



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LISIS KARINE VILAR**

**ANÁLISE DOS TESTES ALÉRGICOS CUTÂNEOS DE LEITURA IMEDIATA E IGES  
ESPECÍFICAS A REATIVIDADE DO TPO COM ASSADOS DE LEITE E OVO.**

**Uberlândia**

**2018**

**LISIS KARINE VILAR**

**ANÁLISE DOS TESTES ALÉRGICOS CUTÂNEOS DE LEITURA IMEDIATA E IGES  
ESPECÍFICAS A REATIVIDADE DO TPO COM ASSADOS DE LEITE E OVO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Dr. Gesmar Rodrigues Silva  
Segundo

**Uberlândia**

**2018**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Tese de Doutorado Nº 019/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa 2: Diagnóstico, tratamento e prognóstico das doenças e agravos à saúde.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Epidemiologia, diagnóstico e tratamento das doenças alérgicas e imunodeficiências primárias. Discente: **Lisis Karine Vilar** – Matrícula nº **11513CSD014**. Título do Trabalho: **"Correlação dos testes alérgicos cutâneos de leitura imediata e IgEs específicas a reatividade do TPO com assados de leite e ovo."** Às 09:00 horas do dia 13 de dezembro do ano de 2018, no anfiteatro do bloco 8B – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Luciene Alves (UFTM), Karine Cristine de Almeida (UNIPAM), Cibele Aparecida Crispim (UFU), Karla Pereira Fernandes (UFU) e Gesmar Rodrigues da Silva Segundo (UFU) – orientador da discente. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Prof. Dr. Gesmar Rodrigues da Silva Segundo apresentou a Comissão Examinadora e a discente, agradeceu a presença do público e concedeu a discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Maprovada** ( )reprovada. Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 14:00 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Gesmar Rodrigues da Silva Segundo \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Luciene Alves \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Karine Cristine de Almeida \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Cibele Aparecida Crispim \_\_\_\_\_

Dra. Karla Pereira Fernandes \_\_\_\_\_

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

V697a Vilar, Lisis Karine, 1980  
2018 Análise dos testes alérgicos cutâneos de leitura imediata e ige  
específicas a reatividade do TPO com assados de leite e ovo [recurso  
eletrônico] / Lisis Karine Vilar. - 2018.

Orientador: Gesmar Rodrigues Silva Segundo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1208>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. 2. Hipersensibilidade alimentar. 3. Alergia a  
alimentos. 4. Hipersensibilidade a leite. 5. Hipersensibilidade a ovo. I.  
Silva Segundo, Gesmar Rodrigues, 1973, (Orient.) II. Universidade  
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



Dedico este trabalho aos pacientes e seus responsáveis, que confiaram no trabalho da nossa equipe e a todos que contribuíram durante todo percurso para torná-lo realidade.

**“A vida não evoluiu pelo combate, mas sim pela cooperação”**

*Lynn Margulis & Carl Sagan*

Ao meu orientador, Gesmar Rodrigues Silva Segundo, agradeço a oportunidade de ampliar o meu conhecimento, pela paciência e dedicação nas adversidades. Minha eterna gratidão e admiração!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por permitir e estar ao meu lado em todos os momentos me conduzindo diante de todas as adversidades do caminho, para tornar realidade este sonho.

Ao meu marido, Marcelo e aos meus filhos Luise e Lorenzo, pelo amor, apoio e compreensão diante das ausências, fundamentais para que me dedicasse.

Aos meus pais, pelo eterno apoio, carinho, exemplo de determinação e superação.

Aos meus irmãos e cunhada pelo amor e apoio em vários momentos.

À minha funcionária do lar, Ivanilda, pelo carinho e dedicação aos meus filhos tornando mais fácil a minha dedicação a este projeto.

À Luciana Carneiro, pela amizade e por ter me amparado com todo o seu conhecimento no momento do diagnóstico de alergia ao ovo do Lorenzo, me acolhendo e permitindo que ampliasse o meu conhecimento.

À minha companheira de trabalho, Flávia Araújo Alves, pela amizade, imensa paciência em todos os momentos e por dividir o seu conhecimento, minha eterna gratidão.

Aos médicos residentes do ambulatório de Alergia e Imunologia, pelo acolhimento e amizade, mas, acima de tudo, pela dedicação e presteza com que realizaram os testes cutâneos e acompanharam os pacientes durante todo o período da pesquisa.

À nutricionista Cristiane, à Dra. Karla, à Dra. Marina Sheik, à Dra. Érica e Dra. Cristina, pelo acolhimento e presteza.

Aos profissionais que trabalham no lactário e cozinha do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, pela presteza em preparar os alimentos para os testes de provocação oral em todos os momentos.

A todos os professores da pós-graduação, por compartilharem o conhecimento.

Às secretarias da pós-graduação, Gisele e Viviane, pela atenção e dedicação em vários momentos, explicando e orientando.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este sonho se realizasse. Muito obrigada!



## RESUMO

**Introdução:** As alergias alimentares (AA) mais comuns na infância são a leite de vaca (LV) e ovo (Ov), afetando respectivamente de 1.4 - 3.8% e 1- 2.6%, nos EUA, Europa e no Brasil. Aproximadamente 60 a 80% dos pacientes com AA ao LV e Ov toleram os assados, tornando a introdução dos mesmos uma alternativa ao tratamento tradicional de exclusão total do alérgeno, reduzindo o risco nutricional e o impacto negativo na qualidade de vida da criança e de seus familiares. Dados sobre a relação de testes alérgicos e tolerância ou intolerância aos assados com leite e ovos ainda são limitados. **Objetivo:** Descrever a relação dos testes alérgicos cutâneos de puntura e IgEs específicos a reatividade do teste de provocação oral (TPO) realizado com assados em pacientes com alergia ao LV e ao Ov. **Métodos:** Estudo transversal, realizado com amostra de conveniência (n=323), onde os pacientes aptos ao TPO, realizavam o Teste Cutâneo de Leitura Imediata (TCLI) com o alérgeno *in natura*, assado (bolo -30min/ 180°C), fervido (por 15 min.) e com os extratos comerciais. Após dava-se início ao TPO com ¼ do bolo, em porções escalonadas a cada 20 min. até o consumo total (1,3 g. de leite de vaca/porção ou 2,2 g. de ovo/porção). Consideramos tolerantes os que não apresentassem manifestações clínicas objetivas. Os pacientes que apresentavam tolerância foram posteriormente submetidos ao TPO com o alimento *in natura* como mouse de cacau. **Resultados:** Foram realizadas 54 provocações orais com o LV assado e 42 com o ovo assado, onde 72% (39) e 66% (14) respectivamente, apresentaram tolerância a proteína assada em forma de bolo. A mediana da idade foi de 1 ano e 1 mês (6 m -15 anos) para os que fizeram o TPO com o LV assado e de 3 anos e 9 meses (6 m -11 anos) para o grupo dos assado com ovo. Apesar de ser uma alternativa ao tratamento tradicional, o risco de reações graves existe, nessa coorte dois pacientes precisaram de epinefrina durante o TPO com LV assado. A análise dos testes alérgicos entre os grupos reativos e tolerantes para ambos alérgenos (LV e Ov), apresentou diferença estatística somente para a IgE LV (13,2 κU/L e 3,2 κU/L) com  $p=0,028$  e para o TCLI de caseína (5,5 mm e 2,5 mm)  $p=0,027$ , respectivamente. A IgE para LV e o TCLI para caseína apresentaram o melhor valor preditivo negativo (VPN) 80% para prever o TPO com LV assado. Enquanto o TCLI com a clara de ovo apresentou melhor performance (100%VPN) ao compararmos com a IgE e o TCLI para ovomucoíde (OM) com 85% de VPN, para prever o TPO com ovo processado. **Conclusão:** O presente trabalho reforça os dados da literatura internacional, ao descrever a relação dos testes alérgicos com os resultados do TPO, em

amostra da população brasileira. Proporcionando indicadores clínicos, de fácil acesso e baixo custo no manejo dos pacientes com AA e ferramentas para evitar repetições desnecessárias do TPO.

**Palavras chaves:** Hipersensibilidade alimentar, Teste cutâneo de leitura imediata, Teste de provocação oral, IgE específicas, Hipersensibilidade a leite, Hipersensibilidade a ovo.

## ABSTRACT

**Introduction:** The most common food allergies (FA) in childhood are cow's milk (CM) and hen's egg (HE), affecting 1.4- 3.8% and 1- 2.6%, respectively in the USA, Europe and Brazil. Approximately 60 to 80% of FA patients tolerate baking products with the allergen, making their introduction an alternative to the traditional treatment of total allergen exclusion, reducing nutritional risk and negative impact on the quality of life of the child and their relatives. Data on the correlation of allergic tests and tolerance or intolerance to milk and egg in baked goods are still limited. **Objective:** Describe the correlation of skin allergic puncture tests and specific IgEs (Immunocap) to the reactivity of OFC performed with baked in patients with cow's and egg allergy in a Brazilian sample. **METHODS:** A cross-sectional study was carried out with a convenience sample, in which patients who were eligible for OFC performed the skin prick test (SPT) with the allergen in natura, baked (cake -30min / 180 ° C), boiled and with extracts after we offered ¼ of the cake, every 20 min. until the total consumption (1.3 g of cow's milk protein / portion or 2.2 g of egg protein / portion). We consider tolerant those who did not present objective clinical manifestations. Patients who presented tolerance were later submitted to OFC with the allergen in nature. **Results:** We performed 54 oral provocations with baked milk and 42 with baked egg, where 72% (39) and 66% (14) presented tolerance to the baked protein in the form of cake, respectively. The median age was 1 year and 1 month (6 m -15 years) for those taking the OFC with Baked milk and 3 years and 9 months (6 m-11 years) for the baked egg group. Although it is an alternative to traditional treatment, the risk of serious reactions exists, in our cohort 2 patients required epinephrine during OFC with baked milk. The analysis of the allergic tests between the reactive and tolerant groups for both allergens (CM and HE) presented statistical difference only for CM IgE (13.2  $\kappa$ U/L and 3.2  $\kappa$ U/L) with  $p = 0.028$  and for casein SPT (5.5 mm and 2.5 mm)  $p = 0.027$ , respectively. IgE for CM and SPT for casein had the best predictive negative (NPV) of 80% to predict OFC with baked. While SPT with egg white presented better performance (100% NPV) when compared to IgE and SPT for ovomucoid (OM) with 85% NPV, to predict OFC with processed egg. **Conclusion:** Our work reinforces data from the international literature, being the first to describe the correlation of allergic tests with OFC outcomes, in a sample of the Brazilian population. Providing clinical indicators with easy access and low cost in the management of patients with FA and tools to avoid unnecessary repetition of OFC.

**Key words:** Food allergy, Skin Prick test, Oral food challenge, Specific IgE tests.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Alergia alimentar
APLV	Alergia à proteína do leite de vaca
DCPC	Duplo cego placebo controle
EAACI	European Academy of Allergy and Clinical Immunology
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IgE	Imunoglobulina E
LV	Leite de vaca
OM	Ovomucoíde
Ov	Ovo
PRACTALL	Practical Allergy
SPT	<i>Skin Prick Test</i>
TCLI	Teste cutâneo de Leitura imediata ou
TPO	Teste de provocação oral
VPN (NPV)	Valor preditivo negativo
VPP ( PPV)	Valor preditivo positivo
WAO	<i>Special Committee on Food Allergy</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1	ALERGIA ALIMENTAR.....	14
1.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS MEDIADAS POR IgE, NÃO MEDIADAS POR IgE E MISTAS .....	14
1.3	PREVALÊNCIA DA AA E DOS PRINCIPAIS ALÉRGENOS ALIMENTARES.....	15
1.4	PROCESSADOS OU <i>BAKED'S</i> (ALÉRGENOS ALIMENTARES ASSADOS EM ALTA TEMPERATURA). ....	17
1.5	DIAGNÓSTICO.....	18
1.5.1	<i>História Clínica</i> .....	18
1.5.2	<i>Investigação de Sensibilização</i> .....	18
1.5.3	<i>Dosagem de IgE Específica</i> .....	19
1.5.4	<i>Teste cutâneo de Leitura Imediata</i> . ....	19
1.5.5	<i>Teste de Provocação Oral</i> .....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1	Objetivo Geral .....	22
2.2	Objetivos Específicos .....	22
<b>3</b>	<b>ARTIGO I .....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO II.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>
	<b>APÊNDICE A – Termo de consentimento e assentimento .....</b>	<b>47</b>
	<b>APÊNDICE B – Ficha de coleta de dados .....</b>	<b>50</b>
	<b>ANEXO I – Receita.....</b>	<b>55</b>
	<b>ANEXO II - Análise Final do Comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.....</b>	<b>56</b>

## 1 Introdução

### 1.1 Alergia alimentar

Alergia alimentar (AA) ou hipersensibilidade alimentar é a resposta imunológica adversa e reprodutível, que ocorre após a exposição à alérgenos alimentares (SOLÉ et al., 2012; MURANO et al., 2014; LUYT et al., 2016; SOLÉ et al., 2018). Ressalta-se que a AA é distinta de outras respostas adversas a alimentos, tais como intolerância alimentar, reações farmacológicas e reações mediadas por toxina (SOLÉ et al., 2012; TURNBULL et al., 2015).

Atualmente, a fisiopatogênese da AA apresenta vários fatores a serem considerados, dentre eles os fatores epigenéticos como: o tipo de alimentação, a época de exposição aos potenciais alérgenos alimentares e a permeabilidade das barreiras imunológicas (sistema gastrointestinal, pele e vias aéreas superiores) que influenciam os diferentes padrões de resposta imunológica ao alérgeno alimentar (NETTING et al., 2013; SAMPSON, 2016; TURNBULL et al., 2015).

As alergias alimentares de acordo com o mecanismo imunológico envolvido são classificadas em: *imuno-mediadas* ou mediadas pela imunoglobulina E (IgE), *não imuno-mediadas* e *mistas* (TURNBULL et al., 2015; LUYT et al., 2016; SOLÉ et al., 2018).

### 1.2 Manifestações clínicas mediadas por IgE, não mediadas por IgE e mistas

O mecanismo imunológico envolvido na fisiopatogênese da AA determina a evolução natural da doença e a gravidade das manifestações clínicas (de leves, como a Síndrome da Alergia Oral, até às graves como a anafilaxia presente na AA mediadas por IgE) (COCCO et al., 2013; LUYT et al., 2016; ELLER et al., 2018). Aproximadamente 40% das reações IgE mediadas são graves, podendo desencadear choque anafilático quando não tratadas de forma adequada (GUPTA et al., 2013). Sendo importante mencionar que na alergia mediada por IgE, algumas variáveis estão associadas à persistência da AA como: quantidade do alérgeno necessária para deflagar os sintomas, gravidade e tipos das reações desencadeadas, presença de anafilaxia prévia e altos níveis de imunoglobulinas específicas (SAMPSON, 2016; SOLÉ et al., 2018).

As manifestações clínicas imuno-mediadas são caracterizadas pelo aparecimento imediato dos sintomas, que surgem em até duas horas após a exposição ao(s) alérgeno(s)

(COCCO et al., 2013; LUYT et al., 2016). A hipersensibilidade mediada por IgE acontece após o contato nas membranas dos mastócitos e basófilos, sensibilizadas previamente por IgE específicas, frente à segunda exposição às proteínas alergênicas, induzindo a ruptura das membranas celulares e liberação de mediadores inflamatórios como: histaminas, prostaglandinas e leucotrienos, responsáveis pelo desencadeamento das reações imediatas (COCCO et al., 2013; LUYT et al., 2016). Essas apresentam amplo espectro de manifestações clínicas classificadas em: cutâneas (urticária, angioedema e prurido), gastrointestinais (náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia) e respiratórias (tosse, sibilo, edema na garganta e dispneia), podendo ainda acometer um ou mais sistemas após a exposição a determinado alérgeno (MACHIA et al., 2015). As reações cutanêas (80% a 90%) e gastrointestinais (40 a 50%) são as mais comuns descritas pela literatura, nos pacientes com AA IgE mediada (GUSHKEN et al., 2007; LEONARD et al., 2012; BARTINIKAS et al., 2013; TURNBULL et al., 2015).

Por outro lado, as reações de alergia alimentar não IgE-mediadas, os linfócitos T são os responsáveis pela liberação dos mediadores inflamatórios como as citocinas. Estas substâncias são responsáveis pela quimiotaxia de células inflamatórias para a região do tubo digestivo, desenvolvendo assim um processo inflamatório local, em sua grande maioria com predomínio de infiltração eosinofílica. Por isso os sintomas são tardios, de 48 a 72 horas após a ingestão do alimento, com predominância de manifestações gastrointestinais (cólicas, diarreia persistente, sangue nas fezes e vômitos) além de baixo ganho ponderoestatural e, em alguns casos, anemia ferropriva. Após o diagnóstico, a instituição da dieta de exclusão de 4 a 8 semanas do(s) possível(is) alérgeno(s) deve ser acompanhada da melhora dos sintomas em 72 a 96 horas. (COCCO et al., 2013; SOLÉ et al., 2018)

Quanto às reações mistas, estas envolvem os dois tipos de manifestações clínicas, mediadas e não mediadas por anticorpos IgE, com envolvimento de linfócitos T, mastócitos, basófilos e eosinófilos. Tais manifestações clínicas estão presentes nos quadros de dermatite atópica, esofagite e gastroenteropatia eosinofílica e na asma. (COCCO et al., 2013; LUYT et al., 2016)

### 1.3 Prevalência da AA e dos principais alérgenos alimentares

Nas últimas décadas, diante do aumento da prevalência da AA, a mesma foi apontada como problema de saúde pública, em algumas sociedades (BOYCE et al., 2010; SOLÉ et al., 2018) e associada a um impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos (SKYPALA et

al., 2015).

No Brasil, a prevalência de AA é de 4% (GONÇALVES et al., 2016). Na literatura internacional é estimada entre 6 a 8% na primeira infância (SICHERER, 2011; PETERS et al., 2012; GUPTA et al., 2013; SAMPSON, 2016). Essa diferença na prevalência estimada nos diferentes continentes está associada ao desenho das pesquisas, aliado aos métodos de diagnóstico utilizados (auto-relato, questionários *online*, testes cutâneos e teste de provocação oral), à interpretação de forma equivocada, além da distribuição heterogênea das amostras populacionais (GONÇALVES, et al., 2016; SOLÉ et al., 2018).

Segundo a revisão publicada pela *WAO Special Committee on Food Allergy* 2013, somente 10% dos países apresentam dados precisos de prevalência de AA baseados no Teste de Provocação Oral (TPO) (PRESCOTT et al., 2013). A maior prevalência de AA IgE mediada, em torno de 10% baseada em TPO (n=2848), foi relatada em Melbourne - Austrália (OSBORN et al., 2011; PRESCOTT et al., 2013). Na Europa, entretanto, outra revisão sistemática estimou em 5,9% a prevalência de AA por meio de auto-relatos. No mesmo continente, após a realização dos TPO, somente 0,9% dos diagnósticos de AA foram confirmados (NWARU et al., 2014, SKYPALA et al., 2015). Estudos realizados em amostra brasileira, segundo Gonçalves et al., (2016), a prevalência de alergia à proteína do leite de vaca (APLV) encontra-se em 2,5% e 1,0% à proteína do ovo, confirmadas por TPO.

Na primeira infância os alérgenos mais comuns são o leite de vaca e o ovo, com prevalência estimada entre 2 a 3%, para cada um, em diferentes regiões (BARBOSA et al., 2017; LUYT et al., 2016; LAMBERT et al., 2017).

A alergia ao leite afeta entre 1,4% a 3,8% de crianças menores de 5 anos, enquanto a alergia ao ovo ocorre de 1% a 2,6% nessa faixa etária nos Estados Unidos e Europa, enquanto na Austrália um estudo relatou a maior prevalência de alergia ao ovo (8,9%), na primeira infância (LEONARD, 2016; PRESCOTT et al., 2013).

As principais proteínas alergênicas identificadas apresentam características físico-químicas e potenciais alergênicos diferentes: no leite  $\alpha$ - lactoalbumina (resistente ao calor), a  $\beta$ - lactoglobulina (resistente ao processo digestivo) e a caseína (termoestável), enquanto no ovo as mais abundantes são a ovoalbumina (termolábil) e ovomucoíde (termoestável). Assim, o processo térmico e a disgestibilidade impactam sobre o potencial alergênico das proteínas. As glicoproteínas caseína e ovomucoíde, por apresentarem epítomos lineares, são consideradas marcadores clínicos de persistência e de reações graves na APLV e na alergia ao ovo, respectivamente (GONÇALVES, 2016; LUYT et al., 2016; SAMPSON, 2016;



LEONARD, et al., 2014; CAUBET et al., 2012; SOLÉ et al., 2018).

#### 1.4 Processados ou *baked's* (alérgenos alimentares assados em alta temperatura).

Tradicionalmente a abordagem terapêutica na AA é a exclusão total do alimento em suas diversas apresentações, inclusive de traços (contaminação cruzada) presentes em algumas preparações (SICHERER et al., 2016; SOLÉ et al., 2018). Entretanto, sabe-se que o efeito da exposição a altas temperaturas (duração x intensidade) e à matriz (trigo) do alimento em que o alérgeno está inserido, podem induzir alterações na estrutura dos epítomos conformacionais e no seu potencial alergênico. Assim a introdução do alérgeno por meio de preparações assadas (30 min/180 °C), pode ser uma alternativa viável no tratamento da AA, e a utilização de porções pré-estabelecidas podem ajudar a promover a dessensibilização a proteína alergênica e possível tolerância ao alérgeno cru (SOLÉ et al., 2012; GROETCHT, NOWAK-WEGRZYN, 2013; KIM et al., 2011; LIBERMAN et al., 2012; LEMON-MULÉ et al., 2008; NOWAK-WEGRZYN et al., 2008; PETERS et al., 2014).

Lieberman et al. (2012) e Leonard et al. (2015), relataram que aproximadamente 70% dos pacientes, com alergia a leite e a ovos, toleram a ingestão de alimentos com essas proteínas extensivamente assados. Ao assar extensivamente o alimento, a conformação original dos epítomos proteicos é alterada, reduzindo seu potencial alergênico, o que viabiliza a ingestão dos mesmos pelos pacientes com alergia alimentar a esses alimentos ( LEONARD et al., 2015; LIBERMAN et al., 2012; SOLÉ et al., 2012 ; GROETCHT, NOWAK-WEGRZYN, 2013; KIM et al., 2011; LEMON-MULÉ et al., 2008; NOWAK-WEGRZYN et al., 2008; PETERS et al., 2014). Essa ingestão regular pode aumentar em 16 vezes, em crianças intolerantes à proteína do leite cru e de 14,6 vezes em alérgicos a ovo cru, a chance de se tornarem tolerantes à proteína alergênica crua (KIM et al., 2011; LIEBERMAN et al., 2012).

Vale ressaltar que o risco nutricional é real diante da exclusão, principalmente do leite e/ou do ovo, considerados alimentos protéicos de alto valor biológico, o que torna a avaliação antropométrica e a orientação nutricional adequada indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento das crianças alérgicas, principalmente aquelas diagnosticadas nos primeiros dois anos de vida (COCCO et al., 2013; GROETCHT, NOWAK-WEGRZYN, 2013; GIOVANNINI et al., 2014).

Assim, a oferta de uma alimentação com proteínas extensamente assadas de forma variada pode reduzir o risco nutricional, evitar a seletividade e tornar a vida social do

paciente alérgico plena ( LIEBERMAN et al., 2012; LEMON-MULÉ et al., 2008; NOWAK-WEGRZYN et al., 2008; PETERS et al., 2014).

## 1.5 Diagnóstico

### 1.5.1 História Clínica

No diagnóstico da AA a história clínica tem papel fundamental. A anamnese detalhada com a identificação do (s) alérgeno (s) alimentar (es), quantidade ingerida, última exposição, tipo e gravidade das reações, presença de contaminantes alimentares durante o preparo (Ex.: caseína, látex, ovomucoíde), reprodutibilidade do sintoma, presença de outras atopias, além da sensibilidade e experiência do médico são fatores determinantes para diferenciar AA das outras reações adversas ou patologias com sintomas semelhantes (MARCHIA et al., 2015; TURNBULL et al., 2015; SOLÉ et al., 2018).

A anamnese minuciosa ainda determina o (s) mecanismo (s) imunológico (s) envolvido(s) na origem das manifestações clínicas na AA ( mediadas por IgE e/ou não), fator essencial para direcionar a investigação de sensibilização por IgE(s) específicas, como na suspeita de AA mediada por IgE (COCCO et al., 2013; SOLÉ et al., 2012; SAMPSON, 2016; SOLÉ et al., 2018).

### 1.5.2 Investigação de Sensibilização IgE Específica

Os níveis séricos de IgE específica *in vitro* por meio do ImmunoCAP e o teste cutâneo de hipersensibilidade imediata ou teste de puntura *in vivo*, auxiliam na detecção da (s) sensibilização (ões) envolvida (s) nas condições IgE mediadas ou mistas (COCCO et al., 2013; TURNBULL et al., 2015). Destaca-se que a identificação dos alérgenos, por meio desses testes, detecta somente a sensibilização ao alérgeno e não a reatividade clínica, sendo ambos importantes para direcionar o alimento a ser utilizado no TPO (SAMPSON et al., 2012; SOLÉ et al., 2018; TURNBULL et al., 2015). Já casos de reações clínicas anafiláticas imediatas associadas à ingestão de um alimento suspeito, a positividade dos exames IgE mediados é suficiente para a confirmação do diagnóstico, de acordo com os consensos atuais (SAMPSON et al., 2012; SOLÉ et al., 2018).

### 1.5.3 Dosagem de IgE específica

Amplamente utilizada na prática clínica, a dosagem de IgE específica (*in vitro*) permite identificar a sensibilização por diversos alérgenos, além de possibilitar que pacientes, em uso contínuo de anti-histamínicos e/ou corticóides, história de anafilaxia prévia, com baixa reatividade e graves lesões de pele, realizem o exame, situações que limitam a utilização do Teste Cutâneo de Leitura Imediata (SOLÉ et al., 2018). Assim, por ser amplamente utilizada, vários grupos de pesquisa buscam a determinação de pontos de corte de IgE específicas que possam prever os resultados do teste de provocação oral, porém a discrepância dos pontos de corte descritos (dentro de um mesmo centro de pesquisa), os diferentes fenótipos da doença e a idade entre os grupos inviabilizaram a adoção dos pontos de corte com valores positivos preditivos de 95% a 99%, a partir dos quais a chance de manifestação clínica seria maior. Exemplo: Os diferentes pontos de corte descritos para crianças com alergia à proteína do ovo entre 1.5  $\kappa$ U/L a 12.6  $\kappa$ U/L (CELIK-BILIGLILI et al., 2005; SAMPSON et al., 2012) e com APLV de 5.0  $\kappa$ U/L a > 20.6  $\kappa$ U/L (LEONARD et al., 2015). Segundo Sampson (2012), os pontos de corte podem ser utilizados com cautela e dentro da população estudada (no local da pesquisa), como critério de decisão para o TPO, em casos específicos.

Os altos níveis de IgE específicas não excluem o TPO para diagnóstico e verificação de tolerância, e não estão correlacionados com severidade dos sintomas durante os testes de provocação (SAMPSON et al., 2016; SICHERER et al., 2016; SOLÉ et al., 2018).

### 1.5.4 Teste Cutâneo de Leitura Imediata

Os testes cutâneos de leitura imediata (TCLI) *in vivo* que determinam a sensibilização aos alérgenos, são simples, rápidos, com baixo risco de reações sistêmicas e de fácil execução em consultório por médicos capacitados. Não há restrição de idade para a realização do teste, contudo deve-se considerar a utilização em crianças menores de seis meses, pois podem não ter sido expostas a vários alimentos, inviabilizando a formação de anticorpos e em menores de 2 anos, que podem apresentar baixa reatividade na pele, fator que pode comprometer o resultado do teste. (SOLÉ et al., 2018; MURANO et al., 2014)

O TCLI é considerado positivo quando há formação de pápula, com diâmetro médio  $\geq$  3 milímetros em relação ao controle negativo (solução de histamina). Pode ser realizado com extratos comerciais ou com o alimento *in natura* (*prick-to-prick*). Normalmente, o TCLI realizado com o alimento fresco apresenta maior sensibilidade ao compararmos com o extrato

padronizado, porém há estudos que demonstram o contrário (SAMPSON et al., 2012).

Os testes cutâneos, realizados com extratos comerciais apresentam valor preditivo negativo superior a 90%, resultado que geralmente descarta a sensibilização mediada por IgE pelo alimento-teste. Entretanto, nos casos de consistência na história clínica de AA e resultados do TCLI negativo, a recomendação é o teste de provocação oral - 100% de especificidade (MARCHIA et al., 2015; SOLÉ et al., 2018). A sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos testes de punção com extratos, descritos na literatura, apresentam ampla variação dos pontos de corte, o que dificulta a comparação dos resultados e determinação de valores universais (MARCHIA et al., 2015).

#### 1.5.5 *Teste de Provocação Oral (TPO)*

O Teste de Provocação Oral é considerado o método padrão-ouro para estabelecer ou excluir o diagnóstico de AA ou para verificar a aquisição de tolerância ao alérgeno. O teste consiste na oferta do alimento suspeito em doses crescentes e pré-estabelecidas até atingir o volume de ingesta (porção) usual, em local controlado e sob supervisão do especialista. Os protocolos para o TPO descritos nas pesquisas são adaptações das diretrizes propostas pelo PRACTALL e por SOLÉ et al., (2018), onde os alimentos líquidos são oferecidos em porções crescentes, atingindo o total de 25 ml a 240ml do alimento ou três gramas da proteína em teste, nos diferentes centros e pesquisas (SAMPSON et al., 2012).

O protocolo adotado no ambulatório de Alergia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) para o leite vaca, contempla quatro doses (10, 20, 30 e 40 ml), totalizando 100 ml após o contato oral, com intervalo de 15 a 20 minutos entre as doses e o desencadeamento com os alérgenos submetidos a altas temperaturas na forma de bolo (matriz - trigo e 1,3 g. de proteína do leite/porção), onde  $\frac{1}{4}$  do bolo é oferecido a cada 20 minutos, semelhante aos protocolos descritos por Groetch, Nowak-Wegrzyn, (2013), Nowak-Wegrzyn et al., (2009) e Kneepkens, Meijer, (2009), Solé et al., (2018) e Ballmer-Weber, Beyer, (2018).

O TPO evita a restrição dietética desnecessária, permite documentar a quantidade do alérgeno necessária para deflagrar as manifestações clínicas e os sistemas envolvidos, apesar do risco de reações graves (SOLÉ et al., 2012; SAMPSON et al., 2012). O TPO pode ser realizado **duplo cego** (o possível alérgeno e o placebo são preparados por uma terceira pessoa), **simples cego** (o alimento é mascarado e somente os membros da equipe tem o conhecimento) ou **aberto** (o alimento é oferecido na sua apresentação natural – com o total

conhecimento da equipe e do paciente) (COCCO et al., 2013; SAMPSON et al., 2016; SOLÉ et al., 2018).

O TPO duplo cego placebo controlado (DCPC) é considerado um método padrão-ouro para o diagnóstico, mais indicado para protocolo de pesquisas (acurácia), nos casos de presença de sintomas subjetivos e em crianças maiores de 3 anos, como recomendado pela Academia Europeia de Alergia e Imunologia Clínica (EAACI) (MURANO et al., 2014; SOLÉ et al., 2018). Porém é de difícil aplicabilidade na prática diária devido ao alto custo, necessidade de local e equipe especializados, além do longo período para a execução de até 7 dias entre as fases cegas (COCCO et al., 2013; SAMPSON et al., 2016; SOLÉ et al., 2018).

Já o TPO simples cego pode ser realizado com ou sem placebo, de acordo com o protocolo adotado. O alimento utilizado como veículo deve ser indistinguível do a ser testado, ou seja, deve mascarar o odor, aparência e consistência. Quanto ao TPO aberto ou supervisionado, pode ser utilizado para diagnóstico (confirmação da história clínica) ou verificar a aquisição de tolerância a um alérgeno alimentar, em crianças menores de três anos e quando os sintomas relatados são específicos. O TPO aberto foi amplamente utilizado na última década em protocolos de pesquisa com o objetivo de estimar a prevalência real da AA e verificar aquisição de tolerância ao alérgeno, principalmente aos alérgenos submetidos a altas temperaturas (assados) (GONÇALVES et al., 2016; MURANO et al., 2014; SOLÉ et al., 2018; LEONARD et al., 2014; GROETCH, NOWAK-WEGRZYN, 2013). Atualmente, o TPO com assados (bolinhos) se tornou um protocolo-padrão para a introdução precoce das proteínas do leite e do ovo para crianças com AA. A oferta de preparações assadas (por 30 min/180°C) na dieta contendo leite (1,3 g.) ou ovo (2,2 g.), acelerou o processo de tolerância ao alérgeno cru (KIM et al., 2011; LEONARD et al., 2012; GROETCH, NOWAK-WEGRZYN, 2013; SAMPSON, 2016).

Diante do risco de vida das AA mediadas por anticorpos IgE e do impacto negativo na qualidade de vida desta população frente à exclusão total do alérgeno, o TPO com os alérgenos assados e os testes imunológicos *in vivo* e *in vitro* das IgE específicas, são uma alternativa para o manejo da AA. Entretanto, apesar dos grandes avanços no diagnóstico e tratamento dos pacientes com AA, existem várias questões que precisam ser esclarecidas em pesquisas futuras na tentativa de determinar valores universais que possam prever os resultados do TPO.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Descrever a relação dos testes alérgicos cutâneos de puntura e IgEs específicas para o alimento com a reatividade ao TPO, realizados com assados em pacientes com alergia ao leite de vaca e ao ovo, em amostra brasileira.

### **2.2 Objetivo Específico**

Comparar os testes alérgicos (Teste Cutâneo de Leitura Imediata e IgE específicas séricas) entre os grupos tolerantes e não tolerantes aos alérgenos assados.

Baked cow's milk tolerance prediction in milk allergic children

Lisis Vilar<sup>1</sup>, Flávia Araújo<sup>1</sup>, Thalita Santos<sup>1</sup>, Thatiana Menezes<sup>1</sup>, Marina Cheik<sup>1</sup>, Luciana  
Gonçalves<sup>1</sup>, Gesmar Segundo<sup>1\*</sup>,

1. Food Allergy Research Group, Pediatric Departments, Universidade Federal de  
Uberlândia, Av: Pará 920, Minas Gerais, 38400902, Brazil, e-mail:  
lisisvilar@hotmail.com(L.V);flaaraujo1@yahoo.com.br(F.A);  
thalitavedder@yahoo.com.br (TS); tavares.thatiana@gmail.com (T.M);  
nina\_cheik@yahoo.com.br (M.C); lucianacpereira@yahoo.com.br (L.G)

\* Correspondent author : Food Allergy Research Group, Pediatric Departments,  
Universidade Federal de Uberlândia, Av: Pará 920, bloco 2H sala 02, Minas Gerais,  
38400902, Brazil; E-mail: gesmar@ufu.br ;Tel.: +55 34 3225 8628

**Abstract:** Cow's milk allergy is managed through specific IgE tests and skin prick tests (SPT) as clinical markers, while the oral food challenge (OFC) is the gold standard for diagnosis or tolerance testing. Therefore, the objective of this study was to verify the correlation between skin prick tests and specific IgE tests to reactivity to the OFC performed in patients with CMA. We performed 54 open OFC, with children in a total diet exclusion of milk. Prick-to-prick and SPT with different preparations were performed, patient's then were submitted to the OFC with a 1/4 of a muffin (1.3 g of milk protein). Statistical analysis of the allergy tests showed no statistical difference between the tolerant and non-tolerant groups, except for a CM IgE and SPT for casein. These results reinforce the international literature regarding the prevalence of a baked tolerance and the difficulty in determining universal values that can predict the OFC result through specific IgE and SPT.

**Keywords:** Food allergy, milk hypersensitivity, skin prick test

## 1. Introduction

Food allergies (FA) have become a major problem in public health over the last decade, with an estimated prevalence by oral provocation of 2.5 % in Brazil and 2.5% to 3.4% in the United States [1,2]. The most common allergen in children is cow's milk protein, the main alternative food to breastfeeding in the first months of life. Total exclusion of cow's milk can cause nutritional deficiencies, impaired growth and decrease quality of life [3,4,5].

Allergy to cow's milk protein usually occurs in the first years of life, diagnosis is based on a clinical history (type of reaction, severity, onset period and reproducibility), allergy testing (skin prick test and specific serum IgE levels) [6] and an oral food challenge (OFC)[7]. When interpreting the results of allergy tests, the patient's age, ethnicity, type of symptoms and the environment are determinant variables for conducting the tests [4]. The persistence of an allergy to cow's milk protein appears to be associated with high levels of cow's milk (CM) and casein IgE, as well as the size of the skin test papules associated with the positive OFC outcome.

Traditionally the therapeutic approach to manage food allergies is the total exclusion of the allergen in its various forms [9,10]. However, it is known that exposure to high temperatures (duration and intensity) associated to a food matrix (wheat) can reduce the allergenic potential of the proteins present in CM. This makes the introduction of the allergen through baked preparations a possible alternative treatment of food allergies in pre-established portions [11,12].

Despite the limitations of allergy testing, it is still used universally by clinicians, in order to verify sensitisation to certain allergens [2,4,6]. However, determination of the predictive values of these tests is contradictory in relation to the occurrence of allergic reactions and their severity. Data on the correlation between allergy tests and tolerance or intolerance to baked goods containing milk is even more limited, controversial and continues to need clarification.

Therefore, the objective of this study is to verify the correlation of skin allergy prick tests and specific IgEs for CM with OFC reactivity performed in patients with a cow's milk allergy.

## 2. Materials and methods

This cross-sectional study was carried out at the Pediatric Allergy and Immunology Clinic of Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia from July 2014 to June 2017. Two hundred and twenty-five patients, with a diagnosis of cow's milk allergy (CMA) were contacted by our multidisciplinary team and recruited to participate in the study. Of these patients, 114 had clinical and laboratory findings compatible with a mediated CMA-IgE. After an interview and food diary, 60 patients consumed, on a regular or irregular basis, baked foods containing milk so they were excluded. The remaining 54 patients were on a total exclusion diet and were invited to participate in the study. They were oriented on the OFC procedures (Table I) and then parents or legal guardians signed the informed consent form.

Table I. Parent's orientation to the trigger day:

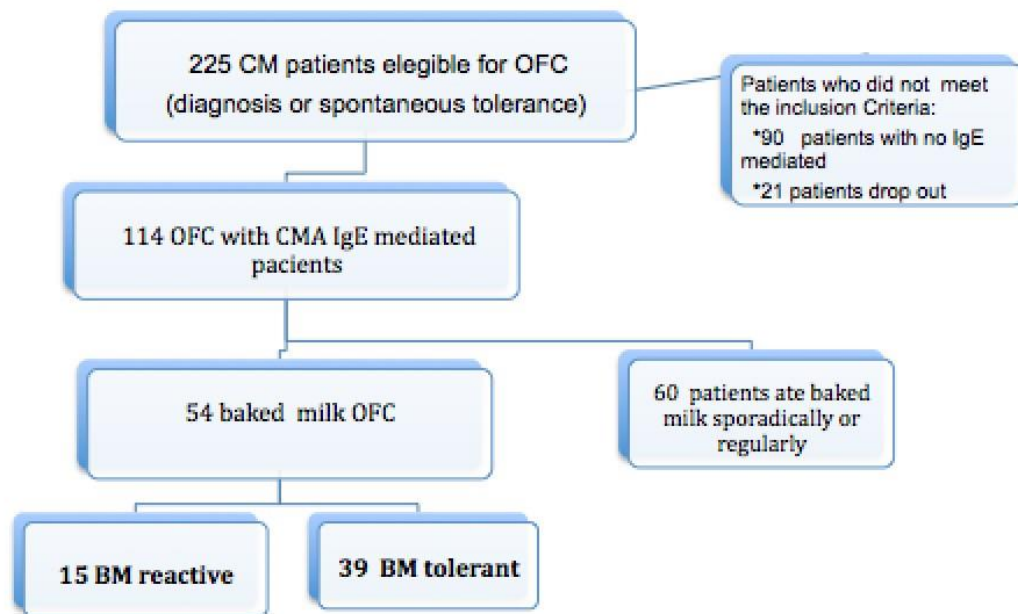
Do not offer any kind of food 2 hours before the test;  
Corticoids: Do not administrated 7-10 days before the test.  
OFC is determined by food allergen and matrix (Cow's milk or baked milk – 30 min/180 C°);

Figure 1 shows the study algorithm. The project was conducted in accordance with Declaration of Helsinki and approved by the local Ethics Committee, number:



79 32030714.4.0000.5152.

**Figure I. Study Design.**



OFC- Oral Food Challenge; BM- baked milk; CM- cow's milk; IgE- Immunoglobulin; SPT- Skin Prick Test;

Allergy tests (dosage of specific IgE for milk, casein, alpha-lactoalbumin, beta-lactoglobulin) were carried out at clinical laboratory in our institution, as well as the immediate-reading skin test with the allergen itself, also known as the prick -to-prick test, using different forms of milk protein (raw, boiled for 15 min, Muffin baked) and with standardised allergens using commercial extracts of casein,  $\alpha$ -lactoalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin (IPI -ASAC, São Paulo, Brazil). The tests were considered positive when the diameter of the papule was  $\geq 3.5$  mm (mm), as described by Franco et al. [13]. The oral challenge test was then performed with cow's milk protein after being cooked extensively according to the following protocol.

#### 2.1 Open OFC Protocol

The OFC protocol was adapted from the recommendations of PRACTALL [14] and the work done by Groetch & Nowak-Wegrzyn [12]. A baked milk OFC was performed by offering a cake with: 1.3g of milk protein, using a wheat matrix, 12.5 g of fat and baked for 30 minutes at 180°C. The recipe was developed and prepared by the nutrition team, according to the descriptions of supplement I. It was offered during the challenge in doses of a quarter every 20 minutes, until the whole portion (21-25 g) was consumed.

## Supplement I. Cup cakes Recipe (12 units)

### Ingredients

- 2 cups of wheat flour
- 2 medium carrots
- 1 cup of sugar
- 5 table spoons of canola oil
- 4 table spoons of powdered Milk
- 1 cup of hot water
- 1 table spoon of yeast

Mix all the ingredients ( excluding yeast and wheat flour ) add the hot water and blender it. Add the wheat flour and yeast. Put everything in a pan and take to bake 30 minutes under 180 degrees. Tips: To change the cake flavour add 2 table spoons of cocoa powder or do a topping with 2 table spoons of sugar, 2 table spoons of cocoa powder , 1 table spoon of water and other with oil.

The oral food challenge was considered positive and interrupted if the patient had any objective symptoms which were compatible with a food allergy, such as urticaria, angioedema, vomiting immediately, wheezing, coughing, diarrhea, difficulty breathing, a pressure drop and receiving medication according to the severity of the symptoms [15]. The OFC was considered negative when the patient was able to ingest the entire sample of the food offered and did not present any reactions during the observation, for a minimum period of 2 hours.

### 3. Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to calculate normality. Nominal variables were described as frequencies and for the analysis of continuous variables; the Mann-Whitney test was used. For the calculations of sensitivity, specificity, positive predictive values (PPV) and negative predictive value (NPV), contingency tables were used, analysing the tests with the OFC being the gold standard. For the purpose of these calculations, the values of 3.5  $\kappa$ U/L and 3.5 mm for the SPT (Youden Index) were considered as cut-off points for the IgEs [13]. All analyses were performed using Graph Pad Prism 7.0 software.

### 4. Results

Of the 54 patients participating in the study, 39 (72.2%) tolerated the ingestion of the prepared sample without reactions, while 15 (27.8%) presented objective reactions and were considered as intolerant to baked milk (Figure I). The age of the patients in this cohort varied from 0.6 months to 15 years, with a median of 1.06 years (95% CI 0.2 -1.7). The median age presented a statistical difference between the two groups with a negative OFC (passed) of 1.08 years and a positive OFC (failed) of 0.62 years where  $p = 0.01$ . The median protein intake during the OFC was 0.81 g (95% CI 0.27 - 2.39) in the group that presented reactions, there was not a statistically significant difference when compared to the group that presented a tolerance, where the median was 1.08 g (95% CI 0.47 - 1.09) ( $p = 0.072$ ) (Table 2).

Table.1 Demographic data of baked milk OFC :

	Total data	Negative OFC	Positive OFC	p<0,05*
	54	39	15	
Gender (M/F)	(26/28)	(17/22)	(9/6)	p=0.279
Median age years)	1.06	1.08	0.62	p=0.01*
PTN consumption (g)	1.06	1.08	0.81	p=0.072
Other food allergy	38.8%	62.0%	38.0%	p=0.66
Prevalence of reactions (%):				
Cutaneous	56.0%			
Urticaria	42.8%			
Angioedema	28.5%			
Pruritus	28.5%			
Respiratory	20.2%			
Cough/ Wheezing	10.1%			
Sibilant	10.1%			
Gastrointestinal	20%			
Vomiting	17.0%			
Diarrhea	3.0%			
Anaphylaxis	3.7%			

The percentages of reactions were calculated from the number of times patients manifested them during OFC. (OFC) - Oral food challenge, \* Analysed by Mann-Whitney - Prisma 7.0

Regarding the reactions that occurred during the OFC, the mean period of time for the reactions to start was 46 min (3-120 min.). Cutaneous manifestations were the most common, followed by respiratory and gastrointestinal reactions (Table II). Although 23% of patients had prior anaphylaxis, only 2 patients (3.7%) required epinephrine during the OFC. The results of the median IgE's specific to cow's milk, alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin and casein, ( $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and casein) as well as prick-to-prick testing (raw milk, boiled milk and roasted milk) are described in Table III. Sensitivity, specificity, PPV and NPV for these propaedeutic methods is also shown.

Table III: Median of IgE test performances in baked milk subgrupos:

	Baked Milk	P<0,05*	sensitivity	specificity	PPV	NPV
	OFC-/OFC+					
IgE-CM Ku/L	3.2/13.2	p=0.028*	80%	51%	40%	80%
SPT CM mm	5.5/6.5	p=0.539	70%	20%	30%	70%
SPT boiled CM mm	4.0/7.0	p=0.071	69%	38%	30%	70%
SPT baked CM mm	3.0/5.5	p=0.075	46%	78%	40%	70%
IgE $\alpha$ -lacto Ku/L	1.2/2.8	p=0.786	33%	77%	50%	60%
SPT $\alpha$ -lacto mm	5.5/7.5	p=0.134	77%	17%	30%	70%
IgE $\beta$ -lacto Ku/L	2.3/3.9	p=0.604	50%	88%	75%	72%
SPT $\beta$ -lacto mm	6.0/7.5	p=0.353	76%	25%	30%	70%
IgE casein Ku/L	1.9/3.6	p=0.897	60%	55%	40%	70%
SPT casein mm	2.5/5.5	p=0.027*	76%	64%	50%	80%

(OFC-) Passed Oral Food Challenge, (OFC +) Failed Oral Food challenge, SPT: Skin Prick Test,  $\alpha$ -lacto: alpha-lactoalbumin,  $\beta$ -lacto: Beta- lactoglobulin and \*Mann –Whitney (Data were calculated between medians of specific IgEs and SPTs - with  $p \leq 0,05$ ) by Graph Pas Prisma 7.0.

Through these results, cow's milk IgE, with 3.5 Ku/l as a cut-off point, was the best predictor for the OFC outcomes, with a NPV of 80%. (Figure II) The prick tests with the different forms of the milk protein, using the 3.5 mm diameter as a cut-off point, showed a NPV of 70%. The exception was casein SPT, where the NPV was 80%, as represented in Table III and Figure III.

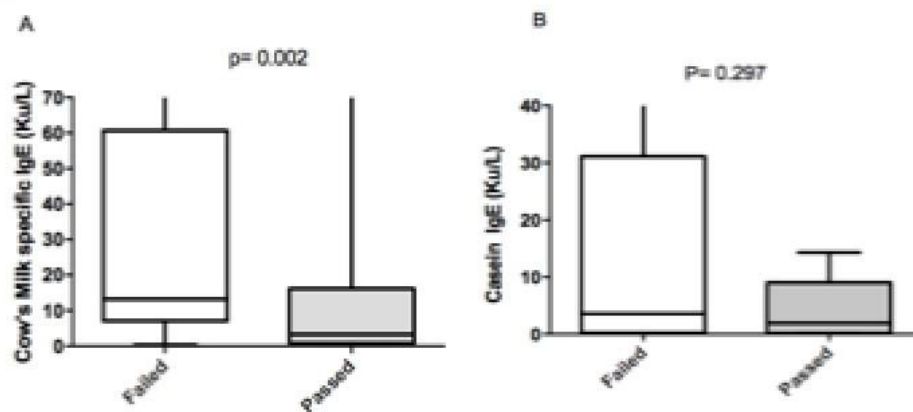
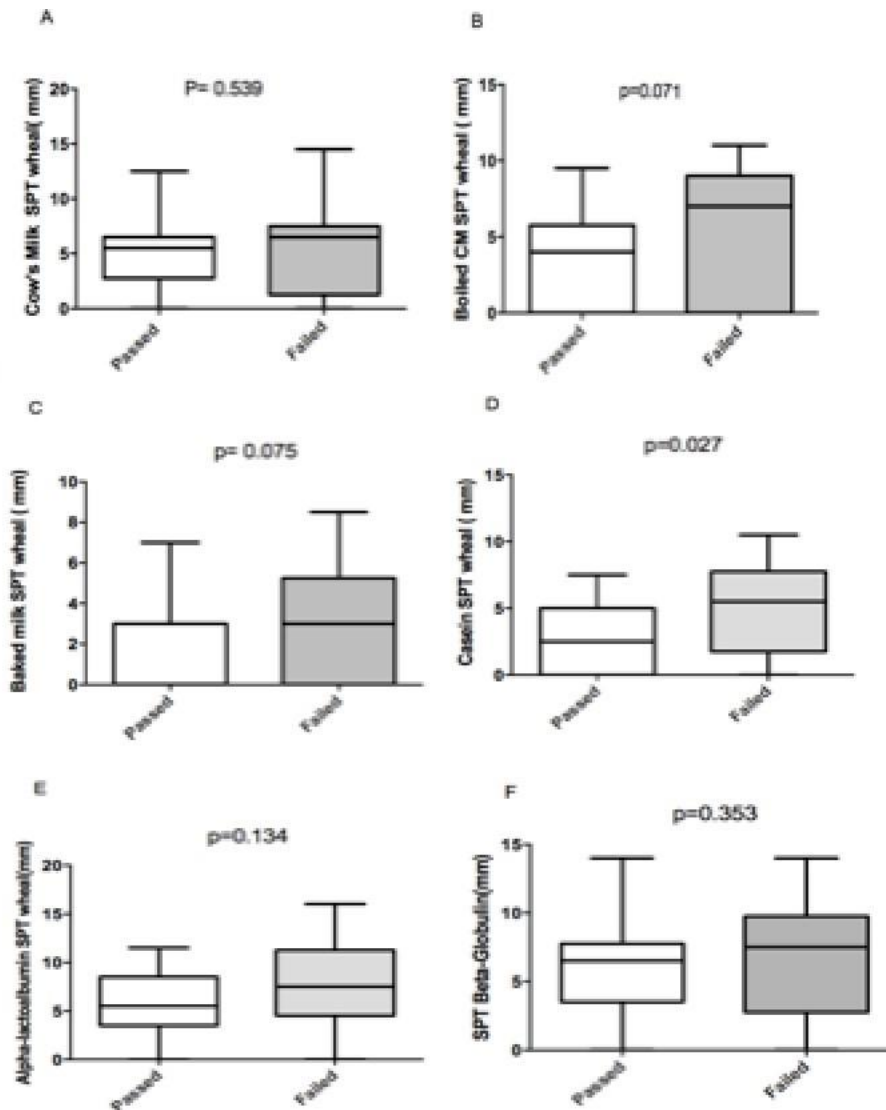


Figure 2. Comparisons between CMA patients who passed and those who failed baked milk oral food challenge (OFC), in regard to (A) cow's milk specific IgE and (B) Casein IgE.



**Figure 3.** Comparisons between CMA patients who passed and those who failed baked milk oral food challenge (OFC), in regard to (A) cow's milk SPT, (B) boiled milk SPT, (C) Baked SPT, (D) Casein IgE, (E) Alpha-lactalbumin SPT and Beta- lactoglobulin.

## 5. Discussion

Some previous publications suggest that up to 70% of patients with a CMA should tolerate extensively heated foods, similar results to those found in this cohort, where 72.2% of the patients presented a tolerance to baked milk [8,11,16]. If we consider all the patients enrolled in this study, we had 99 (86.7%) out of 114 patients who could tolerate baked foods.

A significant finding was that the median age of children who tolerated baked milk was 1.08-year olds, demonstrating that attempting the introduction of baked goods with milk is indeed a viable option after the first year of life.

Cow-specific IgE presented a better profile than other tests in predicting the OFC outcomes in our study. The median value of IgE for the CM of those with a positive OFC was 13.2  $\kappa$ U/L, which was slightly higher than the literature reported (8.14-12.0). Whereas, in patients with a negative OFC, the median value was 3.2  $\kappa$ U/L which was similar to previous studies (4.2-4.8  $\kappa$ U/L) [17,18] (Figure 2). The sensitivity, specificity and predictive values for cow's milk-specific IgE antibodies in OFC with baked milk in our study were very similar



to the results found by Caubet et al.: 62% sensitivity, 85% specificity and a NPV of 86% (median CM IgE of 9.97 Ku/l) [19]. Unlike other studies, casein IgE in our cohort showed no difference between the reactive and non-reactive individuals to extensively baked foods [20]. Considering other allergic tests performed, only the SPT with casein extract showed a statistical difference between those who passed (2.5mm) or did not (5.5mm) with  $p = 0.027$ , and a NPV of 80%. The other prick tests with the different forms of cow's milk protein and those with standardised extracts of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin presented with a NPV of 70%. Similar studies have reported that the median of 5 and <7mm in diameter for the SPT with CM presented with a NPV of 100%, while our study had a similar median of 6.5 mm in diameter, but a NPV of 70%.

Another important finding that was found during our study was the reactions that occurred during the OFC. Previously, Dunlop et al. described the need for the use of epinephrine during an OFC with baked goods in 22% of patients [18]. On the other hand, another study reported that only 5.2% of patients presented with reactions of anaphylaxis during the OFC with baked milk, which was very similar to our results [21]. Patients who react to extensively heated milk protein are at an increased risk of more severe reactions, according to Nowak-Węgrzyn [22]. A previous clinical trial with an OFC for baked milk presented: 92% of cutaneous symptoms which was higher than our result of 43%, 3.8% gastrointestinal symptoms compared to 50% observed in this cohort and a similar frequency of respiratory symptoms in both of the studies [23].

The present study has limitations such as the size of the cohort, which was reduced after the exclusion of those patients who had regularly or sporadically ingested baked goods with milk protein. Another limitation is related to the use of a fixed cut-off to consider tests as positive or negative, which was previously describe in the literature. However, these limitations do not invalidate or significantly interfere with the results obtained.

In conclusion, the CM IgE and skin testing for standardised casein extract presented as the most promising tests. Regarding the provocation with food using extensively heated milk, this was the only test that showed a statistical difference between the positive and negative groups, presenting the highest NPV among all. The study reinforces the use of baked goods as a viable alternative to the OFC and its introduction increases the range of foods available to patients, improving the quality of life of the patient and their family. Although it was not the purpose of this study, the introduction of baked milk may contribute to an earlier tolerance to whole milk, although further studies are needed to expand and confirm this data.

**Author Contributions:** Vilar L: conceptualization, methodology, supervision, draft; Alves F: conceptualization, methodology; Santos T: investigation, methodology; Menezes T: investigation, methodology; Cheik M: supervision; Goncalves L: methodology; Segundo G: conceptualization, methodology, supervision, draft.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Gonçalves, L.C.P.; Guimarães, T.C.P.; Silva, R.M.; Cheik, M.F.A.; De Ramos Nápoles, A.C.; Barbosa E Silva, G.; Segundo, G.R. Prevalence of food allergy in infants and pre-schoolers in Brazil. *Allergol immunopathol.* **2016**, 44, 497-503. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.04.009>PMid:2749678
- Turnbull, J. L.; Adams, H. N.; Gorard, D.A. Review article: The diagnosis and management of food allergy and food intolerances. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2015**, 41, 3-25.

- <https://doi.org/10.1111/apt.12984>; PMID:25316115
3. Skypala, I.J.; Venter, C.; Meyer, R.; Dejong, N.W.; Groecht, M.; Oude Elbering, J.N.; Sprickelman A.; Diamand, L.; Vlieg-Boerstra, B.J. The development of a standardised diet history tool to support the diagnosis of food allergy. *Clin Transl Allergy*. **2015**, 19, 5-7.  
<https://doi.org/10.1186/s13601-015-0050-2>
  4. Sampson, H. A. Food allergy: Past, present and future. *Allergol Int*. **2016**, 65, 363-369.  
<https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.08.006>; PMID:27613366
  5. Mazzocchi, A.; Venter, C.; Maslin, K.; Agostine, C. The role of nutritional aspects in food allergy : Prevention and management. *Nutrients* **2017**, 9, 850-862. <https://doi.org/10.3390/nu9080850> PMID:28792480
  6. Roberts, G.; Ollert, M.; Aalberse, R.; Austin, M.; Custovic, A.; DunnGalvin, A.; Eigenmann, P.A.; Fassio, F.; Grattan, C.; Hellings, P.; et al. A new framework for the interpretation of IgE sensitization tests. *Allergy* **2016**, 71, 1540–1551.  
<https://doi.org/10.1111/all.12939>; PMID:27224838
  7. Muraro, A.; Agache, I.; Clark, A.; Sheikh, A.; Roberts, G.; Akdis, C.A.; Borrego, G.; Higgs, J.; Hourihane, J.Q.; Jorgensen, P.; et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: managing patients with food allergy in the community. *Allergy* **2014**, 69, 1046–1057.  
<https://doi.org/10.1111/all.12441>
  8. Stephanie A. Leonard, Jean-Christoph Caubet, Jennifer S. Kim, Marion Groetch, Anna Nowak-Węgrzyn, Baked Milk- and Egg-Containing Diet in the Management of Milk and Egg Allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* **2015**, 3, 13-23.  
PMid:25577613
  9. Sicherer, S.H.; Wood, R.A.; Vickery, B.P.; Perry, T.T.; Jones, S.M.; Leung, D.Y.; Blackwell, B.; Dawson, P.; Burks, A.W.; Lindblad, R.; Sampson, H.A. Impact of Allergic Reactions on Food-Specific IgE Concentrations and Skin Test Results . *J Allergy Clin Immunol Pract*. **2016** ,4, 239-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaip.2015.11.015> ;PMid:26718150
  10. Solé, D.; Silva, L.R.; Cocco, R.R.; Ferreira, C.T.; Sarni, R.O.; Oliveira, L.C.; Pastorino, A.C.; Weffort, V.; Moraes, M.B.; Barreto, B.P.; et al. Brazilian Consensus on Food Allergy: 2018 - Part 2 - Diagnosis, treatment and prevention. Joint position paper of the Brazilian Society of Pediatrics and the Brazilian Association of Allergy and Immunology. *Arq Asma Alerg Imunol* **2018**; 2: 32-82.
  11. Netting, M.; Makrides, M.; Gold, M.; Quinn, P.; Penttila I. J Heated allergens and induction of tolerance in food allergic children. *Nutrients* **2013**, 5, 2028 46. <https://doi.org/10.3390/nu5062028>; PMID:23739144
  12. Groetch, M.; Nowak-Węgrzyn, A. Practical approach to nutri- tion and dietary intervention in pediatric food allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. **2013**, 24, 212-21. <https://doi.org/10.1111/pai.12035> ;PMid:23384028
  13. Franco, J.M.; Pinheiro, A.P.S.G.; Vieira, S.C.F.; Barreto, Í.D.C.; Gurgel, Q.; Cocco, R.R.; Solé, D. Accuracy of serum IgE concentrations and papule diameter in the diagnosis of cow's milk allergy. *Jornal de Pediatria* **2017**. (Article in press)
  14. Sampson, H.A.; Van Wijk, R. G.; Bindslev-Jensen, C.; Sicherer, S.; Teuber, S.S.; Burks, A.W.; Dubois, A.E.; Beyer, K.; Eigenman, P.A.; Spergel, J.M.; Werfel, T.; Chinchilli, V.M.. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology–European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol*. **2012**, 130, 1260-1274.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.10.017>; PMID:23195525
  15. Sampson HA. Anaphylaxis and Treatement. *Pediatrics* **2003**, 111, 1601-1608.PMid:12777599
  16. Grabenhenrich, L. B.; Reich, A.; Bellach, J.; Trendelenburg. V.; Sprickelman, A. B.; Roberts, G.; Grismshaw, K. E.; Sigurdardottir, S.; Kowalski, M. L.; Papadopoulos, N. G.; et al. A new framework for the documentation and interpretation of oral food challenges in population-based and clinical research. *Allergy* **2017**; 72: 453–461.
  17. Poon, J.; Feuille, E.; Atal, Z.; Sampson, H.A.; Nowak-Węgrzyn, A. Outcomes of 109 open food challenges to extensively-heated (baked) Milk. *J Allergy Clin Immunol* **2016**, ab134.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.12.572>
  18. Dunlop JH, Keet CA, Mudd K, Wood RA. Long-Term Follow-Up After Baked Milk Introduction. *J Allergy Clin Immunol Pract* **2018**, 6, 1699-1704  
<https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.01.024> ;PMid:29408418
  19. Caubet, J.C.; Nowak-Węgrzyn, A.; Moshier, E.; Godbold, J.; Wang, J.; Sampson, H.A. Utility of casein-specific IgE levels in predicting reactivity to baked milk. *J Allergy Clin Immunol* **2013**, 131, 222-224.<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.049> ;PMid:22921870
  20. Bartnikas, L.M.; Sheehan, W.J; Hoffman, E.B.; Permaul, P.; Dioun, A.F.; Friedlander, J. Predicting

- food challenge outcomes for baked milk: role of specific IgE and skin prick testing. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **2012**, 109, 309-313. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.07.026>; PMID:23062384
21. Barbosa, C.P.G.; Castro, A.P.M.; Yonamine, G.H.; Gushken, A.K.F.; Macedo, P.R.C.; Dorna M.B.; Santos, C.J.N.; Pastorino, A.C.; Jacob, C.M.A. Baked milk tolerant patient: Is there any special feature? *Allergol Immunopathol* **2017**, 45, 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.10.008>; PMID:28159383
22. Nowak-Wegrzyn, A.; Bloom, K.A.; Sicherer, S.H.; Shreffler, W.G.; Noone, S.; Wanich, N.; Sampson, H.A. Tolerance to extensively heated milk in children with cows milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* **2008**, 122, 342-347. Feeney, M.; Marrs, T.; Lack, G.; Du Toit, G. Oral Food Challenges: The design must reflect the Clinical Question. *Curr Allergy Asthma Rep* **2015**, 15, 51.
23. Kim, J.; Kim, H.Y.; Park, M.R.; Choi, J.; Shim, J.Y.; Kim, M.J.; Han, Y.; Ahn, K. Diagnostic Decision Points of Specific IgE Concentrations in Korean Children With Egg and Cow's Milk Allergies. *Allergy Asthma Immunol Res* **2015**, 7, 332-338. <https://doi.org/10.4168/aa.2015.7.4.332>; PMID:25749781







## Artigo. 2

### Prediction of baked egg tolerance in hen's egg allergy patients

Lisis Vilar, Cristiane Afonso, Pedro Rolins Neto , Mariana Abdo, Gesmar Segundo\*,

Food Allergy Research Group, Pediatric Departments, Universidade Federal de Uberlândia, Av: Pará 920, Minas Gerais, 38400902, Brazil, e-mail: [lisivilar@hotmail.com](mailto:lisivilar@hotmail.com) (LV); [chitttis77@hotmail.com](mailto:chitttis77@hotmail.com) (CA); [pedrocha21@hotmail.com](mailto:pedrocha21@hotmail.com) (PRN); [mariamorim.ed@hotmail.com](mailto:mariamorim.ed@hotmail.com) (MA).

\* Correspondent author : Food Allergy Research Group, Pediatric Departments, Universidade Federal de Uberlândia, Av: Pará 920, bloco 2H sala 02, Minas Gerais, 38400902, Brazil; E-mail: [gesmar@ufu.br](mailto:gesmar@ufu.br) ; Tel.: +55 34 98418 6111

**1 Abstract:** Hen's egg allergy has an estimated prevalence of 0.5 to 2.5% in several  
**2** countries. Previous studies indicated 70 to 80% of children have tolerance to baked  
**3** protein. Objective: to analyze the correlation of skin prick tests and specific IgEs to the  
**4** reactivity of oral food challenge (OFC) carried out with baked goods in hen's egg  
**5** allergy patients. Methods: A cross-sectional study performed supervised OFC to baked  
**6** egg and same day allergic tests using the egg prick-to-prick technique (in nature, boiled  
**7** and baked) and skin prick tests (SPT) using commercial food extracts (ovalbumin and  
**8** ovomucoid). The OFCs were interrupted in the presence of objective reactions, and  
**9** considered positive. Results: A total of 42-baked egg provocations were performed in  
**10** patients presenting a median of 3.78 years. Twenty-four (72%) finished test without  
**11** reactions. Among the OFC positive patients, the cutaneous and gastric symptoms were  
**12** the most prevalent. Statistical differences of the allergic tests between the groups that  
**13** tolerated (passed) and did not tolerate the baked egg were not found. Conclusions: The  
**14** present study brings additional data on the use of extensive baked hen's egg protein for  
**15** allergic individuals, showing successful OFC with baked could improve the diet on  
**16** several patients since the infancy. Our data reinforces the results described before in the  
**17** international literature of the negative predictive values of immunological markers of  
**18** food allergy as predictors of baked egg OFC in this sample of the Brazilian population  
**19** and show the necessity to use bigger cohorts to calculate decision points, especially to  
**20** the OM IgE.

## **22 Introduction**

**23** Food allergies (FA) have become more frequent in the last decade and given the  
**24** increased prevalence of FA and have been identified as a public health problem in some  
**25** societies and associated with a negative impact on the quality of life of individuals  
**26** [1,2,3].

**27** In early childhood, the most common allergens are cow's milk and egg, reaching an  
**28** estimated prevalence around 2 to 3% for each one, with variations by regions [4,5,6].  
**29** An Australian study reports a prevalence of egg-mediated IgE allergy in 8.9% of infants  
**30** in early childhood, higher than in the US and Europe. In Brazil, a previous study

showed that 1% of infants and preschoolers have egg allergy confirmed by the oral food challenge (OFC) [7,8,9].

The main allergenic proteins identified in the egg show different physicochemical characteristics and different allergenic potentials, being more abundant the ovalbumin (heat sensitive) and ovomucoid (thermostable). For this reason, the thermal process and digestibility have a different impact on the allergenic potential of the whole hen's egg protein. Studies have identified some variables that interfere with the OFC outcomes are, among others, the age of the child, the size of the papules found in the skin prick tests, and also, the thermal treatment of the allergenic proteins [10]. Previous studies described that 70 to 80% of the patients with egg allergy tolerate baked egg products [6,7].

Despite the development of different diagnostic tests for IgE-mediated food allergy, the ability of these tests to predict the risk of a patient to develop allergic reactions or to predict their severity remains contradictory and requires further studies. Currently available tests, such as the dosage of molecular or food allergen-specific IgE antibodies, as well as the immediate-reading skin tests with these food allergens are widely used in practice. These tests in combination with the clinical characteristics and reproducibility of the symptoms after food exposures are used to the diagnosis of IgE-mediated food allergy. However, the OFC on suspected food is the gold standard methodology for diagnosis and, due to its complexity and the need for infrastructure to lead with anaphylactic shock, this procedure is performed only in reference centers for allergic diseases.

The exclusion diet continues to be the recommended treatment for patients with egg allergy. However, the possibility of receiving baked goods with egg protein reduces the exclusion diet of the patient, providing greater freedom and improves quality of life for patients and their families. Data on the correlation of allergic tests, tolerance or intolerance to baked egg is limited and remains an open topic.

Therefore, the objective of the study was to analyze the correlation of skin prick tests and specific IgEs to hen's egg proteins to reactivity to OFC performed with baked egg in patients with egg allergy.

## **2.Methods**

This cross-sectional study was carried out at the Pediatric Allergy and Immunology Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia from July 2014 to June 2017. Children aged 0 to 18 years with diagnosis of IgE-mediated hen's egg allergy were invited to participate in the study, including those with sensitization and history of previous allergic reaction. The project was conducted in accordance with Declaration of Helsinki, approved by the local Ethics Committee under the protocol number: 32030714.4.0000.5152, and the legal responsible signed a consent form authorizing the patient participation in the study.

During the period, 98 patients were recruited with the diagnosis of hen's egg protein allergy in the data records; after the medical visit, 88 patients met the diagnostic criteria and were invited to participate, and 76 consented to participate in the study.

The performance of the food diary showed that 42 patients of the 76 invited were on an exclusion diet of all products containing egg. Thirty-four patients were already consuming sporadic or regular baked goods containing hen's egg protein. Full-length exclusion participants were selected for the study and performance of OFC with baked egg (cupcake), SPT for different forms of egg protein, ovalbumin and ovomucoid specific IgE (Figure 1).

Skin Prick Test

The SPT were performed by the same researcher, using standard commercial egg extracts of ovalbumin (OA) and ovomucoid (OM) (IPI-ASAC, São Paulo, Brazil) and prick-to-prick with natural egg, boiled egg (boiled for 15 minutes) and baked egg (cake - supplement 1) according to the rules established by the Brazilian Society of Allergy and Immunology. The test was considered positive when the papule diameter was  $\geq 3.0$  millimeters (mm) in relation to the negative control.

#### Dosage of specific IgEs

The specific antibodies to egg protein applied in the study were egg white (EW), ovalbumin and ovomucoid (ImmunoCap, Phadia, MA, USA). The study was conducted in a clinical laboratory at Clinical Hospital of the Federal University of Uberlândia, and levels above  $\geq 0.35$   $\kappa$ U/L were considered positive.

#### Oral Food Challenge

The protocol of OFC adapted from the AAAI / EAACI recommendations was performed [11]. After the diagnosis being confirmed by a senior physician, a member of the multidisciplinary team of the Pediatric Allergy and Immunology outpatient clinic advised the child and caregivers about the routine of OFC and the risks of adverse reactions.

The baked good was made in cake format (using wheat matrix) with approximately 2.1 grams of egg protein (and 12.5% total fat) baked for 30 minutes at 180°C, being offered  $\frac{1}{4}$  of the unit every 20 minutes (0, 20, 40, 60 min). After completing the OFC without objective symptoms, the patient remained in the observation unit for at least 2 hours before being discharged. The OFC was discontinued and considered positive if the child presented objective signs of an allergic reaction, such as urticaria, angioedema, pruritus, wheezing, dyspnea, cough, vomiting, diarrhea, hypotension or fainting. [12]

### 3. Statistical Analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to calculate normality, nominal variables were described as frequencies and, for the analysis of categorical variables, the Mann-Whitney test was used. For the calculations of sensitivity, specificity, positive predictive values (PPV) and negative (NPV), contingency tables analyzing the tests were used, with the TPO being the gold standard. For the purpose of these calculations, the values of 3.5  $\kappa$ U/L and 3.5 mm for the SPT (Youden Index) [13] were considered as cut-off points for the IgEs. All calculations were performed using Graph Pad Prism 7.0 software.

### 4. Results

The mean age of the 42 patients submitted to baked egg challenge was 3.98 years, ranging from 6 months old to 11 years old. Fourteen (33.34%) of the patients showed objective symptoms during the OFC with baked goods and required discontinuation and use of medication. The average age of these patients was 3.78 years 95% CI (2.46 - 6.31 years), with an average intake protein of 1.32g (0 to 2.2g) and an average time of 47.6 min (2 to 130 min) between the ingestion of the baked egg until the onset of symptoms. No statistically significant differences were found between patients with positive and negative OFC (Table I).

Although the history of prior anaphylaxis in this group was 26.1%, no patient required epinephrine to control clinical reactions, and most of the reactions involved two systems (cutaneous + gastric), followed by one system (cutaneous or gastric), except for a patient who presented different reactions involving two systems (gastric + respiratory) (Table I).

The median of specific serum IgE levels to egg white, egg yolk, OA and OM did not show a significant difference between patients with positive and negative OFC. Although there was a clear tendency towards higher values of specific IgE in the group

with positive OFC, especially for OM (Figure 2). The medians of the SPT diameters also did not demonstrate a significant difference in patients with positive OFC nor in those with negative OFC (Figure 3). Table 2 shows the sensitivity, specificity, PPV and NPV result for each test applied using the OFC as the standard for this analysis.

## 5. Discussion

Food allergy (FA) has an impact on the quality of life of the child and the whole family, interfering with daily activities, including school and recreational activities due to the risk of potentially serious allergic reactions, such as anaphylaxis. FA also leads to the search for culinary alternatives, especially the exclusion of milk and eggs, which is associated with an inadequate intake of micronutrients and an increase in family costs, since the purchase of less common alternative foods comes at a higher price. In this context, the possibility of reducing the exclusion diet allowing the introduction of baked goods can bring benefits to the patient from a nutritional point of view, but also related to the perception of quality of life and lower financial cost to families.

Only a few studies, to date, have aimed at the evaluation of patients with hen's egg allergy by OFC to baked egg. In the last decade, these studies have described that most patients submitted to open OFC show a tolerance to the extensively heated egg protein from 63% to 70%, similar to the data found in this study cohort 66.6% [14,15,16]. On the other hand, considering total patients with hen's egg allergy, 62 (81.5%) were able to consume baked products in our cohort. Despite being an alternative method with good tolerance, some patients submitted to open OFC to boiled egg and to extensively heated egg protein presented severe reactions, requiring the use of epinephrine. Between 0 and 22% of patients submitted to OFC required the use of epinephrine and, for this reason, it would be important to increase the search for laboratory markers to predict whether or not OFC is positive [15,16,17].

Bartinikas et al (2013) performed a cupcake OFC in 169 patients, and found a statistically significant difference for IgE of EW and ovomucoid, as well as NPV > 90% for both tests [10]. Lieberman et al. (2012) reported similar data with the median of IgE for EW of 2.81  $\kappa$ U/L and 5.85  $\kappa$ U/L among the groups with positive and negative OFC, respectively [18]. Caubet et al. (2012) using a cut-off point of 2.6  $\kappa$ U/L also presented a NPV of 97% for egg white IgE, an index above to this study [19]. Another cohort presented in similar data to our study, and no statistical difference in the dosages of EW IgE between the groups was found [20].

In the present study, the median of specific IgEs in the group with positive OFC were higher, especially for OM, and, probably due to the small sample size, no statistical difference was found. Ovomucoid IgE presented better performance than EW IgE to predict the baked egg OFC in the study by Haneda et al., (2012) [21].

Studies involving SPT for various forms of egg protein and Baked egg challenges are very scarce in the medical literature, therefore this study aimed at verify the sensitivity, specificity and predictive values of SPT using the fresh egg white, boiled and baked egg, in addition to standardized extracts of OM and OA, which demonstrated values very similar to mediated IgE.

The only study (n = 143) that evaluated the SPT to baked egg (muffin) published in the literature presented results similar to this study. In addition, the same study presented a NPV reaching 88% for SPT to baked egg with diameter <2.0mm, data similar to our study [14]. Peters et al., (2013) evaluating the results of SPT to egg white, as a predictor of baked egg OFC found 82% NPV with cutoff point of 11.0 mm in diameter [22]. Other authors reported the data from the EW SPT extract (<10.0 and <11.0 mm) and OM ( $\geq$  11.0 mm) with NPV of 100%, > 90% and 100%, respectively, similar to the cohort of this study [10,14, 20]. The data presented on the SPT to EW and OM

demonstrate they could be useful tools for the management of allergy by specialists who do not have adequate structure for conducting oral food challenge tests to verify tolerance, after more extensive studies

In conclusion, the present study brings additional data on the use of extensive baked hen's egg protein for allergic individuals, showing successful OFC with baked could improve the diet on several patients since the infancy. Our data reinforces the results described before in the international literature of the negative predictive values of immunological markers of food allergy as predictors of baked egg OFC in this sample of the Brazilian population and show the necessity to use bigger cohorts to calculate decision points, especially to the OM IgE.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Author Contributions:** Vilar L: study design, OFC supervised, data analyses and manuscript drafts. Rolin Neto P, Abdo M, Afonso C. performed SPTs, OFC and manage patients. Segundo, G. design and supervised the study, final manuscript.

## References

1. Skypala IJ, Venter C, Meyer R, deJong NW, Groetch M, Oude Elberink JN, et al. The development of a standardised diet history tool to support the diagnosis of food allergy. *Clin Transl Allergy* 2015; 19: 5-7.
2. Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 31: 61-75.
3. Solé D, Silva LR, Cocco RR, Ferreira CT, Sarni RO, Oliveira LC, et al. Brazilian Consensus on Food Allergy: 2018 - Part 2 - Diagnosis, treatment and prevention. Joint position paper of the Brazilian Society of Pediatrics and the Brazilian Association of Allergy and Immunology. *Arq Asma Alerg Imunol* 2018; 2: 32-82.
4. Barbosa CPG, Castro APM, Yonamine GH, Gushken AKF, Macedo PRC, Dorna MB, et al. Baked milk tolerant patient: is there any special feature? *Allergol Immunopathol* 2017. (Article in press)
5. Luyt D, Ball H, Kirk K, Stiefel G. Diagnosis and management of food allergy in children. *Paediatrics and Child Health* 2016; 26:287-291.
6. Lamber T R, Grimshaw KEC, Ellis B, Jaitly J, Roberts G. Evidence that eating baked egg or milk influences egg or milk allergy resolution: a systematic review. *Clin Exp Allergy* 2017; 47: 829-837.
7. Leonard SA. Debates in allergy medicine: baked milk and egg ingestion accelerates resolution of milk and egg allergy. *World Allergy Organ J.* 2016; 9:1.
8. Prescott SL, Pawankar R, Allen KJ, Campbell DE, Sinn JKH, Fiocchi A, et al. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organ J.* 2013; 4: 18 -21.
9. Gonçalves LCP, Guimarães TCP, Silva RM, Cheik MFA, de Ramos Nápolis, A C, Barbosa e Silva G, Segundo GR. Prevalence of food allergy in infants and pre-schoolers in Brazil. *Allergol immunopathol* 2016; 44: 497-503.
10. Bartnikas LM, Sheehan WJ, Larabee KS, Petty C, Schneider LC, Phipatanakul W. Ovomucoid is not superior to Egg white testing in predicting tolerance to baked egg. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2013; 1: 354–360.
11. Muraro A, Agache I, Clark A, Sheikh A, Roberts G, Akdis, CA. et al.; . EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: managing patients with food allergy in the community. *Allergy* 2014; 69:1046–105.
12. Sampson HA, Gerth van Wijk R, Bindslev-Jensen C, Sicherer S, Teuber SS, Burks AW, Dubois AE, et al.. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology–European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol.* 2012; 130:1260-1274.
13. Franco JM, Pinheiro APSG, Vieira SCF, Barreto IDC, Gurgel RQ, Cocco RR, Solé D. Accuracy of serum IgE concentrations and papule diameter in the diagnosis of cow's milk allergy. *Jornal de Pediatria*, 2017. (Article in press)



14. Tan JW, Campbell DE, Turner PJ, Kakakios A, Wong M, Mehr S, Joshi P. Baked egg food challenges- Clinical utility of skin test to baked egg and ovomucoid in children with egg allergy. *Clin Exp Allergy* 2013; 43: 1189-1195.
15. Turner PJ, Mehr S, Joshi P, Tan J, Wong M, Kakakios A, Campbell DE. Safety of food challenges to extensively heated egg in egg-allergic children: a prospective cohort study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2013;24:450–5.
16. Clark A, Islam S, King Y, Deighton J, Szun S, Anagnostou K, Ewan P. A longitudinal study of resolution of allergy to well-cooked and uncooked egg. *Clin Exp Allergy.* 2011;41:706–12.
17. Leonard SA, Sampson HA, Sicherer SH, Noone RN, Moshier EL, Godbold J, Nowak-Wegrzyn A. Dietary baked egg accelerates resolution of egg allergy in children. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130:473-480
18. Lieberman JA, Faith RH, Sampson HA, Nowak-Wegrzyn A. Outcomes of 100 consecutive open, baked-egg oral food challenges in the allergy office. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012; 129:1682–1684.
19. Caubet JC, Bencharitiwong R, Moshier E, Godbold JH, Sampson HA, Nowak-Wegrzyn A. Significance of ovomucoid- and ovalbumin-specific IgE/IgG(4) ratios in egg allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:739–47.
20. Cortot CF, Sheehan WJ, Permaul P, Friedlander JL, Baxi SN, Gaffin JM, et al. Role of specific IgE and skin-prick testing in predicting food challenge results to baked egg. *Allergy Asthma Proc.* 2012;33:275–81.
21. Haneda Y, Kando N, Yasui M, Kobayashi T, Maeda T, Hino A, et al. Ovomucoids IgE is a better marker than egg white-specific IgE to diagnose boiled egg allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:1681–2.
22. Peters RL, Allen KJ, Dharmage SC, Tang MLK, Konplin JJ, Ponsonby A et al. Skin prick test responses and allergen-specific IgE levels as predictors of peanut, egg, and sesame allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:874-880.

Figure.1 Study flowchart

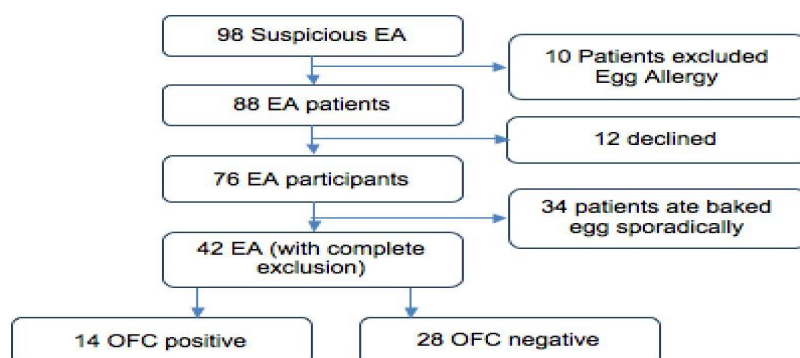


Table.1 Outcomes of patients challenged to baked egg

Baked Egg (n=42)		
Average time of first reactions:	47.6 min. ( 2 a 130 min.)	
Symptoms at OFC:	n=14	
Cutaneous	51.60%	
Gastrointestinal	42.00%	
Respiratory	3.13%	
	OFC fail / OFC Pass	P value
Age (y), median	3.7 / 2.4	p=0.61
PTN intake	1.32 / 1.89	p=0.06
Specific IgE:		
EW IgE (Ku/L)	19.9 / 11.6	p=0.48
OM IgE (Ku/L)	12.0 / 1.6	p=0.44
OA IgE (Ku/L)	9.4 / 5.5	p=0.90
Prick-to-Prick & SPT:		
EW SPT (mm)	7.7 / 6.5	p=0.59
Boiled EW SPT(mm)	4.5 / 4.0	p=0.51
Baked SPT (mm)	2.5 / 0.0	p=0.49
OM SPT(mm)	7.5 / 5.5	p=0.19
OA SPT(mm)	5.2 / 5.0	p=0.70

Positive oral food challenge (OFC Fail), Negative Oral food challenge(OFC pass), Cutaneous: Angioedema, hives, rash or pruritus; Gastrointestinal: vomiting or diarrhea; Respiratory: Coughing, sneezing and sibilant. PTN Protein, EW egg white, IgE Immunoglobulin, OM ovomucoid, OA ovalbumin, SPT Skin prick test.\*Mann –Whitney (Data were calculated between medians of specific IgE's and SPT - with  $p \leq 0.05$ ) by Prisma 7.0.

Table II. Predictors of immunologic parameters in baked egg OFC.

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
IgE-EW (Ku/L)	81%	25%	41%	66%
IgE yolk (Ku/L)	66%	50%	47%	68%
IgE OM (Ku/L)	55%	60%	42%	85%
IgE OA (Ku/L)	52%	30%	30%	100%
SPT EW (mm)	100%	38%	38%	100%
SPT boiled EW (mm)	72%	40%	34%	76%
SPT baked Egg(mm)	38%	70%	38%	70%
SPT OM (mm)	83%	22%	19%	85%
SPT OA (mm)	66%	22%	16%	75%

IgE: Immunoglobulin, EW: Egg white, OM: Ovomucoid, OA: Ovalbumin, SPT: Skin prick test. PPV: Positive Predictive Value, NPV: Negative Predictive Value.

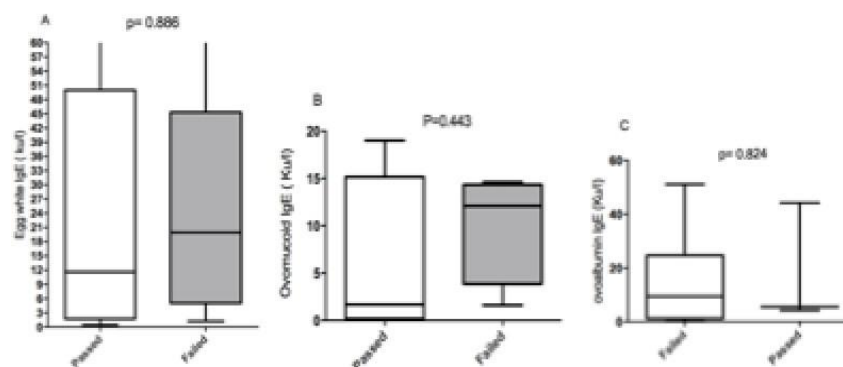


Figure I - Comparisons between baked egg oral food challenge (OFC) groups of specific IgE's: (A) Egg white specific IgE, (B) Ovomucoid IgE and (C) Ovalbumin.

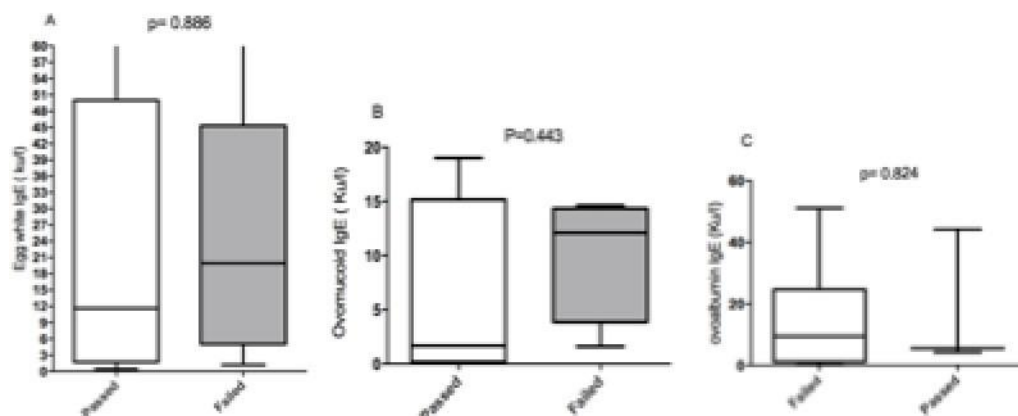


Figure I - Comparisons between baked egg oral food challenge (OFC) groups of specific IgE's: (A) Egg white specific IgE, (B) Ovomucoid IgE and (C) Ovalbumin.

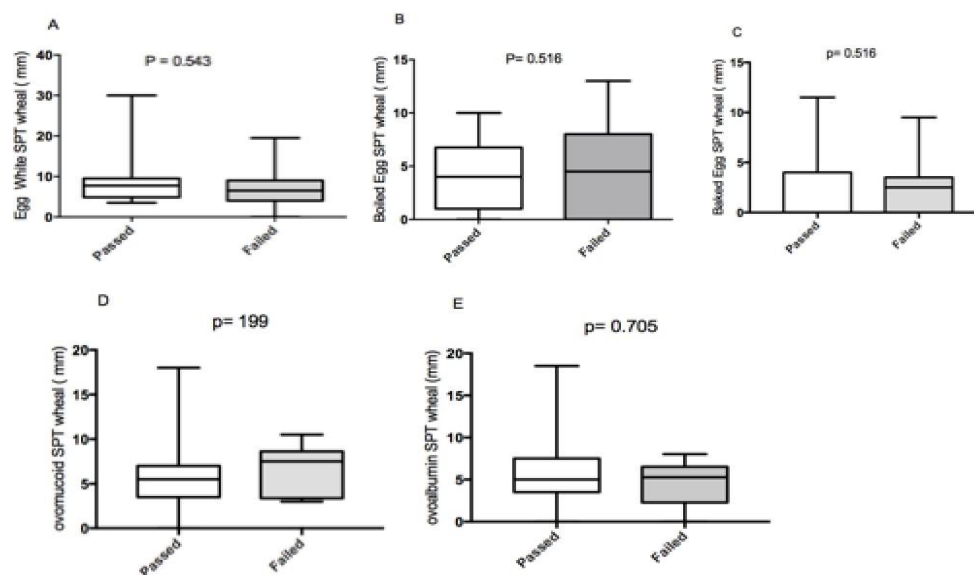


Figure II. Skin prick tests comparisons between who passed and failed baked egg oral food challenge . ( A) Egg White SPT wheal , (B) Boiled , (C) Baked, ( D) Ovomucoid and ( E) Ovalbumin.

#### Supplement I. CUPCAKES RECIPE (12 units)

##### Ingredients

- 2 cups of wheat flour
- 2 medium carrots
- 1 cup of sugar
- 5 table spoons of canola oil
- 2 Whole eggs
- 1 cup of hot water
- 1 table spoons of yeast

Mix all the ingredients ( excluding yeast and wheat flour ) add the hot water and blender it. Add the wheat flour and yeast. Put everything in a pan and take to bake 30 minutes by 180 degrees. Tips: To change the cake flavour add 2 table spoons of cocoa powder or do a topping :2 table spoons of sugar, 2 table spoons of cocoa powder , 1 table spoon of water and other with oil.

## REFERÊNCIAS

BALLMER-WEBER, B. K.; BEYER, K. Food challenges. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 141, n. 1, p. 69–71, Jan. 2018.

BARBOSA, C. P. G. et al., Baked milk tolerant patient: is there any special feature? **Allergologia et Immunopathologia**. Madri, 2017. (Article in press)  
<https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.10.008>

BARTNIKAS, L. M. et al., Predicting food challenge outcomes for baked milk: role of specific IgE and skin prick testing. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**. Boston, v. 109, n. 5, p. 309-313, Nov. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.07.026>

BOYCE, J. A. et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. **Journal of Allergy Clinical Immunology**. St. Louis, v. 121, n. 1, p. 61-75, Jan. 2011.

CAUBET, J. C. et al. . Utility of casein-specific IgE levels in predicting reactivity to baked milk. **Journal of Allergy Clinical Immunology**. St. Louis, v. 131, n. 1, p. 222-224, Aug. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.06.049> ;PMid:22921870

CELIK-BILGILI, S. et al. The predictive value of specific immunoglobulin E levels in serum for the outcome of oral food challenges. **Clinical & Experimental Allergy**. Oxford, v. 35, n. 3, 268-273, Mar. 2005.

COCCO, R. R. et al. **Terapia nutricional na alergia alimentar em pediatria**. São Paulo: Atheneu, 2013.

ELLER, E. et al. Assessing severity of anaphylaxis: a data-driven comparison of 23 instruments. **Clinical Translational Allergy**. Londres, v. 8, p. 29, Aug. 2018.

GIOVANNINI, M. et al. Nutritional management and follow up of infants and children with food allergy: Italian Society of Pediatric Nutrition/Italian Society of Pediatric Allergy and Immunology Task Force Position Statement. **Italian Journal of Pediatrics**. Londres, v. 3, n. 40, p. 1, Jan. 2014.

GONÇALVES, L. C. P. et al. Prevalence of food allergy in infants and pre-schoolers in Brazil. **Allergologia et Immunopathologia**. Madri, v. 44, n. 6, p. 497-503, Nov-Dec 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.04.009> ;PMid:2749678

GROETCH M, NOWAK-WĘGRZYN A. Practical approach to nutrition and dietary intervention in pediatric food allergy. **Pediatric Allergy Immunology**. Inglaterra, v. 24, n. 3, p. 212-221, May 2013. <https://doi.org/10.1111/pai.12035>

GUPTA, R.S. et al. Childhood Food Allergies: Current Diagnosis, Treatment, and Management Strategies. **Mayo Clinic Proceedings**. Inglaterra, v. 88, n. 5, p. 512 – 526, May 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.03.005>

GUSHKEN, A. K. F. et al. Clinical and laboratorial findings from ige mediated cow's milk allergy (CMA) in Brazilian pediatric patients. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v.119, n. 1, p. 195, Jan. 2007.

KIM, J. S. et al. Dietary baked milk accelerates the resolution of cows milk allergy in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 128, n 1, p. 125-131, July 2011. <https://doi.org/10.4168/aa.2015.7.4.332>;PMid:25749781

KNEEPKENS, C. M. F.; MEIJER, Y. Clinical practice. Diagnosis and treatment of cow's milk allergy. **European Journal of Pediatrics**. Berlim, v. 168, n. 8, p. 891-896, Aug. 2009.

LAMBERT, R. et al. Evidence that eating baked egg or milk influences egg or milk allergy resolution: a systematic review. **Clinical & Experimental Allergy**. Oxford, v. 47, n. 6, 829-837, June 2017.

LEMON-MULE, H. et al. Immunologic changes in children with egg allergy ingesting extensively heated egg. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 122, n. 5, p. 977-983, Nov. 2008.

LEONARD, S. A. et al. Dietary baked egg accelerates resolution of egg allergy in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St Louis, v.130, n 2, p.473-480, Aug. 2012.

LEONARD, S. A. et al. Baked milk and egg containing diet in the management of milk and egg allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology in Practice**. Nova York, v. 3, n. 1, 13-23, Jan-Feb. 2015.

LEONARD, S.A. Debates in allergy medicine: baked milk and egg ingestion accelerates resolution of milk and egg allergy. **World Allergy Organization Journal**. Inglaterra, v. 9, n. 1, Jan. 2016. <https://doi.org/10.1186/s40413-015-0089-5>

LUYT, D. et al. Diagnosis and management of food allergy in children. **Paediatrics and Child Health**. Inglaterra, v. 26, n. 7, p. 287-291, July 2016.

LIEBERMAN, J. A.; FAITH, R. H.; SAMPSON, H. A.; NOWAK-WĘGRZYN, A. Outcomes of 100 consecutive open, baked-egg oral food challenges in the allergy office. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v.129, n. 6, p. 1682–1684, June 2012.

MACCHIA, D. et al. Food Allergy Study Group (ATI) of the Italian Society of Allergy, Asthma and Clinical Immunology (SIAAIC), “Guidelines for the use and interpretation of diagnostic methods in adult food allergy.” **Clinical Molecular Allergy**. Londres, v. 15, p. 13-27, Oct. 2015.

MURARO, A. et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: managing patients with food allergy in the community. **Allergy**. Dinamarca, v. 69, n. 8, p. 1046–1105, Aug. 2014. <https://doi.org/10.1111/all.12441>

NETTING, M. et al. Heated allergens and induction of tolerance in food allergic children. **Nutrients**. Suíça, v. 5, n. 6, p. 2028 - 2046, June 2013.

NOWAK-WĘGRZYN, A. et al. Tolerance to extensively heated milk in children with cows milk allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 122, n. 2, p. 342-347, Aug. 2008.

NWARU, B. I. et al. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. **Allergy**. Copenhagen, v. 69, n. 8, p. 992-1007, Aug. 2014.

OSBORNE, N. J. et al. Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 127, n. 3, p. 668-676, Mar. 2011.

PRESCOOT, S. L. et al. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. **World Allergy Organization Journal**. Londres, v. 4, n. 6, p. 18-21, Dec. 2013.

PETERS, R. L. et al. The natural history and clinical predictors of egg allergy in the first 2 years of life: a prospective, population-based cohort study. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 133, n. 2, p. 485-491, Feb. 2014.

PETERS, R. L.; GURRIN, L. C.; ALLEN, K. J. The predictive value of skin prick testing for challenge-proven food allergy: a systematic review. **Pediatric Allergy and Immunology**. Copenhagen, v. 23, n. 4, p. 347-352, June 2012.

SAMPSON, H.A. et al. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology–European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 130, n. 6, p. 1260-1274, Dec. 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.10.017>

SAMPSON, H. A. Food allergy: Past, present and future. **Allergology International**. Londres, v. 65, n. 4, p. 363-369, Oct. 2016.

SICHERER, S.H. Epidemiology of Food Allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. St. Louis, v. 127, n. 3, p. 594-602, Mar. 2011.

SICHERER, S.H. et al. Impact of Allergic Reactions on Food-Specific IgE Concentrations and Skin Test Results. **Journal of Allergy Clinical Immunology: in Practice**. Nova York, v. 4, n. 2, p. 239-245. Mar- Apr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2015.11.015>

SKYPALA, I. J. et al. The development of a standardised diet history tool to support the diagnosis of food allergy. **Clinical Translational Allergy**. Londres, v. 19, n. 5, p. 5-7, Feb. 2015.

SOLÉ, D. et al. Guia prático de diagnóstico de tratamento da alergia às proteínas do leite de vaca mediada pela imunoglobulina E. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 203-233, Nov- Dez. 2012.

SOLÉ, D. et al. Brazilian Consensus on Food Allergy: 2018 - Part 2 - Diagnosis, treatment and prevention. Joint position paper of the Brazilian Society of Pediatrics and the Brazilian Association of Allergy and Immunology. **Arquivos de Asma Alergia e Imunologia**. v. 2, n. 1, p. 32-82, fev. 2018.

TURNBULL, J. L.; ADAMS, H. N.; GORARD, D. A. Review article: The diagnosis and management of food allergy and food intolerances. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. Oxford, v. 41, n. 1, p. 3–25, Jan. 2015. <https://doi.org/10.1111/apt.12984>



## APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) senhor(a), o(a) menor, pelo qual o(a) senhor(a) é responsável, está sendo convidado(a) para participar da pesquisa intitulada **Papel dos alimentos assados na tolerância da alergia alimentar a proteína do leite de vaca e a ovo**, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo, Lisis Karine Vilar.

Nesta pesquisa vamos avaliar o uso de alimentos assados na indução de tolerância da alergia alimentar a ovo.

Esse estudo visa proporcionar um maior conhecimento e ajudar no tratamento de seu filho e de outros pacientes que também tem essa mesma doença.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora Lisis Karine Vilar, no Ambulatório de Alergia e Imunologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Na participação do(a) menor, ele(a), além do tratamento convencional para Alergia Alimentar atualmente preconizado pelo Consenso Brasileiro de Alergia Alimentar e adotado no Ambulatório de Alergia e Imunologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, ele realizará o teste denominado de teste de desencadeamento aberto com alimentos, nas formas assada e crua, o que totalizará, no máximo, 5 encontros semestrais com duração de 4 horas aproximadamente (o número de encontros será delimitado de acordo com a tolerância de cada paciente ao alérgeno alimentar). Também, com a mesma periodicidade, serão solicitados exames para verificação dos níveis séricos de IgE e realização do Teste cutâneo de Leitura imediata que serão realizados com o próprio alimento (bolinho), com a versão in natura e fervida do alérgeno (leite de vaca ou clara de ovo) e com os extratos comerciais.

Em nenhum momento o(a) menor será identificado(a). Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

O(A) menor não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos, da participação do(a) menor na pesquisa, consistem em uma possível reação no teste de desencadeamento. É importante ressaltar que apesar desses pacientes apresentarem risco de reação grave, a quantidade de alérgeno administrada é controlada, o teste é realizado em ambiente hospitalar e sob acompanhamento de equipe multidisciplinar (médicos e nutricionistas). Portanto, caso intercorrências aconteçam, o uso de medicamentos possibilita que as mesmas sejam controladas. Os benefícios são a possibilidade de induzir tolerância precoce ao alérgeno excluído da dieta.

O(A) menor é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor, poderá entrar em contato com:

- Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo

Departamento de Pediatria. Av. Pará, s/n, Campus Umuarama. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG Tel.: (34) 3218-2136 / Tel. fax: (034) 3218-2333

- Lisis Karine Vilar

Departamento de Pediatria. Av. Pará, s/n, Campus Umuarama. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG Tel.: (34) 3218-2136 / Tel. fax: (034) 3218-2333

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38.408-100; Tel.: (34)3239-4131.

Uberlândia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Eu, responsável legal pelo(a) menor \_\_\_\_\_consinto na sua participação no projeto citado acima, caso ele(a) deseje, após ter sido devidamente esclarecido.

\_\_\_\_\_  
Responsável pelo(a) menor participante da pesquisa

## TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENOR

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada **Papel dos alimentos assados na tolerância da alergia alimentar a ovo**, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo e Lisis Karine Vilar.

Nesta pesquisa nós estamos buscando avaliar o uso de alimentos assados na indução de tolerância da alergia alimentar a ovo.

Na sua participação, você realizará o teste denominado de teste de desencadeamento aberto com alimentos, nas formas assada e crua, sendo necessários, no máximo, 5 encontros semestrais com duração de 4 horas aproximadamente (o número de encontros será delimitado de acordo com a tolerância ao alérgeno alimentar). Na mesma periodicidade, serão solicitados exames para verificação dos níveis séricos de IgE e bio-marcadores nutricionais. Para dosagem de citocinas será utilizada uma dessas amostras.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Os riscos, da participação do(a) menor na pesquisa, consistem em uma possível reação no teste de desencadeamento. É importante ressaltar que apesar desses pacientes apresentarem risco de reação grave, a quantidade de alérgeno administrada é controlada, o teste é realizado em ambiente hospitalar e sob acompanhamento de equipe multidisciplinar (médicos e nutricionistas). Portanto, caso intercorrências aconteçam, o uso de medicamentos possibilita que as mesmas sejam controladas. Os benefícios são a possibilidade de induzir tolerância precoce ao alérgeno excluído da dieta.

Mesmo seu responsável legal tendo consentido na sua participação na pesquisa, você não é obrigado a participar da mesma se não desejar. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Esclarecimento ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, o(a) senhor(a), responsável legal pelo(a) menor, poderá entrar em contato com:

- Dr. Gesmar Rodrigues Silva Segundo

Departamento de Pediatria. Av. Pará, s/n, Campus Umuarama. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG Tel.: (34) 3218-2136 / Tel. fax: (034) 3218-2333

- Lisis Karine Vilar

Departamento de Pediatria. Av. Pará, s/n, Campus Umuarama. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG Tel.: (34) 3218-2136 / Tel. fax: (034) 3218-2333

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38.408-100; Tel.: (34)3239-4131.

**APÊNDICE B: FICHA DE COLETA DE DADOS**

Código do paciente: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Condições socioeconômicas da família:

- ( ) <1SM  
 ( ) 1-2 SM  
 ( ) 2-3 SM  
 ( ) 3-5 SM  
 ( ) >5 SM

Grau de escolaridade do responsável:

- Sem instrução: ( )  
 Fundamental: ( ) completo ( ) incompleto  
 Médio: ( ) completo ( ) incompleto  
 Superior: ( ) completo ( ) incompleto

História familiar de atopia: ( ) sim ( ) não

Atopias associadas DIAGNÓSTICADAS: ( ) rinite ( ) dermatite atópica ( ) asma  
 Medicamentos \_\_\_\_\_

Atopias associadas RELATADAS PELOS PAIS: ( ) rinite ( ) dermatite atópica ( ) asma

Reações: ( ) cutâneas ( ) respiratórias ( ) gastrointestinais ( ) anafilaxia

Tempo de exclusão: \_\_\_\_\_ Última reação: \_\_\_\_\_

Exclusão de outros alimentos: \_\_\_\_\_

DATA		/	/	/	/	/	/	/	/
IgE total									
OVO	IgE clara								
	IgE gema								
	IgE clara > ____ / data:								
	IgE gema > ____ / data:								
	IgE ovomucóide								
	IgE ovoalbumina								
TPO	Alimento								
	Reações								
	Peso inicial do bolo								
	Peso final do bolo								
	Resultado								
EN	Peso								
	Estatura								
	Albumina								
	Ferro sérico								
	Ferritina								
Saturação de transferrina									
Retorno em		/	/	/	/	/	/	/	/

**Anexo 1: RECEITAS****BOLO (CUPCAKES)****Rendimento: 12 porções****Ingredientes**

2 xícaras de farinha de trigo

1 xícara de açúcar

5 colheres de sopa de óleo

Alimento em teste: 4 ovos ou 4 colheres de sopa de leite em pó

1 colher de chá de canela (opcional)

1 xícara de água quente

1 colher de sopa de fermento químico

**Modo de preparo**

Misture todos ingredientes (exceto o fermento) e acrescente água quente. Mexa bem.

Adicione o fermento em pó. E coloque a massa em uma forma untada com óleo ou Becel.

Assar em forno pré-aquecido à 180 graus por 30 minutos.

**DICAS: Para variar a preparação**

- Massa:
  - Adicione 1 colher de sopa de chocolate em pó na massa para fazer bolo de chocolate.
- Cobertura:
  - Geléia de frutas
  - Brigadeiro de soja
  - Cobertura de chocolate: 2 colheres de sopa de chocolate em pó, 2 colheres de sopa de açúcar e 2 colheres de sopa de óleo
  - Coloque 50g de goiabada em tirinhas antes de assar.

Valor nutricional por porção (25grs): 191,7 (Kcal), 26,7grs.(CHO), 2.1 grs. (PTN), 9,8 grs. (LIP) e 5.18 grs. (Fibras).

**Anexo II: Parecer consubstanciado do CEP****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** PAPEL DOS ALIMENTOS ASSADOS NA TOLERÂNCIA DA ALERGIA ALIMENTAR A LEITE E/OU OVO

**Pesquisador:** Gesmar Rodrigues Silva Segundo

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 32030714.4.0000.5152

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 862.808

**Data da Relatoria:** 03/10/2014

**Apresentação do Projeto:**

Conforme apresenta o protocolo: A introdução dos alérgenos através dos alimentos assados aumenta as chances de tolerância ao alimento cru. Atualmente não é conhecido o mecanismo de aquisição da tolerância ao alérgeno assado ou cru, bem como a correlação entre a tolerância e as dosagens séricas dos seus biomarcadores e a razão pela qual alguns pacientes são: tolerantes aos assados e aos crus, somente aos assados e outros desencadeiam o processo alérgico independente da forma de apresentação do alimento. Assim esta pesquisa visa possibilitar a introdução de forma segura dos alérgenos alimentares assados, aos pacientes do Ambulatório de Alergia, com o objetivo de proporcionar maior variedade alimentar, reduzir o risco nutricional, além de otimizar a qualidade de vida destes pacientes. Além de viabilizar dados que possam elucidar se há correlação entre a tolerância ao alérgeno e a redução dos biomarcadores.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Geral:** Avaliar a introdução de proteínas assadas do leite e do ovo em pacientes com história de alergia alimentar e as diferenças entre os pacientes que toleram ou não a proteína de diversas formas.

**Objetivos Específicos:**

- Analisar o tempo médio necessário para aquisição da tolerância ao alérgeno;

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 862.808

- Conhecer o tempo médio necessário para que a tolerância ao alimento cru em estudo se concretize a partir da oferta e consumo de alimentos assados;
- Verificar se há correlação positiva entre a diminuição dos níveis sanguíneos da IgE total e específica, com a introdução e tolerância ao alérgeno assado;
- Avaliar o estado nutricional das crianças com exclusão dos alimentos que contenham o alérgeno e/ou traço da proteína, ao iniciarmos a introdução dos alimentos assados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores:

**RISCOS:** Uma possível reação no teste de desencadeamento. É importante ressaltar que apesar desses pacientes apresentarem risco de reação grave, a quantidade de alérgeno administrada é controlada, o teste é realizado em ambiente hospitalar e sob acompanhamento de equipe multidisciplinar (médicos e nutricionistas). Portanto, caso intercorrências aconteçam, o uso de medicamentos possibilita que as mesmas sejam controladas.

**BENEFÍCIOS:** A possibilidade de induzir tolerância precoce ao alérgeno excluído da dieta.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não há.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram apresentados.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências apontadas no parecer 775.670 foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 862.808

adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

UBERLÂNDIA, 07 de Novembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Sandra Terezinha de Farias Furtado**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br





Continuação do Parecer: 862.808

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: julho de 2018.

Relatório Parcial: julho de 2015.

Relatório Parcial: julho de 2016.

Relatório Parcial: julho de 2017.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12 ) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br