

Aquisição de tolerância às proteínas do peixe: Alteração do padrão de sensibilização identificado por *immunoblotting*

Fish protein tolerance acquisition: Sensitization profile changes identified by immunoblotting

Data de recepção / Received in: 16/05/2010

Data de aceitação / Accepted for publication in: 23/06/2010

Rev Port Imunoalergologia 2010; 18 (4): 353-371

Ana Célia Costa^{*1}, Fátima Cabral Duarte^{*1}, José Costa Trindade², Maria Leonor Bento²,
Maria da Conceição Pereira dos Santos³

¹ Serviço de Imunoalergologia/Immunoallergy Department, Hospital de Santa Maria – Centro Hospitalar Lisboa Norte

² Serviço de Pediatria/Paediatrics Department, Hospital de Santa Maria – Centro Hospitalar Lisboa Norte

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

RESUMO

Introdução: Os estudos de *immunoblotting* têm contribuído para a caracterização da alergia alimentar, nomeadamente na alergia ao peixe, permitindo identificar várias proteínas reconhecidas por IgE específica (sIgE). **Objectivo:** Avaliação do perfil de sensibilização, por *immunoblotting*, no seguimento de doentes alérgicos ao peixe. **Materiais e métodos:** Nove doentes (5M,4F; média de idades-12,2±6,4 anos) alérgicos ao peixe, com testes cutâneos em picada (TCP) e sIgE positivos para bacalhau, sardinha, salmão e atum, seleccionados aleatoriamente (T0) para seguimento durante 3 anos (T1) e avaliados por *immunoblotting* para os 4 extractos de peixe em T0 e T1. **Resultados:** Em T1, 6 doentes mantinham alergia ao peixe – Grupo I – e 3 adquiriram tolerância para pelo menos uma espécie de peixe – Grupo II. Entre T0 e T1, observou-se uma diminuição significativa dos valores médios de sIgE (kU/L) para o bacalhau ($p=0,003$), sardinha ($p=0,003$) e salmão ($p=0,003$) e da reactividade cutânea para a sardinha ($p=0,01$), bacalhau ($p=0,008$) e salmão ($p=0,008$). O estudo de *immunoblotting* revelou a existência de proteínas com pesos moleculares de 12-14kDa (Gad c I),

24-25kDa (Gad m 1) e 40-41 kDa (homóloga de APDH) já identificadas na literatura e outras bandas de 30-33, 50-54 e 60-63 kDa. Em T0, para o extracto de bacalhau, foram identificadas em todos os doentes, as proteínas de 12-14kDa (Gad c 1) e 24-25kDa (Gad m 1). O bacalhau foi o extracto de peixe com maior número de bandas identificadas pelo soro dos doentes. Os doentes do Grupo I apresentaram em T0 e T1, no *immunoblotting* dos 4 extractos de peixe testados, maior número e maior intensidade de bandas em relação aos doentes do Grupo II. **Conclusões:** Em todos os doentes, os valores de sIgE diminuíram para os quatro extractos de peixe. Nos que adquiriram tolerância foi também observado uma diminuição da intensidade ou desaparecimento de bandas no *immunoblotting*. Estes resultados sugerem que o *immunoblotting* poderá ser útil no seguimento e prognóstico de doentes alérgicos ao peixe.

Palavras-chave: Alergia ao peixe, *immunoblotting*, perfil de sensibilização, tolerância.

ABSTRACT

Background: Immunoblotting assays have contributed to the characterization of food allergy, particularly in fish allergy allowing the identification of several proteins recognized by specific IgE (sIgE). **Objective:** Evaluation of the sensitization profile by immunoblotting in the follow-up of fish allergic patients. **Materials and methods:** Nine fish allergic patients (5M, 4F; mean age 12.2 ± 6.4 years-old) with skin prick tests (SPT) and sIgE positive to: cod, sardine, salmon and tuna were randomly selected (T0) to be followed for 3 years (T1) and evaluated by immunoblotting for 4 fish extracts in T0 and T1. **Results:** In T1, six patients maintained fish allergy-Group I- and three developed tolerance to at least one of the fish species-Group II. There was a significant decrease of mean sIgE (kU/L) values between T0 and T1 for cod ($p = 0.003$), sardine ($p = 0.003$) and salmon ($p = 0.003$) and of cutaneous reactivity for sardine ($p = 0.01$), cod ($p = 0.008$) and salmon ($p = 0.008$). The immunoblotting study showed protein bands with a molecular weight of 12-14kDa (Gad c 1), 24-25kDa (Gad m 1) and 40-41 kDa (APDH homologous) that have been already identified in the literature, and other protein bands of 30-33, 50-54 and 60-63 kDa. In T0, for cod extract, proteins of 12-14kDa (Gad c 1) and 24-25kDa (Gad m 1) molecular weight were identified in all patients. Cod was the fish extract with higher number of protein bands identified by patients sera. Patients from Group I, presented in T0 and T1 a higher number of protein bands and with higher intensity in the immunoblotting of the four fish extracts tested, than patients from Group II. **Conclusions:** In all patients, sIgE values decreased for the four fish extracts. In those who acquired tolerance, a decrease in the intensity or disappearance of bands in immunoblotting assays was also observed. These results suggest that immunoblotting assays could be useful in the follow-up and prognosis of fish allergic patients.

Key-words: Fish allergy, immunoblotting, sensitization, tolerance.

Abreviaturas

TCP – Testes cutâneos em picada
sIgE – IgE específica
PPO – Prova de provocação oral

Abbreviations

SPT – Skin Prick Tests
sIgE – Specific Immunoglobulin E
OCT – Oral challenge test

INTRODUÇÃO

O peixe, apesar de ser importante na dieta humana, pode tornar-se um potente alergénio alimentar¹. Na criança, constitui a terceira causa mais frequente de alergia alimentar, a seguir ao leite e ao ovo²⁻⁵. A prevalência de alergia ao peixe está associada à sua utilização na dieta local¹. Os países europeus com maior consumo deste alimento são os escandinavos, a Espanha e Portugal¹, onde a alergia ao peixe afecta 1/1000 da população⁶.

As reacções adversas ao peixe mais reportadas são as alérgicas mediadas por IgE, desencadeadas por via digestiva, inalatória ou cutânea. Neste contexto, as manifestações clínicas observadas são as cutâneas, respiratórias, gastrointestinais e anafilaxia⁷⁻¹³.

A alergia ao peixe surge, em média, entre os 9-12 meses de idade, podendo estar associada a outras alergias alimentares⁷. Esta alergia tende a ser persistente, 80% dos doentes mantêm-se alérgicos 10 anos após o início dos sintomas⁷. As espécies de peixe das famílias Tunidae (ex: atum) e Xiphidae (ex: peixe-espada) parecem ser as menos alérgicas e as mais alérgicas as da ordem Gadiforme (ex: bacalhau)^{7,8,14}.

Na avaliação dos doentes alérgicos ao peixe é importante a conjugação da história clínica com o resultado dos testes cutâneos em picada (TCP) e doseamento da IgE específica (slgE) para as várias espécies de peixe. No entanto, o *gold standard* do diagnóstico é a prova de provocação oral (PPO)⁷, com todos os riscos inerentes, consumo de tempo e recursos na sua preparação e execução. Alguns autores têm tentado encontrar parâmetros laboratoriais que possam obviar a realização da PPO. Em 1997 e 2001, Sampson publicou dois estudos em que foram incluídos doentes alérgicos ao peixe, verificando-se uma relação entre quantificação da slgE e a probabilidade de uma PPO positiva^{15,16}. Em 2008, Östblom *et al* publicou outro estudo sobre o valor preditivo do valor de slgE para o peixe e a probabilidade de uma reacção clínica, embora

INTRODUCTION

While fish is an important part of our diet, it may also be a potent food allergen¹. In children, it is the third most frequent cause of food allergy after milk and egg²⁻⁵. The prevalence of fish allergy is associated to its use in the local diet¹. European countries with a higher consumption of fish are Scandinavia, Spain and Portugal¹, where allergy to fish affects 1/1000 of the population⁶.

The most frequently reported adverse reactions to fish are IgE-mediated allergies, triggered by digestive, inhalation or cutaneous routes. Here the clinical manifestations seen are cutaneous, respiratory, gastrointestinal and anaphylaxis⁷⁻¹³.

Fish allergy appears on average, at 9-12 months of life and may be associated to other food allergies⁷. This allergy tends to persist, with 80% of patients still allergic 10 years after onset of symptoms⁷. Species from the *Tunidae* (such as tuna) and *Xiphidae* (such as swordfish) families appear to be the least allergenic and the Gadiforme order (e.g. codfish) the most allergenic^{7,8,14}.

In evaluating fish-allergic patients it is important to assess their clinical history along with the result of the skin prick tests (SPT) and specific IgE (slgE) levels to the various species of fish. However, the gold standard in diagnosis is the oral challenge test (OCT)⁷, with all of its inherent risks, and the consumption of time and resources demanded in its preparation and performance. Some authors have sought out laboratory parameters that could do away with the need for OCT. In 1997 and 2001, Sampson published two studies which included fish-allergic patients, finding a relationship between slgE levels and the likelihood of a positive OCT^{15,16}. In 2008, Östblom *et al* published a study on the predictive value of slgE to fish and the likelihood of a clinical reaction, although the onset of symptoms was not documented via OCT, but by reports given by the children's parents¹⁷.

o aparecimento de sintomas não tenha sido documentado através de PPO, mas de acordo com o relato dos pais das crianças¹⁷.

Os estudos por *immunoblotting* têm sido utilizados na caracterização de doentes com alergia alimentar¹⁸. Nos doentes alérgicos ao peixe, têm demonstrado que a maioria das espécies de peixe contém proteínas IgE reactivas, com peso molecular entre 12 e 130 kDa¹⁹⁻²².

A parvalbumina Gad c I, alergénio *major*, foi a primeira proteína a ser descrita no bacalhau do Báltico^{23,24}. É uma glicoproteína de ligação ao cálcio, termoestável, com peso molecular de 12 kDa, presente no músculo dos vertebrados^{23,24}, considerada alergénio *major* do bacalhau e panalergénio do peixe^{6,11,24}. Posteriormente, foram descritas a parvalbumina Gad m I (24-25 kDa), identificada no bacalhau do Atlântico²⁵, e uma proteína homóloga da APDH (*Aldehyde Phosphate Dehydrogenase*) de 40-41 kDa, presente no bacalhau cru²⁶. O colagénio foi, também, identificado como alergénio do peixe²⁷.

Em alguns estudos, com séries de doentes alérgicos ao peixe, foram identificadas por *immunoblotting* as três proteínas já descritas e outras com pesos moleculares diferentes, em diversos extractos, como bacalhau, atum, carpa, salmão, perca, enguia, cavala, linguado, peixe-gato e truta¹⁹⁻²².

A presença de reactividade cruzada entre as diferentes espécies de peixe, resultante da elevada homologia da sequência de aminoácidos entre as parvalbuminas nelas presentes, tem sido demonstrada por estudos de *immunoblotting*-inibição^{8,10,20,21,24,28,29}.

Apesar da riqueza de informação fornecida por estes estudos, até à data não foi publicado nenhum artigo sobre a utilidade desta metodologia, não só no diagnóstico como no seguimento e na avaliação do prognóstico dos doentes alérgicos ao peixe.

Objectivos: Avaliação do perfil de sensibilização, por *immunoblotting*, e da sua eventual relação com as manifestações clínicas, TCP e sIgE no seguimento de doentes alérgicos ao peixe.

Immunoblotting studies have been used to characterise patients with food allergy¹⁸. It has been shown in fish-allergic patients that the majority of fish species contain reactive IgE proteins, with a molecular weight between 12 and 130 kDa¹⁹⁻²².

Parvalbumin Gad c I, a major allergen, was the first protein to be described in Baltic cod^{23,24}. It is a glycoprotein which binds to calcium, is heat resistant, with a molecular weight of 12 kDa, found in the muscles of vertebrates^{23,24}, and is considered a major allergen of cod and a fish pan-allergen^{6,11,24}. Parvalbumin Gad m I (24-25 kDa), found in Atlantic cod²⁵, and a homologous protein of APDH (aldehyde phosphate dehydrogenase) of 40-41 kDa, found in raw cod²⁶ were subsequently described. Collagen has also been identified as a fish allergen²⁷.

Immunoblotting was used in some studies with series of patients allergic to fish to identify the three proteins described above, as well as others with different molecular weights, in various extracts tested, such as cod, tuna, carp, salmon, perch, eel, mackerel, sole, catfish and trout¹⁹⁻²².

Cross-reactivity among the different species of fish, the result of a high homology of amino-acid sequences between the fish parvalbumins, has been shown by immunoblot-inhibition studies^{8,10,20,21,24,28,29}.

Despite the wealth of information provided by these studies, no article has yet been published on the usefulness of this methodology in the diagnosis, follow-up or evaluation of prognosis in patients with allergy to fish.

Aims: To evaluate the sensitisation profile using immunoblotting, and the profile's relationship with clinical manifestations, SPT and sIgE in the follow-up of fish-allergic patients.

MATERIAL AND METHODS

Sample

Of the 15 patients with IgE-mediated diagnosed fish allergy followed in specialist appointments, we randomly

MATERIAL E MÉTODOS

População

Dos 15 doentes com diagnóstico de alergia ao peixe, mediada por IgE, seguidos na consulta de alergia alimentar, foram seleccionados aleatoriamente 9 doentes (5M, 4F; média de idades $12,2 \pm 6,4$; mínimo-6; máximo-27 anos). Todos os doentes apresentavam reacções imediatas (cutâneas, gastrintestinais e/ou respiratórias) após ingestão, contacto e/ou inalação de peixe.

Métodos

Todos os doentes foram submetidos a avaliação semestral entre o início do estudo (T0) e os 3 anos (T1), que incluiu:

- avaliação de eventuais ingestões acidentais e/ou voluntárias e respectivos sintomas;
- repetição de TCP para as espécies bacalhau, pescada, sardinha, linguado, salmão e atum) representativas das principais famílias de peixe consumidas em Portugal;
- doseamento de IgE específica e imunoblotting para: bacalhau, sardinha, salmão e atum;
- PPO para confirmação ou exclusão da tolerância a alguma espécie de peixe.

De acordo com a aquisição de tolerância a pelo menos uma espécie de peixe, os doentes foram divididos em 2 grupos: Grupo I – não tolerantes e Grupo II – tolerantes.

Testes cutâneos

Todos os doentes realizaram em T0 e T1, TCP com os extractos comerciais (Bial-Aristegui®, Bilbao, Spain) das 6 espécies de peixe referidas. Foi utilizada uma solução salina a 0,9% (controlo negativo) e histamina com concentração de 10 mg/mL (controlo positivo). Todos os doentes tinham TCP positivos (pápula com diâmetro médio ≥ 3 mm relativamente ao controlo negativo, após 15 minutos^{16,30,31}) para os extractos: de bacalhau, sardinha, salmão e atum.

selected nine (5M, 4F; mean age 12.2 ± 6.4 ; minimum 6, maximum 27 years old). All patients had immediate-onset reactions (cutaneous, gastrointestinal and/or respiratory) on contact with, or ingestion and/or inhalation of fish.

Methods

All patients were examined at six-month intervals between study-start (T0) and 3 years (T1), including:

- evaluation of any accidental and/or voluntary ingestion and respective symptoms;
- repeat SPT to cod, hake, sardine, sole, salmon and tuna, representing the main families of fish eaten in Portugal;
- measurement of specific IgE and immunoblotting to cod, sardine, salmon and tuna;
- OCT to confirm or rule out tolerance to some species of fish.

In line with acquisition of tolerance to at least one species of fish, patients were divided into two groups: Group I, non-tolerant and Group II, tolerant.

Skin tests

At T0 and T1 all patients underwent SPT to the commercial extracts (Bial-Aristegui®, Bilbao, Spain) of the six species of fish mentioned above. A 0.9% saline solution was used as negative control and a 10 mg/mL histamine concentration as positive control. All patients had positive SPT (mean wheal diameter ≥ 3 mm, compared to the negative control, after 15 minutes^{16,30,31}) to the cod, sardine, salmon and tuna extracts.

Specific IgE

Serum sIgE (kU/L) levels were measured to cod, sardine, salmon and tuna at T0 and T1, using ImmunoCap® (Phadia, Uppsala, Sweden), according to the manufacturer's instructions. All patients had positive sIgE values (> 0.35 kU/L) to the four extracts.

Doseamento de IgE específicas

Os valores séricos de sIgE (kU/L) foram determinados para bacalhau, sardinha, salmão e atum em T0 e T1, usando o ImmunoCap® (Phadia, Uppsala, Sweden), de acordo com as instruções do fabricante. Todos os doentes apresentavam valores de sIgE positivos (> 0,35 kU/L) para estes 4 extractos.

Immunoblotting

A avaliação por *immunoblotting* (AlaBLOT®, DPC, Los Angeles, EUA) foi efectuada para os 4 extractos de peixe comercialmente disponíveis (bacalhau, sardinha, salmão e atum) em T0 e T1. O teste AlaBLOT® é um teste qualitativo e foi executado de acordo com as instruções do fabricante.

Prova de provocação oral

Todos os doentes seleccionados (T0) apresentavam sintomas após ingestão de bacalhau, pescada, sardinha, linguado, salmão e atum. As PPO foram realizadas com as 6 espécies de peixe em T0, ao longo do seguimento e em T1 para confirmação de alergia ou aquisição de tolerância. Foram realizadas PPO abertas, iniciando-se com uma dose de 100 mg, progredindo de 15 em 15 minutos até atingir uma dose cumulativa de 110 g de peixe.

Análise estatística

A análise estatística foi efectuada através do *software* GraphPad Prism versão 5.0, EUA.

A comparação dos valores de IgE específicas (kU/L), do diâmetro médio da pápula (mm) nos TCP e do número de bandas identificadas no *immunoblotting* para os quatro extractos de peixe entre T0 e T1 na população total e nos Grupos I e II fez-se através do teste *Wilcoxon matched pairs* (valores emparelhados) e entre os Grupos I e II, em T0 e T1, através do teste Mann-Whitney para valores não emparelhados. Na análise dos valores obtidos em T1 de IgE específicas, diâmetro médio da pápula nos TCP e número de bandas identificadas no *immunoblotting* para o extracto

Immunoblotting

Immunoblotting (AlaBLOT®, DPC, Los Angeles, USA) was performed to the four fish extracts commercially available (cod, sardine, salmon and tuna) at T0 and T1. AlaBLOT® is a qualitative test and was performed in line with the manufacturer's instructions.

Oral challenge tests

All patients (T0) exhibited symptoms on ingestion of cod, hake, sardine, sole, salmon and tuna. OCTs were performed to the six species of fish at T0, throughout follow-up and at T1 to confirm allergy or acquisition of tolerance. We performed open OCTs, beginning with a dose of 100 mg, progressing every 15 minutes until we reached a cumulative dose of 110 g of fish.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using, GraphPad Prism software version 5.0.

Comparison of sIgE (kU/L), SPT's mean wheal diameter (mm) and the number of bands identified in immunoblotting to the four fish extracts between T0 and T1 in the total sample and in Groups I and II was performed using the paired Wilcoxon test and between Groups I and II at T0 and T1 using the Mann-Whitney test for unpaired data. For analysis of the T1 data, we used the Fisher's exact test to analyse sIgE values, SPT's mean wheal diameter and the number of bands identified in immunoblotting to the extract of fish to which the Group II patients had acquired tolerance.

The Spearman correlation coefficient (ρ) was used to evaluate agreement between the sIgE, SPT and immunoblotting results.

We considered $p < 0.05$ as statistically significant.

RESULTS

The mean age at first known exposure (ingestion) to fish was 6.8 ± 2.3 months (minimum 4, maximum 12

de peixe ao qual os doentes do Grupo II adquiriram tolerância foi utilizado o teste exacto de Fisher.

O coeficiente de correlação (ρ) de Spearman foi utilizado como medida de avaliação da concordância entre os resultados das IgE específicas, TCP e immunoblotting.

Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

A média de idades da primeira exposição (ingestão) conhecida ao peixe foi $6,8 \pm 2,3$ meses (mínimo-4, máximo-12 meses) e a da primeira manifestação de alergia foi $7,5 \pm 2,9$ meses (mínimo-4, máximo-12 meses). A maioria dos doentes (77,7%) teve sintomas após a primeira ingestão. Todos apresentavam sintomas com a ingestão. Em 7 doentes (77,7%) o contacto com o peixe e em 2 (22,2%) a inalação dos vapores de cozedura do peixe desencadeava manifestações clínicas.

Todos os doentes apresentavam outras sensibilizações além do peixe, nomeadamente a aeroalergénios (ácaros-8, pólenes-7, epitélios-3) e a outros alimentos (moluscos em todos os doentes, crustáceos em 4, ovo em 6, frutos secos e melão em 1 e rosáceas em 1). Estes doentes estavam sensibilizados e tinham sintomas com os alimentos referidos além do peixe (Quadro I).

Todos os doentes tinham doença alérgica concomitante, nomeadamente eczema atópico em 8 (88,8%), rinite em 6 (66,6%), asma em 4 (44,4%) e rinoconjuntivite em 2 (22,2%). O eczema manifestado na maioria destes doentes (88,8%) surgiu antes da alergia ao peixe.

Em T0, todos os doentes apresentavam reacções imediatas após ingestão, contacto e/ou inalação de peixe (Quadros I e 2), como manifestações cutâneas (urticária e/ou angioedema); sintomas respiratórios em 2 e sintomas gastrintestinais (vómitos) em 4. Verificou-se agravamento de eczema com a exposição ao peixe em 2 doentes. Não se verificou anafilaxia como manifestação

months) and that of the first allergic reaction was at 7.5 ± 2.9 months (minimum 4, maximum 12 months). The majority of patients (77.7%) had symptoms on first ingestion. All presented symptoms on ingestion. In seven patients (77.7%) contact with fish and in two (22.2%) inhaled steam from cooking fish triggered clinical manifestations.

All patients had sensitisations in addition to fish, namely to aeroallergens (mites in eight, pollen in seven, dander in three) and other foods (molluscs in all patients, crustaceans in four, egg in six, nuts and melon in one and rosaceae fruits in one). These patients were sensitised and had symptoms to these abovementioned foods in addition to fish (Table I).

All patients had concomitant allergic disease: atopic eczema in eight patients (88.8%), rhinitis in six (66.6%), asthma in four (44.4%) and rhinoconjunctivitis in two (22.2%). In the majority of these patients' (88.8%) eczema appeared before the fish allergy.

At T0, all patients presented immediate-onset reactions upon ingestion of, contact with and/or inhalation of fish (Tables I and II), in addition to cutaneous manifestations (urticaria and/or angioedema): respiratory symptoms in two and gastrointestinal symptoms (vomiting) in four. The eczema aggravated with exposure to fish in two patients. No patient in the sample had anaphylaxis as a clinical manifestation of fish allergy. Up to the diagnosis at food allergy specialist appointment (based on SPT, sIgE, and open OCT) they practiced a self-restricted diet excluding all fish. Mean time from onset of symptoms until the specialist appointment was approximately 13 months (mean age at diagnosis was 21 months).

After three years of follow-up (T1), during which no accidental ingestion of fish occurred, six patients maintained their fish allergy; Group I (3M, 3F; mean age 13.6 ± 7.71 ; minimum 6, maximum 27 years old). The other three patients, aged between 7 and 9 years old, acquired tolerance to some fish; Group II (2M, 1F; mean age 9.3 ± 0.5 ; minimum

Quadro I. Caracterização clínica dos doentes alérgicos ao peixe (n=9)

Doentes	Sexo	Idade (anos)	Idade 1.º contacto (meses)	Idade início de sintomas (meses)	Tempo decorrido até ao diagnóstico definitivo (meses)	Via(s) de exposição ao peixe associada(s) a sintomas	Outras sensibilizações	Doença alérgica concomitante
1	M	6	7	12	12	Ingestão, contacto	Ácaros, pólenes, crustáceos, moluscos, ovo	Eczema, Rinite, Asma
2	M	8	6	6	24	Ingestão, contacto	Ácaros, pólenes, crustáceos, moluscos, ovo, melão, frutos secos	Eczema, Rinite
3	F	27	6	6	13	Ingestão, contacto inalação	Ácaros, pólenes, epitélios, moluscos, rosáceas	Eczema, Rinite
4	F	11	6	6	18	Ingestão, contacto inalação	Ácaros, pólenes, epitélios, crustáceos, moluscos	Rinite, Asma
5	M	18	9	10	3	Ingestão, contacto	Ácaros, pólenes, moluscos, ovo	Eczema, Rinite, Asma
6	F	12	12	12	14	Ingestão	Ácaros, pólenes, epitélios, moluscos, ovo	Eczema, Rinoconjuvite, Asma
7	M	9	6	6	20	Ingestão, contacto	Ácaros, crustáceos, moluscos, ovo	Eczema, Rinoconjuvite
8	F	10	6	6	7	Ingestão	Ácaros, pólenes, moluscos	Eczema, Rinite
9	M	9	4	4	10	Ingestão, contacto	Moluscos, ovo	Eczema

clínica de alergia ao peixe em nenhum dos doentes estudados. Até ao diagnóstico em consulta de alergia alimentar (baseado em TCP, sIgE e PPO aberta) fizeram auto-restrição de todas as espécies de peixe. O tempo médio decorrido desde o início dos sintomas até à consulta foi de cerca de 13 meses (idade média do diagnóstico – 21 meses).

Após 3 anos de seguimento (T1), durante os quais não ocorreu nenhuma ingestão acidental de peixe, verificou-se que 6 doentes mantinham alergia ao peixe – Grupo I (3M, 3F; média de idades-13,6±7,71; mínimo – 6; máximo – 27 anos). Os outros três doentes, entre os 7 a 9 anos de idade, adquiriram tolerância a alguns peixes – Grupo II (2M, 1F; média de idades 9,3±0,5; mínimo – 9; máximo – 12 anos). A tolerância ao peixe foi confirmada através de PPO

9, maximum 12 years old). Tolerance to fish was confirmed by an open OCT, and of the tolerant patients, patients 7 and 8 had acquired tolerance to tuna and sole and patient 9 to tuna only (Table 2).

Patients only began ingestion of fish when there was a negative OCT (Group II patients), and none had undergone tolerance induction.

Table 3 shows the mean SPT wheal diameters and mean sIgE in the two patient groups for the four fish extracts. Statistically significant differences are indicated.

Immunoblotting at T0 showed an individual profile for the four fish extracts, identifying six protein bands: 12-14 kDa (Gad c 1), 24-25kDa (Gad m 1), 40-41kDa (APDH homologue), 30-33, 50-54 and 60-63 kDa (Table 4).

Table 1. Clinical characterisation of the fish-allergic patients (n=9)

Patients	Sex	Age (Years)	Age at 1st contact (months)	Age at onset of symptoms (months)	Time to definite diagnosis (months)	Routes of exposure to fish associated to symptoms	Other sensitisations	Concomitant allergic disease
1	M	6	7	12	12	Ingestion, contact	Mites, pollen, crustaceans, molluscs, egg	Eczema, Rhinitis, Asthma
2	M	8	6	6	24	Ingestion, contact	Mites, pollen, crustaceans, molluscs, egg, melon, nuts	Eczema, Rhinitis
3	F	27	6	6	13	Ingestion, contact inhalation	Mites, pollen, dander, molluscs, rosaceae fruits	Eczema, Rhinitis
4	F	11	6	6	18	Ingestion, contact inhalation	Mites, pollen, dander, crustaceans, molluscs	Rhinitis, Asthma
5	M	18	9	10	3	Ingestion, contact	Mites, pollen, molluscs, egg	Eczema, Rhinitis, Asthma
6	F	12	12	12	14	Ingestion	Mites, pollen, dander, molluscs, egg	Eczema, Rhinoconjunctivitis, Asthma
7	M	9	6	6	20	Ingestion, contact	Mites, crustaceans, molluscs, egg	Eczema, Rhinoconjunctivitis
8	F	10	6	6	7	Ingestion	Mites, pollen, molluscs	Eczema, Rhinitis
9	M	9	4	4	10	Ingestion, contact	Molluscs, egg	Eczema

aberta, tendo-se observado que de entre os doentes tolerantes, os doentes 7 e 8 adquiriram tolerância ao atum e linguado e o doente 9 adquiriu tolerância apenas ao atum (Quadro 2).

Os doentes só iniciaram ingestão do peixe de acordo com a PPO negativa (doentes do Grupo II), não tendo sido feita, em nenhum caso, indução de tolerância.

No Quadro 3 apresentam-se os valores médios da pápula dos TCP e de sIgE nos dois grupos de doentes e referentes aos 4 extractos de peixe estudados, assinalando-se as diferenças estatisticamente significativas, quando elas existem.

O estudo de *immunoblotting* em T0 revelou um perfil individual para os 4 extractos de peixe, identificando 6 bandas proteicas: 12-14 kDa (Gad c I), 24-25kDa (Gad m I),

In terms of the mean number of protein bands identified in immunoblotting for each fish extract, we observed:

- i) that for cod, the same number of bands (6) were seen at T0 and T1, with no differences between Groups I and II;
- ii) that for sardine, there was a higher number of bands in Group I than II, but this was only statistically significant at T1 (Group I, 5, Group II, 1.6; $p = 0.02$);
- iii) that for salmon, there was a higher number of bands at T1 than at T0, but this was only statistically significant for the total sample (T0, 1.7 and T1, 3.7; $p = 0.02$) and Group I (T0, 2 and T1, 5; $p = 0.03$);
- iv) that for tuna, there was a higher number of bands in Group I than II, but this was only statistically significant at T1 (Group I, 4.1 and Group II, 0.6; $p = 0.02$).

Quadro 2. Relação entre as características clínicas e laboratoriais dos doentes alérgicos ao peixe (n=9)

Doentes	Sintomas	sIgE (kU/L)								Tolerância ao peixe em T1 (idade de início)
		TCP (diâmetro médio da pápula em mm)								
		Bacalhau		Sardinha		Salmão		Atum		
T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1			
1	Vómitos, U, Ang # U contacto	>100	30,8	>100	32,2	>100	20,9	23,2	23,6	Não
		14	9	11	5	11	9	4	5	
2	Vómitos, Eczema, U, Ang # U contacto	>100	10,5	36,5	8,69	21,3	7,92	3,11	3,95	Não
		12	5,5	10	6	6,5	5	4	4	
3	Vómitos, U, Ang # U contacto Sintomas resp-Inalação	>100	32	>100	22,9	>100	23,8	13,5	13	Não
		8	6	7	6	5	3	4	3,5	
4	U # U contacto Sintomas resp-Inalação	>100	38,1	>100	23,4	>100	16,9	15,1	15,2	Não
		8	6	8	5,5	9	4,5	4	4	
5	U,Ang # U contacto	79,3	10,8	44,6	8,15	35,2	12,9	11,9	12,7	Não
		16	13	9	6	7	6	8	8	
6	Eczema, U #	>100	63,6	82,7	55,5	58	23,2	18,6	5,13	Não
		8	7	8	7	8	6	6	4	
7	U,Ang # U contacto	6,04	2,08	2,16	2,07	2,42	1,92	3,22	0,46	Sim (7 anos) atum, linguado
		6	5	5	5	5	4	4,5	0	
8	U #	9,38	0,49	2,09	0,25	2,10	0,19	0,62	0,16	Sim (8 anos) atum, linguado
		6	5	5	4	5	3	4	0	
9	Vomitos, U # U contacto	>100	6,44	11,5	2,64	7,41	1,37	1,08	0,88	Sim (9 anos) atum
		9	5	6	3	6	3	4	0	

sIgE – IgE específica; TCP – testes cutâneos em picada; U – urticária; Ang – angioedema; Sintomas resp-Inalação – sintomas respiratórios desencadeados por via inalatória; # – sintomas desencadeados pela ingestão de peixe

40-41 kDa (homóloga de APDH), 30-33, 50-54 e 60-63 kDa (Quadro 4).

Relativamente ao número médio de bandas proteicas identificadas no *immunoblotting* por cada extracto de peixe, observou-se:

- i) para o extracto do bacalhau, o mesmo n.º de bandas identificadas (6) em T0 e T1, sem diferenças entre os Grupos I e II;
- ii) para a sardinha, um maior número de bandas no Grupo I do que no Grupo II, mas apenas estatisticamente significativo em T1 (Grupo I – 5, Grupo II – 1,6; $p=0,02$);
- iii) para o salmão, um maior número de bandas em T1 do que em T0, mas apenas estatisticamente significativo

Table 4 shows the characteristics of the immunoblotting profile of the nine patients, showing the various bands for the different fish allergens that were identified in each. At T0, bands corresponding to the proteins Gad c I and Gad m I in the extract of cod were recognised in the serum of all patients.

In the three patients who acquired partial tolerance to fish we found negative SPTs at T1 ($p < 0.05$) and significantly lower mean sIgE than in the non-tolerant patients (0.5 kU/L vs. 12.3 kU/L; $p < 0.01$), with all presenting sIgE values < 0.89 kU/L ($p < 0.05$) to tuna (tolerated fish). These patients who acquired tolerance to tuna presented at the T1 immunoblotting a significantly lower mean number of bands than the

Table 2. Clinical and laboratorial characteristics fo fish allergy patients (n=9)

Patients	Symptoms	sIgE (kU/L)								Tolerance to fish at T1 (Age at onset)
		SPT (mean wheal diameter in mm)								
		Cod		Sardine		Salmon		Tuna		
		T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	
1	Vomiting, U, Ang #, U contact	>100	30.8	>100	32.2	>100	20.9	23.2	23.6	No
		14	9	11	5	11	9	4	5	
2	Vomiting Eczema, U, Ang # U contact	>100	10.5	36.5	8.69	21.3	7.92	3.11	3.95	No
		12	5.5	10	6	6.5	5	4	4	
3	Vomiting, U, Ang # U contact, Resp-Inhalation symptoms	>100	32	>100	22.9	>100	23.8	13.5	13	No
		8	6	7	6	5	3	4	3.5	
4	U # U contact, Resp-Inhalation symptoms	>100	38.1	>100	23.4	>100	16.9	15.1	15.2	No
		8	6	8	5.5	9	4.5	4	4	
5	U, Ang # U contact	79.3	10.8	44.6	8.15	35.2	12.9	11.9	12.7	No
		16	13	9	6	7	6	8	8	
6	Eczema, U #	>100	63.6	82.7	55.5	58	23.2	18.6	5.13	No
		8	7	8	7	8	6	6	4	
7	U, Ang # U contact	6.04	2.08	2.16	2.07	2.42	1.92	3.22	0.46	Yes (7 years) tuna, sole
		6	5	5	5	5	4	4.5	0	
8	U #	9.38	0.49	2.09	0.25	2.10	0.19	0.62	0.16	Yes (8 years) tuna, sole
		6	5	5	4	5	3	4	0	
9	Vomiting, U # U contact	>100	6.44	11.5	2.64	7.41	1.37	1.08	0.88	Yes (9 years) tuna
		9	5	6	3	6	3	4	0	

sIgE – specific IgE; SPT – skin prick tests; U – urticaria; Ang – angioedema; Resp-inhalation symptoms – respiratory symptoms triggered by inhalation; # – symptoms triggered by ingestion of fish

- para a amostra total (T0– 1,7, T1– 3,7; $p=0,02$) e Grupo I (T0– 2, T1– 5; $p=0,03$);
- iv) para o extracto do atum, um maior número de bandas no Grupo I do que no Grupo II, mas apenas estatisticamente significativo em T1 (Grupo I – 4,1, Grupo II – 0,6; $p=0,02$).

No Quadro 4 apresenta-se a caracterização do perfil de *immunoblotting* dos 9 doentes, mostrando as várias bandas dos diferentes alérgenos dos peixes que foram identificadas em cada um. Em T0, foram reconhecidas, pelo soro de todos os doentes, as bandas correspondentes às proteínas Gad c I e Gad m I no extracto de bacalhau.

Nos 3 doentes que adquiriram tolerância parcial ao peixe verificou-se em T1 negatização dos TCP ($p<0,05$) e valores médios de IgE específica significativamente mais baixos que nos

non-tolerants (0.7 vs. 4.2; $p < 0.01$). We also found the disappearance of all the bands in the tuna extract, with the exception of the 12-14 kDa band in patients 7 and 9. All patients who acquired tolerance had immunoblotting to tuna at T1 with less than 2 bands ($p < 0.05$) (Table 4).

In comparing SPT, sIgE and immunoblotting results for the four fish extracts studied, we found a statistically significant relationship between the mean wheal diameter measurements in the SPT and the sIgE at T1 to cod ($\rho = 0.70$; $p = 0.03$) and tuna ($\rho = 0.74$; $p = 0.02$) and between the sIgE values and the number of bands at immunoblotting at T1 to salmon ($\rho = 0.83$; $p = 0.008$) and tuna ($\rho = 0.81$; $p = 0.01$).

Quadro 3. Evolução dos valores médios de pápula nos TCP e IgE

Extracto	Grupo I (n=6)		Grupo II (n=3)		Grupo I (n=6)		Grupo II (n=3)	
	TCP (diâmetro pápula em mm)		TCP (diâmetro pápula em mm)		sIgE (kU/L)		sIgE (kU/L)	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
Bacalhau	11,0*	7,7*	7,0	5,0	96,5*	30,9*#	38,4	3,0#
Sardinha	8,8*#	5,9*#	5,3#	4,0#	77,3*#	25,1*#	5,2#	1,6#
Salmão	7,7*	5,5*	5,3	3,3	69,0*#	17,6*#	3,9#	1,1#
Atum	5,0	4,7	4,1	0,0	14,2#	12,3#	1,6#	0,5#

*diferenças significativas entre T0 e T1, com $p < 0,05$;

diferenças significativas entre Grupo I e Grupo II, nos mesmos tempos, com $p < 0,05$

Quadro 4. Caracterização do perfil de *immunoblotting* dos doentes alérgicos ao peixe (n=9)

Doentes	T	Bandas proteicas identificadas																							
		12-14 kDa				24-25 kDa				30-33 kDa				40-41 kDa				50-54 kDa				60-63 kDa			
		Ba	At	Sar	Sal	Ba	At	Sar	Sal	Ba	At	Sar	Sal	Ba	At	Sar	Sal	Ba	At	Sar	Sal	Ba	At	Sar	Sal
Net. Ht – área do pico da banda																									
1	T0	77	157	13	33	60	15	17	0	32	13	17	0	24	0	0	0	51	0	53	0	92	28	32	0
	T1	68	118	98	103	48	13	69	63	12	0	67	20	77	0	96	19	66	47	95	0	91	70	0	83
2	T0	38	40	0	0	51	16	17	0	37	20	0	0	18	19	9	0	15	0	0	0	18	16	0	0
	T1	15	68	35	58	44	0	18	17	10	0	20	8	27	10	38	8	66	0	51	0	16	20	0	51
3	T0	96	147	94	146	86	0	51	4	55	4	0	0	50	0	33	9	89	0	0	0	121	0	0	0
	T1	60	110	87	81	21	7	41	43	37	6	32	18	20	22	75	14	36	0	0	0	60	52	0	80
4	T0	118	152	103	116	95	15	70	11	69	31	35	0	60	52	50	0	87	0	65	0	113	33	47	13
	T1	59	125	116	114	21	5	49	44	55	5	38	13	32	17	91	17	56	0	99	0	90	40	0	86
5	T0	57	113	118	157	41	0	84	8	18	25	0	0	13	18	62	0	39	0	0	0	65	0	0	15
	T1	22	118	60	76	23	0	40	13	17	0	28	6	28	20	79	6	64	0	84	0	74	46	71	41
6	T0	20	113	93	142	20	0	55	0	10	0	32	0	6	14	42	0	18	0	0	28	34	0	0	0
	T1	26	126	79	91	28	7	41	22	18	5	40	10	37	21	72	10	72	0	84	0	95	64	0	82
7	T0	150	11	61	113	128	49	4	0	99	5	19	0	94	6	25	0	117	0	29	22	135	0	21	0
	T1	6	14	8	7	12	0	0	0	8	0	0	0	15	0	7	0	13	0	0	0	20	0	0	8
8	T0	19	0	0	2	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6	0	0	0
	T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	T0	23	33	81	94	20	0	49	0	10	0	30	0	7	0	21	0	19	0	50	0	41	5	39	0
	T1	18	32	11	15	19	0	7	0	18	0	0	0	11	0	0	0	29	0	30	0	55	0	0	13

T – tempo; T0 – início do estudo; T1 – após 3 anos de *follow-up*; Ba – bacalhau; At – atum; Sar – sardinha; Sal – salmão

Table 3. Evolution of the mean wheal values in SPT and IgE

Extract	Group I (n=6)		Group II (n=3)		Group I (n=6)		Group II (n=3)	
	SPT (wheal diameter in mm)		SPT (wheal diameter in mm)		sIgE (kU/L)		sIgE (kU/L)	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
Cod	11.0*	7.7*	7.0	5.0	96.5*	30.9*:#	38.4	3.0#
Sardine	8.8*:#	5.9*:#	5.3#	4.0#	77.3*:#	25.1*:#	5.2#	1.6#
Salmon	7.7*	5.5*	5.3	3.3	69.0*:#	17.6*:#	3.9#	1.1#
Tuna	5.0	4.7	4.1	0.0	14.2#	12.3#	1.6#	0.5#

* significant difference between T0 and T1, with $p < 0.05$;

significant difference between Group I and Group II, at the same times, with $p < 0.05$

Table 4. Characterisation of the immunoblotting profile of the fish-allergic patients (n=9)

Doentes	T	Patients Protein bands identified																							
		12-14 kDa				24-25 kDa				30-33 kDa				40-41 kDa				50-54 kDa				60-63 kDa			
		Ba	At	Sar	Sal	Ba	At	Sar	Sal	Ba	At	Sar	Sal	Ba	At	Sar	Sal	Ba	At	Sar	Sal	Ba	At	Sar	Sal
Net. Ht – peak band area																									
1	T0	77	157	13	33	60	15	17	0	32	13	17	0	24	0	0	0	51	0	53	0	92	28	32	0
	T1	68	118	98	103	48	13	69	63	12	0	67	20	77	0	96	19	66	47	95	0	91	70	0	83
2	T0	38	40	0	0	51	16	17	0	37	20	0	0	18	19	9	0	15	0	0	0	18	16	0	0
	T1	15	68	35	58	44	0	18	17	10	0	20	8	27	10	38	8	66	0	51	0	16	20	0	51
3	T0	96	147	94	146	86	0	51	4	55	4	0	0	50	0	33	9	89	0	0	0	121	0	0	0
	T1	60	110	87	81	21	7	41	43	37	6	32	18	20	22	75	14	36	0	0	0	60	52	0	80
4	T0	118	152	103	116	95	15	70	11	69	31	35	0	60	52	50	0	87	0	65	0	113	33	47	13
	T1	59	125	116	114	21	5	49	44	55	5	38	13	32	17	91	17	56	0	99	0	90	40	0	86
5	T0	57	113	118	157	41	0	84	8	18	25	0	0	13	18	62	0	39	0	0	0	65	0	0	15
	T1	22	118	60	76	23	0	40	13	17	0	28	6	28	20	79	6	64	0	84	0	74	46	71	41
6	T0	20	113	93	142	20	0	55	0	10	0	32	0	6	14	42	0	18	0	0	28	34	0	0	0
	T1	26	126	79	91	28	7	41	22	18	5	40	10	37	21	72	10	72	0	84	0	95	64	0	82
7	T0	150	11	61	113	128	49	4	0	99	5	19	0	94	6	25	0	117	0	29	22	135	0	21	0
	T1	6	14	8	7	12	0	0	0	8	0	0	0	15	0	7	0	13	0	0	0	20	0	0	8
8	T0	19	0	0	2	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6	0	0	0
	T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	T0	23	33	81	94	20	0	49	0	10	0	30	0	7	0	21	0	19	0	50	0	41	5	39	0
	T1	18	32	11	15	19	0	7	0	18	0	0	0	11	0	0	0	29	0	30	0	55	0	0	13

T – time; T0 – study-start; T1 – after 3 years of follow-up; Ba – cod; At – tuna; Sar – sardine; Sal – salmon

doentes não tolerantes (0,5 kU/L vs 12,3 kU/L; $p < 0,01$), apresentando todos valores de IgE específica $< 0,89$ kU/L ($p < 0,05$) para o atum (peixe tolerado). Estes doentes que adquiriram tolerância ao atum apresentavam, no *immunoblotting* em TI, um número médio de bandas significativamente menor que os não tolerantes (0,7 vs 4,2; $p < 0,01$), verificando-se ainda desaparecimento de todas as bandas no extracto do atum, excepto a de 12-14 kDa nos doentes 7 e 9. Todos os doentes que adquiriram tolerância apresentavam um *immunoblotting* em TI para o atum com menos de 2 bandas ($p < 0,05$) (Quadro 4).

Em relação à comparação dos resultados dos TCP, IgEs e *immunoblotting* para os quatro extractos de peixe estudados, observou-se uma correlação estatisticamente significativa entre os valores do diâmetro médio de pápula nos TCP e de sIgE em TI para o bacalhau ($\rho = 0,70$; $p = 0,03$) e atum ($\rho = 0,74$; $p = 0,02$) e entre os valores de sIgE e o número de bandas no *immunoblotting* em TI para o salmão ($\rho = 0,83$; $p = 0,008$) e atum ($\rho = 0,81$; $p = 0,01$).

DISCUSSÃO

A idade da primeira manifestação de alergia ao peixe na população estudada situou-se entre os 4 e 12 meses de idade, o que não é muito diferente dos 9 a 12 meses reportados na literatura⁷. A idade mais precoce da primeira reacção alérgica ao peixe (4 meses) observada no doente 10 (Quadro 1) deveu-se a ingestão e/ou contacto accidental com o peixe e não à sua introdução precoce na dieta. Se este doente for excluído, a idade média do primeiro contacto com o peixe e da primeira manifestação desta alergia é de 7,2 e de 8 meses, respectivamente.

A maioria dos doentes (66,6%) manteve sintomas de alergia ao peixe após 3 anos de seguimento, em concordância com o descrito na literatura, em que 80% destes doentes persistem com alergia, 10 anos após o diagnóstico inicial⁷.

A maioria dos doentes (88,8%) tinha concomitantemente eczema atópico e asma (44,4%), rinite (66,6%) ou

DISCUSSION

The age at onset of the first manifestation of allergy to fish in the study sample ranged from 4 to 12 months of age, which is not that different to the 9 to 12 months reported in the literature⁷. The youngest age at the first allergic reaction (4 months) was seen in patient 10 (Table I) and was due to the accidental ingestion of and/or contact with fish and not the early introduction of fish into the diet. Excluding this patient, the mean age at first contact with fish and the first manifestation of fish allergy was 7.2 and 8 months, respectively.

The majority of patients (66.6%) maintained symptoms of fish allergy after 3 years of follow-up, in agreement with that described in the literature, in which 80% of these patients maintain allergy 10 years after the initial diagnosis⁷.

The majority of patients (88.8%) had concomitant atopic eczema and asthma (44.4%), rhinitis (66.6%) or rhinoconjunctivitis (22.2%), with sensitisation to mites, pollens and dander, and no differences seen between Groups I and II. Another interesting aspect of the characterisation of these patients was the presence of other food sensitisations, such as crustaceans (44.4% patients) and molluscs (all patients), with no differences seen between the two groups. All patients studied had other atopic manifestations (respiratory allergy in 8/9 patients and atopic eczema in 8/9), which is also documented in the literature^{7,15,16,20}.

The published series of patients with allergy to fish often have multiple sensitisations, i.e. food allergies, such as allergies to crustaceans, molluscs and egg^{7,20}, which we also saw in our study population.

The clinical manifestations upon exposure to fish were similar in both groups, with the exception of two Group I patients (3 and 4) who presented a more severe clinical picture, with respiratory symptoms triggered by inhalation of fish. This was not seen in any Group II patient.

rinoconjuntivite (22,2%), com sensibilização a ácaros, pólenes e epitélios, não havendo diferenças entre os Grupos I e II. Outro aspecto interessante na caracterização destes doentes foi a presença de outras sensibilizações alimentares, como aos crustáceos (44,4% doentes) e moluscos (em todos os doentes), não havendo diferenças entre os 2 grupos. Todos os doentes do estudo tinham outras manifestações atópicas (alergia respiratória em 8/9 doentes e eczema atópico em 8/9 doentes), o que também está bem documentado na literatura^{7,15,16,20}.

As séries publicadas de doentes com alergia ao peixe têm frequentemente múltiplas sensibilizações, nomeadamente alimentares, como por exemplo aos crustáceos, moluscos e ovo^{7,20}, o que também se observou na nossa população.

As manifestações clínicas após a exposição ao peixe foram semelhantes nos dois grupos, excepto em 2 doentes do Grupo I (doentes 3 e 4) que apresentaram uma clínica mais grave, traduzida por sintomas respiratórios com a inalação do peixe, o que não se verificou em nenhum doente do Grupo II.

Globalmente, observou-se uma diferença no perfil de sensibilização entre os doentes dos Grupos I e II, traduzido pelos três métodos de avaliação complementar de alergia ao peixe: TCP, sIgE e *immunoblotting*. Em alguns casos, nomeadamente em T1, verificou-se uma concordância estatisticamente significativa entre os valores de sIgE e TCP e entre sIgE e número de bandas identificadas no *immunoblotting*. Não se observou correlação entre os valores dos TCP e número de bandas identificadas no *immunoblotting*.

No perfil dos doentes tolerantes (Quadro 4), verificou-se que a banda proteica de 12-14 kDa foi reconhecida por todos os doentes nos 4 extractos de peixe, o que está de acordo com o facto de corresponder à parvalbumina Gad c I, alergénio *major* e panalergénio do peixe^{6,11,24}. Neste estudo, tal como em outros anteriores, os doentes com alergia ao peixe tinham alergia a mais do que uma espécie de peixe, justificada pela existência de reactividade cruzada entre as parvalbuminas das várias espécies^{8,10,20,21,24,28,29,32}.

There was, overall, a difference in the sensitisation profile in Groups I and II evidenced by the three methods of complementary fish allergy evaluation of SPT, sIgE and immunoblotting. In some cases, namely at T1, there was a statistically significant agreement between the sIgE and SPT values seen and between the sIgE and number of bands identified in immunoblotting. There was no correlation seen between the SPT values and the number of bands identified in immunoblotting.

In the tolerant patients' profiles (Table IV), a protein band of 12-14 kDa was recognised by all patients for the four extracts of fish. This is in agreement with the fact that this corresponds to parvalbumin Gad c I, a major allergen and a fish pan-allergen^{6,11,24}. We found, similarly to other authors, that patients with allergy to fish had allergy to more than one species of fish, explained by cross-reactivity between the parvalbumins of the various species^{8,10,20,21,24,28,29,32}.

The immunoblotting showed proteins of molecular weight 30-33, 40-41, 50-54 and 60-63 kDa, identified in some studies as agglomerates of parvalbumin or minor allergens¹⁹⁻²². We underline that the patients who acquired tolerance to tuna lost these heavy molecular weight bands at T1, considered in some studies as species-specific allergens^{19,25}, and maintained only the 12-14 kDa. This could explain why they tolerate tuna but do not tolerate the other fish studied, as these heavy molecular weight bands persisted or only occurred at T1 in immunoblotting of the non-tolerated extracts. Therefore, the persistence and/or appearance of these heavy molecular weight band proteins at T1 could be associated with the persistence of allergy to the extracts of fish analysed. However, the 12-14 and 24-25 kDa bands were never identified at T1 only. The Group I patients with more severe manifestations (patients 3 and 4) had more intense bands of 60-63 kDa for the cod extract. Despite the reduced number of patients in our study, this fact made us question if the immunoblotting studies may play a part in evaluating the severity of symptoms and in the prognosis of these patients.

O *immunoblotting* evidenciou proteínas de alto peso molecular: 30-33, 40-41, 50-54 e 60-63 kDa, identificadas em alguns estudos como aglomerados de parvalbumina ou alergénios *minor*¹⁹⁻²². De salientar que os doentes que adquiriram tolerância ao atum perderam estas bandas de alto peso molecular em TI, consideradas em alguns estudos como alergénios específicos de espécie^{19,25}, mantendo apenas a de 12-14 kDa, o que pode explicar que tolerem o atum, mas não tolerem os outros peixes estudados, pois estas bandas de alto peso molecular persistem ou surgem apenas em TI no *immunoblotting* dos extractos não tolerados. Portanto, a persistência e/ou aparecimento destas proteínas de alto peso molecular em TI pode estar associada à persistência de alergia aos extractos de peixe analisados. No entanto, as bandas de 12-14 e 24-25 kDa nunca foram identificadas apenas em TI. Os doentes com manifestações mais graves (doentes 3 e 4) do Grupo I apresentaram bandas de 60-63 kDa mais intensas para o extracto do bacalhau. Apesar do número reduzido de doentes, este facto levou-nos a questionar se os estudos de *immunoblotting* não poderão ter também um papel relevante na avaliação quer da gravidade dos sintomas quer no prognóstico destes doentes.

Em todos os doentes, o atum foi o extracto que apresentou valores mais baixos de sIgE, de diâmetro médio de pápula nos TCP e foi o que apresentou menor número e intensidade de bandas quer em T0 quer em TI. Estes dados poderão estar associados com o facto de o atum ter sido o peixe mais tolerado pelos doentes que adquiriram tolerância. De acordo com a literatura, o atum, devido à sua constituição, é um dos peixes com menor expressão de parvalbumina (alergénio *major* do peixe), tornando-o um dos mais bem tolerados^{7,8,14,28,29,32}.

Pelo contrário, o bacalhau foi o extracto para o qual se verificaram valores de sIgE e de diâmetro médio de pápula mais elevados, assim como um maior número de bandas proteicas identificadas no *immunoblotting*. Estes dados poderão estar relacionados com a elevada alergenicidade do bacalhau, devido à presença de várias proteínas

In all patients, tuna was the extract which presented the lowest sIgE values, mean wheal diameter in SPTs and had the least number and intensity of bands at both T0 and TI. These data could be associated to tuna being the fish most tolerated by patients who acquire tolerance. According to the literature, tuna, owing to its constitution, is a fish with the least expression of parvalbumin (major fish allergen), making it one of the most well tolerated^{7,8,14,28,29,32}.

On the other hand, cod was the extract with the highest sIgE values and mean wheal diameter, plus a greater number of protein bands identified in immunoblotting. These data could be connected to cod's high allergenicity, which is due to the presence of several allergenic proteins, including a higher expression of parvalbumin Gad c I, which makes this fish one of the least well tolerated^{7,8,14,28,29,33}.

In all patients at TI, sIgE measurements and mean wheal diameter in the SPTs dropped for all extracts, with a statistically significant drop seen for some. In TI a lesser intensity or loss of bands for some fish extracts was also seen, more evident in patients who had acquired tolerance, namely to tuna (Table 4).

Earlier studies have underlined the relationship between serum sIgE concentration and allergic reactions to foods. Sampson published two studies on the usefulness of sIgE in predicting a positive OCT in which all patients were atopic. The first was published in 1997 and studied 196 children and adolescents with eczema, 50% of whom had asthma and rhinitis¹⁵. The second was published in 2001 and studied 100 children and adolescents with atopic eczema and food allergy¹⁶. It was found that a sIgE value of > 20 kU/L is associated with > 95% PPV (positive predictive value) for a positive OCT.

There is a later study with 2336 four-year-old children, in which a sIgE value to cod of 4.7 kU/L was associated with a > 95% probability of reported allergic reactions¹⁷. This latter study did not document

alergénicas, incluindo uma maior expressão da parvalbumina Gad c I, o que faz deste peixe um dos menos tolerados^{7,8,14,28,29,33}.

Em todos os doentes em TI, os valores de sIgE e diâmetro médio de pápula nos TCP diminuíram para todos os extractos, sendo uma diminuição estatisticamente significativa para alguns deles. Todavia, em TI, também se verificou uma menor intensidade ou perda de bandas para alguns extractos de peixe, mais evidente nos doentes que adquiriram tolerância, nomeadamente ao atum (Quadro 4).

Estudos anteriores têm enfatizado a relação entre a concentração sérica de IgE específica e reacção alérgica alimentar. Sampson publicou dois trabalhos sobre a utilidade da IgE específica na previsão de uma PPO positiva, em que todos os doentes eram atópicos. O primeiro foi publicado em 1997: 196 crianças e adolescentes com eczema, das quais 50% com asma e rinite¹⁵; e o segundo em 2001: 100 crianças e adolescentes com eczema atópico e alergia alimentar¹⁶, verificando que um valor de IgE específica > 20 kU/L está associada a um VPP (valor preditivo positivo) > 95% para uma PPO positiva. Existe um estudo posterior com 2336 crianças de 4 anos de idade, em que um valor de IgE específica para o bacalhau de 4,7 kU/L estava associado a uma probabilidade > 95% de reacções alérgicas reportadas¹⁷. Este último estudo não documentou as reacções alérgicas através de PPO, como Sampson, mas através do relato dos pais das crianças. No nosso estudo, verificou-se que todos os doentes que adquiriram tolerância, nomeadamente ao atum, tinham valores de sIgE abaixo destes limiares. Em relação aos outros extractos, no Grupo II, verificou-se que muitos doentes tinham valores de sIgE inferiores aos limiares descritos e mantinham-se não tolerantes para esses extractos. Por outro lado, no Grupo I verificou-se que alguns doentes com valores abaixo destes limiares persistiam com alergia ao peixe.

Independentemente dos valores de sIgE para o atum, a presença de proteínas de alto peso molecular identificadas no *immunoblotting* parece poder estar associada à persistência de alergia a este peixe. Para além disso, os doen-

alergic reactions with OCT as Sampson did, but via reports from the children's parents. In our study, we found that all patients who acquired tolerance, namely to tuna, had sIgE values under these limits. In terms of the other extracts, in Group II we found that many patients had lower sIgE values than the limits described and continued non-tolerant to these extracts. In Group I, however, we found some patients with values lower than these limits maintained their fish allergy. Independent of sIgE values to tuna, the presence of heavy molecular weight proteins identified in the immunoblotting seems to be associated with the persistence of allergy to this fish. Further, the patients who acquired tolerance to tuna presented a significantly lower number of bands for this extract at TI than the non-tolerant patients did.

CONCLUSIONS

Despite the reduced size of our sample, the results suggest that immunoblotting could be useful in diagnosis (profile characteristics and association with clinical severity of symptoms) and, above all, in patient follow-up, in that the sensitisation profile (drop in or even absence of recognition of protein bands) seems to be different in patients with acquisition of clinical tolerance, namely to tuna.

Thus, the characteristics of the profile in immunoblotting, such as the maintenance of numbers of bands and maintenance of some heavy molecular weight bands, could signify the likely persistence of allergy to fish and do away with performing a (probably positive) OCT.

Funding: None,

Conflict of interest disclosure: None.

tes que adquiriram tolerância ao atum apresentaram um número de bandas significativamente menor para este extracto em TI do que os não tolerantes.

CONCLUSÕES

Apesar da reduzida dimensão da amostra estudada, os resultados obtidos sugerem que o *immunoblotting* poderá ser útil no diagnóstico (características do perfil e associação com gravidade clínica dos sintomas) e, sobretudo, no seguimento dos doentes, na medida em que o perfil de sensibilização (diminuição ou mesmo ausência de reconhecimento de bandas proteicas) parece ser diferente nos doentes com aquisição de tolerância clínica, nomeadamente no que diz respeito ao atum.

Assim, as características no perfil de *immunoblotting*, como a manutenção do número de bandas e a manutenção de algumas bandas de alto peso molecular, poderão significar a persistência provável de alergia ao peixe e obviar à realização de uma PPO provavelmente positiva.

Financiamento: Nenhum.

Declaração de conflitos de interesse: Nenhum.

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Belitz HD, Grosch W. Food Chemistry. Berlin: Springer-Velag; 1987:454-71.
2. Crespo JF, Pascual CY, Burks AV, Helm RM, Esteban MM. Frequency of food allergy in a pediatric population from Spain. *Pediatr Allergy Immunol* 1995; 6:39-43.
3. Friedman NJ, Szeiger R, Leung DY. Prevention and natural history of food allergy. In: Sampson HA, Geha RS, Szefer SJ, editors. *Pediatric Allergens Principles and Practice*. St Louis: Mosby; 2003:495-509.
4. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(Suppl 2):S470-5.
5. Arede C, Morais de Almeida M, Prates S, Godinho N, Teixeira C, Martins P, et al. Food allergy pattern in children from Southern Europe [Abstract]. *Allergy* 2000; 55(Suppl 63):52.
6. Aas K. Fish allergy and the cod allergen model. In: Brostoff J, Chalacombe ST (Eds.). *Food allergy and intolerance*. London: Balliere Tindall; 1987:356-66.
7. Pascual CR, Reche M, Fiandor A, Valbuena T, Cuevas T, Esteban MM. Fish allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 2008; 19:573-79.
8. Pascual CY, Martin Esteban M, Crespo JF. Fish allergy: Evaluation of the importance of cross-reactivity. *J Pediatr* 1992; 121:29-34.
9. Kajosaari M. Food allergy in Finnish children aged 1 to 6 years. *Acta Paediatr Scand* 1982; 71:815-9.
10. De Martino M, Novembre E, Galli L, De Marco A, Botarelli P, Marano E, et al. Allergy to different fish species in cod-allergic children: in vivo and in vitro studies. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86:909-14.

11. Tuft L, Blumenstein GI. Studies in food allergy. V. Antigenic relationship among members of fish family. *J Allergy* 1946; 17:329-39.
12. Costa AC, Bento ML, Trindade JC, Pereira Barbosa MA. Fish allergy-characterization of one Portuguese population [Abstract]. *Allergy Clin Immunol Int* 2005; 334(Suppl 1):908.
13. Costa A, Bento M, Santos M, Pereira Barbosa M. Clinical characteristics and allergy-immunologic aspects of patients with fish allergy [Abstract]. Abstract Book XXV Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology 2006;425:1552.
14. Pascual CY, Crespo JF, Sanchez-Pastor S, et al. The Importance of fish in IgE-mediated food-hypersensitivity. *ACI News* 1995;7:73-5.
15. Sampson HA, Ho DG. Relationship between food-specific IgE concentrations and the risk of positive food challenges in children and adolescents. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:444-51.
16. Sampson HA. Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:891-6.
17. Östblom E, Lilja G, Ahlstedt S, van Hage M, Wickman M. Patterns of quantitative food-specific IgE-antibodies and reported food hypersensitivity in 4-year-old children. *Allergy* 2008; 63:418-24.
18. Moneret-Vautrin DA, Kanny G, Frémont S. Laboratory tests for diagnosis of food allergy: advantages, disadvantages and future perspectives. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2003; 35:113-9.
19. Dory D, Chopin C, Aimone-Gastin I, Gueant JL, Guerin L, Sainte-Laudy J, et al. Recognition of an extensive range of IgE-reactive proteins in cod extract. *Allergy* 1998; 53:42-50.
20. Bernhisel-Broadbent J, Scanlon SM, Sampson HA. Fish hypersensitivity. I. In vitro and oral challenge results in fish-allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:730-7.
21. Bugajska-Schretter A, Elfman L, Fuchs T, Kapiotis S, Rumpold H, Valenta R, et al. Parvalbumin, a cross-reactive fish allergen, contains IgE-binding epitopes sensitive to periodate treatment and Ca²⁺ depletion. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101:67-74.
22. Costa AC, Bento ML, Santos MC, Trindade JC. Identificação de novos alérgenos no bacalhau [abstract]. *Rev Port Imunoalergologia* 2006; 14(Suppl 3):S48.
23. Aas K. Studies of hypersensitivity to fish. Studies of different fractions of extracts from cod muscle tissue. *Int Arch Allergy* 1967; 31:239-260.
24. Elsayed S, Bennich H. The primary structure of allergen M from cod. *Scand J Immunol* 1975; 4:203-8.
25. Das Dores S, Chopin C, Villaume I J, Fleurence J, Guéant L. A new oligomeric parvalbumin allergen of Atlantic cod (*Gad m 1*) encoded by a gene distinct from that of *Gad c 1*. *Allergy* 2002; 57:79-83.
26. Das Dores S, Chopin C, Romano A, Galland-Irmouli AV, Quarantino D, Pascual C, et al. IgE-binding and cross-reactivity of a new 41 kDa allergen of codfish. *Allergy* 2002; 57:84-87.
27. Hamada Y, Nagashima Y, Shiomi K. Identification of collagen as a new fish allergen. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001; 65:285-91.
28. Van Do T, Elsayed S, Florvaag E, Hordvik I, Endresen C. Allergy to fish parvalbumins: studies on the cross-reactivity of allergens from 9 commonly consumed fish. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:1314-20.
29. Griesmeier U, Vázquez-Cortés S, Bublin M, Radauer C, Ma Y, Briza P, Fernández-Rivas M, Breiteneder H. Expression levels of parvalbumins determine allergenicity of fish species. *Allergy* 2010; 65:191-8.
30. Dreborg S, Frew A. Position paper allergen standardization and skin tests. *Allergy* 1993; 48:48-82.
31. Eigenmann PA, Sampson HA. Interpreting skin prick tests in the evaluation of food allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol* 1998; 9:186-91.
32. Helbling A, Haydel R Jr, McCants ML, Musmand JJ, El-Dahr J, Lehrer SB. Fish allergy: is cross-reactivity among fish species relevant? Double-blind placebo-controlled food challenge studies of fish allergic adults. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 83:517-23.
33. Kobayashi A, Tanaka H, Hamada Y, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Comparison of allergenicity and allergens between fish white and dark muscles. *Allergy* 2006; 61:357-63.