

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**ULTRASSONOGRAFIA COM DOPPLER EM  
CORES E EM ESCALA DE CINZAS  
PARA AVALIAÇÃO INTESTINAL EM  
LACTENTES ASSINTOMÁTICOS E COM  
ALERGIA À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA**

MATIAS EPIFANIO

PORTO ALEGRE, 2010.

---

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**ULTRASSONOGRAFIA COM DOPPLER EM CORES E EM ESCALA DE  
CINZAS PARA AVALIAÇÃO INTESTINAL EM LACTENTES ASSINTOMÁTICOS  
E COM ALERGIA À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA**

**MATIAS EPIFANIO**

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina da PUCRS, para obtenção do título de Doutor em Medicina/Pediatria.

Orientador: Prof. Dr. Matteo Baldisserotto

PORTO ALEGRE, 2010.

---

---

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

E64u Epifanio, Matias

Ultrassonografia com Doppler em cores e em escala de cinzas para avaliação intestinal em lactentes assintomáticos e com alergia à proteína do leite de vaca / Matias Epifanio. – Porto Alegre, 2010.

81 f.: il. tab.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança. Doutorado em Pediatria e Saúde da Criança.

Orientador: Prof. Dr. Matteo Baldisserotto.

1. ULTRASONOGRAFIA DOPPLER. 2. INTESTINOS/ultrasonografia. 3. ALERGIA A PROTEÍNAS DO LEITE/diagnóstico. 4. CRIANÇA. 5. HIPERSENSIBILIDADE ALIMENTAR. 6. ESTUDOS DE CASOS. 7. ENSAIO CLÍNICO. I. Baldisserotto, Matteo. II. Título.

CDD 616.3  
NLM WN 240

**Ficha Catalográfica elaborada por  
Nívea Bezerra Vasconcelos e Silva CRB 10/1255**

---

---

DOUTORANDO: MATIAS EPIFANIO

ENDEREÇO: Rua Primeiro de Janeiro 150/1804, Torre 2, Três Figueiras

PORTO ALEGRE - RS

CEP: 90470-320

e-mail: mepifanio@hotmail.com

TELEFONE: (051) 3331 2407

ÓRGÃO FINANCIADOR: CAPES

CONFLITO DE INTERESSES: Patrocínio para o estudo da Nutricia Advanced Medical Nutrition – DANONE, fornecendo as fórmulas de aminoácidos (Neocate).

---

---

*Dedicatória*

*Ao futuro, para minhas filhas Laura e Ana...  
E, ao passado, para meu pai.*

---

---

## AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador **Prof. Dr. Matteo Baldisserotto**, pela sua paciência, disponibilidade e competência, a partir da qual obtive inúmeros ensinamentos.
  - À minha esposa **Ellen**, por sempre me ajudar e incentivar, em todos os momentos, mesmo no pós-parto.
  - À minha mãe **Silvana** e ao meu irmão **Justo**, por estarem sempre presentes mesmo na distância.
  - Ao **Dr. José Vicente Noronha Spolidoro**, pela sua enorme contribuição e por acreditar sempre em mim.
  - Às colegas **Juliana Eloi** e **Patricia Edom**, pela sua amizade e essencial identificação de pacientes.
  - A **Ricardo Soder**, pela ajuda com o programa para analisar as imagens.
  - À **Martha Koch** e **Cesar Menezes**, pela sua colaboração e disposição.
  - A **Carlos Alexandre** pela sua disposição e auxílio no manejo das imagens.
  - A **Jonhy**, por sua colaboração com a formatação e imagens.
  - À **Ceres Oliveira**, pela ajuda na análise dos dados e cálculos estatísticos.
  - À **Anelise Burmeister**, pela tradução para o artigo.
  - À **Carla Rothmann**, secretária da pós-graduação, pela sua assistência e por estar sempre disposta a ajudar.
  - À empresa **Support®**, pela contribuição ao estudo.
  - À **CAPES**, pela bolsa de incentivo à pesquisa.
-

---

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>         | <b>14</b> |
| 1.1 HISTÓRICO .....                        | 14        |
| 1.1.1 Epidemiologia e Etiologia .....      | 15        |
| 1.1.2 Patogênese.....                      | 18        |
| 1.1.3 Manifestações Clínicas .....         | 21        |
| 1.1.4 Diagnóstico .....                    | 24        |
| 1.1.5 Tratamento .....                     | 28        |
| 1.1.6 Estudo ultrassonográfico (USG) ..... | 30        |
| 1.2 JUSTIFICATIVA .....                    | 35        |
| 1.3 OBJETIVO PRINCIPAL.....                | 37        |
| 1.3.1 Objetivos secundários .....          | 37        |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>    | <b>38</b> |

### CAPÍTULO II

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2 PACIENTES E MÉTODOS .....</b>      | <b>48</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>58</b> |

### CAPÍTULO III

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| <b>3 ARTIGO ORIGINAL .....</b> | <b>60</b> |
|--------------------------------|-----------|

### CAPÍTULO IV

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>4 CONCLUSÕES.....</b> | <b>71</b> |
|--------------------------|-----------|

---

---

## **CAPÍTULO V**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5 RESULTADOS NÃO INCLUÍDOS NO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO<br/>(CAPÍTULO III) .....</b> | <b>74</b> |
|--|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5.1 PONTOS DE DISCUSSÃO E OUTRAS INFORMAÇÕES SOBRE O<br/>TRABALHO .....</b> | <b>75</b> |
|--|-----------|

|   |           |
|---|-----------|
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>77</b> |
|---|-----------|

## **ANEXOS**

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| <b>ANEXO 1 .....</b> | <b>79</b> |
|----------------------|-----------|

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| <b>ANEXO 2 .....</b> | <b>81</b> |
|----------------------|-----------|

---



---

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA II-1:</b> Desenho do estudo.....  | 49 |
| <b>FIGURA II-2:</b> Análise da imagem ao Doppler em cores, utilizando o programa<br>ImageJ® ..... | 53 |

---

---

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>QUADRO I-1:</b> Classificação das reações imunomediadas a alimentos<br>e os sistemas e órgãos envolvidos ..... | 20 |
| <b>TABELA V-1:</b> Características dos pacientes que iniciaram o estudo.....                                      | 74 |

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

|      |                                     |
|------|-------------------------------------|
| APLV | Alergia à Proteína do Leite de Vaca |
| IgE  | Imunoglobulina E                    |
| DC   | Doença de Crohn                     |
| HSL  | Hospital São Lucas                  |
| OMS  | Organização Mundial da Saúde        |
| RAST | <i>Radio Allergo Sorbent Test</i>   |
| RCU  | Retocolite Ulcerativa               |
| RGE  | Refluxo Gastresofágico              |
| USG  | Ultrassonográfico                   |

---

---

## RESUMO

### Objetivo

**Avaliar se o processo inflamatório intestinal, em crianças com APLV, pode ser detectado através da ultrassonografia em escala de cinzas e com Doppler em cores.**

### Introdução

Alergia à proteína do leite de vaca é um problema pediátrico comum na prática clínica, com uma variabilidade de sinais clínicos, sintomas e difícil de diagnóstico. Ultrassonografia em escala de cinza e com Doppler em cores tem sido, cada vez mais, utilizada para avaliar processos inflamatórios abdominais.

### Métodos

Este estudo avaliou os dados clínicos e os exames ultrassonográficos em escala de cinza e ao Doppler, de 34 crianças. O estudo foi dividido em duas etapas, com delineamentos complementares: uma etapa inicial, constituindo um estudo de casos e controles e uma segunda etapa constituindo um ensaio clínico. Dezesete crianças, entre 0-6 meses de idade, com suspeita de alergia à proteína do leite de vaca, e 17 lactentes assintomáticas, da mesma idade, foram avaliadas por um investigador cego, que determinou a densidade vascular e a espessura da parede intestinal, em diferentes partes do tubo digestivo. As variáveis clínicas e US foram avaliadas em três tempos, no grupo com suspeita: ao início, após quatro semanas de uma fórmula hidrolisada de aminoácidos, e após teste de desencadeamento. Foram determinados pontos de corte, para o percentual de densidade vascular, através do *Like-hood Ratio* e da curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC)

### Resultados

A diferença do valor da densidade vascular, em percentual, entre os pacientes com alergia à proteína do leite de vaca (28,1%) e os controles (7,77%  $p = 0,001$ ), foi muito significativa. A análise de curva ROC mostrou que um ponto de corte de 18,7% pode diferenciar pacientes com alergia à proteína do leite de vaca, dos controles, com 81,8% de sensibilidade e 94,1% de especificidade. Os valores preditivos positivo e negativo foram acima de 88%. Área sob a curva foi de 0.941. A espessura da parede intestinal, entre os dois grupos, foi mínima.

### Conclusão

Este estudo sugere que o Doppler poderá ser útil na suspeita diagnóstica de CMA. Recomendamos utilizar, como ponto de corte, a densidade vascular de 18,7%. A utilização da espessura da parede intestinal apresenta difícil aplicabilidade clínica.

**Palavras-chave:** leite de vaca, alergia alimentar, ultrassonografia, lactente.

---

---

## ABSTRACT

### Aim

**Evaluate whether the intestinal inflammation in children with CMA, can be detected by ultrasound in gray scale and color Doppler.**

### Introduction

Cow's milk allergy is a common pediatric clinical problem with a variability of clinical signs, symptoms and it's hard to diagnose. Gray scale and color Doppler ultrasonography have been increasingly used to evaluate abdominal disorders and intestinal inflammation.

### Methods

This study evaluated clinical findings and gray scale and color Doppler sonograms of 34 infants. The study was divided into two stages, with additional designs: an initial step, making a study of cases and controls and a second stage constitutes a clinical trial. Seventeen infants aged 0 to 6 months with a suspicion of cow's milk allergy and 17 non-symptomatic infants were evaluated by a blinded investigator who determined the percentage of vessel density and the thickness of different parts of the bowel. Clinical and ultrasonographic variables were evaluated at three time points: at presentation, after 4 weeks of amino acid-based formula feeding, and after challenge test. Likelihood ratio and ROC curve were used to define a cut-off point for percentage of vascular density.

### Results

The difference in percentage of vessel density between patients with cow's milk allergy (28.1%) and control infants (7.77%) was statistically significant. ROC analysis showed that a cutoff point of 18.7% could differentiate between patients with cow's milk allergy and control infants with 81.8 % sensitivity and 94.1% specificity. Positive and negative predictive values were greater than 88%. Area under the curve was 0.941. Likelihood ratio of 10.8, when using a cut-off 20%. Difference in bowel wall thickness between the two groups was very little.

### Conclusion

Color Doppler may be used when cow's milk allergy is suspected. We suggest a cut-off point of 18.7% for percentage of vessel density. The use of the thickness of the intestinal wall presents difficult applicability.

**Key words:** Cow's milk, Food allergy, Ultrasonography, Infant.

---

---

# CAPÍTULO I

---

## **1 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.1 HISTÓRICO**

Com as mudanças ocasionadas pelo desenvolvimento tecnológico industrial, nas sociedades ocidentais, sobretudo na área de alimentação, e com a maior participação das mulheres no mercado de trabalho, a alimentação infantil tem se modificado, nos últimos decênios.

Dentre as mudanças observadas, nos hábitos alimentares, talvez as mais significativas sejam: a redução dos índices de aleitamento materno exclusivo e o encurtamento do período de aleitamento (1). Conseqüentemente, há uma utilização maior de outros tipos de leites, que não o materno.

A tendência de não utilizar o aleitamento materno exclusivo tem sido observada em todas as classes sociais. Utilizam-se vários tipos de leites, provenientes de diferentes mamíferos. O mais usado é o leite de vaca.

Atualmente existe disponível uma variedade muito grande de produtos comercializados, com reconhecida qualidade. A partir da maior utilização das fórmulas baseadas em leite de vaca, como principal alimento, no primeiro ano de vida, contudo, têm sido estudadas e reportadas múltiplas afecções, atribuídas a esse leite. Entre essas doenças, estão: anemia ferropriva, sangramento intestinal oculto, intolerância à lactose e alergia à proteína do leite de vaca.

Evidências mostram que a prevalência das doenças alérgicas vem aumentando, nas últimas décadas, tanto na Europa como na América, sendo que a alergia alimentar parece fazer parte deste aumento (2-3-4). Supõe-se que este

---

aumento esteja relacionado com a teoria da higiene ambiental, proposta por Strachan (5). A hipótese da higiene postula que a exposição mais tardia, na vida, a fatores imunomoduladores - tais como certas infecções virais e endotoxinas - pode ser responsável para a crescente prevalência de doenças alérgicas. Entre essas doenças: asma, rinite alérgica e alergia alimentar (6).

Os primeiros relatos de alergia alimentar são atribuídos a Hipócrates *apud* Moon&Kleinman (7). Ele já afirmava que o leite de vaca poderia ocasionar, em crianças, os seguintes sintomas: diarréias, vômitos, déficit no crescimento e até urticária. Filkestein *apud* Cantani (8), em 1905, relatou o primeiro caso de choque anafilático, após ingestão de leite de vaca, e Wernstedt *apud* Host (9), em 1910, propôs o termo de *Alergia ao Leite de Vaca*, para denominar esse transtorno.

### **1.1.1 Epidemiologia e Etiologia**

A reação gastrointestinal adversa a certos componentes alimentares vem sendo descrita há muitos anos. Em 1984, o *National Institute of Health* definiu os termos usados para descrever reações adversas a alimentos. A utilização desses termos tem permitido uma melhor comunicação, no meio científico.

O termo “reação adversa” é genérico e pode ser aplicado a uma resposta clínica anormal, atribuída à ingestão de um alimento ou aditivo alimentar. As reações adversas a alimentos, antigamente, dividiam-se em: tóxicas e não tóxicas. Posteriormente, foram divididas em reações imunomediadas (alergia alimentar) e não imunes (intolerâncias). As reações não imunes dependem de mecanismos enzimáticos (intolerância à lactose), farmacológicos ou químicos. Em 2001,

---



contudo, essa classificação foi reavaliada (10). O termo hipersensibilidade, geralmente usado como sinônimo de alergia alimentar é utilizado atualmente para descrever sintomas ou sinais reproduzíveis, causados pela exposição a um estímulo definido, em uma dose tolerada por pessoas normais.

A Organização Mundial de Alergia propôs, em 2003, utilizar o termo alergia alimentar, para denominar um grupo de distúrbios, com resposta imunológica anormal ou exagerada a determinadas proteínas alimentares, que podem ser mediadas por imunoglobulina E (IgE) ou não (11-12). Intolerância alimentar é um termo genérico, que descreve uma resposta fisiológica anormal à ingestão de um alimento ou aditivo alimentar, cujo mecanismo não é imunológico. Esse mecanismo pode ser metabólico, por ação farmacológica, contaminação tóxica, deficiência enzimática ou idiossincrática (13).

Existem diversos alimentos capazes de gerar reações de alergia. Dentre os mais comuns, se encontram os seguintes: amendoim, ovo, soja, leite e peixe. A alergia causada pela proteína do leite de vaca (APLV) é a reação adversa a alimentos mais comuns na infância. Seu reconhecimento e seu diagnóstico são difíceis, uma vez que não há um teste único ou uma combinação de exames, que definam este diagnóstico.

O leite de vaca contém mais de 25 frações protéicas, potencialmente antigênicas. Para que uma molécula possua capacidade antigênica, deve apresentar um peso molecular mínimo de 10.000 Daltons e deve ser estável ao calor e ao ácido. Ele é composto de 80% de caseína e 20% de proteínas do soro. A beta-lactoglobulina (10% da proteína total), com um peso molecular entre 11.000 e 24.000 Daltons, é considerada a mais alergênica, seguida da alfa-

lactoalbumina (4% da proteína total), gama globulina bovina e albumina sérica bovina (14). Outros estudos referem, entretanto, como componente mais destacado na alergenicidade a  $\alpha$ S1caseína (15).

Os níveis de beta-lactoglobulina, no leite materno, podem estar elevados em algumas mães, cujos filhos apresentam APLV, enquanto são alimentados exclusivamente com leite materno. Nem sempre, contudo, esses níveis de beta-lactoglobulina se relacionam com a presença de alergia (12).

No Brasil, um recente estudo epidemiológico, realizado em consultórios de gastroenterologistas pediátricos, com 9.478 crianças, apresentou que 7,3% possuem suspeita de alergia alimentar, sendo 77,0% do leite de vaca; 8,7% de soja; 2,7 % de ovo; e 11,6%, outros. Nesse estudo, a incidência e prevalência da suspeita de APLV foram de 2,2% e de 5,7%, respectivamente (16).

Estudos em países desenvolvidos demonstraram que a APLV afeta de 2 a 7,5% das crianças, especialmente nos primeiros meses de vida (17). A verdadeira prevalência de APLV em crianças, porém, é desconhecida, dado que se aplicam diferentes definições e métodos diagnósticos. Portanto, é necessário utilizar a padronização das definições e procedimentos diagnósticos, para interpretar os diferentes estudos epidemiológicos, já que existe uma superestimação de alergia alimentar pelos pacientes e suas famílias.

Bock estudou uma coorte de 520 crianças, desde o nascimento até os três anos de vida. Destes, apenas 6% das crianças reagiram a alimentos suspeitos num teste de provocação duplo-cego controlado com placebo. Em 28% dos casos, entretanto, os pais acreditaram que seus filhos tinham alergia alimentar (18).

Estudos prospectivos de recém-nascidos mostraram que, quando há um parente de primeiro grau atópico, a prevalência de alergia ao leite de vaca é de cerca de 2% a 5%, no primeiro ano de vida, em comparação com um décimo dessa incidência na ausência de uma história familiar positiva. A prevalência de APLV é significativamente mais alta em crianças com dermatite atópica ou com asma (19).

### **1.1.2 Patogênese**

A compreensão total da patogênese das reações de hipersensibilidade aos alimentos continua sendo um mistério. Alguns dos fatores a serem esclarecidos são as relações entre: a genética do indivíduo, a flora intestinal, o tipo e a frequência de exposição a alérgenos, mecanismos de tolerância imunológica, assim como alergenidade de diferentes proteínas e surgimento de sinais e sintomas de alergia.

A alergia alimentar desenvolve-se, tanto em indivíduos predispostos geneticamente, quanto em indivíduos sem esta predisposição. Ocorre que, ao serem expostos aos alérgenos, verifica-se a perda da capacidade de reconhecer e ignorar antígenos alimentares, ou seja, falham os mecanismos de tolerância imunológica.

Para que exista alergia alimentar, é preciso que antígenos protéicos, que chegam ao trato gastrintestinal, alcancem o meio interno, passando pelos sistemas de defesa, imunológicos e não imunológicos. Os mecanismos não imunológicos incluem: a barreira ácida gástrica, a camada de muco constituída por

---

glicoproteínas, a microflora intestinal, o peristaltismo intestinal e a própria integridade da mucosa intestinal. Esta última é apontada como o principal mecanismo, que poderia explicar a maior incidência de alergia alimentar em lactentes, determinada pela imaturidade da barreira mucosa intestinal nos primeiros meses de vida (20).

As defesas imunológicas estão constituídas pelo sistema imune associado ao trato gastrintestinal, incluindo linfócitos intraepiteliais e da lâmina própria, placas de Peyer, citocinas e imunoglobulina A secretória. A imaturidade desses mecanismos, em recém-nascidos e lactentes, reduz a eficiência da barreira nessa faixa etária.

O antígeno protéico é transportado da luz intestinal, através das células M , que sensibilizam os linfócitos contidos nas placas de Peyer e nos folículos linfóides. Os linfócitos migram pelos vasos linfáticos, até os gânglios mesentéricos e, pelo canal torácico, atingem a circulação sistêmica. Os linfócitos sensibilizados (B e T) voltam ao tecido linfóide intestinal ou se depositam em outras superfícies mucosas, onde serão células efectoras ou se transformarão em plasmócitos, para produção de imunoglobulinas.

A resposta imune é predominantemente supressora, favorecendo o desenvolvimento de tolerância. A alergia alimentar ocorre, quando há falha nos mecanismos da tolerância imunológica, ou seja, na capacidade de reconhecer e ignorar antígenos alimentares (21).

Sampson classificou as manifestações gastrintestinais secundárias a reações imunológicas aos alimentos em: 1) reações exclusivamente mediadas por

---

IgE, 2) reações parcialmente mediadas por IgE; e, 3) reações exclusivamente mediadas por células, ou não-IgE. Quadro 1(12).

| <b>Tipo de reação/<br/>Momento dos<br/>sintomas</b> | <b>Mediadas por IgE/<br/>Início agudo</b>   | <b>IgE/Mediada por<br/>células/<br/>Início tardio</b> | <b>Mediadas por<br/>células/<br/>Início tardio</b>   |
|---|---|---|--|
| Trato gastrintestinal                               | Síndrome de alergia oral, gastroenteropatia | Esofagite eosinofílica, gastroenterite eosinofílica   | Proctite, proctocolite, enterocolite, doença celíaca |
| Pele  | Urticária, angioedema, anafilaxia           | Dermatite atópica                                     | Dermatite herpetiforme                               |
| Respiratório  | Rinite, conjuntivite, Broncoespasmo (asma)  | Asma  | Hemossiderose (associada ao leite)                   |

**QUADRO1:** Classificação das reações imunomediadas a alimentos e os sistemas e órgãos envolvidos

As reações mediadas por IgE, são, em geral, rápidas, com um início de algumas horas, até 24 - 48h, após a ingestão do alérgeno. Mastócitos são ativados e diversos mediadores químicos como a histamina e metabólitos do ácido araquidônico, são liberados, mas, via de regra, isso ocorre sem produzir um dano histológico no trato gastrintestinal.

As reações mediadas por células (linfócitos Th1 e macrófagos), entretanto, são mais tardias que as provocadas por IgE, podendo chegar a ter sintomatologia clínica até vários dias após a ingestão do alérgeno. Até recentemente, estes mecanismos não eram considerados reações alérgicas. Atualmente, existe um consenso, no sentido de que as reações não-IgE são mediadas por células T. Este

tipo de reação caracteriza-se por liberação de citocinas e atração de macrófagos, ao sítio da lesão, com liberação de enzimas lisossomais, produzindo dano ao trato gastrointestinal. A severidade dessas lesões depende do balanço da resposta imunológica linfocítica Th1 /Th2. Lesões mais severas estão associadas com predomínio Th1.

Alguns fatores aumentam a absorção de antígenos, pelo aparelho digestivo, e predispõem o aparecimento da alergia alimentar na infância. Entre eles, podemos citar: doenças que geram lesão ou inflamação da mucosa intestinal, alterando sua permeabilidade; a imaturidade fisiológica do aparelho digestivo presente nos primeiros meses de vida; as crianças prematuras; as imunodeficiências; a diminuição da acidez gástrica; a insuficiência pancreática; as infecções intestinais bacterianas; as alterações da flora intestinal, entre outros (22).

### **1.1.3 Manifestações Clínicas**

A alergia à proteína do leite de vaca geralmente se manifesta durante os primeiros meses de vida. As manifestações gastrointestinais incluem diarreia crônica com má absorção, refluxo gastroesofágico (RGE), constipação, vômitos, ganho ponderal insuficiente, anemia e hemorragia digestiva alta e baixa (23-24). Podem ocorrer sintomas súbitos, como irritabilidade, cólica, choro intenso e recusa alimentar (25).

O RGE e a APLV são considerados os distúrbios gastrointestinais mais comuns em lactentes, no primeiro ano de vida, sendo, muitas vezes, patologias

---

relacionadas. Estudos recentes sugerem uma relação causal entre RGE e APLV, onde diferentes prevalências (16%-42) de APLV, em pacientes com RGE foram relatadas (26-27). Estas duas entidades têm muitas características em comum: sintomas clínicos, epidemiologia e história natural, que parecem ser estreitamente associados, por vezes sobrepostos. Na prática clínica, a distinção entre RGE e APLV é importante, pois determina uma terapêutica diferente. Por essas razões, as últimas recomendações de diagnóstico e manejo de RGE, publicadas em 2009, em conjunto pelas Sociedades Europeia e Americana de Gastroenterologia Pediátrica, orientam que, diante de um quadro de um lactente com vômitos recorrentes e pouco ganho de peso ou com irritabilidade de natureza desconhecida, deve-se iniciar, empiricamente, um esquema terapêutico de duas semanas, com fórmula extensamente hidrolisada ou fórmula de aminoácidos, para excluir APLV (28).

O esvaziamento gástrico, em pacientes com RGE secundário a APLV, ocorre muito lentamente, propiciando vômitos, principalmente em lactentes. Tem sido observado um piloroespasmo secundário a uma infiltração eosinofílica na mucosa e graus variáveis de comprometimento da mucosa gástrica, desde gastrite histológica a gastrite hemorrágica (29).

A má absorção intestinal é frequente na APLV, o que se verificou em uma casuística italiana com 73 pacientes. Os sintomas mais comuns foram diarreia (60,3%) e retardo do crescimento (32,9%) (30).

A proctite e a proctocolite alérgica ocorrem nos primeiros meses de vida, após a introdução das fórmulas baseadas em leite de vaca leite de vaca, em forma de complemento alimentar. Também pode ocorrer como estímulo antigênico,

veiculado pelo leite materno, mesmo em pacientes alimentados exclusivamente com esse alimento.

A associação entre constipação intestinal crônica e APLV foi estudada em pacientes refratários aos tratamentos habituais. Nestes casos, se observou uma melhora acentuada dos sintomas, ao ser retirada a fórmula baseada em leite de vaca da dieta (31). A constipação também pode ser determinada pela dor evacuatória, associada à inflamação da mucosa retal. Recentemente, um estudo relacionou a APLV como uma das causas de constipação em lactentes (32).

Estudos morfológicos do tubo digestório, em crianças com APLV, demonstraram graus variados de atrofia da mucosa intestinal, bem como presença de processo inflamatório variado, em diferentes partes do tubo digestório - esôfago, estômago, duodeno, intestino delgado, cólon e reto. Foi constatada uma infiltração de linfomononucleares e eosinófilos, nas mucosas dos diferentes órgãos envolvidos (33).

Manifestações dermatológicas são frequentes, sendo a dermatite atópica a apresentação mais observada, acometendo, principalmente, as dobras da pele. As exacerbações, seguidas de períodos de remissão são frequentes. Bucks estima que 1/3 das crianças com alergia alimentar apresenta manifestações cutâneas (34). Há associação, também, entre urticária e angioedema com alergia alimentar. Nestes casos, o quadro clínico tem início abrupto, minutos ou horas após a ingestão do alérgeno, sendo esta reação mediada por IgE. O quadro caracteriza-se por prurido e placas eritemato-papulares de caráter migratório, minutos ou horas após a ingestão do alérgeno.

---



Manifestações respiratórias também são usuais, após ingestão ou inalação de alérgenos, tais como broncoespasmo e rinite. Essas manifestações geralmente são mediadas por IgE (35-36).

#### **1.1.4 Diagnóstico**

O diagnóstico de APLV é difícil, devido às várias manifestações clínicas da doença, à existência de outras intolerâncias alimentares, à ausência de exames laboratoriais conclusivos e às alterações histológicas inespecíficas da mucosa intestinal.

Na maior parte dos casos, as manifestações não são isoladas, o que torna o quadro clínico variável e abrangente. Os sinais e sintomas podem resultar, igualmente, de outros processos, como doenças metabólicas, infecciosas inflamatórias e distúrbios da motilidade gastrointestinal.

O diagnóstico de alergia alimentar tem, a longo prazo, implicações importantes de naturezas nutricionais, psicológicas e sociais para a criança. Um tratamento empírico, baseado unicamente na suspeita clínica, pode ser prejudicial, antes de ter um diagnóstico de certeza (37). Um diagnóstico preciso é essencial para o manejo correto da APLV.

Observam-se anemia ou eosinofilia, em muitos casos. Também pode ocorrer alteração da atividade das dissacaridases por atrofia intestinal. A dosagem de imunoglobulina E apresenta superposição com outros quadros clínicos atópicos. As provas de laboratório, disponíveis na prática clínica rotineira para determinar a origem imunológica, nos pacientes com reações adversas a

---

alimentos, contudo, só permitem definir reações imunológicas de tipo Ig E mediadas.

Os testes para anticorpos IgE específicos incluem testes percutâneos (*prick*) e testes séricos. Entre os testes cutâneos, o *prick test* é o mais utilizado. Este teste é realizado com extrato de leite de vaca ou com suas diferentes proteínas. Sua aplicabilidade é maior nas reações de alergia alimentar mediada por IgE e o resultado deve ser comparado com solução salina e histamina. O resultado deste teste não é comprobatório definitivo para o diagnóstico. O fato de alguns exames apresentarem resultado negativo, para APLV, não exclui essa hipótese diagnóstica (24).

A pesquisa de anticorpos específicos IgE, pelo *radio alergo absorbent teste* (RAST), tem uma melhor especificidade no diagnóstico das alergias alimentares mediadas por IgE, embora estudos em pacientes com APLV indiquem negatividade dos testes cutâneos e valores de IgE e RAST dentro de normalidade. Dois fatores podem guiar o uso de testes sorológicos IgE específicos: a cronicidade dos sintomas e a associação com doenças atópicas (asma, dermatite atópica e anafilaxia).

Ambas as técnicas – teste percutâneo e análise sérica para IgE específica –meramente detectam a presença do anticorpo (sensibilização) e não indicam, necessariamente, que a ingestão resulta em reações clínicas. Eles são altamente sensíveis (>90%), mas apenas moderadamente específicos (50%). São apropriados, quando há grande suspeita de um alimento em particular. Os testes cutâneos não conseguem detectar a maioria das enteropatias ou colites gastrintestinais, induzidas por mecanismos não mediados por IgE (38).

Os resultados desses testes são mais valiosos quando negativos. Isto se verifica, já que sua alta sensibilidade os torna aproximadamente 90% precisos, para excluir reações mediadas por IgE. Um resultado positivo, contudo, está associado a reações clínicas verdadeiras, em apenas 50% das vezes. Esses testes não são eficientes nos casos de triagem (39).

Quando existe uma grande suspeita de APLV, geralmente, na prática clínica, elimina-se o leite de vaca da dieta do lactente, durante algumas semanas, para auxiliar no diagnóstico. Apesar disso, uma resposta clínica favorável a uma dieta de eliminação normalmente não é confiável, e pode ser apenas uma coincidência. O diagnóstico da APLV, reconhecido na literatura, baseia-se em três pontos: suspeita diagnóstica, através de uma história clínica compatível e de exame físico; recuperação clínica, após dieta de eliminação da fórmula baseada em leite de vaca e derivados; e, por último, o teste de desencadeamento positivo, confirmando o diagnóstico pelo reaparecimento dos sinais e sintomas (40). O teste de desencadeamento só deve ser realizado, após algumas semanas de dieta de exclusão, tempo necessário para que ocorra uma normalização das alterações morfológicas e funcionais do trato digestório.

O teste de desencadeamento duplo-cego, controlado por placebo - *Double-blind Placebo-controlled food Challenges (DBPCFC)* - continua sendo o teste de maior acurácia, para o diagnóstico de alergia alimentar (41-42). Ele consiste em utilizar uma fórmula, composta por aminoácidos sintéticos (Neocate®), como placebo, e uma fórmula teste, constituída de das fórmulas baseadas em leite de vaca leite de vaca. Após randomização, são oferecidas doses crescentes e são observadas manifestações clínicas durante sete dias. Se houver reaparecimento

inequívoco de manifestações de APLV, o diagnóstico se confirma. Caso não haja sinais de alergia, o paciente continua recebendo fórmula baseada em leite de vaca, de maneira aberta, para a detecção de falso-negativos.

A análise deste método de desencadeamento duplo-cego, controlado por placebo, demonstra que este procedimento é de difícil aplicação, na maior parte dos serviços médicos do país. O estabelecimento do diagnóstico, pelo teste de desencadeamento aberto ou duplo-cego controlado por placebo, é relevante para reduzir diagnósticos falso-negativos ou positivos. O teste mais utilizado e aceito em nosso meio, pela praticidade, é o protocolo de desencadeamento aberto com fórmula baseada em leite de vaca (40).

Nos lactentes, o diagnóstico de APLV pode ser difícil, sobretudo nos pacientes com poucas semanas de vida. O teste de desencadeamento controlado, portanto, é mandatório, para confirmação do diagnóstico. Este teste também tem como finalidade evitar um excesso no diagnóstico de APLV e a utilização não justificada de uma fórmula hidrolisada, com o alto custo que isto acarreta. Por outro lado, a pouca valorização do quadro alérgico pode desencadear reações graves, quando os pacientes forem submetidos novamente ao alérgeno (43-44).

O caráter potencialmente autolimitado da APLV, com desenvolvimento de tolerância ao alérgeno, antes que se indique o desencadeamento, muitas vezes faz com que exista um subdiagnóstico desta doença. Há, também, situações em que o médico e a família têm pouco interesse em realizar o desencadeamento, em um paciente bem adaptado à dieta, para poupá-lo do desconforto de um eventual teste positivo. Deve ser lembrado que uma expressiva parcela dos pacientes

---

desenvolve tolerância as fórmulas baseadas em leite de vaca, após a idade de um ano, e a maioria, aos três (20).

### **1.1.5 Tratamento**

A conduta terapêutica recomendada é eliminar a fórmula baseada em leite de vaca da dieta da criança e todo alimento que contenha leite bovino e seus derivados em sua composição. A resposta clínica ocorre em um curto período de tempo. É fundamental esclarecer, para os familiares, que a alergia não é de natureza quantitativa e, sim, qualitativa. Por isso, mesmo quantidades mínimas do alérgeno envolvido, quando presentes na alimentação destes lactentes, podem provocar o retorno dos sintomas (12).

A primeira opção de substituição dietética, principalmente em lactentes menores, é o leite humano. Trata-se do alimento ideal, por conter as proteínas que o intestino imaturo dos lactentes está preparado para receber. Neste caso, é recomendável a eliminação do leite de vaca e derivados da dieta materna, para certificarmos de que não existe qualquer exposição da criança às proteínas potencialmente alergênicas (40).

A opção terapêutica baseia-se nas fórmulas alimentares à base de proteína extensamente hidrolisada (45). Um dos meios mais eficazes, para reduzir a alergenicidade de uma proteína alimentar, é diminuir o tamanho da molécula por proteólise. Estas fórmulas contêm apenas peptídeos e aminoácidos, obtidos através de hidrólise enzimática e/ou térmica ou por ultra-filtragem.

---

As fórmulas à base de proteína extensamente hidrolisada são aquelas com fragmentos suficientemente pequenos para não induzir reação em pacientes alérgicos.

Nos últimos anos, contudo, tem-se constatado alergia a esses produtos, já que eles apresentam um pequeno conteúdo residual antigênico, sendo eficazes em 90% dos casos. Já no caso de crianças em que os sintomas não são controlados com o uso de hidrolisado protéico, é necessário o uso de fórmula de aminoácidos (46-47).

Somente os aminoácidos puros são considerados não alergênicos. Portanto, a fórmula baseada em aminoácidos sintéticos proporciona redução total de alergenicidade, dado que não são extraídos da hidrólise de proteína e, sim, desenvolvidos em laboratórios.

Vários estudos em crianças, com diversas apresentações clínicas de APLV, constataram que a utilização de fórmulas de aminoácidos gerou rápida resolução dos sintomas (46-48). Também foi verificado, no entanto, o desenvolvimento de tolerância a outras fórmulas, em aproximadamente 30 % dos pacientes, que receberam fórmula de aminoácidos, durante algumas semanas (49). Além disso, foi comprovada a necessidade de uso de fórmulas de aminoácidos, por períodos mais curtos, nos pacientes com alergia a hidrolisados, quando esses pacientes são comparados aos que têm alergia a oligo-alimentos ou a múltiplos. Nos pacientes com diagnóstico mais precoce e com sintomas, nos primeiros meses de vida, a duração da terapia com fórmula de aminoácidos foi mais curta (48).

As fórmulas à base de proteína isolada de soja não são recomendadas, dado o alto índice de falha (50%). Essa orientação se refere, principalmente, aos

---

pacientes com afetação gastrointestinal, onde o mecanismo imunológico está mediado por células. Em um estudo que empregou testes de provocação controlados por placebo, 14% dos lactentes com alergia ao leite de vaca do tipo I (IgE+) apresentava alergia à soja. Uma maior probabilidade foi observada na enterocolite não mediada por IgE (50).

Um recente estudo prospectivo e randomizado, incluindo 170 lactentes com alergia ao leite de vaca, abordou o tema de alergia à soja. Os lactentes receberam tratamento com proteína de soja padrão ou hidrolisado protéico à base de leite de vaca. O resultado foi que 10% reagiu à soja, enquanto que apenas 2,2% reagiu à fórmula hidrolisada. A incidência de problemas alérgicos foi a mesma nos pacientes IgE positivos e negativos. Os autores notaram que o desenvolvimento de anticorpos IgE específicos, para a soja, foi raro (51). O uso de fórmulas à base de soja é normalmente recomendado apenas para os casos de alergia ao leite de vaca IgE positivos e que nunca receberam soja (38).

Produtos à base de leite de cabra ou de outros mamíferos estão contraindicados, por apresentarem alto risco de reação cruzada.

### **1.1.6 Estudo ultrassonográfico (USG)**

A ultrassonografia é um dos métodos de diagnóstico por imagem mais versáteis e ubíquos, de aplicação relativamente simples e com baixo custo operacional. É um procedimento diagnóstico bastante seguro, que utiliza ondas sonoras de alta frequência para criar imagens de estruturas internas do corpo. A ultrassonografia com Doppler é uma forma de ultrassom, em que é possível

---

estudar estruturas e, ao mesmo, tempo avaliar seu fluxo sanguíneo. O sangue no interior do vaso, por estar em movimento, apresenta um fluxo, que é representado por um gráfico ou por cores.

Nos últimos anos, a ultrassonografia em escala de cinza e com Doppler em cores vem sendo, cada vez mais, utilizada em Pediatria, para avaliar processos vasculares abdominais, inflamatórios intestinais, agudos e crônicos (52-53-54). A utilização do Doppler em cores, para avaliação das doenças inflamatórias abdominais, já está bem estabelecida na prática médica (55-56-57-58).

A neovascularização intestinal, que ocorre principalmente na doença de Crohn em atividade, está relacionada com níveis séricos aumentados de fator de crescimento fibroblástico e com uma intensa estimulação da angiogenesis (59). O aumento de vasos foi constatado, tanto microscópica quanto angiograficamente, bem como através da colonoscopia. A utilização da ultrassonografia com Doppler, no caso dessa doença, permite determinar a região em atividade, por meio do aumento da perfusão da parede intestinal, avaliando o grau de atividade. Esta variável é denominada “densidade vascular” (*vessel density*) (55-57).

Siegel, em um estudo com 37 crianças, concluiu que a idade, a localização da doença, o espessamento da parede intestinal e o fluxo no Doppler em cores são as mais importantes variáveis preditoras do tipo de doença, seja isquêmica, inflamatória ou vascular. A espessura da parede intestinal, nos pacientes com doença inflamatória, foi de 7,8mm +/- 2,7mm; nos pacientes com vasculite, 7,6mm +/- 1,6; e nos pacientes com isquemia, 14,6mm +/- 3,6, sendo a diferença estatisticamente significativa. A autora estudou, também, os fluxos intestinais, os territórios comprometidos, a ecoestrutura da parede intestinal e os relacionou com



o diagnóstico clínico (60). Seus achados são similares aos reportados por outros autores, como Quillen e Siegel, em estudo com crianças (61), e Teefey, com adultos (62).

Um recente estudo analisou como a resposta intestinal a uma provocação, em pacientes com alergia alimentar, pode ser reconhecida, através da ultrassonografia (63). Através de uma sonda nasoduodenal, a mucosa duodenal foi exposta ao alérgeno suspeito, dissolvido em 10 ml de soro fisiológico. Foram avaliadas, através da ultrassonografia, antes e depois do exame, as seguintes medidas: espessura e diâmetro do bulbo duodenal e jejuno, atividade peristáltica e fluidos intraluminais. Uma importante correlação foi observada entre os achados ultrassonográficos (espessura da parede do bulbo duodenal e do jejuno, exsudação de fluidos dentro do lúmen intestinal) e os sintomas provocados através do teste. Da mesma forma, outra significativa correlação se encontrou entre os achados positivos ultrassonográficos, o teste confirmatório de alergia (duplo cego controlado com placebo) e os testes cutâneos (*prick* teste). Este foi o primeiro estudo em que foi monitorada a resposta intestinal a um alérgeno, através da ultrassonografia.

O espessamento da parede intestinal desaparece, após eliminação do alérgeno, e reaparece, no teste de desencadeamento. Estas mudanças na espessura da parede intestinal mostram estreita correlação com as mudanças na contagem de eosinófilos periféricos e nas manifestações cutâneas, através dos testes-padrão (64).

Quillen e Siegel conduziram um estudo de coorte, tentando determinar se a ultrassonografia com Doppler pode identificar um incremento da vascularização

---

intestinal, associado a doenças inflamatórias intestinais, e determinar se diagnósticos específicos podem surgir de diferentes padrões de fluxo. Observaram, através do Doppler em cores, um aumento do fluxo intestinal na mucosa e transmural, em pacientes com uma ampla variedade de doenças inflamatórias intestinais. Esses achados são inespecíficos, dado que todo processo inflamatório de qualquer tipo produz neovascularização. No grupo controle, entretanto, nenhuma anormalidade foi observada, sendo que, este estudo pôde identificar diferentes localizações comprometidas e diferenciar processos extrínsecos intestinais (61).

Ruess et. al.(58) dedicou-se ao estudo das alterações ultrassonográficas, na escala de cinzas, e ao Doppler em cores, nas doenças intestinais inflamatórias (retocolite ulcerativa e Doença de Crohn), observando mudanças significativas, na atividade da doença, nos pacientes submetidos ao tratamento. Eles analisaram 17 pacientes, 13 com doença de Crohn (DC) e quatro com retocolite ulcerativa (RCU). Todos tinham pelo menos um segmento intestinal anormal, espessado e hiperemiado. A parede intestinal foi considerada espessada, quando maior que 3mm, e hiperemiada, de acordo com o grau ao Doppler: grau 1 (sem vascularização); grau 2 (vascularização mínima ou 1 a 5 *pixeis*/centímetro); grau 3 (vascularização moderada ou maior que 5 *pixeis*/cm); grau 4 (aumento severo da vascularização, incluindo discretos vasos ou áreas de confluência vascular). Foram feitos exames ultrassonográficos com Doppler seriados, avaliando tais segmentos. Observou-se redução gradual, tanto da espessura intestinal, quanto do grau de vascularização ao Doppler, juntamente com a melhora clínica dos pacientes.

Em relação à alergia à proteína do leite de vaca, se conhece que esta doença determina alterações gastrintestinais, que podem ser demonstradas pelos estudos ultrassonográficos, determinando um espessamento da parede intestinal (65).

Patenaude descreveu o primeiro caso de APLV, em que o diagnóstico foi sugerido pela ultrassonografia (66). Estudou um paciente de dois meses de vida, em aleitamento materno exclusivo. Esse paciente foi avaliado, por apresentar quadro de vômitos projetivos, antecedentes de fezes com sangue e história de importante irritabilidade. Foi descartada estenose hipertrófica de piloro, colite infecciosa e aganglionose. No estudo USG, foi constatado um cólon esquerdo espástico, com perda da diferenciação das camadas da parede intestinal e um acentuado espessamento da mucosa e submucosa. Esses achados, não foram observados novamente, após cinco dias de tratamento com hidrolisado protéico e dieta de exclusão, com total restituição do padrão USG normal.

Arslen estudou 20 pacientes com alergia alimentar. Para tanto, avaliou a resposta intestinal, após provocação endoluminal com alérgenos alimentares, através de sonda nasoduodenal. Conjuntamente ao procedimento de provocação, foi realizado um estudo endossonográfico, através da mesma sonda, medindo a espessura da parede duodenal. Todos os pacientes tinham história de alergia alimentar e foram divididos em dois grupos, segundo os resultados de testes específicos de alergia, positivos ou negativos (RAST, estudo de liberação de histamina e *skin prick*), em Intolerantes e Alérgicos, respectivamente. Um aumento da espessura da parede duodenal foi observado em 55% dos pacientes (64).

---

Em estudo prospectivo controlado, com 62 neonatos, foi avaliada a sensibilidade e especificidade da ultrassonografia com Doppler versus a radiologia simples de abdome, no diagnóstico de enterocolite necrosante (67). Os resultados mostraram maior sensibilidade e especificidade, sugerindo que este estudo deve fazer parte da avaliação inicial de todo neonato com características clínicas sugestivas de enterocolite necrosante. Tanto a ausência de fluxo na parede intestinal, sugerindo isquemia, como o aumento da vascularização da mesma, indicando um processo inflamatório incipiente, são fatores que facilitam o manejo clínico precoce.

## **1.2 JUSTIFICATIVA**

No contexto da Pediatria, a APLV tem sido bastante destacada como relevante, especialmente pela sua frequência no primeiro ano de vida. A inespecificidade dos sinais e sintomas dessa doença pode retardar ou impossibilitar seu diagnóstico, na atenção básica. Sua apresentação clínica semelhante com a doença do RGE e com cólicas do lactente torna, muitas vezes, difícil o diagnóstico diferencial, entre essas enfermidades.

Está bem estabelecido que a ultrassonografia em escala de cinzas e com Doppler em cores podem detectar processo inflamatório intestinal em crianças. Sabe-se que a APLV determina um processo inflamatório intestinal. Até o momento, entretanto, não foram realizados estudos que avaliassem a circulação intestinal, através da ultrassonografia em crianças com suspeita de APLV.

---

A observação de sinais inflamatórios, nessas crianças, ao ultrassom em escala de cinzas e ao Doppler em cores, poderá ser útil, no sentido de alertar para a possibilidade diagnóstica de APLV. Sendo este exame um método inócua e não invasivo, de fácil realização e baixo custo, poderá ser aplicado no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com APLV.

Até o momento, a avaliação do grau de vasos na parede intestinal, ao Doppler em cores, era realizada através da contagem do número de vasos na parede intestinal. Este método tradicional apresenta algumas dificuldades na hora de quantificar os pixels.

Este estudo utilizou uma metodologia original, que se propôs a avaliar a densidade vascular da circulação mesentérica, através de programa de análise de imagens ImageJ®. Esta tecnologia possibilita identificar quantitativamente a proporção de vasos sanguíneos nas imagens e elimina qualquer possibilidade de subjetividade nas avaliações, aumentando, assim, a acurácia do método.

A realização de vários estudos ultrassonográficos, em diferentes momentos do processo diagnóstico, acompanhando a rotina habitual diagnóstica de APLV, permitirá, possivelmente, observar e quantificar o processo inflamatório que se desenvolve nestes lactentes.

---

### **1.3 OBJETIVO PRINCIPAL**

- Avaliar se o processo inflamatório intestinal, em crianças com APLV, pode ser detectado através da ultrassonografia em escala de cinzas e com Doppler em cores.

#### **1.3.1 Objetivos secundários**

- Comparar os achados clínicos e ultrassonográficos de crianças normais e dos pacientes com suspeita de APLV.

- Estabelecer um valor de corte, utilizando a ultrassonografia com Doppler, através da avaliação da circulação mesentérica periférica, que nos permita diferenciar entre lactentes normais e pacientes com diagnóstico confirmado de APLV.

- Avaliar a resposta clínica e ultrassonográfica, nos lactentes com suspeita de APLV, após tratamento com Neocate® e após desencadeamento oral.

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Leão MM, Coitinho DC, Recine E, Costa LAL, Lacerda AJ. O perfil do aleitamento materno no Brasil. In: Fundação IBGE/UNICEF. Perfil estatístico de crianças e mães no Brasil. Aspectos de saúde e nutrição de crianças no Brasil, 1989. Rio de Janeiro: IBGE; 1992.p. 97-110.
  2. Matricardi PM, Rosmini F, Riondino S, Fortini M, Ferrigno L, Rapicetta M, et al. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ* 2000 12;320(7232):412-7.
  3. Matricardi PM, Rosmini F, Panetta V, Ferrigno L, Bonini S. Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110(3):381-7.
  4. Sicherer SH. Food allergy. *Lancet* 2002;360(9334):701-10.
  5. Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989;299:1259-60.
  6. Bonini S. The Hygiene hypothesis: epidemiologic evidence. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40 Suppl 1:S37-8.
  7. Moon A, Kleinman RE. Allergic gastroenteropathy in children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995;74(1):5-12.
  8. Cantani A. Alergia alimenticia: adecuación nutricional y alergenidad de las fórmulas hipoalergénicas. *An Esp Pediatr* 1993;38(4):283-90.
-

- 
9. Host A. Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 1994;5(5 Suppl):1-36.
  10. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, et al. A revised nomenclature for allergy: an EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 2001;56(9):813-24.
  11. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, et al. Revised nomenclature for allergy for global use: report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(5):832-6.
  12. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(5):805-19.
  13. Berstad A, Arslan G, Lind R, Florvaag E Food hypersensitivity-immunologic (peripheral) or cognitive (central) sensitisation? *Psychoneuroendocrinology* 2005;30(10):983-9.
  14. Wal JM. Cow's milk proteins/allergens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;86(6 Suppl 1):3-10.
  15. Schulmeister U, Hochwallner H, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Geller B, Nystrand M, et al. Cloning, expression, and mapping of allergenic determinants of alphaS1-casein, a major cow's milk allergen. *J Immunol* 2009;182(11):7019-29.
-



- 
16. Vieira MC, Toporovski M, Morais MB, Spolidoro JV, Fonseca MC, Araújo GT, et al. Cow's milk allergy in children: a survey on its main features in Brazil. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2005;29(1 Suppl):S27.
  17. Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Clinical course in relation to clinical and immunological type of hypersensitivity reaction. *Allergy* 1990;45(8):587-96.
  18. Bock A. Prospective appraisal of complains of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics* 1987;79:683-8.
  19. Wershil BK, Butzner D, Sabra A, Savilahti E, Seidman E, Strobel S, et al. Allergy and immunologic disease: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35 Suppl 2:S74-7.
  20. Toporovski MS, Vieira MC, Spolidoro JV, Morais MB, Fagundes-Neto U. Alergia ao leite de vaca. In: Ancona Lopez F, Campos Júnior D. *Tratado de Pediatria*. São Paulo: Manole; 2010. p. 953-61.
  21. Strober W, Kelsall B, Marth T. Oral tolerance. *J Clin Immunol* 1998;18: 1-30.
  22. Herz U. Immunological basis and management of food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;47 Suppl 2:S54-7.
  23. Magazzu G, Scoglio R. Gastrointestinal manifestations of cow's milk allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89(6 Suppl 1):65-8.
  24. American Gastroenterological Association medical position statement: guidelines for the evaluation of food allergies. *Gastroenterology* 2001;120(4):1023-5.
-

- 
25. Jakobsson I, Lindberg T. Cow's milk proteins cause infantile colic in breast-fed infants: a double-blind crossover study. *Pediatrics* 1983;71:268-71.
26. Nielsen R, Bindslev-Jensen C, Kruse-Andersen M, Husby S. Severe gastroesophageal reflux disease and cow milk hypersensitivity in infants and children: disease association and evaluation of a new challenge procedure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:383-91.
27. Cavataio F, Carroccio A, Iacono G. Milk-induced reflux in infants less than one year of age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30 (Suppl):s36-44.
28. Vandenas Y, Rudolph CD, Di Lorenzo C, Hassall E, Liptak G, Mazur L, et al. Pediatric gastroesophageal reflux clinical practice guidelines: joint recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (NASPGHAN) and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;49(4):498-547.
29. Machado R, Kawakami E, Goshima S, Reis Patricio F, Fagundes Neto U. Gastrite hemorrágica por alergia ao leite de vaca: relato de dois casos. *J Pediatr (Rio de Janeiro)* 2003;79(4):363-8.
30. Mancini S, Castro M, Lucidi V, Palumbo M, Dall'oglio L. Caratteristiche cliniche in 73 bambini affetti da allergia alle proteine del latte vaccino. *Minerva Pediatr* 1985;37:49-52.
31. Iacono G, Cavataio F, Montalto G, Florena A, Tumminello M, Soresi M, et al. Intolerance of cow's milk and chronic constipation in children. *N Engl J Med* 1998;339(16):1100-4.
-

- 
32. El-Hodhod MA, Younis NT, Zaitoun YA, Daoud SD. Cow's milk allergy related pediatric constipation: Appropriate time of milk tolerance. *Pediatr Allergy Immunol* 2009. [Epub ahead of print].
  33. Husby S. Food allergy as seen by a paediatric gastroenterologist. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;47 Suppl 2:S49-52.
  34. Burks W. Skin manifestation of food allergy. *Pediatrics* 2003;111(6):1617-24.
  35. O'Connell E. Pediatric allergy: a brief review of risk factors associated with developing allergic disease in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;90(Suppl)3:53-58.
  36. Rautava S, Isolauri E. Cow's milk allergy in infants with atopic eczema is associated with aberrant production of interleukin-4 during oral cow's milk challenge. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:529-35.
  37. Medeiros L, Speridião P, Sdepanian L, Fagundes-Neto U, Morais M. Ingestão de nutrientes e estado nutricional de crianças em dieta isenta de leite de vaca e derivados. *J Pediatr (Rio J)* 2004;80:363-70.
  38. Ferreira C, Seidman E. Food allergy: a practical update from the gastroenterological viewpoint. *J Pediatr (Rio J)* 2007;83(1):7-20.
  39. American College of Allergy, Asthma & Immunology. Food allergy: a practice parameter. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006; 96(3 Suppl 2):S1-68.
-

- 
40. Vandenplas Y, Koletzko S, Isolauri E, Hill D, Oranje A, Brueton M. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child* 2007;92(10):902-8.
  41. Bock SA, Sampson HA, Atkins FM, Zeiger RS, Lehrer S, Sachs M, et al. Double-blind, placebo-controlled food challenge (DBPCFC) as an office procedure: a manual. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82(6):986-97.
  42. Niggemann B, Beyer K. Diagnosis of food allergy in children: toward a standardization of food challenge. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;45(4):399-404.
  43. Barbi E, Gerarduzzi T, Longo G, Ventura A. Fatal allergy as a possible consequence of long-term elimination diet. *Allergy* 2004;59(6):668-9.
  44. Flinterman AE, Knulst AC, Meijer Y, Bruijnzeel-Koomen CA, Pasmans SG. Acute allergic reactions in children with AEDS after prolonged cow's milk elimination diets. *Allergy* 2006;61(3):370-4.
  45. Host A, Halcken S. Hypoallergenic formulas - when, for who and how long: after more than 15 years we know the right indication. *Allergy* 2004;59(Suppl 78):45-52.
  46. Hill DJ, Murch SH, Rafferty K, Wallis P, Green CJ. The efficacy of amino acid-based formulas in relieving the symptoms of cow's milk allergy: a systematic review. *Clin Exp Allergy* 2007;37(6):802-22.
  47. Hill D, Cameron D, Francis D, Gonzalez-Andaya A, Hosling C. Challenge confirmation of late-onset reactions to extensively hydrolyzed formulas in infants with multiple food protein intolerance. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96(3):386-94.
-

- 
48. Boissieu D, Dupont C. Allergy to extensively hydrolyzed cow's milk proteins in infants: safety and duration of amino acid-based formula. *J Pediatr* 2002;141(2):271-3.
49. Vanderhoof JA, Murray ND, Kaufman SS, Mack DR, Antonson DL, Corkins MR, et al. Intolerance to protein hydrolysate infant formulas: an underrecognized cause of gastrointestinal symptoms in infants. *J Pediatr* 1997;131(5):741-4.
50. Zeiger RS. Dietary aspects of food allergy prevention in infants and children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30 Suppl:S77-86.
51. Klemola T, Vanto T, Juntunen-Backman K, Kalimo K, Korpela R, Varjonen E. Allergy to soy formula and to extensively hydrolyzed whey formula in infants with cow's milk allergy: a prospective, randomized study with a follow-up to the age of 2 years. *J Pediatr* 2002;140:219-24.
52. Quillin S, Siegel M. Color doppler US of children with acute lower abdominal pain. *Radiographics* 1993;(13):1281-93.
53. Eidt J, Harward T, Cook J, Kahn M, Troillet R. Current status of duplex doppler ultrasound in the examination of the abdominal vasculature. *Am J Surg* 1990;160:604-9.
54. Siegel M, Carel C, Surratt S. Ultrasonography of acute abdominal pain in children. *JAMA* 1991;266(14):1987-9.
55. Dietrich CF, Jedrzejczyk M, Ignee A. Sonographic assessment of splanchnic arteries and the bowel wall. *Eur J Radiol* 2007;64(2):202-12.
-

- 
56. Scholbach T, Herrero I, Scholbach J. Dynamic color doppler sonography of intestinal wall in patients with crohn disease compared with healthy subjects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:524-8.
57. Spalinger J, Patriquin H, Miron MC, Marx G, Herzog D, Dubois J, et al. Doppler US in patients with crohn disease: vessel density in the diseased bowel reflects disease activity. *Radiology* 2000;217(3):787-91.
58. Ruess L, Blask AR, Bulas DI, Mohan P, Bader A, Latimer JS, et al. Inflammatory bowel disease in children and young adults: correlation of sonographic and clinical parameters during treatment. *AJR Am J Roentgenol* 2000;175(1):79-84.
59. Bousvaros A, Zurakowski D, Fishman SJ, Keough K, Law T, Sun C, et al. Serum basic fibroblast growth factor in pediatric Crohn's disease. Implications for wound healing. *Dig Dis Sci* 1997;42(2):378-86. *Dig Dis Sci*. 1997 Feb;42(2):378-86.
60. Siegel M, Friedland J, Hildebolt C. Bowel wall thickening in children: differentiation with US. *Radiology* 1997;203(3):631-5.
61. Quillin S, Siegel M. Gastrointestinal inflammation in children: color Dopler Ultrasonography. *J Ultrasound Mes* 1994;13:751-753.
62. Teefey SA, Roarke MC, Brink JA, Middleton WD, Balfe DM, Thyssen EP, et al. Bowel wall thickening: differentiation of inflammation from ischemia with color doppler and duplex US. *Radiology* 1996;198(2):547-51.
63. Arslan G, Gilja O, Lind R, Florvaag E, Berstad A. Response to intestinal provocation monitored by transabdominal ultrasound in patients with food hypersensitivity. *Scand J Gastroenterol* 2005(40):386-94.
-

64. Arslan G, Odegaard S, Elsayed S, Florvaag E, Berstad A. Food allergy and intolerance: response to intestinal provocation monitored by endosonography. *Eur J Ultrasound* 2002;15(1-2):29-36.
65. Kino M, Kojima T, Yamamoto A, Sasal M, Taniuchi S, Kobayashi Y. Bowel wall thickening in infants with food allergy. *Pediatr Radiol* 2002(32):31-3.
66. Patenaude Y, Bernard C, Schreiber R, Sinsky A. Cow's-milk-induced allergic colitis in an exclusively breast infant: diagnosed with ultrasound. *Pediatr Radiol* 2000(30):379-82.
67. Faingold R, Daneman A, Tomlinson G, Babyn P, Manson D, Mohanta A et al. Necrotizing enterocolitis: assessment of bowel viability with color doppler US. *Radiology* 2005;235:587-94.
-

---

## CAPÍTULO II

---



## **2 PACIENTES E MÉTODOS**

O estudo foi dividido em duas etapas, com delineamentos complementares:

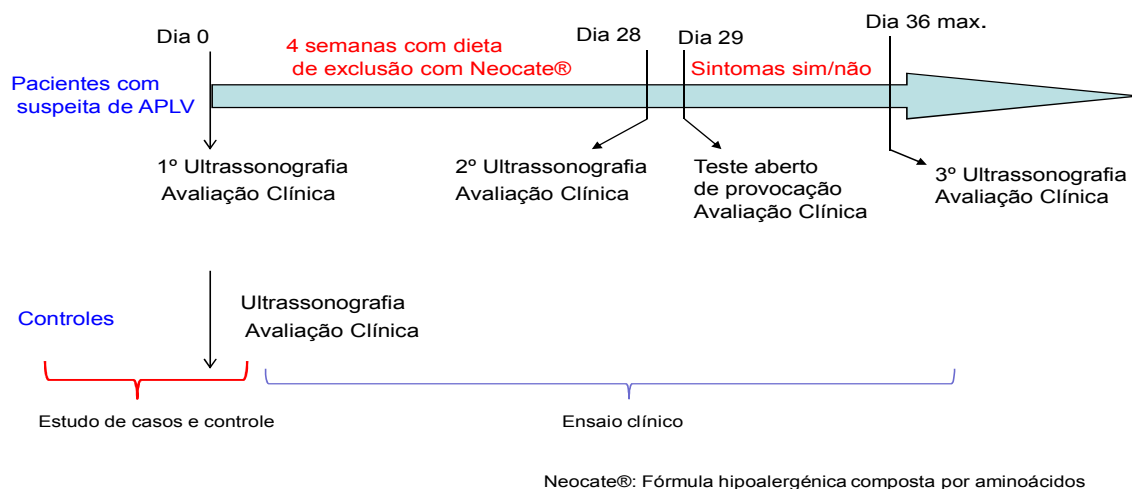
a) Etapa inicial: estudo de casos e controles, em que comparamos os achados ultrassonográficos, em um grupo de lactentes com suspeita de alergia ao leite de vaca e em um grupo de controles; b) Segunda etapa: ensaio clínico, que comparou os achados ultrassonográficos em lactentes com suspeita de APLV, nas diversas etapas do diagnóstico: no momento de suspeita inicial, no tratamento e após teste de desencadeamento.

Esse ensaio clínico avaliou, de forma prospectiva e consecutiva, os dados clínicos e os exames ultrassonográficos, em escala de cinza e ao Doppler em cores, de 34 crianças, constituindo dois grupos.

O grupo de estudo (GE) estava formado por 17 lactentes, entre 0 - 6 meses de vida, com suspeita clínica de APLV. Esses pacientes que foram encaminhados para o Serviço de Gastreenterologia Pediátrica, do Hospital São Lucas (HSL), de Porto Alegre, entre maio de 2006 e julho de 2009. No grupo controle (GC), 17 crianças assintomáticas, entre 0 - 6 meses de idade, que fizeram um controle mensal, no Serviço de Pediatria do HSL, no mesmo período.

As variáveis clínicas e ultrassonográficas foram avaliadas em três tempos, no GE, e em uma única vez, no GC, como mostra a Figura II-1.

---



**FIGURA 1-** Desenho do estudo.

## Pacientes

Os critérios de inclusão no GE foram: pacientes com suspeita diagnóstica de APLV, de acordo com as manifestações clínicas obtidas em anamnese e exame físico, realizados no ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do HSL; e estar em uso de fórmula baseada em leite de vaca. Os critérios de exclusão foram: aleitamento materno exclusivo; uso de outro tipo de alimentação complementar durante o estudo; uso de quaisquer medicações; pacientes com evolução clínica desfavorável, que precisem interromper o uso de dieta via oral; presença de patologia gastrointestinal de outra etiologia; nascido com idade gestacional menor de 36 semanas; percentil de peso menor que três ou maior que 97, conforme Organização Mundial da Saúde (OMS) (1). Nenhum dos pacientes, seja do GE ou do GC, poderia ter, no momento do estudo USG, outro quadro clínico associado,

que pudesse alterar a vasculatura intestinal, como, por exemplo, processo infeccioso de vias aéreas superiores ou outra comorbidade.

Foi aplicado uma entrevista estruturada, pelo pesquisador, para obter as seguintes informações: idade, ganho de peso nos últimos 30 dias, antecedentes neonatais, tempo de aleitamento materno e introdução na dieta do leite de vaca, antecedentes próprios e familiares de processos atópicos, como: broncoespasmo e /ou urticária/eczema. Em todas as consultas, foram registrados o peso e o comprimento.

Os sinais e sintomas observados, nas crianças do GE, foram registrados em forma dicotômica (Sim/Não): vômitos, diarréia, sangues nas fezes, irritabilidade, constipação e manifestações dermatológicas. Para definição dos sinais e sintomas, acima descritos, foram utilizados os conceitos aceitos na literatura, já que não existe nenhum questionário de aplicabilidade, validado para esta doença. Constipação: definido como retardo ou dificuldade nas evacuações, com fezes secas por duas ou mais semanas e suficiente para causar significativo desconforto ao paciente (2). Diarréia: evacuação de fezes líquidas e com maior frequência que o habitual. Foi empregada, também, a impressão subjetiva da mãe, que, conhecendo o ritmo intestinal do filho, informou sobre a presença ou ausência de diarréia, já que a OMS define o caso como a passagem de três ou mais evacuações frouxas ou líquidas, por dia (3-4). Urticária ou eczema atópico: lesões na pele de tipo “*rash*” máculo-papular e/ou eritrodermia difusa ou lesões pruriginosas secas, em placas eritematosas. Fezes com sangue. Vômitos: mais de três episódios diários, seguidos de desconforto. Irritabilidade: crianças que choram

---

mais de três horas por dia, durante e após as mamadas, com dificuldade para dormir e acordando várias vezes durante a noite, com choro intenso.

Todos os sintomas registrados tiveram uma relação temporal, entre a introdução do leite de vaca e a presença posterior de sintomas.

### **Exames ultrassonográficos**

Os exames ultrassonográficos foram realizados, utilizando-C12-3, com transdutores lineares (HD11 XE, *Philips Medical Systems, Seattle, WA*). Na escala de cinza, o estudo obteve, em milímetros, a espessura da parede de alça intestinal de jejuno, de íleo terminal e de todos os segmentos do cólon. A medida foi realizada, colocando um cursor na mucosa superficial e outro na serosa da parede da mesma alça.

Os exames ultrassonográficos foram realizados pelo mesmo examinador, sendo este um médico radiologista com vasta experiência, estando cegado sobre o grupo a que pertence o paciente.

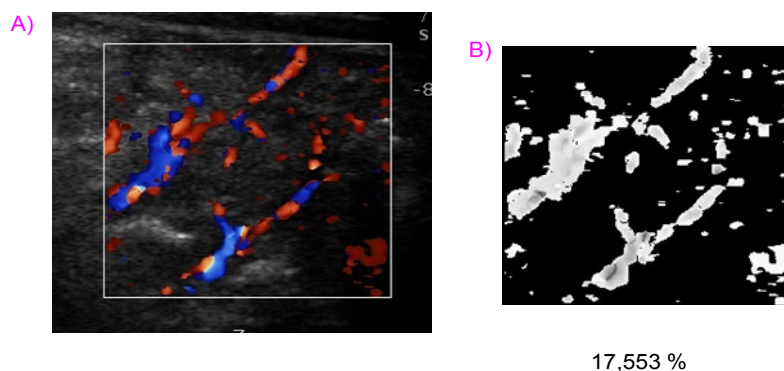
O estudo com Doppler em cores avaliou a quantidade de vasos mesentéricos, existentes em uma área de 4cm<sup>2</sup> (2 x 2cm). Foram estudadas cinco regiões no hemiabdomo direito e cinco no hemiabdomo esquerdo, com o objetivo de examinar as regiões de íleo e jejuno, obtendo 10 imagens. Toda a área colorida era considerada vaso. A densidade vascular desta superfície era avaliada através de um *software* de imagens (descrição a seguir), que determinou a porcentagem de superfície colorida, em cada uma das imagens.

---

O ganho do Doppler em cores foi ajustado de tal forma que desaparecessem as cores relacionadas aos artefatos e permanecessem os sinais relativos aos vasos. Foi considerado vaso o sinal pulsátil (artéria) ou contínuo (veia), persistente em um determinado ponto. O equipamento foi ajustado para detectar fluxos sanguíneos de baixas velocidades, com padronização da velocidade a 8cm/s, utilização de baixo filtro de parede. No sentido de evitarmos os artefatos, não foram obtidas imagens durante a presença de alguma movimentação do paciente ou peristaltismo de alça(s) intestinal (ais).

Foi solicitado que todos os lactentes estivessem com três horas de jejum. Os pacientes foram examinados, inicialmente, em decúbito dorsal, utilizando-se uma abordagem pelo flanco abdominal esquerdo e direito, ou através de uma abordagem abdominal anterior, com a tentativa de evitar alças com conteúdo gasoso. Procurou-se estudar áreas que apresentassem alças intestinais sem conteúdo líquido, sólido e/ou gasoso. Caso isto não fosse possível, o exame era postergado por 30 a 60 minutos, para se obter um melhor esvaziamento de alças intestinais. Alguns lactentes apresentaram excessiva distensão gasosa intestinal, mesmo com jejum maior. Nestes casos, a criança era posicionada em decúbito lateral direito ou esquerdo, por aproximadamente cinco minutos para ocorrer deslocamento gasoso superior e a região mais pendente era então estudada. Nos lactentes que se apresentavam muito irritados e com choro durante o exame, utilizou-se a técnica de colocar o dedo para a criança mamar, ou então, se instilou pequeno volume de água via oral para que não houvesse distensão de alças intestinais.

Depois da digitalização das imagens, obtidas a partir do exame USG, em formato “*Tagged Image File Format*” (TIFF), foi utilizado um programa público para análise assistida por computador de imagens, chamado *ImageJ* (*National Institutes of Health*). Este *software*, disponível para *download* gratuito, em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>, pode quantificar, em percentual, a vascularização da amostra tecidual examinada, contida no interior da área de 4 cm quadrados, previamente descrita. Com esta técnica, foi possível identificar o percentual de área colorida em cada imagem obtida. Como nas imagens obtidas, a imagem colorida correspondia a vasos sanguíneos (cor pulsátil ou contínua em determinado *pixel*), foi possível determinar a área vascularizada, em cada imagem, obtendo um valor de 0 a 100%. A esse percentual de vasos que ocupa a imagem, denominamos “porcentagem de densidade vascular” (Figura 2).



**FIGURA 2** - Mostrando a aplicação do *software*, para calcular a percentagem de densidade vascular. a) Imagem em Doppler em cores de alças de jejuno, demonstrando a densidade vascular neste *roi* selecionado de 4 cm<sup>2</sup>. b) Imagem obtida com Doppler em cores e analisada pelo *software ImageJ*<sup>TM</sup>, demonstrando a percentagem de densidade vascular.

**Métodos**

Os pacientes do GE, após os estudos ultrassonográficos e depois de completada a entrevista estruturada e exame clínico, foram orientados a receber, exclusivamente, uma fórmula de aminoácidos (Neocate®), durante quatro semanas (Figura 1). As mães cujos filhos eram pacientes com suspeita de APLV, que estivessem em uso de fórmulas baseadas em leite de vaca e também de aleitamento materno em forma mista, foram orientadas a realizar uma dieta isenta de proteína do leite de vaca, com suplementação de cálcio, conforme últimas recomendações internacionais (5). A fórmula láctea escolhida, para ser administrada a estes pacientes durante quatro semanas, nos assegura uma completa remissão dos sintomas, caso seja realmente um paciente com APLV.

Após completar quatro semanas com essa fórmula, baseada em aminoácidos, os pacientes do GE realizaram nova avaliação, no ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do HSL. Nesse momento, novamente foi realizada a entrevista estruturada, exame clínico e um exame USG em escala de cinza e com Doppler em cores. Os dados clínicos sobre sintomas foram, mais uma vez, registrados de forma dicotômica, com exceção para a irritabilidade. Neste quesito, a mãe foi questionada se seu filho tinha melhorado muito, pouco, nada ou tinha piorado.

Os pacientes do GE, após realizarem o segundo exame USG, foram submetidos a desencadeamento aberto, conforme últimas orientações internacionais, sugeridas por grupo de expertos (5).

Tanto os pais quanto o médico tinham conhecimento que o lactente seria exposto à proteína do leite de vaca e que isso ocorria sob supervisão médica, em

---

ambiente hospitalar. O início do teste foi feito sob supervisão médica, no Setor de Endoscopia do HSL, onde o paciente permaneceu quatro horas em observação.

Neste desencadeamento, após um exame físico do lactente, com inspeção da pele, o médico umedeceu uma gaze com uma fórmula láctea modificada, derivada do leite de vaca, e a encostou na pele do paciente, para verificar se ocorria uma reação imediata cutânea eritematosa, pelo contato. Após 20 minutos, o mesmo procedimento foi feito na mucosa oral, com o objetivo de verificar se aparecia edema labial. Se o paciente permanecesse assintomático, a seguir era oferecido um volume de leite, pela boca, e aumentando progressivamente (1, 5, 10, 20, 50, a 100 ml), a cada 30 minutos. Caso o paciente permanecesse assintomático por três horas, sem lesões cutâneas, vômitos, diarreia ou manifestações respiratórias, o teste de desencadeamento era continuado no domicílio do paciente. Nestes casos, os volumes de fórmula láctea eram aumentados, progressivamente, até atingir a quantidade normalmente consumida, pelo menos 250 ml, a cada dia.

Novo exame USG, controle clínico e preenchimento da entrevista estruturada com os mesmos critérios de avaliação, descritos acima, foram realizados imediatamente após o paciente ter apresentado sinais ou sintomas que confirmaram o diagnóstico de APLV, ou em uma semana após o início do teste de desencadeamento oral, mesmo sem nenhum achado clínico que confirmasse o diagnóstico.

O padrão diagnóstico reconhecido, para pacientes com suspeita de APLV, inclui uma dieta de exclusão, com plena resolução clínica, e reaparecimento dos sinais e sintomas, após teste de desencadeamento. Assim, os pacientes que

---



apresentaram teste de desencadeamento positivo, por referir qualquer sintoma sugestivo da doença, após reintrodução da fórmula contendo leite de vaca, foram considerados portadores de APLV.

Os exames ultrassonográficos não apresentam nenhum risco para o paciente. A dieta de exclusão e o teste de desencadeamento são o padrão-ouro para diagnóstico de APLV e já são realizados há bastante tempo, na rotina do serviço de Gastreenterologia Pediátrica do HSL.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em abril de 2006. Todos os pais ou responsáveis assinaram o termo de consentimento. Foi obtido um patrocínio para o estudo da Nutricia Advanced Medical Nutrition - DANONE fornecendo as fórmulas de aminoácidos (Neocate).

### **Análise estatística**

Os resultados foram analisados, através do programa *SPSS*, versão 13.0, utilizando o teste *t* de *student* para as médias, na comparação de variáveis contínuas, com distribuição simétrica entre os grupos. Em caso de assimetria, o teste de *Mann-Whitney* foi aplicado. *Pearson's chi-square or Fisher's exact test* foram utilizados para as variáveis categóricas. A Análise de Variância (ANOVA), para medidas repetidas, foi utilizada para comparar as médias das variáveis ultrassonográficas nas três ecografias. Para complementar essa análise, o teste de Bonferroni foi aplicado.

Foram determinados pontos de corte, para o percentual de densidade vascular através da análise dos quartis, com o auxílio do *Likel-hood Ratio*.

---

Também foi avaliado um ponto de corte, a partir da curva *Receiver Operator Characteristic* (ROC). A análise da sensibilidade, especificidade e valores preditivo positivo e negativos auxiliou na determinação do melhor ponto de corte. Também foi calculada a área sob a curva, com o respectivo intervalo de 95% de confiança. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

Foi calculado o tamanho de amostra, utilizou-se a variável espessura da submucosa do jejuno. O único estudo similar, na literatura, avalia crianças normais e com alergia alimentar (ovo e leite), que apresentavam também dermatite atópica (6). Obtiveram o valor, em média, de 1,3 mm, com desvio padrão (DP) de 0,2 para os controles e o valor de 3,8 mm DP 0,9 mm em relação aos doentes. Para obter um valor de significância de 0,05, precisamos de um  $N = 16$ . Não encontramos na literatura, entretanto, nos estudos com dados sobre pacientes com APLV mais que um relato de caso, sem descrição de valores de espessura (7). Também não encontramos dados em valores quantitativos, em relação à densidade vascular, nestes pacientes ou em pacientes-controle, utilizando a ultrassonografia com Doppler em cores.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. World Health Organization. The WHO child growth standards. [acesso em 2007 jan 10]. Disponível em: [www.who.int/childgrowth/en/](http://www.who.int/childgrowth/en/).
  2. Constipation Guideline Committee of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Evaluation and treatment of constipation in infants and children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43(3):e1-13.
  3. World Health Organization. Persistent diarrhoea in children in developing countries: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1988;66:709-17.
  4. King CK, Glass R, Bresee JS, Duggan C. Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. *MMWR Recomm Rep* 2003;52(RR-16):1-16.
  5. Vandenplas Y, Koletzko S, Isolauri E, Hill D, Oranje A, Brueton M, et al. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child* 2007;92(10):902-8.
  6. Kino M, Kojima T, Yamamoto A, Sasal M, Taniuchi S, Kobayashi Y. Bowel wall thickening in infants with food allergy. *Pediatr Radiol* 2002;32(1):31-3.
  7. Patenaude Y, Bernard C, Schreiber R, Sinsky AB. Cow's-milk-induced allergic colitis in an exclusively breast-fed infant: diagnosed with ultrasound. *Pediatr Radiol* 2000;30(6):379-82.
-

---

## CAPÍTULO III

---

**3 ARTIGO ORIGINAL**

Artigo submetido a ***Pediatrics***, no 21 de Janeiro de 2010.

---

## Grey Scale and Color Doppler Ultrasound Findings in Infants With Cow's Milk Allergy

**AUTHORS:** Matias Epifanio, MD,<sup>a</sup>  
Ricardo Soder, MD,<sup>b</sup> José Spolidoro, MD,<sup>c</sup>  
Matteo Baldisserotto, MD, PhD<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Division of Pediatric Gastroenterology of the São Lucas Hospital; <sup>b</sup>Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, São Lucas Hospital, Radiology Department; <sup>c</sup>Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Division of Pediatric Gastroenterology of the São Lucas Hospital; <sup>d</sup>Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, São Lucas Hospital, Radiology Department

### KEY WORDS

cow's milk, food allergy, ultrasonography, infant

Address correspondence to  
Matias Epifanio, MD  
Rua 1 de Janeiro 150 ap 1805 B,  
90470-320, Porto Alegre, Brazil.  
Phone: +55 51 99996248,  
Fax: +55 51 33282593,  
E-mail: mepifanio@hotmail.com.

### abstract

**INTRODUCTION:** Cow's milk allergy (CMA) is a common pediatric clinical problem with a variability of clinical signs, symptoms and it's hard to diagnose. Gray scale and color Doppler ultrasonography have been increasingly used to evaluate abdominal disorders and intestinal inflammation.

**METHODS:** This study evaluated clinical findings and gray scale and color Doppler sonograms of 34 infants. Seventeen infants aged 0 to 6 months with a suspicion of CMA and 17 non-symptomatic infants were evaluated by a blinded investigator who determined the percentage of vessel density and the thickness of different parts of the bowel. Clinical and ultrasonographic variables were evaluated at three time points: at presentation, after 4 weeks of amino acid-based formula feeding, and after challenge test. Likelihood ratio and ROC curve were used to define a cut-off point for percentage of vascular density.

**RESULTS:** The difference in percentage of vessel density between patients with CMA (28.1%) and control infants (7.77%) was statistically significant. ROC analysis showed that a cutoff point of 18.7% could differentiate between patients with CMA and control infants with 81.8 % sensitivity and 94.1% specificity. Positive and negative predictive values were greater than 88%. Area under the curve was 0.941. Likelihood ratio of 10.8, when using a cut-off 20%. Difference in bowel wall thickness between the two groups was very little.

**CONCLUSION:** Color Doppler may be used when CMA is suspected. We suggest a cut-off point of 18.7% for percentage of vessel density. The use of the thickness of the intestinal wall presents difficult applicability.

Cow's milk allergy (CMA) is a common pediatric clinical problem, with a frequency of 2.5% to 7.5% in the general population (1-2). The prevalence of allergic diseases, including food allergies, has increased over the last decades (3). In the etiopathogenesis of CMA, early exposure of the immature infantile intestine to cow's milk protein triggers an immunological response and consequent intestinal inflammation of variable intensity (4-5), either immunoglobulin E mediated or non-immunoglobulin E mediated (6-7). Patients with CMA may present with several gastrointestinal disorders: chronic diarrhea and malabsorption, gastroesophageal reflux, constipation, vomiting, insufficient weight gain, anemia and low digestive tract hemorrhage (8-9). However, symptoms are often unspecific: irritability, colic, intense crying and refusal to eat (10). The variability of clinical signs and symptoms and the lack of conclusive laboratory tests or specific histological changes in the intestinal mucosa make CMA difficult to diagnose (11). Several medical specialization guidelines describe and prescribe the use of an exclusion diet; symptoms improve in cases

suggestive of CMA, and the allergy is confirmed using a challenge test a few weeks after clinical improvement (12-13).

In Pediatrics, gray scale and color Doppler ultrasonography (US) have been increasingly used to evaluate acute and chronic abdominal vascular disorders and intestinal inflammation (14-15-16). Inflammatory and infectious intestinal diseases cause a thickening of the intestinal wall that can be detected using gray scale US (17-18). Color Doppler US detects increases in vessel density in the intestinal wall when there is active inflammation (19-20). These imaging modalities have not been used to examine children with CMA. This study evaluated whether gray scale and color Doppler US detect intestinal inflammation caused by CMA and whether these tests should, therefore, be used as diagnostic tools for CMA.

## METHODS

This study was divided into two phases with complementary designs: (a) first phase - comparison of US findings in a group of infants with signs and symptoms suggestive of CMA and in a control group; (b) second phase: clinical trial that

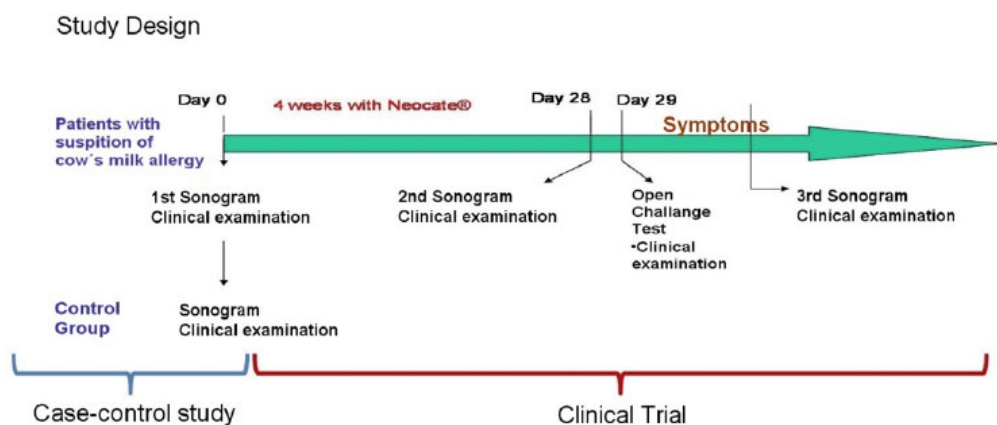
compared US findings in infants with signs and symptoms suggestive of CMA at the three diagnostic time points (presentation, treatment, and after challenge test).

This prospective study evaluated clinical data and gray scale and color Doppler US findings of 34 consecutive children divided into two groups. The study was approved by our Institutional Review Board on April 2006. Parents or guardians signed informed consent forms.

The study group (SG) comprised 17 infants aged 0-6 months, who presented with signs and symptoms of CMA and were referred to the division of Pediatric Gastroenterology of the São Lucas Hospital (HSL) between May 2006 and July 2009. The control group (CG) enrolled 17 non-symptomatic infants aged 0 - 6 months who were seen for a monthly pediatric follow-up visit at the Pediatrics Service of HSL during the same time period.

Clinical and ultrasound variables were evaluated at three time points in the SG and only once in the CG group (Figure 1).

SG inclusion criteria were: patients suspected of having CMA according to physical exam and history obtained during visit to the Pedi-



**FIGURE 1**  
Study design

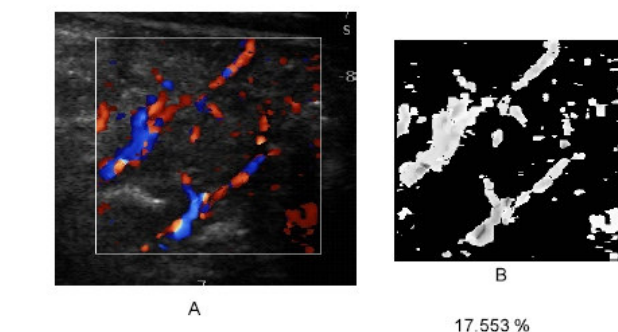
atric Gastroenterology Outpatient Service; patients receiving cow's milk formula (CMF). Exclusion criteria were: exclusive breastfeeding; use of other type of complementary diet during the study time; use of any medication; another gastrointestinal pathology; birth at < 36 weeks; weight below 3rd or above 97th percentile according to the World Health Organization (WHO) charts (21).

A clinical questionnaire was applied always by the same investigator, and the following data were collected: age, weight gain in the last 30 days, duration of breastfeeding and introduction of CMF in the infant's diet.

Data collected for the SG infants were recorded as dichotomous variables (Yes/No): vomiting, diarrhea, blood in stools, irritability, constipation, and skin lesions. No questionnaire has been validated for CMA; therefore, signs and symptoms were defined according to the literature: constipation - delay or difficulty to evacuate, dry stools for two or more weeks and substantial patient discomfort (22); diarrhea; three or more loose or watery stools per day (23); atopic urticaria or eczema - maculopapular rash and/or diffuse erythema; blood in stools; vomiting - more than 3 episodes per day, followed by discomfort; irritability - crying more than 3 hours per day, during and after feeding with difficulty to sleep; and awakening several times during the night with intense crying.

All the symptoms were associated with the time when CMF was introduced and the later development of symptoms.

US examination was performed using C12-3 linear transducers (HD11 XE, Philips Medical Systems, Bothell, WA). The gray scale study measured the thickness of the wall of bowel



**FIGURE 2**

Use of software to calculate vessel density. (A) shows color Doppler sonogram of jejunal loops and vessel density in the selected 4 cm<sup>2</sup> roi; (B) figure analyzed using the ImageJ™ software shows percentage of vessel density.

loops in the jejunum, terminal ileum and all colon segments. Measurements were made by placing one pointer at the mucosal layer and the other at the serosa in the same loop. US exams were performed by the same examiner, a very experienced radiologist blinded to which group the patient belonged.

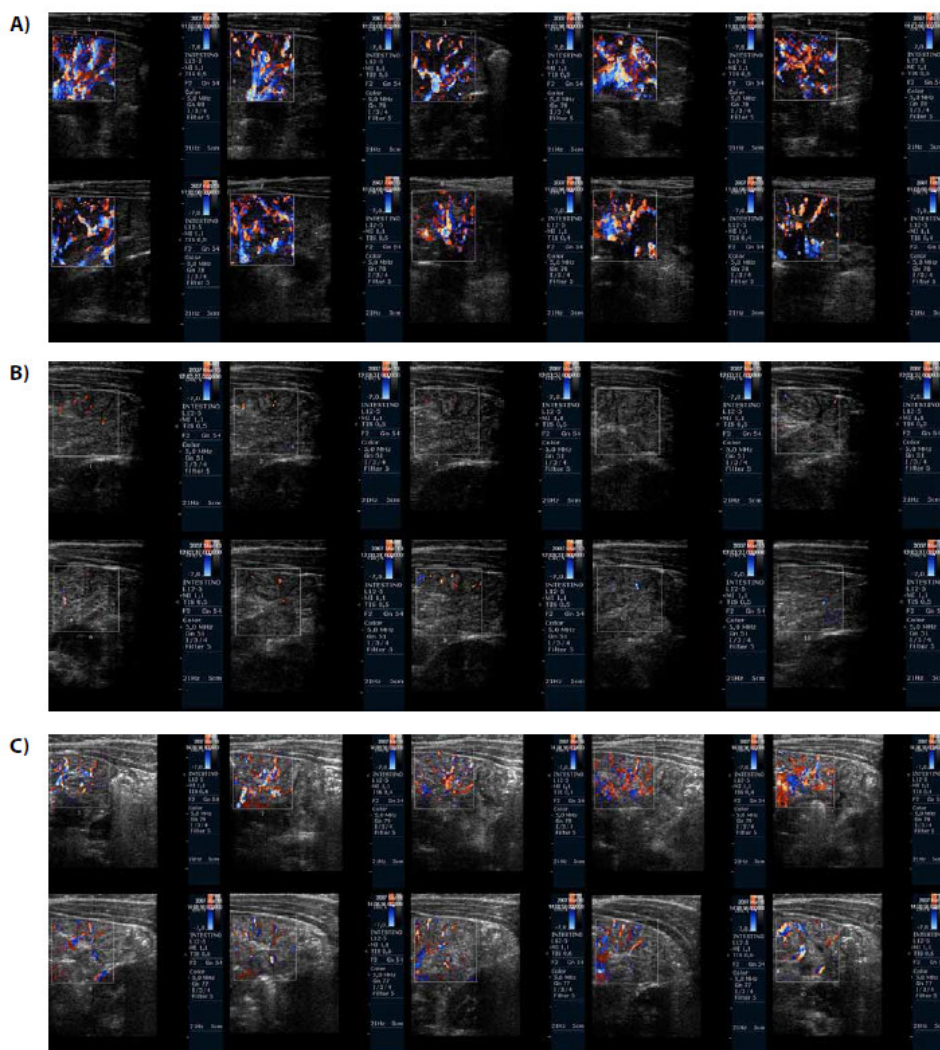
The color Doppler test evaluated the quantity of peripheral mesenteric vessels in a 4 cm<sup>2</sup> area (2 x 2 cm). To examine the ileal and jejunal regions, five areas were examined in the right and 5 in the left side of the abdomen. All colored areas were classified as vessels. Vessel density in the surface was evaluated using an image software (described below), which determined the percentage of colored areas in each image and the mean value.

Color Doppler gain was adjusted to eliminate the color artifacts but to retain vessel signals. Vessels were recorded as the pulsating (artery) or continuous (vein) signal that persisted in a certain area. The US unit was adjusted to detect low velocity blood flows, and velocity was standardized at 8 cm/s by using a low wall filter. To avoid artifacts, images were not obtained during patient movements or bowel loop peristalsis. No patient in either group had, at

the time of US examination, any other associated clinical condition that might affect intestinal vessels. The infants fasted for 3 hours before US exams. The patients were first examined while lying down on their back, and the exam was performed using a left and right flank approach or an anterior abdominal approach to avoid loops with gas contents. We tried to examine areas in which the bowel loops had no liquid, solid or gas contents. If that was not possible, the exam was postponed 30 to 60 minutes to ensure that bowel loops were emptied.

After the ultrasound images were saved, public domain software (ImageJ™; National Institutes of Health) was used for computer-assisted analysis. This software, available for free download at [rsb.info.nih.gov/ij/index.html](http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html), can provide the percentage of vessel density in the tissue sample under exam, the 4 cm<sup>2</sup> area described above, and calculate the percentage of colored area on each image. As the color image corresponded to blood vessels (pulsatile or continuous color in a certain pixel) in the images obtained, the vascularized area could be determined in each image, and a value from 0% to 100% was obtained. This number was called per-





**FIGURE 3**

Infant of 6 weeks of age with suspected CMA. Symptoms of irritability, vomiting, severe food refusal and poor weight gain

A) Doppler ultrasonography realized before treatment showing vascularity of 10 different regions

B) Doppler ultrasonography after 4 weeks of AAF, total improvement of symptoms.

C) Doppler ultrasonography with important vascularization 48-72 h after provocation test. Symptoms of vomiting, food refusal and intense irritability.

centage of vessel density (Figure 2). When US exams, questionnaire, and physical exams were completed, the guardians of SG patients received instructions to feed the infants only with an amino acid-based formula (AAF) (Neocate®) for 4 weeks (Figure 1).

After 4 weeks receiving AAF, SG pa-

tients underwent another evaluation in the Pediatric Gastroenterology Outpatient Service using the questionnaire, clinical exam, and a second gray scale and color Doppler US scans.

After US exams, SG patients underwent an open challenge according to guidelines (12). Parents and pedi-

atrician were aware that the infants would be exposed to cow's milk protein under medical supervision in a hospital. After a physical examination of the undressed infant, including skin examination, a drop of CMF was placed on the infant's lips. If no reaction occurred after 15 min, CMF was given orally, and the dose

was increased stepwise (1, 5, 10, 20, 50 to 100 ml) every 30 min. Thereafter, the infant was observed for 3 h and examined for skin or respiratory reactions before going home. If no reaction occurred, parents were told to give the infant at least 250 ml of CMF each day for the next week and observe the child for late reactions.

Another US exam, clinical control, and questionnaire were completed according to the same evaluation criteria described above when the patient had signs or symptoms that confirmed CMA, or a week after the oral challenge test, even when there was no clinical confirmation.

Figure 3 shows 30 images corresponding to three sample points of an infant suspected of having CMA. We see the increased vascularity at the beginning (A), improved after 4 weeks using the AAF (B) and an increase in the number of vessels, after re-exposure to cow's milk (C). The SPSS 13.0 software was used for statistical analyses. The Student t test was used to compare symmetrically distributed continuous variables between groups, and the Mann-Whitney test, for asymmetrical distributions. The Pearson chi-square or Fisher exact test was used for categorical variables. Repeated measures ANOVA, followed by the Bonferroni test, was used to compare means of US variables in the three scans.

A cut-off point was defined for the percentage of vessel density according to quartiles and the likelihood ratio (LR).

The cut-off point was also assessed using the ROC curve. Sensitivity, specificity and positive (PPV) and negative predictive (NPV) values were used as aids in the calculation of the best cut-off point. The area under the curve (AUC) was also calculated together with 95%

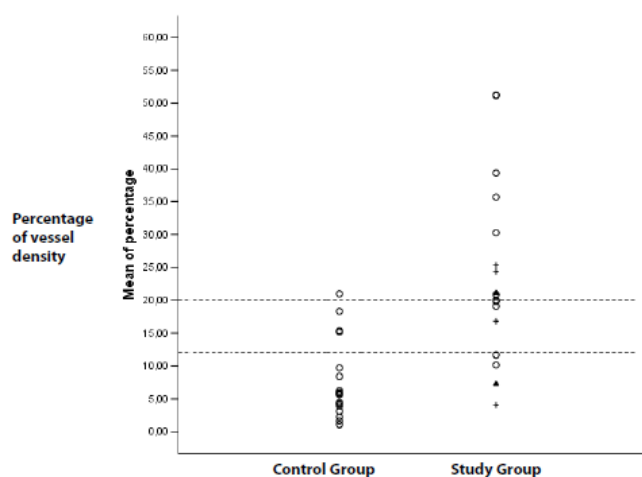


FIGURE 4

Mean of the 10 Images as percentage for each patients. Dotted lines show the cut-off points according to 50th and 75th percentiles; o, case confirmed; +, cases not confirmed; ▲, patients that dropped out follow-up before second US exam; †=p<0.05.

TABLE 1 Patient characteristics. Quantitative variables are expressed as mean  $\pm$  standard deviation or median (percentiles 25 - 75). Qualitative variables are described by n (%).

| Variables                                  | Group                   |                    | p      |
|--|-------------------------|--------------------|--------|
|  | Suspected CMA<br>(n=17) | Controls<br>(n=17) |        |
| Age (months)                               | 3.64 $\pm$ 1.23         | 3.80 $\pm$ 1.62    | 0.743  |
| Male sex                                   | 7 (41.2)                | 11 (64.7)          | 0.303  |
| Allergy                                    | 4 (23.5)                | 2 (11.8)           | 0.656  |
| Weight (kg)                                | 5.82 $\pm$ 1.25         | 6.34 $\pm$ 1.25    | 0.233  |
| Length (cm)                                | 59.9 $\pm$ 4.49         | 61.4 $\pm$ 5.42    | 0.377  |
| Weight gain in previous month (kg)         | 0.52 $\pm$ 0.24         | 0.74 $\pm$ 0.16    | 0.003  |
| Breastfeeding duration (months)            | 1.0 (0.3 - 1.0)         | 2.1 (1.0 - 3.8)    | 0.004  |
| Age at introduction of cow's milk (months) | 0.3 (0.1 - 1.0)         | 1.0 (0.8 - 2.0)    | 0.049  |
| Constipation:                              | 3 (17.6)                | 0 (0.0)            | 0.227  |
| Diarrhea:                                  | 6 (35.3)                | 0 (0.0)            | 0.018  |
| Urticaria/eczema                           | 3 (17.6)                | 0 (0.0)            | 0.227  |
| Irritability:                              | 17 (100.0)              | 0 (0.0)            | <0.001 |
| Vomiting:                                  | 12 (70.6)               | 0 (0.0)            | <0.001 |
| Blood in feces                             | 6 (35.3)                | 0 (0.0)            | 0.018  |

TABLE 2 Likelihood ratio to confirm diagnosis according to percentage of image area with blood vessels.

| Percentage of vessel density | CMA<br>(n=11) | Controls<br>(n=17) | LR:   | PPV<br>(%) | NPV<br>(%) |
|------------------------------|---------------|--------------------|-------|------------|------------|
|                              | n (%)         | n (%)              |       |            |            |
| 0 - 12                       | 2 (18.2)      | 13 (76.5)          | 0.24  | -          | 86.7       |
| 12 - 20                      | 2 (18.2)      | 3 (17.6)           | 1.03  | -          | -          |
| > 20                         | 7 (63.6)      | 1 (5.9)            | 10.8* | 87.5       | -          |

LR: likelihood ratio.\* P<0.001 for the group with percentage from 0 to 12%.

confidence intervals (95% CI). The level of significance was set at 5% ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS

Thirty four patients were enrolled in the study. Both groups were similar at baseline, with no significant differences in median age, sex, weight, length (Table 1). Patients in the SG had a lower weight gain in the previous month than patients in the CG ( $p = 0.003$ ). The infants in the SG had a shorter breastfeeding duration and earlier introduction of CMF ( $p = 0.004$ ).

Irritability (100%) and vomiting (70%) were the most frequent symptoms in the SG (Table 1).

Two of the 17 patients in the SG underwent only the first US test. One patient refused the challenge test and the other was not brought back to continue follow-up.

Figure 4 shows the percentage of mean vessel density for each patient in both groups at baseline. Mean percentage of vessel density in the SG was greater than in the CG (24.01,  $SD = 13.7$ ; 7.77,  $SD = 6.07$ ;  $p < 0.05$ ).

Of the 15 patients in the SG that completed the study and underwent three US exams, 11 had CMA confirmed by the challenge test.

The cut-off points for percentage of vessel density according to the 50th and 75th percentiles in this

study were: 12% to rule out CMA, with LR of 0.24 for possibility of CMA diagnosis and NPV of 86.7%; and 20% to confirm CMA, with LR of 10.8 and PPV of 87.5% (Table 2 and Figure 4).

There was no association between signs or symptoms and higher percentages of vessel density in patients with a confirmed diagnosis of CMA. The progression of clinical signs and symptoms is described in Table 3. Weight gain of the 11 patients with a confirmed diagnosis of CMA between the first and the second study time points and who received AAF for 4 weeks was greater (0.88 kg,  $SD = 0.33$ ) than the weight gain in the month before the first visit (0.53 kg,  $SD = 0.28$ ;  $p = 0.036$ ).

The percentage of vessel density for patients with a confirmed diagnosis of CMA and control patients was significantly different ( $28.1 \pm 14.5$  vs.  $7.77 \pm 6.07$ ;  $p = 0.001$ ) (Table 4); its progression for patients with a confirmed diagnosis of CMA is described in Figure 5.

The thickness of the intestinal segments in the CG and at the three time points in the SG is shown in Table 4. The comparison of intestinal wall thickness between CG and patients with CMA indicated that it was greater among the latter. However, in the second and third scans, only the jejunal and ileal segments showed the same difference (Table 4).

ROC analysis was used to define the optimal cut-off point for percentage of vessel density, and revealed that a cut-off point of 18.7% could differentiate between patients' probability to have CMA and control patients; sensitivity was 81.8%, specificity, 94.1%, and PPV and NPV, 90.0% and 88.9%. AUC was 0.941 (95% CI, 0.860–1.000) (Figure 6).

## DISCUSSION

This study used gray scale and color Doppler ultrasonography to diagnose CMA. The percentage of mesenteric vessel density according to color Doppler scans of patients with signs and symptoms suggestive of CMA was significantly greater than in normal infants, and the value increased when only the patients with a diagnosis confirmed by the challenge test were included in the analysis.

**TABLE 3** Progression of clinical symptoms.

| Variables        | Confirmed cases (11) |        |        |
|------------------|----------------------|--------|--------|
|                  | 1st US               | 2nd US | 3rd US |
| Clinical         | n                    | n      | n      |
| Constipation     | 3                    | 0      | 0      |
| Diarrhea         | 3                    | 0      | 8      |
| Urticaria/eczema | 3                    | 0      | 3†     |
| Irritability     | 11                   | 0      | 6      |
| Vomiting         | 6                    | 0      | 5      |
| Blood in feces   | 4                    | 0      | 0      |

†: Only one patient examined at the first time point had urticaria/eczema again.

**TABLE 4** Ultrasonography findings.

| Variables                  | Controls    | Confirmed cases |              |                | P <sub>group*</sub> | P <sub>US**</sub> |
|----------------------------|-------------|-----------------|--------------|----------------|---------------------|-------------------|
|                            |             | Confirmed cases |              |                |                     |                   |
|                            |             | 1st US          | 2nd US       | 3rd US         |                     |                   |
|                            | Mean ± SD   | Mean ± SD       | Mean ± SD    | Mean ± SD      |                     |                   |
| Vessel density (%)         | 7.77 ± 6.07 | 28.1 ± 14.5b    | 12.7 ± 9.3a  | 16.5 ± 6.2a    | 0.001               | 0.005             |
| Thickness left colon (mm)  | 1.18 ± 0.38 | 1.99 ± 1.17     | 1.33 ± 0.40  | 1.72 ± 0.77    | 0.049               | 0.123             |
| Thickness right colon (mm) | 1.05 ± 0.10 | 1.55 ± 0.52     | 1.15 ± 0.33  | 1.35 ± 0.48    | 0.011               | 0.117             |
| Thickness ileum (mm)       | 1.86 ± 0.52 | 2.28 ± 0.44b    | 1.77 ± 0.69a | 2.10 ± 0.46a,b | 0.038               | 0.006             |
| Thickness jejunum (mm)     | 1.29 ± 0.28 | 1.72 ± 0.57b    | 1.15 ± 0.46a | 1.52 ± 0.46a,b | 0.037               | 0.004             |

\* comparison of control group with confirmed cases in 1st US using the Student t test.

\*\* comparison of three US exams of confirmed cases using repeated measures ANOVA.

a,b Equal letters indicate no difference according to Bonferroni test.

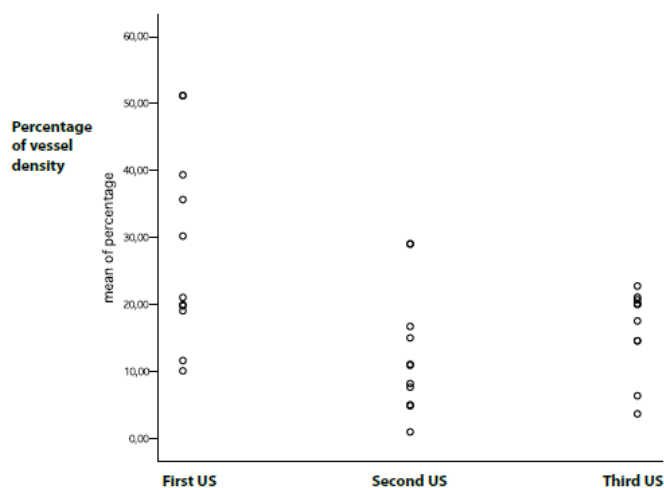
Moreover, the value of vessel density from the second (after 4 weeks of exclusion diet) to the third (after the challenge test) US exam in patients with a confirmed diagnosis of CMA increased from 12.7% to 16.5%, but this increase was not statistically significant. This may be assigned to the fact that the US exam was conducted immediately after symptoms appeared. As it was an open test, the parents were asked to report on the appearance of any symptom, and it would not be ethical to keep cow's milk feeding only to reach a more significant increase of inflammation in the digestive tract.

The cut-off percentages for vessel density were below 12% and above 20%, which matched the 50th and 75th percentiles in the sample. These values also show LR of 0.24 and 10.8 to rule out or confirm the diagnosis of CMA.

The power of percentage of vessel density as a test to diagnose CMA was assessed using the area under the ROC curve. The percentage of vessel density was a significant predictor of CMA, as the area under the ROC curve was 0.94. Sensitivity, specificity, PPV and NPV were above 88%.

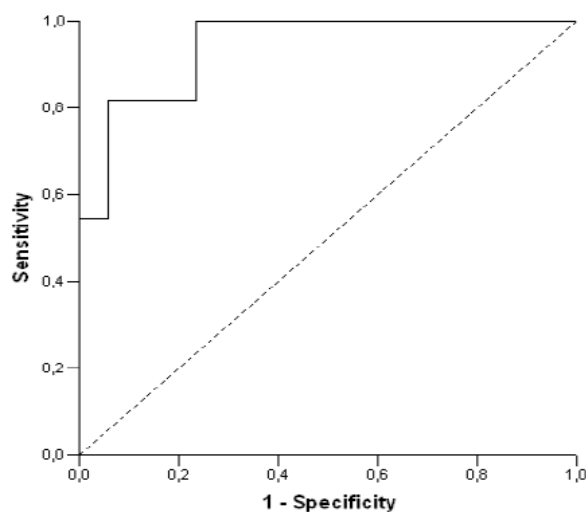
US findings, particularly vessel density, seem to be associated with inflammatory changes in the intestinal wall (15-19-24). The physiopathologic mechanism of CMA in infants is usually associated with intestinal inflammation (25), and US may, therefore, detect these changes. When associated with clinical parameters, US may be useful to suggest the diagnostic hypothesis of CMA.

Color Doppler may detect an increase in intestinal vessels in other intestinal inflammatory diseases. Our results showed that similar results may also be found in infants



**FIGURE 5**

Mean values of three color Doppler sonograms only for 11 patients with confirmed CMA. The values of the first sonogram were greater than the values of the second ( $p=0.003$ ) and the third ( $p=0.024$ ) sonograms; values for the second and third sonograms did not differ from each other ( $p=0.519$ ).



**FIGURE 6**

Sensitivity and specificity of percentage of vessel density for the disease according to ROC curve. Area under the curve: 0.941; 95%CI: 0.860 – 1.000; Cut-off point: 18.7%; Sensitivity=81.8%; Specificity=94.1%; PPV=90.0%; NPV=88.9%

with CMA. This increase in vessel density may be used as a noninvasive tool to help to establish a diagnosis and follow up infants suspected of having CMA.

As expected, patients with signs and symptoms suggestive of CMA had a lower weight gain than normal patients, as well as a shorter duration of breastfeeding and ear-

lier introduction of CMF. The most frequent symptoms were irritability (100%) and vomiting (70%). Symptoms are unspecific, and the diagnosis, therefore, is difficult. Moreover, these symptoms are common at this age in association with gastroesophageal reflux and infantile colic. We used an AAF (Neocate®) because it was completely free of allergens and would ensure a safer response to the exclusion diet (26-27-28). According to data in the literature, the oral challenge test confirms the diagnosis, but does not rule it out because tolerance to the allergenic protein could be early (29-30). Therefore, tolerance may have developed during the 4 weeks of the exclusion diet. Two of the 4 patients that might have CMA had highly suggestive symptoms, such as blood in stools and diarrhea, which improved with the use of the AAF. Vessel density was above the cut-off point for these two infants, and they probably developed tolerance during the time when they received the exclusion diet.

The intestinal wall thickness measured using gray-scale US was significantly different between control patients and patients with CMA in the four segments under study. However, this difference remained significant only in the ileum and the jejunum in the second and third US scans. As the difference in intestinal wall thickness between the control group and the patients with CMA was small, this parameter seems to have little value for clinical practice. The main symptom for four of the infants with a confirmed diagnosis of CMA was blood in stools. Mean thickness in the first US exam was 2.97 in the left colon, which is significantly greater than in the control group. This suggests that the assessment of submucosal wall thickening in infants with CMA as-

sociated with blood in stools may help to establish a diagnosis and to monitor clinical progression.

Many studies counted the number of vessels in the intestinal wall to define the intensity of circulation (15-31-32). However, considering that the small bowel loops are tortuous and overlapping, the individual identification of vessels may be difficult. Therefore, we decided to evaluate vessel density of the intestinal wall by capturing images of several (10) segments and calculating a mean value for the areas with the most and the fewest vessels. This method may be adequate for clinical practice because it uses free image software.

One of the limitations of this study was the small number of patients and the fact that the sample was clinically heterogeneous. Patients had CMA symptoms of varying degrees of severity, which might be a sign of different clinical presentations. Even so, our results showed significant differences.

This study may open an interesting line of research about CMA, an important pathology with a high incidence among infants. The free computer-assisted image analysis method used in this study is innocuous to patients, easy to perform by the medical team, and has good applicability.

## CONCLUSIONS

There is an important difference in intestinal vessel density in infants younger than 6 months with CMA when compared with healthy infants matched according to age. This study suggests the use of Doppler US as a tool to screen for CMA. An 18% cut-off point for vessel density should be adopted: results below it would indicate that the likelihood of the disease is low, and above it, that it is high.

## REFERENCES

1. Wershil BK, Butzner D, Sabra A, Savilahti E, Seidman E, Strobel S, et al. Allergy and immunologic disease: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;35 Suppl 2:S74-7.
2. Hill DJ, Firer MA, Shelton MJ, et al. Manifestations of milk allergy in infancy: clinical and immunologic findings. *J Pediatr.* 1986;109:270-6.
3. Sicherer SH. Food allergy. *Lancet.* 2002 Aug 31;360(9334):701-10.
4. Sampson H. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 May;113(5):805-19; quiz 20.
5. Shah U, Walker WA. Pathophysiology of intestinal food allergy. *Adv Pediatr.* 2002;49:299-316.
6. Walker-Smith. Cow's milk allergy: a new understanding from immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003 Jun;90(6 Suppl 3):81-3.
7. Herz U. Immunological basis and management of food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Nov;47 Suppl 2:S54-7.
8. Magazzu G, Scoglio R. Gastrointestinal manifestations of cow's milk allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002 Dec;89(6 Suppl 1):65-8.
9. American Gastroenterological Association medical position statement: guidelines for the evaluation of food allergies. *Gastroenterology.* 2001 Mar;120(4):1023-5.
10. Jakobsson I, Lindberg T. Cow's milk proteins cause infantile colic in breast-fed infants: a double-blind crossover study. *Pediatrics* 1983;71:268-71.
11. Ewing WM, Allen PJ. The diagnosis and management of cow milk protein intolerance in the primary care setting. *Pediatr Nurs* 2005;31:486-93.
12. Vandenplas Y, Koletzko S, Isolauri E, Hill D, Oranje A, Brueton M. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child.* 2007 Oct;92(10):902-8.
13. Niggemann B, Beyer K. Diagnosis of food allergy in children: toward a standardization of food challenge. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007 Oct;45(4):399-404.
14. Quillín SP, Siegel MJ. Gastrointestinal inflammation in children: color Doppler Ultrasonography. *J Ultrasound Med* 1994;13:751-6.
15. Dietrich CF, Jedrzejczyk M, Ignee A.

- Sonographic assessment of splanchnic arteries and the bowel wall. *European Journal of Radiology*. 2007 Nov;64(2):202-212.
16. Epifanio M, Baldisserotto M, Spolidoro J, Gaiger A. Gray-scale and color Doppler sonography in the evaluation of children with suspected bowel inflammation: correlation with colonoscopic and histologic findings. *Clinical Radiology*. 2008 Sep;63(9):968-78.
  17. Canani RB, Horatio L, Terrin G, Romano MT, Miele E, Stalano A, et al. Combined use of noninvasive tests is useful in the initial diagnostic approach to a child with suspected inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:9-15.
  18. Baud C, Saguintaah M, Veyrac C, et al. Sonographic diagnosis of colitis in children. *Eur Radiol* 2004;14:2105-19.
  19. Spalinger J, Patriquin H, Miron MC, et al. Doppler US in Patients with Crohn Disease: Vessel Density in the Diseased Bowel Reflects Disease Activity. *Radiology* 2000 Dec;217(3):787-91.
  20. Scholbach T, Herrero I, Scholbach J. Dynamic Color Doppler Sonography of intestinal wall in patients with Crohn disease compared with healthy subjects. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:524-8.
  21. World Health Organization. The WHO child growth standards. [www.who.int/childgrowth/en/](http://www.who.int/childgrowth/en/).
  22. Evaluation and treatment of constipation in infants and children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006 Sep;43(3):e1-13.
  23. King C, Glass R, Bresee J, Duggan C. Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. *MMWR Recomm Rep*. 2003 Nov 21;52(RR-16):1-16.
  24. Ruess L, Blask AR, Bulas DI, et al. Inflammatory bowel disease in children and young adults: correlation of sonographic and clinical parameters during treatment. *AJR Am J Roentgenol* 2000;175:79e84.
  25. Troncone R, Discepolo V. Colon in Food Allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009 Apr;49 Suppl 2:S89-91.
  26. Hill DJ, Murch SH, Rafferty K, et al. The efficacy of amino acid-based formulas in relieving the symptoms of cow's milk allergy: a systematic review. *Clin Exp Allergy* 2007;37:808-22.
  27. de Boissieu D, Dupont C. Allergy to extensively hydrolyzed cow's milk proteins in infants: safety and duration of amino acid-based formula. *J Pediatr*. 2002 Aug;141(2):271-3.
  28. Niggemann B, Binder C, Dupont C, Hadji S, Arvola T, Isolauri E. Prospective, controlled, multi-center study on the effect of an amino-acid-based formula in infants with cow's milk allergy/intolerance and atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2001;12:78-82.
  29. Niggemann B, Beyer K. Pitfalls in double-blind, placebo-controlled oral food challenges. *Allergy*. 2007 Jul;62(7):729-32.
  30. Caffarelli C, Petroccone T. False-negative food challenges in children with suspected food allergy. *Lancet*. 2001 Dec 1;358(9296):1871-2.
  31. Siegel MJ, Friedland JA, Hildebolt CF. Bowel wall thickening in children: differentiation with US. *Radiology* 1997;203:631e5.
  32. Faingold R, Daneman A, Tomlinson G, et al. Necrotizing enterocolitis: assessment of bowel viability with colour Doppler US. *Radiology* 2005;235:587e94.

---

## CAPÍTULO IV

---

## **4 CONCLUSÕES**

Nossos resultados mostram que a densidade vascular periférica mesentérica, ao Doppler em cores, em pacientes com suspeita de APLV, foi significativamente maior do que nas crianças normais. Além disso, o valor aumentou, quando considerados unicamente os pacientes confirmados, através do teste de provocação.

Nossos resultados, utilizando a espessura da parede intestinal, pela ultrassonografia em escala de cinzas, permitiu a observação de diferença estatisticamente significativa, nos quatro segmentos estudados, entre os pacientes-controle e os pacientes com APLV. Considerando que a diferença na espessura da parede intestinal, entre o grupo controle e os pacientes com APLV, foi muito pequena e de difícil mensuração, este parâmetro se torna de pouco valor, na prática clínica.

Observamos que indivíduos com ponto de corte em percentual de densidade vascular inferior a 18,7% apresentam baixa probabilidade para ter a doença; em caso superior a este ponto, há forte sugestão de apresentar a doença.

Os sintomas mais freqüentes, encontrados em pacientes com APLV, foram irritabilidade (100%) e vômitos (70%). Os pacientes com suspeita de ALPV tiveram



um ganho de peso menor que os pacientes normais. Foi verificado, também, tempo de aleitamento materno menor, com introdução mais precoce de fórmulas à base de leite de vaca.

Este estudo demonstra que a ultrassonografia com Doppler em cores poderá ser útil como teste de rastreamento, tanto de crianças com clínica duvidosa de APLV, quanto na avaliação de crianças com quadros sugestivos de APLV.

Este é o primeiro estudo, utilizando a ultrassonografia em escala de cinzas e com Doppler em cores, no processo diagnóstico de APLV. Entendemos, entretanto, que, para confirmar nossos achados, outros estudos precisam ser realizados, utilizando esse método, com um número maior de crianças.

---

---

## CAPÍTULO V

---

## 5 RESULTADOS NÃO INCLUÍDOS NO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (CAPÍTULO III)

Foram coletadas informações em forma dicotômica (sim/não), sobre antecedentes alérgicos dos pacientes. Perguntamos se eles tinham apresentado, anteriormente, repetição de quadros de urticária ou de broncoespasmo. Também registramos, da mesma forma, a história de alergia cutânea ou respiratória dos pais.

**Tabela 1.** Características dos pacientes. As variáveis quantitativas estão descritas por média  $\pm$  desvio padrão ou mediana (percentis 25 – 75). As variáveis qualitativas estão descritas por n (%). HF: história familiar. Em vermelho, os dados sobre alergia e sobre história familiar de alergia.

| Variáveis                                  | Grupo                   |                    | P      |
|--|-------------------------|--------------------|--------|
|  | Suspeita APLV<br>(n=17) | Controle<br>(n=17) |        |
| Idade (meses)                              | 3,64 $\pm$ 1,23         | 3,80 $\pm$ 1,62    | 0,743  |
| Sexo masculino                             | 7 (41,2)                | 11 (64,7)          | 0,303  |
| Alérgicos                                  | 4 (23,5)                | 2 (11,8)           | 0,656  |
| HF de alergia                              | 9 (52,9)                | 5 (29,4)           | 0,296  |
| Peso (kg)                                  | 5,82 $\pm$ 1,25         | 6,34 $\pm$ 1,25    | 0,233  |
| Comprimento (cm)                           | 59,9 $\pm$ 4,49         | 61,4 $\pm$ 5,42    | 0,377  |
| Ganho de peso no ult. mês(kg)              | 0,52 $\pm$ 0,24         | 0,74 $\pm$ 0,16    | 0,003  |
| Tempo de aleitamento materno (meses)       | 1,0 (0,3 – 1,0)         | 2,1 (1,0 – 3,8)    | 0,004  |
| Início do consumo de leite de vaca (meses) | 0,3 (0,1 – 1,0)         | 1,0 (0,8 – 2,0)    | 0,049  |
| Constipação                                | 3 (17,6)                | 0 (0,0)            | 0,227  |
| Diarréia                                   | 6 (35,3)                | 0 (0,0)            | 0,018  |
| Urticária/rush                             | 3 (17,6)                | 1 (5,9)            | 0,601  |
| Irritabilidade                             | 17 (100,0)              | 0 (0,0)            | <0,001 |
| Vômito                                     | 12 (70,6)               | 0 (0,0)            | <0,001 |
| Sangue nas fezes                           | 6 (35,3)                | 0 (0,0)            | 0,018  |

Estes dados não foram colocados no artigo, devido ao fato de trazerem muita informação e serem pouco relevantes, devido ao número de pacientes.

O ganho de peso dos 17 pacientes com suspeita de APLV nos, últimos 30 dias antes da consulta, foi em média de  $0,52 \text{ kg} \pm 0,24$ , e dos pacientes-controle de  $0,74 \pm 0,16 \text{ kg}$  ( $p= 0,003$ ). Quando analisado o período de 28 dias, dos pacientes com suspeita de APLV fazendo uso da fórmula baseada em aminoácidos, observamos que o ganho de peso foi, em média de 0,80 kg. Este valor de ganho de peso está bem próximo dos apresentados pelos pacientes do grupo-controle. Quando avaliamos, unicamente, os 11 pacientes confirmados de APLV, após teste de provocação, o ganho de peso foi de  $0,88 \text{ kg} \pm 0,33$  em 28 dias, provavelmente fazendo uma recuperação do peso.

Quatro pacientes com diagnóstico confirmado de APLV tiveram, entre seus sintomas principais, a presença de sangue visível nas fezes. Quando avaliada a espessura da submucosa do cólon esquerdo, desses pacientes, o valor médio foi de  $2,9 \text{ mm} \pm 1,37$  e dos controles  $1,18 \pm 0,38$ , dando um valor de  $p=0,078$ . Acreditamos que esse valor não, chegou a valores de significância estatística, provavelmente por causa do número de pacientes.

## **5.1 PONTOS DE DISCUSSÃO E OUTRAS INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO**

A fórmula láctea baseada em aminoácidos, que foi administrada durante quatro semanas aos pacientes com suspeita de APLV, porque assegura uma completa remissão dos sintomas, caso seja realmente um paciente com esta

---

doença. As recomendações internacionais orientam no sentido de que, se o paciente não melhorar com essas fórmulas, o diagnóstico deve ser descartado e o processo precisa ser orientado para outras patologias (1-2).

O custo dessas fórmulas é muito elevado. Apesar disso, para evitar viés de aferição, achamos fundamental, utilizar este tipo de fórmula, mesmo que isso tenha resultado em um número menor de pacientes, no estudo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Vandenplas Y, Koletzko S, Isolauri E, Hill D, Oranje A, Brueton M, et al. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch Dis Child* 2007;92(10):902-8.
  2. Hill DJ, Murch SH, Rafferty K, Wallis P, Green CJ. The efficacy of amino acid-based formulas in relieving the symptoms of cow's milk allergy: a systematic review. *Clin Exp Allergy* 2007;37(6):802-22.
-

---

# ANEXOS

---

## **Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de pacientes com suspeita de APLV.**

Titulo da Pesquisa: ULTRASSONOGRAFIA COM DOPPLER EM CORES PARA AVALIAÇÃO INTESTINAL EM LACTENTES NORMAIS E COM ALERGIA À PROTEÍNA DO LEITE DE VACA: PADRÃO NO DIAGNÓSTICO E APÓS TRATAMENTO.

Justificativa:

Seu filho, no momento, está com um quadro clínico de suspeita de Alergia à Proteína do Leite de Vaca. O objetivo desta pesquisa é analisar com ecografias como está o intestino dele e como responderá ao tratamento.

Como meio de realização do trabalho, seu filho deverá ser submetido a ecografias e consultas médicas, que serão feitas em 3 momentos diferentes.

1º Momento: Será realizada uma primeira ecografia na primeira consulta, onde será entregue o leite que seu filho tomará por 4 semanas, sem custo financeiro algum.

2º Momento : Após estas quatro semanas, será realizada outra consulta e uma nova ecografia.

3º Momento: Se seu filho responder bem ao leite, será realizada, sob supervisão médica e em nível hospitalar, uma prova para ver se tolera o leite de vaca e novamente, se realizará outra ecografia abdominal.

As ecografias serão realizadas no setor de radiologia deste hospital e não trazem nenhum risco para seu filho e nenhum custo para você.

Os benefícios que se podem obter são a melhora do estado clínico da criança, já que os leites que serão fornecidos gratuitamente, unicamente por um período de 4 semanas, são os mais bem recomendados para o quadro clínico de seu filho. Após estas 4 semanas se seu filho continuar necessitando de fórmulas hipoalergênicas estas fórmulas não mais serão fornecidas pelos pesquisadores e ficarão ao encargo dos pais. O uso de fórmulas hipoalergênicas é fundamental para todas as crianças que apresentam este quadro clínico de alergia a proteína de leite de vaca, sendo normalmente adquiridas pelos pais desde o início do tratamento.

Também será possível avaliar, através de uma ecografia abdominal, a circulação intestinal.

Damos plena garantia de resposta a qualquer pergunta que poderá surgir durante o estudo, assim como privacidade.

A concordância em participar neste estudo não implica necessariamente em qualquer modificação no tratamento que receberá seu filho.

Da mesma forma, a não concordância em participar deste estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento.

Eu,..... fui informado(a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada .

Recebi informação à respeito do tratamento oferecido e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu desejar.



O Dr Matias Epifanio certificou-me de que todos os dados desta pesquisa referente ao meu bebê serão confidenciais, bem como o seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa.

Fui informado (a) que caso existirem danos a saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo posso chamar ao Dr. Matias Epifanio no telefone 99996248. Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Dr. José Spolidoro, Chefe do Serviço, através do telefone 99858440 ou ainda através do Comitê de ética em Pesquisa (CEP) da Instituição através do telefone 33203345.

Declaro que recebi cópia de presente Termo de Consentimento.

|                           |       |       |
|---------------------------|-------|-------|
| _____                     | _____ | _____ |
| Assinatura                | Nome  | Data  |
| _____                     | _____ | _____ |
| Assinatura do pesquisador | Nome  | Data  |

Este formulário foi lido para:

Em ...../...../.....pelo Dr.Matias Epifanio enquanto eu estava presente .

|                          |      |      |
|--------------------------|------|------|
| Assinatura de testemunha | Nome | Data |
|--------------------------|------|------|

