

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MARCIA ELIZABETH KEIM MAGHELI LIMA

**ACURÁCIA DE TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DE SENSIBILIDADE A
ÁCAROS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA**

(Diagnostic accuracy of serum assays for mite sensitivity in dogs with atopic dermatitis)

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

MARCIA ELIZABETH KEIM MAGHELI LIMA

**ACURÁCIA DE TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DE SENSIBILIDADE A
ÁCAROS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA**

(Diagnostic accuracy of serum assays for mite sensitivity in dogs with atopic dermatitis)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias.

Co-orientador: Victor do Espirito Santo Cunha.

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Câmpus São José dos Pinhais

L732a
2015

Lima, Marcia Elizabeth Keim Magheli
Acurácia de testes sorológicos no diagnóstico de sensibilidade a ácaros em cães com dermatite atópica = Diagnostic accuracy of serum assays for mite sensitivity in dogs with atopic dermatitis / Marcia Elizabeth Keim Magheli Lima; orientador, Marconi Rodrigues de Farias ; co-orientador, Victor do Espírito Santo Cunha. – 2015.
xiii, 71 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais, 2015
Bibliografia: 51-64
Texto português e inglês

1. Pele – Doenças. 2. Cães. 3. Ácaro. 4. Veterinária – Diagnóstico. I. Farias, Marconi Rodrigues de. II. Cunha, Victor do Espírito Santo. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título. Título: Diagnostic accuracy of serum assays for mite sensitivity in dogs with atopic dermatitis.

CDD 20. ed. – 636.08



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus São José dos Pinhais

PUCPR
GRUPO MARISTA

**ATA Nº 0067 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA MARCIA ELIZABETH KEIM MAGHELI LIMA**

Aos vinte e quatro dias do mês de março do ano de dois mil e quinze, às 8:00 horas, realizou-se na sala 07 da Pós-Graduação, 2º andar, Bloco Amarelo, Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da Dissertação da mestranda Marcia Elizabeth Keim Magheli Lima, intitulada: **“ACURÁCIA DE TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DE SENSIBILIDADE A ÁCAROS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA”**. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Marconi Rodrigues de Farias (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Herberto José Chong Neto (UFPR) e Luiz Henrique de Araújo Machado (FMVZ-UNESP). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada aprovado.

Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias (Presidente)

Assinatura [Assinatura]

Prof. Dr. Herberto José Chong Neto (UFPR)

Assinatura [Assinatura]

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado (FMVZ-UNESP)

Assinatura [Assinatura]

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

São José dos Pinhais, 24 de março de 2015.

[Assinatura]

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

[Assinatura]

Caroline Nocera Bertton

Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

	Página
AGRADECIMENTOS	v
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	vii
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
CAPÍTULO 1	1
1 REVISÃO DE LITERATURA	1
2 FATORES INTRÍNSECOS	2
2.1 DISFUNÇÃO DE BARREIRA EPIDÉRMICA	2
2.2 HIPER-REATIVIDADE TEGUMENTAR.....	4
3 FATORES EXTRÍNSECOS	5
3.1 IRRITANTES QUÍMICOS E FÍSICOS.....	5
3.2 PRINCIPAIS ALÉRGENOS.....	6
3.2.1 Alérgenos de ácaros domiciliares	6
3.2.2 Alérgenos de pólenes	8
3.2.3 Alérgenos de fungos	10
3.2.4 Alérgenos da saliva da pulga	11
4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	12
5 DIAGNÓSTICO	12
5.1 TESTE ALÉRGICO INTRADÉRMICO.....	14
5.2 TESTE ALÉRGICO SOROLÓGICO.....	17
CAPÍTULO 2	21
RESUMO	21
ABSTRACT	22

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 COMITÊ DE ÉTICA.....	25
3.2 TIPO DE ESTUDO.....	25
3.3 GRUPO EXPERIMENTAL.....	26
3.3.1 Grupo de cães com dermatite atópica.....	26
3.3.1.1 <i>Crítérios de inclusão para GA</i>	26
3.3.1.2 <i>Crítérios de exclusão para GA</i>	26
3.3.2 Grupo de cães saudáveis (GS)	27
3.3.2.1 <i>Crítérios de inclusão para GS</i>	27
3.3.2.2 <i>Crítérios de exclusão para GS</i>	27
3.4 TESTE INTRADÉRMICO	27
3.4.1 Seleção dos extratos	27
3.4.2 Protocolo do teste intradérmico	28
3.4.2.1 <i>Teste de proficiência</i>	28
3.4.2.2 <i>Teste intradérmico</i>	29
3.4.2.3 <i>Interpretação do teste intradérmico</i>	30
3.5 TESTES SOROLÓGICOS	31
3.5.1 Obtenção dos soros	31
3.5.2 Acondicionamento da amostra	32
3.5.3 Protocolo de teste sorológico	32
3.5.3.1 <i>Protocolo do teste sorológico policlonal</i>	32
3.5.3.2 <i>Protocolo do teste sorológico FceR1-alfa</i>	34
3.5.4 Interpretação do testes sorológico	34
3.5.5 Determinação dos parâmetros de acurácia	35
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35

4 RESULTADOS	36
4.1 TESTE INTRADÉRMICO.....	36
4.2 TESTES SOROLÓGICOS	36
4.3 AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA DOS TESTES REALIZADOS	43
5 DISCUSSÃO	44
6 CONCLUSÕES	49
CAPÍTULO 3	50
CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICES	65
ANEXOS	70

“Todos os homens, por natureza, desejam saber.”

Aristóteles

“Todo conhecimento é resposta a uma pergunta”

Bachelar

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Marconi Rodrigues de Farias, cuja amabilidade, profissionalismo e brilhantismo fizeram o mestrado tão distante de casa valer à pena, por sua presença inspiradora em todos os momentos, desde o início do projeto.

Ao meu co-orientador, Victor do Espírito Santo Cunha, por sua amizade, paciência, disponibilidade em responder tantos emails e mensagens e pela orientação tão competente, sem a qual esse projeto não teria sido possível.

Agradeço ao meu marido, Eduardo, pelo companheirismo há 23 anos. Sem sua presença e apoio eu não teria a clareza nem a serenidade necessárias para alcançar qualquer objetivo nesta vida.

À minha filha, Gabriela, por sua alegria, seu apoio e por ser tão independente e companheira, que me fez cogitar ficar distante tantos dias nesses dois anos. Não foi fácil, a saudade foi grande e isso só aumentou nossa alegria agora.

Agradeço à minha família: Rogério, Conceição e Áurea, pelo apoio incondicional há mais de uma era. Essa conquista não seria possível sem o seu amor, que me estabiliza e dá sempre forças para não desistir com as dificuldades do caminho.

À minha cunhada mais querida, Cristiane Martins Magheli, por sua paciência e inestimável ajuda com as tabelas Excel.

Também agradeço aos amigos Gisa e Gilson, Santina e Ataíde, que tão gentilmente me acolheram durante todas as idas a Curitiba, com tanto amor, que me fizeram sentir parte da família. Compartilho especialmente com vocês a alegria desta conquista. E não podia deixar de agradecer ao canino Zambesi, por tornar quentinhas as minhas noites nesse frio que faz em Curitiba. Mesmo com montes de meias e cobertas, sem ele dormindo abraçadinho nos meus pés, a carioca friorenta aqui não teria dormido bem nem metade das noites que passou em Curitiba.

Aos amigos e colegas médicos veterinários: Carol Cassano e André Leal, Cátia e Gerson Perez, Daniel Haddad e Adriana São Thiago, Paulo Diniz, Ana Beatriz, Rachel Oliveira, Analúcia Nunes, Lourenço A. Lima, Ana Maria Dieckmann, Rogério Lobo, Tielli Magnus, Dévaki L. Assunção, Grazielle Vandresen, Jorge Bárcena e Vanessa Ornella, que contribuíram de muitas formas para a realização deste projeto.

À amiga e companheira de mestrado, Juliane Possebom, pela motivação, por sua ajuda na realização do experimento, por sua energia e competência e pela parceria nos momentos felizes e na superação dos obstáculos nesses dois últimos anos.

À professora e amiga Alessandra Pereira, pela carta de recomendação e carinho de sempre.

Ao professor Ronaldo Lucas, pela carta de recomendação e pelo apoio à minha iniciativa de tentar o mestrado, sugerindo o professor Marconi como orientador.

Ao meu orientado de PIBIC, Fábio Nogueira, pela colaboração na realização do experimento.

À Caroline Nocera e à professora Maria Cristina Sotto Maior, pelo carinho e apoio quando eu não conseguia abrir a conta no Banco do Brasil e durante todo o curso.

Agradeço à empresa FDA Allergenic (Laboratório de Antígenos, Rio de Janeiro, Brasil), pelo apoio, fornecimento dos extratos alergênicos e pela permissão do uso das suas instalações para a realização de um dos testes sorológicos realizados neste experimento.

Agradeço ao Luiz Eduardo Ristow e à empresa TECSA Laboratórios (Minas Gerais, Brasil), pela realização dos testes sorológicos HESKA, realizados neste experimento.

E, finalmente, agradeço à CAPES, pela bolsa de isenção, sem a qual este projeto não teria sido realizado.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos e a metodologia aplicada nos mesmos segue as normas Vancouver Modificada.

O capítulo 1 é composto pela revisão de literatura.

O capítulo 2 trata da Acurácia de Testes Sorológicos no Diagnóstico da Sensibilidade a Ácaros em Cães com Dermatite Atópica, em formato de artigo a ser submetido para publicação em periódico científico.

O capítulo 3 contém as considerações finais.

As referências de todos os capítulos encontram-se em lista única, ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

As manifestações clínicas da dermatite atópica (DA) em cães são geralmente associadas a reações da imunoglobulina-E (IgE) contra alérgenos ambientais, principalmente ácaros domiciliares. Testes sorológicos e intradérmicos são indicados para o diagnóstico da dermatite atópica *stricto sensu*, para direcionar o controle de alérgenos, e a escolha de quais destes devem ser incluídos em protocolos de imunoterapia alérgeno-específica. O presente estudo teve como objetivo avaliar acurácia, valores preditivos e concordância do teste sorológico que utiliza fração Fc do mastócito e de um teste policlonal, na identificação de sensibilidade aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Dermatophagoides farinae* (DF) e *Blomia tropicalis* (BT), comparado com teste intradérmico de alta especificidade. O teste ID foi realizado em 78 cães (55 com DA e 23 saudáveis). Os sorológicos foram realizados em 20 cães com DA e teste ID positivo, e em 19 cães saudáveis com teste ID negativo. O valor de kappa determinou a concordância entre os testes. Foram calculados os parâmetros de acurácia: sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). Quando considerado resultado positivo a pelo menos um dos ácaros testados (avaliação geral), o teste sorológico policlonal apresentou acurácia=0,49, S=74%, E=26%, VPP=50% e VPN=45%. Quando considerados os resultados de cada ácaro testado separadamente, este mesmo teste apresentou para DP: acurácia=0,58, S=36%, E=74%, VPP=50% e VPN=61%; para DF: acurácia=0,46, S=78%, E= 32%, VPP= 35% e VPN=75%; e para BT acurácia=0,53; S= 55%; E= 53; VPP= 40; e VPN= 67%. O teste de técnica FceR1-alfa apresentou, na avaliação geral, acurácia=0,46, S=65%, E=26%, VPP=48% e VPN=42%. E na avaliação por ácaro, apresentou para DP: acurácia=0,58, S=57%, E=58%, VPP=50% e VPN= 65%, para DF: acurácia=0,50, S=44%, E=53%, VPP=31% e VPN=67%, e para BT: acurácia=0,67, S=45%, E= 79%, VPP=56% e VPN= 71%. O grau de concordância entre teste ID e sorológico policlonal foi pobre (0,05), e entre o teste ID e o sorológico FceR1-alfa, foi inexistente (-0,09). Entre os dois testes sorológicos, a concordância foi moderada (0,52). E na avaliação por ácaro, o grau de concordância entre testes sorológicos variou de pobre a fraca (0 a 0,32). Os parâmetros de acurácia dos testes sorológicos avaliados sugerem que tais testes não são indicados para a escolha dos alérgenos a serem incluídos na imunoterapia alérgeno-específica, quando utilizado como referência um teste ID de alta especificidade. Embora seus valores preditivos sejam baixos, estes podem elevar-se quando avaliadas as respostas a cada ácaro individualmente. O grau de concordância entre os testes sorológicos avaliados é moderado e não há concordância entre estes e o teste ID.

Palavras-chave: Teste intradérmico. *Blomia tropicalis*. *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Dermatophagoides farinae*. Grau de concordância

GENERAL ABSTRACT

Clinical signs of canine atopic dermatitis (AD) are usually associated with immunoglobulin-E (IgE) reactions against environmental allergens, especially house dust and storage mites. Serological and intradermal testing are indicated for the diagnosis of canine atopic dermatitis *sensu stricto*, to guide allergen control and identify relevant allergens for inclusion in allergen-specific immunotherapy protocols. This study aimed to evaluate accuracy parameters, predictive values and correlation of a FceR1-alfa serological test and a polyclonal test, for the identification of sensitivity to the mites *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Dermatophagoides farinae* (DF) and *Blomia tropicalis* (BT), compared to a high specific intradermal test (IDT). Intradermal test was performed in 78 dogs (55 with AD and 23 healthy dogs). Serological testing was performed in 20 dogs with AD and positive IDT, and in 19 healthy dogs with negative IDT. Kappa value determined correlation between the tests. The following accuracy parameters were calculated: sensitivity (S), specificity (E), positive and negative predictive values (PPV, NPV). When considered positive result to at least one of the tested mites (overall rating), polyclonal serological test showed accuracy=0,49, S=74%, E=26%, PPV=50% and NPV=45%. When considering the results of each mite tested, individually, this test showed for DP: accuracy=0,58, S=36%, E=74%, PPV=50% and NPV=61%; for DF: accuracy=0,46, S=78%, E= 32%, PPV= 35% and NPV=75%; and for BT accuracy=0,53; S= 55%; E= 53; PPV= 40, and NPV= 67%. The FceR1-alpha test showed, in overall rating, accuracy=0,46, S=65%, E=26%, PPV=48% and NPV=42%. And in mite rating, it showed for DP: accuracy=0,58, S=57%, E=58%, PPV=50% and NPV= 65%; for DF: accuracy=0,50, S=44%, E=53%, PPV=31% and NPV=67%; and for BT: accuracy=0,67, S=45%, E= 79%, PPV=56% and NPV= 71%. Agreement between IDT and polyclonal serum test was poor (0,05), while among IDT and FceR1-alpha test was non-existing (-0,09). Overall agreement between both serum tests was moderate (0.52). And mite rating showed a poor to weak (0-0,32) agreement between serum tests. In conclusion, the accuracy parameters of the serological tests evaluated herein, suggest that such tests are not indicated for choosing allergens to be included in allergen-specific immunotherapy, when a high specificity IDT is used as reference. Furthermore, though negative predictive values were low, these can rise when the sensitivity to each mite is evaluated individually. And, finally, agreement between the serological assays evaluated herein is moderate and there is no agreement among them and IDT.

Keywords: Intradermal testing. *Blomia tropicalis*. *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Dermatophagoides farinae*. Correlation.

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	atopic dermatitis
BSA	Bovine serum albumin
<i>cut off</i>	ponto de corte
DASc	dermatite atópica <i>simile</i> canina
DA	dermatite atópica
DASS	dermatite atópica <i>stricto sensu</i>
E	especificidade (specificity)
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i> /ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
FceR1-alfa-	receptor de membrana do mastócito que se liga à porção Fc da molécula de IgE
GA	grupo de cães com DA que fizeram os testes sorológicos
GS	grupo de cães saudáveis que fizeram os testes sorológicos
ID	intradérmico
IDT	intradermal test
IgE	imunoglobulina-E
IL-4	interleucina-4
M	Molar
mL	mililitros
mm	milímetro
nm	nanômetros
NPV	Negative Predictive Value
°C	graus Célsius
pH	potencial de hidrogênio
PNU	<i>Protein Nitrogen Unit</i>
PPV	Positive Predictive Value
PR	Paraná
RAST	<i>radioallergosorbant test</i>

RJ	Rio de Janeiro
rpm	rotações por minuto
S	sensibilidade (sensitivity)
SC	Santa Catarina
Th0	T auxiliar imaturo
Th1	T auxiliares do tipo 1
Th2	T auxiliares do tipo 2
UBE	unidade biológica equivalente
URA	umidade relativa do ar
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
μL	microlitros

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1 Condições ótimas de desenvolvimento dos ácaros domiciliares.....	7
Quadro 2 Reações positivas mais prevalentes aos testes ID ou sorológico em diferentes regiões do mundo	8
Quadro 3 Critérios de Favrot para o diagnóstico da DA em cães.....	13
Quadro 4 Intervalos de tempo sugeridos para interrupção do uso de imunomoduladores prévios ao teste ID.....	16
Quadro 5 Ilustração da utilização da fração FceR1-alfa do teste sorológico...	19
Quadro 6 Resultados dos testes ID e sorológicos dos cães com DA avaliados	37
Quadro 7 Resultados dos testes ID e sorológicos dos cães saudáveis avaliados	38
Tabela 1 Tabela de contingência do cálculo dos parâmetros de acurácia do teste policlonal, com avaliação geral	39
Tabela 2 Tabela de contingência do cálculo dos parâmetros de acurácia do teste FceR1-alfa, com avaliação geral	40
Tabela 3 Tabelas de contingência do cálculo dos parâmetros de acurácia do teste policlonal, com avaliação individual dos ácaros	40
Tabela 4 Tabelas de contingência do cálculo dos parâmetros de acurácia do teste FceR1-alfa, com avaliação individual dos ácaros	41
Tabela 5 Parâmetros de acurácia dos testes sorológicos	39
Tabela 6 Parâmetros de acurácia dos testes sorológicos, considerando cada ácaro separadamente	42
Tabela 7 Concordância entre os testes	43
Tabela 8 Concordância entre os testes, considerando cada ácaro separadamente	44

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Extratos alergênicos utilizados no teste ID	28
Figura 2	Aferição das pápulas formadas no teste de proficiência	29
Figura 3	A. Marcação dos pontos de aplicação dos extratos em região lateral do tórax.....	30
	B. Pápulas e placas eritematosas formadas 15 minutos após aplicação dos extratos do teste ID	31
Figura 4	A. Divisão dos quadrantes da placa de ELISA.....	33
	B. Placa contendo amostras prontas para leitura no espectrofotômetro.....	33
Figura 5	Placa de teste sorológico, pronta par aferição da densidade óptica.....	34

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO DE LITERATURA

Alergia é o resultado de uma disfunção na resposta imune frente a proteínas ambientais ubiqüitárias e inócuas a outros indivíduos, chamadas alérgenos. Estes são capazes de elicitar resposta de linfócitos Th2 e produção de anticorpos IgE pelo paciente. A principal característica que define as doenças alérgicas atópicas é a sua associação com níveis elevados de IgE tecidual e sérico (Marsella e Samuelson, 2009; Miller, Griffin e Campbell, 2013).

A DA em cães é doença tegumentar inflamatória, crônica, pruriginosa e recorrente, com manifestações clínicas associadas à produção de IgE contra alérgenos diversos (ambientais, alimentares e microbianos) (Olivry *et al.*, 2010). Síndrome semelhante, de mesma manifestação clínica, é também reconhecida, em que a presença de IgE não é detectada nos testes diagnósticos disponíveis, seja pela escolha errada dos alérgenos, seja por tecnologia atual inexistente para tal detecção, ou ainda, pela hipótese de a IgE não ser necessária para a sua manifestação clínica. Esta síndrome é denominada dermatite atópica *simile* canina (DASc) ou dermatite atópica *like* (Wood *et al.*, 2009; Olivry *et al.*, 2010).

Estima-se que a DA acometa cerca de 10% dos cães, principalmente os de raça definida (Lund *et al.*, 1999; Hillier e Griffin, 2001). A prevalência entre as diversas raças pode mudar de acordo com a geografia, mas parece ser similar em vários países, sendo as mais frequentemente descritas nos EUA: Labrador, Golden Retriever, West Highland White Terrier, Springer Spaniel inglês, Shar-pei, Bull Terrier, Bichon frisé e Terrier Tibetano (Zur *et al.*, 2002).

Tipicamente, não há predileção por gênero sexual, e a maioria dos cães com DA manifesta prurido entre seis meses e três anos de idade (Olivry *et al.*, 2010).

2. FATORES INTRÍNSECOS

Estudos de mapeamento genético têm mostrado que, assim como ocorre na DA em humanos, um grande número de genes é expresso de forma alterada na DA em cães (Merryman-Simpson *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2009, Plager *et al.*, 2012, Leung e Guttman- Yassky, 2014).

Estas mutações conduzem à menor produção de peptídeos antimicrobianos, disfunção de barreira epidérmica, alterações na diferenciação do queratinócito basal e na regulação do ciclo celular (disqueratose), hiper-reatividade tegumentar, caracterizada por alterações na função de IgE, de mediadores químicos da inflamação e da imunogenicidade, além de distúrbios psicogênicos, principalmente síndromes ansiosas (Hillier e Griffin, 2001).

2.1. DISFUNÇÃO DE BARREIRA EPIDÉRMICA

A barreira da epiderme inclui mecanismos físicos, químicos e imunológicos. Quando presente, oferece proteção contra a radiação solar, impede a penetração de irritantes e alérgenos e a saída de água da pele para o meio ambiente (Cork, 2006; Miller, Griffin e Campbell, 2013).

A epiderme é composta por várias camadas de células epiteliais, sendo a camada basal a mais interna. Os queratinócitos basais passam por processo de diferenciação, em que vão perdendo suas organelas e núcleo, enquanto acumulam queratina, adotam forma achatada e migram para a superfície, dando origem aos corneócitos (Lavker e Matoltsy, 1970).

Os corneócitos formam a camada mais externa da epiderme, ou estrato córneo, responsável pela resistência cutânea às tensões, devida à forte aderência entre eles, através dos corneodesmosomas. Grande parte da função de barreira da epiderme é exercida pelo estrato córneo e seus corneodesmosomas (Elias, 2005).

Durante o processo de formação dos corneócitos, os queratinócitos vão eliminando, para o meio extracelular, seus grânulos citoplasmáticos, ricos em proteínas e lipídeos.

Os corpos lamelares, ricos em lipídeos, fornecem flexibilidade à pele e formam a matriz lipídica presente entre os corneócitos. Esta é composta principalmente por ceramidas, colesterol e ácidos graxos, que formam um filme hidrofóbico na superfície cutânea, e minimizam a entrada de soluções aquosas presentes no ambiente e a perda de água transdérmica, por oclusão (Cork, 2006; Yamamoto, 2011).

A hidrólise da proteína filagrina origina compostos como ureia, amônia e alguns ácidos, que atuam na hidratação do estrato córneo (Cork, 2006) e no processo de homogeneização da queratinização (Proksch *et al.*, 2008).

Alterações na função de barreira epidérmica podem aumentar o risco de sensibilização alérgica e ocorrem em humanos e em cães com DA (Addor e Aoki, 2010; Olivry, 2011; Marsella, 2013; Plant *et al.* 2014).

Estudos com cães com DA demonstraram aumento da perda de água trans-epidérmica em áreas não lesionais, mesmo antes da exposição alérgica (White *et al.*, 1999; Benitah *et al.*, 2003; Preziosi *et al.*, 2003; Plumb, 2008).

Em adição, corneócitos desprendem-se do estrato córneo, permitindo a renovação celular, por ação de enzimas quimiotrípticas, que desfazem as ligações dos corneodesmosomos. A ação exagerada das enzimas quimiotrípticas resulta em destruição precoce dos corneodesmosomos, conseqüente descamação dos corneócitos e adelgaçamento do estrato córneo (Cork, 2006).

Pesquisas médicas demonstraram que a ação exagerada ou o aumento da meia-vida das enzimas quimiotrípticas é comum em pacientes com DA, por predisposição genética, fatores ambientais (como o hábito frequente de lavar a pele com sabão ou detergente, ou uso prolongado de corticoides) ou ainda pela exposição a proteases exógenas, provenientes de ácaros da poeira domiciliar e de *Staphylococcus aureus* (Cork, 2006). Esta ação exagerada das enzimas quimiotrípticas resulta em destruição precoce dos corneodesmosomos, conseqüente descamação dos corneócitos e adelgaçamento do estrato córneo (Cork, 2006).

Além da ação enzimática nos corneodesmosomos, há estudos que relacionam a disfunção de barreira epidérmica com alterações nas expressões dos genes que expressam filagrina, loracrina, e com a redução na quantidade, na composição e na

síntese das ceramidas, tanto em humanos quanto em alguns cães com DA (Addor e Aoki, 2010; Chervet *et al.*, 2010; Marsella, 2013; Miller, Griffin e Campbell, 2013, Leung e Guttman-Yassky, 2014).

O restabelecimento da função de barreira cutânea causado pela terapia com ciclosporina e corticoides está relacionado com a remissão da doença apenas em humanos. No entanto, estudos com cães com DA mostraram restabelecimento da barreira epidérmica e remissão da doença com tratamentos baseados em imunoterapia (Addor e Aoki, 2010).

2.2.HIPER-REATIVIDADE TEGUMENTAR

A pele do cão com DA tende a uma menor capacidade de auto-regulação dos seus mecanismos inflamatórios, mediados por citocinas produzidas principalmente por linfócitos Th1 e Th2, to que torna a pele de cães com DA, muito reacional.

Ainda não é conhecido se as anormalidades imunológicas demonstradas na DA em cães ocorrem em consequência da permanente disfunção de barreira, ou se ocorrem de forma primária (Charney *et al.*, 2003; Marsella, Nicklin e Lopez, 2006).

Proteínas alergênicas, uma vez detectadas pelos queratinócitos, plasmócitos ou células apresentadoras de antígeno de um cão com DA são fagocitadas e apresentadas aos linfócitos Th0, nos linfonodos regionais. Esses linfócitos diferenciam-se em Th2. Estudos recentes vêm demonstrando maiores níveis de IL-4 (interleucina produzida pelo Th2) tanto na pele quanto no sangue periférico de cães com DA (Miller, Griffin e Campbell, 2013), o que leva à maior concentração sérica de IgE (Miller, 1997) e maior captura de antígenos (Grundy e Barton, 2001; Mason *et al.*, 2003).

As moléculas de IgE produzidas nos linfonodos alcançam a corrente sanguínea por via linfática. Devido ao seu grande tropismo histiocítico, estas imunoglobulinas migram para a derme, onde ligam-se às células de Langerhans, o que aumenta a captura de alérgenos.

Em adição, a IgE tende a ligar-se a receptores específicos na parede celular dos mastócitos, e permanecem por todo o resto de sua vida útil (cerca de quatro a 12

semanas), ou até que se liguem a algum alérgeno, o que causa desestabilização, desgranulação mastocitária e eczema local (Miller, Griffin e Campbell, 2013).

Mastócitos apresentam grande afinidade por moléculas de IgE, o que permite a ativação da resposta alérgeno-mediada na pele (Zeman *et al.*, 2002). A presença dos mastócitos tanto em pele lesionada, quanto na não lesionada, mostra seu relevante papel na patogenia da DA em cães.

Estas células apresentam-se em maior concentração nos pavilhões auriculares, nos interdígitos e nas regiões abdominal e inguinal (Auxilia e Hill, 2000), coincidindo com as áreas de maior incidência de eczema atópico em cães com dermatite atópica, descritas por Favrot *et al.* (2010).

3. FATORES EXTRÍNSECOS

3.1. IRRITANTES QUÍMICOS E FÍSICOS

Segundo pesquisas médicas, os extremos de temperatura e umidade destacam-se como irritantes físicos capazes de suscitar resposta no paciente com DA (Schneider *et al.*, 2013).

Já estudos veterinários, indicam como irritantes químicos: cosméticos, saponáceos, antissépticos, desinfetantes, lã, e excreções e secreções com pH muito diferente do fisiológico (Miller, Griffin e Campbell, 2013).

Foi demonstrado que o pH do estrato córneo em humanos depende de subprodutos da queratinização e da síntese de ácidos graxos. Quando mantido levemente ácido, reduz a colonização por bactérias patogênicas. Além disso, o pH influencia no processo de descamação, permeabilidade e integridade da coesão do estrato córneo (Cork, 2006).

Assim, o uso de soluções de pH neutro é capaz de retardar o processo de recuperação da barreira epidérmica em humanos (Mauro *et al.*, 1998). E o aumento do pH da pele é capaz de causar alterações na função de barreira, pela inibição da secreção da fosfolipase A2, que cessa após contato com solução de pH ácido (Cork, 2006).

A protease que atua na ligação dos corneodesmosomas humanos alcança sua ação máxima quando em pH neutro e a redução do pH da pele de 7,5 para 5,5 é capaz de reduzir a atividade dessa enzima em 50% (Ekholm, Brattsand e Egelrud, 2000; Caubet *et al.*, 2004).

O uso de sabões e detergentes é uma das principais causas de dermatite de contato irritante nas mãos, em humanos, e pode precipitar crises em pacientes com DA (Meding e Swanbeck, 1987). Lavar a pele com saponáceos pode causar aumento no pH da palma das mãos por mais de 90 minutos (Mucke *et al.*, 1993). Os detergentes presentes nas formulações para limpeza da pele humana emulsificam a gordura da superfície cutânea, e permitem que sejam retiradas no enxágue, o que pode danificar a pele, provocar descamação e perda de água trans-dérmica (Cork, 2006).

3.2. PRINCIPAIS ALÉRGENOS AMBIENTAIS

São considerados alergênicos para o cão, os elementos de alto peso molecular e estrutura terciária complexa, capazes de ligarem-se a duas moléculas de IgE e suscitarem resposta ao penetrarem o epitélio, seja por ingestão, inalação ou, principalmente, pela via percutânea (Marsella, Nicklin e Lopez, 2006).

Os principais alérgenos implicados na DA são proteínas provenientes de fungos anemófilos, pólenes, micro-organismos (Mason *et al.*, 2003), saliva de artrópodes e ácaros domiciliares (Olivry *et al.*, 2007; Miller, Griffin e Campbell, 2013), sendo estes últimos os mais frequentes no animal domiciliado a maior parte do tempo (Zavadiniak, 2000; Arlian e Platts-Mills, 2001; Platts-Mills, 2009; Miller, Griffin e Campbell, 2013).

3.2.1. Alérgenos de ácaros domiciliares

Além dos ácaros que habitam os domicílios (família Pyroglyphidae), estão também incluídos no grupo de ácaros domiciliares, os ácaros de estocagem (famílias Acaridae, Glycyphagidae e Chortoglyphidae), e os ácaros predadores (família Cheyletidae) (Nuttall *et al.*, 2006).

Os ácaros domiciliares são bem adaptados ao habitat humano e atuam como recicladores biológicos e redutores de resíduos humanos (Nuttall *et al.*, 2006). Sua nutrição é composta principalmente de restos de alimentos para os ácaros de estocagem, e de escamas, secreções epiteliais, fungos, bactérias, detritos orgânicos e materiais têxteis para as outras espécies (Zavadniak, 2000; Nuttall *et al.*, 2006; Platts-Mills, 2009).

O desenvolvimento ótimo da maioria dos ácaros domiciliares dá-se a temperaturas entre 20 e 30°C, e umidade relativa do ar (URA) entre 80 e 90% (Nuttall *et al.*, 2006), com alguma variação entre a espécies, como demonstrado no quadro 1:

Ácaro	Características	Referências
<i>D. farinae</i>	. Maior crescimento entre 25 e 30°C e URA de 50 a 60%	(Jackson <i>et al.</i> , 2005)
<i>D. pteronyssinus</i>	. Maior crescimento a 25°C e URA de 65 a 75%, . Menor crescimento a 10, 15 ou 20°C, ou mais que 30°C	(Arlan e Platts-Mills, 2001; Jackson <i>et al.</i> , 2005)
<i>B. tropicalis</i>	. Mais frequentes em regiões de clima tropical e subtropical	(Terra <i>et al.</i> , 2004).

Quadro 1- Condições ótimas de desenvolvimento dos ácaros domiciliares incluídos neste estudo.

Os ácaros domiciliares mais frequentemente testados em cães são os da família Pyroglyphidae (*Dermatophagoides farinae* e *D. pteronyssinus*); da família Acaridae (*Tyrophagus putrescentiae* e *Acarus siru*) e os da família Glycyphagidae (*Lepidoglyphus destructor* e *Blomia tropicalis*) (Nuttall *et al.*, 2006).

Cerca de 80% dos cães com DA apresentam IgE sérica que reconhece algum ácaro domiciliar, como o *D. farinae* e o *D. pteronyssinus* (Miller, Griffin e Campbell, 2013). Apesar de utilizarem diferentes metodologias, os testes ID e sorológicos aplicados em diferentes regiões geográficas no mundo mostraram também maior prevalência de sensibilização aos ácaros domiciliares, como descrito no quadro 2:

Local	Sensibilização encontrada	Referência
Canadá	88,9% de reações positivas para ácaros	(Gosselin <i>et al.</i> , 1983)
Reino Unido	66,4% <i>D. farinae</i> , 2% <i>D. pteronyssinus</i>	(Foster <i>et al.</i> , 2003)
Grécia	84,61% de resposta positiva para ácaros da poeira doméstica	(Saridomichelakis <i>et al.</i> , 1999)
Japão	69,5% para ácaros	(Park <i>et al.</i> , 2000)
Brasil	67,5% <i>D. pteronyssinus</i> 9,4% <i>D. farinae</i> 6% <i>B. tropicalis</i>	(Assunção, 2014)
Brasil	17,4% <i>D. farinae</i> e <i>D. pteronyssinus</i>	(Cunha, Chagas e Faccini, 2012).

Quadro 2- Reações positivas mais prevalentes aos testes ID ou sorológico em diferentes regiões do mundo.

Outra publicação brasileira, também baseada na identificação da IgE sérica, concluiu que os ácaros *D. farinae* e *B. tropicalis* podem contribuir para a patogênese da DA em cães no Brasil (Cunha, Silva e Faccini, 2012).

3.2.2. Alérgenos de pólen

Os principais causadores de polinose humana são os alérgenos provenientes de pólen anemófilos - carregados pela ação do vento (Taketomi *et al.*, 2006). Alérgenos de pólen são proteínas ou glicoproteínas solúveis em água e por isso prontamente disponíveis biologicamente. Sua propagação ocorre principalmente em dias quentes, secos e com vento (Vieira, 1995).

Se forem provenientes de um meio ambiente seco (isotônico), entram em contato com as mucosas, levando a sintomas locais imediatos nos indivíduos sensibilizados. No entanto, se forem provenientes de meio ambiente hipotônico (após chuva, por exemplo), liberam alérgenos menores, capazes de alcançar as vias aéreas

inferiores e induzir asma, ao serem inalados por indivíduos sensibilizados (Suphioglu, 1998).

Em ambiente seco, os pólenes podem permanecer viáveis por séculos (Suphioglu, 1998). E quando hidratados ou em contato com poluentes, são capazes de liberar diversas enzimas, incluindo proteases que causam dano epitelial, o que facilita o processo de sensibilização às partículas alergênicas (Hassim, Maronese e Kumar, 1998).

Pelo menos 40% dos pacientes alérgicos em todo o mundo são sensibilizados a pólen de gramíneas (Anderson e Lidholm, 2003).

Em regiões de clima temperado, como América do Norte, Europa e partes da Austrália, *Lolium perenne* e gramíneas similares são importantes fontes de polinose (Freidhoff *et al.*, 1986, Wüthrich *et al.*, 1995). No Brasil, as gramíneas de importância alergênica incluem: *L. perenne* (azevém), *Poa pratensis* (erva-de-febra), *Phleum pratense* (conhecida em Portugal como rabo-de-gato), *Dactylis glomerata* (conhecida em Portugal como pé-de-galo) e *Cynodon dactylon* (grama-bermudas) (Weber, 2003).

A gramínea mais abundante no sul do Brasil, principalmente em regiões não-urbanas (periferia de rodovias, calçadas e terrenos abandonados nas cidades) é *Lolium multiflorum* (azevém-italiano). Esta espécie invasiva e resistente tem sido associada à polinose e apesar de sua real participação na sensibilização alérgica ainda ser desconhecida, foi demonstrado que mesmo cidades altamente populosas podem ter grãos de pólen dessa gramínea no ar durante o período de polinização (Vieira, 2003).

Há poucos estudos, no Brasil e no mundo, sobre a caracterização dos alérgenos de *L. multiflorum*. E porque ainda não há padronização comercialmente disponível de extratos desta gramínea para uso clínico em testes cutâneos ou sorologia específica, muitas vezes apenas *L. perenne* é utilizada nas baterias realizadas. Uma melhor definição, portanto, da ocorrência de reação cruzada entre essas espécies seria útil para diagnósticos e tratamentos mais específicos da polinose no Brasil (Taketomi *et al.*, 2006).

Em cães, existe pouca pesquisa a respeito da sensibilização aos pólenes e por isso alguns autores a consideram em cães com prurido sazonal, e indicam a realização dos testes alérgicos logo após o período de polinização (Olivry *et al.*, 2010).

Paradoxalmente, um estudo retrospectivo, conduzido na França, sugeriu que a sensibilização a pólenes em cães é perene. Seus resultados demonstraram que apenas 16,5% dos 261 cães alérgicos avaliados, apresentavam prurido sazonal (Roussel, Bruet e Bourdeau, 2013).

Estes autores sugeriram a hipótese do acúmulo destes alérgenos nos domicílios para explicar a falta de influência da época do ano com a presença de sensibilização a pólenes verificada.

3.2.3. Alérgenos de fungos

A abundância de esporos fúngicos no ar despertou a pesquisa do seu potencial alergênico na medicina. Fungos produzem aeroalérgenos e sua dispersão depende das condições climáticas. Sua concentração atmosférica depende das variações ecológicas na vegetação ambiental, da estação do ano e da localização geográfica (Zoppas *et al.*, 2006).

Alguns fungos, ditos dominantes universais, tendem a prevalecer de forma ubiqüitária, como o *Cladosporium sp*, capaz de multiplicar-se em locais de clima quente e úmido, e onde haja abundância de matéria vegetal, como os arredores de parques e jardins, pomares e plantações agrícolas (Zoppas *et al.*, 2006).

Um estudo confirmou sua presença em uma cidade do sul do Brasil ao publicar que os fungos mais encontrados foram: *Alternaria sp*, *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* e *Cladosporium sp*, entre outros, todos do grupo Deuteromycotina (Zoppas *et al.*, 2006).

Os fungos desse grupo apresentam alta taxa de multiplicação de esporos redondos e de baixa densidade, com alguma diversidade enzimática, pouca demanda de substrato e grande capacidade de dispersão (Lima e Gadelha, 1983).

Das 250.000 espécies de fungos conhecidas, cerca de 100 possuem ligação com alguma doença alérgica em humanos. No entanto, a prevalência da sensibilização

a fungos é pouco conhecida, variando de 3 a 91% em estudos médicos (Zoppas *et al.*, 2006).

Há poucas publicações que envolvam cães com DA a esse respeito e os resultados variam grandemente também, desde 0,7% no Reino Unido (Foster *et al.*, 2003), até 60% na Califórnia, EUA (Zur *et al.*, 2002).

3.2.4. Alérgenos da saliva da pulga

Cães com DA são mais susceptíveis à alergia a proteínas encontradas na saliva da pulga (*Ctenocephalides felis*) (Bevier, 1997). A sensibilização dos cães a esses antígenos foi demonstrada em cerca de 82% dos cães que participaram de um estudo, com teste sorológico, após 40 semanas de exposição (Cook *et al.*, 1996; McCall *et al.*, 1997).

Esses artrópodes podem ser encontrados tanto no ambiente extradomiciliar quanto no seu interior (Miller, Griffin e Campbell, 2013). Em locais de clima quente, como a Flórida, nos EUA, as pulgas podem sobreviver ao ambiente extradomiciliar durante todo o ano, em micro-habitats protegidos, como dentro da casa do cachorro no quintal, ou debaixo de alguma mobília no ambiente domiciliar (Bos, Teunissen e Kapsenberg, 1989).

Os níveis ótimos de desenvolvimento desses insetos são alcançados à temperatura de 20 a 30°C, com URA menor que 70%, enquanto mostram-se reduzidos a temperaturas maiores que 35°C, ou menores que 8°C (Bos, Teunissen e Kapsenberg, 1989).

Além da temperatura ambiente, variações na URA também interferem grandemente no desenvolvimento das pulgas e, em meios protegidos, como carpetes, em que as condições ambientais podem ser diferentes e mais favoráveis que as encontradas no chão ou no resto do domicílio, o seu ciclo de vida pode completar-se mais rápido que o habitual (Thyssen *et al.*, 2007).

No Rio de Janeiro, Brasil, um estudo demonstrou sensibilização aos alérgenos da saliva da pulga mais frequente (52,2%) que aos ácaros testados (Cunha, Chagas e Faccini, 2012).

Em Ohio, EUA, quando o mesmo extrato antigênico, contendo os principais alérgenos da saliva da pulga, foi utilizado no teste ID e também no sorológico, houve grande concordância nos resultados, com acurácia do teste sorológico variando de 88 a 90% (McCall, 1997).

4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Na fase inicial, cães com DA podem apresentar apenas prurido alesional. Com a intensificação do prurido, as manifestações cutâneas incluem máculas, manchas eritematosas e pápulas, as quais podem acarretar erosões e alopecia auto-induzida (Olivry *et al.*, 2010).

Com a cronicidade, a DA é associada com hiperqueratose, descamação, liquenificação e hiperpigmentação, distribuindo-se de acordo com a cronicidade e os alérgenos envolvidos (Olivry *et al.*, 2010).

Em relação à topografia lesional, as principais áreas acometidas pela DA no cão são a face, a região cervical ventral, a face interna dos pavilhões auriculares, as axilas, o abdômen, a região inguinal, o períneo, a face ventral da cauda, as regiões flexurais, os interdígitos e as áreas dorsais e ventrais das extremidades distais dos membros (Olivry *et al.*, 2010).

5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DA em cães baseia-se, principalmente, no histórico e achados do exame clínico, além da exclusão de outras síndromes pruriginosas, que cursam com igual conjunto de manifestações clínicas.

Recentemente, foi criado, para auxiliar na triagem diagnóstica, um conjunto de critérios com alta especificidade para o diagnóstico da DA em cães, desde que tenham

sido excluídas previamente outras dermatopatias pruriginosas, chamado Critérios de Favrot (Favrot *et al.*, 2010), descritos no quadro 3.

Critérios de Favrot (2010) para o diagnóstico da DA em cães:
1- prurido inicia antes de três anos de idade 2- prurido melhora com corticoides 3- cão domiciliado 4- prurido primário 5- prurido na porção distal dos membros torácicos 6- prurido em condutos auditivos 7- margens dos pavilhões auriculares não afetadas 8- região dorsolombar não afetada.
Após a exclusão das parasitoses e infecções, com seis desses oito parâmetros acima, a especificidade pode alcançar 89%.

Quadro 3- Critérios de Favrot para o diagnóstico da DA em cães (Favrot *et al.*, 2010).

Diferente do que ocorre com outras dermatopatias, os exames laboratoriais têm apenas papel complementar no diagnóstico da DA em cães. Testes sorológicos e ID, por consenso, são indicados para identificar se há ou não resposta IgE-mediada, e permitir o diagnóstico da dermatite atópica *strictu sensu* (associada à sensibilização a alérgenos ambientais), para direcionar a exclusão e controle de alérgenos, e a escolha de quais destes devem ser incluídos na imunoterapia alérgeno-específica para cada paciente (Hillier e DeBoer, 2001; Deboer e Hillier, 2001; Olivry *et al.*, 2010; Miller, Griffin e Campbell, 2013).

5.1. TESTE ALÉRGICO INTRADÉRMICO

Em medicina, por serem pouco invasivos e de boa reprodutibilidade, se aplicados corretamente, testes cutâneos têm sido indicados para confirmar resposta alérgica, principalmente em pacientes com rinite e asma (Farias, 2007).

Há décadas, o teste ID, cujo resultado positivo caracteriza-se pela formação de uma pápula por reação de hipersensibilidade imediata, tem sido utilizado no diagnóstico dos fatores extrínsecos ambientais associados à DA em cães, com o principal objetivo de selecionar alérgenos não alimentares candidatos para imunoterapia, e de direcionar a escolha das medidas de controle ambiental desses alérgenos (Olivry *et al.*, 2010).

O teste alérgico intradérmico é considerado procedimento rápido e seguro (Hillier e DeBoer, 2001; Cunha *et al.*, 2007; Ferreira, 2013), em que extratos alergênicos são aplicados por via intradérmica para avaliar, de acordo com a intensidade da reação, se há hipersensibilidade mediada por IgE aos alérgenos utilizados (Ferreira, 2013), e se estes devem ser incluídos no protocolo de imunoterapia alérgeno-específica ou não.

O teste ID é um importante auxiliar no diagnóstico da DA em cães, por avaliar o órgão-alvo desta síndrome (Carlotti e Costragent, 1992; Koch e Peters, 1994; Sture *et al.*, 1995). Sua principal limitação é a possibilidade de interferência no potencial reacional cutâneo, pelo uso prévio de várias medicações, como anti-histamínicos e corticoides (Hillier e DeBoer, 2001; Ferreira, 2013).

Por avaliar resposta biológica, tanto seus resultados quanto sua interpretação podem ser influenciados por múltiplos fatores, como o tipo de extratos utilizados, a genética da população, a técnica utilizada (Oppenheimer e Nelson, 2006), o local do teste na pele e, principalmente, a possível interferência de medicamentos que possam suprimir ou alterar a resposta cutânea (Dreborg, 1989; Nelson, 1983; Nelson, 2001), o que pode reduzir sua acurácia e seus valores preditivos positivos.

A escolha dos alérgenos utilizados no teste ID é baseada em disponibilidade comercial, padronização para uso em cães, e na sua distribuição geográfica. Os

alérgenos mais testados na DA em cães são: insetos, epitélios de animais, pólenes, fungos e ácaros domiciliares (Buckley *et al.*, 2013).

Estudos em humanos e em cães com DA mostraram a existência de reação-cruzada entre extratos dos ácaros domiciliares, como *D. farinae*, *D. pteronyssinus*, *A. siro*, *T. putrescentiae*, *Euroglyphus maynei*, *Lepidoglyphus destructor* e *Glycyphagus domesticus* (Griffin *et al.*, 1989; Johansson, Johansson e van Hage-Hamsten, 1994; Saridomichelakis *et al.*, 2008).

A qualidade dos extratos utilizados constitui importante variável, independente do método. A maioria deles é padronizada para uso em humanos, mas ainda não foi esclarecido se o conteúdo alergênico, ou se a composição e a concentração desses extratos é adequada para uso em cães com DA (Wassom e Grieve, 1998). Esta falta de padronização dos extratos alergênicos (Loewenstein e Mueller, 2009) pode interferir na confiabilidade do teste ID na DA em cães (DeBoer e Hillier, 2001).

Assim como ocorre com os extratos alergênicos, também não há ainda um consenso a respeito da concentração de histamina (controle positivo) mais eficaz a ser utilizada na DA em cães. A variação encontrada nas publicações é razoavelmente grande, como 0,01mg/mL nos EUA (Buckley *et al.*, 2013) e 0,1mg/mL na Escandinávia (Oppenheimer, 2006).

Uma vez que a interpretação dos resultados do teste ID depende da comparação da pápula formada pelo controle positivo, uma solução de histamina, quando pouco concentrada, pode reduzir o ponto de corte (*cut off*) do teste e elevar demais sua sensibilidade, aumentando a ocorrência de resultados falso-positivos.

Da mesma forma, uma concentração muito alta de histamina como controle positivo, de um teste ID, pode reduzir a sensibilidade, aumentando a incidência de falso-negativos, por deixar o ponto de corte maior e difícil de ser ultrapassado pelas pápulas formadas pelos extratos alergênicos, ainda que o paciente seja hipersensível a algum deles.

A maioria dos estudos com este teste alérgico sugere a região da lateral do tórax, uma vez que o local da realização do teste ID pode provocar resultados mais ou

menos intensos (Wassom e Grieve, 1998), dependendo da concentração de mastócitos e capacidade reacional cutânea.

Os extratos empregados podem conter componentes capazes de levar a desgranulação dos mastócitos, e gerar resultados falso-positivos (Wassom e Grieve, 1998), da mesma forma que alguns fármacos podem reduzir ou inibir a resposta imunoalérgica na pele. Não há publicações suficientes, até o momento, para estabelecer-se um padrão de tempo para interrupção prévia de tais fármacos. No entanto, para evitar que essas decisões continuassem sendo tomadas com base na experiência clínica e não em evidência científica, uma recente compilação dos estudos foi publicada e sugeriu protocolos de intervalo para anti-histamínicos, corticoides e outros imunomoduladores, previamente à realização de testes alérgicos em cães (Quadro 4) (Olivry e Saridomichelakis, 2013).

Imunomodulador	Intervalo
Anti-histamínicos orais	2-7 dias
Corticoide tópico e ótico	14 dias
Corticoide oral - prednisolona e prednisona	Preferencialmente 14 dias
Corticoide sistêmico - metilprednisolona injetável	28 dias
Ciclosporina oral (5mg/kg uma vez ao dia)	Não é necessário interromper o uso

Quadro 4 – Intervalos de tempo sugeridos para interrupção do uso de imunomoduladores prévios ao teste ID, adaptado de Olivry e Saridomichelakis (2013).

A técnica do profissional que realiza o teste ID também pode interferir nos resultados e na sua confiabilidade. Estudos não publicados relataram boa concordância entre as interpretações deste teste por três pesquisadores distintos (Plant *et al.*, 2014), mas o assunto carece de mais pesquisa.

Para avaliar a reprodutibilidade do teste ID para DA e cães, a realização de treinamento e aferição da dextreza dos participantes da equipe, através de um teste de

proficiência de simples realização, foi recentemente proposta no Brasil (Cunha, Nunes e Souza, 2013).

Embora possa variar, a metodologia do teste ID, em geral, inclui tricotomia para marcação dos pontos de aplicação, com três centímetros de distância entre eles, com seringa apropriada (de agulha fina, com 27 gauge ou menor), aplicação intradérmica dos controles positivo e negativo e dos extratos alergênicos a serem testados, e leitura das pápulas formadas alguns minutos depois (Miller, Griffin e Campbell, 2013).

Também não há ainda consenso para a interpretação do teste ID na DA em cães. Há autores que sugerem a interpretação objetiva como sendo a forma mais confiável de se interpretar um teste cutâneo, através da aferição e registro dos valores do tamanho da reação obtida em milímetros (com régua ou paquímetro) (Reedy *et al.*, 1997; McCann e Ownby, 2002; Hensel *et al.*, 2004 e Hubbard e White, 2011).

Outros autores preferem método de interpretação mais subjetivo, comparando a turgidez, o tamanho e o eritema formados nas pápulas dos extratos alergênicos com as dos controles positivo e negativo, através de um escore de 0-4, em que valores iguais ou maiores que 2 são considerados positivos e valores iguais a 0 ou 1 são sempre negativos (Goldman *et al.*, 2010).

Na ausência de um método diagnóstico padrão e de fácil aplicação para a identificação de sensibilização a um alérgeno específico na DA em cães, não há como avaliar a sensibilidade e a especificidade dos testes ID em cães de forma precisa (Koebrich *et al.*, 2012).

5.2. TESTE ALÉRGICO SOROLÓGICO

Por serem mais rápidos e mais fáceis de realizar na rotina clínica, que o teste ID, muitos tipos de testes sorológicos foram desenvolvidos e são amplamente utilizados na prática veterinária (Hillier, 2002), principalmente fora do Brasil.

Uma vez que nenhum teste sorológico disponível é totalmente sensível ou específico, tal teste não é indicado como triagem para classificar pacientes como alérgicos ou não alérgicos (DeBoer e Hillier, 2001). No entanto, pode ser uma útil

ferramenta diagnóstica para guiar a escolha dos alérgenos que compõem a imunoterapia ou o manejo clínico do cão com DA, na redução dos alérgenos no ambiente (Olivry *et al.*, 2010).

Historicamente, a metodologia dos testes sorológicos evoluiu, passando do uso de anti-soros policlonais para os monoclonais, e da tecnologia RAST (*radioallergosorbant test*) para a ELISA (ensaio de imunoabsorção ligado a enzima). Ambas as tecnologias utilizam um meio sólido, que é sensibilizado com o alérgeno a ser testado. Os anticorpos provenientes de cães em teste são detectados por anti-anticorpos marcados com radiação (RAST) ou enzimas (ELISA), que catalizam a conversão de algum substrato a uma forma detectável e quantificável (Thom *et al.*, 2009).

Os anti-anticorpos utilizados primeiramente eram policlonais simples ou purificados, geralmente preparados por imunização de coelhos ou cabras com IgE canina purificada (Kleinbeck *et al.*, 1989; Peng, Simons e Becker, 1993).

Acreditava-se que estes fossem úteis para o diagnóstico da DA em cães (Kleinbeck *et al.*, 1989), mas pesquisas mostraram que a IgE contém inúmeros epítomos similares ou idênticos aos da IgG, o que aumentava as chances de testes sorológicos policlonais serem menos sensíveis à IgE, e resultarem em diagnósticos falso-positivos (Goldman *et al.*, 2010).

Assim, testes diagnósticos baseados em anticorpos policlonais tendem a mostrar baixa especificidade (Codner e Lessard, 1993) e baixa concordância com os testes ID (Miller, Scott e Janet, 1992; Bond, Thorogog e Lloyd, 1994) e não apresentam bom valor preditivo positivo para DA em cães (Haemmerling e De Weck, 1998).

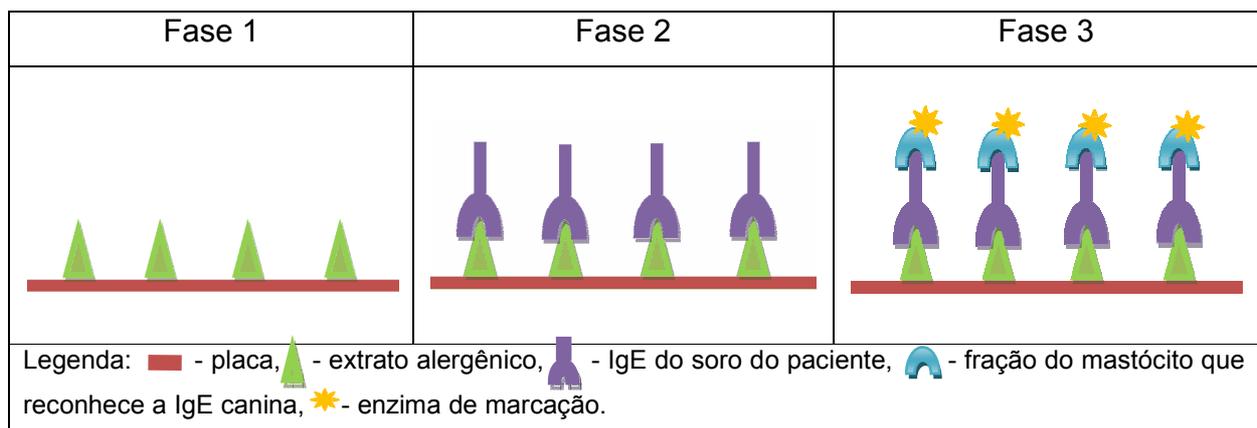
Nas doenças atópicas por inalação ou ingestão de alérgenos, os anticorpos IgE específicos caninos parecem compartilhar algumas propriedades similares com IgE humanas homólogas (Goldman *et al.*, 2010). Em particular, a IgE de cães é menos termossensível e capaz de transferir sensibilidade ao alérgeno, tanto por transferência passiva para a pele *in vivo*, quanto para células ou tecidos liberadores de mediadores, *in vitro* (Hillier e Griffin, 2001).

Essas constatações levaram ao desenvolvimento dos primeiros anti-anticorpos monoclonais, capazes de reconhecer mais epítomos na mesma molécula de IgE, devido à associação de anti-anticorpos monoclonais canino e humano. Esse tipo de teste pode mostrar elevada sensibilidade, o que explica a grande quantidade de resultados falso-positivos nos relatos da época, segundo Derer, Morrison-Smith e DeWeck (1998).

Importante avanço na especificidade do teste alérgico sorológico resultou do desenvolvimento de tecnologia recombinante (Wassom e Grieve, 1998), que clona um fragmento da porção extracelular do mastócito, onde há o receptor de alta afinidade para IgE (FceR1-alfa) (Steadman *et al.*, 2001).

A interação das moléculas de IgE com o FceR1-alfa é altamente específica e dependente da configuração tridimensional da porção Fc da molécula de IgE, uma vez que outros tipos de anticorpos (IgM, IgA e IgG), reativos ou não ao alérgeno, não se ligam a esse receptor (Wassom e Grieve, 1998).

Com tal metodologia (Quadro 5), anticorpos IgE relevantes são detectados. Porém, os anticorpos IgE, presentes no soro do cão, que conseguem se ligar ao alérgeno da placa, mas não conseguem se ligar ao receptor do fragmento de mastócito (FceR1-alfa, não são detectados; sendo considerados irrelevantes, por serem incapazes de se ligar aos mastócitos cutâneos (Wassom e Grieve, 1998).



Quadro 5- Ilustração da utilização da fração FceR1-alfa no teste sorológico Allercept® (Heska).

Há poucos estudos comparando dois testes sorológicos (Haemmerling e De Weck, 1998), enquanto muitos outros comparam os resultados do teste sorológico com os do teste ID (Bevier *et al.*, 1997; Wassom e Grieve, 1998; Saevik, Ulsten e Larsen, 2003; Thom *et al.*, 2009; Goldman *et al.*, 2010; Koebrich *et al.*, 2012), mostrando que na maioria das vezes há uma pobre concordância entre testes sorológicos e intradérmico (Codner e Lessard, 1993; Bond, Thorogood e Lloyd, 1994; Haemmerling e De Weck, 1998; Wassom and Grieve, 1998; Park *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2003; Saevik, Ulsten e Larsen, 2003; Patterson, Schaeffer e Campbell, 2005).

Independendo de quão específica é a tecnologia utilizada para detectar anticorpos IgE, a qualidade dos extratos utilizados para os testes alérgicos é uma importante variável (DeBoer e Hillier, 2001).

A comparação entre testes de diferentes metodologias, na aferição de IgE alérgeno-específica, pode mostrar limitações importantes, devido a diferenças de imunogenicidade entre os extratos alergênicos, seja por variação na potência entre os fornecedores e as partidas dos extratos; por contaminação-cruzada; pela ocorrência de diferentes processos de extração durante a produção do alérgeno-reagente; pela variação da estabilidade do extrato, durante a estocagem; ou ainda por fatores como a estação do ano em que o material base é coletado para a manufatura (Hamilton e Adkinson, 2003).

Outra importante limitação do teste sorológico é a falta de padrão metodológico (Williams *et al.*, 2000; DeBoer e Hillier, 2001). Em medicina veterinária, programas de garantia de qualidade têm sido implementados a critério dos laboratórios (Thom *et al.*, 2009), mas ainda não há padronização de protocolos de como interpretar os diversos métodos dos testes alérgicos sorológicos; ou uma certificação dos laboratórios e um programa de garantia de qualidade para testes sorológicos IgE alérgeno-específicos (Hillier e DeBoer, 2001).

CAPÍTULO 2

ACURÁCIA DE TESTES SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DE SENSIBILIDADE A ÁCAROS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA

(*Diagnostic accuracy of serum assays for mite sensitivity in dogs with atopic dermatitis*)

As manifestações clínicas da dermatite atópica (DA) em cães são geralmente associadas a reações da imunoglobulina-E (IgE) contra alérgenos ambientais, principalmente ácaros domiciliares. Testes sorológicos e intradérmicos são indicados para o diagnóstico da dermatite atópica *stricto sensu*, para direcionar o controle de alérgenos, e a escolha de quais destes devem ser incluídos em protocolos de imunoterapia alérgeno-específica. O presente estudo teve como objetivo avaliar acurácia, valores preditivos e concordância do teste sorológico que utiliza fração Fc do mastócito e de um teste policlonal, na identificação de sensibilidade aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Dermatophagoides farinae* (DF) e *Blomia tropicalis* (BT), comparado com teste intradérmico de alta especificidade. O teste ID foi realizado em 78 cães (55 com DA e 23 saudáveis). Os sorológicos foram realizados em 20 cães com DA e teste ID positivo, e em 19 cães saudáveis com teste ID negativo. O valor de kappa determinou a concordância entre os testes. Foram calculados os parâmetros de acurácia: sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). Quando considerado resultado positivo a pelo menos um dos ácaros testados (avaliação geral), o teste sorológico policlonal apresentou acurácia=0,49, S=74%, E=26%, VPP=50% e VPN=45%. Quando considerados os resultados de cada ácaro testado separadamente, este mesmo teste apresentou para DP: acurácia=0,58, S=36%, E=74%, VPP=50% e VPN=61%; para DF: acurácia=0,46, S=78%, E= 32%, VPP= 35% e VPN=75%; e para BT acurácia=0,53; S= 55%; E= 53; VPP= 40; e VPN= 67%. O teste de técnica FceR1-alfa apresentou, na avaliação geral, acurácia=0,46, S=65%, E=26%, VPP=48% e VPN=42%. E na avaliação por ácaro, apresentou para DP: acurácia=0,58, S=57%, E=58%, VPP=50% e VPN= 65%, para DF: acurácia=0,50, S=44%, E=53%, VPP=31% e VPN=67%, e para BT: acurácia=0,67, S=45%, E= 79%, VPP=56% e VPN= 71%. O grau de concordância entre teste ID e sorológico policlonal foi pobre (0,05), e entre o teste ID e o sorológico FceR1-alfa, foi inexistente (-0,09). Entre os dois testes sorológicos, a concordância foi moderada (0,52). E na avaliação por ácaro, o grau de concordância entre testes sorológicos variou de pobre a fraca (0 a 0,32). Os parâmetros de acurácia dos testes sorológicos avaliados sugerem que tais testes não são indicados para a escolha dos alérgenos a serem incluídos na imunoterapia alérgeno-específica, quando utilizado como referência um teste ID de alta especificidade. Embora seus valores preditivos sejam baixos, estes podem elevar-se quando avaliadas as respostas a cada ácaro individualmente. O grau de concordância entre os testes sorológicos avaliados é moderado e não há concordância entre estes e o teste ID.

Palavras-chave: Teste intradérmico. *Blomia tropicalis*. *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Dermatophagoides farinae*. Grau de concordância.

ABSTRACT

Clinical signs of canine atopic dermatitis (AD) are usually associated with immunoglobulin-E (IgE) reactions against environmental allergens, especially house dust and storage mites. Serological and intradermal testing are indicated for the diagnosis of canine atopic dermatitis *sensu stricto*, to guide allergen control and identify relevant allergens for inclusion in allergen-specific immunotherapy protocols. This study aimed to evaluate accuracy parameters, predictive values and correlation of a FceR1-alfa serological test and a polyclonal test, for the identification of sensitivity to the mites *Dermatophagoides pteronyssinus* (DP), *Dermatophagoides farinae* (DF) and *Blomia tropicalis* (BT), compared to a high specific intradermal test (IDT). Intradermal test was performed in 78 dogs (55 with AD and 23 healthy dogs). Serological testing was performed in 20 dogs with AD and positive IDT, and in 19 healthy dogs with negative IDT. Kappa value determined correlation between the tests. The following accuracy parameters were calculated: sensitivity (S), specificity (E), positive and negative predictive values (PPV, NPV). When considered positive result to at least one of the tested mites (overall rating), polyclonal serological test showed accuracy=0,49, S=74%, E=26%, PPV=50% and NPV=45%. When considering the results of each mite tested, individually, this test showed for DP: accuracy=0,58, S=36%, E=74%, PPV=50% and NPV=61%; for DF: accuracy=0,46, S=78%, E= 32%, PPV= 35% and NPV=75%; and for BT accuracy=0,53; S= 55%; E= 53; PPV= 40, and NPV= 67%. The FceR1-alpha test showed, in overall rating, accuracy=0,46, S=65%, E=26%, PPV=48% and NPV=42%. And in mite rating, it showed for DP: accuracy=0,58, S=57%, E=58%, PPV=50% and NPV= 65%; for DF: accuracy=0,50, S=44%, E=53%, PPV=31% and NPV=67%; and for BT: accuracy=0,67, S=45%, E= 79%, PPV=56% and NPV= 71%. Agreement between IDT and polyclonal serum test was poor (0,05), while among IDT and FceR1-alpha test was non-existing (-0,09). Overall agreement between both serum tests was moderate (0.52). And mite rating showed a poor to weak (0-0,32) agreement between serum tests. In conclusion, the accuracy parameters of the serological tests evaluated herein, suggest that such tests are not indicated for choosing allergens to be included in allergen-specific immunotherapy, when a high specificity IDT is used as reference. Furthermore, though negative predictive values were low, these can rise when the sensitivity to each mite is evaluated individually. And, finally, agreement between the serological assays evaluated herein is moderate and there is no agreement among them and IDT.

Keywords: Intradermal testing. *Blomia tropicalis*. *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Dermatophagoides farinae*. Correlation.

1. INTRODUÇÃO

A DA em cães é doença tegumentar inflamatória, crônica e pruriginosa, com cerca de 10% de prevalência mundial (Lund *et al.*, 1999; Hillier e Griffin, 2001) e manifestações clínicas que podem estar associadas à sensibilização e à produção de IgE, direcionada principalmente a alérgenos ambientais, mormente os provenientes dos ácaros domiciliares *D. farinae* e *D. pteronyssinus* (Miller, Griffin e Campbell, 2013). Em regiões de clima tropical e subtropical, uma crescente importância de sensibilização à *B. tropicalis* tem também sido observada em humanos com asma e rinite (Terra *et al.*, 2004).

Por ser uma condição multifatorial, o protocolo terapêutico da DA inclui variadas abordagens, sendo a dessensibilização por imunoterapia, uma modalidade frequentemente indicada em cães (Miller, Griffin e Campbell, 2013).

Estudos em cães com DA mostraram restabelecimento da barreira epidérmica e remissão dos sintomas da doença com tratamentos baseados em imunoterapia alérgeno-específica (Addor e Aoki, 2010). Por esse motivo, testes alérgicos alérgeno-específicos são de grande importância na DA (Saevik, Ulstein e Larsen, 2003).

Apesar dos muitos estudos publicados, ainda não há consenso a respeito do melhor teste alérgico (Hillier, 2002).

Testes sorológicos e intradérmicos não são totalmente sensíveis ou específicos (DeBoer e Hillier, 2001) e, por isso, não são indicados no estabelecimento diagnóstico da DA (Olivry *et al.*, 2010), apesar de serem boas ferramentas para o ajuste do manejo ambiental e a seleção dos extratos alergênicos para imunoterapia alérgeno-específica (DeBoer e Hillier, 2001)

Em cães, o teste ID é considerado como o padrão-ouro, ou teste-referência, no diagnóstico de sensibilização em indivíduos com DA, principalmente por testar o órgão-alvo desta síndrome (Olivry *et al.*, 2010; Miller, Griffin e Campbell, 2013).

Por serem mais rápidos e mais fáceis de realizar na rotina clínica, que o teste ID, muitos tipos de testes sorológicos foram desenvolvidos e são amplamente utilizados na prática veterinária (Hillier, 2002). No Brasil, um teste sorológico de metodologia

policlonal vem sendo utilizado na avaliação da sensibilização a alérgenos ambientais na DA em cães há muitos anos.

Porém, devido aos testes sorológicos com anticorpos policlonais serem vinculados a muitos resultados falso-positivos, um teste mais específico na detecção de IgE (Wassom e Gieve, 1998), que não utiliza anticorpos mono ou policlonais (Allercept®, HESKA, Suíça), tornou-se popular entre os médicos veterinários, principalmente da Europa e América do Norte, e recentemente foi disponibilizado no Brasil.

Essa tecnologia, surgida no final da década de 1990, utiliza a cadeia alfa do receptor de IgE de alta afinidade ao mastócito (FceR1-alfa) para detectar IgE alérgeno-específica no soro dos cães (Kristensen, 1998).

Seu fabricante (HESKA) afirma que a ligação do receptor FceR1-alfa de cães, gatos, cavalos e humanos com epítomos diferentes de IgE ocorre em menos de 10% dos casos (Foster *et al.*, 2003; Thom *et al.*, 2009), o que fornece a este teste uma melhor especificidade.

Em medicina, testes alérgicos cutâneos são os principais métodos usados para avaliar a sensibilidade em indivíduos alérgicos, principalmente por serem pouco invasivos e de boa reprodutibilidade, se aplicados corretamente (Oppenheimer e Nelson, 2006).

Por serem testes bastante distintos entre si, uma vez que o intradérmico detecta IgE alérgeno-específica na pele e o teste sorológico identifica a IgE alérgeno-específica presente no soro, a avaliação da concordância entre ambos tem sido muito variada (Carlotti e Costragent, 1992; McCall, 1997; Hillier, 2002).

Oppenheimer e Nelson (2006) recomendam que o clínico considere os valores preditivos positivos e negativos de ambos os testes alérgicos e os use em associação ao histórico e exame físico, para concluir o diagnóstico de sensibilização associado à doença alérgica (Oppenheimer e Nelson, 2006). Da mesma forma, pesquisadores veterinários frequentemente indicam a associação de ambos os testes, na prática dermatológica clínica, para melhorar a conduta terapêutica do cão com DA (Hillier,

2002; Miller, Griffin e Campbell, 2013). No Brasil, no entanto, pouca evidência científica tem sido documentada a esse respeito.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a acurácia de um teste sorológico policlonal e outro, que utiliza a cadeia FceR1-alfa do mastócito, para identificação de sensibilidade aos ácaros: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*, em cães com DA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Calcular os valores preditivos de ambos os testes sorológicos para diagnóstico de sensibilização a ácaros em cães com dermatite atópica.
- b) Avaliar o grau de concordância entre os testes sorológicos utilizados.
- c) Avaliar a concordância entre o teste intradérmico e os testes sorológicos utilizados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COMITÊ DE ÉTICA

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob o registro de número 833 (Anexo A).

3.2. TIPO DE ESTUDO

Foi desenvolvido um estudo experimental, transversal, controlado, não-pareado, com amostra de conveniência e não randomizado.

3.3. GRUPO EXPERIMENTAL

Participaram do presente estudo cães domiciliados, vacinados e vermifugados regularmente, atendidos em clínicas veterinárias do Rio de Janeiro (RJ), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC), que foram subdivididos em dois grupos experimentais, após seleção baseada em critérios de inclusão e exclusão:

3.3.1. Grupo de cães com dermatite atópica (GA)

3.3.1.1 Critérios de inclusão para GA

Foram incluídos no estudo, cães com diagnóstico clínico de DASS que apresentaram:

a- seis dos oito critérios estabelecidos por Favrot (2010);

b- presença de prurido mesmo após:

- controle de outras dermatopatias pruriginosas, de origem infecciosa ou parasitária;

- rotina frequente de hidratação da pele com produtos hidratantes, emolientes, umectantes e não irritantes;

- exclusão da possibilidade de dermatite atópica induzida por trofoalérgenos, através de dieta exclusiva com proteína original, pelo prazo de quatro a oito semanas;

c- resultado positivo a pelo menos um dos ácaros testados (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*) no teste ID utilizado.

3.3.1.2. Critérios de exclusão para GA

Foram excluídos do estudo os cães com DA que apresentaram:

a- medicação prévia com glicocorticoides sistêmicos, tópicos ou com anti-histamínicos, pelo prazo de duas semanas;

b- medicação prévia com glicocorticoides de longa duração (injetáveis), pelo prazo de quatro semanas;

c- período de estro, gestação ou lactação; e

d- temperamento agitado ou agressivo, que impossibilitasse a contenção manual para a realização dos testes.

3.3.2. Grupo de cães saudáveis (GS)

3.3.2.1. Critérios de inclusão para GS

Foram incluídos cães hígidos, domiciliados e sem histórico de prurido.

3.3.2.2. Critérios de exclusão para GS

Foram excluídos os cães saudáveis que apresentaram:

- a- reação a algum dos ácaros avaliados no teste ID;
- b- qualquer sinal clínico de doença tegumentar;
- c- medicação prévia com glicocorticoides sistêmicos, tópicos ou com anti-histamínicos, pelo prazo de duas semanas;
- d- medicação prévia com glicocorticoides de longa duração (injetáveis), pelo prazo de quatro semanas;
- e- período de estro, gestação ou lactação;
- f- temperamento agitado ou agressivo, que impossibilitasse a contenção manual para a realização dos testes.

3.4. TESTE INTRADÉRMICO

3.4.1. Seleção dos extratos

Para a realização do teste ID, foram utilizadas, como controle negativo: solução salina fenolada e, como controle positivo: solução contendo 0,1 mg/mL de histamina-base (Figura 1).

Os extratos alergênicos foram manipulados a partir de soluções contendo corpo inteiro de ácaro, com as seguintes concentrações de alérgenos, baseadas em estudo prévio de limiar irritativo (Ferreira, 2013) (Figura 1):

-*D. pteronyssinus* – 1.000 PNU/mL (que corresponde a 100 UBE/mL)

- *D. farinae* – 500 PNU/mL (que corresponde a 100 UBE/mL) e

- *B. tropicalis* – 125 PNU/mL (que corresponde a 50 UBE/mL)

Tanto os controles positivo e negativo, quanto os extratos alergênicos, foram manipulados e fornecidos pelo FDA Allergenic (Laboratório de Antígenos, Rio de Janeiro, Brasil).



Figura 1- Extratos alergênicos utilizados no teste ID, fornecidos por Immunotech, do FDA Allergenic.

3.4.2. Protocolo do teste intradérmico

3.4.2.1. Teste de proficiência da equipe

Foi realizado teste de proficiência, como descrito por Cunha, Nunes e Souza (2013), anteriormente ao início do experimento, com obtenção de coeficiente de variação menor que 10%.

Neste teste, após a tricotomia da região lateral do tórax, foram realizadas dez aplicações intradérmicas de controle positivo (histamina-base a 0,1mg/mL), e dez aplicações de controle negativo (solução salina fenolada), com intervalo de 3 cm entre cada uma.

Os diâmetros das pápulas foram então aferidos (Figura 2) após 15 minutos e os dados utilizados para calcular média, desvio-padrão e coeficiente de variação. O coeficiente de variação foi considerado ideal quando abaixo de 10%, indicando bom treinamento e dextreza da equipe, o que interfere na reprodutibilidade do método.



Figura 2- Aferição do diâmetro das pápulas formadas após aplicação de controles positivo e negativo, para cálculo do coeficiente de variação obtido no teste de proficiência.

3.4.2.2. *Teste intradérmico*

O teste intradérmico foi realizado conforme o estabelecido por Hillier e DeBoer (2001) em todos os cães selecionados.

Primeiramente, foi realizada a tricotomia com auxílio de máquina de tosa¹, na região lateral do tórax.

Após a tricotomia e a higienização local com solução fisiológica, foram feitas as marcações dos pontos de aplicação com intervalos de três centímetros de distância entre cada um, com caneta dermográfica (figura 3A).

Os cães foram contidos manualmente por cinco minutos, sem a necessidade de anestesia ou sedação. As aplicações (50 microlitros) foram então feitas no espaço intradérmico, com seringas de 300 μ L e agulhas de 6 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro² (controles positivo e negativo e os extratos alergênicos dos três ácaros), nas áreas delineadas.

¹ Máquina de tosa da marca Oster ou outra marca disponível no local do atendimento.

² Seringa BD Ultra-fine ®

Quinze minutos após as aplicações, os cães foram novamente contidos por mais cinco minutos para a leitura do teste (figura 3B).

3.4.2.3. *Interpretação do teste intradérmico*

Os resultados foram avaliados através da aferição e registro da média entre o diâmetro maior e o seu perpendicular, das pápulas formadas.

O ponto de corte foi estabelecido através do cálculo da média entre os valores obtidos para o controle positivo e o controle negativo.

Foram consideradas resultados positivos, as reações papulares, no local da aplicação, com média igual ou maior ao valor do ponto de corte calculado para cada paciente. Resultados negativos apresentaram valores menores que o do ponto de corte estabelecido.

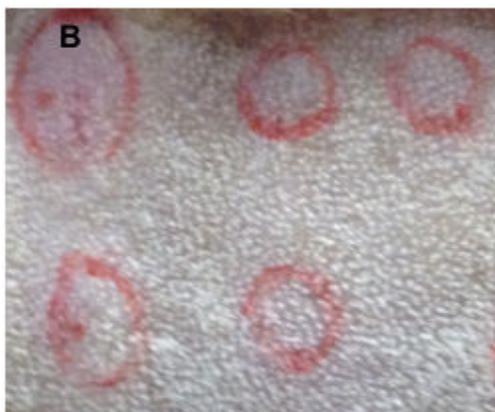


Figura 3- **A.** Marcação dos pontos de aplicação dos extratos em região lateral do tórax para realização de testes intradérmico em um cão com dermatite atópica; **B.** Pápulas e placas eritematosas formadas 15 minutos após aplicação dos extratos do teste ID, no local das aplicações.

3.5. TESTES SOROLÓGICOS

Foram realizados os dois testes sorológicos desenvolvidos para diagnóstico da DA em cães, dispostos abaixo:

- **Teste FceR1-alfa** – teste sorológico Allercept® (HESKA – Suíça), que utiliza a fração FceR1-alfa como reagente identificador de IgE alérgeno-específica, comercialmente disponível no Brasil através do Laboratório TECSA (MG, Brasil), que disponibilizou 40 testes para este experimento;

- **Teste policlonal** – teste sorológico desenvolvido no laboratório de antígenos FDA Allergenic (RJ – Brasil), que utiliza anti-anticorpo policlonal como reagente identificador de IgE alérgeno-específica.

3.5.1. Obtenção dos soros

Os cães foram contidos manualmente para tricotomia, higienização cutânea com algodão embebido em solução de clorexidine alcoólico, e coleta de 10 mL de sangue com agulha 25x7 e seringa de 10 mL.

3.5.2. Acondicionamento da amostra

O sangue coletado foi armazenado em frasco sem anticoagulante e mantido na posição vertical à temperatura ambiente por trinta minutos em suporte próprio. Após a coagulação, o soro foi separado por centrifugação a 3.000 rpm. O soro obtido foi aliquoteado em amostras de 500 µL e mantido a -20°C até o momento da análise.

3.5.3. Protocolo do teste sorológico

As amostras congeladas de soro foram acondicionadas em gelo seco e enviadas para a realização dos testes sorológicos em cada laboratório.

As placas e os reagentes utilizados em ambos os laboratórios foram retirados da refrigeração previamente ao teste, para que estivessem sempre à temperatura ambiente e não causasse variações nos resultados.

3.5.3.1. Protocolo do teste sorológico policlonal

Este teste sorológico foi desenvolvido e validado pelo Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento do FDA Allergenic. Foram determinadas, previamente à realização dos testes do presente estudo, as diluições ótimas dos soros dos cães, do anticorpo secundário ou conjugado, e dos extratos alergênicos utilizados para sensibilizar as placas.

Os mesmos extratos alergênicos do teste ID foram utilizados neste teste sorológico.

Cada placa de poliestireno para ensaios ELISA³ foi dividida em quadrantes (Figura 4A). Em seguida, foi adicionado cada um dos extratos alergênicos, diluídos com solução tampão, 100 µL por poço, com exceção do último quadrante e da última coluna da placa, os quais serviram como controles negativos para cada soro e para a placa, respectivamente.

Em seguida, as placas foram incubadas durante a noite (2-8°C), lavadas com PBS-Tween (0,005%) e bloqueadas durante 90 minutos em temperatura ambiente com solução de albumina do soro bovino⁴ a 1%.

Após o bloqueio, foram aplicados 100 µL por poço dos soros diluídos em BSA a 1%, em toda a placa, com exceção da primeira e última colunas, onde foram aplicados apenas BSA a 1% (100 µL por poço), com objetivo de atuarem com controles do método.

³ Placas de ELISA Costar 3590®, Corning Incorporated, USA

⁴ Soro bovino: BSA – Sigma

As placas foram então incubadas em temperatura ambiente por 60 minutos. Após lavagem, foram aplicados 100 µL, por poço do conjugado, de anti-IgE canino, policlonal purificado de cabra, em toda a placa, com exceção da última coluna.

As placas foram então incubadas em temperatura ambiente por 75 minutos. Em seguida, foram aplicados 100 µL do substrato⁵ por poço, e as placas incubadas em temperatura ambiente por 20 minutos.

As reações foram paralisadas após 20 minutos com ácido fosfórico 1M (Figura 4B) e as leituras das placas realizadas em espectrofotômetro (leitor de ELISA) com filtro de 450 nm.

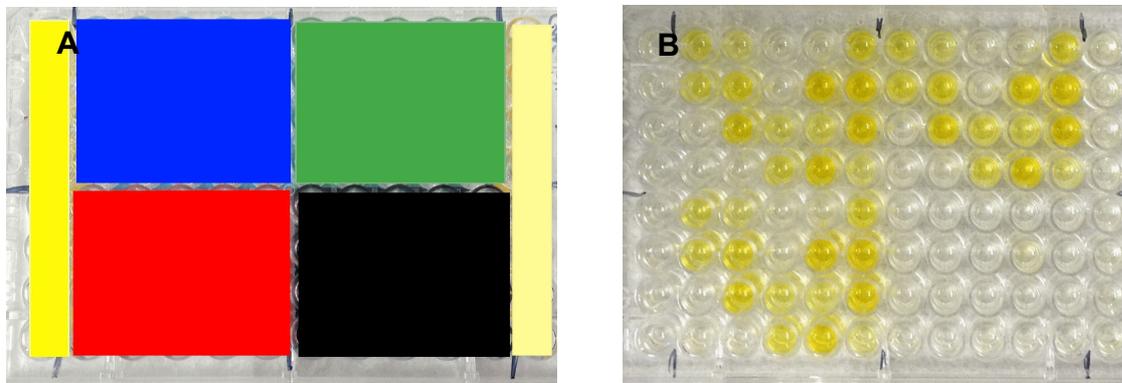


Figura 4- **A:** Divisão dos quadrantes da placa de ELISA. **B:** Placa contendo amostras prontas para leitura no espectrofotômetro.

3.5.3.2. Protocolo do teste sorológico FceR1-alfa

Os extratos alergênicos, os reagentes, os diluentes e as placas utilizados diferem dos demais testes sorológicos desenvolvidos para cães alérgicos.

Neste protocolo, é utilizada a fração FceR1-alfa, de receptor de mastócito de seres humanos. Esta fração reconhece de forma específica a molécula de IgE e

⁵ Substrato: KPL Peroxidase Substrate®, Gaithersburg, EUA

minimiza reações falso-positivas com outras imunoglobulinas. A figura 5 mostra a placa após a paralisação das reações.

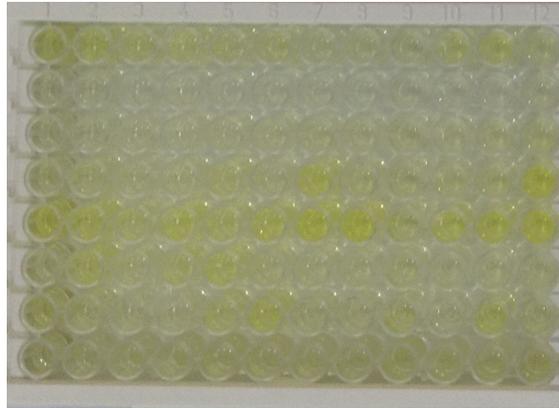


Figura 5. Placa de teste sorológico FceR1-alfa, após todas as etapas, pronta para aferição da densidade óptica em espectrofotômetro.

3.5.4. Interpretação do teste sorológico

A leitura das placas, realizada em espectrofotômetro, originava um relatório impresso, contendo a densidade óptica aferida em cada poço.

Os dados foram transferidos para planilha Excel® por cada laboratório, através de software próprio, que calcula os pontos de corte.

A interpretação do teste sorológico policlonal foi realizada considerando a média dos resultados obtidos em triplicata para cada soro (quadrantes 1, 2 e 3).

A interpretação do teste sorológico FceR1-alfa foi realizada com base em um ponto de corte padrão, sendo consideradas reações positivas todas as maiores ou iguais a 150 unidades.

3.5.5. Determinação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos testes sorológicos

A determinação dos parâmetros de acurácia foi realizada levando-se em consideração os resultados obtidos com o teste intradérmico como padrão-ouro, da seguinte forma (Pereira, 1995):

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{\text{verdadeiro-positivos}}{\text{verdadeiro-positivos} + \text{falso-negativos}} \times 100;$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{\text{verdadeiro-negativos}}{\text{verdadeiro-negativos} + \text{falso-positivos}} \times 100;$$

$$\text{Valor preditivo positivo (\%)} = \frac{\text{verdadeiro-positivos}}{\text{verdadeiro-positivos} + \text{falso-positivos}} \times 100;$$

$$\text{Valor preditivo negativo (\%)} = \frac{\text{verdadeiro-negativos}}{\text{verdadeiro-negativos} + \text{falso-negativos}} \times 100;$$

$$\text{Acurácia} = \frac{\text{verdadeiro-positivos} + \text{verdadeiro-negativos}}{\text{verdadeiro-negativos} + \text{falso-negativos} + \text{verdadeiro-positivos} + \text{falso-positivos}}$$

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros de acurácia dos testes sorológicos foram calculados conforme descrito por Pereira (1995). Para o cálculo da concordância entre os testes sorológicos foi feita a análise de concordância kappa, conforme descrito por Fleiss (1981). A interpretação do valor de kappa foi feita baseada nos critérios de Landis e Koch (1977), descritos abaixo:

Valores de kappa	Interpretação
<0	não há concordância
0-0,19	pobre
0,20-0,39	fraca
0,40-0,49	moderada
0,60-0,79	substancial
0,80-1,00	quase perfeita

4. RESULTADOS

4.1. TESTE INTRADÉRMICO

O teste ID foi realizado em todos os 78 participantes deste estudo, sendo 55 cães alérgicos e 23 cães saudáveis.

Dos 55 cães alérgicos testados, 22 (40%) reagiram para algum dos três ácaros avaliados, enquanto 33 (60%) apresentaram reação negativa no teste ID.

Dos 23 cães saudáveis testados, apenas um (4%) apresentou reação positiva a algum dos ácaros avaliados no teste ID (*B. tropicalis*).

4.2. TESTES SOROLÓGICOS

Dos 22 cães alérgicos com resultado positivo no teste ID, foram selecionados aleatoriamente, 20 soros para a realização dos testes sorológicos.

Dos 22 cães saudáveis com resultado negativo no teste ID, dois não apresentaram quantidade de soro suficiente para a realização de ambos os testes sorológicos e foram descartados, totalizando as 40 amostras almejadas para a realização deste experimento.

Durante o transporte ao laboratório, um dos frascos de soro do grupo de cães saudáveis sofreu danos e foi descartado.

Assim, dentre os 78 cães participantes, 39 obedeceram aos critérios de inclusão e foram selecionados para a realização dos testes sorológicos, conforme disposto abaixo:

- a) Grupo de cães alérgicos (GA) – composto por 20 cães com dermatite atópica com resultado positivo no teste ID para algum dos ácaros testados.
- b) Grupo de cães saudáveis (GS) – composto por 19 cães hígidos, com resultado negativo no teste ID para os ácaros testados.

Dentre os 20 cães pertencentes ao GA, 14 foram positivos no teste ID para *D. pteronyssinus*, 11 para *B. tropicalis* e 9 para *D. farinae*.

No teste sorológico policlonal, sete cães com DA foram positivos para *D. pteronyssinus*, 14 para *D. farinae* e nove para *B. tropicalis*.

Já no teste sorológico FceR1-alfa, de 20 cães com DA, 12 foram positivos para *D. pteronyssinus*, oito para *D. farinae* e nove para *B. tropicalis*.

Dentre os 19 cães pertencentes ao GS, 100% (19/19) apresentaram reação negativa no teste ID, aos três ácaros avaliados.

No entanto, houve reação positiva a algum dos três ácaros em 74% (14/19) dos soros pelo teste policlonal e em iguais 74% (14/19) dos soros testados pela metodologia FceR1-alfa.

Houve reação negativa aos ácaros avaliados no grupo GS em 26% (5/19) dos soros testados por ambas as metodologias.

A avaliação individual da positividade a cada ácaro, entre os cães do grupo GS, mostrou, dentre os soros testados pela metodologia policlonal, cinco reações a *D. pteronyssinus*, 13 a *D. farinae* e nove a *B. tropicalis*.

Dentre os soros de cães saudáveis testados pela metodologia FceR1-alfa, houve oito reações positivas a *D. pteronyssinus*, nove a *D. farinae* e quatro a *B. tropicalis*.

Os quadros 6 e 7 ilustram os achados de positividade no teste ID e nos sorológicos, em relação a cada grupo avaliado.

Cães	Teste ID			Teste sorológico policlonal			Teste sorológico FceR1-alfa		
	DP	DF	BT	DP	DF	BT	DP	DF	BT
1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
2	1	0	0	0	1	0	1	1	1
3	1	0	1	0	1	1	0	1	0
4	1	0	1	0	1	1	0	0	0
5	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	0	0	0	0	0	1	1	1
8	0	0	1	1	1	0	1	0	1
9	1	1	1	0	0	0	1	0	1
10	1	1	0	1	1	0	1	0	1
11	0	1	1	0	1	1	1	0	1
12	0	1	1	0	0	0	0	0	0
13	0	1	0	1	1	1	1	1	0
14	1	1	1	1	1	0	0	0	0
15	1	1	0	0	1	1	1	1	1
16	1	0	0	0	0	0	0	0	0
17	1	0	0	0	1	0	1	0	0
18	1	1	1	1	1	1	1	1	0
19	1	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	1	0	1	1	1	1	1

Quadro 6- Resultados dos testes ID e sorológicos dos cães **com DA** avaliados, sendo 0 correspondente à reação negativa e 1 correspondente à reação positiva; DP: *D. pteronyssinus*; DF: *D. farinae* e BT: *B. tropicalis*.

Cães	Teste ID			Teste sorológico policlonal			Teste sorológico FceR1-alfa		
	DP	DF	BT	DP	DF	BT	DP	DF	BT
1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	1	0	1	0
4	0	0	0	1	1	1	1	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	1	0	0	1	0
7	0	0	0	0	0	0	1	1	1
8	0	0	0	0	1	1	1	1	1
9	0	0	0	1	1	1	1	1	0
10	0	0	0	0	1	0	0	1	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	1	1	1	1	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	1	1	1	1	1	0
15	0	0	0	0	1	1	1	0	0
16	0	0	0	1	1	0	0	1	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	1	1	1	1	0
19	0	0	0	0	1	1	0	0	1

Quadro 7- Resultados dos testes ID e sorológicos dos cães **saudáveis** avaliados, sendo 0 correspondente à reação negativa e 1 correspondente à reação positiva; DP: *D. pteronyssinus*; DF: *D. farinae* e BT: *B. tropicalis*.

Os parâmetros de acurácia e os valores preditivos foram calculados com base nos cálculos-padrão descritos anteriormente (Pereira, 1995). As tabelas de contingência foram então montadas, considerando reação a pelo menos um, dos três ácaros testados, como mostram as tabelas 1 e 2; e considerando reação, a cada ácaro separadamente, como mostram as tabelas 3 e 4.

	Alérgicos	Saudáveis	Total
Policlonal +	14	14	28
Policlonal -	6	5	11
Total	20	19	39

Tabela 1 – Tabela de contingência utilizada para o cálculo dos parâmetros de acurácia do teste sorológico policlonal, considerando reação positiva a pelo menos um, dos três ácaros domiciliares testados.

	Alérgicos	Saudáveis	Total
FceR1-alfa +	13	14	27
FceR1-alfa -	7	5	12
Total	20	19	39

Tabela 2 – Tabela de contingência utilizada para o cálculo dos parâmetros de acurácia do teste sorológico FceR1-alfa, considerando reação positiva a pelo menos um, dos três ácaros domiciliares testados.

DP	Alérgicos	Saudáveis	Total
Policlonal +	5	5	10
Policlonal -	9	14	23
Total	14	19	33

DF	Alérgicos	Saudáveis	Total
Policlonal +	7	13	20
Policlonal -	2	6	8
Total	9	19	28

BT	Alérgicos	Saudáveis	Total
Policlonal +	6	9	15
Policlonal -	5	10	15
Total	11	19	30

Tabela 3 – Tabelas de contingência utilizadas para o cálculo dos parâmetros de acurácia do teste sorológico policlonal, considerando reação positiva a cada ácaro, separadamente. DP= *D. pteronyssinus*; DF= *D. farinae*; BT= *B. tropicalis*.

DP	Alérgicos	Saudáveis	Total
FceR1-alfa +	8	8	16
FceR1-alfa -	6	11	17
Total	14	19	33

DF	Alérgicos	Saudáveis	Total
FceR1-alfa +	4	9	13
FceR1-alfa -	5	10	15
Total	9	19	38

BT	Alérgicos	Saudáveis	Total
FceR1-alfa +	5	4	9
FceR1-alfa -	6	15	21
Total	11	19	30

Tabela 3 – Tabelas de contingência utilizadas para o cálculo dos parâmetros de acurácia do teste sorológico FceR1-alfa, considerando reação positiva a cada ácaro, separadamente. DP= *D. pteronyssinus*; DF= *D. farinae*; BT= *B. tropicalis*.

Os cálculos dos parâmetros de acurácia, numa avaliação geral, considerando-se reação positiva a pelo menos um dos ácaros testados estão dispostos na tabela 4.

	Policlonal	FceR1-alfa
S	74%	65%
E	26%	26%
VPP	50%	48%
VPN	45%	42%
ACURÁCIA	0,49	0,46

Tabela 4 – Parâmetros de acurácia e valores preditivos dos testes sorológicos avaliados, considerando reação positiva a pelo menos um dos três ácaros domiciliares testados. VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo; S= sensibilidade; E= especificidade.

A tabela 5 descreve parâmetros de acurácia e valores preditivos obtidos, considerando avaliação individual de resposta positiva a cada ácaro testado.

Parâmetros para DP	Policlonal	FceR1-alfa
S	36%	57%
E	74%	58%
VPP	50%	50%
VPN	61%	65%
ACURÁCIA	0,58	0,58

Parâmetros para DF	Policlonal	FceR1-alfa
S	78%	44%
E	32%	53%
VPP	35%	31%
VPN	75%	67%
ACURÁCIA	0,46	0,50

Parâmetros para BT	Policlonal	FceR1-alfa
S	55%	45%
E	53%	79%
VPP	40%	56%
VPN	67%	71%
ACURÁCIA	0,53	0,67

Tabela 5 – Parâmetros de acurácia e valores preditivos dos testes sorológicos avaliados, considerando reação positiva a cada ácaro separadamente. VPP= Valor Preditivo Positivo; VPN= Valor Preditivo Negativo; S= sensibilidade; E= especificidade.

4.3. AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA DOS TESTES REALIZADOS

A concordância entre os testes, considerando reação positiva a pelo menos um dos três ácaros testados, é mostrada na tabela 6.

	kappa	p-valor de kappa	Interpretação da concordância
Teste ID x Policlonal	0,05 (0,34 a -0,24)	0,74	pobre
Teste ID x FceR1-alfa	-0,09 (0,21 a -0,38)	*	inexistente
Teste Policlonal x FceR1-alfa	0,52 (0,83 a 0,21)	0,01	moderada

Tabela 6 – Concordância entre os testes, com intervalos de confiança de 95%. * Não é interpretável e não se aplica teste de significância.

A concordância entre o teste ID e os testes sorológicos, considerando reação positiva para cada ácaro, separadamente, é mostrada na tabela 7.

Policlonal x FceR1-alfa	kappa	p-valor de kappa	Interpretação da concordância
<i>D. pteronyssinus</i>	0,23 (0,50 a 0,002)	0,048	fraca
<i>B. tropicalis</i>	0 (0,30 a -0,30)	1,0	pobre

<i>D. farinae</i>	0,32 (0,59 a 0,04)	0,024	fraca
<hr/>			
Teste ID x Policlonal	kappa	p-valor de kappa	Interpretação da concordância
<hr/>			
<i>D. pteronyssinus</i>	0,09 (0,39 a -0,22)	0,56	pobre
<i>B. tropicalis</i>	0,11 (0,39 a -0,18)	0,46	pobre
<hr/>			
<i>D. farinae</i>	0,078 (0,28 a -0,13)	0,46	pobre
<hr/>			
Teste ID x FceR1-alfa	kappa	p-valor de kappa	Interpretação da concordância
<hr/>			
<i>D. pteronyssinus</i>	0,08 (0,38 a -0,2)	0,58	pobre
<i>B. tropicalis</i>	0,16 (0,47 a -0,15)	0,31	pobre
<i>D. farinae</i>	0,008 (0,29 a -0,24)	0,95	pobre

Tabela 7 – Concordância entre os testes, com intervalos de confiança de 95%, considerando cada ácaro separadamente.

5. DISCUSSÃO

A acurácia de um teste sorológico avalia a sua proporção de acertos e é calculada com base na sua sensibilidade e especificidade, sempre comparando com um teste padrão-ouro, como no caso da avaliação de sensibilizações alérgicas, o teste ID (DeBoer e Hillier, 2001).

Como todos os cálculos dos parâmetros de acurácia dos testes sorológicos estudados foram comparados com os resultados obtidos no teste ID, torna-se de suma importância analisar as características do teste-padrão utilizado neste experimento, antes de interpretar e analisar os testes sorológicos.

As concentrações utilizadas neste teste ID foram estabelecidas baseadas em um estudo de limiar irritativo (Ferreira, 2013), o que significa que são mínimas as chances de a concentração de histamina-base (0,1mg/mL) e dos extratos alergênicos utilizados causarem resultados falso-positivos.

Em adição, os extratos alergênicos deste teste ID são compostos de corpo inteiro dos ácaros, o que aumenta as chances de estarem presentes as proteínas mais relevantes na sensibilização de cães com DA (Marsella, Nicklin e Lopez, 2006), e reduz as chances de ocorrerem resultados falso-negativos.

Os resultados do teste ID observados no grupo GS demonstraram a especificidade da metodologia empregada, uma vez que apenas um dos cães saudáveis foi positivo a algum dos três ácaros testados, o que legitimou a sua utilização como padrão-ouro, nos cálculos dos parâmetros de acurácia dos testes sorológicos avaliados.

Similarmente, boa especificidade do teste ID foi demonstrada por Koebrich *et al.* (2012), que obtiveram 10,3% de reações positivas a ácaros em 17 cães sadios, utilizando concentração de histamina-base de 0,1mg/mL e extratos alergênicos com 250 PNU/mL de ácaros da poeira domiciliar e de estocagem.

Importante ressaltar que o tamanho da pápula formada no teste ID, a partir da aplicação da solução de histamina, influencia no estabelecimento do ponto de corte, o que torna difícil comparar os resultados obtidos no presente estudo, com os dados de publicações pregressas que relatam uso de concentração de histamina (controle positivo) dez vezes menor, ou que não divulgam tal informação.

A concentração baixa de histamina, utilizada em outros estudos, pode justificar os índices de resultados positivos ao teste ID, em cães com DA, superiores aos observados no presente estudo.

Os parâmetros de acurácia encontrados neste experimento, para o teste sorológico de metodologia policlonal, corroboram os achados da literatura, de baixa especificidade e VPP para DA em cães (Codner e Lessard, 1993).

O ponto de corte individualizado (através da média entre as três aferições do soro de cada animal), assim como os controles individuais de cada soro (quarto

quadrante da placa de ELISA) são capazes de reduzir as chances de resultados falso-positivos nesta metodologia. No entanto, não causaram grande elevação na especificidade do teste policlonal avaliado.

Isso pode decorrer da possibilidade de o reagente policlonal utilizado reconhecer alguns epítomos de IgG, além da IgE (Derer, Morrison-Smith e DeWeck, 1998), causando reações falso-positivas, o que influencia os cálculos dos parâmetros de acurácia.

Em adição, semelhante ao que foi demonstrado para testes *in vitro* em pacientes humanos (Mari *et al.*, 1999), é possível que a enzima substrato HRPO, do teste policlonal avaliado, seja capaz de interferir nos resultados, aumentando o número de falso-positivos, devido à ligação com a IgE sérica. No entanto, ainda é desconhecida a importância desta descoberta médica para os testes veterinários diagnósticos *in vitro* de alergia (DeBoer e Hillier, 2001).

Em relação ao teste sorológico de metodologia que utiliza a fração FceR1-alfa, os parâmetros de acurácia encontrados neste experimento foram discrepantes de muitas publicações, que relatam maiores parâmetros de acurácia (Cook *et al.*, 1996; Bevier *et al.*, 1997; McCall *et al.*, 1997; Wassom e Grieve, 1998; Thom *et al.*, 2009).

Isso pode resultar da falta de padronização metodológica, mostrada pelas diferenças das concentrações de histamina utilizadas no teste ID, entre os estudos publicados.

Em testes intradérmicos, o uso de menores concentrações de histamina-base como controle positivo, reduz o ponto de corte e aumenta a sua sensibilidade. A utilização de teste ID de maior sensibilidade, como referência, pode aumentar o número de resultados verdadeiro-positivos e, com isso, elevar o cálculo da especificidade de um teste sorológico, como parece ter ocorrido com as muitas publicações (Cook *et al.*, 1996; Bevier *et al.*, 1997; McCall *et al.*, 1997; Wassom e Grieve, 1998; Thom *et al.*, 2009) que relatam maiores parâmetros de acurácia para os testes sorológicos, que os encontrados neste estudo.

Já trabalhos desenvolvidos na Austrália, com teste sorológico de reagente FceR1-alfa, que utilizaram 0,1mg/mL de histamina-base como controle positivo do teste

ID de referência, apesar de não terem calculado os parâmetros de acurácia, encontraram 100% de reações falso-positivas (Roque *et al.*, 2011). Estes achados sugerem baixa especificidade do método sorológico, quando comparado com teste ID de ponto de corte similar ao usado neste experimento.

Num mecanismo semelhante, a especificidade reduzida encontrada para o teste sorológico de metodologia FceR1-alfa, neste experimento, pode estar relacionada à maior concentração de histamina-base do controle positivo no teste ID de alta especificidade, utilizado como referência.

A avaliação de resposta positiva a pelo menos um dos ácaros testados evidenciou aumento da acurácia e da especificidade, e mostrou VPP maior que o VPN.

Porém, considerando os resultados de cada ácaro, separadamente, os resultados de VPN maior que o VPP, observados neste experimento, divergem dos dados publicados por alguns pesquisadores (Ginel, Riaño e Lucena, 1998; Saevik, Ulstein e Larsen, 2003).

Os resultados deste experimento mostram que a acurácia de *D. pteronyssinus* e de *B. tropicalis*, embora superiores a 50%, permaneceram baixas na avaliação individual para cada ácaro; e que a especificidade do teste policlonal é melhor para *D. pteronyssinus*, enquanto a do teste FceR1- alfa é melhor para *B. tropicalis*.

Isso pode decorrer de fatores metodológicos especificamente relacionados a cada ácaro, mostrando que talvez a concentração ou a composição do extrato alergênico de um ácaro esteja mais adequada para seu reconhecimento sorológico que a de outro.

Estudos futuros, portanto, devem considerar a identificação dos principais alérgenos de cada ácaro, envolvidos na sensibilização, e testá-los individualmente, uma vez que tal avaliação pode melhorar a especificidade e o VPP dos testes sorológicos, ainda que sem interferir tanto na sua acurácia.

São poucos os artigos que comparam dois testes sorológicos (Haemmerling e De Weck, 1998), principalmente os que calculam sua acurácia. A análise das pesquisas a respeito mostra que testes sorológicos policlonais tendem a apresentar resultados menos específicos, em comparação com os testes de metodologia

monoclonal, ou com os que utilizam a fração FceR1-alfa (Wassom e Grieve, 1998; Saevik, Ulstein e Larsen, 2003).

No presente estudo, no entanto, os resultados de especificidade do teste policlonal foram similarmente baixos, quando comparados aos resultados do teste de metodologia FceR1-alfa. Assim, a indicação desses testes sorológicos como triagem para escolha do protocolo de imunoterapia alérgeno-específica não é confiável, uma vez que muitos dos cães saudáveis avaliados apresentaram resultados falso-positivos; e que o estabelecimento de protocolos de imunoterapia em quem não precisa pode gerar sensibilização e agravar a doença clínica.

No entanto, esses testes sorológicos identificam a presença de IgE sérica contra determinado alérgeno, podendo indicar se houve contato do animal com o alérgeno testado. Por esse motivo, segundo os dados encontrados neste experimento, os testes sorológicos avaliados podem ser indicados para guiar protocolos de controle e exclusão ambientais.

A concordância encontrada entre ambos os testes sorológicos avaliados neste experimento foi similar à relatada por Plant *et al.* (2014), que avaliaram a concordância de quatro testes sorológicos, inclusive um policlonal e o que utiliza a fração Fc do mastócito.

A concordância entre os resultados do teste ID e os métodos sorológicos avaliados foi de encontro aos dados publicados por Bevier *et al.* (1997), com relação ao teste que utiliza a fração Fc do mastócito.

Porém, a maioria dos pesquisadores tem relatado baixa concordância entre os testes sorológicos e o teste ID (Carlotti e Costragent, 1992; Codner e Lessard, 1993; Bond, Thorogood e Lloyd, 1994; Park *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2003; Patterson, Schaeffer e Campbell, 2005).

A comparação entre as mensurações de IgE alérgeno-específica por diferentes métodos, apresenta importantes limitações, uma vez que a imunogenicidade entre os extratos alergênicos pode variar, assim como a potência entre os fornecedores e as partidas dos extratos (Hamilton e Adkinson, 2003).

Além disso, segundo DeBoer e Hillier (2001), é esperada a baixa concordância entre o teste ID e o sorológico, não somente por diferenças entre os extratos alergênicos, mas também de metodologia e reagentes, como as observadas neste experimento.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

- a) A acurácia e os valores preditivos dos testes sorológicos com anticorpos policlonais e baseado em reconhecimento da fração FcεR1-alfa do anticorpo IgE são baixos.
- b) Os VPN dos testes sorológicos avaliados podem elevar-se quando consideradas as respostas a cada açúcar individualmente.
- c) O grau de concordância entre os testes sorológicos avaliados é moderado e não há concordância entre estes e o teste ID.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação dos parâmetros de acurácia do teste sorológico que utiliza a fração FceR1-alfa e do teste sorológico de reagente policlonal avaliados, sugere que estes dois tipos de metodologia não são indicados, como sugere a literatura, para selecionar pacientes alérgicos e não alérgicos aos ácaros testados.

A acurácia encontrada, com valores menores que 0,5 para ambas as metodologias avaliadas, sugere que tais testes sorológicos não são melhores que o acaso para auxiliar na escolha dos alérgenos de ácaros dos protocolos de imunoterapia, ficando o diagnóstico definitivo e a decisão da escolha do protocolo imunoterápico dependentes da avaliação do histórico clínico e do resultado do teste intradérmico, sempre que possível.

Na rotina clínica veterinária no Brasil, em que nem sempre o teste ID é uma opção bem aceita pelos responsáveis dos cães com DA, seja pela dificuldade de encontrar um profissional especializado, seja pelo custo ou ainda pela necessidade de interrupção dos fármacos imunomoduladores por algumas semanas, os testes sorológicos aqui avaliados podem ser utilizados para indicar contato, sem significância clínica, guiando o manejo de exclusão ambiental, e também como triagem da não sensibilização a ácaros, ou seja, interpretando resultado negativo como sinal de não sensibilização, pelos seus valores preditivos negativos encontrados.

REFERÊNCIAS

Addor FAZ, Aoki V. Barreira cutânea na dermatite atópica. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2010; 85(2):184-94.

Anderson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of Grass pollen allergens. International Archives of Allergy Immunology. 2003;130(2):87-107.

Arlian LG, Platts-Mills TAE. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2001; 107:406-413.

Assunção DL. Avaliação da concentração de alérgenos de ácaros na pelagem e na poeira de domicílios de cães (*canis lupus familiaris*) com dermatite atópica. Paraná. Dissertação [Mestrado em Ciência Animal] – Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2014.

Auxilia ST e Hill PB. Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? Veterinary Dermatology. 2000; 11: 247-254.

Benitah N, de Lorimier LP, Gaspar M, Kitchell BE. Chlorambucil-induced myoclonus in a cat with lymphoma. Journal of the American Animal Hospital Association. 2003; 39(3):283–287.

Bevier DE, Mondesire RL, Rose, BJ, Wassom DL. FceR1a-based ELISA technology for in vitro determination of allergen-specific IgE in a population of intradermal skin-tested normal and atopic dogs. Clinical Advances: A Supplement to Compendium on continuing Education for the Practicing Veterinarian. 1997; 3: 10-16.

Bond R, Thorogood SC, Lloyd DH. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of canine atopy. Veterinary Record. 1994; 135: 130-3.

Bos JD, Teunissen MB, Kapsenberg ML. Immunology of contact dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*. 1989; 151:84–87.

Buckley L, Schmidt V, McEwan N e Nuttall T. Cross-reaction and co-sensitization among related and unrelated allergens in canine intradermal tests. *Veterinary Dermatology*. 2013; 24: 422–e92.

Carlotti DN, Costragent F. Analysis of positive skin tests in 449 dogs with allergic dermatitis. *Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*. 1992; 27: 53-69.

Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M e Serre G. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *Journal of Investigative Dermatology*. 2004; 83:761-73.

Charney SC, Bergman PJ, Hohenhaus AE e McKnight JA. Risk factors for sterile hemorrhagic cystitis in dogs with lymphoma receiving cyclophosphamide with or without concurrent administration of furosemide: 216 cases (1990-1996). *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 2003; 222(10):1388–1393.

Chervet L, Galichet A, Mclean WHI, Chen H, Suter MM, Roosje PJ e Müller EJ. Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappa B activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*. 2010; 19: e343-e346.

Codner EC, Lessard P. Comparison of intradermal allergy test and enzyme-linked immunosorbent assay in dogs with allergic skin disease. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1993; 202: 739–743.

Cook CA, Steadman KE, Frank GR, Wassom DL. The in vitro diagnosis of flea bite hypersensitivity: Flea saliva vs. whole flea extracts. Proceedings of the Third World Congress of Veterinary Dermatology. 1996; p. 170.

Cork MJ, Robinson Da, Vasilopoulos Y, Ferguson A, Moustafa M, MacGowan A, Duff GW, Ward SJ e Tazi-Ahnini R. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. Journal of Allergy Clinical and Immunology. 2006; 118: 3-21.

Cunha VES, Hahnstadt RL, Soares AMB, Faccini JLH. Evaluation of skin sensitivity in dogs bearing allergic dermatitis to standardized allergenic extract of house dust and storage mites. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2007; 27: 341-344.

Cunha VES, Chagas MV, Faccini JLH. Sensibilização a ácaros domiciliares em cães com dermatite atópica e concordância entre teste intradérmico e teste sorológico. [Apresentação na XI Conferência Sul-Americana de Medicina Veterinária; 2012, agosto 08-10; Rio de Janeiro, Brasil].

Cunha VES, Silva MH, Faccini JLH. Serological identification of house dust mite allergens in dogs with atopic dermatitis. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2012; 32: 00.

Cunha VES, Nunes TAP, Souza PP. Teste de Proficiência para Testes Intradérmicos em Cães. [2013, Brasil].

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based “allergy” tests. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2001; 81: 277–87.

Derer M, Morrison-Smith G e DeWeck AL. Monoclonal anti-IgE antibodies in the diagnosis of dog allergy. Veterinary Dermatology. 1998; 9: 185-190.

Dreborg S. Skin tests used in type I allergy testing [position paper. *Allergy*. 1989; 44:S1–S59.

Ekholm IE, Brattsand M, Egelrud T. Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *Journal of Investigative Dermatology*. 2000;114:56-63.

Elias PM. Stratum Corneum Defensive Functions: An Integrative View. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005;125:183-200.

Farias, MR. Dermatite atópica: da fisiopatologia ao tratamento. *Revista Clínica Veterinária*. 2007; v. 69, p. 48-62.

Favrot C, Steffan J, Seewald W e Picco FA. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*. 2010; 21:23-31.

Ferreira, RR. Avaliação de diferentes concentrações de histamina e extratos alergênicos em cães sadios submetidos a teste intradérmico. Porto Alegre. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias] Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.

Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. New York: John Wiley; 1981.

Foster AP, Littlewood JD, Webb P, Wood JL, Rogers K e Shaw SE. Comparison of intradermal and serum testing for allergenspecific IgE using a Fce R1a-based assay in atopic dogs in the UK. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 2003; 93: 51–60.

Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Grant JH, Meyers DA e Marsh DG. A study of the human immune response to *Lolium perenne* (rye) pollen and its components, Lol p I and Lol p II (rye I and rye II). I. Prevalence of reactivity to the allergens and correlations

among skin test, IgE antibody, and IgG antibody data. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1986; 78(6):1190-201.

Ginel PJ, Riaño C, Lucena R. Evaluation of a commercial ELISA test for the detection of allergen-specific IgE antibodies in atopic dogs. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1998;45:421–425.

Goldman C, Rosser E, Petersen A, Hauptman J. Investigation on the effects of ciclosporin (Atopica) on intradermal test reactivity and allergen-specific immunoglobulin (IgE) serology in atopic dogs. *Veterinary Dermatology*. 2010; 2: 393-399.

Griffin P, Ford AW, Alterman L, Thompson J, Parkinson C, Blainey AD, Davies RJ e Topping MD. Allergenic and antigenic relationship between three species of storage mite and the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1989; 84: 108–117.

Gosselin Y, Malo d, Papdeorges M e Chalifoux A. Intradermoreaction and hyposensitization in canine atopy. *Canadian Veterinary Journal*. 1993; 24: 101-104.

Grundy SA, Barton C. Influence of drug treatment on survival of dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 88 cases (1989-1999). *Journal of American Veterinary Medical Association*. 2001; 218(4):543–546.

Haemmerling R e DeWeck AL. Comparison of two diagnostic tests for canine atopy using monoclonal anti-IgE antibodies. *Veterinary Dermatology*. 1998; 9: 191–199.

Hamilton RG e Adkinson NF. Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003; 111: 687–701.

Hassim Z, Maronese SE e Kumar RK. Injury to murine airway epithelial cells by pollen enzymes. *Thorax*. 1998; 53(5):368-71.

Hensel P, Austel M, Medleau L, Zhao Y e Vidyashankar A. Determination of threshold concentrations of allergens and evaluation of two different histamine concentrations in canine intradermal testing. *Veterinary Dermatology*. 2004; 15(5):304–308.

Hillier A, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis. (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001; 81: 289–304.

Hillier A. e Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): Incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001; 81: 147-151.

Hillier, A. Allergy testing and treatment for canine atopic dermatitis. *Veterinary Medicine*. 2002; 210-24.

Hubbard TL e White PD. Comparison of Subjective and Objective Intradermal Allergy Test Scoring Methods in Dogs with Atopic Dermatitis. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 2011; 47:399-405.

Jackson PA, Foster PA, Hart JB, Helps RC e Shaw ES. Prevalence of house dust mites and dermatophagoides group 1 antigens collected from bedding, skin and hair coat of dogs in south-west England. *Veterinary Dermatology*. 2005;16:32–38.

Johansson E, Johansson SG, van Hage-Hamsten M. Allergenic characterization of *Acarus siro* and *Tyrophagus putrescentiae* and their crossreactivity with *Lepidoglyphus destructor* and *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clinical & Experimental Allergy*. 1994; 24: 743–751.

Kleinbeck ML, Hites MJ, Loker JL, Halliwell REW e Lee KW. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of allergen-specific IgE antibodies in canine serum. *American Journal of Veterinary Research*. 1989; 50: 1831-9.

Koch HJ e Peters S. 207 Inrtakutantests bei Hunden mit Verdacht auf atopische Dermatitis. *Kleintierpraxis*. 1994; 39: 25-36.

Koebrich S, Nett-Mettler C, Wilhelm S e Favrot C. Intradermal and serological testing for mites in healthy beagle dogs. *Veterinary Dermatology*. 2012; 23: 192–e39.

Kristensen F. Meeting the diagnostic challenge in canine and feline allergic skin disease. Guest Editor. *Veterinary Dermatology*. 1998; 9:143.

Landis JR e Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33: 159-174

Lavker RM, Matoltsy AG. Formation of horny cells: the fate of organelles and differentiation products in ruminal epithelium. *The Journal of Cell Biology*. 1970;44:501-12.

Leung DYM, Guttman-Yassky E. Deciphering the complexities of atopic dermatitis: Shifting paradigms in treatment approaches. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014; 134(4):769-79.

Lima JA e Gadelha W. Contaminación de hongos del aire atmosférico en la ciudad de Recife (Pernambuco- Brasil). *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 1983; 25(4):243–251.

Loewenstein C e Mueller RS. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Veterinary Dermatology*. 2009; 20:84–98.

Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Kolar LM e Klausner JS. 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*. 1999; 214:1336-1341.

Mari A, Iacovacci P, Afferni C, Barletta B, Tinghino R, Di Felice G, Pini C. Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunopathology*. 1999; 103: 1005-11.

Marsella R, Nicklin C e Lopez J. Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Veterinary Dermatology*. 2006; 17:306-312.

Marsella R, Samuelson D. Unravelling the skin barrier: a new paradigm for atopic dermatitis and house dust mites. *Veterinary Dermatology*. 2009; 20:533-538.

Marsella R. Fixing the skin barrier: past, present and future – man and dog compared. *Veterinary Dermatology*. 2013; 24: 73–e18.

Mason N, Duval D, Shofer FS e Giger U. Cyclophosphamide exerts no beneficial effect over prednisone alone in the initial treatment of acute immunemediated hemolytic anemia in dogs: a randomized controlled clinical trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2003;17(2):206–212.

Mauro T, Holleran WM, Grayson S, Gao WN, Man MQ, Kriehuber E, Behne M, Feingold KR e Elias PM. Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing. *Archives of Dermatology*. 1998; 290:215-22.

McCall CA, Steadman KE, Penner SJ, *et al.* FcεR1a-based measurement of anti-flea saliva IgE in dogs. In: *Clinical Advances: A Supplement to Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 1997; 3:24-28.

McCann WA, Ownby DR. The reproducibility of the allergy skin test scoring and interpretation by board-certified/boardeligible allergists. *Annals of Allergy Asthma Immunology*. 2002; 89:368–371.

Meding B e Swanbeck G. Prevalence of hand eczema in an industrial city. *Brazilian Journal of Dermatology*. 1987;116:627-34.

Merryman-Simpson AE, Wood SH, Fretwell N, Jones PG, McLaren WM, Mcewan, NA, Clements DN, Carter SD, Ollier WE r Nuttal T.. Gene (mRNA) expression in canine atopic dermatitis: microarray analysis. *Veterinary Dermatology*. 2008; 19, 59-66.

Miller E. Immunosuppression—an overview. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery of Small Animals*. 1997; 12(3):144–149.

Miller WHJr, Griffin CE e Campbell KL. *Muller&Kirk's Small Animal Dermatology*. 7^a ed. Missouri: Elsevier; 2013.

Miller WH, Scott DW e Janet JM. Evaluation of an allergy screening test for use of atopic dogs. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*. 1992;200: 931-5.

Mucke H, Mohr KT, Rummler A e Wutzler P. Untersuchungen u"ber den haut-pH-wert der hand nach anwendeung von seife. *Reinigungs- und Ha"ndedesinfektionsmittein. Pharmazie*. 1993;48:468-9.

Nelson HS. Diagnostic procedures in allergy I: allergy skin testing. *Annals of Allergy*. 1983;51:411– 417.

Nelson HS. Variables in allergy skin testing. In: Dolen W, ed. *Skin Testing*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2001:281–290.

Nuttall TJ, Peter BH, Bensignor E, Willemse T. and the members of the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. *European Society of Veterinary Dermatology*. 2006; 17:223–235.

Nuttall T. Canine atopic dermatitis – what have we learned? Downloaded from veterinaryrecord.bmj.com on May 21, 2013 - Published by group.bmj.com

Olivry T. Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011; 144:11–16.

Olivry T, Deboer DJ, Prélaud P, *et al.*; International Task Force on Canine Atopic Dermatitis: Food for thought: pondering the relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *Veterinary Dermatology*. 2007;18(6):390–391.

Olivry T, Deboer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prélaud P, International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology*. 2010; 21: 233-248.

Olivry T, Saridomichelakis M and for the International Committee on Atopic Diseases of Animals (ICADA). Evidence-based guidelines for anti-allergic drug withdrawal times before allergen-specific intradermal and IgE serological tests in dogs. *Veterinary Dermatology*. 2013; 24: 225–e49.

Oppenheimer J e Nelson HS. Skin testing. *Annals of Allergy Asthma and Immunology* 2006; 96(SI):56-512.

Park SJ, Ohya F, Yamashita K, Nishifuji K e Iwasaki T. Comparison of response to immunotherapy by intradermal skin test and antigen-specific IgE in canine atopy. *Journal of Veterinary Medicine and Science*. 2000;62: 983–988.

Patterson P, Schaeffer DJ e Campbell KL. Reproducibility of a commercial in vitro allergen-specific assay for immunoglobulin E in dogs. *Veterinary Record*. 2005;157, 81–85.

Peng Z, Simons FE, Becker AB. Measurement of ragweed-specific IgE in canine serum by use of enzyme-linked immunosorbent assays, containing polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal of Veterinary Research*. 1993; 54: 239-43.

Pereira, MG. Epidemiologia: Teoria e Prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1995

Plager DA, Torres SMF, Koch SN e Kita H. Gene transcription abnormalities in canine atopic dermatitis and related human eosinophilic allergic diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2012; 149, 136-142.

Plant JD, Neradelik MB, Polissar NL, Fadok VA e Scott BA. Agreement between allergen-specific IgE assays and ensuing immunotherapy recommendations from four commercial laboratories in the USA. *Veterinary Dermatology*. 2014; 25, 15–e6.

Platts-Mills TA. Indoor allergens. In: Middleton's allergy, 7a. ed., Mosby Elsevier: Philadelphia; 2009.

Plumb DC: Plumb's veterinary drug handbook, desk edition, ed 6. Wiley-Blackwell; 2008.

Preziosi DE, Goldschmidt MH, Greek JS, Jeffers JG, Shanley KS, Drobatz K e Mauldin EA. Feline pemphigus foliaceus: a retrospective analysis of 57 cases. *Veterinary Dermatology*. 2003; 14(6):313–321.

Proksch E, Brandner JM e Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 2008; 17: 1063–72.

Reedy LM, Miller WH e Wilemse T. Allergic Skin Diseases of the Dog and Cat. 2. ed. London, UK: Saunders; 1997.

Roque JB, O'Leary CA, Kyaw-Tanner M, Latter M, Mason K, Shipstone M, Vogelnest L e Duffy D. High allergen-specific serum immunoglobulin E levels in nonatopic West Highland white terriers. *Veterinary Dermatology*. 2011; 22, 257–266.

Roussel AJJ, Bruet V e Bourdeau PJ. Characterisation of dog sensitisation to Grass pollen in western France from 1999 to 2010. *Veterinary Record*. 2013. Downloaded

from <http://veterinaryrecord.bmj.com/> on December 3, 2014 - Published by group.bmj.com

Saevik BK, Ulstein TL, Larsen HJS. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of allergen-specific IgE antibodies in dogs. *Research in Veterinary Science*. 2003; 74: 37-45.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Gioulekas D e Leontidis L. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1999; 69: 61-73.

Saridomichelakis MN, Marsella R, Lee KW, Esch RE, Farmaki R e Koutinas AF. Assessment of cross-reactivity among five species of house dust and storage mites. *Veterinary Dermatology*. 2008; 19: 67-76.

Schneider L, Tilles S, Lio P, Boguniewicz M, Beck L, LeBovidge J e Novak N. Atopic dermatitis: A practice parameter update 2012. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013; 131 (2), 295-299e27.

Sture GH, Haliwell REW, Thoday KL, Van Den Broek AHM, Henfrey JH, Lloyd DH, Mason IS e Ferguson E. Canine atopic disease: the prevalence of positive intradermal tests at two sites in the north and south of Great Britain. *Veterinary Immunological Immunopathology*. 1995; 44: 293-308.

Suphioglu C. Thunderstorm asthma due to grass pollen. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1998;116(4):253-60.

Taketomi EA, Sopelete MC, Moreira PFS, Vieira F. Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2006; 72: 562-7.

Terra SA, Silva DAO, Sopelete MC, Mendes J, Sung SJ e Taketomi EA. Mite allergen levels and acarologic analysis in house dust samples in Uberaba, Brazil. *Journal of Investional Allergology and Clinical Immunology*. 2004; 14:232-237.

Thom N, Favrot C, Failing K, Mueller RS, Neiger R e Linek M. Intra- and interlaboratory variability of allergen-specific IgE levels in atopic dogs in three different laboratories using the Fc-ε receptor testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009; 133: 183–9.

Thyssen JP, Linneberg A, Menné T e Johansen JD. The epidemiology of contact allergy in the general population – prevalence and main findings. *Contact Dermatitis*. 2007; 57(5):287–299.

Vieira FAM. Polinose no Brasil. In: Negreiros EB, Ungier C. *Alergologia clínica*. São Paulo: Atheneu; 1995.

Vieira FAM. Novas práticas agropastoris estão influenciando a relação meio-ambiente/polinose no sul do Brasil? *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. 2003; 26: 37-8

Wassom DL e Grieve RB. In vitro measurement of canine and feline IgE: a review of FcεR1a-based assays for detection of allergen-reactive IgE. *Veterinary Dermatology*. 1998; 9: 173-178.

Weber RW. Patterns of pollen cross-allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003; 112 (2): 229-39.

White S, *et al*. Nonsteroidal immunosuppressive therapy. In Bonagura J, editor: *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*, Philadelphia: WB Saunders Co; 1999.

Williams PB, Barnes JH, Szeinbach SL e Sullivan TJ. Analytic precision and accuracy of commercial immunoassays for specific IgE: establishing a standard. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000; 105: 1221–1230.

Wood SH, Clements DN, Ollier WE, Nuttall T, Mcewan NA e Carter SD. Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *Journal of Dermatological Science*. 2009; 55: 27-33.

Wüthrich B, Schindler C, Leuenberger P, Ackermann-Liebrich P. Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). *International Archives of Allergy and Immunology*. 1995;106(2):149-56.

Yamamoto IA, Igawa S, Koshibe M. Order and disorder in corneocyte adhesion. *Journal of Dermatology*. 2011; 38:645-654.

Zavadniak, AF. Verificação da potência de extratos alergênicos e da exposição a alérgenos domiciliares: contribuição ao tratamento de doenças alérgicas. Curitiba. Dissertação [Mestrado] - Universidade Federal do Paraná; 2000.

Zeman B, Griot-Wenk ME, Eder C, Marti E, Mayer P, Nefzger M, Schneider H, DeWeck AL e Liehl E. Allergic pulmonary and ocular tissue responses in the absence of serum IgE antibodies in an allergic dog model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2002; 87: 373-378.

Zoppas BCA, Valencia-Barrera RM, Duso SMV e Fernández-González D. Fungal spores prevalent in the aerosol of the city of Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, over a 2-year period (2001–2002). *Aerobiologia*. 2006; 22:119–126.

Zur G, Ihrke PJ, White SD e Kass PH. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Veterinary Dermatology*. 2002; 13, 89-102.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO DE USO ANIMAL

Eu, _____
Nacionalidade: _____, estado civil: _____,
Idade: _____, profissão: _____, RG: _____,
Endereço: _____, permito a

participação do meu animal no estudo denominado: **“Avaliação da acurácia de testes sorológicos para diagnóstico específico da dermatite atópica canina”**, cujos objetivos são: **avaliar os testes sorológicos, disponíveis comercialmente, como métodos diagnósticos de sensibilização a alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, em comparação com o teste intradérmico.**

A participação do meu animal no referido estudo será no sentido de **contribuir para o melhor entendimento da participação de alérgenos ambientais provenientes de ácaros na precipitação da inflamação e do prurido (eczema) em cães com dermatite atópica, correlacionando com os meios diagnósticos utilizados.** Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos e negativos somente serão obtidos após a sua realização.

Estou ciente de que meu animal será atendido, respeitado e receberá os cuidados necessários, como qualquer outro elemento submetido da mesma forma a procedimentos onde não estejam sendo utilizados para fins de pesquisa.

Também fui informado de que posso recusar a participação do meu animal no estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de que, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que recebe o meu animal.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: **prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias, Dr. Victor do Espírito Santo Cunha e mestranda Marcia Elizabeth Keim Magheli Lima** e com eles poderei manter contato pelo email dermatocaoegato@gmail.com.

É assegurada a assistência durante a pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação da pesquisa com o meu animal.

Assim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em permitir a participação do mesmo, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação do meu animal. _____, ___ / ___ / ____.

Proprietário: _____
Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias: _____
Dr. Victor do Espírito Santo Cunha: _____
M.V. Marcia Elizabeth Keim Magheli Lima: _____

APÊNDICE B

FICHA CLÍNICA PARA SELEÇÃO PROJETO MESTRADO

Nome: () M () F () castrado () íntegro

Raça: Idade/Nasc:

Responsável: CPF:

Tel: () Local: () RJ () PR () SC

Critérios de Inclusão GRUPO CONTROLE:

1) domiciliado: () sim

2) animal hígado: () sim

3) sinais de doença tegumentar: () ausentes

4) doença sistêmica ou imunocomprometedora: () não

5) Última administração de medicações:

- corticoide sistêmico- () > 8 semanas () > 12 semanas

- anti-histamínico sistêmico- () > 2 semanas

- corticosteroides tópicos- () > 3 semanas

- faz uso de medicação regular? () não () sim

6) Estro, gestação, lactação: () ausentes

7) Teste intradérmico:

a) Controle positivo - + =/2 =mm

b) Controle negativo - + =/2 =mm - *Cut off*: Cp + Cn/2 =

c) *Der p* - + =/2 =mm +() -()

d) *Der f* - + =/2 =mm +() -()

e) *Blo t* - + =/2 =mm +() -()

leitura dos controles – 15 minutos – h

leitura dos alérgenos- 20 minutos - h

...../...../14

Mestranda Marcia Lima
Médica Veterinária
CRMV-RJ 5217

FICHA CLÍNICA PARA SELEÇÃO PROJETO MESTRADO

Nome: () M () F () castrado () íntegro

Raça: Idade/Nasc:

Responsável: CPF:

Tel: () Local: () RJ () PR () SC

Critérios de inclusão GRUPO DE ESTUDO:

1) Favrot:

- () início dos sintomas com < 3 anos de idade
- () domiciliado
- () melhora com corticoide
- () prurido primário
- () porção distal dos membros torácicos acometida
- () condutos auditivos acometidos
- () bordas de pavilhão auricular não acometidas
- () região dorsolombar não acometida

2) Controle de infecções:

- () antimicrobiano sistêmico- (contínuo - dias)
- () pulsoterapia -
- () tópico sintomático

3) controle de ectoparasitos:

- () quinzenal () mensal

4) irritantes:

- onde dorme: () cama de tecido () acesso a sofá e cama () embaixo da cama
- () roupas () contato com grama () outros
- ambiente: () piso liso () carpete, tapete felpudo () piso madeira
- () outros:
- limpeza semanal: () lavagem () aspirador de pó () hipoclorito de sódio diluído ()
quaternário de amônio diluído () outros:

5) hidratação da pele:

- banho com () Dermogen () Allercalm () outros:
() q 3ds () q 7ds
- hidratante () Hidrapet () Humilac () Allerderm q 7ds () outros:
() Sid () q 2ds

6) Dieta de exclusão de DAIA com:

- () dieta comercial, qual?
- () dieta caseira qual?

7) Última administração de medicações:

- corticoide sistêmico- () > 8 semanas () > 12 semanas
- anti-histamínico sistêmico- () > 2 semanas
- corticoide tópico- () > 3 semanas

8) Estro, gestação, lactação: () ausentes

9) Teste intradérmico: início ____: ____ h

a) Controle positivo - + =/2 =mm

b) Controle negativo - + =/2 =mm

Cut off. Cp + Cn/2 =

c) Der p - + =/2 =mm +() -()

d) Der f - + =/2 =mm +() -()

e) Blo t - + =/2 =mm +() -()

leitura dos controles – 15 minutos – h

leitura dos alérgenos- 20 minutos - h

...../...../14

Mestranda Marcia Lima
Médica Veterinária
CRMV-RJ 5217

ANEXOS

ANEXO A



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 12 de Dezembro de 2013.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 833 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da acurácia de testes sorológicos no diagnóstico dos fatores extrínsecos relacionados à dermatite atópica canina

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marconi Rodrigues de Farias

EQUIPE DE PESQUISA: Marconi Rodrigues de Farias, Marcia Elizabeth Keim, Victor do Espírito Santo Cunha.

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária – Mestrado

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Canis familiaris</i>	M/F	Indefinido	B	60

O colegiado do CEUA em reunião no dia 12/12/2013, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer:

APROVADO.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Marta Luciane Fischer
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso de Animais.

