

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da Sensibilidade de Cães com Dermatite Alérgica aos
Extratos Alergênicos Padronizados de Ácaros da Poeira Domiciliar**

Victor do Espirito Santo Cunha

2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE CÃES COM DERMATITE
ALÉRGICA AOS EXTRATOS ALERGÊNICOS PADRONIZADOS
DE ÁCAROS DA POEIRA DOMICILIAR**

VICTOR DO ESPIRITO SANTO CUNHA

Sob a Orientação do Professor
João Luiz Horacio Faccini

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

VICTOR DO ESPIRITO SANTO CUNHA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/2006

João Luiz Horacio Faccini, Ph. D.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Elmiro Rozendo do Nascimento, Ph. D.
Universidade Federal Fluminense

Ana Maria Barros Soares, Ph. D.
Universidade Federal Fluminense

À minha mãe querida que, com serenidade e inteligência,
nos passou confiança para que buscássemos
os nossos sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor JOÃO LUIZ HORACIO FACCINI não apenas pela excelente orientação, mas também pela credibilidade depositada desde o primeiro momento.

Ao Mestre RUPPERT LUDWIG HAHNSTADT pelos ensinamentos, pelos artigos e livros indicados e pela atenção dispensada em nossos encontros.

À professora MARIA HELENA DA SILVA, pelos ensinamentos relacionados às técnicas imunológicas utilizadas nos processos de padronização de extratos alergênicos.

Ao laboratório de antígenos FDA-ALLERGENIC pelo fornecimento dos extratos alergênicos produzidos pela ALK-ABELLÓ utilizados no trabalho, reflexo do interesse e confiança na pesquisa veterinária.

À amiga ANA MARGARIDA KEIDEL, médica veterinária e proprietária do canil CHANTECLAIR, pela ajuda prestada na obtenção de cães participantes do Grupo Controle.

Aos amigos RAFAEL VERÍSSIMO e LUCIANA MESQUITA pela paciência ao ouvir inúmeras vezes minhas dúvidas e divagações sobre o assunto.

À minha família que sempre me apoiou e incentivou na busca do conhecimento e crescimento profissional.

Aos animais testados que, apesar da possível contribuição prestada para o crescimento científico relacionado à própria espécie, participaram independentemente de seus desejos e sentimentos.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 13 |
| 3.1. Seleção dos Animais..... | 13 |
| 3.2. Diagnóstico de Dermatite Alérgica..... | 13 |
| 3.3. Extratos Alergênicos..... | 14 |
| 3.4. Soluções Controle..... | 15 |
| 3.5. Preparação dos Pacientes..... | 15 |
| 3.6. Técnica de Aplicação dos Extratos..... | 16 |
| 3.7. Interpretação das Reações | 17 |
| 3.8. Determinação da Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo do Teste Intradérmico..... | 17 |
| 3.9. Análise Estatística..... | 17 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 18 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 23 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 24 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1: Critérios diagnósticos sugeridos por WILLENSE (1986) para a Dermatite Atópica Canina..... | 13 |
| TABELA 2: Resultados dos testes intradérmicos nos grupos Controle e Alérgico..... | 18 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Principais alterações clínicas observadas em animais que compuseram o Grupo Alérgico..... 14
- FIGURA 2:** Frascos contendo extratos alergênicos de ácaros da poeira domiciliar padronizados pela ALK-ABELLÓ – Laboratório de Antígenos, utilizados nos testes intradérmicos..... 15
- FIGURA 3:** Ilustração da área lateral do tórax, tricotomizada e com as marcações dos pontos para a inoculação dos extratos alergênicos e soluções controle.....16
- FIGURA 4:** Inoculação intradérmica dos extratos alergênicos durante realização de teste intradérmico em animal pertencente ao Grupo Alérgico..... 16
- FIGURA 5:** Teste intradérmico positivo para extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df) e *Lepidoglyphus destructor* (Ld). Controle positivo (Cp) e Controle negativo (Cn)..... 17
- FIGURA 6:** Reações positivas observadas na leitura imediata no Grupo Alérgico.....18
- FIGURA 7:** Principais alterações clínicas observadas em animais do Grupo Alérgico que apresentaram reações positivas no teste intradérmico.....20

RESUMO

CUNHA, Victor do Espírito Santo. **Avaliação da sensibilidade de cães com dermatite alérgica aos extratos alergênicos padronizados de ácaros da poeira domiciliar.** Seropédica: UFRRJ, 2006. 29p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária).

O presente estudo do tipo caso-controle teve como objetivo avaliar se extratos alergênicos de cinco espécies de ácaros da poeira domiciliar padronizados para humanos podem ser utilizados no diagnóstico da dermatite atópica canina. Extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Blomia tropicalis*, *Lepidoglyphus destructor* e *Tyrophagus putrescentiae* foram avaliados através de testes intradérmicos em 45 cães, dos quais 20 controles e 25 com dermatite alérgica. Uma diferença significativa foi observada no padrão de respostas entre os dois grupos ($p < 0,05$). Apenas um animal (5%) do grupo controle reagiu ao teste cutâneo, enquanto que no grupo dos alérgicos 14 cães (56%) apresentaram pelo menos uma reação positiva (*odds ratio* = 24,2). As maiores frequências de reações positivas observadas no grupo dos alérgicos foram aos extratos de *T. putrescentiae* ou *L. destructor*, cada um induzindo reações em 10 (40%) cães. Os extratos de *D. farinae*, *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* foram responsáveis por reações positivas em 7 (28%), 3 (12%) e 3 (12%) cães, respectivamente. A sensibilidade e a especificidade dos testes intradérmicos foram de 56% e 95%, respectivamente e, o valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 93% e 63%, respectivamente.

Palavras-chave: Alergia, dermatite atópica, teste intradérmico.

ABSTRACT

CUNHA, Victor do Espírito Santo. **Evaluation of the sensibility from dogs with allergic dermatitis towards standardized allergenic extracts of house dust mites.** Seropédica: UFRRJ, 2006. 29p. (Dissertation, Master Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology).

The objective of this case-control study was to evaluate whether allergenic extracts from five species of house dust mites standardized for humans may be taken into account in the diagnosis of the canine atopic dermatitis. Extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Blomia tropicalis*, *Lepidoglyphus destructor* and *Tyrophagus putrescentiae* have been evaluated through intradermal testing on 45 dogs, from which 20 belonged to the control group and 25 suffered from allergic dermatitis. There was a significant difference on the response pattern between the two groups ($p < 0,05$). Only one dog (5%) from the control group has reacted to the intradermal test, whereas from the allergic group, 14 dogs (56%) have presented at least one positive reaction (odds ratio = 24,2). Most of the positive reactions observed in the allergic group were to the extracts of *T. putrescentiae* or *L. destructor*, each one inducing reactions on ten dogs (40%). The *D. farinae*, *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* extracts were responsible for positive reactions on 7 (28%), 3 (12%) and 3 (12%) dogs, respectively. The intradermal testing sensitivity and specificity were 56% and 95%, respectively, and the positive predictive value and the negative predictive value were 93% and 63%, respectively.

Key words: Allergy, atopic dermatitis, intradermal testing.

1. INTRODUÇÃO

A Dermatite Atópica Canina (DAC) é uma doença cutânea caracterizada por uma tendência hereditária à produção de imunoglobulinas do tipo E em resposta a alérgenos ambientais. Sua prevalência na população canina está próxima dos 10% (SCOTT et al., 2001), podendo chegar a 30% dos casos atendidos em clínicas particulares especializadas em dermatologia (NESBITT, 1983).

Os principais alérgenos ambientais incriminados na patogênese da dermatite atópica canina são: antígenos de ácaros da poeira domiciliar e de produtos armazenados; pólenes de gramíneas, árvores e arbustos; esporos de fungos; antígenos epidérmicos; e antígenos de insetos (HILL & DEBOER, 2001). Ácaros da poeira domiciliar, em particular *Dermatofagoides farinae* e *D. pteronyssinus*, são considerados como as principais fontes de alérgenos responsáveis pelas hipersensibilidades em cães, afetando de 30 a 100% dos cães com dermatite atópica (RANDALL et al., 2003).

O diagnóstico é baseado no histórico e na apresentação clínica e posteriormente substanciado pelos testes intradérmicos (ID) *in vivo* ou testes sorológicos *in vitro*, tais como o teste de imunoabsorção ligado a enzimas (ELISA) e o teste de radioalergoabsorção (RAST), os quais demonstram níveis aumentados de IgE alérgeno-específico. O objetivo destes testes é identificar alérgenos relacionados à doença, possibilitando desta forma a aplicação de medidas de controle para minimizar a exposição a estes alérgenos, assim como a seleção de antígenos para a imunoterapia alérgeno-específica.

Porém, os extratos alergênicos utilizados em Medicina Veterinária para a realização dos testes intradérmicos são produzidos por métodos inespecíficos de quantificação de alérgenos e estão disponíveis comercialmente em concentrações de peso sobre volume (w/v) ou unidades protéicas por mililitro (PNU/ml). Tais medidas de concentração não nos permitem reconhecer a bioatividade de cada extrato, que pode variar de 10 a 1000 vezes entre extratos com a mesma concentração (SCOTT et al., 2001). Extratos alergênicos são misturas complexas de componentes antigênicos e o conteúdo protéico não está necessariamente relacionado ao conteúdo alergênico (IPSEN et al., 1998). Portanto, reações falso-positivas e falso-negativas podem ser observadas quando a bioatividade do extrato estiver muito alta ou muito baixa, respectivamente.

Para que a reprodutibilidade dos resultados dos testes intradérmicos no diagnóstico de doenças alérgicas seja alta, é essencial a padronização dos extratos alergênicos (DREBORG, 1993; Position Statement: AAAAI, 1997). Os processos de padronização de extratos alergênicos têm como objetivo principal a identificação de alérgenos clinicamente importantes para uma determinada espécie, assim como a avaliação de sua atividade alergênica em unidades biológicas. Com isso, a criação de referências internacionais de extratos alergênicos se torna possível, seguindo uma política semelhante à adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para referências internacionais de outras substâncias biológicas. O reconhecimento da quantidade de qualquer princípio ativo utilizado em medicina é um requisito de máxima importância. O benefício de um tratamento e a reprodutibilidade de um teste diagnóstico dependem, de forma direta, deste conhecimento. Como o processo de padronização de extratos alergênicos em medicina veterinária ainda não é uma realidade e alérgenos principais para cães podem diferir daqueles alérgenos principais já descritos para humanos (McCALL et al., 2001), a utilização de extratos padronizados para humanos no diagnóstico da dermatite atópica canina tem valor desconhecido.

Como os ácaros da poeira domiciliar e de produtos armazenados são considerados como a principal causa de doença atópica em cães e humanos (SWINNEN & VROOM, 2004), o presente trabalho teve como objetivo avaliar se extratos alergênicos de ácaros da poeira domiciliar e de produtos armazenados, padronizados para humanos, podem ser utilizados para complementar o diagnóstico da dermatite atópica canina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro caso relatado de doença atópica em cães foi descrito por WITTICH (1941), e tratava-se de um cão com sintomas sazonais de rinite alérgica. A segunda publicação de doença alérgica em cães foi descrita por PATTERSON (1960), e tratava-se de um cão com conjuntivite alérgica, aumento da produção de lágrimas e prurido. Somente em 1971 os sinais clínicos da dermatite atópica canina (DAC) foram descritos (HALLIWELL & SCHWARTZMAN, 1971).

Acreditou-se durante muitas décadas que a rota de penetração de antígenos fosse a respiratória. O antígeno seria inalado, penetraria no trato respiratório e através da circulação chegaria na pele, com subsequente degranulação dos mastócitos. Porém, esta hipótese nunca foi comprovada experimentalmente e é atualmente considerada como um dogma em medicina veterinária. Acredita-se, atualmente, que a rota de penetração de antígenos para a DAC seja a epidermal e, portanto, o termo “dermatite alérgica a inalantes”, utilizado durante muitos anos, não deve mais ser utilizado (OLIVRY & HILL, 2001).

A incidência de doença atópica em humanos (asma, rinite alérgica e dermatite atópica) tem aumentado de forma significativa nas últimas décadas, especialmente em países desenvolvidos. Embora já se conheça uma predisposição genética para a doença, é pouco provável que este rápido aumento da incidência ocorra devido a processos de seleção genética. Acredita-se que fatores ambientais, tais como ambientes cada vez mais urbanizados, com um aumento da concentração de alérgenos dentro dos domicílios, sejam os responsáveis por este aumento da incidência em humanos. Como muitos destes fatores, associados a uma crescente incidência de dermatite atópica em humanos, também estão comumente presentes no ambiente dos cães, parece provável que um aumento similar da incidência da doença em cães também esteja ocorrendo (HILLIER & GRIFFIN, 2001).

Existem diversas publicações sobre a prevalência de dermatite atópica em cães, porém nenhum desses trabalhos utilizou dados epidemiológicos representativos e, portanto, não se conhece a verdadeira prevalência e incidência de dermatite atópica na população geral de cães (HILLIER & GRIFFIN, 2001). SCOTT et al. (2001) estimaram uma prevalência da doença em 10% na população geral de cães e LUND et al. (1999) estimaram, após uma análise de 31.484 cães atendidos com problemas de pele ou de ouvido em 52 clínicas privadas norte-americanas, em 8.7% a prevalência de dermatite alérgica/atópica, alergia ou atopia.

Atopia é definida como uma tendência hereditária à produção de imunoglobulinas do tipo IgE. Dermatite atópica canina é a doença clínica observada em cães atópicos, resultante da produção de mediadores inflamatórios, com conseqüentes reações alérgicas clinicamente relevantes a antígenos ambientais (ZUR et al., 2002).

O padrão de herança genética da dermatite atópica e da produção de altos títulos de IgE tem sido o foco de muitos estudos. Trabalhos iniciais suportaram a hipótese de um padrão de herança multifatorial para a dermatite atópica em humanos. Entretanto, trabalhos subsequentes sobre asma utilizando reatividade de IgE como um indicador fenotípico, indicaram que o modo de herança das doenças atópicas em humanos era autossômico dominante (PALLER, 1993). Na DAC acredita-se que exista um componente genético devido a uma maior observação da doença em determinadas raças. As raças mais comumente relatadas como predispostas são: West Highland White Terrier, Labrador Retriever, Boxer, dentre outras. Porém, a maioria desses estudos não

associou a prevalência da doença à frequência com que estas raças são encontradas na população geral de cães (SOUZA & MARSELLA, 2001).

A apresentação clínica primária da DAC é caracterizada pela presença de prurido com lesões cutâneas secundárias resultantes do autotraumatismo. A maioria dos cães manifesta prurido ao esfregar a face e ao lambar ou mascar as patas. As lesões ocorrem mais comumente no abdome ventral e regiões axilar e inguinal. Lesões descritas na literatura incluem escoriações, alopecia variável devido ao autotraumatismo, máculas eritematosas, pápulas, pústulas, hiperpigmentação e liquenificação (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). A intensidade das lesões cutâneas pode variar de leve a grave e infecções cutâneas secundárias com bactérias e leveduras são comuns. Otite externa é observada em aproximadamente 55% dos cães diagnosticados com dermatite atópica (ZUR et al., 2002).

A DAC é uma síndrome complexa e sua etiopatogênese ainda é mal compreendida (BENSIGNOR et al., 2002). É considerada como uma hipersensibilidade do tipo I (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). Diversas células inflamatórias estão relacionadas com a patogênese da doença embora, no passado, os mastócitos eram considerados como as mais importantes. Trabalhos recentes sugerem que uma interação complexa ocorra entre uma ampla variedade de células, sendo consideradas as mais importantes as células de Langerhans e células dendríticas dermais, linfócitos-B, linfócitos-T helper alérgeno-específicos, e mastócitos (HILL & OLIVRY, 2001).

Células apresentadoras de antígenos com morfologia dendrítica são também encontradas na derme (YAGER, 1992). Assim como as células de Langerhans, estas células estão envolvidas no processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos. Essas células são encontradas em biópsias cutâneas de dermatite atópica de cães e de humanos (DAY, 1996; OLIVRY et al., 1997).

Os linfócitos-T são classificados em duas categorias de acordo com seus marcadores de superfície. As células CD4 são equipadas para responder a antígenos exógenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos e, portanto, são essenciais na patogênese das doenças atópicas. Os linfócitos T CD8 são designados como linfócitos citotóxicos, embora ainda exista alguma controvérsia sobre suas funções supressoras (HILL & OLIVRY, 2001).

Uma investigação preliminar da produção de citocinas pelas células T na DAC, revelou que em biópsias cutâneas de cães normais havia um predomínio de IL-2 e IL-12 e, em biópsias cutâneas de cães atópicos, um predomínio de IL-4 e IL-5 (OLIVRY et al., 1999). Embora os resultados deste estudo indiquem que possa haver uma resposta predominantemente do tipo TH2 em cães atópicos, o número de casos estudados foi pequeno e mais estudos são necessários para investigar essa importante área da imunologia canina (HILL & OLIVRY, 2001).

A principal função dos linfócitos-B é a síntese de imunoglobulinas alérgeno-específicas. Em relação às doenças alérgicas, anticorpos da classe IgE são os mais importantes, embora subclasses de IgG também possam estar envolvidas. Anticorpos IgE alérgeno-específicos também têm a capacidade de amplificar a resposta imune através da captura de antígenos epidermais, com posterior apresentação para as células de Langerhans. Atuam ainda iniciando a inflamação após induzirem a degranulação dos mastócitos (HILL & OLIVRY, 2001).

Os eosinófilos são atraídos para o local da inflamação por fatores quimioatrativos específicos tais como histamina, componente 5a do sistema complemento e leucotrieno B4. Os eosinófilos possuem receptores de superfície celular para essas substâncias, mas também podem expressar receptores Fc para IgG e

receptores de baixa afinidade para IgE. Uma vez no ponto de inflamação mostram atividade fagocítica e secretória (McEWEN, 1992).

O papel dos mastócitos nas reações de hipersensibilidade está relacionado à síntese e liberação de mediadores inflamatórios no espaço intercelular. Estes mediadores ficam estocados em grânulos em seu interior e incluem a histamina, tryptases, quimases, leucotrienos e fator de necrose tumoral α (HILL & OLIVRY, 2001). Quando ocorre a ligação entre o alérgeno e duas moléculas de IgE alérgeno-específicas adjacentes acopladas na superfície do mastócito, este degranula (BAKER, 1990). Os mediadores liberados são responsáveis por uma complexa interação entre a microcirculação e outras células inflamatórias, o que resulta em muitos dos sinais clínicos da dermatite atópica. AUXILIA & HILL (2000) demonstraram que as áreas com as mais altas densidades de mastócitos nos cães são as pinas e as áreas interdigitais ventrais e levantaram a hipótese de que estes achados possam estar relacionados com a ocorrência freqüente de pododermatites e otites externas na DAC.

Os principais mediadores inflamatórios incriminados na patogênese da DAC são histamina, serotonina e leucotrienos, porém, destes apenas a histamina foi mais profundamente estudada e parece ser de grande importância na patogênese da doença. Outras citocinas, já melhor estudadas na dermatite atópica humana, também podem estar envolvidas, tais como a interleucina-4 (IL4) e IL5 (MARSELLA & OLIVRY 2001).

Em humanos, ácaros da poeira domiciliar, especialmente *Dermatophagoides farinae* e *D. pteronyssinus*, são responsáveis por reações cutâneas em 45 a 80% da população asmática. A associação entre alérgenos de ácaros da poeira domiciliar e sensibilização já é reconhecida, não somente em pacientes com asma, mas também naqueles com outras doenças alérgicas tais como rinite alérgica e dermatite atópica (RANDALL et al., 2003).

Ácaros da poeira domiciliar são aracnídeos de vida livre que utilizam carpetes e tapetes de fibras naturais, colchões, roupas de cama e frestas de assoalhos e de rodapés para nidificação e reprodução. Para tal, são necessárias boas condições climáticas e disponibilidade de alimento, em geral representado por fungos e descamações da pele de pessoas e animais (BAGGIO et al., 1992). A umidade é o principal fator limitante para o desenvolvimento e crescimento da população de ácaros da poeira domiciliar. A regulação osmótica se faz através da cutícula e, portanto, altos níveis de umidade do ar são necessários para que não ocorra a dessecação (EZEQUIEL et al., 2001). Ácaros da poeira domiciliar necessitam de uma temperatura ambiente ideal em torno de 25 a 30° C e uma umidade relativa entre 75 e 80% para se desenvolver (PLATTS-MILLS & CHAPMAN, 1987). Os ácaros de produtos armazenados são encontrados principalmente no meio rural, em grãos, farinhas e fenos, mas também podem ser encontrados na poeira domiciliar, desde que as condições de umidade e temperatura sejam favoráveis para o seu desenvolvimento. Estes ácaros se desenvolvem em ambientes úmidos, com umidade relativa ideal em torno de 80% e temperatura entre 25 e 30° C (TEE, 1994).

O Brasil é um país tropical com umidade relativa e temperatura média anual em torno de 70% e 27° C, respectivamente. Tais condições são altamente favoráveis para o desenvolvimento de ácaros da poeira domiciliar. Os gêneros mais comumente encontrados no país são pertencentes às famílias Pyroglyphidae, Glycyphagidae, Cheyletidae, e Acaridae. O gênero *Dermatophagides* (Pyroglyphidae) é o mais relatado, representado principalmente pelas espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (BINOTTI et al., 2001). A primeira é relatada em todo o território nacional e sua prevalência variou de 3.7 a 89.3% dos ácaros encontrados nos diversos estados (ROSA, 1978; BAGGIO et

al., 1992). A prevalência de *D. farinae* variou de 0.05% a 39.2%, sendo encontrada em quase todo território nacional (MOREIRA, 1975; BAGGIO & AMBROSIO, 1992). A família Glycyphagidae é a segunda mais comumente reportada, sendo representada principalmente pela *Blomia tropicalis*, com uma prevalência variando entre 3.8 a 79.5% nos diversos estados (ROSA, 1978; CHAGAS et al., 2000) e *Glycyphagus domesticus* entre 6.8 a 36.5% (MOREIRA, 1975). *Tyrophagus putrescentiae* (Acaridae) já foi descrito em diversas regiões do país e sua prevalência variou de 0.2 a 10.5% (ROSA, 1978; JORGE NETO, 1984).

Os sinais clínicos da DAC são muito variáveis e não existe um único achado clínico ou dado do histórico que, se presente, indique a presença da doença. O diagnóstico inicial é clínico e deve ser realizado através da identificação de uma combinação de critérios clínicos comumente associados à doença (DeBOER & HILLIER, 2001). Os critérios clínicos sugeridos por WILLENSE (1986) são amplamente utilizados por muitos veterinários dermatologistas na avaliação de cães com potencial alérgico. Infelizmente esses critérios nunca foram avaliados em relação à sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da DAC.

Os achados histopatológicos das biópsias cutâneas de cães atópicos são caracterizados por graus variáveis de dermatite perivascular superficial com predomínio de linfócitos e histiócitos. Mastócitos podem estar aumentados em número. Embora possa ocorrer eosinofilia tecidual branda, este achado não é comum nos exames histopatológicos de rotina. A presença de intensa eosinofilia tecidual sugere outras doenças ou patologia concomitante. Agregados intraepidermais focais de eosinófilos ou células de Langerhans podem ser encontrados. A presença de numerosos neutrófilos, células plasmáticas, ou ambos indicam infecção cutânea, na maioria das vezes causada por *Staphylococcus intermedius*. No entanto, o exame histopatológico não confirma um diagnóstico de dermatite atópica. Ele deve ser utilizado para descartar outras hipóteses diagnósticas e para sugerir a necessidade de outros testes diagnósticos (SCOTT et al., 2001).

Existe um consenso entre os dermatologistas para que outras hipóteses diagnósticas de doenças pruriginosas devam ser descartadas, tais como escabiose, hipersensibilidade à picada de pulgas e a alimentos. Uma vez confirmada a suspeita inicial de dermatite atópica, o clínico deve utilizar os testes alérgicos para substanciar o diagnóstico. Os testes alérgicos disponíveis em medicina veterinária são os testes intradérmicos e os testes sorológicos para quantificação de anticorpos IgE ou IgG alérgeno-específicos. Os principais objetivos destes testes são selecionar alérgenos candidatos para a imunoterapia e servir como base para a instituição de medidas que possam minimizar a exposição dos pacientes aos alérgenos identificados (DeBOER & HILLIER, 2001).

Os testes sorológicos disponíveis comercialmente para uso veterinário possuem baixa especificidade e, portanto, não devem ser recomendados para o diagnóstico da DAC. Eles podem ser úteis, quando associados aos testes intradérmicos, na escolha de alérgenos que devem ser incluídos na imunoterapia. Os testes intradérmicos parecem ser superiores aos testes de escarificação cutânea, aos de puntura (prick test) e aos sorológicos (SCOTT et al., 2001). Os testes intradérmicos são utilizados em medicina humana e veterinária por muitas décadas. O objetivo destes testes é a demonstração de hipersensibilidade a alérgenos mediada por IgE. A presença de uma reação positiva nem sempre indica doença alérgica, podendo algumas vezes indicar hipersensibilidade subclínica (HILLIER & DeBOER, 2001).

A seleção dos alérgenos utilizados no teste irá variar de acordo com a região onde o paciente vive. As informações sobre os alérgenos mais importantes para cães em

cada localização podem ser obtidas de veterinários particulares da região, faculdades de veterinária locais, laboratórios de alérgenos que fornecem alérgenos para os testes cutâneos ou que oferecem sorologia para quantificação de IgE alérgeno-específica, ou de livros texto de dermatologia e alergia veterinária (REEDY et al., 1997). Outras informações também podem ser obtidas de médicos-alergologistas da região, de faculdades de medicina e agências de climatologia. Porém, o veterinário-alergologista deve estar ciente de que alérgenos de importância em medicina humana não são necessariamente importantes para cães e que, mesmo dentro de zonas definidas de polinização, pode haver uma grande variabilidade na vegetação e nas condições climáticas (HILLIER & DeBOER, 2001).

Para que os resultados dos testes alérgicos sejam fidedignos se faz necessária a padronização dos extratos alérgênicos (DREBORG, 1993; Position Statement: AAAAI, 1997). A primeira tentativa de padronização de extratos alérgênicos foi desenvolvida por NOON (1911), que propôs o tratamento etiológico da “febre do feno” em humanos, causada por pólen. O objetivo de NOON era injetar extratos de polens em indivíduos doentes para que houvesse a produção de antitoxinas que neutralizassem as toxinas dos pólenes. NOON chamou atenção para a importância de poder determinar a quantidade do princípio ativo introduzido em seus pacientes, e criou seu próprio método de controle, até hoje utilizado por alguns grupos. Com o objetivo de expressar a potência do extrato, definiu a “unidade” de toxina polínica como aquela quantidade que podia ser extraída de 1µg de pólen de *Phleum*. Desta forma, estabelecia um sistema numérico que permitia designar uma quantidade, em qualquer extrato, em Unidades Noon/ml. O conceito de toxina era incorreto, assim como o de unidades Noon, pois supunha que da mesma quantidade em peso de matéria prima, sempre se podia extrair a mesma quantidade do princípio ativo, o que é totalmente falso. A unidade Noon tem sido utilizada até hoje com o nome de seu autor ou pela denominação de relação peso/volume e, portanto, as objeções feitas para a unidade Noon são igualmente válidas para a relação peso/volume (CARREIRA, 1992).

Na década de 30 já se aceitava que a maioria dos alérgenos eram proteínas e STULL et al. (1933) sugeriram que a quantidade de proteína de um extrato representaria um bom método para controlar extratos alérgênicos. Admitiu-se que toda a proteína de um extrato poderia ser precipitada com ácido fosfotúngstico e que o nitrogênio medido no precipitado representaria a proteína total. Desta forma, se estabeleceu a unidade de nitrogênio protéico, comumente conhecida como PNU, na qual 1 PNU representa a quantidade de nitrogênio protéico correspondente a 62 ng de proteína. Porém, a quantidade total de proteína de um extrato não representa, de forma alguma, seu conteúdo em atividade alérgênica ou proteína alérgênica ativa. A maior parte de um extrato alérgênico é composta por proteína não relacionada com fenômenos alérgicos e, o que é mais importante, a relação entre proteína alérgicamente ativa e alérgicamente inerte varia enormemente, não somente entre espécies, mas também entre lotes da mesma espécie. Além disso, alguns alérgenos importantes podem ser instáveis ao calor ou à degradação enzimática em certas condições de manipulação e armazenamento (CARREIRA, 1992).

Em 1978 AAS et al. publicaram o primeiro método de padronização biológica elaborado de forma sistemática, que é reconhecido como método Europeu de padronização de alérgenos. A técnica eleita foi o teste cutâneo de puntura e a avaliação da atividade biológica total, que representa o somatório das atividades individuais de todos os alérgenos do extrato, está baseada unicamente na reatividade cutânea dos pacientes sensíveis. Portanto, é de extrema importância a seleção correta dos indivíduos testados, que devem possuir teste de puntura positivo, história clínica compatível e IgE

específica ao alérgeno em questão. Além disso, a reatividade cutânea desses indivíduos não pode estar alterada por imunoterapia prévia ou utilização de drogas para tratamento sintomático.

No método de AAS (1978), os pacientes selecionados (ente 10 e 20) devem ter história clínica compatível, teste de puntura positivo, RAST de classe 2 ou mais ao alérgeno objeto de estudo, e uma pápula com histamina a 10mg/ml maior ou igual a 6mm de diâmetro médio no teste de puntura. Desta forma, àquele extrato que produz uma pápula igual a da histamina a 10mg/ml atribui-se 10 HEP (Histamine Equivalent Prick), isto é, uma atividade biológica capaz de produzir, por puntura, uma reação média igual à gerada pela solução de histamina a 10mg/ml. Ao extrato com 10 HEP de atividade alergênica foi designado 10.000 Unidades Biológicas/ml. Porém, a utilização da histamina exógena como pré-referência introduz uma variável desnecessária, pois a histamina não é o único mediador da reação alérgica, induz à máxima resposta cutânea em tempo diferente da resposta ao alérgeno, possui uma grande variabilidade de respostas, não apresenta uma boa correlação de respostas com os alérgenos quando utilizada em maiores concentrações e o tamanho da reação cutânea, por ela produzida, depende se o indivíduo estudado é normal, pouco ou muito alérgico (CARREIRA, 1992).

Em 1979, BRIGHTON et al. propuseram uma nova definição de unidade de atividade biológica para extratos alergênicos na qual um extrato alergênico, livre de irritantes, contém uma atividade de 100 unidades biológicas por ml (BU/ml) quando, através de teste de puntura em 30 pacientes clinicamente sensíveis ao extrato em questão, produz uma pápula cuja média geométrica tem 75mm².

Em 1982, TURKELTAUB propôs um método de padronização biológica em unidades de atividade alergênica (Allergy Unit/ml) no qual, através de teste intradérmico, pacientes altamente sensíveis são testados com quatro diluições do extrato objeto de estudo em distintas diluições seriadas em um fator de 3. A primeira diluição é aquela em que o eritema é aproximadamente igual à pápula e as três seguintes são as imediatamente mais concentradas. O tamanho do eritema é calculado em milímetros pela soma do diâmetro maior com o diâmetro perpendicular ao ponto médio do maior. A diluição que proporciona um eritema cuja soma de diâmetros é igual a 50 milímetros é denominada de D50. Os extratos mais ativos necessitam de diluição de 3⁻¹⁴ para produzir um eritema de 50 milímetros, o que se traduz por uma D50=14. Por definição, a estes extratos mais potentes são designadas 100.000 AU/ml. Grupos são formados de tal forma que uma D50 média igual a 14 inclui diluições de 13 a 15, uma D50 igual a 12 diluições de 11 a 13 e assim sucessivamente. Desta forma qualquer extrato ativo pode ser incluído dentro de um grupo de atividade e receber Unidades de Alergia (TURKELTAUB, 1982).

A criação de extratos referência, com atividade biológica determinada mediante ensaios *in vivo* e expressa em Unidades Biológicas, é uma condição indispensável em qualquer programa de padronização. Extratos referência ou padrão são comparados, através de métodos *in vitro* ou *in vivo*, com os extratos destinados ao uso clínico. O método mais empregado é o RAST de inibição, o qual permite averiguar a atividade biológica de qualquer extrato sempre que se disponha de uma referência da mesma espécie (LOMBARDERO et al., 1986). A atividade biológica de um extrato representa a soma das atividades individuais de cada um dos alérgenos que compõe o extrato e, obviamente, a composição alergênica de todo extrato destinado ao uso clínico deve ser um reflexo da composição alergênica do material que sensibilizou o paciente. Por muitas razões, em especial por diferenças na matéria prima e na manipulação do material, é possível que algum extrato não contenha algum alérgeno importante.

Portanto, é indispensável o conhecimento da presença ou ausência de, pelo menos, alérgenos mais importantes tanto em extratos referência quanto nos de uso clínico. As principais técnicas que podem fornecer estas informações são: imunoelektroforese (IEF), contraimunoelektroforese (CIE), focalização isoelétrica e immunoblotting. Todas são complexas e algumas como a CIE, às vezes, difíceis de reproduzir quando reativos diferentes são utilizados. Portanto, é extremamente importante a utilização de pelo menos duas técnicas para cada extrato (CARREIRA, 1992).

Cada extrato alergênico é composto por um grande número de proteínas. Somente algumas (entre 5 e 10) são alérgenos identificáveis por técnicas de laboratório. A importância relativa de cada alérgeno no extrato é algo que deve ser bem estudado. Alguns alérgenos são absolutamente majoritários, de tal forma que 100% dos pacientes sensíveis à espécie são sensíveis a ele e outros têm uma relevância intermediária – ambos são chamados de alérgenos principais ou *major*. Ainda existem aqueles que muito poucos pacientes demonstram IgE específica – chamados de alérgenos minoritários ou *minor*. Algumas espécies têm um único alérgeno relevante, outras têm dois, três ou mais. Em alguns casos os alérgenos importantes apresentam reatividade cruzada entre si ou com alérgenos menos importantes da mesma espécie (VENTAS et al., 1991).

Diz-se que um alérgeno é um alérgeno principal ou *major* quando, pelo menos, 50% dos pacientes alérgicos ao conjunto de alérgenos da espécie possuem IgE específica para ele. O método de quantificação de extratos alergênicos em unidades de massa (UM) visa determinar com precisão a quantidade de cada alérgeno principal no estado ativo e expressar suas quantidades em µg ou ng de proteína por mililitro. Desta forma, pode-se considerar que um extrato alergênico é quantificado em UM/ml quando se pode definir que para um total de 100 BU/ml, por exemplo, existe ‘X’ µg do alérgeno 1, ‘Y’ µg do alérgeno 2, ‘Z’ µg do alérgeno 3. Os demais alérgenos, cuja prevalência de IgE não supera os 50% dos pacientes, devem estar presentes nestes extratos, ainda que não quantificados em unidades de massa. Quantificar um alérgeno em UM/ml implica numa série de passos sucessivos cuja investigação é grande, complexa e às vezes difícil. As etapas mais importantes podem ser resumidas da seguinte maneira: identificação de alérgenos clinicamente relevantes ($\geq 50\%$); purificação do alérgeno mediante técnicas convencionais de purificação de proteínas; confirmação de que o alérgeno purificado produz reação cutânea em pelo menos 50% dos pacientes alérgicos ao extrato completo e de que, aproximadamente, este mesmo percentual de pacientes possui IgE específica no soro; obtenção de anticorpos monoclonais, em ratos, capazes de reconhecer o alérgeno e que tenham especificidade e afinidade adequadas; realização de imunoensaio que permita quantificar o alérgeno purificado e, por comparação a ele, o mesmo alérgeno em uma mistura complexa onde exista outras proteínas alergênicas e não alergênicas; determinação das concentrações relativas dos alérgenos em espécies com mais de um alérgeno principal; e determinação da relação entre quantidade de proteína alergênica e atividade biológica (CARREIRA, 1992).

Até o momento, ainda não foram produzidos extratos alergênicos padronizados para o diagnóstico de doenças atópicas em animais. Os extratos utilizados em medicina veterinária são padronizados de forma inespecífica em peso/volume (w/v) ou em unidades de nitrogênio protéico/mililitro (PNU/ml) (HILLIER & DeBOER, 2001; REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001; ZUR et al., 2002). A padronização de extratos alergênicos para cães e a homogeneização dos critérios para a interpretação dos resultados, deverão melhorar em muito a eficácia dos testes intradérmicos para o diagnóstico da dermatite atópica canina (HILLIER & DeBOER, 2001).

O uso de misturas de alérgenos não relacionados deve ser evitado. Em princípio, somente alérgenos com reatividade imunológica cruzada conhecida na espécie testada devem ser misturados num único extrato. Em cães, a reatividade cruzada entre alérgenos de *Dermatophagoides* dos grupos 1 e 2 já é conhecida (MASUDA et al., 1999). Extratos de poeira domiciliar não devem ser utilizados, pois podem conter quantidades variáveis de ácaros da poeira domiciliar, descamações, fungos, insetos, polens e outros materiais não alergênicos. Extratos alergênicos da poeira domiciliar produziram reações positivas em somente 56% dos cães com reatividade positiva a ácaros individuais da poeira domiciliar (HILLIER et al., 2000). Portanto, a recomendação é de que somente extratos contendo alérgenos individuais devem ser utilizados para teste intradérmico em cães (HILLIER & DeBOER, 2001).

As soluções controle são usadas para avaliação da reatividade cutânea e para facilitar a gradação das reações aos extratos alergênicos. A solução de controle positivo mais comumente utilizada é o fosfato de histamina a 0,01% (BENSIGNOR & CARLOTTI, 2002) ou a 0,001% (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). Recentemente, HENSEL et al. (2004) compararam estas duas concentrações de histamina em 30 cães saudáveis e concluíram que a concentração ótima para a utilização como controle positivo nos testes intradérmicos em cães é a de 1: 10.000 w/v (0,01%). A solução de controle negativo deve ser composta por solução diluente usada na diluição dos extratos alergênicos, mais comumente salina tamponada e fosfatada a 0,9% (REEDY et al., 1997).

Muitas drogas podem alterar a reatividade aos alérgenos utilizados no teste intradérmico. O único anti-histamínico avaliado em cães em relação à reatividade cutânea foi a hidroxizine. Na dosagem de 3mg/kg duas vezes ao dia, observou-se a supressão da reatividade cutânea à histamina e antígenos de pulgas por até nove dias. Na ausência de outros trabalhos publicados sobre os efeitos dos anti-histamínicos na reatividade cutânea com testes intradérmicos, recomenda-se a interrupção destas drogas por pelo menos dez dias antes da realização dos testes (HILLIER & DeBOER, 2001). O período de interrupção após o uso de anti-histamínicos com ação mais duradoura, como a cetirizina e astemizol, pode ser maior, como ocorre em humanos (JUNIPER et al., 1988). Os efeitos dos glicocorticóides na reatividade cutânea são dependentes da formulação e potência utilizados, assim como da dosagem, frequência de administração, duração do tratamento, e fatores individuais do paciente. Glicocorticóides tópicos reduzem as reações cutâneas imediatas e as de fase lenta em humanos (PIPKORN et al., 1989). A recomendação para a interrupção de glicocorticóides tópicos e de uso oral antes dos testes cutâneos é de 3 semanas e, de glicocorticóides injetáveis 8 semanas (SCOTT et al., 2001). Outras drogas que podem afetar a reatividade cutânea nos testes intradérmicos incluem compostos com progesterona, antidepressivos tricíclicos e agonistas β -2 adrenérgicos. Porém o efeito destas drogas nos cães ainda não foi avaliado (HILLIER & DeBOER, 2001).

No momento do teste intradérmico o paciente não deve ter a pele inflamada ou infeccionada. Se lesões cutâneas primárias ou secundárias estão presentes, os pontos de injeção intradérmica devem estar distantes o suficiente destas lesões para permitir a interpretação da reatividade cutânea (HILLIER & DeBOER, 2001). A reatividade cutânea parece não variar nas diferentes regiões do corpo, e por convenção ou hábito, a maioria dos veterinários dermatologistas encolhe a área do tórax lateral para a realização do teste intradérmico (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). O local é suavemente tricotomizado com uma lâmina de tosa número 40 e não deve ser lavado ou escovado. Os pontos para as injeções intradérmicas são marcados com caneta a prova d'água e separados por uma distância mínima de 3 cm (HILLIER & DeBOER, 2001).

Os testes intradérmicos podem ser realizados em cães sem sedação, porém é importante que esses cães não fiquem estressados, com conseqüente hipercortisolemia, o que poderia afetar adversamente a reatividade cutânea (FRANK et al., 1992). Contudo, a maioria dos veterinários dermatologistas prefere sedar os animais para facilitar as aplicações dos extratos e as leituras das reações. Sedativos e anestésicos que não afetam a reatividade cutânea e, portanto, são aceitáveis para a realização dos testes intradérmicos incluem a xylazina, medetomidina, tiletamina com zolazepam, thymilal, halotano, isoflurano e methoxyflurano. Sedativos e anestésicos que podem alterar a reatividade cutânea e que, portanto, não devem ser utilizados para a realização dos testes intradérmicos incluem a oxymorfina, ketamina com diazepam, acepromazina e propofol (HILLIER & DeBOER, 2001).

As injeções intradérmicas de soluções-controle e de extratos alergênicos são administradas através de seringas de 1,0ml ou de tuberculina, com agulhas de 0,5 a 0,75 mm. Tipicamente, um volume de 0,05 ml de solução controle ou extrato alergênico é injetado por via intradérmica. A quantidade de solução injetada é menos importante do que a concentração dos extratos (MALLING, 1993). Embora volumes de 0,02-0,1ml já tenham sido utilizados, a maioria dos dermatologistas injeta 0,05ml de alérgenos ou soluções controle (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001) Após as aplicações corretas dos extratos alergênicos e das soluções-controle, observa-se uma elevação esbranquiçada na pele. As seringas não devem conter bolhas de ar, pois se injetadas por via intradérmica podem dificultar a interpretação das reações. Agulhas sem corte, grossas demais ou técnica traumática podem provocar hemorragias nos pontos de aplicação, dificultando desta forma a interpretação das reações (HILLIER & DeBOER, 2001).

As reações cutâneas imediatas são lidas em 15 a 20 minutos após as injeções. As reações podem ser avaliadas de forma subjetiva (avaliação da intensidade e/ou tamanho do eritema e turgidez) ou objetivamente (medida do diâmetro ou área de eritema ou pápula) (HILLIER & DeBOER, 2001). Os critérios utilizados para considerar uma reação como positiva ou negativa variam amplamente, e ainda não foram criteriosamente avaliados em medicina veterinária. As reações podem ser consideradas positivas quando são iguais ou maiores que a média dos diâmetros dos controles positivo e negativo, ou quando são pelo menos 3 mm maiores que o controle negativo (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001).

As reações de fase lenta ou LPR (Late Phase Reaction) são consideradas reações mediadas por IgE e estão sendo intensamente investigadas em medicina humana. Porém, parâmetros para a graduação e interpretação destas reações ainda não foram estabelecidos para humanos. Da mesma forma, essas reações ainda não foram convenientemente estudadas em Medicina Veterinária e, portanto, não se sabe sobre sua importância clínica e se são mais importantes que as reações imediatas (HILL et al., 2001).

O tratamento da DAC é multifacetado e consiste de uma combinação de ações que incluem o evitar os alérgenos, agentes antiinflamatórios, imunoterapia alérgeno-específica e drogas antimicrobianas. Na maioria dos cães com dermatite atópica, tanto a eliminação de alérgenos e prevenção de contato com alérgenos são difíceis de alcançar e resposta à farmacoterapia frequentemente é insatisfatória. Nestes casos, a possibilidade de modular a resposta imune resultante da exposição ao alérgeno é interessante. Este conceito conduziu ao desenvolvimento da imunoterapia alérgeno específica ou SIT (Specific Immunotherapy), também conhecida como hipossensibilização, dessensibilização e “vacinação” para alergia (OLIVRY & SOUZA, 2001).

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) especificou um guia para SIT em pacientes alérgicos humanos. Agora definida como “a prática da administração de quantidades gradualmente aumentadas de um extrato alergênico para um indivíduo alérgico com o intuito de atenuar os sintomas associados com a exposição subsequente a um alérgeno causador” (BOUSQUET et. al., 1998). A imunoterapia não é indicada para todo paciente com dermatite alérgica (OLIVRY & SOUZA, 2001) e a OMS propôs que a “imunoterapia é indicada para pacientes que demonstram evidências de anticorpos IgE específicos à alérgenos clinicamente relevantes e nos quais os sintomas alérgicos justifiquem o tempo e o risco envolvidos com a imunoterapia alergênica” (BOUSQUET et. al., 1998). Imunoterapia é a única opção de tratamento disponível com o potencial de induzir à remissão parcial ou completa da DAC sem a necessidade do uso de drogas antiinflamatórias adicionais (OLIVRY & SOUZA, 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção dos Animais

Foram selecionados 20 cães saudáveis, sem histórico ou sintomatologia de dermatite alérgica de qualquer origem, com histórico conhecido desde os primeiros meses de vida e pertencentes a clientes de consultórios ou clínicas particulares (Grupo Controle) e 25 cães com histórico e clínica compatíveis com dermatite alérgica (Grupo Alérgico), atendidos devido a problemas dermatológicos em clínicas e consultórios particulares na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, onde foram realizados os testes intradérmicos. Os testes intradérmicos só foram realizados após a autorização dos proprietários e sem ônus para os mesmos, os quais estavam cientes do caráter experimental do procedimento.

O Grupo Controle foi representado por animais com idades entre 10 meses e 10 anos, sendo 7 Yorkshires, 4 sem raça definida, 2 Pastores Alemães, 2 Dinamarqueses, 1 Lhasa Apso, 1 Weimaraner, 1 Rotweiller, 1 Collie e 1 Pequinês. O Grupo Alérgico foi representado por animais com idades entre 12 meses e 11 anos, sendo 8 Poodles, 3 Pastores Alemães, 3 Cockers Spaniels Ingleses, 2 Beagles, 2 Teckels, 1 Bulldog Inglês, 1 West Highland White Terrier, 1 Schnauzer Miniatura, 1 Bichon Frisé, 1 Bull Terrier, 1 American Staffordshire Terrier e 1 sem raça definida.

3.2. Diagnóstico de Dermatite Alérgica

O diagnóstico de dermatite alérgica foi realizado através da análise do histórico e dos achados clínicos, conforme critério sugerido por Willense (1986) para o diagnóstico de Dermatite Atópica Canina (DAC) (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios diagnósticos sugeridos por WILLENSE (1986) para a Dermatite Atópica Canina

| Critérios maiores (no mínimo três) | Critérios menores (no mínimo três) |
|---|--------------------------------------|
| Prurido | Início dos sintomas entre 1 e 3 anos |
| Morfologia e distribuição das lesões: acometimento facial e/ou digital | Eritema facial |
| liquenificação do jarrete e/ou carpo cranial | Conjuntivite bilateral |
| Dermatite crônica ou recidivante | Pioderma superficial |
| Predisposição racial ou histórico familiar | Reações positivas no teste ID |
| | Hiperidrose |
| | IgGd alérgeno-específica elevada |
| | IgE alérgeno-específica elevada |

As principais alterações clínicas observadas no Grupo Alérgico foram piodermite (92%), otite externa ou eritema das pinas (88%), pododermatite (88%), dermatite periocular (44%) e dermatite da região flexora da articulação do cotovelo (44%) (Figura 1). Todos os animais apresentavam prurido.

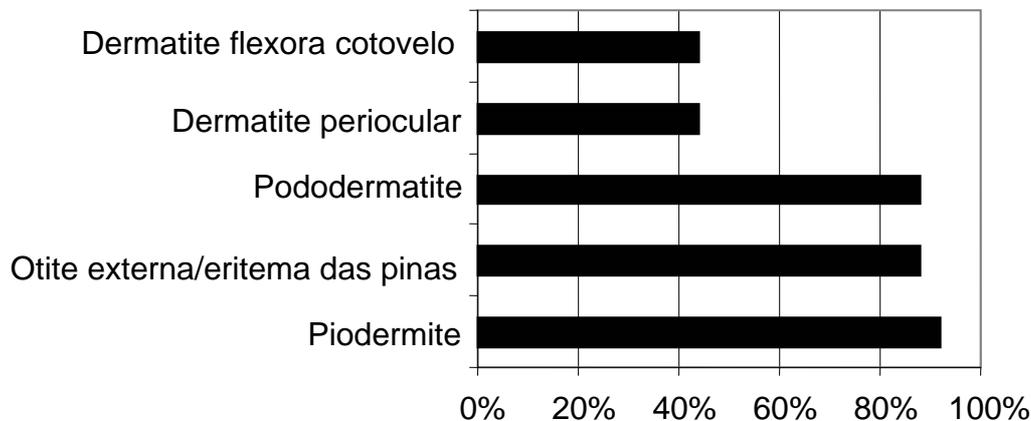


Figura 1. Principais alterações clínicas observadas em animais que compuseram o Grupo Alérgico.

Para que animais com dermatite alérgica a pulgas não fossem incluídos no Grupo Alérgico, todos os casos que apresentavam histórico de pulgas nos três meses antecedentes à consulta ou que apresentavam pulgas ou fezes de pulgas ou dermatite/alopecia na região lombo-sacro durante a consulta foram excluídos, conforme recomendado por (LAFFORT-DASSOT et al., 2004). Além disso, todos os cães do Grupo Alérgico recebiam tratamento mensal para o controle de pulgas com produtos de ação residual (fipronil ou imidaclopride). Para a exclusão de dermatites pruriginosas de origem parasitária, tais como escabiose, demodicose e otoacaríase, foram realizados em 14 cães raspados cutâneos e/ou triagens acaricidas (ivermectina 0,3 mg/kg SC 2 aplicações com intervalo de 14 dias). Três cães foram biopsados e o exame histopatológico de lesões cutâneas possibilitou o descarte de outras possibilidades diagnósticas além de revelar alterações compatíveis com dermatite alérgica. Culturas para dermatófitos negativas foram obtidas de 2 animais e triagens hipoalergênicas com dietas comerciais foram conduzidas em 7 (Purina Veterinary Diets HA[®] em 5 cães e Eukanuba FP[®] em 2 cães), os quais não demonstraram sequer melhora parcial do quadro pruriginoso.

Sempre que infecções secundárias causadas por bactérias ou leveduras foram diagnosticadas, por exame clínico ou citológico, realizou-se o tratamento sistêmico específico (cefalexina 22 a 30mg/kg bid ou cetoconazol 10mg/kg bid), durante no mínimo três semanas e associado ao tratamento tópico com xampus a base de clorexidina a 2% ou peróxido de benzoíla a 2,5 a 3,5 % duas vezes por semana. Somente após a resolução das infecções secundárias os animais foram submetidos aos testes cutâneos.

3.3. Extratos alérgênicos

Os extratos alérgênicos das cinco espécies de ácaros testados foram fornecidos pela FDA-Allergenic laboratório de antígenos (Rua da Abolição, 413 – Rio de Janeiro – Brasil), representante exclusivo no Brasil da ALK-ABELLÓ (DK-2970, Horsholm – Dinamarca) laboratório de antígenos (Figura 2).



Figura 2. Frascos contendo extratos alergênicos de ácaros da poeira domiciliar padronizados pela ALK-ABELLÓ – Laboratório de Antígenos, utilizados nos testes intradérmicos.

Os extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* e *Lepidoglyphus destructor* eram padronizados em unidades de massa (UM), enquanto que os extratos de *Blomia tropicalis* e *Tyrophagus putrescentiae* eram padronizados em unidades biológicas (BU). Extratos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae* apresentavam em sua composição 0,4 µg/ml de Der p 1 e Der f 1 e 0,2 µg/ml de Der p 2 e Der f 2, respectivamente, equivalentes a 1 BU/ml de atividade biológica. Extratos de *L. destructor* possuíam 0,3 µg/ml de Lep d 1 equivalente a 1BU/ml. Extratos de *B. tropicalis* e *T. putrescentiae* apresentavam atividade biológica de 1BU/ml.

3.4. Soluções Controle

Em todos os casos, soluções de controle positivo (fosfato de histamina 0,01%) e controle negativo (solução salina tamponada e fenicada) foram utilizados para a confirmação de reatividade cutânea e para possibilitar a gradação das reações aos extratos alergênicos.

3.5. Preparação dos Pacientes

Conforme recomendado, a administração de alguns fármacos foi interrompida antes da realização dos testes cutâneos. O tempo mínimo de interrupção foi de 1 semana para anti-histamínicos, 3 semanas para corticoidoterapia oral e 8 semanas para corticoidoterapia injetável (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). Sempre que necessário, a contenção com fármacos que não interferem na reatividade cutânea (tiletamina com zolazepan 4mg/kg IV ou xylazina 0,25 a 0,5 mg/kg IV) foi realizada (REEDY et al., 1997).

A área lateral do tórax foi escolhida para a realização dos testes. A região foi tricotomizada com uma lâmina de tosa número 40 e os pontos para a aplicação dos extratos foram marcados com caneta marcador de retroprojeter (resistente à água), com uma distância mínima entre eles de 3 cm (Figura 3).



Figura 3. Ilustração da área lateral do tórax, tricotomizada e com as marcações dos pontos para a inoculação dos extratos alergênicos e soluções controle.

3.6. Técnica de Aplicação dos Extratos e Soluções Controle

Os extratos alergênicos e as soluções controle foram inoculados por via intradérmica com seringas de insulina (1ml) e agulhas com 0,5 mm de calibre, estéreis e descartáveis (Figura 4). O volume injetado dos extratos e das soluções controle, em todos os casos, foi de 0,05ml.



Figura 4. Inoculação intradérmica dos extratos alergênicos durante realização de teste intradérmico em animal pertencente ao Grupo Alérgico.

3.7. Interpretação das Reações

As reações cutâneas foram avaliadas objetivamente entre 15 e 20 minutos após as injeções. Para que uma reação fosse considerada positiva, o diâmetro do eritema tinha que ser igual ou maior que a média dos diâmetros dos controles positivo e negativo (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001) (Figura 5).

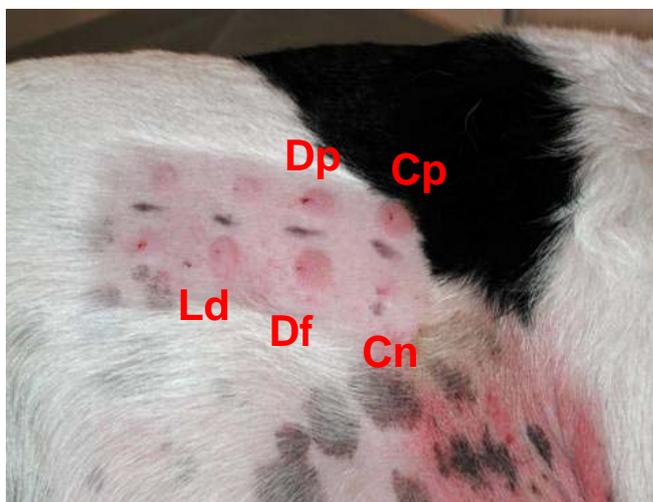


Figura 5. Teste intradérmico positivo para extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *D. farinae* (Df) e *Lepidoglyphus destructor* (Ld). Controle positivo (Cp) e Controle negativo (Cn).

3.8. Determinação da Sensibilidade, Especificidade, Valor preditivo positivo e Valor preditivo negativo do teste intradérmico

A determinação das estimativas de validade supracitadas foi realizada da seguinte forma (PEREIRA, 1995):

- . Sensibilidade (%) = verdadeiros positivos / verdadeiros positivos + falso-negativos X 100;
- . Especificidade (%) = verdadeiros negativos / verdadeiros negativos + falso-positivos X 100;
- . Valor preditivo positivo (%) = verdadeiros positivos / verdadeiros positivos + falso-positivos X 100;
- . Valor preditivo negativo (%) = verdadeiros negativos / verdadeiros negativos + falso-negativos X 100.

3.9. Análise Estatística

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para avaliar se houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência de reações positivas encontradas nos dois grupos testados (SAMPAIO, 2002). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos para a comparação dos grupos. As *odd ratios*, calculadas para um intervalo de confiança de 95%, foram utilizadas para avaliar se cães pertencentes ao Grupo Alérgicos apresentavam maiores chances de reagir positivamente ao teste intradérmico do que os cães do Grupo Controle (PEREIRA, 1995). O software utilizado para a análise estatística foi o SPSS versão 13.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 20 cães normais testados, apenas 1 animal (5%) reagiu positivamente ao teste intradérmico enquanto que, dos 25 cães com dermatite alérgica, 14 (56%) demonstraram reações positivas (Tabela 2). Cães com dermatite alérgica tiveram 24,2 (2,79 – 209,76; IC 95%) vezes mais chances de responder a pelo menos 1 extrato do que os cães normais. O único animal que reagiu positivamente no Grupo Controle apresentou reações aos extratos de *B. tropicalis* e *T. putrescentiae*. As reações positivas em animais normais podem ocorrer devido à hipersensibilidade subclínica, técnica imprópria, pele irritada, ou extratos alergênicos irritantes devido à alta concentração ou contaminados (HILLIER & DeBOER, 2001). As concentrações dos extratos utilizados não foram consideradas irritantes, pois, conforme recomendado por REEDY et al. (1997), a prevalência de reações positivas em cães normais situou-se abaixo dos 10%.

Tabela 2. Resultados dos testes intradérmicos nos grupos Controle e Alérgico.

| Grupo | Positivo | | Negativo | | Total | |
|----------|----------|----|----------|----|-------|-----|
| | n | % | n | % | n | % |
| Alérgico | 14 | 56 | 11 | 44 | 25 | 56 |
| Controle | 1 | 5 | 19 | 95 | 20 | 44 |
| Total | 15 | 33 | 30 | 67 | 45 | 100 |

No Grupo Alérgico, 11 cães reagiram positivamente a mais de um extrato e 3 obtiveram reações positivas somente ao extrato de *T. putrescentiae*. As maiores freqüências de reações positivas foram observadas com os extratos de *L. destructor* e *T. putrescentiae*, ambos responsáveis por reações em 10 (40%) animais. Em 7 (28%) cães observou-se resposta positiva ao extrato de *D. farinae* e em 3 (12%) aos extratos de *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* (Figura 6). Esses resultados ressaltam a importância da inclusão de extratos de ácaros de produtos armazenados na bateria de alérgenos utilizada na cidade do Rio de Janeiro para o diagnóstico da dermatite atópica canina.

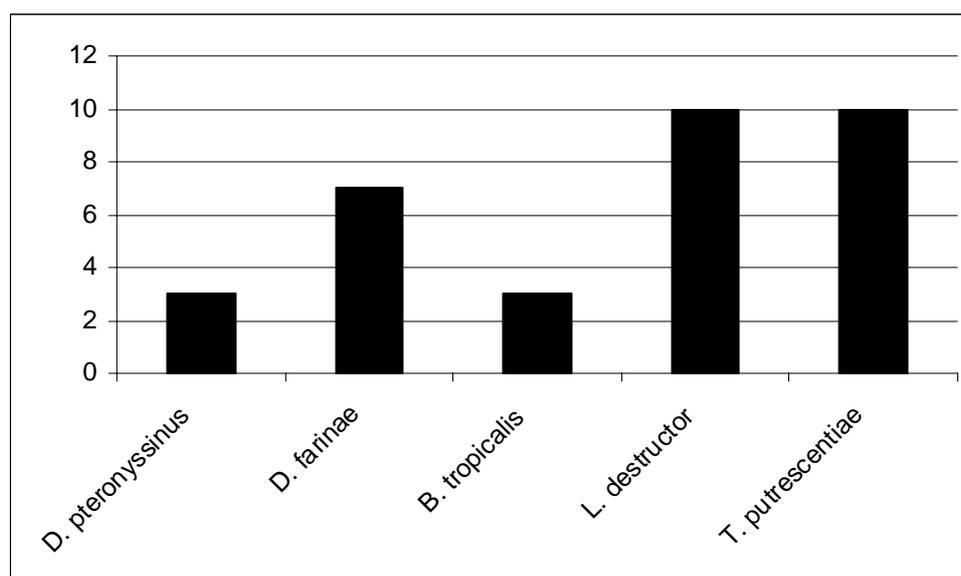


Figura 6. Reações positivas observadas na leitura imediata no Grupo Alérgico.

Diferentemente dos resultados encontrados por MUELLER et al. (2005), que não encontraram diferenças significativas entre as reações de 21 cães normais e 26 cães com dermatite atópica, submetidos ao teste intradérmico com diferentes concentrações de extratos de *T. putrescentiae*, o presente trabalho demonstrou uma diferença significativa ($p < 0,05\%$) na prevalência de reações positivas ao extrato de *T. putrescentiae* entre os grupos Controle e Alérgico. No entanto, além das enormes diferenças climáticas, as concentrações dos extratos alergênicos utilizadas no trabalho citado consistiam de unidades protéicas por mililitro (PNU/ml) e neste estudo de unidades biológicas por mililitro (BU/ml) e, portanto, qualquer tentativa de comparação entre os resultados torna-se impossível.

Todos os 14 cães que demonstraram reações positivas no Grupo Alérgico reagiram aos extratos de *L. destructor* e/ou *T. putrescentiae*, sendo que 6 (43%) animais reagiram positivamente a ambas espécies de ácaros. Conforme demonstrado por TEE (1994), uma forte reação cruzada entre estes ácaros de produtos armazenados pode ocorrer, o que pode ter influenciado o aparecimento de algumas destas reações. A alta prevalência (10/24) de reações positivas ao *T. putrescentiae* sugere ser esta espécie de ácaro comum no ambiente onde vivem os cães. Embora BINOTTI et al. (2001) tenham afirmado que *T. putrescentiae* não havia sido até então diagnosticado na cidade do Rio de Janeiro, esta espécie é comumente diagnosticada em materiais recebidos pelo Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ (FACCINI, J.L.H., comunicação pessoal), como poeira domiciliar e alimentos.

As reações cruzadas também podem ocorrer entre espécies de *Dermatophagoides* (CHAPMAN et al., 1987), entre *B. tropicalis* e *Dermatophagoides*, e entre ácaros da poeira domiciliar e antígenos de insetos (SCOTT et al., 2001). Uma forte reatividade cruzada parece ocorrer entre os grupos 1 e 2 de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* em humanos (CHAPMAN et al., 1987) e cães (HILLIER & De BOER, 2001). O percentual elevado de cães sensíveis a mais de um extrato encontrado neste estudo pode estar relacionado ao aparecimento de reações cruzadas, ou podem indicar a presença das diferentes espécies de ácaros estudadas. Para que as reações cruzadas entre antígenos intraespecíficos ou interespecíficos possam ser reconhecidas e consideradas durante a interpretação dos resultados obtidos com os testes intradérmicos, se faz necessário que as frações antigênicas presentes em cada extrato sejam identificadas, para que estudos imunológicos posteriores possam ser conduzidos com os antígenos isoladamente.

Dois dos 3 cães que demonstraram reações positivas somente ao extrato de *T. putrescentiae* na leitura imediata, apresentaram também reações de fase-lenta ao mesmo extrato, observadas 6 horas após às injeções. Devido à impossibilidade de avaliação direta dos animais 6 horas após a realização dos testes intradérmicos, o aparecimento e interpretação destas reações não foram incluídos na metodologia utilizada. Os proprietários foram alertados no momento do teste para a possibilidade do aparecimento destas reações e, através de contato telefônico, informavam o aparecimento ou não das lesões. As principais alterações relatadas foram endurecimento e vermelhidão no ponto de injeção. Estes relatos são compatíveis com as alterações já descritas na literatura onde, de 6 a 24hs após o teste, se observa espessamento da pele, endurecimento, edema difuso, prurido e eritema (HILL et al., 2001). As reações de fase-lenta são caracterizadas pela presença de infiltrado celular perivascular com predomínio de células mononucleares, principalmente células dendríticas apresentadoras de antígenos CD1+ e células T. O número de eosinófilos e neutrófilos também se encontra aumentado, sendo que o número de eosinófilos é de 2 a 10 vezes maior que o de neutrófilos (OLIVRY et al., 2001). Ao exame histopatológico as reações de fase-lenta

se assemelham mais às lesões de dermatite atópica do que as reações imediatas (OLIVRY et al., 2001). No entanto, o objetivo dos testes intradérmicos é identificar pacientes sensíveis aos extratos testados, e não mimetizar as lesões da dermatite atópica. Até o momento, em medicina veterinária, ainda não se estabeleceu de que forma deve-se realizar a graduação e interpretação destas reações. Questões como o porquê destas reações nem sempre acompanham as reações imediatas ainda não foram respondidas. Portanto, a importância das reações de fase-lenta, após o teste intradérmico para o diagnóstico da dermatite atópica canina, ainda é desconhecida.

Dos 14 cães que demonstraram reações positivas ao teste intradérmico 13 (93%) possuíam histórico de otites e piodermites recidivantes. Estes achados estão de acordo com os encontrados por REEDY et al. (1997) e SARIDOMICHELAKIS et al. (1999), onde otite externa e piodermite bacteriana foram os achados clínicos mais comumente observados em cães com dermatite alérgica. Pododermatite foi observada em 12 (86%) cães, dermatite periocular em 7 (50%) e dermatite da região flexora da articulação do cotovelo em 5 (36%) (Figura 7). A presença de lesões cutâneas nas articulações do carpo e tarso é comumente relatada em diversos estudos (GRIFFIN et al., 1993; REEDY et al., 1997; SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; SCOTT et al., 2001), porém o acometimento de tais regiões não foi observado no Grupo Alérgicos. Esta diferença observada em relação aos trabalhos citados pode-se dever a um padrão de resposta diferente entre as populações estudadas, resultado da exposição a diferentes antígenos, visto que os trabalhos referidos foram realizados em climas temperados, ou devido a diferenças genéticas. Entretanto, o número reduzido de animais incluídos neste estudo impede maiores conclusões e, portanto, tais diferenças merecem futuras investigações.

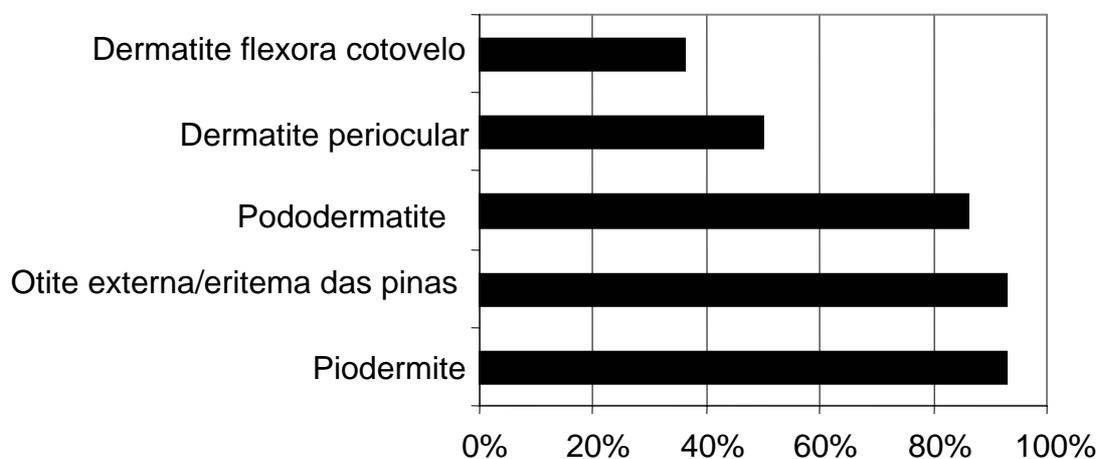


Figura 7. Principais alterações clínicas observadas em animais do Grupo Alérgico que apresentaram reações positivas no teste intradérmico.

Para a investigação da sensibilidade cutânea de cães a extratos alergênicos, a maioria dos autores avalia apenas animais atópicos, excluindo-se inicialmente a possibilidade de outras hipersensibilidades cutâneas, tais como a dermatite alérgica à pulgas e a alergia alimentar, as quais são clinicamente indistinguíveis da dermatite atópica (GRIFFIN et al., 1993; REEDY et al., 1997; HILLIER & GRIFIN, 2001; SCOTT et al., 2001). Para a exclusão da dermatite alérgica à pulgas leva-se em consideração o histórico de ausência de pulgas e a utilização regular de produtos adulticidas de ação residual e, para a exclusão da alergia alimentar, as dietas de

eliminação com posterior desafio com a dieta original (BENSIGNOR & CARLOTTI, 2002; ZUR et al., 2002). Apesar da metodologia utilizada neste estudo também exigir a ausência de histórico de pulgas por pelo menos três meses antes dos testes e a utilização regular de produtos aduicidas de ação residual para a inclusão no grupo dos cães alérgicos, a possibilidade de alergia à pulgas neste grupo não pode ser totalmente descartada. Todos os animais deste grupo possuíam o histórico de passeios frequentes, convívio com outros animais e visitas regulares a pet shops para banhos e/ou tosas. Além disso, o fato dos proprietários não relatarem a presença de pulgas no histórico também não é suficiente para descartar esta possibilidade diagnóstica. Desta forma, eventuais picadas de pulgas poderiam ter ocorrido, e a importância destes eventos na avaliação da reatividade cutânea aos extratos estudados é desconhecida.

As dificuldades inerentes às triagens hipoalergênicas para a investigação da alergia alimentar acabam dificultando, em muitos casos, a identificação de indivíduos atópicos. Os cães devem ser alimentados por um período mínimo de 8 semanas com uma dieta preferentemente caseira, contendo proteínas nunca antes experimentadas e uma fonte de carboidratos. Dietas comerciais hipoalergênicas compostas por proteínas hidrolizadas também podem ser utilizadas, porém o produto final do processo de hidrólise enzimática destas dietas não deve superar 10 kDa de peso molecular (CAVE & GUILFORD, 2004). As proteínas mais utilizadas nas dietas caseiras são as de carneiro, rã, coelho ou cavalo, dependendo do histórico do paciente. Nenhum outro alimento pode ser oferecido durante este período e medicamentos com ação antiinflamatória devem ser evitados. Se uma melhora nítida dos sintomas for observada durante ou após o período da triagem, deve-se realizar o teste de provocação com a dieta original para que se possa observar o retorno dos sintomas. Neste momento o diagnóstico de alergia alimentar é confirmado (GRIFFIN et al., 1993; REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). Esta investigação diagnóstica pode ser muito difícil ou impossível para alguns proprietários (SCOTT et al., 2001). Embora a triagem hipoalergênica tenha sido indicada para todos os cães do Grupo Alérgico, apenas 7 cães experimentaram tal investigação e nenhum apresentou melhora sequer parcial dos sintomas durante a triagem. Como os proprietários destes cães optaram pelas dietas comerciais com uma única fonte de proteína (Eukanuba FP[®] – 2 cães) ou contendo proteína de soja parcialmente hidrolizada (PVD/HA[®] – 5 casos), a possibilidade de alergia alimentar nestes casos também não pôde ser excluída.

Na metodologia utilizada neste trabalho, que levou em consideração as dificuldades acima descritas, não houve a necessidade da exclusão da possibilidade de alergia alimentar para a inclusão dos cães no Grupo Alérgico. A investigação da dermatite alérgica à pulgas e da alergia a alimentos deve ser realizada sempre que possível, porém, a exclusão destas possibilidades diagnósticas não deve ser condição imprescindível para a realização dos testes cutâneos.

A especificidade e o valor preditivo positivo dos testes foram 95% e 93%, respectivamente. Logo, um resultado positivo no Grupo Alérgico tende a confirmar a presença da hipersensibilidade específica naquele indivíduo. Por outro lado, a sensibilidade e o valor preditivo negativo dos testes foram 56% e 63%, respectivamente e, portanto, um resultado negativo não pode ser interpretado como ausência da doença. Como o objetivo deste estudo consistiu em avaliar os extratos padronizados para humanos disponíveis comercialmente, existe a possibilidade de que as concentrações dos mesmos estivessem abaixo das concentrações limites ideais, o que poderia resultar em reações falso-negativas no Grupo Alérgico. Para a determinação da concentração limite ideal dos extratos de uso clínico, se faz necessário testar animais normais com diferentes concentrações até que se atinja 10% de reações falso-positivas ou irritantes

(HENSEL et al., 2004). Por outro lado, indivíduos do Grupo Alérgico que não responderam aos testes poderiam ser alérgicos a outros antígenos ausentes nos extratos utilizados, como antígenos de alimentos, epitélios, pólenes, fungos ou a outros antígenos de ácaros importantes para cães, mas presentes em baixas concentrações nos extratos padronizados para humanos.

Todos os extratos alergênicos utilizados neste estudo foram padronizados em UB (*B. tropicalis* e *T. putrescentiae*) ou UM (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *L. destructor*). Apesar de padronizados para humanos, tais extratos apresentam algumas vantagens quando comparados aos extratos formulados em PNU ou w/v utilizados até hoje em medicina veterinária. Tanto os métodos de padronização em UB quanto os em UM exigem que todos os alérgenos com importância clínica sejam eles, principais ou não, estejam presentes nos extratos para uso clínico. Tal averiguação normalmente se faz através da comparação com os extratos Referência e a técnica mais comumente utilizada é o RAST de inibição. Desta forma, o clínico tem algum controle sobre o que está usando e, conseqüentemente, poderá obter resultados mais fidedignos. No caso dos extratos padronizados em UM, ainda há a vantagem de possuírem concentrações relativas constantes dos alérgenos principais, de forma a refletir a composição qualitativa e quantitativa do material agressor encontrado no ambiente dos pacientes. Estudos realizados com poeira domiciliar em diversos países demonstraram uma relação de *Der I* e *Der II* surpreendentemente constante e aproximadamente igual a 2 (CARREIRA, 1992). Essas observações sobre o gênero *Dermatophagoides* sugerem que todos os extratos alergênicos destinados para uso clínico devem conter a mesma proporção de *Der I* e *Der II* encontrada nas poeiras domiciliares, como é o caso dos extratos padronizados em UM utilizados no presente estudo. Como cães e humanos convivem no mesmo ambiente domiciliar, estando ambos expostos aos mesmos alérgenos, tais achados podem ter grande utilidade no desejável processo de padronização de extratos alergênicos para o diagnóstico da dermatite atópica canina. A medida em que os alérgenos principais para cães forem sendo identificados e incluídos em quantidades constantes nos extratos alergênicos para diagnóstico, espera-se que ocorra uma diminuição dos resultados falso-negativos com uma conseqüente melhora da sensibilidade dos testes.

5. CONCLUSÃO

Esses resultados indicam que alérgenos de ácaros da poeira domiciliar devem estar envolvidos na etiogênese da doença e que, na ausência de extratos padronizados para cães, extratos alergênicos padronizados para humanos podem ser utilizados para complementar o diagnóstico da dermatite atópica canina, assim como indicar alérgenos candidatos para a imunoterapia alérgeno-específica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASS, K.; BACKMAN, A.; BELIN, L.; WEEKW, B. Standardization of allergen extracts with appropriate methods. *Allergy*, v.33:130, 1978.

AUXILIA, S.T.; HILL, P.B. Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? *Veterinary Dermatology*, v.11: 247-254, 2000.

BAGGIO, D.; AMBROZIO, L.C. Domestic mites in the Brazilian countries. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v.15: A93, 1992.

BAGGIO, D.; AMBROZIO, L.C.; CORDARO, C. Household mites from South American Countries – A review. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v.15: A90, 1992.

BAKER, E. *Small Animal Allergy: A Practical Guide*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1990.

BENSIGNOR, E.; CARLOTTI, D.N. Sensitivity patterns to house dust mites and forage mites in atopic dogs: 150 cases. *Veterinary Dermatology*, v.13: 37-42, 2002.

BINOTTI, R.S.; MUNIZ, J.R.O.; PASCHOAL, I.A.; PRADO, A.P.; OLIVEIRA, C.H.. House dust mites in Brazil – an annotated bibliography. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96(8): 1177-1184, 2001.

BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.; MALLING, H.J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.102: 558-562, 1998.

BRIGHTON, W.D.; TOPPING, M.D.; HENOCQ, E. Activity units for allergen extracts. *Allergy*, v.9:591, 1979.

CARREIRA, J. *Cuantificación de Alergenos en Unidades de Masa*, Ed. Alergia e Inmunología Abelló, S.A., Madrid, 1992.

CAVE, N.J.; GUILFORD, W.G. A method for in vitro evaluation of protein hydrolysates for potential inclusion in veterinary diets. *Research in Veterinary Science*, v.77: 231-238, 2004.

CHAGAS, K.N.; MUNIZ, J.R.O.; BINOTTI, R.S.; OLIVEIRA, C.H.; CHAGAS, K.D.N.; PRADO, A.P. Primeiro levantamento de ácaros em poeira de casas da cidade de Araguaína – Tocantins. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v.23: 209, 2000.

CHAPMAN, M.D.; HEYMANN, P.W.; WILKINS, S.R.; BROWM, M.J.; PLATTS-MILLS, T.A.E. Monoclonal immunoassays for major dust mite (*Dermatophagoides*) allergens, *Der p I* e *Der f I*, and quantitative analysis of the allergen content of mite and house dust extracts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.80(2): 184-194, 1987.

DAY, M.J. Expression of major histocompatibility complex class II molecules by dermal inflammatory cells, epidermal langerhans cells and keratinocytes in canine dermatological disease. *Journal of Comparative Pathology*, v.115: 317-326, 1996.

DEBOER, D.J.; HILLIER, A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v.81: 271-276, 2001.

DREBORG, S. Standardization of allergenic preparations by in vitro and in vivo methods. *Allergy*, v.48(Suppl.14): 63-70, 1993.

EZEQUIEL, O.S.; GAZETA, G.S.; AMORIM, M.; FREIRE, N.M.S. Evaluation of the acarofauna of the domiciliary ecosystem in Juiz de Fora, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96(7): 911-916, 2001.

FRANK, L.A.; KUNKLE, G.A.; BEALE, K.M. Comparison of serum cortisol concentration before and after intradermal testing in sedated and nonsedated dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.200: 507-510, 1992.

GRIFFIN, C.E.; KWOCKHA, K.W.; MCDONALD, J.M. 1993. *Current Veterinary Dermatology – The Science and Art of Therapy*. Mosby - Year Book, St. Louis, 1993.

HALLIWELL, R.E.W.; SCHWARTZMAN, R.M. Atopic disease in the dog. *Veterinary Records*, v.89: 209-214, 1971.

HENSEL, P.; AUSTEL, M.; MEDLEAU, L.; ZHAO, Y.; VIDYASHANKAR, A. Determination of threshold concentrations of allergen and evaluation of two different histamine concentrations in canine intradermal testing. *Veterinary Dermatology*, v.15: 304-308, 2004.

HILL, P.B.; DEBOER, D.J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v.81: 169-186, 2001.

HILL, P.B.; OLIVRY, T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v.81: 187-198, 2001.

HILL, P.B.; HILLIER, A. OLIVRY, T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VI): IgE-induced immediate and late-phase reactions, two inflammatory sequences at sites of intradermal allergen injections. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v.81: 199-204, 2001.

HILLIER, A.; GRIFFIN, C.E. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.81: 147-151, 2001.

HILLIER, A.; DEBOER, D.J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.81: 289-304, 2001.

HILLIER, A.; KWOCZKA, K.W.; RIESTER, R.L. Reactivity to intradermal injection of extracts of *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, house dust mite mix and house dust in dogs suspected to have AD: 115 cases (1996-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.217: 536-540, 2000.

IPSEN, H.; LARSEN, J.N.; NIEMEIJER, N.R.; LOWENSTEIN, H.; SCHOU, C.; SPANGFORT, M.D. Allergenic extracts. In: MIDDLETON, E.; REED, C.E.; ELLIS, E.F. (Eds.), *Allergy Principles and Practice*, 5^a ed. Mosby Year Book, St. Louis, p. 404-416, 1998.

JUNIPER, E.F.; WHITE, J.; DOLOVICH, J. Efficacy of continuous treatment with astemizole (Hismanal) and terfenadine (Seldane) in ragweed pollen induced rhinoconjunctivitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.82: 670-675, 1988.

LAFFORT-DASSOT, C.; CARLOTTI, D.N.; PIN, D.; JASMIM, P. Diagnosis of flea allergy dermatitis: comparison of intradermal testing with flea allergens and a FcεRI α-based IgE assay in response to flea control. *Veterinary Dermatology*, v.15: 321-330, 2004.

LOMBARDERO, M.; GONZÁLES, R.; DUFFORT, O.; JUAN, F.; AYUSO, R.; VENTAS, P.; CORTÉS, C.; CARREIRA, J. Evaluación de la actividad biológica total y composición alérgica de extractos alérgicos. *Allergology et Immunopathology*, v.14: 189, 1986.

LUND, E.M.; ARMSTRONG, P.J.; KIRK, C.A.; KOLAR, L.M.; KLAUSNER, J.S. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.214: 1336-1341, 1999.

MALLING, H.J. Methods of skin testing. *Allergy*, v.48 (Suppl. 14): 55-56, 1993.

MARSELLA, R. OLIVRY, T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VII): mediators of cutaneous inflammation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.81: 205-213, 2001.

MASUDA, K.; TSUJIMOTO, H.; FUGIWARA, K.; KURATA, K.; HASEGAWA, A.; YASUEDA, H.; YAMASHITA, K.; DEBOER, D.J.; de WECK, A.L.; SAKAGUSHI, M. IgE sensitivity and cross-reactivity to crude and purified mite allergens (Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2) in atopic dogs sensitive to *Dermatophagoides* mite allergens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.72: 303-313, 1999.

McCALL, C.; HUNTER, S.; STEDMAN, K.; WEBER, E.; HILLIER, A.; BOZIC, C.; RIVOIRE, B.; OLIVRY, T. Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v.78: 231-247, 2001.

McEWEN, B.J. Eosinophils – a review. *Veterinary Research Communications*, v.16: 11-14, 1992.

MOREIRA, N.S. *Acarinos Pyroglyphidae e outros sarcoptiformes em amostras de pó domiciliar em Belo Horizonte, Minas Gerais*. Tese de Mestrado - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1975.

MUELLER, R.S.; FIESELER, K.V.; ROSYCHUCK, R.A.W.; GREENWALT, T. Intradermal testing with the storage mite *Tyrophagus putrescentiae* in normal dogs and dogs with atopic dermatitis in Colorado. *Veterinary Dermatology*, v.16: 27-31, 2005.

NESBITT, G.H. *Canine and Feline Dermatology: A Systematic Approach*, Lea & Febiger, Philadelphia, 1983.

NETO, J. *Contribuição para o estudo da fauna acarina da poeira domiciliar em habitações da cidade de São Paulo*. Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1984.

NOON, L. Prophylactic inoculation against hayfever. *Lancet*, v.1: 1572-1911, 1911.

OLIVRY, T.; HILL, P.B. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v.81: 219-225, 2001.

OLIVRY, T; SOUSA, C.A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v.81: 311-316, 2001.

OLIVRY, T; NAYDAN, D.K.; MOORE, P.F. Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *American Journal of Dermatopathology*, v.19: 477-486, 1997.

OLIVRY, T; DEAN, G.A.; THOMPSON, M.B.; DOW, J.L.; MOORE, P.F. Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Experimental Dermatology*, v.8: 204-211, 1999.

OLIVRY, T.; DUNSTON, S.M.; MURPHY, K.M.; MOORE, P.F. Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late-phase reaction in the skin of normal and atopic dogs. *Veterinary Dermatology*, v.12: 49-58, 2001.

PALLER, A.S. Clinical features of atopic dermatitis. *Clinical Review Allergy*, v.11: 429-446, 1993.

PATTERSON, R. Investigations of spontaneous hypersensitivity of the dog. *Journal of Allergy*, v.31: 351-363, 1960.

PEREIRA, M.G. *Epidemiologia: teoria e prática*. 1ª ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1995.

PIPKORN, U.; HAMMARLUND, A.; ENERBACK, L. Prolonged treatment with topical glucocorticoids results in an inhibition of the allergen-induced weal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. *Clinical and Experimental Allergy*, v.19: 19-25, 1989.

PLATTS-MILLS, T.A.E.; CHAPMAN, M.D. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.90: 755-775, 1987.

POSITION STATEMENT: AAAAI. The use of standardized allergen extracts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.99: 583-586, 1997.

RANDALL, M.; HILLIER, A.; COLE, L.K.; KWOCKHA, K.W.; NEEDHAM, G.; WASSOM, D.L. Quantitation of house dust mites and house dust mite allergens in the microenvironment of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.64: 1580-1588, 2003.

REEDY, L.M.; MILLER, W.H.; WILLESEN, T. *Allergic Skin Disease of Dog and Cat*. 2ª ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1997.

ROSA, A.E. *Estudo sobre a fauna acarina em poeira doméstica no Brasil*. Tese de mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós", Universidade de São Paulo, 1978.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2ª ed. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 2002.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; KOUTINAS, A.F.; GIOULEKAS, D.; LEONTIDIS, L. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.69: 61-73, 1999.

SCOTT, D. W.; MILLER, H. W.; GRIFFIN, C. E. *Small Animal Dermatology*. 6ª ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 2001.

SOUZA, C.A.; MARSELLA, R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81: 153-157, 2001.

STULL, A.; COOKE, R.A.; TENANT, J. The allergen content of pollen extracts; its determination and deterioration. *Journal of Allergy*, v.4: 455, 1933.

SWINNEN, C.; VROOM, M. The clinical effect of environmental control of house dust mites in 60 house dust mite-sensitive dogs. *Veterinary Dermatology*, v.15: 31-36, 2004.

TEE, R.D. Allergy to storage mites. *Clinical and Experimental Allergy*, v.24: 636-640, 1994.

TURKELTAUB, P.C.; RASTOGI, S.C.; BAER, H.; ANDERSON, M.C.; NORMAN, P.S. A standardized quantitative skin-test assay of allergen potency and stability: studies on the allergen dose-response curve and effect of wheal, erythema and patients selection on assay results. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.70:343-352, 1982.

VENTAS, P.; CARREIRA, J.; POLO, F. Identification of IgE-binding proteins from *Lepidoglyphus destructor* and production of monoclonal antibodies to a major allergen. *Immunology Letters*, v.29: 229, 1991.

WILLENSE, T. Atopic skin disease: a review and a reconsideration of diagnostic criteria. *Journal of Small Animal Practice*, v.27: 771-778, 1986.

WITTICH, F.W. Spontaneous allergy (atopy) in the lower animal: seasonal hay fever (fall type) in a dog. *Journal of Allergy*, v.12: 247-251, 1941.

ZUR, G.; WHITE, S.D.; IHRKE, P.J.; KASS, P.H.; TOEBES, N. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part II. Response to hyposensitization. *Veterinary Dermatology*, v.13: 103-111, 2002.