada coagulação;• Antagonista da heparina;• Interação com o sistema do complemento;• Indução de moléculas de adesão e fatores de crescimento em células epiteliais.

Adaptado de http://www.latamjpharm.org/trabajos/24/4/LAJOP_24_4_7_1_P4MOVIO0K2.pdf

Para a determinação da ECP pode utilizar-se soro ou plasma ^[40]. Os tubos de colheita, assim como o tempo de coagulação (soro) e temperatura devem ser controlados, uma vez que afetam a concentração de ECP libertada nas amostras ^[28]. No caso do plasma, a amostra deve ser colhida em tubo com anticoagulante, preferencialmente EDTA ou citrato de sódio para evitar a libertação espontânea da ECP. Numa amostra de soro, os valores de ECP são muito mais altos e consistentes, no entanto é necessário um controlo mais apertado da manipulação, para evitar variações dos níveis de ECP ^[40].

4.2.2.1. Teste ImmunoCAP® ECP

O ImmunoCAP® ECP da Thermo Scientific mede o nível de Proteínas Catiónicas Eosinófilas (ECP) no soro. O teste é concebido como imunoensaio em sanduiche. O anticorpo anti-ECP, covalentemente acoplado à fase sólida, reage com a ECP da amostra de soro do indivíduo. Após lavagem, são adicionados anticorpos anti-ECP marcados por uma enzima para formarem um complexo. Após incubação, a enzima-

anti-ECP não ligada é lavada e o complexo ligado é incubado com o substrato. Após paragem da reação, é medida a fluorescência do eluído. A fluorescência é diretamente proporcional à concentração de ECP na amostra de soro. O valor de *cut-off* é de 15µg/l [41].

A determinação da ECP no soro apresenta como vantagens uma elevada precisão e especificidade. É no entanto um método moroso, que requer cuidados ao nível da manipulação da amostra [42].

4.2.3. Triptase

A triptase é um marcador específico da ativação mastocitária, uma vez que apenas os mastócitos libertam esta protease após estimulação [32]. A triptase é libertada para a circulação após uma **reação anafilática** causada por medicamentos, picadas de insetos ou alimentos, sendo os níveis normalmente detetados entre 3 a 6 horas após a reação.

Assim, níveis de triptase anormalmente elevados que normalizam até 24 horas indicam que ocorreu uma reação de causa alérgica, sendo um bom marcador de diagnóstico de doença alérgica. A presença constante de níveis elevados de triptase no sangue poderá estar relacionada com outras doenças, sendo que este marcador também é utilizado como critério de diagnóstico para a mastocitose e como marcador em neoplasias hematológicas [43].

A quantificação da triptase pode ser feita com base no imunoensaio fluoroenzimático executado no equipamento ImmunoCAP®, utilizando anticorpos anti-triptase [9]. Apesar de a sensibilidade ser moderada, a especificidade desta metodologia é bastante elevada. Os indivíduos saudáveis têm níveis indetetáveis de triptase no soro/plasma. Já em indivíduos com anafilaxia, este valor aumenta para mais de 11,4 µg/L [33]. Um nível base persistentemente elevado de triptase indica a possibilidade de mastocitose [43].

4.3. Outras metodologias laboratoriais

4.3.1. *Immunoblotting*

Em determinadas situações em que os indivíduos apresentam história evidente de reação a um alérgico específico, mas os testes convencionais não conseguem detetar a presença de anticorpos para esse alérgico, pode recorrer-se ao *immunoblotting* ^[44].

O *immunoblotting* associa técnicas de separação por eletroforese e métodos de deteção de anticorpos. Os extratos alérgicos são constituídos por uma mistura complexa de proteínas, que podem ser separadas de acordo com o peso molecular por eletroforese em gel de poliácridamida e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A incubação desta matriz com o soro do doente e, posteriormente, com anticorpo monoclonal anti-IgE, anti-IgG ou outro marcado com uma enzima (ex. fosfatase alcalina) que reage com uma substância cromogénica entretanto adicionada, revela o padrão de anticorpos específicos de cada indivíduo ^[24,34].

É um método qualitativo/semi-quantitativo com elevada sensibilidade e especificidade, que possibilita a execução de ensaios de inibição e conseqüentemente um estudo funcional de reatividade cruzada ^[1,45]. Contudo, é moroso e dispendioso, requerendo um bom conhecimento dos pesos moleculares das partículas constituintes de cada alérgico. O desenvolvimento de alérgicos moleculares tem remetido esta técnica para uma utilização mais residual ^[1].

4.3.2. Hemograma

A contagem de eosinófilos poderá encontrar-se elevada na doença alérgica ^[46]. Aproximadamente 30 a 40% dos indivíduos com rinite alérgica e asma demonstram a presença de eosinofilia. Durante a polinização é muito comum detetar-se, em análises de rotina, a presença de um número elevado de eosinófilos em indivíduos alérgicos ao pólen ^[9]. No entanto, a contagem de eosinófilos no sangue tem um valor de diagnóstico limitado ^[47], uma vez que a eosinofilia está presente num grande número de condições, como leucemia, Síndrome de Wiskot-Aldrich e parasitoses intestinais ^[47,48].

Também em situações de sinusite aguda pode existir um défice imunitário celular detetável no hemograma, principalmente ao nível dos neutrófilos e linfócitos ^[3].

4.3.3. Análise de secreções

4.3.3.1. Quantificação de eosinófilos

Os esfregaços nasais podem ser usados para determinar o número de **eosinófilos** nas secreções nasais ^[40,50]. Uma zaragatoa é inserida duas ou três vezes em cada narina e os esfregaços são espalhados cuidadosamente sobre a uma lâmina de microscópio e corados, e as células são contadas ^[49].

As vantagens de esfregaços nasais são de que o nariz é facilmente acessível e o teste pode ajudar a diferenciar entre a rinite eosinofílica (rinite alérgica e rinite não-alérgica com eosinofilia, que respondem bem aos corticosteróides tópicos) e rinite devido a outras causas. No entanto, as desvantagens são um ligeiro desconforto para o paciente e um elevado risco de resultados falsos negativos, se a amostra nasal não é adequadamente obtida ^[49]. Além disso, a positividade do teste pode também não refletir uma condição alérgica, uma vez que existem casos (raros) de rinite não alérgica com abundante eosinofilia nas secreções nasais ^[3,47].

A quantificação de eosinófilos na expetoração também é útil para avaliar a resposta dos anti-inflamatórios no tratamento da asma ^[18].

4.3.3.2. Exame microbiológico de secreções

A aspergilose broncopulmonar alérgica é uma condição difícil de diagnosticar e o laboratório poderá fornecer algum auxílio ao diagnóstico, através do exame direto e cultura de amostras de expetoração. No exame direto, o esfregaço da expetoração é corado e analisa-se a presença de filamentos de *Aspergillus*. Para o exame cultural, a amostra é colocada num meio que favoreça o crescimento do fungo e posteriormente é feita a sua identificação. No entanto, a interpretação deve ser correlacionada com a sintomatologia e outros exames, uma vez que este fungo é comum no meio ambiente e muitas vezes pode ser encontrado na saliva e na expetoração de indivíduos sãos ^[9].

4.4. Alergologia molecular: uma nova era no diagnóstico

A alergologia molecular vem eliminar os métodos tradicionais de diagnóstico, pois nem sempre estes permitem conhecer a origem das moléculas que provocam a alergia. Neste sentido, o estudo em torno da alergia tem melhorado ao longo dos últimos anos e hoje o conhecimento acerca das moléculas que provocam uma reação alérgica permite que as decisões de diagnóstico e terapêutica sejam mais precisas e eficazes.

4.4.1. Diagnóstico resolvido por componentes e tecnologia *microarray*

O diagnóstico tradicional da alergia mediada por IgE era realizado apenas com **extratos** de **alergénios naturais**, que continham uma mistura de moléculas alergénicas e não alergénicas de difícil padronização [17,51]. Apenas quantificava a fonte alergénica, não conseguindo revelar a entidade molecular. Desta forma, o diagnóstico baseado na quantificação de alergénios simples ou em misturas não discriminava entre doentes polisensibilizados com fontes alergénicas não relacionadas, como acontece em casos de **reatividade cruzada** [22,52,53] que surgem, por exemplo, em indivíduos alérgicos ao pólen, frequentemente sensibilizados por outras fontes alérgicas [54].

Entretanto, nas últimas décadas temos assistido à identificação, isolamento e purificação de um grande número de alergénios de diversas origens e à aplicação da tecnologia DNA recombinante ao campo da alergologia para a produção biotecnológica de alergénios de elevada pureza e qualidade [22,55]. Um **alergénio recombinante** é uma molécula produzida com técnicas biotecnológicas que tornam possível a identificação e posteriormente a reprodução de proteínas específicas a partir de um extrato alergénico [30]. A sua capacidade de ligação às IgE é comparável à dos alergénios naturais e, em geral, apresentam boa reatividade em testes de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* [17]. A designação dos alergénios recombinantes foi estabelecida em conformidade com a nomenclatura oficial (www.allergen.org) e estão agrupados de acordo com as respetivas funções bioquímicas. Assim, encontramos grupos de proteínas estruturais, proteínas reguladoras, proteínas de reserva, proteínas PR (relacionadas com a patogénese), entre outras [30].

À abordagem diagnóstica que permite definir o padrão de sensibilização alérgica de um paciente ao nível molecular, em plataformas *singleplex* ou *multiplex*, dá-se o nome de técnica de diagnóstico molecular ou **diagnóstico resolvido por componentes** (do inglês, CRD - *Component Resolved Diagnosis*)^[22]. O CRD identifica a presença de IgE específica para proteínas individuais, que podem ser específicas/exclusivas de determinadas fontes alérgicas – componente alérgico específico de espécie – ou podem existir em múltiplas fontes alérgicas – panalérgico/ componente alérgico marcador de reatividade cruzada^[56]. É possível executar ensaios CRD rapidamente e de forma rentável utilizando a tecnologia *microarray*, ensaios **multiplex** que detetam, num único ensaio, a IgE do indivíduo frente a uma panóplia de alérgenos pré-selecionados, independentemente da sua história clínica^[22,51].

4.4.1.1. Tecnologia *microarray*: ImmunoCAP® ISAC

Atualmente a tecnologia *microarray* é comercializada na forma de ImmunoCAP® ISAC (*Immuno Solid-phase Allergen Chip*) da Thermo Scientific^[57]. Trata-se de um imunoensaio de fase sólida^[58] que permite a deteção de IgE específica (em 30 µl de soro ou plasma), disponibilizando uma grande variedade de componentes moleculares de alérgenos^[22,54] naturais ou recombinantes^[51]. Deste modo, permite uma abordagem diagnóstica muito mais detalhada, cuja interpretação apresenta, potencialmente, maior complexidade, mas que pode permitir um diagnóstico muito mais preciso^[56].

Os componentes alérgicos são imobilizados num substrato sólido em formato de *microarray*^[58] (Figura 5). A preparação do *microarray* consiste em dispor um painel de moléculas alérgicas sobre uma lâmina de vidro (75x25mm) modificada quimicamente através da adição de reagentes como os epoxisilanos ou nitrocelulose, com a finalidade de melhorar a ligação proteica^[59]. Os alérgenos são colocados a triplicar, e ficam imobilizados ao chip por uma ligação covalente^[22]. Estes componentes alérgicos vão reagir com a IgE específica da amostra de soro do indivíduo. Depois de eliminar a IgE não específica, os componentes que reagem com o soro são detetados por um anticorpo secundário (Anti-IgE humana) marcado com um fluorocromo. Depois da incubação, os anticorpos anti-IgE que não se ligaram são eliminados mediante uma nova lavagem^[22,58].

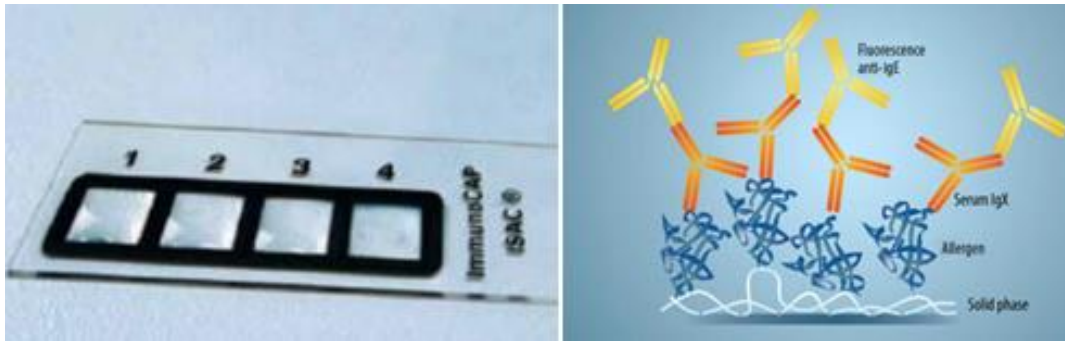


Figura 6 - Plataforma e esquema de hibridação do microarray. Adaptado de : <http://alergialafe.org/descargas/microarray.pdf>

Segue-se a medição da fluorescência utilizando um *scanner a laser*. A intensidade do sinal de fluorescência vai de azul (menos intensa) até vermelho (mais intensa). Quanto mais elevado o valor de resposta, mais IgE específica haverá na amostra. Os resultados são analisados com o *Software Microarray Image Analysis (MIA)*, a partir de uma curva de calibração e expressos numa faixa de 0,3 a 100 ISAC *Standardized Units (ISU-E)*, dando uma indicação semiquantitativa dos 4 níveis de anticorpos IgE ^[1,26,43] (Figura 7). As ISU-E são normalizadas para unidades do ImmunoCAP Specific IgE.

Em caso de positividade, cada componente pode ser testado isoladamente, pois um painel positivo não indica qual o alérgénio implicado no desencadeamento da manifestação alérgica.

ISAC unidades estandarizadas (ISU-E)	Nível	
< 0.3	Indetectable	
0.3 - 0.9	Bajo	
1 - 14.9	Moderado /alto	
≥ 15	Muy alto	

Figura 7- Expressão semiquantitativa dos resultados do ISAC. Fonte <http://alergialafe.org/descargas/microarray.pdf>

Vantagens e desvantagens

Os testes de IgE baseados em *microarray* permitem: (i) acelerar o diagnóstico, pois analisam em simultâneo vários parâmetros em poucas horas; (ii) utilizar uma amostra mínima de soro do doente; (iv) adotar medidas profiláticas, quando aplicável, em termos de reatividade cruzada; (iv) otimizar o diagnóstico de situações particulares, como a alergia alimentar e alergia ao latex; (vi) elaborar uma imunoterapia específica adequada a cada doente, de acordo com o seu perfil de sensibilização ^[60].

Quando comparada ao ImmunoCAP® (FEIA), a principal desvantagem desta técnica é a sensibilidade inferior, sobretudo em situações de níveis de IgE específica baixos. Além disso, os resultados do ISAC são semi-quantitativos e, uma vez que a técnica utiliza pequenas quantidades de alérgeno ligado, permite a competição entre outros isótipos para além das IgE [22]. A tabela 5 sumariza as vantagens e limitações de diferentes técnicas de mensuração de IgE específica.

Tabela 5: Vantagens e desvantagens de ISAC, ImmunoCAP® e testes cutâneos.

	Vantagens	Desvantagens
ISAC	<ul style="list-style-type: none"> - 30µl de soro ou plasma (sangue capilar ou venoso) - Capacidade para 112 alérgenos em paralelo - Proteínas naturais ou recombinantes - Menor quantidade de alérgeno por ensaio - Não sofre interferência de altas concentrações de IgE 	<ul style="list-style-type: none"> - Método manual - Ensaio semi-quantitativo - Menor sensibilidade - Maior variabilidade na análise inter-ensaio para determinados alérgenos - Maior coeficiente de variação - Algumas fontes alérgicas não incluídas - Menos apropriado para monitorizar a sensibilização do paciente - Potencial interferência entre IgE e outros isótipos, sobretudo IgG
ImmunoCAP	<ul style="list-style-type: none"> - Método automático - Ensaio quantitativo - Alta sensibilidade - Baixo coeficiente de variação - Extratos naturais de alérgenos, proteínas purificadas ou recombinantes - Apropriado para monitorização da sensibilização 	<ul style="list-style-type: none"> - 40µl de soro - Um alérgeno por ensaio - Deteta anticorpos de menor afinidade que têm pouca ou nenhuma relevância clínica
Prick-test cutâneo	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilidade elevada (dependente do extrato) - Leitura imediata 	<ul style="list-style-type: none"> - Manual - Um alérgeno por picada - Apenas extratos naturais de alérgenos - Não apropriado para monitorizar a sensibilização - Outros riscos associados

5. Conclusões e perspetivas futuras

A alergia pode ser definida como uma reação adversa a um antigénio, mediada por mecanismos imunológicos ^[3]. Nas últimas décadas tem-se tornado um problema de saúde à escala mundial e está associada a um impacto negativo significativo na qualidade da vida ^[4].

O diagnóstico da alergia é fundamentalmente clínico, mas pode ser completado por testes *in vivo* (ex: testes cutâneos) e/ou *in vitro* ^[17]. Apesar de mais dispendiosos e morosos, os testes *in vitro* mostram ser uma alternativa bastante eficaz, especialmente quando os testes cutâneos não podem ser realizados ou interpretados corretamente, como no caso de pacientes com dermatite generalizada ou naqueles que não podem interromper a toma de anti-histamínicos, além de evitar reações sistémicas, como anafilaxia ^[6,21].

O exame laboratorial considerado padrão-ouro para o diagnóstico das alergias é a determinação das IgEs específicas ^[31]. A utilização de alergénios purificados, naturais ou recombinantes, permitiu que as técnicas tradicionais de diagnóstico fossem aperfeiçoadas no que toca à reprodutibilidade, sensibilidade e estabilidade ^[17]. Atualmente, a determinação das IgEs pode ser feita por *singleplex* (monocomponentes) com a tecnologia ImmunoCAP ou, mais recentemente, por *multiplex*, através da tecnologia ISAC - ImmunoCAP Solid-Phase Allergen Chip ^[22]. A opção por *singleplex* ou *multiplex* deve ser equacionada de acordo com a relação custo benefício e complexidade do caso clínico.

A tecnologia ImmunoCAP permite ainda determinar outros parâmetros, como a ECP e a triptase, úteis em situações mais específicas. A Proteína catiónica do eosinófilo é uma medida objetiva do estado da inflamação na asma ^[28] e o teste ImmunoCAP® ECP, apesar de moroso, apresenta uma elevada precisão e especificidade ^[42]. A triptase sérica é um marcador específico da ativação mastocitária, libertado durante uma reação anafilática ^[32]. Apesar de a sensibilidade ser moderada, a especificidade desta metodologia é bastante elevada ^[33].

Além destas técnicas realizadas em tecnologia ImmunoCAP® e similares, outras ferramentas laboratoriais podem ser utilizadas, algumas delas apenas disponíveis em

laboratórios especializados. O *immunoblotting*, que associa técnicas de separação por eletroforese e métodos de detecção de anticorpos, é um método qualitativo/semi-quantitativo com elevada sensibilidade e especificidade, no entanto é moroso e requer um bom conhecimento dos pesos moleculares das partículas constituintes de cada alérgeno ^[1]. A determinação de marcadores de ativação de basófilos como o CD63 e o CD203c por citometria de fluxo, através da utilização de anticorpos antiCD63 e antiCD203c, é uma técnica promissora, mas necessita da padronização das condições para cada alérgeno a testar ^[38].

Existem ainda outras técnicas não específicas disponíveis no laboratório que podem completar o estudo das alergias, como o hemograma e a análise de secreções, que detetam a eosinofilia muitas vezes característica da doença alérgica ^[46].

Pode concluir-se que o laboratório tem, cada vez mais, um papel de relevância no complemento ao diagnóstico e investigação da doença alérgica, sempre em conjunto com uma história clínica clara e completa. Muitos dos problemas no diagnóstico que se relacionam com a estrutura tridimensional dos alérgenos estão a ser superados com a substituição dos alérgenos naturais por alérgenos recombinantes geneticamente desenhados e o futuro do diagnóstico da alergia passa pelo aperfeiçoamento das técnicas disponíveis até à data, desenvolvimento de novas metodologias com custos mais suportáveis e purificação de novas moléculas alérgicas.

6. Referências bibliográficas

- [1] Bom AT, Carrapatoso I, Loureiro C, Pinto AM. Alergia Alimentar. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2013.
- [2] Daher S, Galvão C, Abe A, Cocco R. Diagnóstico em doenças alérgicas mediadas por IgE. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia. 2009;32:3-8.
- [3] Ferreira, M. Aspectos básicos clínicos das alergias. Lisboa: Publicações Ciência & Vida, 2011.
- [4] Lloid M. PathCare Pathology forum: allergy investigations. 1st edition. PathCare Business Centre, 2014.
- [5] Couto M, Almeida MM. Diagnóstico da doença alérgica em Portugal: Um estudo exploratório. Rev Port Imunoalergologia. 2011;19(1):23-32.
- [6] Cianferoni A, Spergel, J M. Food Allergy: Review, Classification and Diagnosis. Allergy International. 2009;58:457-466.
- [7] Johansson S, Hourihane JOB, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. Allergy. 2001; 56:813-24.
- [8] World allergy organization: WAO/EAACI Allergy Definitions. [página de internet acedida em julho de 2014]. Disponível em http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/nomenclature/english.php
- [9] Zubeldia J, Baeza L, Jáuregui R, Senet C. Libro de las enfermedades alérgicas de la fundación BBVA. 1.^a ed. Bilbao: Fundación BBVA, 2012.
- [10] Carrapatoso I, Cadinha S, Sanz ML. Aplicação do teste de activação dos basófilos no estudo de reacções de hipersensibilidade a alimentos e fármacos. Rev Port Imunoalergologia. 2005;13(2):153-164.
- [11] Quesada JM. El papel del laboratorio en el diagnostico de la alergia. Ed Cont Lab Clín. 2006;10:13-21.
- [12] Shao-heng HE, Zhang H, Zeng X, Chen D, Yang P. Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. Acta Pharmacologica Sinica. 2013;34:1270-1283.

- [13] Resende RO. Reatividade de IgE específica a *Dermatophagoides pteronyssius* (Acari: Pyroglyphidae) e suas frações ligantes de Concanavalina A no soro de pacientes com alergia respiratória. Uberlândia. Dissertação [Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia aplicadas] – Universidade federal de Uberlândia; 2006.
- [14] Mitchel R, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th edition. Philadelphia: Elsevier, 2010. [acedido em setembro de 2014] Disponível em <https://drive.google.com/file/d/0BzMrjObTakyyTXBSTk5QSFVqZ0U/edit>
- [15] Ramos REM, Lyra NRS, Oliveira CM. Alergia alimentar: reações e métodos diagnóstico. *Journal of Management and Primary Health Care*. 2013;4(2):54-63.
- [16] Siles RI, Hsieh FH. Allergy blood testing: A practical guide for clinicians. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2011;78(9):585-592.
- [17] Silva AR, Cruz AA, Kober A, Pastorino AC, Yang AC, Carvalho BTC et al. IgE – da síntese à prática clínica: Em comemoração aos 40 anos de descoberta da IgE. São Paulo: Rosconi, 2008.
- [18] Borges MS, Ivanchevic JC, Pérez NR, Ansotegui I. Evidence based approaches to diagnosis and management. In: Pawankar R, Canonica GW, Holgate ST, Lockey RF. WAO White book on allergy. Milwaukee: World Allergy Organization, 2011.
- [19] Teixeira ARN. Alergias Alimentares na Infância. Porto. Monografia [Licenciatura em Ciências da Nutrição] – Universidade do Porto; 2010.
- [20] Perez JFC, Arango JC, Cardona-Arias, JA. Revisión sistemática y metaanálisis: Evaluación de técnicas inmunológicas in vitro para el diagnóstico de alergias: metaanálisis 2000-2012(*). *Rev Esp Salud Pública*. 2014; 88:67-84.
- [21] Cocco RR, Nunes ICC, Pastorino AC, Silva L, Sarni ROS, Filho NAR *et al*. Abordagem laboratorial no diagnóstico da alergia alimentar. *Revista Paulista de Pediatria*. 2007; 25(3):258-65.
- [22] Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R, Schmid-Grendelmeier P, Hage M, Baena-Cagnani CE, et al. WAO - ARIA - GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organization Journal*. 2013;6:1-17. Disponível em <http://www.waojournal.org/content/6/1/17>

- [23] Arruda Chávez E. Pruebas diagnósticas en alergia y su utilidad clínica. *Rev Med Hered*, 2004; 15(2):113-117.
- [24] Burmester GR, Pezzutto A. *Imunologia: Texto e Atlas*. Lisboa: Lidel, 2005.
- [25] Marinho S, Almeida MM, Loureiro V, Matos V, Gaspar A, Murta R, et al. Avaliação do desempenho do teste de rastreio de alergia alimentar FP5® (DPC-Amerlab). *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*. 2004;XII:383-389.
- [26] Goikoetxea MJ, Sanz ML, García BE, Mayorga G, Longo N, Gamboa PM, et al. Recommendations for the Use of In Vitro Methods to Detect Specific Immunoglobulin E: Are They Comparable?. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013; 23(7):448-454.
- [27] dias JG, Silva SL, Luz S, Silva SP, Santos AS, Pedro E, et al. Estudo comparativo de métodos de rastreio de atopia em doentes com rinite (ImmunoCAP® Rapid versus Phadiatop® e testes cutâneos em picada). *Rev Port Imunoalergologia*. 2013;21(1):41-47.
- [28] Manual de Imunoalergologia 2003, *Pharmacia Diagnostics*.
- [29] Pires G. Alergia Cruzada. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*. 2005; 13(1):23-26.
- [30] ThermoScientific: ImmunoCAP Specific IgE. [página de internet acedida em setembro de 2014]. Disponível em <http://www.phadia.com/pt-pt/5/products/ensaaios/1/>
- [31] Gandarillas JA, Laita CA, Vázquez D. Taller de diagnóstico de la alergia. *Rev Pediatr Aten Primaria*. 2007;9(2):129-33
- [32] Palma-Carlos AG, Palma-Carlos ML. Mediadores e inflamação alérgica. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, 2003; 10:79-84.
- [33] Mayorga C, Sanz ML, Gamboa PM, García BE. In vitro Diagnosis of Immediate Allergic Reactions to drugs: An update. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2010; 20(2): 103-109.
- [34] Tavares B. Alergia a veneno de himenópteros: Novos métodos de diagnóstico. *Acta Med Port*. 2005; 18: 445-452.
- [35] Servicio de alergia del Hospital La Fe [Página da internet]. Test de activación de basófilos [acedido em setembro de 2014]. Disponível em: <http://alergialafe.org/descargas/TAB.pdf>
- [36] Ebo C, Bridts CH, Hagendorens MM, Aerts NE, Clerck SL, Stevens WJ. Basophil Activation Test by Flow Cytometry: Present and Future Applications in Allergology. *Clinical Cytometry Society*. 2008; 74B:201-210.

- [37] Hipólito ACLC. Diagnóstico de Urticária autoimune: Estudo de activação dos Basófilos por Citometria de Fluxo. Lisboa. Dissertação [Mestrado em Imunologia Médica] – Faculdade de Medicina de Lisboa da UL, 2008.
- [38] Chirumbolo S. Basophil activation test in allergy: time for an update. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012; 158:99–114.
- [39] Santos A, Gibbs B, Stephens A, Turcanu V, Lack G. Estudo *in vitro* dos basófilos é uma ferramenta diagnóstica e de investigação útil em alergologia. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*. 2011; 19(2): 73-83.
- [40] Simão HML, Esteban MM. Níveis séricos da proteína catiônica do eosinófilo na asma brônquica infantil. *Revista brasileira de alergia e imunopatologia*. 2002; 25(3):93-98.
- [41] ThermoScientific: ImmunoCAP ECP. [página de internet acedida em setembro de 2014]. Disponível em <http://www.phadia.com/es/5/Productos/Ensayos/ImmunoCAP-ECP/>
- [42] Lowhagen O, Wever AMJ, Lusuardi M, Moscato G, De Backer WA, Gandola L, et al. The inflammatory marker serum eosinophil cationic protein (ECP) compared with PEF as a tool to decide inhaled corticosteroid dose in asthmatic patients. *Respiratory medicine*. 2001;96(2002):95-101.
- [43] ThermoScientific: ImmunoCAP Tryptase. [página de internet acedida em setembro de 2014]. Disponível em <http://www.phadia.com/pt-pt/5/products/ensaio/immunocap-tryptase/>
- [44] Lopata AL. Specialized in vitro diagnostic methods in the evaluation of hypersensitivity – an overview. *Current Allergy & Clinical Immunology*. 2006;19(1): 18-20.
- [45] Pedro E, Santos MCP. Controvérsias em Imunoalergologia. Venenos, alergia sem IgE?. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*. 2009; 17(1):7-11.
- [46] Medeiros D, Silva AR, Rizzo JA, Motta ME, Oliveira FHB, Sarinho ESC. Total IgE level in respiratory allergy: study of patients at high risk for helminthic infection. *J Pediatr (Rio J)*. 2006; 82(4):255-9.
- [47] Bush MK. Diagnostic Tests in Allergy. In: Slavin RG, Reisman RE. *Expert Guide to Allergy & Immunology*. Philadelphia: American College of Physicians, 1999. p.1-22.
- [48] Walcher DL, Pedroso D, Frizzo MN. Associação entre parasitoses intestinais e alterações do hemograma. *Revista Mirante – FACOS/CNEC*. 2013;3(1)18-40.
- [49] Rusznak C, Davies RJ. ABC of allergies: Diagnosing allergy. *BMJ*. 1998; 316:386-689.

- [50] Manning SC, Neto LB. Sinusite em Pediatria. Manual de otorrinolaringologia pediátrica da IAPO. 2007;6:96-101.
- [51] Arruda LK, Moreno AS, Ferreira F. Diagnóstico molecular de alergia: pronto para a prática clínica?. *Braz J Allergy Immunol*, 2013;1(4):187-194.
- [52] Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A, et al. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *The FASEB Journal* [serial on the internet]. 2002 [citado em novembro de 2014];16(3):414-435.
- [53] D'Urbano LE, Pellegrino K, Artesan MC, Donnanno S, Luciano R, Riccardi C, et al. Performance of a component-based allergen-microarray in the diagnosis of cow's milk and hen's egg allergy. *Clinical & Experimental Allergy*. 2010; 40(10):1561-1570.
- [54] Scaparrotta A, Cingoliani A, Attanasi M, Cerasa M, Nigro R, Di Pillo S, et al. Recombined allergens in diagnosis and therapy of allergic diseases. *European Medical Journal*, 2013;1:101-107.
- [55] Asociacion Aragonesa de alergia [página da internet]. Pamplona: Departamento de Alergología e Inmunología Clínica de la Clínica Universitaria de Navarra, 2013. [citado em novembro de 2015]. Disponível em <http://www.alergoaragon.org/2013/segunda1.html>
- [56] Chambel M, Paiva M, Prates S, Loureiro V, Pinto PL. Polissensibilização a pólenes analisada e reinterpretada à luz do método ImmunoCAP ISAC®. *Rev Port Imunoalergologia*. 2002; 20(3):211-219.
- [57] Caubet JC, Sampson HA. Beyond skin testing: State of the Art and New Horizons in Food Allergy Diagnostic Testing. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2012;32:97-109.
- [58] Servicio de alergia del Hospital La Fe [Página da internet]. Detección de IgE específica frente a componentes alérgicos por medio de un microarray [accedido em setembro de 2014]. Disponível em: <http://alergialafe.org/descargas/microarray.pdf>
- [59] Araujo LML, Filho NAR. Determinação de IgE a alérgenos alimentares por microarray (ImmunoCAP-ISAC) em pacientes com rinite alérgica. *Braz J Allergy Immunol*. 2013;1(4):219-222.
- [60] Carvalho S, Gaspar A, Prates S, Pires G, Silva I, Matos V, et al. ImmunoCAP ISAC®: Tecnologia microarray no estudo da alergia alimentar em contexto com a reactividade cruzada. *Rev Port Imunoalergologia*. 2010;18(4):331-352.