

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TESE DE DOUTORADO

RAFAEL RODRIGUES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HISTAMINA E
EXTRATOS ALERGÊNICOS EM CÃES SADIOS SUBMETIDOS A TESTE
INTRADÉRMICO**

PORTO ALEGRE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HISTAMINA E
EXTRATOS ALERGÊNICOS EM CÃES SADIOS SUBMETIDOS A TESTE
INTRADÉRMICO**

Autor: Rafael Rodrigues Ferreira.
Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias, junto à Faculdade de
Veterinária da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.
Subárea: Microbiologia
Especialidade: Micologia
Orientador: Prof. Dr. Laerte Ferreira
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio
Guerra Bernd

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Ferreira, Rafael Rodrigues

Avaliação de diferentes concentrações de histamina e extratos alergênicos em cães saudáveis submetidos a teste intradérmico / Rafael Rodrigues Ferreira. -- 2013.

68 f.

Orientador: Laerte Ferreira.

Coorientador: Luiz Antônio Guerra Bernd.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Teste intradérmico. 2. Limiar irritativo. 3. Dermatite atópica. 4. Cão. I. Ferreira, Laerte, orient. II. Bernd, Luiz Antônio Guerra, coorient. III. Título.

Folha de aprovação da tese

RAFAEL RODRIGUES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HISTAMINA E
EXTRATOS ALERGÊNICOS EM CÃES SADIOS SUBMETIDOS A TESTE
INTRADÉRMICO.**

Aprovada em 27 de Março de 2013.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Laerte Ferreira
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Mauro Luis da Silva Machado
Membro da Comissão

Prof. Dr. Daniel Guimarães Gerardi
Membro da Comissão

Prof. Dra. Clarissa Pimentel de Souza
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as graças alcançadas.

Aos meus pais por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

À Simone Passos Bianchi, por todo amor, estímulo, dedicação, paciência e carinho, como companheira e colega.

Aos mestres e amigos Mauro Luís da Silva Machado e Marconi Rodrigues de Farias que contribuíram muito no caminho de minha formação profissional.

Ao meu orientador, desde a graduação, passando pela Residência, Mestrado e Doutorado, Prof. Laerte Ferreiro, por sempre acreditar em mim. Muito obrigado por tudo!

Ao meu co-orientador, Dr. Luiz Antônio Guerra Bernd, pela ajuda prestada.

Ao colega e amigo Victor do Espírito Santo Cunha por ter sido incansável em toda ajuda prestada, fundamental para realização desse trabalho.

À FDA-Allergenic pelo patrocínio dos extratos alergênicos e apoio técnico.

Aos colegas, diretores e funcionários do HCV-UFRGS, principalmente do Setor de Dermatologia Veterinária, pelo apoio e ajuda.

Aos meus irmãos Rodrigo e Roberto por estarem sempre presentes em minha vida.

À todos colegas que me ajudaram na parte prática do experimento.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	05
LISTA DE FIGURAS	06
RESUMO	07
ABSTRACT	08
1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Dermatite atópica canina	12
2.2. Teste intradérmico.....	16
3. OBJETIVO.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES.....	42
8. REFERÊNCIAS	43
9. ARTIGO CIENTÍFICO.....	50
10. ANEXOS	65

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Resultados dos diferentes pontos de corte (*cut-off*), obtidos a partir das diferentes concentrações de histamina utilizadas. 29
- TABELA 2.** Resultados das reações do controle positivo (histamina). 30
- TABELA 3.** Frequências de positividade (n, percentual e os intervalos para uma confiança de 95% relativos à porcentagem de resultados positivos) do teste intradérmico com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, a partir do ponto de corte, obtido com a concentração de histamina de 0,1 mg/mL..... 31
- TABELA 4.** Frequências de positividade (n, percentual e os intervalos para uma confiança de 95% relativos à porcentagem de resultados positivos) do teste intradérmico com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, a partir do ponto de corte, obtido com a concentração de histamina de 0,01 mg/mL..... 32
- TABELA 5.** Frequências de positividade (n, percentual e os intervalos para uma confiança de 95% relativos à porcentagem de resultados positivos) do teste intradérmico com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, a partir do ponto de corte, obtido com a concentração de histamina de 0,001 mg/mL..... 33

LISTA DE FIGURAS

Figuras do Anexo:

FIGURA 1. Canino macho, 2 anos de idade, da raça Spitz submetido a teste intradérmico..... 65

FIGURA 2. Canino fêmea, SRD, 4 anos de idade, submetido a avaliação do resultado do teste intradérmico com uso de paquímetro digital (Electronic Digital Calliper®)..... 66

RESUMO

Teste intradérmico avalia reação de hipersensibilidade a diversos agentes que possam apresentar poder reacional alérgico e são comumente utilizados para complementar o diagnóstico da dermatite atópica canina (DAC). Ainda não existe consenso sobre as concentrações de histamina e extratos alergênicos a serem utilizadas. Para determinar a concentração ideal de histamina, como controle positivo, e do limiar irritativo de extratos alergênicos em teste intradérmico é necessário que diversas concentrações sejam avaliadas em uma população bem numerosa de cães hígidos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar em 160 cães saudáveis submetidos a teste intradérmico, quais seriam as concentrações de histamina e de extratos alergênicos consideradas ideais. A solução contendo 0,1 mg/mL de histamina foi considerada como parâmetro ideal, provocando reações cutâneas com diâmetro médio, mediana e desvio padrão, de 15,18 mm, 14,97 mm e 2,07 mm, respectivamente. A partir do estabelecimento da concentração de histamina, foram determinadas as concentrações ótimas dos extratos alergênicos, expressas em PNU/mL: 1.000 para *Dermatophagoides pteronyssinus*, 500 para *D. farinae*, 125 para *Blomia tropicalis* e 2.000 para *Malassezia pachydermatis*. Futuros estudos devem ser conduzidos em cães atópicos para verificação da acurácia dos testes intradérmicos realizados com essas concentrações.

Palavras-chave: Teste intradérmico, limiar irritativo, dermatite atópica, cão.

ABSTRACT

Intradermal testing evaluates hypersensitivity reaction to different agents that can present allergic reactivity power. It is commonly used to complement canine atopic dermatitis diagnosis. There is still no consensus about histamine concentrations and allergen extracts to be used. The determination of the histamine ideal concentration as positive control and the irritant threshold of allergen extracts for intradermal testing, requires evaluation of different concentrations on a large population of healthy dogs. The purpose of this research was to evaluate the ideal histamine and allergen extracts concentrations on 160 healthy dogs submitted to intradermal testing. A histamine solution 0,1 mg/mL was considered the ideal parameter. It caused cutaneous reactions with average diameter, median measure and standard deviation of 15.18 mm, 14.97 mm and 2.07 mm, respectively. From the histamine concentration establishment, the optimum allergen extracts concentrations were determined, expressed by PNU/mL: 1.000 for *Dermatophagoides pteronyssinus*, 500 for *D. farinae*, 125 for *Blomia tropicalis* and 2.000 for *Malassezia pachydermatis*. Future studies have to be conducted on atopic dogs to verify the accuracy of the intradermal testing with these concentrations.

Key-words: Intradermal testing, irritant threshold, atopic dermatitis, dog.

1. INTRODUÇÃO

Teste intradérmico é um exame de realização rápida e segura, que consiste em aplicações cutâneas de extratos alergênicos, a fim de avaliar reação de hipersensibilidade a agentes potencialmente desencadeantes de reações alérgicas e auxiliar na escolha dos alérgenos a serem utilizados em protocolos de imunoterapia alérgeno-específica. É utilizado principalmente em casos de dermatite atópica canina (DAC) (HILLIER; DEBOER, 2001; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

A DAC é uma doença alérgica de etiologia genética que cursa com disfunções intrínsecas imunológicas e de barreira cutânea (CORK et al, 2006). As alterações genéticas a nível epidérmico levam a modificações de lipídeos e proteínas estruturais, facilitando a perda de água, tornando a pele ressecada e permeável a penetração de agentes externos (OLIVRY et al., 2010). As alterações da resposta imunológica, principalmente um desequilíbrio entre os linfócitos Th1 e Th2, levam à hiper-reatividade cutânea mediada por IgE à diversos agentes extrínsecos e intenso prurido (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

São diversos os agentes envolvidos, tais como ácaros, fungos, polens, irritantes e microorganismos residentes da pele (DEBOER; MARSELLA, 2001; GRIFFIN; DEBOER, 2001; MUELLER, 2007). Os ácaros da poeira domiciliar estão entre os principais alérgenos responsáveis por perpetuar dermatite atópica (DA), afetando de 30 a 90% dos cães (RANDALL et al., 2003; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

O tratamento da DAC envolve uma série de protocolos, tais como hidratantes corporais, antimicrobianos, anti-histamínicos, drogas imunossupressoras, glicocorticoides e imunoterapia alérgeno-específica (NUTTAL, 2008; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Imunoterapia alérgeno-específica consiste na administração gradual de extratos de alérgenos que são responsáveis por determinada doença alérgica com vista a melhorar os sintomas clínicos dos pacientes (MUELLER; BETTENAY, 1996; BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998, CASTRO; GALVÃO, 2011). É a única forma de tratamento que pode alterar o transcurso inicial, e curar uma doença alérgica (LOEWENSTEIN;

MUELLER, 2009; CASTRO; GALVÃO, 2011). Na DAC o sucesso da imunoterapia alérgeno-específica é dependente da utilização de antígenos previamente estabelecidos a partir de teste intradérmico, o de eleição para esse propósito (PARK et al., 2000; GRIFFIN; HILLIER, 2001; HILLIER; DEBOER, 2001; LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009; OLIVRY et al., 2010; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Diversas concentrações de histamina e de extratos alergênicos já foram utilizadas em teste intradérmico em cães atópicos, porém ainda não há uniformidade entre as concentrações até então utilizadas (GROSSELIN et al., 1983; STURE et al., 1995; MUELLER; BURROWS; TSOHALIS, 1999; SARIDOMICHELAKIS et al., 1999; HILLIER; KWOCKHA; PINCHBECK, 2000; PARK et al., 2000; BENSIGNOR; CARLOTTI, 2002; ZUR^a et al., 2002; ZUR^b et al., 2002; FOSTER et al., 2003; CHANTHICK; ANAMAN; BUATHET, 2008; SUNG; HUANG, 2009).

Para avaliar limiar irritativo em teste intradérmico, ou seja, determinar ideais de concentrações de extratos alergênicos, com intuito de diferenciar irritação cutânea de sensibilização, é necessário testar diversas concentrações em um grupo de cães saudáveis. A concentração considerada ideal deve ser a maior possível em que 90% dos animais não tenham reações positivas (REEDY; MILLER e WILEMSE, 1997; HILLIER; DEBOER, 2001; HENSEL et al., 2004, FARVER et al., 2005; KOEBRICH et al., 2012). Para determinar concentração ideal de histamina, como controle positivo do teste intradérmico, também é preciso que sejam utilizadas diversas concentrações numa população de cães hígidos até achar uma que reduza o desenvolvimento de reações positivas, de tal forma que somente 10% dos cães apresentem resultados positivos com os extratos alergênicos testados. Deve-se escolher uma concentração que provoque reação cutânea com diâmetro maior que 10 mm (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; HENSEL et al., 2004).

A literatura sobre o assunto registra poucos trabalhos que visam estabelecer concentrações ideais em cães saudáveis. Além disso, ainda existe discordância entre alguns autores com relação aos parâmetros de concentração dos extratos alergênicos a serem utilizados em teste intradérmico em cães com doença alérgica (WELLINGTON; MILLER; SCARLETT, 1991; HILLIER; DEBOER, 2001; HENSEL et al., 2004; LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009; KOEBRICH et al., 2012; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Possivelmente o uso de diferentes concentrações de extratos alergênicos e histamina até

então utilizados, se deve ao fato de que os trabalhos que avaliaram ideais de concentrações utilizaram um “n” amostral reduzido.

O objetivo do presente estudo foi determinar em cães saudáveis, submetidos a teste intradérmico, com diferentes concentrações de histamina e de extratos alergênicos, de ácaros da poeira domiciliar das espécies *Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, e de leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis*, quais são as concentrações ideais, para utilização futura em testes intradérmicos de cães atópicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dermatite atópica canina

Etiopatogenia

A DAC é uma doença multifatorial que envolve a pele de animais geneticamente predispostos, levando a alterações, principalmente na barreira cutânea, o que facilita a perda transepidermica de água, e a torna ressecada e permeável a penetração de agentes externos. As reações observadas nos pacientes são principalmente hiper-reatividade cutânea mediada por IgE e intenso prurido (OLIVRY; HILL, 2001; SOUSA; MARSELLA, 2001). Os principais agentes perpetuantes da doença podem ser classificados como aeroalérgenos: ácaros, fungos e polens; microorganismos residentes da pele: principalmente leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis* e bactérias do gênero *Staphylococcus* e também irritantes (DEBOER; MARSELLA, 2001; GRIFFIN; DEBOER, 2001).

Por se tratar de uma síndrome, na DAC, os alérgenos adentram no organismo, causando alterações clínicas, não somente pela via transcutânea, que é a principal, mas também penetram pelas vias aéreas e digestiva (OLIVRY et al., 2007).

O extrato córneo da epiderme é a primeira linha de defesa entre o ambiente e o corpo. É formado pelos corneócitos, os quais são células achatadas que representam o estágio final da diferenciação dos ceratinócitos basais. A adesão entre os corneócitos é mantida por desmossomos, além de outras proteínas de adesão, como a desmogleína, desmocolina e a plectina (ANDRADE, 2008).

Células de Langerhans exercem papel importante no processamento e na apresentação dos antígenos. A imunomarcagem de amostras cutâneas colhidas de cães com DA demonstram a proliferação de células de Langerhans e aumento da expressão de IgE ligada ao tecido lesado. Dois padrões distintos relativos à produção de citocinas já foram demonstrados em diversas espécies mamíferas. Tais padrões se relacionam à resposta dos linfócitos T1 auxiliares (TH1, *T helper 1*) e T2 (TH2, *T helper 2*). Uma resposta anormal

relativa à polarização das citocinas (TH1 para TH2) pode ser responsável pelo desenvolvimento dos sintomas da DA (HILL; OLIVRY, 2001). Esses eventos promovem a liberação de agentes farmacologicamente ativos dos mastócitos, liberando fatores da cascata do prurido, tais como heparina, histamina, prostaglandinas, citocinas, interleucinas, etc. Em adição, os queratinócitos são ativados por produtos microbianos e derivados de fatores imunomediados, liberando citocinas e quimioquinas. Devido a hiperreatividade Th2, há diminuição da atividade dos lipídios e peptídeos antimicrobianos (defensina e catelicidina), facilitando a penetração de microrganismos tegumentares (KISICH et al., 2008; SCHAUBER; GALLO, 2008).

Estudos revelam que os queratinócitos de cães com DA, mesmo assintomáticos, têm maior aderência e colonização por *Staphylococcus pseudintermedius* e *Malassezia pachydermatis* (principais agentes causadores das doenças bacterianas e fúngicas cutânea em cães com DA, respectivamente). Esses microorganismos podem se comportar como “superantígenos”, capazes de induzir a expressão antigênica linfocítica cutânea (DEBOER; MARSELLA, 2001) e penetrar ativamente pela epiderme atópica. Ao assumir o papel de alérgenos, estimulam a resposta mediada por IgEs e provocam reação do tipo alérgeno-específica. Esses eventos levam a migração de linfócitos T ativados ao local de inflamação cutânea, aumentando a resposta inflamatória. Em adição, os mastócitos cutâneos tornam-se sensíveis às IgEs e degranulam após a epiderme ser exposta até mesmo a uma pequena quantidade de toxinas estafilocócicas ou outros antígenos absorvidos percutaneamente (HALLIWELL; DEBOER, 2001; MARSELLA; OLIVRY, 2001). As infecções de repetição tornam-se freqüentes, precipitam e intensificam a doença atópica, o que aumenta os custos do tratamento e conduz a refratariedade (MUELLER, 2007; MCEWAN, 2000; SIMOU et al., 2005; MCEWAN et al., 2006).

Defeitos genéticos primários na barreira epidérmica podem ser determinantes no desenvolvimento da DA. Alterações na estrutura genômica do gene Kalicreína 7, mutações do gene *SPINK5* e alterações do pH do estrato córneo, identificadas em pessoas atópicas, conduzem ao aumento do tempo de meia-vida da enzima quimiotróptica do estrato córneo (CORK et al., 2006). A elevação dessa enzima no espaço extracelular conduz à quebra dos desmossomos, resultando em descamação prematura dos corneócitos e adelgaçamento da camada córnea. Além disso, distúrbios de maturação dos corpúsculos lamelares conduzem

a diminuição do mecanismo de extrusão de lipídeos para o meio extracelular e da produção de ceramidas em indivíduos atópicos, o que leva ao aumento da perda transepidermica e à xerose tegumentar (MORAR et al., 2006). A conjugação destes fatores promove a quebra da função de barreira cutânea, o que favorece a penetração transepidermica de aeroalérgenos como os alérgenos de ácaros da poeira doméstica, de fungos, insetos, polens de gramíneas, arbustos e ervas daninhas, antígenos microbianos provenientes de bactérias e leveduras e irritantes ambientais, os quais se tornam alvos de resposta imunoalérgica evidenciada em animais com DA (FARIAS, 2007).

As infecções de repetição estão se tornando cada vez mais comuns nos cães com DA. O desafio imposto ao clínico frente o tratamento da piodermite bacteriana e a malasseziose cutânea crônicas e recorrentes exigem muitas vezes o uso contínuo de antimicrobianos, podendo levar a importantes danos aos pacientes. O fato do cão portador de DA montar uma resposta imunológica exacerbada frente a microorganismos comensais, principalmente do gênero *Malassezia*, é motivo de estudo por vários pesquisadores (CHEN; HILL, 2005; FARVER et al., 2005; MCEWAN et al., 2006; MUELLER, 2007) no intuito de entender a real fisiopatologia, visando melhor controle da doença.

Sinais clínicos

Os principais sinais clínicos observados são eritema, liquenificação, alopecia auto-induzida e escoriação (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001). Sessenta e duas áreas corporais podem estar envolvidas na DAC. O grau de severidade da doença pode ser detectado através de um “índice” proposto por Olivry et al (2007), denominado CADESI, que encontra-se na sua terceira versão. O emprego dessa ferramenta, além de auxiliar o clínico a determinar grau de severidade do quadro no primeiro dia de consulta, também ajuda na aferição da evolução clínico-terapêutica. Notas de 0 a 5 devem ser atribuídas para cada um dos quatro sinais clínicos, sempre relacionadas com cada área corporal acometida. O somatório de todas as notas caracteriza o grau de severidade da doença.

Diagnóstico

Alguns critérios já foram utilizados para estabelecer o diagnóstico de DAC (WILLEMSE, 1986; PRÉLAUD et al., 1998). Porém, atualmente seguem-se os preceitos de Favrot et al. (2010), os quais apontam que a combinação de seis dos oito pré-requisitos abaixo relacionados, apresentam uma sensibilidade de 85%, com especificidade de 89% no diagnóstico da DAC.

1. Início dos sinais antes dos três anos de idade.
2. Cão habitante de interiores residenciais.
3. Prurido responsivo a glicocorticóides.
4. Prurido não-lesional.
5. Extremidades de membros anteriores lesadas.
6. Pinas lesadas.
7. Margens das orelhas não lesadas.
8. Região dorso-lombar não lesadas.

Além desses critérios, deve-se também levar em conta o histórico e a exclusão de outras dermatopatias pruriginosas, como escabiose, dermatite alérgica à saliva de artrópodes e alergia alimentar, bem como outras dermatoses infecto-parasitárias.

Teste intradérmico não firma diagnóstico de DAC, porém serve para auxiliar o clínico no diagnóstico e na escolha dos extratos alergênicos a serem utilizados em protocolos de imunoterapia alérgeno-específica (OLIVRY et al., 2010).

Tratamento

O tratamento da DAC envolve uma série de protocolos. São utilizados hidratantes corporais, antimicrobianos, anti-histamínicos, drogas imunossupressoras, glicocorticóides e imunoterapia alérgeno-específica (NUTTAL, 2008; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Na DAC, em cerca de 85% dos casos, a doença é perene e as lesões crônico-recorrentes, sendo, portanto, necessário longo tempo de tratamento (LOEWENSTEIN;

MUELLER, 2009). Para evitar-se o uso pulsátil ou contínuo de corticosteróides ou outras medicações imunomoduladoras, a imunoterapia alérgeno-específica mostra ser uma alternativa eficaz e segura, com baixos índices de efeitos colaterais, diferentemente do observado nas demais terapias medicamentosas (GRIFFIN; HILLIER, 2001; HILLIER; DEBOER, 2001; FARVER et al., 2005; LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009; OLIVRY et al., 2010; CASTRO; GALVÃO, 2011; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Melhores resultados na imunoterapia alérgeno-específica são observados após aplicação do teste intradérmico, pois permite uma melhor escolha dos extratos alergênicos a serem utilizados no protocolo vacinal (GRIFFIN; HILLIER, 2001; HILLIER; DEBOER, 2001; OLIVRY et al., 2010). Atualmente, este é um dos protocolos terapêuticos mais seguros e com boa eficácia, em torno de 50 a 80%. (LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009; OLIVRY et al., 2010).

2.2 Teste intradérmico

Teste intradérmico é um exame realizado na pele de pacientes com diagnóstico de doenças alérgicas. Auxilia na verificação de hipersensibilidade, mediada por IgE e na escolha de protocolos de imunoterapia alérgeno-específica (HILLIER; DEBOER, 2001, KOEBRICH et al, 2012).

Mundialmente, em medicina humana, testes cutâneos e imunoterapia alérgeno-específica são utilizados em grande escala em pacientes alérgicos (CASTRO; GALVÃO, 2011), porém, na DA, imunoterapia ainda é muito discutida e os resultados são controversos (LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009). Já em medicina veterinária, mais precisamente na DAC, imunoterapia alérgeno-específica é largamente usada na Europa e Estados Unidos, mostrando melhores resultados quando realizada após teste intradérmico (GRIFFIN; HILLIER, 2001; HILLIER; DEBOER, 2001; FARVER et al., 2005; LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009).

No Brasil, essas técnicas são pouco utilizadas. Até o momento, há poucos dados registrados (CUNHA et al., 2007), referentes ao perfil de resposta alérgica que os cães com DA apresentam quando submetidos a teste intradérmico. Além disso, não há estudo que

avalia limiar irritativo de alérgenos e concentração ideal de histamina para teste intradérmico em cães saudáveis no Brasil, visto que concentrações de extratos alérgicos podem variar de acordo com cada região (SUNG; HUANG, 2009).

Preparação do paciente e realização do procedimento

Para realização do teste intradérmico, os animais não devem ter recebido tratamento a base de corticosteróides (três semanas anteriores – uso tópico e oral e oito semanas para glicocorticóides de depósito) (REEDY; MILLER; WILEMSE, 1997; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001) e anti-histamínicos (antes de dez dias) (BARBET; HALLIWELL, 1989).

Para preparação do paciente, protocolo anestésico torna-se opcional. Frank, Kunkle e Beale (1992) citam que cães com DA não sedados apresentam níveis séricos de cortisol maiores que os sedados, quando submetidos a teste intradérmico, porém este aumento não interfere na resposta do teste. Quando utilizados, os anestésicos mais indicados são os inalatórios (isoflurano e sevoflurano) (DAVID et al., 2006).

Tricotomia deve ser realizada de forma cuidadosa, normalmente na região lateral do tórax, porém não há comprovação de que outras regiões não possam ser utilizadas para realização do teste (HILLIER; DEBOER, 2001).

Os locais de injeção devem ser marcados com pelo menos 3cm de distância. Solução fosfatada de histamina deve ser utilizada como controle positivo e solução salina 0,9% fosfatada como controle negativo do teste. O volume a ser injetado intradermicamente varia de 0,02 a 0,1mL (REEDY; MILLER; WILEMSE, 1997; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

Os resultados são avaliados 15 minutos pós-aplicação, observando a formação de pápula e/ou eritema local. Resultados positivos ocorrem quando a reação for maior ou igual à média observada entre o controle positivo e o negativo. Este exame pode ser realizado ambulatorialmente (REEDY; MILLER; WILEMSE, 1997; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; HENSEL et al., 2004).

Escolha dos extratos alergênicos

No teste intradérmico, é observada resposta cutânea aos agentes que possam apresentar poder de reação alérgica (HILLIER; DEBOER, 2001). Para tal, são escolhidos previamente os principais aeroalérgenos de determinada região, que diferem de cidade para cidade, devido às diversidades ambientais encontradas em cada uma delas (MENDES, 1989; REEDY; MILLER; WILEMSE, 1997; SPALDING; WALD; BERND, 2000).

Os principais grupos de antígenos utilizados em testes intradérmicos, além dos ácaros (os mais envolvidos em resposta alérgica), são polens, fungos anemófilos, insetos e os principais microorganismos residentes da pele (*Staphylococcus* e *Malassezia*), (HILLIER; DEBOER, 2001). Dentre as espécies de ácaros da poeira domiciliar, o gênero *Dermatophagoides* é o mais descrito, representado principalmente pelas espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (BINOTTI et al., 2001; HILLIER; DEBOER, 2001). São considerados os principais alérgenos responsáveis por hipersensibilidade do tipo I em cães, afetando de 30 a 100% dos cães com dermatite atópica (RANDALL et al., 2003).

Alérgenos de alimentos não são recomendados para teste intradérmicos, devido ao baixo valor preditivo positivo observado. Para auxílio diagnóstico de alergia alimentar em cães, recomenda-se, portanto, exclusão, seguido de desafio dietético (JEFFERS; SHANLEY; MEYER, 1991; KUNKLE; HORNER, 1992).

Padronização de extratos alergênicos

Em Medicina Veterinária, ainda não há padronização dos extratos de alérgenos a serem utilizados em protocolos de testes intradérmicos (LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009).

Segundo Ipsen et al. (1998), os extratos alergênicos são uma mistura complexa de componentes antigênicos. Para assegurar resultados reprodutíveis no auxílio diagnóstico da doença alérgica e posterior realização de imunoterapia alérgeno-específica, a standardização é essencial. Portanto, é importante:

- determinar a composição do alérgeno para assegurar-se de que os componentes antigênicos mais importantes estejam presentes (antígenos “*major*s”);
- quantificar os alérgenos específicos para assegurar-se de que os essenciais estejam presentes em relações constantes;
- quantificar a atividade alergênica total para assegurar-se de que a potência total do extrato seja consistente, *in vivo* e *in vitro*.

Mundialmente, poucos estudos foram realizados na tentativa de elucidar quais as melhores concentrações dos diversos extratos alergênicos a serem utilizados em testes intradérmico, um dos passos requeridos para padronização (HILLIER; KWOCKHA; PINCHBECK, 2000; HENSEL et al., 2004; KOEBRICH et al., 2012). Para avaliar limiar irritativo em teste intradérmico, é necessário testar diversas concentrações de extratos alergênicos, num grupo de indivíduos sadios, até encontrar uma concentração em que apenas 10% apresentem reações cutâneas positivas (REEDY; MILLER e WILEMSE, 1997; HILLIER; DEBOER, 2001).

Teste intradérmico na DAC

Diversos estudos já foram realizados na tentativa de elucidar o perfil de reposta cutânea em cães com DA em várias regiões, envolvendo diversos tipos de concentrações de histamina e de extratos alergênicos:

Grosselin et al. (1983), estudaram teste intradérmico em 81 cães com DA no Canadá por 4 anos e encontraram 88,9% de reações positivas à ácaros, 53,1% à fungos e 35,8% à gramíneas. Foram utilizadas concentrações de 1.500 PNU/mL para todos os extratos alergênicos. Não foi informada a concentração de histamina, nem realizada avaliação de concentrações em animais sadios.

Mais tarde, em 1995, Sture et al. (1995), num estudo realizado na Grã-Bretanha, com 118 cães com DA, utilizaram uma concentração de 10 NE/mL para *D. pteronyssinus* e *D. farinae* e 0,01% de histamina e verificaram que o segundo foi bem mais frequente que o primeiro em reações positivas no teste intradérmico.

Em outro estudo, realizado na Austrália por Mueller, Burrows e Tsohalis em 1999, com 84 cães atópicos, foram utilizadas concentrações de 500 PNU/mL para gramíneas e fungos e para ácaros, uma concentração de 1:75.000 w/v. Não foi informada a concentração de histamina usada em teste intradérmico.

No mesmo ano, Saridomichelakis et al., usaram uma concentração de 1/50.000 para *D. farinae* e 1/5.000 para *D. pteronyssinus* e duas concentrações de histamina (1/100.000 w/v e 1/10.000 w/v), em estudo realizado na Grécia com 91 cães atópicos submetidos a teste intradérmico. A maioria dos animais apresentou resposta positiva a múltiplos extratos alergênicos, principalmente a ácaros da poeira doméstica (84,61%), sendo maior a sensibilidade à espécie *D. farinae* (70,33%).

Park et al. (2000) realizaram um estudo no Japão e observaram, após teste intradérmico, reatividade cutânea para ácaros em 69,5%, para gramíneas em 15,8%, para *Penicillium* spp. em 9,5% e para *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* spp. em 3,2%, dos 95 cães atópicos arrolados. As concentrações utilizadas dos extratos alergênicos foram: 1/10.000 w/v para ácaros, 1.000 PNU/mL para gramíneas e fungos e 1/100.000 w/v para histamina em aplicações de 0,05 mL.

Já Hillier; Kwochka e Pinchbeck, (2000) utilizaram uma concentração de 1/50.000 w/v para *D. farinae* e *D. pteronyssinus* e 1/100.000 w/v de histamina, em estudo envolvendo teste intradérmico realizado nos EUA.

Na França, em 2002, Bensignor e Carlotti realizaram um estudo de avaliação de sensibilidade a ácaros em 150 cães com DA. Todos os animais foram submetidos a teste intradérmico com uma concentração de 1.000 UI/mL para *D. farinae* e *D. pteronyssinus*, 0,1% para outros ácaros e 0,01% para histamina (como controle positivo), em aplicações de 0,05 mL. Previamente, estas mesmas concentrações foram utilizadas em 10 cães saudáveis, que não apresentaram reações positivas. Dos animais atópicos, 90% reagiram à *D. farinae* e 27% à *D. pteronyssinus*.

No mesmo ano, na Califórnia (EUA), ZUR^a et al. desenvolveram um estudo com 266 cães atópicos submetidos a teste intradérmico, avaliados num período de 7 anos. Várias concentrações foram utilizadas: 1:1.000 w/v para *D. pteronyssinus* e *D. farinae*; 250 PNU/mL para demais ácaros; 1.000 PNU/mL para maioria dos fungos e gramíneas; e 1/100.000 w/v para histamina em aplicações de 0,05-0,1 mL. Não foram utilizados cães

sadios anteriormente ao estudo. Os cães reagiram mais a ácaros (71%), seguido de fungos (60%). Apenas 35% dos animais reagiram a gramíneas.

Em 2003, Foster et al., realizaram um estudo no Reino Unido e verificaram 78,9% de positividade em reações cutâneas, após realização de teste intradérmico, para *D. farinae* e 66,4% para *D. pteronyssinus*, 2% para *Penicillium* e 0,7% para *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Alternaria* em 265 cães com DA. Foram utilizadas concentrações de 1/10.000 w/v para *D. farinae* e *D. pteronyssinus*, 1.000 PNU/mL para fungos e 1/100.000 w/v para histamina em aplicações de 0,05 mL.

Na Tailândia, em 2008 Chanthick, Anaman e Buathet, num estudo que envolveu 114 cães com DA, submetidos a testes intradérmicos, utilizaram uma concentração de 1mg/mL de histamina diluída em 0,1 mg/mL de solução salina e 100 AU/mL de *D. farinae* e *D. pteronyssinus*. Encontraram sensibilização cutânea em 74,56% dos animais, para *D. farinae* e em 53,51% dos animais, para *D. pteronyssinus*.

Outro estudo semelhante foi realizado em 2009, por Sung e Huang, em Taiwan, que avaliou resposta cutânea em 71 cães atópicos submetidos a teste intradérmico com concentrações de extratos alergênicos de ácaros, que variaram de 100 a 250 PNU/mL e com uma concentração de histamina de 0,0275 mg/mL, em aplicações de 0,05 mL. Não foram utilizados cães sadios para testar as concentrações usadas. Setenta por cento dos animais apresentaram reações cutâneas positivas à *D. farinae* e *D. pteronyssinus*.

Uso de extrato alergênico de Malassezia em teste intradérmico

Malassezia spp. são microrganismos leveduriformes comensais da pele da maioria dos vertebrados e às vezes podem agir como patógenos (GUILLOT; BOND, 1999). Tradicionalmente, as espécies lipidiodependentes tem sido relacionadas com a pele humana, enquanto que na pele de cães, *M. pachydermatis* é a principal espécie encontrada, como agente comensal e em dermatopatias (BOND; LLOYD, 1997).

Dermatite por *Malassezia* é o termo utilizado para descrever doenças de pele associadas com o aumento populacional de leveduras nas regiões afetadas. Cães com dermatites associadas à *Malassezia* podem ter a população destas leveduras aumentadas em

até 10.000 vezes se comparado a cães saudáveis (BOND; LLOYD, 1997). Várias condições, tais como doenças endócrinas, imunológicas ou parasitárias poderiam alterar a “função de barreira” da pele e favorecer a reprodução exacerbada destas leveduras (CHEN; HILL, 2005).

Embora *Malassezia* seja classificada como patógeno secundário em cães com dermatites, esta levedura é frequentemente pró-inflamatória (GUILLOT *et al.*, 1998; KENNIS *et al.*, 1996), devido a sua capacidade de produzir enzimas como lipases e proteases (COUTINHO; PAULA, 2000, CAFARCHIA *et al.*, 2005) e/ou metabólitos que podem causar reações inflamatórias ou de hipersensibilidade (GUEHO *et al.*, 1998; CHEN; HILL, 2005; ASHBEE, 2006).

Com frequência tem-se observado associação da malasseziose com a DAC. Em função da falha cutânea, programada geneticamente para ocorrer, nos casos de DAC, há uma facilitação para o desenvolvimento e penetração das leveduras, pelo espaço transepidérmico, que contribui para perpetuação da doença atópica (CHEN; HILL, 2005; MUELLER, 2007). As lesões da dermatite por *Malassezia* estão comumente associadas ao prurido e os sinais clínicos comumente observados são eritema, alopecia, excoriações, liquenificação e hiperpigmentação (LARSSON *et al.*, 1988; MASON; EVANS, 1991; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). As regiões mais comumente afetadas são pescoço ventral, axilas, espaços interdigitais, flexurais, perianal, perivulvar, periocular, perilabial e ouvidos (GUILLOT *et al.*, 2000; CAFARCHIA *et al.*, 2006).

Diversas técnicas de citologia e cultura fúngica para a detecção e quantificação de leveduras do gênero *Malassezia* tem sido utilizadas para auxílio diagnóstico em casos de DAC (GUILLOT; BOND, 1999; CAFARCHIA *et al.*, 2005), porém poucos estudos mostram a utilização do teste intradérmico com extratos de alérgenos de *Malassezia* na detecção de hipersensibilidade do tipo-1 em cães com DA (MORRIS; OLIVIER; ROSSER, 1998; FARVER *et al.*, 2005; OLIVRY *et al.*, 2010). No Brasil desconhece-se este tipo de estudo.

Num estudo realizado por Farver *et al.* (2005), evidenciou-se, após a utilização de várias concentrações de extratos de *Malassezia* (4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 100 e 50 PNU/mL) em teste intradérmico em cães saudáveis, que a concentração considerada ideal foi 1.000 PNU/mL, para ser utilizada na detecção de hipersensibilidade do tipo-1 em cães com

DA. Destes animais, 90% não desenvolveram reações positivas no teste intradérmico e nenhum cão reagiu a concentrações menores que a de 1.000 PNU/mL, caracterizando-se assim, o ideal de concentração. No mesmo estudo observou-se ainda, que 93% dos cães que apresentavam DA e malasseziose cutânea apresentaram resultados positivos para extrato de *Malassezia*, em teste intradérmico.

Outro estudo, porém realizado somente com cães com DA, por Sung e Huang (2009), avaliou resposta cutânea em 71 animais submetidos a teste intradérmico com extrato alergênico de *Malassezia pachydermatis* na concentração de 1.000 PNU/mL. Apenas trinta e sete por cento dos cães apresentaram resultados positivos.

Segurança

Testes intradérmicos são de extrema segurança, com raríssimos relatos de efeitos adversos e, quando ocorrem, normalmente são revertidos rapidamente com uso tópico de pomadas/cremes anti-histamínicos (HILLIER; DEBOER, 2001; BENSIGNOR; CARLOTTI, 2002; ZUR^a et al., 2002; FARVER et al., 2005; CUNHA et al., 2007; LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009; SUNG; HUANG, 2009).

Imunoterapia alérgeno-específica

Segundo a *World Health Organization*, imunoterapia alérgeno-específica consiste na administração gradual dos próprios extratos alergênicos que são responsáveis por determinada doença alérgica com vista de melhorar os sintomas clínicos dos pacientes (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998).

Os primeiros relatos da utilização da imunoterapia alérgeno-específica já datam um século. Tentativas de imunização em humanos começaram com Curtis, em 1900, e Scheppergrell, em 1909, nos Estados Unidos, por diferentes vias. William Dunbar, em Hamburgo, tentou, sem sucesso, diferentes tratamentos, incluindo a inoculação subcutânea, cessando o tratamento após forte reação anafilática. Mais tarde, em 1911, Noon desenhou

uma técnica de inoculação profilática contra a febre do feno, na qual a aplicação se dava em doses extremamente diluídas e crescentes. A partir de então, foram publicados os primeiros estudos de Leonard Noon (1911) e de seu colega John Freeman (1911) que são considerados os primeiros relatos da eficácia da imunoterapia espécie-específica (CASTRO; GALVÃO, 2011).

Em cães, a imunoterapia alérgeno-específica foi relatada pela primeira vez com sucesso em 1941 por Wittich. Em cães com DA, diversos estudos vêm sendo relatados, a partir do final da década de 70 (HALLIWELL, 1977; WILLEMSE; VANDENBROM; RIJNBERK, 1984; MUELLER; BETTENAY, 1996; DEBOER, 1998; ZUR^b et al., 2002).

Na DAC o sucesso da imunoterapia alérgeno-específica é dependente da utilização de antígenos previamente estabelecidos a partir de teste intradérmico ou dosagem de IgE antígeno-específica, visando melhora da resposta imune e diminuição de reações alérgicas no paciente (PARK et al., 2000; GRIFFIN; HILLIER, 2001; HILLIER; DEBOER, 2001; ANDRADE, 2008; LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009; OLIVRY et al., 2010). Miller, Griffin e Campbell (2013) citam que o teste intradérmico é o de eleição para auxílio diagnóstico da DAC e para escolha de extratos alergênicos para posterior realização de imunoterapia alérgeno-específica.

3. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi determinar em 160 cães sadios, submetidos a teste intradérmico, com diferentes concentrações de histamina e de extratos alergênicos, de ácaros da poeira domiciliar das espécies *Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*, e de leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis*, quais são as concentrações ideais, para utilização futura em testes intradérmicos de cães atópicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Teste intradérmico foi realizado em 160 cães saudáveis, de seis meses a cinco anos de idade, de diversas raças e ambos sexos, com peso corporal mínimo de 5kg, provenientes da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil, no período de julho de 2012 a novembro de 2012. A amostragem utilizada foi calculada a partir de estudos progressivos, para estimar um percentual de positividade de 10%, com uma confiança de 95% e uma margem de erro menor que 5%. Escolheu-se 20 animais das seguintes raças: Dachshund, Poodle, Yorkshire, Shih-Tzu, Labrador, Spitz Alemão e Beagle, além de 20 cães sem raça definida, por diferirem entre portes e tendências ou não alérgicas. Com relação ao sexo, houve divisão igual dentre todos animais de cada raça e sem raça definida.

Para cada animal foram usados diferentes tipos de concentrações de histamina, extratos alergênicos de leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis* e aeroalérgenos, ácaros das espécies *Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*.

Critérios e procedimentos de seleção/inclusão

- Cães hígidos de proprietários que concordaram com todos os procedimentos do estudo e assinaram, por livre e espontânea vontade, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (**Anexo 3**);
- Cães que não receberam qualquer tipo de tratamento medicamentoso que pudesse interferir na resposta do teste intradérmico por pelo menos 3 meses antes;
- Fêmeas não prenhes ou lactantes;
- Cães dóceis, que não demonstraram irritabilidade e/ou agressividade durante a contenção;
- Exame clínico geral e dermatológico.

Concentrações dos extratos alergênicos testadas:

Controle negativo: solução salina fenolada. Controle positivo: soluções contendo 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,01 mg/mL de histamina base. Ácaros: concentrações em

PNU/mL. *Dermatophagoides pteronyssinus* – 125, 250, 500 e 1.000; *Dermatophagoides farinae* – 62,5, 125, 250, 500 e 1.000; *Blomia tropicalis* – 62,5, 125, 250, 500 e 1.000. Leveduras da espécie *Malassezia pachydermatis* (concentrações em PNU/mL): 500, 1.000, 1.500 e 2.000 Os extratos alergênicos foram diluídos com solução fosfato-salina até atingirem a concentração desejada.

Controle positivo, controle negativo e extratos alergênicos de ácaros foram provenientes da FDA-Allergenic – Laboratório de Antígenos, Rio de Janeiro, Brasil. O extrato de *Malassezia pachydermatis* foi proveniente da Greer Laboratories, Carolina do Norte, EUA.

Realização do teste intradérmico

O protocolo de realização do teste intradérmico foi baseado nas indicações de Hillier e Deboer (2001). Primeiramente foi realizada tricotomia da região abdominal e/ou torácica com auxílio de máquina de tosa e higienização da área com solução fisiológica. Posteriormente, marcações foram feitas na pele com caneta dermatográfica a 3 cm de distância entre os pontos de aplicação para delinear a área de aplicação. As aplicações (0,05 mL) foram feitas no espaço intradérmico com seringas de insulina de 0,3 mL e agulhas de 8 mm de comprimento e 0,3 mm de calibre (BD[®] Ultra-FineTM II).

No total, 22 aplicações intradérmicas foram realizadas em cada animal (**Fig. 1**). Nenhum cão foi submetido a anestesia ou sedação. Esses eram contidos manualmente para a realização das aplicações, por aproximadamente 5 minutos e 15 minutos após, novamente, por mais 5 minutos, para leitura do teste. Frank, Kunkle e Beale (1992) citam que protocolo anestésico torna-se opcional, para realização do teste intradérmico, pois embora cães não sedados apresentem níveis séricos de cortisol maiores do que cães sedados, este aumento não interfere na resposta do teste.

Os resultados foram avaliados sempre pelos mesmos dois observadores, através de aferição e marcação do tamanho das reações (média entre o diâmetro maior e menor) com uso de paquímetro digital (Electronic Digital Calliper[®]) (**Fig. 2**).

No final do procedimento, creme anti-histamínico a base de prometazina era aplicado na pele para minimizar o desconforto causado pelas aplicações.

Interpretação dos resultados:

- Resultados positivos: formação de pápula local maior ou igual à média observada entre o controle positivo e o negativo (ponto de corte ou *cut-off*) (REEDY; MILLER; WILEMSE, 1997; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; HENSEL et al., 2004). Foram estabelecidos três pontos de cortes, a partir de cada concentração de histamina usada.

Análise dos dados:

Foram digitados os dados no Programa Excel e posteriormente exportados para o programa SPSS v.18.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis por frequências e percentuais e apresentados os intervalos de 95% de confiança para a proporção. Variáveis quantitativas foram descritas pela média, mediana e desvio padrão. Foram calculados os intervalos de 95% de confiança (IC-95%) para a média. As concentrações dos extratos alergênicos foram comparadas com as concentrações de histamina e com os pontos de corte. Foram comparados os percentuais de resultados positivos no teste intradérmico, com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, a uma porcentagem de positividade de 10%, pelo Teste de Qui-quadrado com correção de Yates. Foram comparadas as médias das reações das diferentes concentrações de histamina pelo Teste t de Student para amostras emparelhadas. Foram ajustados os valores de significância das comparações múltiplas pela correção de Bonferroni modificado por Finner. Foi considerado um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Segurança do teste intradérmico

Não houve qualquer tipo de reação sistêmica após realização do teste intradérmico nos animais estudados, ou desistência dos proprietários. Apenas reações tópicas leves foram observadas ao final do teste que foram rapidamente revertidas com uso de creme a base de prometazina.

Reações cutâneas do controle negativo (solução salina)

A maioria dos cães (103; 64,37%) não apresentou reação cutânea com aplicação de solução salina, quando submetidos ao teste intradérmico. Quando observadas, as reações foram muito pequenas, com tamanho médio de 0,96 mm. A mediana foi 0 mm e o desvio padrão, 1,71.

Reações cutâneas do controle positivo (histamina)

A Tabela 1 mostra os resultados da mediana, desvio padrão, média e os intervalos para uma confiança de 95% para as médias das concentrações de histamina de 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,1 mg/mL. As médias apresentaram resultados estatisticamente diferentes entre si ($P=0,003$) para todas comparações.

Tabela 1. Resultados das reações do controle positivo (histamina).

Concentração de histamina (mg/mL)	Mediana (mm)	Desvio padrão (mm)	Média (mm)	IC-95% (mm)
0,001	7,52	3,12	6,95	6,46 - 7,44
0,01	10,67	1,97	10,72	10,41 - 11,03
0,1	14,97	2,07	15,18	14,86 - 15,50

Ponto de corte (*cut-off*):

O ponto de corte é estabelecido a partir da média obtida entre os diâmetros das reações cutâneas dos controles positivo e negativo. Quando as reações dos extratos

alergênicos forem maiores ou igual ao *cut-off*, o resultado do teste é considerado positivo para aquele alérgeno.

A Tabela 2 mostra os resultados da mediana, desvio padrão, média e os intervalos para uma confiança de 95% para a média dos pontos de corte, obtidos a partir das concentrações de histamina de 0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,1 mg/mL.

Tabela 2. Resultados dos diferentes pontos de corte (*cut-off*), obtidos a partir das diferentes concentrações de histamina utilizadas.

Ponto de corte (mg/mL)	Mediana (mm)	Desvio padrão	Média (mm)	IC-95% (mm)
0,001	3,95	1,83	3,95	3,66 - 4,23
0,01	5,65	1,38	5,84	5,62 - 6,05
0,1	7,84	1,38	8,07	7,85 - 8,28

Quando comparadas as médias dos *cut-off*'s das diferentes concentrações de histamina, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as médias de 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL (P=0,003), 0,1 mg/mL e 0,001 mg/mL (P=0,003) e 0,01 mg/mL e 0,001 mg/mL (P=0,048).

Reações cutâneas dos extratos alergênicos

As tabelas 3, 4 e 5 apresentam os resultados das frequências de positividade (n, percentual e os intervalos para uma confiança de 95% relativos à porcentagem de resultados positivos) do teste intradérmico com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, a partir dos pontos de corte obtidos das concentrações de histamina, de 0,1 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,001 mg/mL, respectivamente.

Tabela 3. Frequências de positividade (n, percentual e os intervalos para uma confiança de 95% relativos à porcentagem de resultados positivos) do teste intradérmico com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, a partir do ponto de corte, obtido com a concentração de histamina de 0,1 mg/mL.

Extrato alergênico	Concentração (PNU/mL)	Animais positivos		IC - 95%	P*
		n	%		
<i>D. pteronyssinus</i>	125	3	1,88	0,39 - 5,38	0,005
<i>D. pteronyssinus</i>	250	4	2,5	0,69 - 6,28	0,011
<i>D. pteronyssinus</i>	500	7	4,38	1,78 - 8,81	0,083
<i>D. pteronyssinus</i>	1000	17	10,63	6,31 - 16,47	1,000
<i>D. farinae</i>	62,5	12	7,5	3,93 - 12,73	0,553
<i>D. farinae</i>	125	13	8,12	4,4 - 13,49	0,697
<i>D. farinae</i>	250	15	9,37	5,34 - 15	1,000
<i>D. farinae</i>	500	16	10	5,82 - 15,73	1,000
<i>D. farinae</i>	1000	41	25,62	19,06 - 33,12	0,000
<i>B. tropicalis</i>	62,5	3	1,88	0,39 - 5,38	0,005
<i>B. tropicalis</i>	125	16	10	5,82 - 15,73	1,000
<i>B. tropicalis</i>	250	27	16,87	11,42 - 23,59	0,101
<i>B. tropicalis</i>	500	30	18,75	13,02 - 25,67	0,038
<i>B. tropicalis</i>	1000	38	23,75	17,39 - 31,11	0,002
<i>M. pachydermatis</i>	500	4	2,5	0,69 - 6,28	0,011
<i>M. pachydermatis</i>	1000	8	5	2,18 - 9,61	0,137
<i>M. pachydermatis</i>	1500	8	5	2,18 - 9,61	0,137
<i>M. pachydermatis</i>	2000	17	10,63	6,31 - 16,47	1,000

*Teste de Qui-quadrado com correção de Yates comparando os percentuais de resultados positivos no teste intradérmico, com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, à uma porcentagem de positividade de 10%.

Tabela 4. Frequências de positividade (n, percentual e os intervalos para uma confiança de 95% relativos à porcentagem de resultados positivos) do teste intradérmico com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, a partir do ponto de corte, obtido com a concentração de histamina de 0,01 mg/mL.

Extrato alergênico	Concentração (PNU/mL)	Animais positivos		IC - 95%	P*
		n	%		
<i>D. pteronyssinus</i>	125	11	6,88	3,48 - 11,97	0,421
<i>D. pteronyssinus</i>	250	19	11,88	7,3 - 17,92	0,720
<i>D. pteronyssinus</i>	500	29	18,13	12,49 - 24,98	0,054
<i>D. pteronyssinus</i>	1000	48	30,00	23,02 - 37,74	0,000
<i>D. farinae</i>	62,5	31	19,38	13,56 - 26,36	0,027
<i>D. farinae</i>	125	36	22,50	16,28 - 29,76	0,004
<i>D. farinae</i>	250	40	25,00	18,5 - 32,45	0,001
<i>D. farinae</i>	500	47	29,38	22,45 - 37,08	0,000
<i>D. farinae</i>	1000	73	45,63	37,74 - 53,67	0,000
<i>B. tropicalis</i>	62,5	25	15,63	10,37 - 22,2	0,181
<i>B. tropicalis</i>	125	55	34,38	27,06 - 42,28	0,000
<i>B. tropicalis</i>	250	59	36,88	29,39 - 44,85	0,000
<i>B. tropicalis</i>	500	72	45,00	37,14 - 53,05	0,000
<i>B. tropicalis</i>	1000	71	44,38	36,53 - 52,43	0,000
<i>M. pachydermatis</i>	500	30	18,75	13,02 - 25,67	0,038
<i>M. pachydermatis</i>	1000	27	16,88	11,42 - 23,59	0,101
<i>M. pachydermatis</i>	1500	27	16,88	11,42 - 23,59	0,101
<i>M. pachydermatis</i>	2000	37	23,13	16,83 - 30,44	0,003

*Teste de Qui-quadrado com correção de Yates comparando os percentuais de resultados positivos no teste intradérmico, com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, à uma porcentagem de positividade de 10%.

Tabela 5. Frequências de positividade (n, percentual e os intervalos para uma confiança de 95% relativos à porcentagem de resultados positivos) do teste intradérmico com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, a partir do ponto de corte, obtido com a concentração de histamina de 0,001 mg/mL.

Extrato alergênico	Concentração (PNU/mL)	Animais positivos		TC - 95%	P*
		n	%		
<i>D. pteronyssinus</i>	125	28	17,50	11,95 - 24,29	0,074
<i>D. pteronyssinus</i>	250	31	19,38	13,56 - 26,36	0,027
<i>D. pteronyssinus</i>	500	48	30,00	23,02 - 37,74	0,000
<i>D. pteronyssinus</i>	1000	64	40,00	32,48 - 48,03	0,000
<i>D. farinae</i>	62,5	39	24,38	17,94 - 31,78	0,001
<i>D. farinae</i>	125	46	28,75	21,88 - 36,43	0,000
<i>D. farinae</i>	250	49	30,63	23,59 - 38,39	0,000
<i>D. farinae</i>	500	67	41,88	34,13 - 49,92	0,000
<i>D. farinae</i>	1000	84	52,50	44,47 - 60,44	0,000
<i>B. tropicalis</i>	62,5	33	20,63	14,64 - 27,73	0,013
<i>B. tropicalis</i>	125	69	43,13	35,33 - 51,18	0,000
<i>B. tropicalis</i>	250	65	40,63	32,94 - 48,66	0,000
<i>B. tropicalis</i>	500	81	50,63	42,62 - 58,61	0,000
<i>B. tropicalis</i>	1000	84	52,50	44,47 - 60,44	0,000
<i>M. pachydermatis</i>	500	41	25,63	19,06 - 33,12	0,000
<i>M. pachydermatis</i>	1000	49	30,63	23,59 - 38,39	0,000
<i>M. pachydermatis</i>	1500	37	23,13	16,83 - 30,44	0,003
<i>M. pachydermatis</i>	2000	60	37,50	29,98 - 45,49	0,000

*Teste de Qui-quadrado com correção de Yates comparando os percentuais de resultados positivos no teste intradérmico, com a utilização das diferentes concentrações dos extratos alergênicos, à uma porcentagem de positividade de 10%.

Dermatophagoides pteronyssinus

Dentre todas concentrações do extrato alergênico de *Dermatophagoides pteronyssinus* testadas (125, 250, 500 e 1.000 PNU/mL) a de 1.000 PNU/mL foi considerada a ideal, por ter sido a maior concentração encontrada em que 90% dos cães não apresentaram reações positivas no teste intradérmico. Dezesete (10,63%) cães tiveram resultados positivos. Os intervalos, para uma confiança de 95%, variaram de 6,31% a 16,47% e a significância estatística obtida foi 1,000, sugerindo que não houve diferença com o valor teórico igual a 10%. As concentrações mais baixas (125, 250 e 500 PNU/mL) mostraram-se fracas, pois apenas 1,88% (3), 2,5% (4) e 4,38% (7) dos animais apresentaram resultados positivos, respectivamente.

Dermatophagoides farinae

Com as concentrações de 62,5, 125 e 250 PNU/mL, de *Dermatophagoides farinae*, os resultados encontrados ficaram próximos de 10%: 7,5% (12), 8,12% (13) e 9,37% (15), respectivamente. Porém, com a concentração de 500 PNU/mL, 10% (16) dos animais apresentaram resultados positivos, o que caracterizou ser a maior concentração encontrada em que até 10% dos cães apresentaram resultados positivos. O IC-95% variou de 5,82% a 15,73%. Numa concentração maior (1.000 PNU/mL), 25,62% (41) dos cães tiveram resultados positivos, o que mostrou ser uma concentração irritativa para ser utilizada posteriormente em animais alérgicos.

Blomia tropicalis

Já com relação às concentrações de *Blomia tropicalis* testadas, a de 125 PNU/mL foi considerada a ideal, por ter sido a maior concentração encontrada em que 90% dos cães não apresentaram reações positivas no teste intradérmico. Dezesesseis (10%) cães tiveram resultados positivos. Em concentração mais baixa (62,5 PNU/mL) apenas 1,88% (3) dos animais tiveram resultados positivos, mostrando ser uma concentração fraca. Em concentrações maiores 250, 500 e 1.000 PNU/mL, 16,87% (27), 18,75% (30) e 23,75% (38) dos cães apresentaram resultados positivos, caracterizando serem concentrações irritativas para posterior utilização em animais alérgicos.

Malassezia pachydermatis

Dentre todas concentrações do extrato alergênico de *Malassezia pachydermatis* utilizadas, a de 2.000 PNU/mL foi considerada a ideal, por ter sido a maior concentração encontrada em que 90% dos cães não apresentaram reações positivas no teste intradérmico. Dezesete (10,63%) cães tiveram resultados positivos. Os intervalos, para uma confiança de 95%, variaram de 6,31% a 16,47% e a significância estatística obtida foi 1,000, sugerindo que não houve diferença com o valor teórico igual a 10%. As concentrações mais baixas (500, 1.000 e 1.500 PNU/mL) mostraram-se fracas, pois apenas 2,5% (4), 5% (8) e 5% (8) dos animais tiveram resultados positivos, respectivamente.

Já, a partir da concentração de histamina de 0,001 mg/mL, em todas diferentes concentrações dos quatro extratos alergênicos testadas, não foi possível determinar quais

foram as ideais. Mesmo com as menores concentrações utilizadas de cada extrato alergênico (125 PNU/mL de *Dermatophagoides pteronyssinus*, 62,5 PNU/mL de *Dermatophagoides farinae*, 62,5 PNU/mL de *Blomia tropicalis* e 500 PNU/mL de *Malassezia pachydermatis*), mais que 10% dos cães apresentaram respostas positivas no teste intradérmico, respectivamente, 28 (17,5%), 39 (24,37%), 33 (20,62%) e 41 (25,62%). Concluiu-se, portanto, que a concentração de histamina de 0,001 mg/mL demonstrou ser fraca para as concentrações dos extratos alergênicos utilizadas no presente estudo, o que determinou o alto número de cães sadios com respostas positivas.

Com a concentração de histamina de 0,01 mg/mL, apenas a concentração do extrato alergênico de 250 PNU/mL de *Dermatophagoides pteronyssinus*, foi considerada apropriada. Mesmo que mais que 10% dos cães arrolados apresentaram resultados positivos no teste intradérmico (19, 11,87%), o intervalo de 95% de confiança ficou entre 7,30% e 17,92%, ou seja, cruzou com 10%. Com os demais extratos alergênicos não foi possível estabelecer ideais de concentrações, pois com a menor concentração utilizada (62,5 PNU/mL de *D. farinae*, 62,5 PNU/mL de *Blomia tropicalis* e 500 PNU/mL de *Malassezia pachydermatis*), 31, 25 e 30 cães, respectivamente, apresentaram repostas positivas no teste intradérmico, ou seja, mais que 10% da população estudada. Portanto, mesmo com as menores concentrações destes extratos alergênicos, estas mostraram-se muito fortes para serem utilizada posteriormente em animais alérgicos.

6. DISCUSSÃO

Muitos cães, mesmo todos sendo saudáveis, apresentaram diversas reações positivas no teste intradérmico, em função das várias concentrações de histamina e extratos alergênicos utilizadas. No entanto, reações positivas em cães saudáveis podem ocorrer em função de extratos muito concentrados (concentrações irritativas) ou em casos de hipersensibilidade subclínica.

Mesmo assim, não evidenciou-se reação adversa sistêmica, apenas leve desconforto tópico, em alguns animais. Em todos os casos, foi rapidamente revertido com uso de creme a base de prometazina. Este tipo de exame apresenta boa segurança para o paciente. Tanto em humanos, quanto em cães, são raríssimos os casos de efeitos colaterais. Quando ocorrem, normalmente são revertidos rapidamente com uso tópico de pomadas/cremes anti-histamínicos. Infreqüentemente são usadas medicações sistêmicas (HILLIER; DEBOER, 2001; BENSIGNOR; CARLOTTI, 2002; ZUR^a et al., 2002; FARVER et al., 2005; CUNHA et al., 2007; LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009; SUNG; HUANG, 2009).

Com relação às diversas concentrações de histamina utilizadas no presente estudo (0,001 mg/mL, 0,01 mg/mL e 0,1 mg/mL) pôde-se avaliar que a melhor concentração encontrada foi a de 0,1 mg/mL, principalmente em função do tamanho médio das reações encontradas, o que permitiu reduzir a quantidade de reações positivas nos cães saudáveis e contribuiu para estabelecer ideais de concentrações dos quatro extratos alergênicos utilizados. Scott, Miller e Griffin (2001) afirmam que concentrações do controle positivo que apresentem reações cutâneas com diâmetros menores que 10 mm não devem ser usadas para avaliação de teste intradérmico, por aumentarem as chances de resultados falso-positivos dos extratos alergênicos. No presente estudo, pelo fato das reações cutâneas, com as concentrações de histamina de 0,001 mg/mL e 0,01 mg/mL, terem sido fracas, com médias, respectivamente de 6,95 mm e 10,72 mm e desvio padrão, respectivos de 1,97 e 3,12, ocorreram muitas reações positivas nos cães saudáveis, diante do uso dos extratos alergênicos. Hensel et al. (2004), num estudo comparativo entre duas concentrações de histamina (0,01 mg/mL e 0,1 mg/mL), encontraram reações médias de 11,6 mm e 14 mm,

respectivamente e indicaram a utilização da segunda, como controle positivo, por reduzir a presença de resultados falso-positivos. Esses resultados corroboram com os encontrados no presente estudo, no qual apontou a mesma concentração de histamina considerada ideal (0,1 mg/mL). Além disso, a média do diâmetro das reações cutâneas encontradas foi semelhante, ou seja, 15,18 mm, com desvio padrão de 2,07.

Extratos alergênicos de diferentes laboratórios já foram utilizados nos estudos envolvendo teste intradérmico em cães: Sture et al., (1995) - Greer Laboratories, USA, HAL Allergen Laboratories, Holanda e ARTU Biologicals, Holanda; Saridomichelakis et al. (1999) - Greer Laboratories, USA e ARTU Biologicals, Holanda; Mueller; Bettenay; Tideman (2000) - Greer Laboratories, USA e Center Laboratories, USA; Bensignor; Carlotti (2002) - Isotec Laboratories, França; Cunha et al. (2007) - ALK Abello, USA, Brasil; Chanthick; Anaman; Buathet (2008) - ALK Abello, USA e Siriraj Medical Hospital, Tailândia. Porém, ainda não existem extratos alergênicos padronizados para serem utilizados em teste intradérmico em cães (HILLIER; DEBOER, 2001; LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009). Diante disso, a maioria dos extratos alergênicos que são utilizados em testes intradérmicos para cães apresentam padronização para a espécie humana, como os usados no presente estudo, provenientes da FDA-Allergenic, Brasil e Greer Laboratories, USA.

Diversos trabalhos já foram realizados para avaliar perfil de resposta cutânea através de teste intradérmico em cães atópicos com diversas concentrações de histamina e de extratos alergênicos, provenientes de diferentes laboratórios, observando-se ainda não haver uniformidade entre as concentrações até então utilizadas. Cada laboratório utiliza uma forma diferente de expressar a atividade biológica ou potência dos extratos, sendo as unidades de concentração mais utilizadas em Medicina Veterinária a Unidade de Nitrogênio Proteico por mililitro (PNU/mL) e a relação peso/volume (w/v). Ambas as medidas não refletem a potência dos extratos. Enquanto w/v indica apenas uma proporção de solução extratora e matéria-prima, PNU/mL indica a quantidade de proteína presente no extrato, sendo que a maioria das proteínas presentes nos extratos não possui atividade alergênica (Ipsen et al., 1998). Na verdade, apenas poucas proteínas de um extrato possuem atividade alergênica, por exemplo, para o ácaro *Dermatophagoides farinae*, os alérgenos principais ou “majors” para cães são Der f 15 (98 kDa) e Der f 18 (60 kDa). Esses dois alérgenos são proteínas da classe das quitinases e são identificados por mais de 50% dos

Soros de cães com dermatite atópica (McCall et al., 2001 e Cunha et al., 2012). A quantidade de alérgenos presentes nos extratos alergênicos depende principalmente da matéria-prima utilizada (ex: cultura de ácaros), das etapas de extração e diálise durante o processo de produção e das condições de conservação dos extratos. Logo, a potência dos extratos alergênicos controlados em PNU/mL ou w/v podem variar entre lotes de laboratórios diferentes e mesmo entre lotes do mesmo laboratório (SCOTT et al, 2001). Como ainda não existem extratos alergênicos padronizados em unidades biológicas ou em unidades de massa ($\mu\text{g/mL}$ de alérgeno principal) para uso veterinário, a maioria dos estudos veterinários utilizam essas duas unidades de concentração.

Em 1983, Grosselin et al., (Canadá) utilizaram uma concentração de 1.500 PNU/mL para todos ácaros. Não foi informada a concentração de histamina usada. Já Sture et al. (1995), num estudo realizado na Grã-Bretanha, utilizaram uma concentração de 10 NE/mL para *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae* e 0,01% para controle positivo. Em 1999, Mueller, Burrows e Tsohalis, em experimento conduzido na Austrália, usaram uma concentração de 1:75.000 w/v de extratos alergênicos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*. Não foi informada a concentração de histamina usada. No mesmo ano, Saridomichelakis et al., usaram uma concentração de 1/50.000 para *D. farinae* e 1/5.000 para *D. pteronyssinus* e duas concentrações de histamina (1/100.000 w/v e 1/10.000 w/v), em estudo realizado na Grécia. Em 2000, Park et al. num estudo realizado no Japão, utilizaram uma concentração de 1/10.000 w/v de uma mistura contendo ácaros da poeira doméstica e 1/100.000 w/v de histamina. Já Hillier, Kwochka e Pinchbeck, (2000) utilizaram uma concentração de 1/50.000 w/v para *D. farinae* e *D. pteronyssinus* e 1/100.000 w/v para histamina, em estudo realizado nos EUA. Bensignor e Carlotti (2002) em estudo realizado na França, usaram uma concentração de 1.000 UI/mL para todos extratos alergênicos de ácaros e 0,01% para histamina. No mesmo ano, nos EUA, Zur et al. usaram uma concentração de 1/1.000 w/v para ambos ácaros (*D. pteronyssinus* e *D. farinae*) e 1/100.000 w/v para histamina. Em 2003, Foster et al., Reino Unido, usaram uma concentração de 1/10.000 w/v para os ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae* e 1/100.000 w/v para histamina. Na Tailândia, em 2008 Chanthick, Anaman e Buathet utilizaram uma concentração de 100 AU/mL para *D. pteronyssinus* e *D. farinae* e 1mg/mL para histamina, diluída em 0,1 mg/mL de solução salina. Em Taiwan, Sung e Huang (2009), utilizaram uma

variação de 100-250 PNU/mL para *D. pteronyssinus* e *D. farinae* e 0,0275 mg/mL para histamina.

No entanto, poucos estudos foram descritos no intuito de testar concentrações de histamina e extratos alergênicos em cães não alérgicos, para posterior utilização em cães atópicos. Além disso, ainda há divergências entre autores com relação a ideais de concentrações (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Wellington; Miller e Scarlett (1991) encontraram uma concentração ideal de 31,25 PNU/mL de um extrato aquoso contendo uma mistura de ácaros de poeira, após realização de teste intradérmico, com seis diluições diferentes, em 56 cães saudáveis. Trinta e dois por cento dos animais tiveram que ser excluídos porque não apresentaram reação a qualquer diluição utilizada no teste. No presente estudo, não foram utilizadas misturas. Todos extratos alergênicos eram puros para cada espécie utilizada, conforme o recomendado por Hillier e DeBoer (2001).

Em 2002, Besignor e Carlotti realizaram um estudo de avaliação de sensibilidade a ácaros, a partir de teste intradérmico, em 150 cães com DA. Foram utilizadas concentrações de 1.000 UI/mL para *D. farinae* e *D. pteronyssinus*, e 0,01% para histamina, em aplicações de 0,05 mL. Para validação das concentrações foram utilizados 10 cães sadios. Todos animais não apresentaram reações positivas.

Em outro estudo com a utilização de cães sadios, Hensel et al. (2004), avaliaram diferentes concentrações de extratos alergênicos em teste intradérmico em 30 animais. As concentrações ideais observadas para ácaros foram: *D. pteronyssinus* (250 PNU/mL) e *D. farinae* (100 PNU/mL). Segundo os mesmos autores, até a realização deste estudo, a concentração para ácaros utilizada pela maioria dos dermatologistas veterinários era de 1.000 PNU/mL.

No presente trabalho, foi observado que a partir da concentração de histamina considerada ideal (0,1 mg/mL), pôde-se estabelecer que a concentração de 1.000 PNU/mL do extrato de *D. pteronyssinus* foi considerada a mais adequada, pois 10,62% dos cães arrolados apresentaram reações positivas. Nas concentrações de 250 e 500 PNU/mL, apenas 2,5% e 4,37%, dos cães, respectivamente, apresentaram respostas positivas, sendo consideradas concentrações fracas. Esses resultados diferem dos encontrados nos trabalhos de Wellington, Miller e Scarlett (1991), Hensel et al. (2004) e Bauer et al (2009). A partir

da concentração de histamina de 0,1 mg/mL, também pôde-se estabelecer que a concentração de 250 PNU/mL do extrato alergênico de *D. farinae*, demonstrou ser boa, pois 9,37% dos cães tiveram respostas positivas. Porém, a concentração de 500 PNU/mL foi considerada a ideal, por ter sido a maior concentração observada em que 90% dos animais não apresentaram reações positivas, discordando das concentrações recomendadas por Wellington, Miller e Scarlett (1991), Hillier, Kwochka e Pinchbeck (2000), Bensignor e Carlotti (2002), Hensel et al. (2004), Bauer et al. (2009). Esses resultados concordam com os dados encontrados no trabalho de Koebrich et al. (2012), os quais evidenciaram que, com uma concentração de 500 PNU/mL puderam reduzir a presença de reações falso-negativas, sem aumentar reações falso-positivas, comparada a uma concentração de 250 PNU/mL, recomendada por Hensel et al. (2004) e Bauer et al. (2009). Como no estudo de Koebrich et al. (2012) os 17 cães utilizados eram Beagles sadios e de laboratório, para corroborar tais resultados, os mesmos autores recomendaram futuros experimentos com a utilização de cães vivendo em situações reais de vida. No presente trabalho, os 160 animais arrolados, apresentavam tipos raciais (de tendências ou não alérgicas), sexo, portes e idades diferentes e que conviviam em situações reais de vida.

Ácaros da poeira domiciliar são considerados os principais alérgenos perpetuantes de doença atópica em cães e seres humanos (SWINNEN; VROOM, 2004; LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009). Os principais grupos de antígenos utilizados em testes intradérmicos, além dos ácaros, são polens, fungos anemófilos e insetos (HILLIER; DEBOER, 2001). Alérgenos de alimentos normalmente não são recomendados para teste intradérmicos, devido ao baixo valor preditivo positivo observado. Para auxílio diagnóstico de alergia alimentar em cães, recomenda-se, portanto, exclusão, seguido de desafio dietético (JEFFERS; SHANLEY; MEYER, 1991; KUNKLE; HORNER, 1992). Dentre as espécies de ácaros da poeira domiciliar, o gênero *Dermatophagoides* é o mais descrito, representado principalmente pelas espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (BINOTTI et al., 2001; HILLIER; DEBOER, 2001). São considerados os principais alérgenos responsáveis por hipersensibilidade do tipo I em cães, afetando de 30 a 100% dos animais com dermatite atópica (RANDALL et al., 2003). Em países de clima tropical, como o Brasil, outras espécies de ácaros são frequentemente encontradas na poeira, como a *Blomia tropicalis* (ROSA, 1978; CHAGAS et al., 2000), inclusive sendo responsável por sensibilização, com importante percentual, em

pessoas alérgicas (BERND et al., 1994; SPALDING; WALD; BERND, 2000). Uma pesquisa com ácaros, realizada em 72 casas no Brasil mostrou que *B. tropicalis* estava presente em todas e constituiu 79,5% do número total de ácaros encontrados nas amostras (ROSA; FLECHTMANN, 1979). Em função disso e por haver poucos estudos que avaliaram respostas cutâneas a partir de teste intradérmico em cães (CUNHA et al., 2007), foi utilizado, no presente trabalho, o extrato alergênico de *Blomia tropicalis*. A partir da concentração de histamina de 0,1 mg/mL, evidenciou-se que a concentração de 125 PNU/mL desse extrato alergênico foi considerada a ideal, por ter sido a maior concentração observada em que 90% dos animais não apresentaram reações positivas.

Poucos estudos mostraram a utilização do teste intradérmico com extratos alergênicos de *Malassezia* em cães (MORRIS; OLIVIER; ROSSER, 1998; FARVER et al., 2005; OLIVRY et al., 2010). Farver et al. (2005), testaram diferentes concentrações de extratos de *Malassezia pachydermatis* (4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 100 e 50 PNU/mL) em cães saudáveis submetidos a teste intradérmico. Em 2009, Sung e Huang, avaliaram resposta cutânea em 71 cães atópicos, submetidos a teste intradérmico. Incluíram em sua bateria de extratos alergênicos, *Malassezia pachydermatis* na concentração proposta por Farver et al. (2005). Trinta e sete por cento dos animais apresentaram resultados positivos. Não foram utilizados cães saudáveis para testar as concentrações dos extratos alergênicos utilizados. No presente estudo, evidenciou-se que, a partir da concentração de histamina considerada ideal (0,1 mg/mL), a concentração de 2.000 PNU/mL foi a indicada para ser usada posteriormente em animais alérgicos, pois 17 (10,63%) cães tiveram resultados positivos e os intervalos, para uma confiança de 95%, variaram de 6,31% a 16,47%. Este resultado difere do encontrado por Farver et al. (2005), no qual consideraram a concentração de 1.000 PNU/mL de *Malassezia pachydermatis*, a ideal para ser utilizada na detecção de hipersensibilidade do tipo-1 em cães com DA, utilizando-se apenas 12 cães saudáveis. No presente estudo, foi utilizado o mesmo extrato alergênico e o “n” amostral foi 160 cães.

Concentrações mais baixas (500, 1.000 e 1.500 PNU/mL) mostraram-se fracas, pois apenas 2,5% (4), 5% (8) e 5% (8) dos animais apresentaram positividade, respectivamente.

7. CONCLUSÕES

Como conclusões, podemos indicar, para teste intradérmico uma concentração de histamina base de 0,1 mg/mL, como controle positivo, por entendermos que a partir desta, pode-se reduzir a presença de reações falso-positivas. Para os extratos alergênicos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *Blomia tropicalis* e *Malassezia pachydermatis* as concentrações respectivamente recomendadas, em PNU/mL, são 1.000, 500, 125 e 2.000, por serem as mais altas concentrações encontradas, em cães saudáveis, em que 90% dos animais não apresentaram resultados positivos. Futuros estudos devem ser conduzidos em cães atópicos com a utilização dessas concentrações consideradas ideais.

8. REFERÊNCIAS

ACKERMAN, L. Diagnosing inhalant allergies: intradermal or in vitro testing? **Veterinary Medicine**, v. 83, p. 779-788, 1988.

ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3. ed. In:_____. São Paulo: Roca, 936 pp., 2008.

ASHBEE, H.R. Recent developments in the immunology and biology of *Malassezia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 47, p. 14-23, 2006.

BARBET, J.L.; HALLIWELL, R.E.W. Duration of inhibition of immediate skin test reactivity by hydroxyzine hydrochloride in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 11, p. 1565-1569, 1989.

BAUER C.L., et al. Determination of irritant threshold concentrations of six mites through serial dilutions in intradermal testing on healthy clinically non-allergic dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 227, 2009 [abstract].

BENSIGNOR, E.; CARLOTTI, D.N. Sensitivity patterns to house dust mites and a forage mites in atopic dogs: 150 cases. **Veterinary Dermatology**, v. 13, p. 39-44, 2002.

BERND, L.A.G. et al. Identificação e estudo da atividade sensibilizante de ácaros domésticos em Porto Alegre (RS). **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 17, n.1, p. 23-33, 1994.

BINOTTI, R.S. et al. House dust mites in Brazil – an annotated bibliography. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, p.1177-1184, 2001.

BOND, R.; LLOYD, D.H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrheic Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v.8, p. 101-106, 1997.

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

CAFARCHIA, C. et al. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. **Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation**, v. 17, p. 316-322, 2005.

CAFARCHIA, C. et al. New insights into diagnosis and the pathogenicity of *Malassezia* yeasts. **Veterinary Research Communications**, v. 30 (supl.), p. 231-234, 2006.

CASTRO, F.F.M.; GALVÃO, CE.S. **Imunoterapia**. In:_____. São Paulo: Manole, 221pp., 2011.

CHAGAS, K.N. et al. Primeiro levantamento de ácaros em poeira de casas da cidade de Araguaína – Tocantins. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.23, p.209, 2000.

CHANTHICK, C.; ANAMAN, S.; BUATHET, K. The prevalence of positive intradermal allergy tests in 114 dogs with atopic dermatitis in the Bangkok metropolis, Thailand. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 256-262, 2008.

CHEN, T.A.; HILL, P.B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n.1, p. 4-26, 2005.

CORK, M.J. et al. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. **Journal of Allergy Clinical and Immunology**, v. 118, p.3-21, 2006.

COUTINHO, S.D.; PAULA, C.R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v. 38, n.1, p. 73-6, 2000.

CUNHA, V.E.S. et al. Evaluation of skin sensitivity in dogs bearing allergic dermatitis to standardized allergenic extract of house dust and storage mites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 341-344, 2007.

DAVID, D.; et al. Pain Management and Anesthesia in Veterinary Dermatology. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 36 p. 1-14, 2006.

DEBOER, D. J.; MARSELLA, R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 239-249, 2001.

DEBOER, D.J. Survey of intradermal skin testing practices in North America. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, p. 1357–63, 1998.

FARIAS, M.R. Dermatite atópica: da fisiopatologia ao tratamento. **Revista Clínica Veterinária**, v. 69, p. 48-62, 2007.

FARVER, K et al. Humoral measurement of type-1 hypersensitivity reactions to a commercial *Malassezia* allergen. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 261–268, 2005.

FAVROT, C. et al. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 23-30, 2010.

FOSTER, A.P. et al. Comparison of intradermal and serum testing for allergen-specific IgE using a Fc^εR1 α -based assay in atopic dogs in the UK. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 93, p. 51-60, 2003.

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

GRIFFIN, C.E.; DEBOER, D.J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 255–269, 2001.

GRIFFIN, C.E.; HILLIER, A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 363-383, 2001.

GROSSELIN, Y. et al. Intradermoreaction and hyposensitization in canine atopy. **Canadian Veterinary Journal**, v. 24, p. 101-104, 1983.

GUEHO, E. et al. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. **Medical Mycology**, v.36 (Supp. I), p. 220-9, 1998.

GUILLOT, J. et al. A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 400-403, 2000.

GUILLOT, J. et al. Importance des levures du genre *Malassezia* en dermatologie vétérinaire. **Le Point Vétérinaire**, v. 29, p. 21-31, 1998.

GUILLOT, J. ; BOND, R. *Malassezia pachydermatis* : a review. **Medical Mycology**, v. 37, p. 295-306, 1999.

HALLIWELL, R.E. Hyposensitization in the treatment of atopic disease. In: KIRK, R.W. **Current Veterinary Therapy**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.537-41, 1977.

HALLIWELL, R.E.W; DEBOER D.J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (III): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 159-167, 2001.

HENSEL, P. et al. Determination of threshold concentration of allergens and evaluation of two different histamine concentrations in canine intradermal testing. **Veterinary Dermatology**, v. 15, p. 304-308, 2004.

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

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

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

IPSEN, H. et al. Allergenic extracts. In: MIDDLETON, E. et al. (Eds.). **Allergy principles and practice**, 5th ed. Mosby Year Book, St. Louis, pp. 404-416, 1998.

JEFFERS, J.G; SHANLEY, K.J.; MEYER, E.K. Diagnostic testing of dogs for food hypersensitivity. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 198, p. 245-250, 1991.

KENNIS, R.A. et al. Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 1048-1051, 1996.

KISICH, K.O. et al. Defective killing of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis is associated with reduced mobilization of human β -defensin-3. **Journal of Allergy Clinical and Immunology**, v. 122, n. 1, p. 62-68, 2008.

KOEBRICH, S. e at. Intradermal and serological testing for mites in healthy beagle dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 192–e39, 2012.

KUNKLE, G.; HORNER, S. Validity if skin testing for diagnosis of food allergy in dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 200, p. 677-680, 1992.

LARSSON, C.E. et al. Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. **Ars Veterinaria**, v.4, n.1, p. 63-8, 1988.

LOEWENSTEIN, C.; MUELLER, R.S. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 84–98, 2009.

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

MASON, K.V.; EVANS, A.G. Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 27, n.1, p.13-20, 1991.

MCEWAN, N. A. Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine keratinocytes in atopic dermatitis. **Research in Veterinary Science**, v. 68, p. 279-283, 2000.

MCEWAN, N.A. et al. Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine corneocytes: a preliminary study comparing noninflamed and inflamed atopic canine skin. **Journal compilation © 2006 European Society of Veterinary Dermatology**, v. 17, p. 151-154, 2006.

MENDES, E. Alérgenos inalantes. In:_____. **Alergia no Brasil, alérgenos regionais e imunoterapia**. São Paulo: Manole, p. 33-93, 1989.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. CAMPBELL, K.L. **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology**, 7th edn. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders, 2013, p. 363-431.

MORAR, N. et al. the genetics of atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, p. 24-34, 2006.

MORRIS, D.O.; OLIVIER, B.N.; ROSSER, E.J. Type I hypersensitivity reactions to *Malassezia pachydermatis* extract in atopic dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 836-841, 1998.

MUELLER, R.S. Immunopathology of Atopic Dermatitis. **Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association**, Sydney, Australia, 2007.

MUELLER, R.S.; BETTENAY, S.V. Long-term immunotherapy of 146 dogs with atopic dermatitis – a retrospective study. **Australian Veterinary Practitioner**, v. 26, p. 126–32, 1996.

MUELLER, R.S.; BETTENAY, S.V.; TIDEMAN, L. Aero-allergens in canine atopic dermatitis in southeastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. **Australian Veterinary Journal**, v.78, p.392-399, 2000.

MUELLER, R.S.; BURROWS, A.; TSOHALIS, J. Comparison of intradermal testing and serum testing for allergen-specific IgE using monoclonal IgE in 84 atopic dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, p. 290-294, 1999.

NUTTAL, T. Management of atopic dermatitis. **Veterinary Focus**, v. 18, n. 1, p.32-39, 2008.

OLIVRY, T. et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 233-248, 2010.

OLIVRY, T. et al. Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. **Journal compilation**, v. 18, p. 78–86, 2007.

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

PARK, S. et al. Comparison of response to immunotherapy by intradermal skin test and antigen-specific IgE in canine atopy. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, p. 983-988, 2000.

PRÉLAUD, P. et al. Reevaluation of diagnostic criteria of canine atopic dermatitis. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 149, p. 1057-1064, 1998.

RANDALL, M. et al. Quantitation of house dust mites and house dust mite allergens in the microenvironment of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, p.1580-1588. 2003.

REEDY, L.M.; MILLER, W.H.; WILEMSE, T. **Allergic Skin Diseases of the Dog and Cat**, 2. ed. Saunders: London, U.K., p. 83-115, 1997.

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

ROSA, A.E.; C.H.W. FLECHTMANN. Mites in house dust from Brazil. **International Journal of Acarology**, v.5(3), p. 195-198. 1979.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. et al. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, p. 61-73, 1999.

SCHAUBER, J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. **Journal of Allergy and Immunology**, v. 122, n.2, p. 261-266, 2008.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology**, 6th edn. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p. 574-608.

SIMOU, C. et al. Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 385-391, 2005.

SOUSA, C.A.; MARSELLA, R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 155-157, 2001.

SPALDING, S.M.; WALD V.; BERND, L.A.G. IgE sérica total em atópicos e não-atópicos na cidade de Porto Alegre. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 93-97, 2000.

STURE, G.H. et al. Canine atopic disease: the prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the north and south of Great Britain. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 44, p. 293-308, 1995.

SUNG, T.; HUANG, H. The incidence of positive intradermal skin test reactions in dogs with atopic dermatitis. **Journal of Veterinary Clinical Sciences**, v. 2, p. 31-36, 2009.

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

WELLINGTON, J.; MILLER, W.H. Jr.; SCARLETT, J.M. Determination of skin threshold concentration of an aqueous house dust mite allergen in normal dogs. **Cornell Veterinarian**, v. 81, p. 37-42, 1991.

WILLEMSE, A. Atopic skin disease: a review and a reconsideration of diagnostic criteria. **Journal of Small Animal Practice**, v. 27, p. 771-8, 1986.

WILLEMSE, A.; VAN DEN BROM, W.E.; RIJNBERK, A. Effect of hyposensitization on atopic dermatitis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 184, p. 1277-1280, 1984.

ZUR^a, G. et al. 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**, v. 13, p. 89-102, 2002.

ZUR^b, G. et al. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part II. Response to hyposensitization. **Veterinary Dermatology**, v. 13, p. 103-111, 2002.

9. ARTIGO CIENTÍFICO

EVALUATION OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF HISTAMINE AND SKIN IRRITANT THRESHOLD FOR HOUSE DUST MITES IN HEALTHY DOGS SUBMITTED TO INTRADERMAL TESTING

Rafael R. Ferreira*, Laerte Ferreiro†, Mauro L. S. Machado*, Victor E. S. Cunha‡, Marconi R. Farias§, Daniel G. Gerardi*, Eduardo Antunes*, Luis A. G. Bernd¶

*Service of Dermatology, Veterinary Medical Teaching Hospital, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

†Section of Veterinary Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

‡FDA-Allergenic – Antigen Laboratory, Rio de Janeiro, Brazil.

§Department of Small Animal Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

¶Department of Medical Clinic, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Trabalho submetido para publicação no periódico “Veterinary Dermatology” em 18 de agosto de 2013, número VDE-2013-116.

ABSTRACT

Background – The intradermal test (IDT) assesses the type-I hypersensitivity reaction to several common environmental allergens being commonly used to supplement the diagnosis of atopic dermatitis in dogs.

Hypothesis/Objectives – Currently there is no agreement on the histamine concentrations and allergen extracts to be used. In order to determine the ideal histamine concentration as the positive control, as well as the irritation threshold of allergenic extracts in IDT, it is necessary to evaluate different concentrations in a large population of healthy dogs.

Methods – The purpose of this research was to evaluate 160 healthy dogs submitted to IDT, in order to determine which would be the ideal concentrations of histamine and allergenic extract of house dust mites.

Results – A solution containing 0.1 mg/mL histamine was considered as the ideal parameter, causing skin reactions with an average diameter, median and standard deviation of 15.18 mm, 14.97 mm and 2.07 mm, respectively. After establishing the histamine concentration, the optimal concentrations of allergenic extracts were determined in PNU/mL: 1,000 for *Dermatophagoides pteronyssinus*, 500 for *D. farinae* and 125 for *Blomia tropicalis*.

Conclusions and clinical importance – Future studies must be carried out in atopic dogs in order to verify the precision of IDT made with such concentrations.

Keywords: atopic dermatitis, intradermal test, threshold concentration, dog.

INTRODUCTION

Intradermal test (IDT) consist of dermal injections of allergen extracts in order to assess IgE-mediated hypersensitivity reactions to common environmental allergens and, most importantly, to select the allergens to be included in allergen-specific immunotherapy protocols for dogs with atopic dermatitis (AD).¹

Several histamine and allergen extract concentrations have been used in IDT in dogs with AD, but currently still there is no general agreement regarding the concentrations used so far.²⁻¹³

In order to determine the ideal allergen extract concentrations with the purpose of differentiating skin irritation from sensitization, it is necessary to test several concentrations in a group of healthy dogs. The highest concentration where 90% of the animals will not show positive reactions is currently recommended as the ideal concentration to be used in the IDT.^{1,14-17}

In order to determine the ideal histamine concentration to be used as the positive control, it is also necessary to investigate different dilutions in a population of healthy dogs to find the concentration that results in only 10% of healthy dogs showing positive reactions with the allergen extracts tested.¹⁵ The recommendation

is to select a histamine concentration that causes a skin reaction of at least 10 mm in diameter.¹⁸

Few studies have investigated the threshold concentration of allergen extracts in healthy dogs.^{15-17,19} Additionally, there is still disagreement among some authors regarding the concentration of allergen extracts to be used in IDT in dogs with allergic disease.^{1,15,17,19-22} Possibly the use of different allergenic extract and histamine concentrations used so far is due to the fact that the studies assessing ideal concentrations have used a reduced “n” sampling.

The goal of this study was to determine the ideal concentrations of histamine and house dust mites (*Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus* and *Blomia tropicalis*) in a large population of healthy dogs for future utilization in IDT in dogs with AD.

MATERIAL AND METHODS

Inclusion and exclusion criteria

To be included in the study the dogs had to be healthy dogs with no history or clinical signs of skin diseases. Medications that could affect the IDT response had to be withdrawn at least 1 month prior to inclusion. Pregnant and lactating females could not be included. Dogs had to have a mellow temperament and could not show irritability and/or aggressiveness during restraint. Owners had to agree with all procedures of the study and be willing to sign the term of free and informed consent.

Allergen extracts and controls tested

Three house dust mites were tested in each dog at various concentrations. *Dermatophagoides pteronyssinus* was tested at 125, 250, 500, and 1,000 PNU/mL; *D. farinae* at 62.5, 125, 250, 500, and 1,000 PNU/mL and *Blomia tropicalis* at 62.5, 125, 250, 500, and 1,000 PNU/mL. The allergen extracts were diluted in a phosphate-saline solution until the desired concentration was obtained. Histamine was used as the positive control and tested at concentrations of 0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL and 0.001 mg/mL. Phosphate saline 0,9% was used as the negative

control. The positive and negative controls and allergen extracts were obtained from FDA-Allergenic – Antigen Laboratory, Rio de Janeiro, Brazil. The same batch was used throughout the study.

Study population

IDT were performed in 160 dogs healthy, during July 2012 to November 2012 that met the inclusion criteria. The mean age of the dogs was 2,63 and standard deviation was 1,37 (range: 6 months to 5 years). Eighty dogs were males and eighty females (40 dogs intact and 40 neutered of each sex). Twenty dogs from each of the following breeds were included: Dachshund, Poodle, Yorkshire, Shih-Tzu, Labrador, German Spitz and Beagle. In addition, 20 mongrel dogs.

Sample calculation

The concentration of allergen extracts considered ideal, among several tested, is the largest possible in only 10% of healthy dogs presenting positive skin test reactions. To estimate the frequency of the outcome of 10% with a margin of error of less than 5 percentage points and a 95% confidence, was necessary use 160 healthy dogs.

Intradermal test protocol

The IDT was performed according to a previously reported protocol (1). Briefly, the lateral aspect of the thorax was first shaved with a hair clipper and the area was cleaned with physiological solution. Thereafter, using a dermatographic pen, markings were made on the skin at a distance of 3 cm between the application points, in order to delimit the application area. The volume of 0.05 mL was injection into the dermis using 0.3 mL insulin syringes with 8 mm length and 0.3 mm gauge needles (BD[®] Ultra-Fine[™] II). None of the dogs was subject to anesthesia or sedation to perform and interpret the IDT as a mellow temperament was a criterion for inclusion in the study. The results were assessed always by the same observer, who measured and recorded the size of the reactions (average between the highest and smallest diameter) using a digital pachymeter (Electronic Digital

Calliper®). At the end of the procedure, an antihistaminic cream with promethazine was applied on the skin to minimize the discomfort caused by the injections.

Interpretation of the results

A reaction to an allergen test concentration was considered positive if it was erythematous and/or indurated and its wheal diameter was equal to or greater than the mean diameter between the negative control and the positive histamine phosphate control (*positive cut-off*) (15).

Data analysis

The data were entered in Excel spreadsheets and then exported to the software SPSS v.18.0 for statistical analysis. For the histamine and allergen extract wheals, means and standard deviations and 95% confidence intervals (CI) of the means were calculated. The percentages and 95% CI of dogs reacting to the various concentrations of the allergen extracts based on the cut-off value determined by each of the three histamine concentrations were calculated. The percentages of positive results based on each cut-off value were compared among the various allergen extract concentrations using the chi-square test with Yates' correction. The means of the reactions using different histamine concentrations were compared by the Student's T-Test for paired samples. The significance values of multiple comparisons were adjusted by the Bonferroni correction modified by Finner. A significance level of 5% was considered.

RESULTS

Phosphate histamine (positive control)

Table 1 shows the mean, standard deviation, and the 95% CI of the mean for each histamine concentration. There was a significant difference ($P = 0.003$) among the mean of the three histamine concentrations.

Allergen extracts

Tables 2, 3 and 4 show the frequency of dogs that reacted to the various dilutions of the allergen extracts based on the positive cut-off values obtained from the histamine concentrations 0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL and 0.001 mg/mL, respectively. The threshold concentrations for *D. pteronyssinus*, *D. farina* and *Blomia tropicalis* were 1000 PNU/mL, 500 PNU/mL and 125 PNU/mL, respectively, as these were the highest concentrations where 90% of the dogs did not react on the IDT (Table 2). The threshold concentrations for the tested allergen extracts could not be determined with the 0.01mg/mL and 0.001 mg/mL histamine concentrations (Tables 3 and 4).

DISCUSSION

Despite the fact that all dogs were healthy, many of them presented several positive reactions in the IDT due to the different histamine and allergenic extract concentrations used. However, positive reactions in healthy dogs can occur due to highly concentrated extracts (irritant concentrations) or in cases of subclinical hypersensitivity. No dog was subject to anesthesia or sedation. They were restrained manually in order to perform the applications and test readings. Frank *et al.*²³ state that the anesthesia protocol is optional to perform IDT, because even though nonsedated dogs have higher serum levels of cortisol than sedated dogs, such increase does not interfere with the test results.

In relation to the different histamine concentrations used in this study (0.001 mg/mL, 0.01 mg/mL and 0.1 mg/mL) we observed that the best concentration found was 0.1 mg/mL, particularly due to the average size of the reactions found, which allowed reducing the amount of positive reactions in healthy dogs and contributed to establish ideal concentrations for the four allergenic extracts used. Scott *et al.*¹⁸ stated that positive control concentrations causing skin reactions with a diameter smaller than 10 mm should not be used to evaluate the IDT, since they increase the chances of occurring false-positive results for allergenic extracts. In this study, since the skin reactions at histamine concentrations 0.001 mg/mL and 0.01 mg/mL were weak, with 6.95 mm and 10.72 mm means and standard deviation of 1.97 and 3.12, respectively, many positive reactions were observed in

healthy dogs with the use of allergenic extracts. Hensel *et al.*¹⁵, in a comparative study between two histamine concentrations (0.01 mg/mL and 0.1 mg/mL), found reaction means of 11.6 mm and 14 mm, respectively, and they indicated the utilization of the second concentration as the positive control, because it reduced the occurrence of false-positives. These results support those found in this study, which pointed out the same histamine concentration considered ideal (0.1 mg/mL). Additionally, the mean of skin reaction diameters was similar, i.e., 15.18 mm, with a standard deviation of 2.07.

Several studies have already been performed to evaluate the skin response profile, through IDT performed in atopic dogs at different histamine and allergenic extract concentrations, originated from different labs, and no uniformity has been observed among the concentrations used so far.^{2-9,11-13,22,24} Each lab uses a different method to express the biological activity or strength of the extracts, and the most frequently used concentration unit in Veterinary Medicine is the Protein Nitrogen Unit per Milliliter (PNU/mL) and the weight/volume (w/v) relation. Both measures do not reflect the strength of the extracts. Whilst w/v only indicates a proportion of the extractor solution and raw material, PNU/mL indicates the quantity of protein found in the extract, with the majority of the proteins found in the extracts lacking allergenic activity²⁵. In fact, only a few proteins from a given extract have allergenic activity; for example, for *Dermatophagoidea farinae*, the main allergens or “majors” for dogs are Der f 15 (98 kDa) and Der f 18 (60 kDa). These two allergens are chitinase-like proteins, which are identified by over 50% of the sera of dogs with atopic dermatitis.^{22,26} The amount of allergens found in the allergenic extracts mostly depends on the raw material used (ex.: mite culture), on the extraction and dialysis stages during the production process and on the extract preservation conditions. Consequently, the strength of controlled allergenic extracts in PNU/mL or w/v may vary among batches from different labs and even among batches from the same lab.¹⁸ Since there are no standardized allergenic extracts in biological units or mass units ($\mu\text{g/mL}$ of the main allergen) for veterinary use^{1,20}, the majority of veterinary studies use these two concentration units.

However, only a few studies have been described in order to test histamine and allergenic extract concentrations in non-allergic dogs, for subsequent utilization in atopic dogs.^{15,17,19} Additionally, there are still divergences among some authors in relation to the ideal concentrations.²¹

Wellington *et al.*¹⁹ found the ideal 31.25 PNU/mL concentration of an aqueous extract containing a mixture of dust mites, after having performed the IDT with six different dilutions in 56 healthy dogs. Thirty-two percent of the animals had to be excluded because they did not react to any dilution used in the test. Bensignor and Carlotti⁸ made a study to evaluate the sensitivity of 150 dogs with AD using the IDT. The study used 1000 UI/mL concentrations for *D. farinae* and *D. pteronyssinus*, and 0.01% for histamine, in 0.05 mL applications. Ten healthy dogs were used to validate the concentrations. No animal had positive reactions. In another study using healthy dogs¹⁵, evaluated different concentrations of allergenic extracts through an IDT made in 30 animals. The ideal concentrations observed for mites were as follows: *D. pteronyssinus* (250 PNU/mL) and *D. farinae* (100 PNU/mL). According to the same authors, by the time this study was concluded, the mite concentration used by most veterinary dermatologists was 1000 PNU/mL. The present study observed that, based on the histamine concentration considered ideal (0.1 mg/mL), the 1000 PNU/mL concentration of the *D. pteronyssinus* extract was the most adequate, since 10.62% of the dogs participating in the study had positive reactions. At 250 and 500 PNU/mL concentrations, only 2.5% and 4.37%, of the dogs, respectively, had positive responses, and they were considered weak concentrations. These results are different from those found in other studies.^{15,19,27} Based on the histamine concentration 0.1 mg/mL, the 250 PNU/mL concentration of the allergenic extracts of *D. pteronyssinus* was also considered adequate, since 9.37% of the dogs had positive responses. However, the 500 PNU/mL concentration was considered ideal, since it was the highest concentration observed in which 90% of the animals did not have positive reactions, as opposed to the concentrations recommended by other studies.^{6,8,15,19,27} These results are in accordance with the data found in the study made by Koebrich *et al.*¹⁷, which confirmed that, at a 500 PNU/mL concentration, the occurrence of false-negative

reactions could be reduced without, however, increasing the false-positive reactions, in comparison to the 250 PNU/mL concentration recommended by Hensel et al.¹⁵ and Bauer et al.²⁷

Among the house dust mite, the *Dermatophagoides* genus is the most involved in allergic diseases.^{1,28} In tropical countries such as Brazil, other mite are frequently found in dust, such as *Blomia tropicalis*^{29,30}, which is responsible for sensitization in allergic persons, with an important percentage.^{31,32} Because of this and of the scarcity of papers that assessed IDT in dogs with this specie²², this present study used the allergenic extract of *Blomia tropicalis*. At the 0.1 mg/mL histamine concentration and higher, we observed that the 125 PNU/mL concentration of this allergenic extract was considered the ideal, because it was the highest concentration observed in which 90% of the animals did not develop positive reactions.

CONCLUSIONS

We can indicate a basic 0.1 mg/mL histamine concentration as the positive control in IDT, because at higher concentrations the occurrence of false-positive reactions can be reduced. For the allergenic extracts of *D. pteronyssinus*, *D. farinae* and *Blomia tropicalis*, the concentrations recommended in PNU/mL, respectively, are 1000, 500 and 125, because they are the highest concentrations found in healthy dogs, in which 90% of the animals did not show positive results. Future studies must be carried out in atopic dogs using these concentrations, which are considered the ideal ones.

REFERENCES

1. Hillier A, Deboer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 289-304.
2. Gosselin Y, Malo D, Papageorges M, et al. Intradermoreaction and hyposensitization in canine atopy. *Can Vet J* 1983; 24: 101-104.

3. Sture GH, Halliwell RE, Thoday KL, et al. Canine atopic disease: the prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the north and south of Great Britain. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 44: 293-308.
4. Mueller RS, Burrows A, Tsohalis J. Comparison of intradermal testing and serum testing for allergen-specific IgE using monoclonal IgE in 84 atopic dogs. *Aust Vet Pract* 1999; 77: 290-294.
5. Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Gioulekas D, et al. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69: 61-73.
6. Hillier A, Kwochka KW, Pinchbeck LR. Reactivity to intradermal injection of extracts of *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, house dust mite mix and house dust in dogs suspected to have AD: 115 cases (1996-1998). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217: 536-540.
7. Park S, Ohya F, Yamashita K, et al. Comparison of response to immunotherapy by intradermal skin test and antigen-specific IgE in canine atopy. *J Vet Med Sci* 2000; 62: 983-988.
8. Bensignor E, Carlotti DN. Sensitivity patterns to house dust mites and a forage mites in atopic dogs: 150 cases. *Vet Dermatol* 2002; 13: 39-44.
9. Zur^a G, Ihrke PJ, White SD, et al. 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. *Vet Dermatol* 2002; 13: 89-102.
10. Zur^b G, Ihrke PJ, White SD, et al. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part II. Response to hyposensitization. *Vet Dermatol* 2002; 13: 103-111.
11. Foster AP, Littlewood JD, Webb P, et al. Comparison of intradermal and serum testing for allergen-specific IgE using a Fc^εR1 α -based assay in atopic dogs in the UK. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 93: 51-60.

12. Chanthick C, Anaman S, Buathet K. The prevalence of positive intradermal allergy tests in 114 dogs with atopic dermatitis in the Bangkok metropolis, Thailand. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 126: 256-262.
13. Sung T, Huang H. The incidence of positive intradermal skin test reactions in dogs with atopic dermatitis. *J Vet Clin Sci* 2009; 2: 31-36.
14. Reedy LM, Miller WH, Wilemse T. *Allergic Skin Diseases of the Dog and Cat*, 2nd ed. London, UK: Saunders, 1997; 83-115.
15. Hensel P, Austel M, Medleau L, et al. Determination of threshold concentration of allergens and evaluation of two different histamine concentrations in canine intradermal testing. *Vet Dermatol* 2004; 15: 304-308.
16. Farver K, Morris DO, Shofer F, et al. Humoral measurement of type-1 hypersensitivity reactions to a commercial *Malassezia* allergen. *Vet Dermatol* 2005; 16: 261–268.
17. Koebrich S, Nett-Mettler C, Wilhelm S, et al. Intradermal and serological testing for mites in healthy beagle dogs. *Vet Dermatol* 2012; 23: 192–e39.
18. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 6nd ed. Philadelphia: Saunders, 2001; 574-608.
19. Wellington J, Miller WH Jr, Scarlett JM. Determination of skin threshold concentration of an aqueous house dust mite allergen in normal dogs. *Cornell Vet* 1991; 81: 37-42.
20. Loewenstein C, Mueller RS. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Vet Dermatol* 2009; 20: 84–98.
21. Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 7nd ed. St. Louis: Elsevier/Saunders, 2013; 363-431.
22. Cunha VES, Hahnstadt RL, Soares AMB, et al. Evaluation of skin sensitivity in dogs bearing allergic dermatitis to standardized allergenic extract of house dust and storage mites. *Pesq Vet Bras* 2007; 27: 341-344.
23. Frank LA, Kunkle GA, Beale KM. Comparison of serum cortisol concentration before and after intradermal testing in sedated and nonsedated dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200: 507–510.

24. Mueller RS, Bettenay SV, Tideman L. Aero-allergens in canine atopic dermatitis in southeastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. *Aust Vet Pract* 2000; 78: 392-399.
25. Ipsen H, Klysner SS, Larsen JN, et al. Allergenic extracts. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, et al., eds. *Allergy: Principles and Practice*. 4th ed. St. Louis: Mosby, 1993; 529-533.
26. Mccall C, Hunter S, Stedman K, et al. Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 78: 231-247.
27. Bauer CL, Hensel P, Austel M, et al. Determination of irritant threshold concentrations of six mites through serial dilutions in intradermal testing on healthy clinically non-allergic dogs. *Vet Dermatol* 2009; 20: 227.
28. Swinnen C, Vroom M. The clinical effect of environmental control of house dust mites in 60 house dust mite-sensitive dogs. *Vet Dermatol* 2004; 15: 31-36.
29. Rosa AE, Flechtmann CHW. Mites in house dust from Brazil. *Int J Acarol* 1979; 5: 195-198.
30. Chagas KN, Muniz JRO, Binotti RS, et al. Primeiro levantamento de ácaros em poeira de casas da cidade de Araguaína - Tocantins. *Rev Bras Alerg Immunopatol* 2000; 23: 209.
31. Bernd LAG, Baggio D, Becker AB, et al. Identificação e estudo da atividade sensibilizante de ácaros domésticos em Porto Alegre (RS). *Rev Bras Alerg Immunopat* 1994; 17: 23-33.
32. Spalding SM, Wald V, Bernd LAG. IgE sérica total em atópicos e não-atópicos na cidade de Porto Alegre. *Rev Ass Med Bras* 2000; 46: 93-97.

Table 1. Mean, standard deviation and 95% confidence interval for each of the histamine concentrations.

Histamine concentration (mg/mL)	Mean (mm)	95% CI (mm)
0.001	6.95 ± 3.12	6.46 - 7.44
0.01	10.72 ± 1.97	10.41 - 11.03
0.1	15.18 ± 2.07	14.86 - 15.50

Table 2. Number, frequency and 95% confidence interval (CI) of dogs positive to each dilution of the tested allergen extracts based on the positive cut-off value obtained from the histamine concentration 0.1 mg/mL.

Allergen extract	Concentration		Positive dogs		95% CI	P-value*
	n (PNU/mL)	n	%			
<i>D. pteronyssinus</i>	125	3	1.88	0.39 - 5.38	0.005	
	250	4	2.5	0.69 - 6.28	0.011	
	500	7	4.38	1.78 - 8.81	0.083	
	1000	17	10.63	6.31 - 16.47	1.000	
<i>D. farinae</i>	62.5	12	7.5	3.93 - 12.73	0.553	
	125	13	8.12	4.4 - 13.49	0.697	
	250	15	9.37	5.34 - 15.00	1.000	
	500	16	10	5.82 - 15.73	1.000	
<i>B. tropicalis</i>	1000	41	25.62	19.06 - 33.12	0.000	
	62.5	3	1.88	0.39 - 5.38	0.005	
	125	16	10	5.82 - 15.73	1.000	
	250	27	16.87	11.42 - 23.59	0.101	
	500	30	18.75	13.02 - 25.67	0.038	
	1000	38	23.75	17.39 - 31.11	0.002	

*Chi-square test with Yates' correction, comparing the percentages of positive results in the intradermal test, with the use of different concentrations of allergenic extracts, at a positivity percentage of 10%.

Table 3. Number, frequency and 95% confidence interval of dogs positive to each dilution of the tested allergen extracts based on the positive cut-off value obtained from the histamine concentration 0.01 mg/mL.

Allergen extract	Concentration (PNU/mL)	Positive dogs		95% CI	P-value*
		n	%		
<i>D. pteronyssinus</i>	125	11	6.88	3.48 - 11.97	0.421
	250	19	11.88	7.3 - 17.92	0.720
	500	29	18.13	12.49 - 24.98	0.054
	1000	48	30.00	23.02 - 37.74	0.000
<i>D. farinae</i>	62.5	31	19.38	13.56 - 26.36	0.027
	125	36	22.50	16.28 - 29.76	0.004
	250	40	25.00	18.5 - 32.45	0.001
	500	47	29.38	22.45 - 37.08	0.000
<i>B. tropicalis</i>	1000	73	45.63	37.74 - 53.67	0.000
	62.5	25	15.63	10.37 - 22.20	0.181
	125	55	34.38	27.06 - 42.28	0.000
	250	59	36.88	29.39 - 44.85	0.000
	500	72	45.00	37.14 - 53.05	0.000
	1000	71	44.38	36.53 - 52.43	0.000

*Chi-square test with Yates' correction, comparing the percentages of positive results in the intradermal test, with the use of different concentrations of allergenic extracts, at a positivity percentage of 10%.

Table 4. Number, frequency and 95% confidence interval of dogs positive to each dilution of the tested allergen extracts based on the positive cut-off value obtained from the histamine concentration 0.001 mg/mL.

Allergen extract	Concentration	Positive dogs		95% CI	P-value*
	(PNU/mL)	n	%		
<i>D. pteronyssinus</i>	125	28	17.50	11.95 - 24.29	0.074
	250	31	19.38	13.56 - 26.36	0.027
	500	48	30.00	23.02 - 37.74	0.000
	1000	64	40.00	32.48 - 48.03	0.000
<i>D. farinae</i>	62.5	39	24.38	17.94 - 31.78	0.001
	125	46	28.75	21.88 - 36.43	0.000
	250	49	30.63	23.59 - 38.39	0.000
	500	67	41.88	34.13 - 49.92	0.000
<i>B. tropicalis</i>	1000	84	52.50	44.47 - 60.44	0.000
	62.5	33	20.63	14.64 - 27.73	0.013
	125	69	43.13	35.33 - 51.18	0.000
	250	65	40.63	32.94 - 48.66	0.000
	500	81	50.63	42.62 - 58.61	0.000
	1000	84	52.50	44.47 - 60.44	0.000

*Chi-square test with Yates' correction comparing the percentages of positive results in the intradermal test, with the use of different concentrations of allergenic extracts, at a positivity percentage of 10%.

10. ANEXOS

Anexo 1:



Figura 1. Canino macho, 2 anos de idade, da raça Spitz submetido a teste intradérmico.

Anexo 2:

Figura 2. Canino fêmea, SRD, 4 anos de idade, submetido a avaliação do resultado do teste intradérmico com uso de paquímetro digital (Electronic Digital Calliper®).

Anexo 3:**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA REALIZAÇÃO
DE TESTE INTRADÉRMICO**

Projeto de pesquisa: “AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HISTAMINA E EXTRATOS ALERGÊNICOS EM CÃES SADIOS SUBMETIDOS A TESTE INTRADÉRMICO”.

O teste de reação cutânea para avaliação de alergia em cães consiste na aplicação de doses mínimas (0,05mL) em região abdominal, bem superficial da pele (intradérmica) e posterior análise de reação local. Primeiramente os pelos da região abdominal serão removidos com auxílio de máquina de tosa. Posteriormente, proceder-se-ão aplicações na pele com agulhas de calibre muito pequeno (0,3mm x 8mm) acopladas a seringas de 0,3mL (insulina). Este procedimento envolve dor mínima ao animal. Não há necessidade de anestesia ou sedação, apenas contenção manual cuidadosa dos cães por aproximadamente 3 minutos. Vinte e duas aplicações serão realizadas no total. Após realização das aplicações, o animal ficará livre e depois de 15 minutos, outra contenção manual, de aproximadamente 3 minutos, necessitará ser feita para leitura do teste. Um aparelho, chamado paquímetro (medidor de precisão), é posicionado próximo a pele, sem causar lesão, para realização das medições das pápulas (bolinhas, pequenas elevações da pele) que poderão ser observadas nos locais de aplicação. Essas normalmente desaparecerão em, no máximo uma hora após as aplicações. Há raros relatos de ocorrência de irritação local. No final, um creme antipruriginoso (creme fenegan®), será aplicado na pele para ajudar a minimizar o desconforto. Evidências de reações maiores, sistêmicas, que possam ocorrer durante ou após a realização do teste são raríssimas. Esse exame, portanto, é muito seguro para ser realizado em seu cão. O animal ficará em observação pelo médico veterinário, doutorando, responsável pelo projeto durante todo o procedimento e por até uma hora após a realização do teste. Se por uma eventualidade, ocorrer qualquer complicação, seu animal receberá todos os cuidados médicos possíveis, sem oneração alguma para o proprietário. Esse exame será gratuito, portanto, não haverá custo algum para participar do projeto.

Orientador de projeto: Laerte Ferreiro CRMV/RS
Médico Veterinário, Doutorando - Rafael Rodrigues Ferreira - CRMV/RS 8117
End. Av. Bento Gonçalves, 9090. Laboratório de Micologia.
Faculdade de Veterinária da UFRGS.
Tel. 51-8182.9631.

Eu, _____, portador de Carteira de Identidade _____ e CPF: _____, concordo em participar do projeto de pesquisa “AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HISTAMINA E EXTRATOS ALERGÊNICOS EM CÃES SADIOS SUBMETIDOS A TESTE INTRADÉRMICO” juntamente com meu cão de nome _____, raça _____, sexo _____ e idade _____, ciente da realização da técnica utilizada. Declaro estar informado de que em qualquer momento (antes ou durante a realização do teste) poderei desistir de participar do projeto de pesquisa e que essa decisão não prejudicará no acompanhamento do meu animal pelo médico veterinário doutorando responsável, caso venha a ocorrer qualquer complicação. Estou ciente de que não haverá custo algum para mim em participar desse estudo. Autorizo fotografar meu animal durante o experimento e veicular as fotos em futuras publicações do trabalho em revistas científicas ou em aulas e palestras.

Assinado: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de 201__.