

ALEXSANDRO FABIANO ZAVADNIAK

**VERIFICAÇÃO DA POTÊNCIA DE EXTRATOS ALERGÊNICOS
E DA EXPOSIÇÃO A ALÉRGENOS DOMICILIARES:
CONTRIBUIÇÃO AO TRATAMENTO DE
DOENÇAS ALÉRGICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação -
Mestrado em Pediatria, do Setor de Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Paraná, para a
obtenção do título de Mestre em Pediatria.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

CURITIBA

2000



Parecer

Parecer conjunto dos Professores: *Dr. Nelson Augusto Rosário Filho, Dra. Luisa Karla de Paula Arruda* e o *Dr. Fábio Fernandes Morato Castro*, sobre a dissertação: **"VERIFICAÇÃO DA POTÊNCIA DE EXTRATOS ALERGÊNICOS E DA EXPOSIÇÃO À ALÉRGENOS DOMICILIARES: CONTRIBUIÇÃO AO TRATAMENTO DE DOENÇAS ALÉRGICAS"**, nível de Mestrado em Pediatria, do aluno: *Dr. Alessandro Fabiano Zavadniak*, do Curso de Pós-Graduação - Mestrado em Pediatria da Universidade Federal do Paraná.

A Comissão Examinadora considerou que o *Dr. Alessandro Fabiano Zavadniak*, apresentou trabalho adequado para a dissertação a nível de Mestrado em Pediatria e defendeu convenientemente as argüições que lhes foram feitas, atribuindo-lhes as seguintes notas:

<i>Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho</i>	<i>Nota (100) e Conceito A</i>
<i>Profa. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda</i>	<i>Nota (100) e Conceito A</i>
<i>Prof. Dr. Fábio Fernandes Morato Castro</i>	<i>Nota (100) e Conceito A</i>

Tendo o candidato sido aprovado com *Média Final (100) e Conceito A* sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná, a concessão de título de **"Mestre em Pediatria"** e a publicação da dissertação em veículo de divulgação conveniente.

Curitiba, 19 de dezembro de 2000

Nelson Augusto Rosário Filho
Prof. Dr. Nelson Augusto Rosário Filho

Luisa Karla de Paula Arruda
Profa. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda

Fábio Fernandes Morato Castro
Prof. Dr. Fábio Fernandes Morato Castro

Esta dissertação é dedicada

À Adriana, minha futura esposa, sol que ilumina minha vida.

Aos meus pais, Ana e Ernani, pelas oportunidades que me deram e sem as quais eu não teria chegado até aqui.

Ao meu irmão Roberson e à minha tia Ivetha.

IDEAL
Helena Kolody

O vento aviva a labareda forte.
A chama vacilante, um sopro extingue

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Rosário, por motivar minha escolha profissional e constantemente incentivá-la. Acima de tudo, obrigado pela amizade e pelo respeito.

Meus sinceros agradecimentos aos professores do Departamento de Pediatria pelos ensinamentos durante todos estes anos de convívio.

Aos professores do curso de pós graduação, especialmente à Prof^a Martha Garcia Gomenso Sánchez.

Aos funcionários e médicos do Departamento de Pediatria, em especial àqueles que colaboraram diretamente neste trabalho. Às secretárias deste Departamento, meus agradecimentos pela ajuda e apoio.

Aos colegas da Disciplina de Alergia e Imunologia, especialmente ao Dr. Carlos Antônio Riedi e à Dra. Tsukiyo Obu Kamoi, pela amizade e ajuda na realização do estudo.

À Professora Dra. Luisa Karla Arruda, Kátia R. C. Tobias, Ana Paula F. Trombone, Andrea C. K. Kuramoto e Ana B. R. Santos, por tudo que aprendi e pela honra de ter trabalhado com esta equipe.

Aos médicos Dr. Fabrício Meyer, Dr. Gregor P. Chermikoski e Dr. Flávio R. Pavan, pela importante participação neste estudo.

Aos médicos dos diferentes centros que participaram da execução dos testes cutâneos.

Aos funcionários e, especialmente, ao chefe do Serviço de Farmácia Hospitalar, Sr. João C. Seratiuk, pela indispensável colaboração.

À Farmacêutica Elvira Misako Doi, do serviço de análises clínicas do HC-UFPR.

À estatística Sra. Ângela da Matta S. Martins.

À Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia, pelo apoio.

À Pharmacia & Upjohn, pela doação dos kits para determinação de IgE.

E, finalmente, aos pacientes do ambulatório de Alergia e Imunologia e seus pais, por sua participação neste estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
LISTA DE ANEXOS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	19
3 JUSTIFICATIVA.....	21
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	
4.1. AVALIAÇÃO DO PUNTOR PARA TESTE CUTÂNEO.....	23
4.2. AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE EXTRATOS ALERGÊNICOS PARA IMUNOTERAPIA.....	25
4.3. NÍVEIS DE ALÉRGENOS INALÁVEIS EM RESIDÊNCIAS DE PACIENTES COM ASMA E/OU RINITE ALÉRGICA EM CURITIBA.....	32
5 RESULTADOS	
5.1. AVALIAÇÃO DO PUNTOR PARA TESTE CUTÂNEO ALÉRGICO.....	45
5.2. AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE EXTRATOS CUTÂNEOS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	47
5.3. NÍVEIS DE ALÉRGENOS INALÁVEIS EM RESIDÊNCIAS DE PACIENTES COM ASMA E/OU RINITE ALÉRGICA EM CURITIBA.....	54
6 DISCUSSÃO.....	71
7 CONCLUSÕES.....	85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
9 ANEXOS.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	RESULTADOS DOS TESTES CUTÂNEOS REALIZADOS COM AGULHA E PUNTOR.....	45
TABELA 2	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES CUTÂNEOS.....	46
TABELA 3	CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS E NÍVEIS DE Der p 1 E Der p 2.....	48
TABELA 4	DIÂMETROS DAS PÁPULAS (MM) PRODUZIDAS PELOS DIFERENTES EXTRATOS (N=210)	50
TABELA 5	FREQÜÊNCIA DE TESTES CUTÂNEOS POSITIVOS PARA CADA EXTRATO TESTADO (N=210)*	51
TABELA 6	FREQÜÊNCIA DE POSITIVIDADE AOS TESTES CUTÂNEOS COM OS EXTRATOS C E G	53
TABELA 7	NÍVEIS DE IGE TOTAL E IGE ESPECÍFICA PARA <i>D PTERONYSSINUS</i> ...	55
TABELA 8	REATIVIDADE CUTÂNEA AOS EXTRATOS (N=51)	55
TABELA 9	CARACTERÍSTICAS DOS DOMICÍLIOS VISITADOS (N=46) E DOS RESPECTIVOS LOCAIS DE COLETA DE POEIRA	57
TABELA 10	NÍVEIS DE ALÉRGENOS DO GRUPO 1 > 2 µG/G E > 10 µG/G NOS LOCAIS DE COLETA	60
TABELA 11	NÍVEIS DE ALÉRGENOS DO GRUPO 2 > 2 µG/G E > 10 µG/G NOS LOCAIS DE COLETA	62
TABELA 12	NÍVEIS DE ALÉRGENO DE BARATA (BLA G 1) 2 UI/G E 8 UI/G NOS LOCAIS DE COLETA	65
TABELA 13	NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO DOS 51 PACIENTES AO ALÉRGENO CAN F 1 (µG/G POEIRA) EM RELAÇÃO A PRESENÇA (N=38) OU AUSÊNCIA DE CÃES (N=13) NAS RESIDÊNCIAS.....	67
TABELA 14	NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO DOS 51 PACIENTES AO ALÉRGENO FEL D1 (µG/G POEIRA) EM RELAÇÃO A PRESENÇA (N=4) OU AUSÊNCIA DE GATOS (N=47) NAS RESIDÊNCIAS.....	67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	ESQUEMA DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA).....	11
GRÁFICO 1	“BOX AND WHISKER PLOT” DOS DIÂMETROS DAS PÁPULAS COM OS DIFERENTES EXTRATOS (MM)	50
GRÁFICO 2	FREQÜÊNCIA DE POSITIVIDADE AOS TESTES CUTÂNEOS.....	52
GRÁFICO 3	NÍVEIS DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS (GRUPO1)	60
GRÁFICO 4	NÍVEIS DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS (GRUPO2)	62
GRÁFICO 5	NÍVEIS DOS ALÉRGENOS Der p1 E GRUPO 2	63
GRÁFICO 6	NÍVEIS DE ALÉRGENOS DE BARATA (Bla g 1)	64
GRÁFICO 7	NÍVEIS DE ALÉRGENOS DE CÃES (Can f 1).....	66
GRÁFICO 8	NÍVEIS DE ALÉRGENOS DE GATOS (Fel d 1)	68

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA
ANEXO 2	TERMO DE CONSENTIMENTO
ANEXO 3	FICHA PARA ANOTAÇÃO DOS RESULTADOS
ANEXO 4	SUMÁRIO DA PESQUISA
ANEXO 5	PÁGINA DE ORIENTAÇÃO PARA REGISTRO DE DADOS
ANEXO 6	FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA
ANEXO 7	DISTRIBUIÇÃO DOS DOMICÍLIOS NA CIDADE DE CURITIBA
ANEXO 8	FICHA DE VISITA DOMICILIAR
ANEXO 9	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E SIGNIFICÂNCIA ENTRE O DIÂMETRO DAS PÁPULAS E DOS ERITEMAS
ANEXO 10	VARIABILIDADE NA LEITURA DA REAÇÃO CUTÂNEA IMEDIATA E COMPARAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE TESTES CUTÂNEOS POSITIVOS ENTRE OBSERVADORES
ANEXO 11	DOSAGEM DE IgE TOTAL E ESPECÍFICA
ANEXO 12	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO PARA ANÁLISE DA DEPENDÊNCIA ENTRE O DIÂMETRO DAS PÁPULAS, NÍVEIS DE Der p 1 E ANTICORPOS IgE NO SORO
ANEXO 13	RESULTADO DOS TESTES CUTÂNEOS (DIÂMETRO MÉDIO DAS PÁPULAS) NOS DIFERENTES CENTROS

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	- 2,2'-azino-di(ácido sulfônico 3 etil benzotiazoline) SIGMA A1888
AU / U.A	- allergy unit / unidade alergênica
BAU	- bioequivalent allergy unit
BU	- biologic unit
BBS	- tampão de borato salina, pH 8.0
Bla g 1	- alérgeno de <i>Blattella germanica</i>
BSA	- albumina bovina sérica
<i>Bt</i>	- <i>Blomia tropicalis</i>
Can f 1	- alérgeno de <i>Canis familiaris</i>
cm	- centímetro
Co.	- corporation
Der f 1	- alérgeno principal do <i>Dermatophagoides farinae</i> (grupo 1)
Der p 1	- alérgeno principal do <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (grupo 1)
Der p 2	- alérgeno principal do <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> (grupo 2)
<i>Df</i>	- <i>Dermatophagoides farinae</i>
<i>Dp</i>	- <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DP	- desvio padrão
ELISA	- enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)
EPM	- Escola Paulista de Medicina-SP
F	- sexo feminino
FDA	- Food and Drug Administration
Fel d 1	- alérgeno de <i>Felis domesticus</i>
FNT	- fator de necrose tumoral
H1 / 2	- receptor de histamina 1 / 2
HEP	- histamine equivalent potency
HSP	- Hospital do Servidor Público Estadual –SP
IgE	- imunoglobulina E
IgG	- imunoglobulina G
IUIS	- International Union of Immunological Societes
kDa	- kilodaltons
kU/l	- UniCAP IgE units
M	- sexo masculino
MG	- média geométrica
mg	- miligrama
ml	- mililitro
mm	- milímetro
ng	- nanograma
nm	- nanômetro
NS	- não significante
PBS	- tampão fosfato salina, ph 7.4
PBS-T	- tampão fosfato salina, ph 7.4 contendo 0,05% de Tween 20
PNU	- protein nitrogen unit
RAST	- radioallergosorbent test
rpm	- rotações por minuto
S	- significante
SBAI	- Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia
Th	- célula T helper (célula T auxiliadora)
U	- unidades
UA	- unidades alergênicas
UBE	- unidade biológica equivalente
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UI	- unidades internacionais
URC	- unidade de reatividade cutânea
USP	- Universidade de São Paulo
µg	- micrograma
%	- por cento

RESUMO

O controle das doenças alérgicas inclui o conhecimento dos aeroalérgenos e o uso da imunoterapia na tentativa de modificar a resposta imunológica dos pacientes aos mesmos. Os objetivos deste estudo foram: verificar a potência *in vivo* e *in vitro* de extratos alergênicos comerciais de *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dp*) para imunoterapia e o grau de sensibilização e exposição de pacientes atópicos a alérgenos domiciliares. Os alérgenos Der p 1 e Der p 2 foram quantificados por ELISA em extratos alergênicos para imunoterapia. Os extratos foram avaliados por testes cutâneos de leitura imediata por punção (TCA), cujo instrumento e variabilidade foram previamente avaliados. Pacientes alérgicos ao *Dp* (n=210) e indivíduos não alérgicos (n=31) foram submetidos a TCA em seis serviços de alergia. A intensidade das reações foi aferida pelo diâmetro médio das pápulas e dos eritemas, em leitura após 15 minutos. Os alérgenos Der p 1, Der f 1, Der p 2, Bla g 1, Can f 1 e Fel d 1 foram quantificados por ELISA em amostras de poeira domiciliar de 51 pacientes alérgicos ao *Dp*. Estes foram submetidos a TCA para alérgenos domiciliares e determinação dos níveis séricos de IgE total e específica ao *Dp* por fluorescência enzimática (UniCAP). Os níveis dos alérgenos Der p 1 ou Der p 2 foram indetectáveis ou muito baixos (0,02 a 0,58 µg/ml) na maioria dos extratos, exceto em um deles (código I ; 68,3 e 31,7µg/ml, respectivamente). Em 210 atópicos foi avaliado o diâmetro médio das pápulas. As pápulas foram < 2 mm (0,36 a 1,95 mm) com sete extratos, mas com o extrato I a média das pápulas foi 7,1 mm de diâmetro. A positividade dos testes (pápula ≥ 3 mm) com os sete extratos variou de 2 a 36%, sendo detectada diferença significativa entre os resultados de cada serviço envolvido. O extrato I teve positividade de 97,2% sem haver diferença significativa entre os resultados de cada serviço. Os maiores níveis dos alérgenos de ácaros (grupos 1 e 2) foram detectados em amostras das camas (MG=30,2 e 15,2 µg/g, respectivamente), seguidas pela sala de TV, piso do quarto e cozinha. Os níveis de alérgenos do grupo 1 e 2 foram ≥ 2 µg/g de poeira em todas as amostras de camas. Níveis de alérgenos do grupo 1 e 2 ≥ 10 µg/g foram observados, respectivamente, em 46/51 (90%) e 35/51 (69%) destas amostras. Níveis de alérgenos de barata (Bla g 1) >2UI/g foram detectados ao menos em um local coletado em 11 (22%) dos 51 domicílios, mais frequentemente na cozinha e sala de TV. Os maiores níveis de alérgenos de cães e gatos foram detectados nas casas com animais. Níveis baixos destes alérgenos, no entanto, foram também encontrados em ambientes domiciliares sem a presença de animais. Todos os pacientes apresentaram positividade ao TCA para ácaros da poeira domiciliar. Os níveis de IgE total (MG=630, 4 UI/ml) e específica para *Dp* (MG=40,2 UI/ml) estavam elevados e apresentaram correlação entre si. Concluiu-se que a maioria dos extratos alergênicos testados *in vitro* e *in vivo* não contém os alérgenos principais do *Dp* em quantidades recomendáveis para imunoterapia. Pacientes atópicos de Curitiba são expostos a altos níveis de alérgenos de ácaros, especialmente *Dp*, que predominam nas amostras de cama. Outros alérgenos, com menor frequência, podem ser encontrados em níveis de sensibilização.

ABSTRACT

The control of allergic diseases includes the knowledge of the aeroallergens and use of immunotherapy in the attempt of modifying immunologic reactions to them. The aims of this study were to verify the *in vitro* and *in vivo* potency of commercial allergenic extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dp*) for immunotherapy and the sensitization degree and exposure levels of atopic patients to indoor allergens. The allergens Der p 1 and Der p 2 were quantified in allergenic extracts for immunotherapy by the ELISA method. The extracts were evaluated for skin prick test (SPT) whose disposable devices and variability were previously appraised. For that, six allergy centers submitted allergic patients to *Dp* (n=210) and non allergic individuals (n=31) to TCA. Reading was done after 15 minutes and the skin reactivity was determined by the mean diameters of wheals and flares. The allergens Der p 1, Der f 1, Der p 2, Bla g 1, Can f 1 and Fel d 1 were quantified by ELISA in house dust samples of 51 patients allergic to *Dp*. These patients were skin prick tested to other inhalant allergens and serum levels of total and specific IgE to *Dp* were determined by fluoroenzymeimmunoassay (UniCAP). Der p 1 and Der p 2 allergen levels were undetectable or very low (average 0.02 to 0.58 µg/ml) in most of the extracts, except in one of them (code I; 68.3 and 31.7 µg/ml, respectively). In 210 atopic patients the mean wheal diameters were evaluated. The wheals were <2 mm (average 0.36 to 1.95 mm) with seven extracts, but a mean wheal diameter of 7.1 mm with extract I. The frequency of the positive SPT (wheal ≥ 3 mm) with seven extracts varied from 2 to 36%, and significant differences were observed among observers of participating centers. SPT with the extract I gave 97.2% positive reactions with similar frequency obtained in different centers. The highest allergen levels were detected to house dust mite allergens (groups 1 and 2) especially in dust samples from beds (geometric means=30.2 and 15.2 µg/g, respectively), followed by samples from living room, bedroom floor and kitchen. Levels of group 1 and 2 allergens were ≥ 2 µg/g of dust in all samples from beds. Levels of these allergens ≥ 10 µg/g of dust were observed, respectively, in 46/51 (90%) and 35/51 (69%) of those samples. Levels of cockroach allergen (Bla g 1) >2UI/g were detected at least in one sample in 11 (22%) houses, more frequently in kitchen and living room. The highest dog and cat allergen levels were detected in houses with animals. However, low levels of these allergens were also found in houses without animals. All patients had positive SPT to house dust mites. The total (GM=630.4 kU/ml) and specific IgE for *Dp* (GM=40.2 kU/ml) levels were increased and correlated to each other. We concluded that most of the allergenic extracts tested *in vitro* and *in vivo* did not have enough amounts of the main allergens of *Dp* for immunotherapy. Allergic patients in Curitiba are exposed to high dust mite allergen levels, especially *Dp*, that prevails in beds. Other allergens could be found less frequently at sensitization levels.

Introdução



1. INTRODUÇÃO

O termo alergia engloba o estudo e o tratamento das reações humanas de hipersensibilidade produtoras de uma resposta patogênica a moléculas não próprias de um indivíduo denominadas de alérgenos (SHEARER & FLEISHER, 1998).

Paralelamente às mudanças de estilo de vida ocorridas nos últimos 50 anos (sedentarismo, maior tempo de permanência no ambiente intradomiciliar, moradias com móveis em excesso e com pouca ventilação), tem havido um aumento progressivo da prevalência e morbidade das doenças alérgicas em diversas partes do mundo (BURNEY, 1997).

A asma afeta parcela significativa da população com elevado custo social e econômico. Dados do ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) em cidades brasileiras, revelam que a prevalência cumulativa média da doença é de 13,3%, considerando-se populações de 6 a 7 anos e de 13 a 14 anos. (II CONSENSO BRASILEIRO NO MANEJO DA ASMA, 1998).

Em Curitiba, o questionário padronizado do ISAAC foi aplicado a escolares e mostrou uma prevalência de asma em 15,7% das crianças de 6 e 7 anos (grupo I) e 11,6% das crianças de 13 e 14 anos (grupo II) (FERRARI, 1997). Com o questionário ISAAC modificado associado a presença de testes cutâneos positivos ao *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) demonstrou-se, nesta cidade, uma prevalência de rinite alérgica de 12,2% para escolares de 13 a 14 anos e de 25,4% para adultos (ESTEVES, ROSÁRIO & ZAVADNIAK, 2000). Os dados epidemiológicos destes estudos confirmam a necessidade do diagnóstico correto e de tratamentos adequados para estas doenças.

O estudo ISAAC tem revelado grande variabilidade e diferenças regionais na prevalência das doenças alérgicas em todo o mundo, sendo provável que os fatores ambientais foram os responsáveis pelas principais diferenças entre os centros (MALLOL, CLAYTON, ASHER et al, 1999).

Embora nem todos os asmáticos sejam alérgicos, em crianças menores e adultos jovens a alergia é a responsável por mais de 90% dos casos de asma (GERRITSEN, KOETER, MONCHY et al, 1990) e o processo inflamatório nesses pacientes é causado pela reação alérgica. Nesses pacientes predominam as reações de hipersensibilidade do tipo I, mediadas por anticorpos da classe IgE, além de reações não dependentes de IgE, onde o linfócito T é o principal mediador.

A reação clássica ocorre após a exposição do indivíduo a um alérgeno específico. Células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e outras) apresentam este alérgeno aos linfócitos Th2. Esses agem sobre linfócitos B para que produzam anticorpos IgE específicos contra o epítipo responsável pelo reconhecimento desta estrutura antigênica, mecanismo este mediado principalmente pela interleucina 4. Em uma nova exposição ao alérgeno ocorre aumento na produção de IgE específica, que vai se ligar principalmente a receptores específicos de alta afinidade na membrana de mastócitos, além de outras células como basófilos, eosinófilos, macrófagos e plaquetas. Ocorre então a liberação de mediadores químicos dessas células, tanto pré-formados como neo-formados, levando a migração de eosinófilos e outras células inflamatórias que contribuem para o desencadeamento e a manutenção de sintomas crônicos. A resposta inflamatória na asma envolve a participação de diversos tipos celulares, incluindo eosinófilos, células T e mastócitos. O sistema nervoso autônomo é envolvido secundariamente neste processo, que inclui ainda alterações estruturais no epitélio das vias aéreas (BARNES, 1998).

O mecanismo da rinite alérgica é semelhante ao da asma, levando a uma inflamação da mucosa nasal caracterizada por um ou mais dos seguintes sintomas: congestão nasal, rinorréia, espirros e prurido (INTERNATIONAL CONSENSUS REPORT ON THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF RHINITIS, 1994). Os sintomas imediatos ao contato com o antígeno incluem espirros, prurido e rinorréia aquosa e são provocados por mediadores pré-formados liberados pelos mastócitos, como histamina, leucotrienos, prostaglandinas, bradicinina e o fator estimulador de plaquetas. A evolução da reação alérgica, com a migração de eosinófilos e outras células inflamatórias, leva aos sintomas crônicos, evidenciados principalmente pela obstrução nasal causada pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.

ALÉRGENOS

Alérgenos são substâncias capazes de induzir uma resposta imunológica com a produção de anticorpos específicos da classe E (IgE). Provenientes de várias fontes ambientais, os alérgenos representam grupos diversos de proteínas. Os alérgenos inaláveis têm propriedades físicas comuns: são geralmente proteínas de baixo peso molecular ou glicoproteínas rapidamente solúveis em meios aquosos que eluem prontamente da fonte alergênica. Estas propriedades facilitam a penetração nas superfícies mucosas, tornando possível a passagem pela membrana basal epitelial e subsequente transporte aos linfonodos regionais com o desencadeamento da resposta imunológica. Além disso, promovem a ligação de anticorpos IgE à superfície do mastócito com a liberação de mediadores, causando sintomas nos indivíduos sensibilizados.

A história dos alérgenos remonta a 1873, quando Charles Blackley demonstrou que pólenes de gramíneas eram capazes de induzir sintomas de febre do feno e que extratos

aquosos de gramíneas originavam reações imediatas de hipersensibilidade em pacientes com esta doença. Nas décadas subseqüentes, foi observado que a inalação de diferentes substâncias estava associada ao desencadeamento de sintomas alérgicos.

Na década de 60 foram purificados e caracterizados bioquimicamente os primeiros alérgenos, além da descoberta do envolvimento da IgE nas reações de hipersensibilidade. Posteriormente, vários alérgenos foram purificados e identificados quanto às suas características físico-químicas. A introdução das técnicas de biologia molecular possibilitou um grande avanço na identificação e caracterização de alérgenos. Alérgenos importantes foram seqüenciados, clonados e expressos como proteínas recombinantes. As informações obtidas nestes estudos têm sido úteis em estabelecer a estrutura e função biológica dos alérgenos, identificar os sítios antigênicos nas respostas do tipo IgE e a investigação de mecanismos celulares da resposta inflamatória na asma. Os alérgenos são atualmente descritos utilizando-se as três primeiras letras do gênero, a primeira letra da espécie e um numeral arábico para indicar a ordem cronológica de classificação (PLATTS-MILLS, VERVOLET, THOMAS et al., 1997; LARSEN & LOWENSTEIN, 1996).

Os aeroalérgenos desempenham papel relevante na patogênese da asma e da rinite alérgica. Os alérgenos domiciliares são de especial importância e incluem principalmente os alérgenos provenientes de ácaros da poeira domiciliar, animais domésticos, baratas e fungos. A importância relativa de cada grupo de alérgenos difere mundialmente, dependendo de fatores geográficos e climáticos. Diversos estudos concordam, no entanto, que grande parte dos pacientes são sensibilizados a um ou mais alérgenos encontrados principalmente no interior do local em que vivem (PLATTS-MILLS, VERVLOET, THOMAS et al., 1997).

O maior tempo de permanência das pessoas no ambiente domiciliar associado a hábitos sedentários e exposição a uma variedade de alérgenos, claramente contribui para o

desenvolvimento da asma perene e a sensibilização aos alérgenos intradomiciliares está fortemente associada à asma, rinite alérgica e dermatite atópica (SQUILLACE, SPORIK, RAKES et al, 1997; PLATTS-MILLS, 1998).

Em diversos países observou-se que o padrão de sensibilização a alérgenos específicos reflete o nível médio de alérgenos encontrados nas residências das comunidades onde vivem os pacientes, além de demonstrar que há locais nos quais a alta prevalência de asma está associada a outros alérgenos intradomiciliares além dos provenientes de ácaros (PLATTS-MILLS, VERVLOET, THOMAS et al., 1997).

Há três considerações que evidenciam a relação entre os alérgenos domiciliares e asma. A primeira está relacionada à frequência na qual é vista a sensibilização a estes alérgenos; a segunda baseia-se na evidente constatação que sustenta a ligação entre sensibilização alérgica, exposição a alérgenos e atividade da doença; e a terceira está relacionada aos efeitos benéficos evidentes demonstrados com medidas ambientais que diminuem a exposição a alérgenos (WOOD, 1998).

ÁCAROS

Os ácaros domiciliares são, em todo o mundo, a principal fonte de alérgenos clinicamente relevantes. Acredita-se que estão envolvidos nas exacerbações clínicas das doenças atópicas, incluindo a asma, eczema e rinite alérgica (CARSWELL, 1999).

Os ácaros constituem uma ordem dentro da classe Aracnida. Os alérgenos dos ácaros da família *Pyroglyphidae* são predominantes na poeira domiciliar, cujas principais espécies são o *Dermatophagoides pteronyssinus* e o *Dermatophagoides farinae*. A denominação ácaro da poeira domiciliar tem sido empregada a qualquer espécie que viva predominantemente neste local. Outras espécies importantes, distribuídas globalmente, são membros da

superfamília *Glycyphagoidea*, especialmente a *Blomia tropicalis* (COLLOFF & STEWART, 1997).

Os ácaros são artrópodes microscópicos de 0,1 a 0,6 mm. Vivem em roupas de cama, carpetes, tapetes e outros materiais têxteis do domicílio, onde se alimentam de descamações do epitélio humano, além de fungos, bactérias, detritos orgânicos e secreções humanas. Condições ideais de crescimento e multiplicação incluem temperaturas entre 21 e 26°C e umidade relativa de 75 a 80%. A umidade e a temperatura são os mais importantes fatores que determinam o local onde os ácaros vivem, o crescimento e as variações sazonais de sua população (COLLOFF & STEWART, 1997).

Os alérgenos provenientes de ácaros estão contidos em partículas relativamente grandes, com diâmetro aerodinâmico médio de 10 a 20 µm, as quais tornam-se inaláveis após agitação da poeira (aspiração, arrumação de camas, utilização de vassouras). Os alérgenos de ácaros têm sido divididos em 10 grupos de acordo com suas características imunológicas e físico-químicas. Dois grupos de alérgenos são os mais importantes: o grupo 1 de alérgenos (que compreende o Der p 1, Der f 1, Der m 1) são glicoproteínas com peso molecular de aproximadamente 25 kDa, possuem estruturas homólogas com a mesma seqüência terminal de aminoácidos e são excretados nas partículas fecais; o grupo 2 de alérgenos (Der p 2, Der f 2 e Der m 2) de alérgenos são glicoproteínas com peso molecular com aproximadamente 15 kDa, possuem igualmente a mesma seqüência terminal de aminoácidos e têm origem nos corpos dos ácaros (THOMAS & SMITH, 1998).

O Der p 1 é considerado o mais importante alérgeno (alérgeno principal) envolvido na expressão de hipersensibilidade mediada a ácaros. Há reatividade cruzada entre alérgenos do mesmo grupo, por exemplo entre Der p 1 e Der f 1 assim como entre Der p 2 e Der f 2,

mas não há nenhuma evidência de reações cruzadas entre o grupo 1 e grupo 2 (PLATTS-MILLS, VERVLOET, THOMAS et al., 1997).

Estudos realizados em diversos países têm demonstrado que crianças expostas a níveis de alérgenos domiciliares superiores a 2 µg/g de poeira estão em risco de desenvolver sensibilização a estes alérgenos, demonstrada pela positividade aos testes cutâneos de leitura imediata e anticorpos séricos IgE específicos. Níveis superiores a 10 µg/g, por sua vez, estão relacionados ao desencadeamento de sintomas. A exposição precoce aos alérgenos de ácaros é um fator determinante no subsequente desenvolvimento da asma na infância (SPORIK, 1990).

Na América Latina, a alergia ao ácaro da poeira domiciliar tem alta prevalência (>80%) em pacientes com asma, particularmente em crianças, e estes pacientes comumente têm rinite alérgica associada. As mais elevadas taxas de sensibilização foram encontradas em pacientes residentes em cidades de clima tropical com prolongados períodos de temperatura média e umidade elevadas. Os pacientes nesta região são expostos a uma grande variedade de espécies de ácaros, cujas condições climáticas regionais poderiam favorecer o crescimento das populações, mesmo em cidades situadas em altitudes elevadas como Bogotá (BAENA-CAGNANI, PATIÑO, NEFFEN et al, 1999).

Levantamentos no Brasil demonstram a existência de várias espécies de ácaros no ambiente domiciliar. Duas espécies, no entanto, são prevalentes: o *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e a *Blomia tropicalis* (Bt) (ARRUDA, RIZZO, CHAPMAN et al, 1991; SARINHO, FERNANDEZ-CALDAS, JUST et al, 1996; GELLER, 1996; OLIVEIRA, BINOTTI, MUNIZ et al., 1999; SERRAVALLE & MEDEIROS, 1999).

Os ácaros domiciliares são as fontes de alérgenos mais importantes na cidade de Curitiba. As duas espécies mais prevalentes na cidade são o *Dermatophagoides pteronyssinus* (65%) e a *Blomia tropicalis* (30%) (ROSÁRIO FILHO, BAGGIO, SUZUKI et al., 1992). Em

um estudo que avaliou aspectos clínicos e epidemiológicos da asma nesta cidade observou-se reações positivas em 97,5% dos indivíduos submetidos a teste cutâneo por puntura com extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus*, demonstrando seu papel como principal alérgeno, seguido da *Blomia tropicalis* (ROSÁRIO FILHO, 1997).

BARATAS

Alguns autores sugerem uma ligação entre a exposição a antígenos da barata e o aumento das taxas de morbidade e mortalidade em certas populações urbanas da América do Norte (HAYDEN, 1999; CALL, SMITH, CHAPMAN et al, 1992).

As principais espécies encontradas no ambiente domiciliar são *Blattella germanica* e *Periplaneta americana*, e a prevalência de cada espécie varia de acordo com a localização geográfica. Entre os vários alérgenos identificados, os mais importantes são: Bla g 1, Bla g 2 e Per a 1. Os alérgenos de baratas possuem características aerodinâmicas semelhantes aos dos ácaros. Há significativa reatividade cruzada entre as duas espécies (SCHOU, 1990).

Estudos realizados em diversas cidades do Brasil revelaram uma variabilidade de 8,3 a 66% na frequência de testes cutâneos positivos a baratas, relacionada principalmente aos diferentes métodos de pesquisa utilizados. Em Curitiba, a positividade ao teste cutâneo com extrato misto de baratas em 303 asmáticos atópicos foi de 24,1%, com maior frequência de reações positivas na asma grave (40,7%) (ROSÁRIO FILHO, FARIAS, RIEDI et al.,1999).

Uma combinação de sensibilização a baratas e exposição a altos níveis de alérgenos de baratas nas residências está associada com alta morbidade causada pela asma em crianças de grandes cidades dos Estados Unidos. A sensibilização a baratas tem sido ligada a fatores sócio-econômicos, pelos ambientes que permitem a infestação por esse inseto

(ROSENSTREICH, EGGLESTON, KATTAN et al., 1997; SARPONG, HAMILTON, EGGLESTON et al, 1996).

Testes cutâneos positivos a extratos de *Periplaneta americana* e/ou *Blattella germanica* foram observados em 55% dos pacientes de duas cidades brasileiras com diagnóstico de asma moderada a grave e/ou rinite alérgica, dos quais 91% tinham testes cutâneos positivos ao *D pteronyssinus*. Considerou-se, portanto, que a alergia à barata é fator de risco importante para asma e/ou rinite alérgica no Brasil (SANTOS, CHAPMAN AALBERSE et al, 1999).

A quantificação de alérgenos de barata na poeira domiciliar tem demonstrado que a maioria dos pacientes sensibilizados a alérgenos de baratas são expostos a altos níveis de alérgenos em seus domicílios, e que a alergia a barata é um fator de risco para atendimentos de emergência de asmáticos (ARRUDA, FERRIANI, OLIVER et al, 1999).

ANIMAIS DOMÉSTICOS

Os alérgenos de animais domésticos (cães e gatos) são também causa de sintomas agudos e crônicos em pacientes asmáticos, e em alguns locais são os alérgenos domiciliares predominantes (INGRAM, SPORIK, ROSE et al, 1995).

O alérgeno principal de gatos, Fel d 1, é produzido nas glândulas sebáceas da pele e torna-se disperso no ar em pequenas partículas. Além disso, este alérgeno adere facilmente às superfícies, tornando difícil reduzir a exposição ambiental mesmo após a retirada do animal do local (WOOD, MUDD & EGGLESTON, 1992).

Alérgenos de cachorro (*Canis familiaris*), cujo principal é o Can f 1, possuem propriedades semelhantes aos alérgenos de gato. Uma significativa proporção de ambos, Can f 1 e Fel d 1, são encontrados em pequenas partículas de aproximadamente 5 µm de diâmetro,

as quais tendem a manter-se em suspensão por longos períodos de tempo (2-4 horas). As características dos alérgenos de cães e gatos contribuem para que os mesmos apresentem uma grande distribuição passiva entre ambientes. Um estudo recente demonstrou significativa exposição em escolas, sendo as roupas importantes fontes de dispersão destes alérgenos (ALMQVIST, LARSSON, EGMAR et al, 1999).

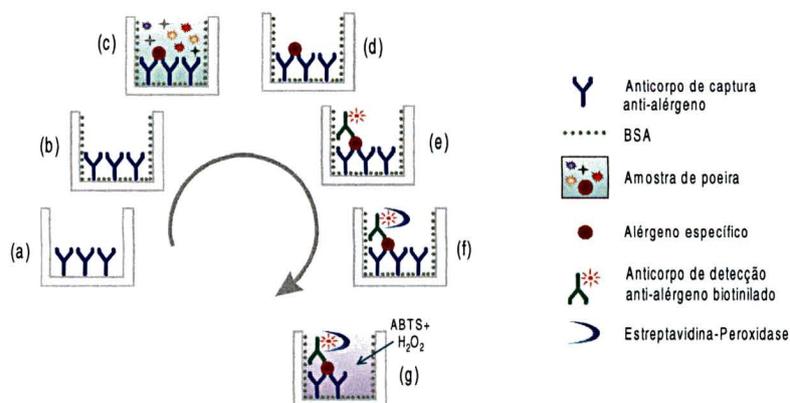
Assim como na exposição a alérgenos de ácaros, têm-se mostrado que a exposição precoce a alérgenos de animais domésticos leva a um risco elevado de desenvolver-se sensibilização (WARNER, 1991).

MÉTODOS DE DOSAGENS DE ALÉRGENOS

O desenvolvimento de padrões de alérgenos estáveis e confiáveis foi crucial para os estudos que envolvem medidas de alérgenos, principalmente monitorização da exposição ambiental, avaliação de equipamentos para controle da mesma e a padronização de extratos alergênicos. Alguns padrões atualmente utilizados foram desenvolvidos por agências nacionais ou internacionais como a WHO/IUIS ou FDA, e outras por grupos de pesquisa ou empresas. Painéis de anticorpos monoclonais têm sido produzidos contra a maioria dos alérgenos para utilização em ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Estes ensaios tornaram-se o principal método para detecção de alérgenos ambientais e têm sido utilizados por fabricantes de alérgenos e organizações regulatórias e governamentais para a padronização dos mesmos.

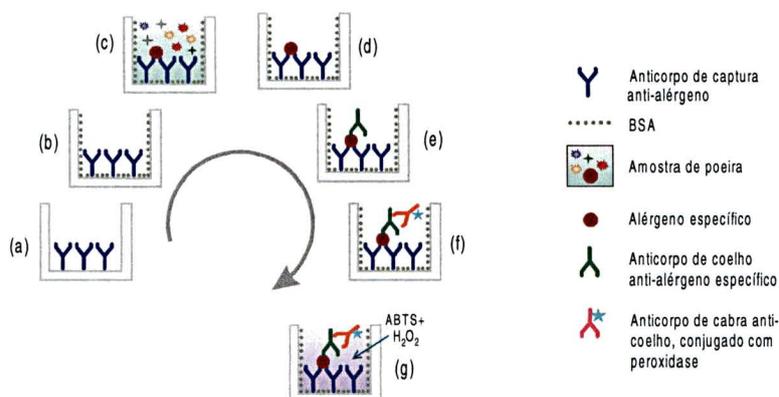
O método de ELISA com a finalidade de determinar níveis de antígenos solúveis, é comumente conhecido como ELISA “sandwich” e esquematizado a seguir (FIGURA 1).

FIGURA 1



A - Esquema do ensaio imunoenzimático (ELISA "sandwich") para determinação de alérgenos inalantes na poeira domiciliar. (a): anticorpo monoclonal de captura específico ao alérgeno; (b): bloqueio com BSA; (c): adição da amostra de poeira; (d): alérgeno específico+anticorpo de captura; (e): adição do anticorpo de detecção biotilado anti-alérgeno específico; (f): adição do conjugado Estreptavidina-Peroxidase; (g): revelação da reação realizada com a adição do substrato enzimático ABTS e H_2O_2 .

Fonte: adaptado de *Current Protocols in Immunology*, 1991.



B - Esquema do ensaio imunoenzimático (ELISA "sandwich") para determinação de alérgenos inalantes na poeira domiciliar, utilizando três anticorpos. (a): anticorpo monoclonal de captura específico ao alérgeno; (b): bloqueio com BSA; (c): adição da amostra de poeira; (d): alérgeno específico+anticorpo de captura; (e): adição do anticorpo de coelho anti-alérgeno específico; (f): adição de anticorpo de cabra anti-coelho, conjugado com peroxidase; (g): revelação da reação realizada com a adição do substrato enzimático ABTS e H_2O_2 .

Fonte: adaptado de *Current Protocols in Immunology*, 1991

Neste teste, uma quantidade fixa de anticorpo é aderida a um suporte sólido. Permite-se a ligação de uma solução-teste, de concentração desconhecida do antígeno, ou uma série de soluções-padrão de concentrações conhecidas do antígeno. O antígeno não ligado é removido, permitindo-se a ligação de uma segunda população de anticorpos ligados a enzimas. Quanto maior a concentração de antígenos na solução-teste ou na solução-padrão, maior a ligação do segundo anticorpo ligado à enzima. Os resultados das soluções-padrão são usados na construção de uma curva de ligação para o segundo anticorpo em função da concentração antigênica e a partir da qual pode ser inferida a quantidade de antígeno na solução-teste. (ABBAS, 1994).

Esse ensaio, portanto, consiste na utilização de dois anticorpos: o primeiro, denominado anticorpo de captura, específico ao antígeno e que recobre a placa, e o outro, que é conjugado com uma enzima e que se liga ao antígeno. Ao adicionar o substrato (juntamente com H_2O_2 , que potencializará a velocidade da reação) ocorre hidrólise, desencadeando a coloração característica, quantificada com um espectrofotômetro (**A**). Pode-se encontrar uma pequena variação nesse mesmo método, onde é adicionado um terceiro anticorpo, conjugado com uma enzima, que se liga ao segundo pela região Fc deste (**B**).

A IMUNOTERAPIA

O tratamento das doenças alérgicas baseia-se em evitar a exposição aos alérgenos, educação do paciente, terapia farmacológica e na imunoterapia (NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE, 1995).

A imunoterapia modifica ativamente os mecanismos imunológicos envolvidos nas doenças alérgicas. Consiste na administração de doses graduais e progressivas de extratos

alergênicos a um indivíduo sensibilizado durante um longo período de tempo, com o objetivo de aumentar sua tolerância a esses alérgenos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Estudos têm demonstrado que a imunoterapia com alérgenos é eficaz no tratamento de pacientes com asma, rinite e conjuntivite alérgicas, além das reações alérgicas à picada de insetos. Observações recentes, especialmente promissoras, sugerem que a imunoterapia específica é capaz de alterar a história natural da doença alérgica ao prevenir o desenvolvimento de novas sensibilizações em crianças (DES ROCHES, PARADIS, MENARDO et al, 1997).

A imunoterapia específica não substitui o uso de agentes anti-inflamatórios regulares no tratamento da asma. Porém, quando indicada de forma criteriosa, observa-se melhora dos parâmetros clínicos e nos valores de função pulmonar dos pacientes asmáticos (HAUGAARD, DAHL, JACOBSEN et al., 1993).

Embora a imunoterapia com alérgenos seja amplamente utilizada no tratamento de doenças alérgicas há mais de setenta anos, seu papel ainda permanece discutível. Apesar do grande número de protocolos de imunoterapia existentes, as interpretações dos seus resultados clínicos são controversas. Esta condição advém do pequeno número de pacientes avaliados e das diferenças na gravidade da doença alérgica, além da variação no delineamento dos estudos. A utilização de diversos extratos alergênicos não padronizados é um fator decisivo nesta questão à medida que origina resultados divergentes e não comparáveis (BARNES, 1996).

A resposta à imunoterapia é específica para o antígeno administrado, não devendo ser utilizadas misturas de alérgenos não relacionados a sensibilidade do paciente. A qualidade da vacina com alérgenos é crítica para o diagnóstico e o tratamento. Além disso, a diluição e

a mistura de extratos alergênicos podem ocasionar uma diminuição significativa da sua potência (NELSON, ILKÉ, BUCHMEIER et al, 1996).

Recomendações internacionais enfatizam a necessidade de garantir-se a qualidade dos extratos alergênicos utilizados, visando a segurança e a eficácia do tratamento. A padronização dos extratos utilizados permite a redução da frequência e da gravidade das reações sistêmicas secundárias à imunoterapia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

A padronização de um extrato baseia-se na detecção *in vitro* ou *in vivo* da presença de anticorpos específicos da classe IgE a determinados alérgenos. Em ambos os casos realiza-se uma comparação entre o extrato testado a um extrato considerado de referência pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Os testes utilizados para diagnóstico das doenças alérgicas e as preparações utilizadas para imunoterapia são baseados em extratos dializados de fontes ambientais de alérgenos. Conseqüentemente, tais extratos são misturas complexas de glicoproteínas e polissacárides e sua composição reflete a variação natural que ocorre nos sistemas biológicos. A grande maioria dos extratos alergênicos internacionais comercialmente disponíveis, baseados na mais importante fonte alergênica, são agora padronizados. Infelizmente, no entanto, quase todas as companhias têm suas próprias unidades de padronização. Torna-se assim impossível realizar a conversão de diferentes unidades utilizadas pelas várias companhias, o que inviabiliza o conhecimento da potência alergênica entre extratos de diferentes origens comerciais (VAN REE, 1999).

Historicamente as primeiras solicitações para padronização de extratos ocorreram logo após a proposta de dessensibilização para rinite sazonal. As primeiras unidades propostas eram baseadas na relação entre o peso do material utilizado e volume do fluido utilizado na

extração do mesmo, não refletindo o conteúdo alergênico. A primeira unidade que avaliou a quantidade proteica do extrato foi denominada PNU (Protein nitrogen unit), referindo-se a todas as proteínas na solução e não somente aos alérgenos biologicamente ativos. As unidades utilizadas atualmente derivam da utilização dos testes cutâneos como técnica básica para mensuração da potência relativa de extratos. O sistema nórdico utilizava originalmente a unidade HEP (Histamine equivalent potency), baseada na diluição do extrato produtora de pápula do mesmo tamanho que a produzida por uma determinada concentração de histamina. Atualmente é utilizada a denominação BUs (Biological units) em praticamente todos os países europeus (PLATTS-MILLS & CHAPMAN, 1991).

Nos Estados Unidos utiliza-se outro método no qual avalia-se o eritema produzido por testes intradérmicos, segundo determinação do FDA (Food and Drug Administration). A unidade utilizada é a AU (allergy unit), tendo sido introduzida posteriormente a BAU (Bioequivalent allergy unit) (IPSEN, LARSEN, NIEMEIJER et al., 1998).

Testes in vitro são úteis na determinação da composição de extratos, quantificação de alérgenos específicos e determinação da potência relativa.

Idealmente a quantidade de todo alérgeno deveria ser determinada durante a padronização de um extrato. As medidas da concentração de alérgenos específicos requerem anticorpos monoespecíficos (freqüentemente anticorpos policlonais de coelhos ou anticorpos murinos monoclonais) para detecção destes alérgenos. Diversas técnicas de imunoeletroforese podem ser utilizadas para avaliação quantitativa dos alérgenos individuais. A técnica de análise de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA) têm adquirido popularidade pela acurácia e possibilidade de testagem de múltiplas amostras e automação parcial. Na quantificação in vitro da potência relativa de um extrato a técnica dominante tem sido o RAST (Radio Allergosorbent Test) (IPSEN, LARSEN, NIEMEIJER et al., 1998).

Os métodos de padronização in vivo baseiam-se na realização de testes cutâneos, que determinam a presença de anticorpos IgE específicos aos alérgenos testados. Nestes testes pequena quantidade de alérgeno é introduzida na camada mais superficial da pele. Se o indivíduo é sensibilizado ao alérgeno em questão ocorre a união deste com duas moléculas de IgE ligadas a receptores específicos da membrana celular de mastócitos, que liberam histamina e outros mediadores químicos inflamatórios. A ação dos mediadores combinada com reflexos neuronais leva ao aparecimento de reação típica de pápula e eritema, com prurido, cuja intensidade máxima ocorre 15 minutos após a introdução do alérgeno na pele (BOUSQUET, 1993).

Há variações nas formas de medida, graduação e interpretação dos resultados dos testes cutâneos de leitura imediata. A medida do maior diâmetro e do diâmetro perpendicular a este é suficiente para interpretação da reação com finalidades clínicas. (AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY AND IMMUNOLOGY - POSITION STATEMENT, 1993).

As reações cutâneas relacionadas à alergia clínica geralmente produzem pápulas com diâmetro igual ou superior a três milímetros (correspondente a área da pápula de 7 mm^2) e eritemas com diâmetro superior a dez milímetros (ADINOFF, ROSLONIEC, McCALL et al, 1990).

Os testes cutâneos são relativamente seguros e de fácil execução. Alguns fatores, no entanto, influenciam a precisão dos testes, tais como: a dose empregada na sua realização, a maneira de avaliação da resposta cutânea, a técnica e o local de injeção, o tempo de leitura da resposta cutânea e a distância entre as aplicações. Os diâmetros das pápulas e eritemas devem ser lidos com réguas milimetradas no momento máximo da reação. Independente do método, os testes produzem respostas máximas para alérgenos entre 15 a 20 minutos (DEMOLY, MICHEL & BOUSQUET, 1998).

Os resultados dos testes cutâneos têm boa correlação com os níveis de IgE específica medidos *in vitro* (BOUSQUET, CHANEZ & CHANAL, 1990; ROSÁRIO & VILELA, 1997). Os testes cutâneos são mais sensíveis porém menos específicos que os testes *in vitro* (SELNER, SULLIVAN, AHLSTEDT et al, 1999).

Uma das questões cruciais na avaliação de um extrato alergênico diz respeito a determinação de alérgenos específicos presentes na solução, já que a eficácia da imunoterapia está relacionada a administração de quantidade fixa e regular do alérgeno (VAN REE, 1999).

No Brasil não há estudos comparando a variabilidade da potência *in vitro* ou *in vivo* dos extratos disponíveis comercialmente para imunoterapia, revelando um total desconhecimento das substâncias utilizadas em um grande número de pacientes alérgicos.

A falta de padronização dos extratos utilizados para imunoterapia impede a análise da sua eficácia como tratamento das doenças alérgicas, impossibilitando o consenso acerca de suas indicações. Além disso, tornam-se incertas questões relativas a sua segurança.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- 1) Comparar os resultados dos testes cutâneos produzidos por dois dispositivos: puntor e agulha descartáveis.
- 2) Verificar a potência, *in vivo* e *in vitro*, de diferentes extratos alergênicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* para imunoterapia.
- 3) Avaliar a sensibilização e a exposição de pacientes atópicos de Curitiba aos alérgenos intradomiciliares.

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

É bem estabelecido que a asma é uma doença inflamatória e que está associada a hipersensibilidade a alérgenos intradomiciliares perenes. Aproximadamente 80-90% das crianças com asma são sensibilizadas a alérgenos intradomiciliares, e a sensibilização é claramente relacionada à exposição. O estudo propiciará o conhecimento do grau de exposição aos mais importantes alérgenos intradomiciliares em Curitiba, além de revelar a frequência dos níveis que determinam a sensibilização e a ocorrência de crises. Tal determinação constituir-se-á uma contribuição ao conhecimento da história natural da asma e outras doenças alérgicas em Curitiba, com implicações sobre a prevenção primária e o tratamento destas doenças, especialmente fornecendo subsídios ao planejamento de medidas de controle ambiental e com vacinas de alérgenos.

A eficácia da imunoterapia no tratamento das doenças alérgicas, por sua vez, depende da qualidade do extrato alergênico utilizado. A ausência de padronização de extratos comerciais dificulta a avaliação da eficácia deste método terapêutico. Foi proposto o presente estudo com a finalidade de avaliar o resultado de testes cutâneos realizados em pacientes atópicos, com diferentes extratos concentrados de *D. pteronyssinus* para imunoterapia, além da determinação *in vitro* da quantidade de alérgenos no extratos.

“Os médicos devem conhecer a aerobiologia local e regional e o nível de exposição do paciente em sua residência e no ambiente de trabalho. Somente médicos com treinamento em alergia/imunologia devem prescrever vacinas cujos alérgenos tenham relevância clínica para a imunoterapia” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).



Casuística e Métodos

4.1. AVALIAÇÃO DO PUNTOR PARA TESTE CUTÂNEO

CASUÍSTICA

Foram realizados testes cutâneos de leitura imediata em 50 indivíduos adultos (17M:33F) voluntários, médicos e funcionários do Hospital de Clínicas da UFPR. Não foram incluídos indivíduos em que houvesse lesões cutâneas ou condições patológicas que alterassem a reatividade cutânea ou história prévia de reação anafilática. Foram ainda excluídos de participar do estudo indivíduos em uso de medicamentos: antihistamínicos, cetotifeno e antidepressivos, conforme tempo de supressão da reatividade cutânea: astemizol (60 dias), outros histamínicos H1 (10 dias), antihistamínicos H2 (24 horas), antidepressivos (14 dias). Os testes foram realizados por três pesquisadores da Disciplina de Alergia e Imunologia do Departamento de Pediatria do HC-UFPR, já familiarizados com a técnica do teste.

MÉTODO

Na região proximal da linha média da face anterior do antebraço esquerdo foi colocada 1 gota da solução de histamina (10 mg/ml) pelo pesquisador 1 e realizado o teste com agulha (26G½, Becton-Dickinson).

A solução de histamina (10 mg/ml) foi depositada na linha mediana da face anterior do antebraço direito de cada indivíduo. As gotas foram dispostas 5 cm distantes uma das

outras, seguindo da fossa antecubital ao punho e sempre na mesma ordem em todos os indivíduos avaliados (pesquisador 1, seguido pelo pesquisadores 2 e 3). A puntura utilizando o puntor descartável (Alko do Brasil), foi realizada na mesma seqüência e também em intervalos de dois minutos entre cada pesquisador.

A leitura dos testes foi realizada 15 minutos após a puntura. Foram aferidos, com régua milimetrada, os maiores diâmetros das pápulas e dos eritemas e os respectivos maiores diâmetros ortogonais, e analisada a média destas duas medidas. Cada pesquisador foi responsável pela leitura e registro do testes que realizou, sem o conhecimento dos demais pesquisadores.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram digitados no programa estatístico PRIMER OF BIostatISTICS. Foram utilizados teste paramétricos de análise da variância para comparação dos resultados obtidos com a agulha e puntor por um observador (*One Way ANOVA*) e por três observadores que utilizaram puntor descartável (*Repeated Measures ANOVA*).

4. 2. AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE EXTRATOS ALERGÊNICOS PARA IMUNOTERAPIA

CASUÍSTICA

Além do Hospital de Clínicas da UFPR, foram escolhidos pela Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia, para participar do estudo, cinco outros serviços universitários de Alergia com um pesquisador responsável pela realização dos testes cutâneos em cada local: Escola Paulista de Medicina (Prof. Dirceu Solé), Universidade de São Paulo (Prof. Fábio M. Castro), Hospital do Servidor Público Estadual - SP (Dr. Wilson T. Aun), Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (Prof^a. Luisa Karla Arruda) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (Prof. Alfeu T. França).

A cada centro foi solicitado realizar testes cutâneos de leitura imediata em 50 pacientes atópicos selecionados nos respectivos ambulatórios especializados.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes ambulatoriais, de ambos os sexos, de qualquer grupo étnico, com idade superior a 7 anos, após fornecimento de consentimento livre e esclarecido para participação no estudo, e que apresentassem as seguintes condições:

1. Diagnóstico clínico de asma (de acordo com os critérios do *Global Strategy for Asthma*) e/ou rinite alérgica (de acordo com os critérios do *Guidelines of the Joint Task Force on Practice Parameters in Allergy, Asthma and Immunology*, 1998).
2. História familiar de doença atópica
3. Teste cutâneo alérgico prévio positivo para *Dermatophagoides pteronyssinus*.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

1. Presença de lesões cutâneas em antebraços que comprometessem a reatividade cutânea (ex: eczema extenso, dermatografismo).
2. Presença de condições patológicas que alterassem a reatividade cutânea: neoplasias, lesões espinhais ou anormalidades de nervos periféricos, neuropatia diabética.
3. História prévia de reação anafilática.
4. Uso de medicamentos: antihistamínicos, cetotifeno, antidepressivos, conforme tempo de supressão da reatividade cutânea: astemizol (60 dias), outros histamínicos H1 (10 dias), antihistamínicos H2 (24 horas), antidepressivos (14 dias).
5. Imunoterapia específica para *D. pteronyssinus* por mais de três meses e há menos de três anos.

Cinco indivíduos não atópicos deveriam ser igualmente testados em cada centro (total = 30 controles), para afastar a ocorrência de reações inespecíficas.

MÉTODO

OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Extratos comerciais de *Dermatophagoides pteronyssinus* para imunoterapia foram comprados sem informar ao fabricante sobre a realização da pesquisa. Foram solicitados extratos comerciais aquosos de maior concentração deste alérgeno produzidos por cada empresa. Aos fabricantes que não dispunham de extratos concentrados foi solicitado o material para imunoterapia com a maior concentração de *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Além do extrato da Bayer Co. (EUA) 30000 AU/ml, foram obtidos extratos comercializados no Brasil por sete empresas.

Foram adquiridas também: solução de histamina 10 mg/ml (IPI-ASAC) e glicerina 50% (OPHTHALMOFARMA PR – Farmácia Oftalmológica Ltda).

CODIFICAÇÃO E PREPARO DOS EXTRATOS

Todos os frascos foram entregues ao Serviço de Farmácia Hospitalar do Hospital de Clínicas da UFPR, responsável pelo preparo e identificação das soluções. Os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar sob a supervisão do farmacêutico chefe do serviço, utilizando material estéril para manipulação e condicionamento das soluções.

As dez soluções (8 extratos alergênicos, 1 de histamina e 1 de glicerina) foram codificadas pelo Serviço de Farmácia Hospitalar com letras de A a J sem o conhecimento dos pesquisadores. O código permaneceu inviolado até o término da análise estatística.

Inicialmente foram retiradas amostras de cada frasco para quantificação dos alérgenos *in vitro*. Dos sete extratos comercializados no Brasil, da solução de histamina e glicerina 50%, foi retirado 1 ml. Do extrato da Bayer Co. foi retirado 0,3 ml e diluído em frasco contendo 0,6 ml de solução fisiológica 0,9% (resultando em uma solução final de 10000 AU/ml).

A seguir, foram preparadas as soluções para testes cutâneos.

Aos sete extratos comerciais brasileiros (17ml) foram acrescentados 17 ml em 17 ml de glicerina 100%, dividindo-se as soluções glicerinadas a 50% em 8 frascos conta-gotas, com aproximadamente 4 ml em cada frasco.

Ao extrato da Bayer (9 ml) foram adicionados 18 ml de glicerina 50%, totalizando 27 ml de uma solução glicerinada 50% com 10.000 AU/ml, distribuída em 7 frascos contendo aproximadamente 4 ml.

Glicerina a 50% e histamina 10 mg/ml, também foram preparadas em frascos com 4 ml para servirem de controle negativo e positivo, respectivamente.

Os frascos destinados a realização dos testes cutâneos foram identificados com as mesmas letras utilizadas na primeira etapa de identificação.

PREPARO E ENVIO DOS “KITS”

Além de Curitiba, foi enviado a cada centro participante da pesquisa um “kit” que continha: carta de aprovação do projeto (ANEXO 1), 1 caixa de isopor com 10 frascos, com conta-gotas, identificados com as letras de A a J, 1 régua acrílica milimetrada (TRIDENT mod. 7115), 65 envelopes de puntores descartáveis (Alko do Brasil) contendo 10 puntores cada, 120 cópias do consentimento informado (ANEXO 2), 1 resumo do projeto, 1 pasta com fichas para anotação dos resultados (ANEXO 3) acompanhada de 1 sumário da pesquisa (ANEXO 4) e 1 página de orientação para o registro de dados nas fichas (ANEXO 5). Cada “kit” foi enviado com uma lista de checagem do material e carta aos pesquisadores responsáveis em cada centro.

REALIZAÇÃO DOS TESTES CUTÂNEOS DE LEITURA IMEDIATA

Foram realizados testes cutâneos por puntura (*skin prick test*) com a utilização de puntor descartável (Alko do Brasil) na linha mediana das faces anteriores dos antebraços, com distância mínima de 3 cm entre as soluções.

As soluções codificadas com as letras A a E, seguindo da fossa antecubital ao punho, foram dispostas no antebraço direito. As soluções codificadas com as letras F a J, seguindo da fossa antecubital ao punho, foram colocadas no antebraço esquerdo. O tempo recomendado para a leitura das reações foi de 15 minutos.

As reações de eritema e pápula provocadas por cada solução foram medidas com régua transparente graduada em milímetros, das quais foram registrados: o maior diâmetro (a) e o respectivo maior diâmetro ortogonal (b), bem como a média destas duas medidas $[(a+b) \div 2]$. Foi anotado também o surgimento de pseudópodos nas reações.

DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE ALERGÊNICA *IN VITRO*:

A determinação da concentração alergênica das soluções foi realizada no Laboratório de Alergia e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP.

Inicialmente as soluções foram recodificadas, recebendo números de 1 a 10, para que os pesquisadores permanecessem desinformados sobre o conteúdo alergênico das soluções.

Foram quantificados os níveis dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 por ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo “sandwich”, conforme descrito por LUCZYNSKA et al. (1989).

Cada poço da placa de microtitulação de poliestireno (IMMUNOLON II DYNATECH, ALEXANDRIA, VA, Cat. # 011-010-3450) foi sensibilizado com 1 μ g dos respectivos anticorpos monoclonais: anti-Der p 1 (5H8) e anti-Der p 2 (1D8) em tampão carbonato-bicarbonato, 50 mM, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente com 0,1 ml de PBS-T + BSA a 1%.

Novamente, as placas foram lavadas por 2 vezes com PBS-T. Adicionou-se 0,1 ml das amostras das 10 soluções recodificadas diluídas em PBS-T+BSA a 1% nas seguintes proporções: 1:2; 1:4; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1024; 1:2048 e 1:4096. Paralelamente, foram realizadas, em duplicata, as curvas padrões, em diluições seriadas em PBS-T+BSA a 1%, variando de 250 a 0,25 ng/ml. Foram utilizados extratos de ácaros com concentrações conhecidas, obtidos da Universidade da Virgínia, EUA : Der p 1 (UVA 93/03) e Grupo 2 (UVA 92/02). O extrato UVA 93/03 contém 2500 ng/ml de Der p 1 foi subpadronizado contra a referência de *D. pteronyssinus* da WHO/IUIS (NIBSC 82/518) que contém 12,5 µg/ml de Der p 1. O extrato UVA 92/02 contém 2500 µg/ml de Der p 2 foi subpadronizado contra a preparação de referência CBER/FDA E1-Dp, que contém 50 µg/ml de Der p 2.

Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas por 5 vezes com PBS-T e adicionou-se 0,1 ml dos anticorpos monoclonais biotinizados: anti-Der p 1 (4C1) na diluição 1:1000 ou anti-Der p 2 (7A1) na diluição de 1:3000 em PBS-T +BSA a 1%. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente.

Em seguida, os poços foram lavados cinco vezes com PBS-T e realizada incubação por 30 minutos com 0.1 ml de estreptavidina-Peroxidase (SIGMA S5512), reconstituída em 1 ml de água destilada) a 1:1000 em PBS-T+BSA a 1%.

Após cinco lavagens com PBS-T, adicionou-se 0,1 ml do substrato enzimático consistindo de solução ABTS a 1mM em Tampão Citrato-Fosfato 70 mM, pH 4,2 e contendo 0,03 % de H₂O₂ , para desenvolver o experimento. A leitura foi realizada quando a absorbância do topo da curva controle alcançou 2,0-2,4 em leitor de microplacas (E-MAX, MOLECULAR DEVICES CORPORATION, SUNNY VAILE, CA, USA) a 405 nm. A

absorbância obtida é diretamente proporcional à quantidade de alérgenos ligados, e os valores foram obtidos de suas respectivas curvas controle.

A média dos valores de absorbância obtidos dos extratos alergênicos foi determinada em ng/ml e posteriormente expressa em $\mu\text{g/g}$.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no programa estatístico *PRIMER OF BIostatISTICS* e exportados para o *STATISTICA* para confecção dos gráficos.

Foi utilizado o teste paramétrico de análise da variância para comparação entre o diâmetro médio das pápulas registradas por cada centro (*ANOVA*).

Na comparação entre a frequência de positividade dos testes obtida em cada centro foi aplicado o teste não paramétrico de comparação entre duas proporções. Para correlação entre os diâmetros médios das pápulas e eritemas de cada paciente, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

4. 3. NÍVEIS DE ALÉRGENOS INALÁVEIS EM RESIDÊNCIAS DE PACIENTES COM ASMA E/OU RINITE ALÉRGICA EM CURITIBA

CASUÍSTICA

Foram incluídos, de forma aleatória, 51 pacientes com diagnóstico de asma e/ou rinite alérgica, teste cutâneo alérgico prévio positivo para *D pteronyssinus* e antecedentes familiares de doença atópica, acompanhados no ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Os pacientes convidados foram os mesmos 52 primeiros pacientes que participaram da avaliação da potência *in vivo* dos extratos alergênicos excetuando-se um paciente (32), que recusou o convite para esta avaliação.

Após esclarecimento dos objetivos do estudo e consentimento dos pais durante a consulta, foi realizada análise da história clínica do paciente, exame físico, revisão dos exames laboratoriais, especialmente das provas de função pulmonar.

O diagnóstico de asma leve persistente, moderada persistente ou grave persistente, seguiu critérios clínicos de classificação propostos pelo *Global Initiative for Asthma*. Quando disponíveis, foram utilizados valores de função pulmonar para a classificação da gravidade da asma, como recomendado por este consenso.

Um protocolo foi preenchido na consulta, no qual constava o registro de história clínica inicial e evolutiva do paciente, os medicamentos utilizados, história familiar, presença de doenças atópicas associadas à asma (utilizando-se critérios clínicos para o diagnóstico de

dermatite atópica, rinite e conjuntivite alérgica), além dos resultados das provas de função pulmonar e dos testes cutâneos alérgicos de leitura imediata (TCA) (ANEXO 6).

MÉTODOS

TESTES CUTÂNEOS DE HIPERSENSIBILIDADE IMEDIATA

A sensibilização aos alérgenos domiciliares foi avaliada com a realização de testes cutâneos alérgicos de leitura imediata (TCA) utilizando-se puntor descartável (Alko do Brasil) e a mesma bateria de extratos alergênicos. Foram utilizados extratos dos ácaros *D. pteronyssinus* (10000 UA e 5000 UA) da Bayer Corporation e extratos de *B. tropicalis*, cão, gato e barata (*B. germanica*), da IPI-International Pharmaceutical Immunology do Brasil®. Foram registrados, após 15 minutos da puntura, os diâmetros das pápulas e eritemas para cada extrato testado. Foram considerados positivos aqueles com formação de pápula com diâmetro ≥ 3 mm. O controle positivo do teste foi realizado com histamina (10mg/ml) e o controle negativo com soro fisiológico a 0,9% com glicerol a 50%.

Os critérios de inclusão para realização dos testes foram os mesmos utilizados na avaliação da potência *in vivo* dos extratos alergênicos.

DOSAGEM DE IGE SÉRICA TOTAL E ESPECÍFICA *IN VITRO* PARA *DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS*

Procedeu-se a coleta de 7 ml de sangue periférico venoso de cada paciente. As amostras de foram colhidas em tubo seco e, após retração do coágulo, centrifugadas e o soro estocado a -20°C para posterior análise.

Os níveis séricos de IgE total e específica para *D. pteronyssinus* foram determinados por ensaio fluoroenzimático com o “kit” UniCAP (Pharmacia & Upjohn), que utiliza anticorpos IgE monoclonais e policlonais anti IgE humana. O ensaio mede o anticorpo IgE onde o ligante é um anticorpo IgE marcado. A fluorescência dos soros foi medida no equipamento UniCAP 100, sendo proporcional à concentração de anticorpos IgE específicos.

A concentração de anticorpos IgE é expressa em kU/l. Para IgE específica, os resultados são expressos em 6 classes de positividade: 0 (<0,35); 1 (0,35-0,70); 2 (0,7-3,5); 3 (3,5-17,5); 4 (17,5-50); 5 (50-100) e 6 (>100).

COLETA DE POEIRA DOMICILIAR

Localização dos domicílios e visitas domiciliares

Curitiba está localizada na região sul do Brasil, 25°25'48” Latitude Sul, 49°16'15” Longitude Oeste; altitude de 935m. A cidade tem uma população de aproximadamente 1.613.462 habitantes, e possui clima subtropical úmido mesotérmico, com verões frescos (temperatura média inferior a 22° C) e invernos com ocorrências de geadas severas e freqüentes (temperatura média inferior a 18° C), não apresentando estação seca (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, 2000).

Os pacientes, incluídos de forma aleatória, eram habitantes de diferentes bairros da cidade de Curitiba (ANEXO 7). As coletas foram agendadas conforme a disponibilidade de horário dos pais ou responsáveis pelos pacientes, sendo orientado aos mesmos que fossem mantidos inalterados os hábitos familiares, especialmente os de limpeza dos ambientes.

A equipe de investigadores responsável pelas visitas domiciliares incluía o próprio pesquisador e outros três voluntários, alunos do sexto ano do curso de Medicina que realizavam estágio na Disciplina de Alergia do Departamento de Pediatria da UFPR.

Todos os domicílios foram visitados por uma dupla de investigadores que, além da coleta de poeira, eram também responsáveis pelo preenchimento de uma ficha específica com dados sobre a estrutura familiar, condições gerais dos ambientes (características dos materiais do chão e dos móveis, presença de tapetes, carpetes e cortinas, existência de animais domésticos ou baratas), hábitos de limpeza dos mesmos bem como frequência de troca de roupas de cama (ANEXO 8).

As amostras de poeira domiciliar foram coletadas no período de dezembro de 1999 a março de 2000.

Técnica e protocolo de coleta das amostras de poeira domiciliar

Utilizou-se um aspirador de pó portátil (ELECTROLUX COMPACT PLUS), ao qual era acoplado um adaptador junto ao sifão de sucção (HEYMAN, CHAPMAN, PLATTS-MILLS, 1986). Entre as duas partes do adaptador eram acondicionados retalhos de tecido de algodão (aproximadamente 15 cm²), cuja função era reter o material aspirado. Após a coleta em cada local dos domicílios, o adaptador era retirado e cada retalho, contendo a amostra de poeira, era cuidadosamente amarrado com uma liga de borracha e colocado em envelope plástico identificado com uma etiqueta adesiva. O material era posteriormente armazenado a 4°C para que fosse mantido o estado físico normal dos ácaros e ao mesmo tempo houvesse a redução da taxa normal de metabolismo, impedindo sua proliferação.

As amostras de poeira foram colhidas em quatro locais de cada residência: cama, chão do quarto, sala de TV e cozinha. Da cama foram aspiradas inicialmente as roupas de cama (lençóis, fronhas e cobertores), com posterior remoção das mesmas e aspiração direta dos travesseiros e colchões. Do quarto foram aspirados intensamente tapetes e carpetes, sendo incluídas áreas dos pés da cama e atrás da porta; realizou-se a coleta de uma área de um metro

quadrado durante dois minutos do chão do quarto. Da sala de TV foram coletadas amostras de todos os sofás, incluindo almofadas, tapetes e o chão (área de um metro quadrado durante dois minutos). Da cozinha foi coletada poeira dos armários (retirando-se o conteúdo dos mesmos), ao redor da lixeira, do fogão e do refrigerador; bancadas, embaixo da pia e do chão (área de um metro quadrado durante dois minutos).

Preparo das amostras de poeira domiciliar

No Laboratório do Departamento de Pediatria do Hospital de Clínicas da UFPR as amostras de poeira foram peneiradas através de uma malha com 0,3 mm de diâmetro (STANDARD SIEVE SERIES A.S.T.M., EUA) com intuito de remover fibras e partículas grandes. O material resultante da passagem pela peneira era depositado numa placa de Petri, sendo transferido a potes plásticos estéreis e armazenados em refrigerador, a 4°C.

Após o preparo de todas as amostras coletadas as mesmas foram levadas à Ribeirão Preto-SP, mantendo-se as mesmas condições de temperatura.

As etapas seguintes foram realizadas pelo pesquisador e pela equipe do Laboratório de Alergia e Biologia Molecular do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Inicialmente determinou-se o peso de cada amostra coletada. Frações alergênicas foram então extraídas de 100 mg de poeira de cada amostra com 2 ml de PBS-T (Solução Salina Tamponada com Fosfato, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20). Nas amostras abaixo de 50 mg foi adicionado 1 ml e nas amostras entre 50 e 100 mg foi adicionado proporcionalmente a quantia necessária. Em seguida, as amostras foram ressuspensas utilizando agitador (DAIGGER VORTEX – GENIE 2) e agitadas em um rotator orbital (GLAS COL) por 18 horas a 4°C. Subseqüentemente, as amostras foram centrifugadas a

2500 rpm, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml) foi removido com auxílio de um pipeta de Pasteur e acondicionado a -20°C, em tubo devidamente identificado, para posterior análise do conteúdo alergênico.

Determinação dos alérgenos nas amostras de poeira

- Quantificação de alérgenos de *Dermatophagoides* ssp. (Der p 1, Der f 1 e Grupo 2).

Alérgenos de *Dermatophagoides* ssp. foram determinados através de ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo “sandwich”, descrito por LUCZYNSKA et al. (1989).

Cada poço da placa de microtitulação de poliestireno (IMMUNOLON II DYNATECH, ALEXANDRIA, VA, Cat. # 011-010-3450) foi sensibilizado com 1 µg dos respectivos anticorpos monoclonais: anti-Der p 1 (5H8), anti-Der f 1 (6A8) e anti-Der p 2 ou Der f 2 (1D8 - como o ensaio do Grupo 2 possui reatividade cruzada, pode ser usado o mesmo anticorpo, tanto para a detecção de Der p 2 como de Der f 2.) em Tampão Carbonato-Bicarbonato, 50 mM, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T (solução tampão fosfato salino, pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente com 0,1 ml de PBS-T com BSA (Albumina de soro bovino, SIGMA A7030) a 1%.

Novamente, as placas foram lavadas por 2 vezes com PBS-T. Adicionou-se 0,1 ml de amostras de poeira dos diferentes locais do domicílio diluídos em PBS-T+BSA a 1% nas seguintes diluições: 1:5; 1:25 e 1:125. Paralelamente, foram realizadas, em duplicata, as curvas padrões para cada alérgeno testado, em diluições seriadas em PBS-T+BSA a 1%, variando de 250 a 0,25 ng/ml. A quantificação dos ensaios é dependente do uso de extratos de ácaros com concentrações conhecidas, obtidos da Universidade da Virgínia, EUA e cujas

referências são as seguintes: Der p 1 (UVA 93/03), Der f 1 (UVA 93/02) e Grupo 2 (UVA 92/02).

Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas por 5 vezes com PBS-T e adicionou-se 0,1 ml dos anticorpos monoclonais biotinizados: anti-Der p 1 e anti-Der f 1 (4C1) na diluição 1:1000 ou anti-Der p 2 (7A1) na diluição de 1:3000 em PBS-T +BSA a 1%. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente.

Em seguida, foram realizadas cinco lavagens com PBS-T e incubação com 0,1 ml de Estreptavidina-Peroxidase (SIGMA S5512, reconstituída em 1 ml de água destilada) a 1:1000 em PBS-T+BSA a 1%, durante 30 minutos.

Após cinco lavagens com PBS-T adicionou-se 0,1 ml do substrato enzimático consistindo de solução ABTS a 1mM em Tampão Citrato-Fosfato 70 mM, pH 4,2 e contendo 0,03 % de H₂O₂. A leitura foi realizada, quando a absorbância do topo da curva controle alcançou 2,0-2,4, em leitor de microplacas (E-MAX, MOLECULAR DEVICES CORPORATION, SUNNY VAILE, CA, USA) a 405 nm. A absorbância obtida é diretamente proporcional à quantidade de alérgenos ligados, e os valores são obtidos de suas respectivas curvas controle. A reação poderia ser interrompida adicionando-se 0,1 ml de Azida Sódica 2 mM.

A média dos valores de absorbância obtidos dos extratos de poeira foi determinada em ng/ml e posteriormente expressa em µg/g de poeira. Os extratos de poeira que apresentaram valores de absorbância extrapolados acima da curva dos respectivos alérgenos, foram repetidos, porém em diluições maiores (1:25, 1:125, 1:625).

- Quantificação do Alérgeno de *Blattella germanica* (Bla g 1).

Alérgenos de *Blattella germanica* foram determinados através de ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo “sandwich” (POLLART, SMITH & MORRIS et al., 1991; POLLART, MULLINS & VAILES et al.; 1991).

Sensibilizou-se cada poço da placa de microtitulação de poliestireno com 1 µg do anticorpo monoclonal: anti-Bla g 1 (10A6) em Tampão Carbonato-Bicarbonato, 50 mM, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C.

A seguir, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente com 0,1 ml de PBS-T + BSA a 1%.

Novamente as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T. Adicionou-se 0,1 ml de amostras de poeira dos diferentes locais do domicílio diluídos em PBS-T+BSA a 1% nas seguintes proporções: 1:2; 1:8 e 1:32. Diluições duplicadas em série do extrato são utilizadas para gerar a curva de 5U/ml decrescendo para um valor de 0,01 U/mL. As curvas-controle foram estabelecidas utilizando o extrato de *Blattella germanica* (UVA 93/04), que contém 45 Unidades/ml de Bla g 1, e foi diluída 1:9 para se obter 5U/ml de Bla g 1.

Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas por 5 vezes com PBS-T e adicionou-se 0,1 ml de anticorpo de coelho anti-barata em cada poço da placa. A solução contendo o anticorpo foi diluída 1:200 em PBS-T+BSA a 1%.

Após uma hora de incubação em temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS-T. Adicionou-se, a cada poço, 0,1 ml de IgG de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase (BIOSSOURCE INTERNATIONAL, BURLIGAME, CA, CAT #4520). Diluiu-se 1:1000 em PBS-T+BSA. Incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente.

Após cinco lavagens com PBS-T, adicionou-se 0,1 ml do substrato enzimático consistindo de solução ABTS a 1mM em Tampão Citrato-Fosfato 70 mM, pH 4,2 e contendo 0,03 % de H₂O₂. A leitura ($\lambda=405$ nm) foi realizada, quando a absorbância do topo da curva controle alcançou 2,0-2,4, em leitor de microplacas. A reação poderia ser interrompida adicionando-se 0,1 ml de Azida Sódica 2 mM.

A média dos valores de absorbância obtidos dos extratos de poeira foi determinada em ng/ml e posteriormente expressa em $\mu\text{g/g}$ de poeira.

- Quantificação de Alérgeno de *Canis familiaris* (Can f 1).

O alérgeno Can f 1 foi determinado através de ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo "sandwich" (SCHOU et al. 1992).

Placas de microtitulação foram sensibilizadas (0,1 ml/poço) com 1 μg do anticorpo monoclonal anti-Can f 1 (6E9) em Tampão Carbonato-Bicarbonato, 50 mM, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C.

Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente com 0,1 ml de PBS-T + BSA a 1%.

As placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T. Foi adicionado 0,1 ml de amostras de poeira dos diferentes locais do domicílio diluídos em PBS-T+BSA a 1% nas seguintes proporções: 1:2; 1:8 e 1:32. Para estabelecer uma curva padrão foram feitas diluições seriadas de 1000 UI/ml a 1 UI/ml em duplicata. Utilizou-se a referência de epitélio de cachorro ("dog dander") da WHO/IUIS conforme a Preparação de Referência Internacional (NIBSC código 84/685), que contém 10.000 Unidades Internacionais/ml.

Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas por 5 vezes com PBS-T e adicionou-se 0,1 ml de anticorpo de coelho anti-cachorro em cada poço

da placa. A solução contendo o anticorpo foi diluída 1:16000 em PBS-T+BSA a 1%. Incubar por 1 hora à temperatura ambiente.

As placas foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS-T. Adicionou-se, a cada poço, 0,1 ml de IgG de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase (diluição 1:1000 em PBS-T+BSA). Em seguida, incubou-se por 1 hora à temperatura ambiente.

Após cinco lavagens das placas com PBS-T adicionou-se 0,1 ml do substrato enzimático consistindo de solução ABTS a 1mM em Tampão Citrato-Fosfato 70 mM, pH 4,2 e contendo 0,03 % de H₂O₂. A leitura das placas foi feita quando a absorbância do topo da curva controle atingiu um valor acima de 2, em leitor de microplacas num comprimento de onda de 405 nm. A absorbância obtida é diretamente proporcional à quantidade de Can f 1 ligado e os valores são obtidos da sua curva controle. Cada Unidade Internacional (UI) equivale aproximadamente a 1ng de proteína Can f 1. A reação pode ser parada adicionando 0,1 ml de Azida Sódica 2 mM.

A média dos valores de absorbância obtidos dos extratos de poeira foi determinada em UI/ml e posteriormente expressa em µg/g de poeira.

- Quantificação de Alérgeno de *Felis domesticus* (Fel d 1).

O alérgeno Fel d 1 foi determinado, através de ensaio imunoenzimático, conforme descrito por CHAPMAN, AALBERSE, BRAUN et al. (1988).

As placas de microtitulação foram sensibilizadas (0,1ml/poço) com 1 µg do anticorpo monoclonal anti-Fel d 1 (6F9) em Tampão Carbonato-Bicarbonato, 50 mM, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C.

Em seguida, as placas foram lavadas por 2 vezes com PBS-T e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente com 0,1 ml de PBS-T + BSA a 1%.

Após o bloqueio as placas foram lavadas novamente, por 2 vezes, com PBS-T e adicionou-se 0,1 ml dos extratos de poeira dos diferentes locais do domicílio diluídos em PBS-T+BSA a 1% nas seguintes proporções: 1:2; 1:8 e 1:32. Estabeleceu-se a curva padrão diluindo-se, em duplicata, o extrato de Fel d 1 (UVA 94/01) em PBS-T+BSA a 1%. Esta referência contém 1,6 Unidades/ml de Fel d 1 e é diluído 1:80 para fazer a primeira diluição da curva controle, de 20 mU/ml a 0,02 mU/ml. Incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente.

Após cinco lavagens dos poços com PBS-T foi adicionado 0,1 ml de uma diluição 1:1000 do anticorpo monoclonal biotinilado 3E4 em PBS-T+BSA a 1%.

Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas por 5 vezes com PBS-T. Incubou-se por 30 minutos com 0,1 ml de Estreptavidina-Peroxidase a 1:1000 em PBS-T+BSA a 1%.

Após cinco lavagens com PBS-T, adicionou-se 0,1 ml do substrato enzimático que consiste numa de solução ABTS a 1mM em Tampão Citrato-Fosfato 70 mM, pH 4,2 e contendo 0,03 % de H₂O₂. Foi realizada uma leitura quando a absorbância do topo da curva controle alcançou 2,0-2,4, em leitor de microplacas, a 405 nm. A reação poderia ser interrompida adicionando-se 0,1 ml de Azida Sódica 2 mM.

A referência UVA 94/01 foi subpadronizada da referência de epitélio de gato CBER, E5, a qual contém 9,7 U/ml de Fel d 1 (1 unidade = 4 µg de proteína). Os valores de Fel d 1 foram obtidos da parte linear da curva controle.

A média dos valores de absorbância obtidos dos extratos de poeira foi obtida em mUg/ml e posteriormente expressa em µg/g de poeira.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no programa estatístico PRIMER OF BIOSTATISTICS e exportados para o ORIGIN 5.0 para confecção dos gráficos.

Como os níveis de alérgenos tiveram ampla variação os dados foram *log* transformados. Na comparação entre os níveis de cada local do domicílio foi utilizado o teste paramétrico de análise da variância (*ANOVA*).

Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação dos níveis de alérgenos entre os locais dos domicílios em que havia ou não animais domésticos.

O coeficiente de correlação de Pearson foi aplicado para detectar possíveis relações entre os níveis séricos de IgE total e específica ao *Dp*, reatividade cutânea e níveis de exposição domiciliar ao Der p 1. Este coeficiente foi também utilizado para correlação entre os níveis de alérgenos de ácaros do grupo 1 e 2.

Resultados



5.1. AVALIAÇÃO DO PUNTOR PARA TESTE CUTÂNEO ALÉRGICO

RESULTADOS

A tabela 1 resume os dados coletados no estudo em relação às variáveis observadas.

TABELA 1 – RESULTADOS DOS TESTES CUTÂNEOS REALIZADOS
COM AGULHA E PUNTOR

	Média ± DP (mm)	Mínimo-Máximo (mm)	Coefficiente de variação
AGULHA			
Eritema			
Observador 1	28,6 ± 6,8	12,5 - 42,5	24,0
Pápula			
Observador 1	5,6 ± 1,2	4,0 - 9,0	21,9
PUNTOR			
Eritema			
Observador 1	30,8 ± 8,3	15,5 - 53,0	27,1
Observador 2	26,4 ± 7,4	10,0 - 42,5	27,9
Observador 3	32,4 ± 8,8	10,0 - 57,5	27,3
Pápula			
Observador 1	5,8 ± 1,1	3,5 - 9,0	18,3
Observador 2	6,2 ± 1,4	3,5 - 10,0	22,0
Observador 3	6,2 ± 1,0	4,0 - 8,5	16,0

Foi verificado pela análise da variância não haver diferença entre os resultados dos testes realizados pelo mesmo pesquisador com dois instrumentos diferentes (agulha ou puntor) em relação ao eritema ($p=0,153$) e à Pápula ($p=0,573$).

Com a mesma técnica aplicada por observadores diferentes havia diferença significativa na medida do eritema ($p < 0,0001$). Constatou-se que o pesquisador 2 registrou valores de eritema inferiores ($p < 0,0001$) aos demais pesquisadores

Em relação à pápula havia diferença significativa ($p = 0,046$) nos resultados dos testes cutâneos entre os observadores. Tal diferença foi proveniente dos dados registrados pelo pesquisador 1, que aferiu valores um pouco menores aos registrados pelos outros dois pesquisadores (TABELA 2).

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES CUTÂNEOS

	Resultado do teste	Teste aplicado	Valor tabelado	Significância
AGULHA x PUNTOR				
(Um Observador)				
• Eritema	2,08	<i>One Way</i>	$p = 0,153$	NS
• Pápula	0,32	<i>One Way</i>	$p = 0,573$	NS
PUNTOR (Três Observadores)				
• Eritema	17,54	<i>Repeated Measures</i>	$p < 0,0001$	S
• Pápula	3,17	<i>Repeated Measures</i>	$p = 0,046$	S

NOTA: Utilizado o teste paramétrico da Análise da Variância, através do *software* "Primer of Biostatistics".

5.2. AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE EXTRATOS CUTÂNEOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

QUANTIDADE ALERGÊNICA DOS EXTRATOS *IN VITRO*

Após a realização dos testes cutâneos por todos os centros envolvidos, recebimento das fichas de registro e análise dos extratos pelo coordenador da pesquisa e análise estatística dos dados foi realizada a decodificação dos frascos, identificando-se portanto as soluções avaliadas *in vivo* e *in vitro*. O conteúdo alergênico das soluções *in vitro*, bem como suas características são descritas a seguir (TABELA 3).

Observamos que na maioria dos extratos avaliados a quantidade dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 foi inferior a 0,002 µg/ml, sendo detectáveis níveis baixos destes alérgenos nos extratos F e G. A maior quantidade de alérgenos foi detectada na solução I.

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS E NÍVEIS DE Der p 1 E Der p 2

cód.	Tipo	Características dos extratos	Concentração final avaliada	Der p 1 (µg/ml)	Der p 2 (µg/ml)
A	Histamina	-	10 mg/ml	<0,002	<0,002
B	<i>D. pteronyssinus</i>	concentrado, dil 1:1, fenol 0,4%	10.000 UBT/ml	<0,002	<0,002
C	<i>D. pteronyssinus</i>	concentrado aquoso, dil. 1:1	800 URC	<0,002	<0,002
D	“inalantes”	Vacina tipo inalante puro A1-pré, 3ª série (60% poeira domiciliar, 20% inalantes de origem vegetal, 10% fungos secundários, 10% inalantes de origem animal)	2000 PNU/ml	<0,002	<0,002
E	<i>D. pteronyssinus</i>		860 UBE/ml	<0,002	<0,002
F	<i>D. pteronyssinus</i>	concentrado	100.000 PNU/ml	0,017	<0,002
G	<i>D. pteronyssinus</i>	Leti-aquoso	10 HEP/ml	0,133	0,582
H	manutenção (tipo M)) <i>D. pteronyssinus</i>	precipitado em gel de AIOH	2000 PNU/ml	<0,002	<0,002
I	<i>D. pteronyssinus</i>	50% glicerina, 30.000 AU/ml	10.000 AU/ml	68,33	31,73
J	Glicerina	-	50%	<0,002	<0,002

* Extratos concentrados não disponíveis: optou-se pela aquisição dos extratos comercializados com maior quantidade de alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*
 PNU: Protein Nitrogen Unit; UBE: Unidade Biológica Equivalente; HEP: Histamine Equivalent Potency
 AU: Allergic units; URC: Unidade de Reatividade Cutânea, método de padronização de extratos criado pelo departamento científico da empresa em 1982.

AValiação dos Extratos *IN VIVO*

Foram recebidos os resultados dos testes cutâneos de leitura imediata realizados em 250 pacientes. O teste cutâneo foi considerado positivo quando a média dos diâmetros das pápulas foi igual ou superior a 3 mm.

Foram excluídos da análise oito pacientes que apresentaram média dos diâmetros das pápulas inferiores a 3 mm para a solução de histamina 10 mg/ml (controle positivo) ou testes

Foram excluídos da análise oito pacientes que apresentaram média dos diâmetros das pápulas inferiores a 3 mm para a solução de histamina 10 mg/ml (controle positivo) ou testes positivos para a solução de glicerina 50% (controle negativo). Foi excluído ainda um paciente do grupo de não atópicos que teve teste cutâneo positivo a algum dos extratos alergênicos testados.

Assim, foram analisados os dados de 210 pacientes atópicos e 31 pacientes não atópicos.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

Os pacientes atópicos incluídos na análise tinham idade entre 7 e 63 anos, com média de 19,3 anos. Destes, 96 (46%) eram do sexo masculino e 114 (54%) do sexo feminino. A maioria dos pacientes tinha diagnóstico de asma e rinite alérgica (67%), enquanto 26% possuíam somente rinite alérgica e 7% somente asma.

Os pacientes não atópicos tinham idade entre 11 e 72 anos, com média de 26,9 anos. Destes, 18 (58 %) eram do sexo masculino e 13 (42%) do sexo feminino.

REATIVIDADE CUTÂNEA

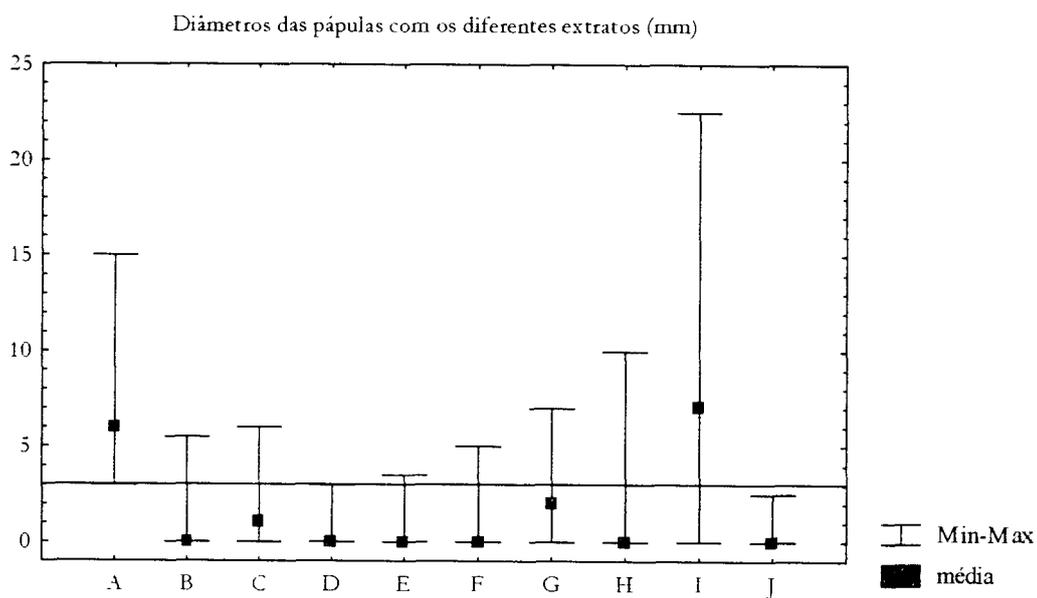
Os 31 pacientes não atópicos incluídos na análise apresentaram reatividade cutânea à solução de histamina semelhante aos pacientes atópicos (média $6,26 \pm 1,69$ mm, com variação de 2,5 a 10 mm). Estes pacientes não apresentaram reações cutâneas às outras soluções testadas.

Os pacientes atópicos apresentaram médias dos diâmetros médios das pápulas inferiores a 2 mm com todos os extratos testados, exceto à solução de histamina e ao extrato I (TABELA 4).

TABELA 4 -DIÂMETROS DAS PÁPULAS (mm) PRODUZIDAS
PELOS DIFERENTES EXTRATOS (n=210)

soluções	média	mediana	desvio padrão	limites	quartil inferior	quartil superior
A (Histamina)	6,51	6	1,86	3-15	5	7,5
B	0,63	0	1,14	0-5,5	0	1
C	1,45	1	1,48	0-6	0	2,5
D	0,36	0	0,75	0-3	0	0
E	0,43	0	0,82	0-3,5	0	1
F	0,90	0	1,31	0-5	0	2
G	1,95	2	1,72	0-7	0	3
H	0,62	0	1,26	0-10	0	1
I	7,10	7	3,19	0-22,5	5	8,5
J (Sol. salina glicerina 50%)	0,22	0	0,49	0-2	0	0

GRÁFICO 1



Houve correlação entre os diâmetros das pápulas e eritemas (ANEXO 9). Utilizamos a pápula como representativa da sensibilidade cutânea por ser mais precisa a medida dos diâmetros. O teste foi considerado positivo quando houve a formação de pápula com diâmetro médio igual ou superior a 3 mm.

Analisamos a positividade dos pacientes atópicos ao teste cutâneo com todas as soluções. Reações cutâneas intensas, com formação de pseudópodos, ocorreram com as soluções de histamina (A) e com o extrato I e em casos isolados com os extratos C e G. (TABELA 5).

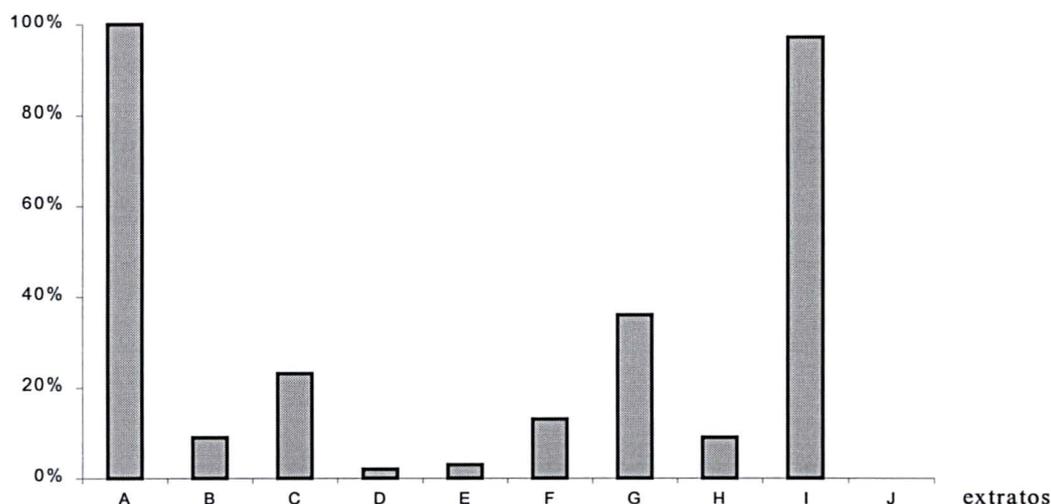
TABELA 5 –FREQUÊNCIA DE TESTES CUTÂNEOS POSITIVOS PARA CADA EXTRATO TESTADO (n=210)*

soluções	testes positivos n (%) [*]	reações intensas n (%) [#]
A - histamina	210 (100)	15 (7,1)
B	18 (8,6)	0
C	48 (22,8)	1 (0,5)
D	4 (1,9)	0
E	7 (3,3)	0
F	28 (13,3)	0
G	76 (36,2)	3 (1,4)
H	19 (9,0)	0
I	204 (97,1)	73 (34,8)
J - sol. salina glicerina 50%	0 (0)	0

* teste positivo: diâmetro médio das pápulas igual ou superior a 3mm

presença de pseudópodos

GRÁFICO 2 -FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE AO TESTE CUTÂNEO COM OS DIFERENTES EXTRATOS



Ao analisarmos a quantidade alergênica dos extratos e a reatividade cutânea, observamos uma freqüente reatividade cutânea aos extratos C (22,5%) e G (36%), que continham baixa concentração dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 de acordo com os resultados *in vitro*.

Aplicamos a análise da variância (teste paramétrico da análise da variância, ANOVA) com o objetivo de detectar diferenças nos resultados dos testes (média das pápulas) entre cada centro participante do estudo.

Não houve diferenças significativas entre as médias registradas nos diferentes centros com os extratos B ($p=0,139$), F ($p=0,197$) e I ($p=0,162$). Constatou-se que o observador 2 (EPM) registrou valores superiores aos demais observadores com os extratos: C ($p=0,008$), D ($p<0,001$), E ($p<0,0001$) e H ($p=0,003$). Ainda em relação ao extrato C, o observador 1 (UFPR) encontrou valores superiores em relação aos demais observadores

($p < 0,001$). O observador 3, por sua vez, apresentou valores superiores aos demais nos extratos A ($p = 0,008$) e G (0,040) (ANEXO 10).

Com relação a positividade dos testes C e G, observamos que houve grande variabilidade entre os observadores (TABELA 6)

TABELA 6 – FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE AOS TESTES CUTÂNEOS COM OS EXTRATOS C e G

observadores	extrato C	extrato G
1 (UFPR)	19/77 (24,7%)	26/77 (33,8%)
2 (EPM)	9/48 (18,8%)	11/48 (22,9%)
3 (USP)	15/44 (34,1%)	27/44 (61,4%)
4 (HSP)	5/41 (12,2%)	12/41 (29,3%)
Total	48/210 (22,8%)	76/210 (36,2%)

Com a utilização do teste não paramétrico de comparação entre duas proporções, observamos que o dados do observador 3 (USP) foram os responsáveis pela alta frequência de positividade dos testes com o extrato G. Com relação ao extrato C, foram detectadas diferenças significativas exclusivamente entre as frequências de positividade ao teste entre o observador 3 (USP) e 4 (HSP) (ANEXO 10).

5.3. NÍVEIS DE ALÉRGENOS INALÁVEIS EM RESIDÊNCIAS DE PACIENTES COM ASMA E/OU RINITE ALÉRGICA EM CURITIBA

CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Os pacientes incluídos neste estudo tinham idade entre 7 e 23 anos, com média de $11,4 \pm 3,0$ anos e mediana de 11 anos, sendo 29 (56,9%) do sexo masculino e 22 (43,1 %) do sexo feminino.

Todos os pacientes tinham antecedentes familiares de doenças atópicas e teste cutâneo anterior positivo ao *Dermatophagoides pteronyssinus*. A maioria dos pacientes (74,5%) tinha diagnóstico de asma persistente e rinite alérgica. Somente rinite alérgica estava presente em 8 (15,7%) dos pacientes; 5 (9,8%) tinham exclusivamente asma persistente.

Em relação à gravidade, 39,5% dos pacientes receberam o diagnóstico de asma leve persistente, 53,5% asma moderada persistente e 7 % asma grave persistente.

NÍVEIS DE IGE TOTAL E ESPECÍFICA E REATIVIDADE CUTÂNEA

Os pacientes apresentaram níveis médios elevados de IgE total e específica para o *Dermatophagoides pteronyssinus* (TABELA 7). Destes, 21/ 51 (41,2%) apresentaram níveis de IgE específica superiores a 100 kU/l (classe 6) (ANEXO 11).

TABELA 7 - NÍVEIS DE IgE TOTAL E IgE ESPECÍFICA PARA *D. PTERONYSSINUS*

	IgE total (kU/l)	IgE específica (kU/l)
média geométrica	630,4	40,2
mediana	695	75,3
limites	56 - 4298	1,6 - >100

Todos os pacientes apresentaram testes cutâneos positivos ao *D. pteronyssinus*, sendo ainda observada uma alta frequência de sensibilização a *Blomia tropicalis*. Todos os pacientes apresentaram testes cutâneos positivos à solução de histamina com ausência de reações cutâneas ao controle negativo. A frequência de sensibilização aos outros alérgenos foi menor que aos ácaros da poeira domiciliar (TABELA 8).

TABELA 8 - REATIVIDADE CUTÂNEA AOS EXTRATOS (n=51)

Extrato	Positividade	Reação com pseudópodos
	n (%)	n (%)
Dp 10000 AU*	51 (100)	20 (39)
Dp 5000 AU*	51 (100)	21 (41)
<i>Blomia tropicalis</i> ■ 37650 UBE / mL	46 (90,2)	19 (37)
<i>Canis familiaris</i> ■ 10000 PNU / mL	9 (17,6)	1 (2)
<i>Felis domesticus</i> ■ 94500 UBE / mL	7 (13,7)	0
<i>Blatella germanica</i> ■ 5000 PNU / mL	8 (15,7)	0

* Bayer Co. USA

■ IPI - ASAC

CARACTERÍSTICAS DOS DOMICÍLIOS E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DURANTE O PERÍODO DE COLETA

Foram coletadas amostras dos domicílios de 51 pacientes com doença atópica que faziam acompanhamento no ambulatório de Alergia e Imunologia Pediátrica do Hospital de Clínicas, totalizando 46 domicílios visitados (42 casas e 4 apartamentos).

Em cinco residências havia dois indivíduos alérgicos (irmãos), sendo coletadas uma amostra da sala de TV, uma da cozinha, uma amostra do quarto de cada paciente e uma da respectiva cama. Em duas casas os pacientes coabitavam o mesmo quarto, do qual foi colhida uma única amostra. Desta forma, foram coletas 51 amostras de camas, 49 amostras de quartos, 46 amostras de salas de TV e 46 amostras de cozinha. Durante o preparo das amostras foi extraviada uma amostra proveniente da cozinha (paciente A12), sendo portanto analisadas 45 amostras colhidas deste local.

Considerando-se as características mais freqüentes foi possível delinear um perfil dos domicílios visitados e seus respectivos locais de coleta de poeira (TABELA 9). A maioria das casas (80,4%) tinha quatro ou cinco moradores, com uma renda mensal familiar (71,7%) de 3 a 10 salários mínimos. Animais domésticos estavam presentes em 76,1% das casas, quase exclusivamente cães.

Os quartos eram habitados, em sua maioria, somente pelo paciente ou mais um indivíduo da família (77,5%). Embora os pisos de madeira fossem predominantes, havia carpetes e tapetes em cerca de 15% dos quartos. Foi descrita a troca semanal das roupas de cama e alternância dos lados do colchão em grande número das casas, sendo menos freqüente o hábito de expor os colchões ao sol.

Nas salas de TV, os sofás eram de tecido em aproximadamente metade das residências; objetos em que ocorre acúmulo de poeira foram freqüentemente encontrados, tais

como almofadas (39,1%), tapetes (37%), carpetes (19,6%) e cortinas (76,1%). Não foram observadas baratas nas cozinhas durante os procedimentos de coleta de poeira. No entanto, a presença destas foi informada pelas famílias em 30,4% das casas. Havia capa protetora para o colchão em apenas uma cama e nenhuma das famílias referiu-se ao uso de acaricidas nos ambientes.

TABELA 9 - CARACTERÍSTICAS DOS DOMICÍLIOS VISITADOS (n=46)
E DOS RESPECTIVOS LOCAIS DE COLETA DE POEIRA

Variável	n (%)
Número de moradores	
3	8 (17,4)
4	21 (45,6)
5	16 (34,8)
6	1 (2,2)
Renda familiar	
até 3 SM	8 (17,4)
3 a 5 SM	19 (41,3)
5 a 10 SM	14 (30,4)
> 10 SM	5 (10,9)
Presença de animais	
cachorro	34 (73,9)
gato	4 (8,7)
outros animais	6 (13)
Tabagismo	23 (50)
Instrumentos de limpeza	
pano úmido	46 (100)
aspirador de pó	4 (8,7)
vassoura	44 (95,6)
<i>Camas (n=51)</i>	
almofadas	10 (19,6)
bichos de pelúcia	8 (15,7)
Troca de roupas de cama (frequência/mês)	
≥ 4	44 (86,3)
< 4	7 (13,7)
exposição de colchões ao sol	33 (64,7)
alternância de lados do colchão	38 (74,5)

<i>Quartos (n=49)</i>		
Número de pessoas		
	1	22 (44,9)
	2	16 (32,6)
	≥3	11 (22,5)
pisos		
	carpete	7 (14,3)
	madeira	32 (65,3)
	cerâmico	7 (14,3)
tapetes		8 (16,3)
cortinas		35 (76,1)
<i>Salas de TV (n=46)</i>		
Presença de:		
Sofás		
	tecido	26 (56,5)
	outro material	20 (43,5)
almofadas		18 (39,1)
tapetes		17 (37,0)
carpetes		9 (19,6)
cortina		35 (76,1)
<i>Cozinhas(n= 46)</i>		
Observação de baratas		14 (30,4)

No período de coleta das amostras de poeira (dezembro de 1999 a março de 2000) Curitiba apresentou as seguintes médias climáticas: precipitação de 145 mm, temperatura média 20°C (mínima 16°C – máxima 27°C) e umidade de 85 % (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2000).

NÍVEIS DOS ALÉRGENOS DO GRUPO 1 (Der p 1 e Der f 1)

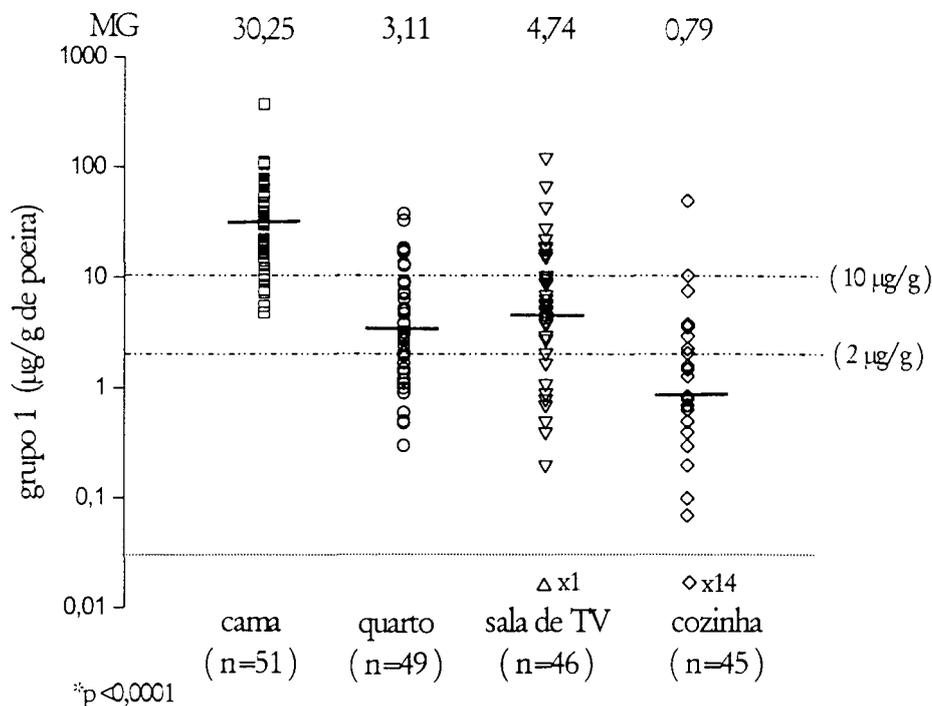
Foram avaliados os níveis de alérgenos do Grupo 1 (Der p 1 e Der f 1) de 191 amostras coletadas na cama (51), no piso do quarto (49), na sala de TV (46) e na cozinha (45). Os níveis detectáveis variaram de 0,7 a 375 µg/g de poeira (Der p 1) e de 0,2 a 24,2 µg/g de poeira (Der f 1).

Os níveis de Der p 1 não foram detectáveis apenas em 15 (7,8%) amostras (1 amostra de sala de TV e 14 amostras de cozinha). Os níveis de Der f 1, por sua vez, não foram detectáveis em 131 (68,6%) amostras (22 amostras de cama, 35 amostras de quarto, 34 amostras de sala de TV e 40 amostras de cozinha).

Foram observados baixos níveis de exposição ao alérgeno de *Dermatophagoides farinae* nas amostras em que o mesmo foi detectável, com variação de 0,2 µg/g a 24,2 µg/g de poeira. A média geométrica dos níveis de alérgenos de Der f 1 foi maior nas amostras da cama (MG = 0,64 µg/g), seguida pelas amostras da sala (MG = 0,42 µg/g), quarto (MG= 0,27 µg/g) e cozinha (MG= 0,20µg/g).

Os níveis detectáveis dos alérgenos do grupo 1 de *Dermatophagoides ssp.* variaram de 2,9 µg/g a 375 µg/g de poeira. Níveis de alérgenos do grupo 1 não foram detectáveis em 14 (7,3%) amostras (1 amostra de sala de TV e 13 amostras de cozinha). Os níveis de alérgenos do grupo 1 foram significativamente maiores ($p < 0,0001$) nas amostras de cama (MG = 30,25 µg/g), seguida pelas amostras de sala (MG = 4,74 µg/g), quarto (MG= 3,11µg/g) e cozinha (MG= 0,79 µg/g) (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 - NÍVEIS DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS (GRUPO 1)



Em apenas 7,3% (14/191) das amostras os níveis de Der f 1 foram superiores a 2 µg/g, sendo superiores a 10µg/g exclusivamente em 2 amostras de poeira de cama.

TABELA 10 - NÍVEIS DE ALÉRGENOS DO GRUPO 1 > 2 µg/g e > 10 µg/g NOS LOCAIS DE COLETA

	cama n (%)	quarto n (%)	sala de TV n (%)	cozinha n (%)
> 2 µg/g	51/51 (100%)	33/49 (67,3%)	35/46 (76,1%)	8/45 (7,8%)
> 10 µg/g	46/51 (90,2%)	8/49 (16,3%)	13/46 (28,3%)	2/45 (4,4%)

Níveis de sensibilização aos alérgenos do grupo 1 foram encontrados em mais da metade das amostras de cada local do domicílio, com exceção das amostras de cozinha. Nas amostras de cama todos os níveis foram superiores a 2 µg/g, tendo sido observada ainda alta frequência de níveis superiores a 10 µg/g de poeira (TABELA 10).

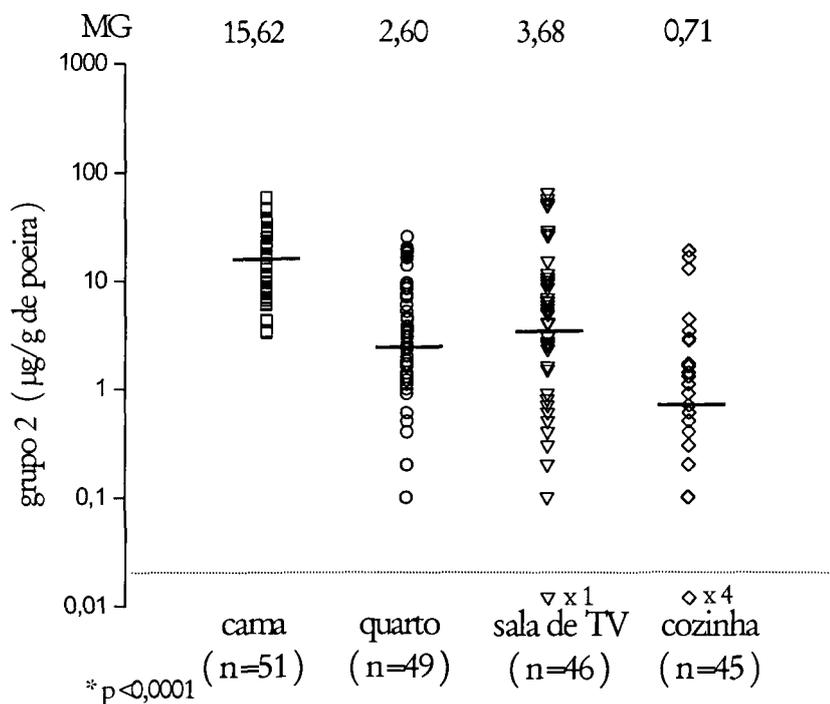
As médias geométricas dos maiores níveis de alérgenos por domicílio para o Der p 1, Der f 1 e grupo 1, foram respectivamente: 28,1 ; 0,63 e 30,2 µg/g de poeira.

NÍVEIS DE ALÉRGENOS DO GRUPO 2

Os níveis de alérgenos do Grupo 2 de *Dermatophagoides ssp.* foram avaliados nas 191 amostras de poeira, sendo detectáveis em 186 (97,4%) destas, com variação de 0,1 µg/g a 65 µg/g de poeira. A ordem de frequência dos locais do domicílio com maior concentração de alérgenos foi semelhante para o grupo 1 e 2 dos alérgenos de *Dermatophagoides ssp.* Os níveis deste alérgeno foram significativamente maiores ($p < 0,0001$) nas amostras de cama (MG =15,62 µg/g;), seguida pelas amostras de poeira de sala (MG=3,68 µg/g), quarto (MG=2,60) e cozinha (MG=0,71) (GRÁFICO 4).

A média geométrica dos maiores níveis de alérgenos do grupo 2 encontrados em cada domicílio foi de 18,7 µg/g de poeira, semelhante à média geométrica dos valores encontrados nas amostras de cama.

GRÁFICO 4 - NÍVEIS DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS (GRUPO 2)

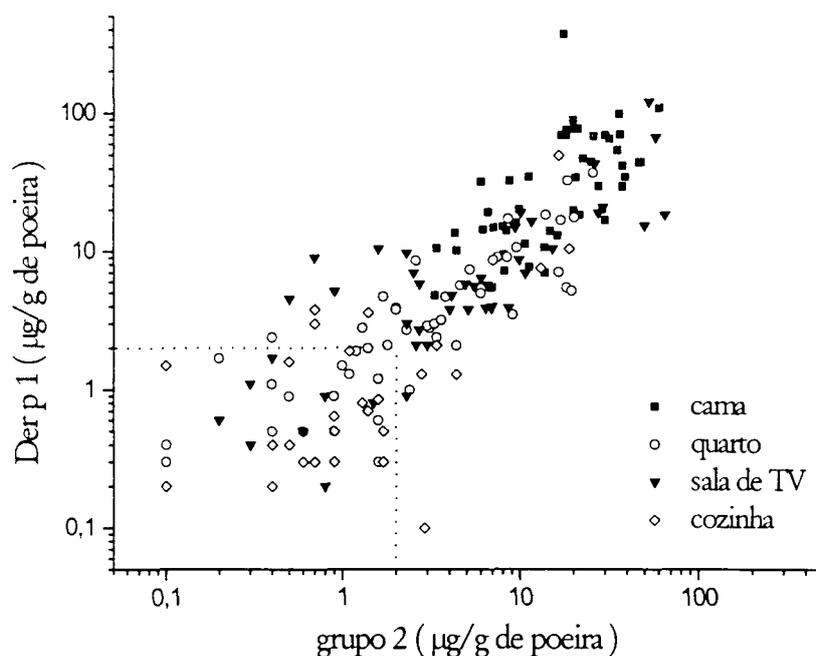


A frequência dos níveis de alérgenos do grupo 2 superiores a 2 µg/g (sensibilização) e 10 µg/g (desencadeamento de sintomas) foram semelhantes aos níveis do grupo 1 (TABELA 11). Houve excelente correlação entre os níveis de Der p 1 e alérgenos do grupo 2 ($r = 0,65$, $p < 0,001$) (GRÁFICO 5).

TABELA 11: NÍVEIS DE ALÉRGENOS DO GRUPO 2 > 2 µg/g e > 10 µg/g NOS LOCAIS DE COLETA

	cama n (%)	quarto n (%)	sala de TV n (%)	cozinha n (%)
> 2 µg/g	51/51 (100%)	29/49 (59,2%)	32/46 (69,6%)	7/45 (15,5%)
> 10 µg/g	35/51 (68,6%)	8/49 (16,3%)	11/46 (23,9%)	3/45 (6,7%)

GRÁFICO 5 - NÍVEIS DOS ALÉRGENOS Der p 1 E GRUPO 2

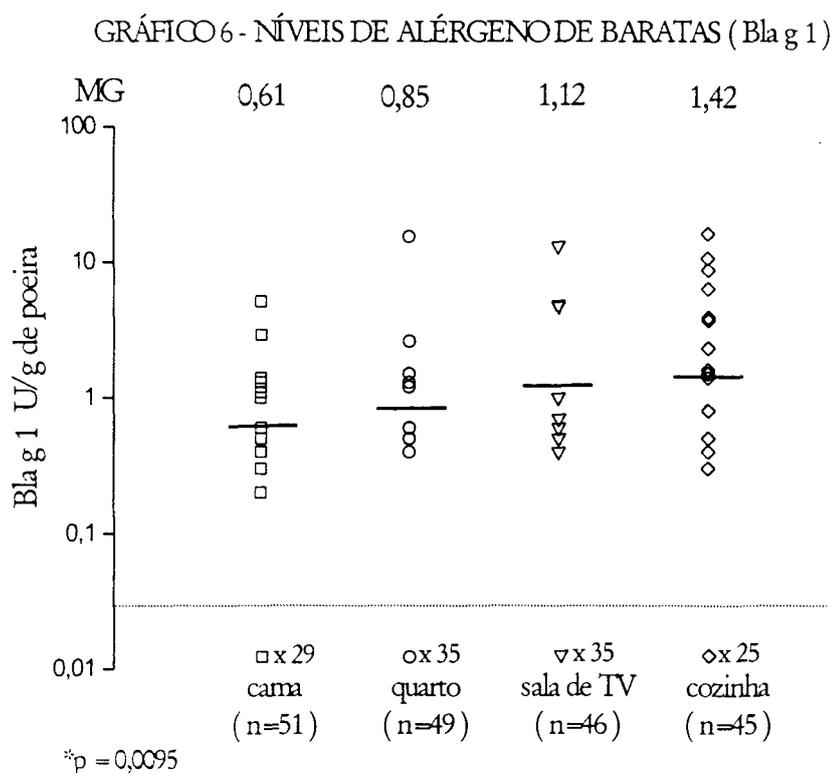


NÍVEIS DE ALÉRGENO DE BARATA (BLA G 1)

Os níveis de Bla g 1 foram avaliados nas 191 amostras. Foram detectáveis em 67 (35,1%) destas e variaram de 0,2 a 15,4 U/g de poeira. Em 124 (64,9%) amostras os níveis de Bla g 1 não foram detectáveis.

Em 20 (44,5%) amostras de cozinha havia níveis detectáveis deste alérgeno, sendo este encontrado com frequência semelhante nas amostras de cama (43,1%). Nos outros locais de coleta a frequência foi menor: 14 (28,6%) amostras de quarto e 11 (23,9%) amostras de salas de TV.

Os níveis encontrados nas amostras de cozinha (MG= 1,42 $\mu\text{g/g}$), embora mais elevados, não foram significativamente diferentes que os observados em outros locais dos domicílios ($p=0,095$) (GRÁFICO 6).



Foi avaliada a frequência das amostras de poeira com níveis superiores a 2 U/g e a 8 U/g, níveis respectivamente considerados sensibilizantes e como fator de risco para indivíduos previamente sensibilizados apresentarem sintomas alérgicos (TABELA 12).

TABELA 12 - NÍVEIS DE ALÉRGENO DE BARATA (Bla g 1) ≥ 2 UI/g e ≥ 8 UI/g NOS LOCAIS DE COLETA

	Cama	Quarto	Sala de TV	Cozinha	Pelo menos um local
≥ 2 UI/g	3,9 % (2/51)	4 % (2/49)	6,5 % (3/46)	17,8% (8/45)	21,6% (11/51)
≥ 8 UI/g	0 % (0/51)	2 % (1/49)	2,2 % (1/46)	6,7 % (3/45)	5,9 % (3/51)

Estes níveis foram encontrados com maior frequência nas amostras de cozinha, seguidas pelas amostras de sala de TV, quarto e cama. Com exceção da cozinha, os demais locais do domicílio apresentaram isoladamente frequência muito baixa de detecção destes níveis. Quando considerada para os 51 pacientes a presença destes níveis em pelo menos um dos locais coletados, foi observada uma frequência de exposição a níveis de sensibilização e risco para desencadeamento de sintomas de 21,6% e 5,9%, respectivamente.

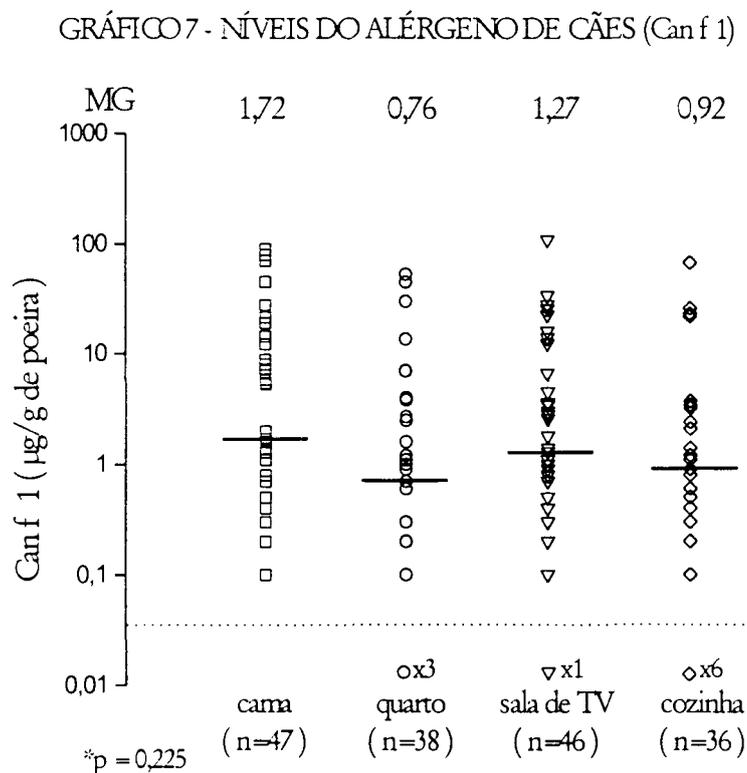
NÍVEIS DE ALÉRGENO DE CÃES (Can f 1)

Foram determinados os níveis de Can f 1 em 167 amostras. Os níveis deste alérgeno foram detectáveis em 67 (35,1%) destas. Em 24 amostras a quantidade de extrato de poeira foi insuficiente para ser realizada a determinação (4 amostras de cama, 11 amostras de quarto e 9 amostras de cozinha).

Os níveis encontrados nos diferentes locais de coleta tiveram variação de 0,1 $\mu\text{g/g}$ a 108,8 $\mu\text{g/g}$ de poeira e foram semelhantes nas amostras de cama (MG= 1,7 $\mu\text{g/g}$) e sala de TV (MG= 1,27 $\mu\text{g/g}$), seguidas pelas amostras de cozinha (MG= 0,92 $\mu\text{g/g}$) e quarto (MG= 0,76 $\mu\text{g/g}$) (GRÁFICO 7).

Não houve diferença significativa entre os níveis deste alérgeno nos diferentes locais de coleta ($p= 0,225$). No entanto, nas casas em que havia a presença do animal os níveis deste alérgeno foram significativamente superiores nas amostras de cama ($p<0,0001$), quarto ($p =$

0,009) e sala de TV ($p=0,001$) em relação aos respectivos níveis em cada local nos domicílios de pacientes que não possuíam cães (TABELA 13).



Nas casas onde havia a presença do animal, níveis de exposição superiores a $1\mu\text{g/g}$ de poeira foram detectados em 70/122 (57,4%) das amostras e níveis superiores a $10\mu\text{g/g}$ de poeira em 20/122 (16,4%) destas. Nas casas onde não havia cães, por sua vez, níveis de exposição superiores a $1\mu\text{g/g}$ de poeira foram detectados em apenas 6/45 (13,3%) das amostras, e níveis superiores a $10\mu\text{g/g}$ de poeira em 1/45 (2,2%) das mesmas.

TABELA 13 - NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO DOS 51 PACIENTES AO ALÉRGENO
Can f 1 ($\mu\text{g/g}$ POEIRA) EM RELAÇÃO A PRESENÇA (n=38)
OU AUSÊNCIA DE CÃES (n=13) NAS RESIDÊNCIAS

		cama	quarto	sala de TV	cozinha
Cão presente	MG	3	1,24	2,07	1,23
	limites	(0,1 – 89,6)	(0,1 – 53,1)	(0,1 – 108,8)	(0,1 – 67,2)
Cão ausente	MG	0,40	0,22	0,28	0,28
	limites	(0,1 – 14,4)	(0,1 – 1,2)	(0,1 – 1,8)	(0,1 – 1,1)

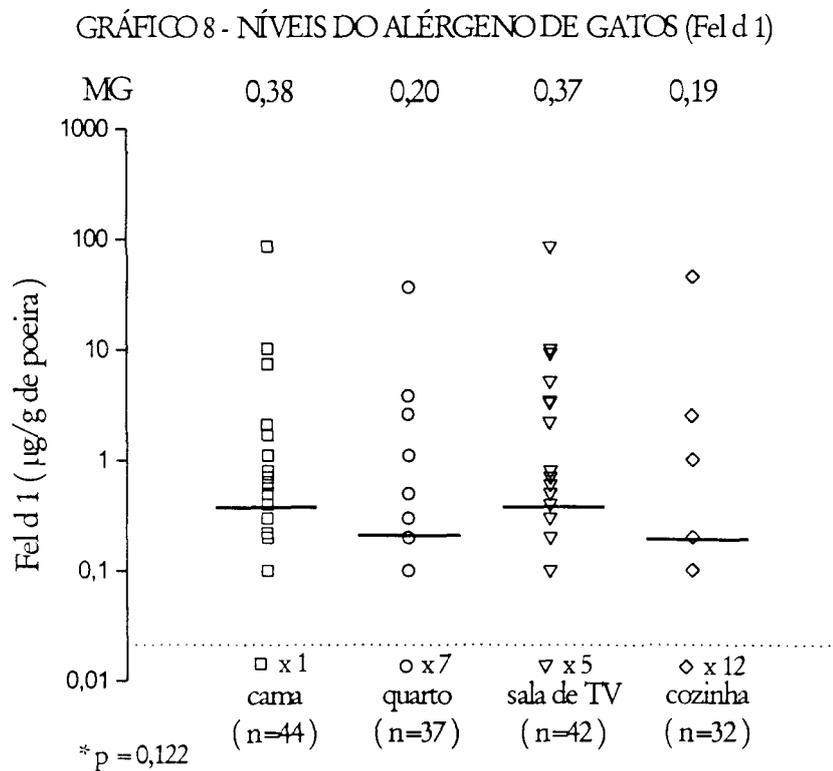
NÍVEIS DE ALÉRGENO DE GATOS (Fel d 1)

Foram determinados os níveis de Fel d 1 em 155 amostras. Os níveis deste alérgeno foram detectáveis em 130 (83,9%) destas, embora fossem mais elevados nas casas que possuíam gatos (TABELA 14). Em 36 amostras a quantidade de extrato de poeira foi insuficiente para ser realizada a determinação (7 amostras de cama, 12 amostras de quarto, 4 amostras de sala de TV e 13 amostras de cozinha).

TABELA 14 - NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO DOS 51 PACIENTES AO ALÉRGENO
Fel d1 ($\mu\text{g/g}$ POEIRA) EM RELAÇÃO A PRESENÇA (n=4)
OU AUSÊNCIA DE GATOS (n=47) NAS RESIDÊNCIAS

		cama	quarto	sala de TV	cozinha
Gato presente	MG	9,18	2,11	14,11	1,64
	limites	(1,1 – 85,7)	(0,1 – 36,1)	(5,1 – 84,5)	(0,1 – 44,5)
Gato ausente	MG	0,27	0,15	0,24	0,13
	limites	(0,1 – 2,1)	(0,1 – 3,8)	(0,1 – 3,4)	(0,1 – 2,5)

Os níveis encontrados nos diferentes locais de coleta tiveram variação de 0,1 $\mu\text{g/g}$ a 85,7 ($\mu\text{g/g}$ de poeira (GRÁFICO 8). A médias geométricas foram muito próximas nas amostras de cama (MG=0,38 $\mu\text{g/g}$ poeira) e sala de TV (MG= 0,37 $\mu\text{g/g}$ poeira), bem como nas amostras do quarto (MG= 0,20 $\mu\text{g/g}$ poeira) e cozinha (MG= 0,19 $\mu\text{g/g}$ poeira). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os níveis deste alérgenos nos diferentes locais de coleta ($p=0,122$).



Das casas que possuíam gatos foram avaliadas 14 amostras. Foram observados níveis $\geq 8 \mu\text{g/g}$ de poeira (considerado nível de sensibilização para este alérgeno) em 7 destas (50%). Todas as casas com presença de gatos possuía ao menos um local com níveis superiores a 8

$\mu\text{g/g}$ de poeira; nas casas sem a presença do animal todos os níveis foram inferiores a este valor, nas 141 amostras avaliadas.

Nas casas em que havia a presença do animal os níveis deste alérgeno foram significativamente superiores nas amostras de cama ($p=0,001$), sala de TV ($p<0,001$) e cozinha ($p=0,048$) em relação aos respectivos níveis em cada local nos domicílios de pacientes que não possuíam gatos.

CORRELAÇÃO ENTRE REATIVIDADE CUTÂNEA, EXPOSIÇÃO A ALÉRGENOS E ANTICORPOS IgE

Os níveis séricos de IgE total estão correlacionados com os níveis de anticorpos IgE específicos ($p<0,0001$), demonstrando que nestes pacientes alérgicos ao *Dermatophagoides pteronyssinus* os níveis de IgE específica contribuem para o estabelecimento da IgE total.

Escolhemos a pápula e não o eritema como representativa da sensibilidade cutânea, por ser mais precisa a medida dos diâmetros, mesmo quando a pele é mais escura. O diâmetro médio das pápulas obtidas com o alérgeno (10000 UA) depende dos níveis séricos de anticorpos IgE específicos ao alérgeno ($p<0,0001$), ou seja, quanto maiores os níveis de anticorpos IgE maior a reação cutânea provocada pelo antígeno (ANEXO 12).

Não houve associação quantitativamente significativa entre os níveis de Der p 1 e os valores de IgE específica ao *Dermatophagoides pteronyssinus*, bem como entre os níveis deste alérgeno no ambiente domiciliar e a reatividade cutânea.

Discussão



6. DISCUSSÃO

O tratamento das doenças alérgicas baseia-se em evitar a exposição ao alérgeno, uso de medicamentos, educação do paciente e na imunoterapia com alérgenos. A imunoterapia, quando adequada, deveria ser usada em combinação a todas as formas de tratamento com o objetivo de tornar o paciente assintomático. Tem sido proposto utilizar a denominação “vacinas de alérgenos” em lugar de extratos alergênicos para indicar que as vacinas modificam a resposta imunológica e fazem parte de um conjunto de outras formas de tratamento disponíveis para as doenças imunológicas e infecciosas (WHO, 1998).

As alterações fisiopatológicas promovidas pela imunoterapia não estão completamente esclarecidas. Estudos recentes, no entanto, sugerem que os efeitos da imunoterapia na produção de anticorpos e eosinofilia tissular, produção de mediadores e recrutamento e ativação de mastócitos é resultado dos seus efeitos sobre os linfócitos T. A imunoterapia induz a produção de IFN- γ e IL-2 por linfócitos do tipo TH1, além de reduzir a reação inflamatória promovida por linfócitos TH2. Desta forma, a imunoterapia altera o equilíbrio entre linfócitos TH2 e TH1, favorecendo as respostas celulares do tipo TH1 (CRETICOS, 2000).

Estudos de metanálise demonstram que pacientes asmáticos submetidos à imunoterapia, em relação aos pacientes tratados com placebo, apresentam melhora dos sintomas, redução do uso de medicamentos regulares e diminuição da hiperreatividade brônquica. Como a maioria dos estudos incluídos não foram realizados com antígenos padronizados, os resultados obtidos com a imunoterapia são provavelmente melhores que os atualmente observados (ALVAREZ-CUESTA & GONZÉLES-MANCEBO, 2000).

A eficácia clínica da imunoterapia depende da correta seleção dos pacientes, utilização de protocolos de tratamento eficazes e utilização de extratos alergênicos padronizados.

CHAPMAN comparou a quantidade de alérgenos principais em extratos de ácaros para testes cutâneos comercializados nos Estados Unidos e demonstrou a variabilidade no conteúdo de alérgenos em diferentes extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (CHAPMAN, 1991).

Outro estudo submeteu dez extratos de ácaros à análise por quatro laboratórios e demonstrou que os extratos variam não somente em relação ao conteúdo alergênico, mas também na distribuição dos alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2 (FORD, RAWLE, LIND et al, 1985).

A importância desta última constatação é que alguns pacientes podem ser predominantemente alérgicos ao Der p 2, já que estes dois alérgenos não apresentam reatividade cruzada. A quantidade de cada extrato utilizado para imunoterapia deveria, portanto, ser calculada em função da quantidade de alérgeno específico ao qual o paciente é predominantemente sensibilizado.

Recentemente foram quantificados os níveis de Der p 1 em 28 extratos de *D. pteronyssinus* disponíveis no comércio americano para imunoterapia. Este estudo demonstrou grande variabilidade na quantidade de alérgenos dos extratos (68 a 385 µg/ml), com níveis médios de 172 ± 74 µg/ml de Der p 1 (NELSON, 2000).

Em nosso estudo todos os extratos apresentaram quantidades indetectáveis ou muito baixas dos alérgenos Der p 1 e Der p 2. Somente no extrato I o nível de Der p 1 estava dentro dos limites encontrados por este último autor.

Estudos clínicos têm demonstrado a eficácia da imunoterapia com doses de manutenção de 7 a 12 μg de Der p 1. Extratos com baixas concentrações de alérgenos comprometem a eficácia da imunoterapia no tratamento das doenças alérgicas. (EWAN, ALEXANDER, SNAPE et al, 1998; HAUGAARD, DAHL & JACOBSEN, 1993; OLSEN, LARSEN, JACOBSEN et al, 1998).

Consensos internacionais recomendam que as doses de manutenção devem conter 5 a 20 μg do alérgeno principal por injeção, pelos resultados satisfatórios obtidos com estes níveis em estudos controlados (AAAI POSITION STATEMENT, 1997; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Algumas considerações sobre as características dos extratos avaliados são relevantes. Havia diferenças na padronização das unidades alergênicas, revelando a grande variabilidade entre os mesmos. Como nem todas as empresas possuíam extratos aquosos, foram analisadas também vacinas de depósito ou modificadas. A modificação de vacinas pode ocasionar alterações, ainda pouco conhecidas, na estrutura molecular dos alérgenos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

Em segundo lugar, as informações obtidas são restritas aos lotes de extratos que foram testados. Os componentes dos extratos alergênicos dependem de vários fatores, que incluem a fonte do material, a natureza e tempo dos processos de extração, o armazenamento e a manipulação de produtos intermediários, podendo ainda ser influenciada pela purificação e outros processos industriais (DREBORG, 1993).

Uma terceira consideração diz respeito à utilização de um único método para detecção da quantidade alergênica *in vitro*. Outros métodos de quantificação alergênica *in vitro* podem auxiliar na caracterização do perfil imunoquímico dos extratos e confirmar os resultados obtidos.

Embora as considerações anteriores sejam relevantes, os resultados deste estudo indicam que os extratos alergênicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* comercialmente disponíveis no Brasil para imunoterapia não apresentam níveis dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 que alcancem as doses de manutenção internacionalmente recomendadas.

A técnica mais utilizada para a verificação *in vivo* da potência de um extrato alergênico são os testes cutâneos de leitura imediata. Entre as várias técnicas de testes cutâneos, optou-se pela puntura em virtude da segurança, rapidez e facilidade de execução, menor desconforto para o paciente além da possibilidade de utilização de extratos glicerinados (MALLING, 1993).

As diluições foram cuidadosamente preparadas em glicerina a 50%. A glicerina é bem tolerada nos locais de teste e não altera a resposta cutânea, além de garantir maior estabilidade aos extratos (BOUSQUET, 1985; VAN METRE, ADKINSON, KAGEY-SOBOTKA et al, 1990).

Estudos sugerem que os testes cutâneos por puntura são melhor realizados e têm maior sensibilidade com a utilização de instrumentos especialmente criados em substituição à agulha (ADINOFF, ROSLONIEC, McCALL et al., 1989).

Comparações entre instrumentos para realização de testes cutâneos, no entanto, têm revelado diferenças significativas entre a reatividade cutânea à solução de histamina ou a extratos alergênicos mesmo quando são utilizados por indivíduos treinados e experientes. (NELSON, LAHR, BUCHMEIER et al, 1998).

Não observamos diferença significativa nos diâmetros das pápulas produzidas pelo puntor descartável e agulha. O puntor utilizado por três observadores diferentes, revelou a variabilidade individual na leitura da reação cutânea imediata à solução de histamina. A medida das pápulas mostrou ser mais confiável do que a medida dos eritemas na avaliação

dos resultados dos testes cutâneos realizados por investigadores diferentes. Estas observações determinaram utilizar a pápula para as análises subseqüentes.

A reatividade cutânea depende basicamente de duas variáveis: concentração do alérgeno no extrato utilizado e da sensibilidade dos indivíduos testados. A técnica utilizada para a realização do teste e os valores que definem sua positividade têm importante influência nos resultados (HAAHTELA, 1993).

Embora tenham sido detectadas diferenças entre as medidas aferidas pelos vários pesquisadores, a reatividade cutânea da maioria dos extratos foi representativa do conteúdo alergênico detectado *in vitro*.

Verificamos discordância entre a alta freqüência de positividade de dois extratos (C e G) e suas quantidades dos alérgenos Der p 1 e Der p 2. Neste caso aplicam-se novamente as considerações sobre a análise de extratos com características diferentes e de um determinado lote. Não foi pesquisada a presença de outras substâncias nos extratos que pudessem promover reações cutâneas inespecíficas. Além disso, poderia haver outros alérgenos, derivados ou não de ácaros, aos quais os pacientes testados eram sensibilizados.

O fator mais provável, no entanto, parece estar relacionado à técnica de realização dos testes ou ao registro das medidas das pápulas, pois um dos centros envolvidos registrou valores significativamente maiores que os demais.

Ocorrem diferenças nos resultados obtidos entre investigadores que utilizam o mesmo método. O diâmetro médio da pápula pode variar significativamente (3,5-7 mm) mesmo quando são utilizados o mesmo método e extrato alergênico para realização do teste cutâneo (BASOMBA, SASTRE & PELAEZ, 1985; DREBORG, 1988).

Em observação para avaliar a variabilidade do teste por puntura com histamina, em que três investigadores diferentes utilizaram o mesmo instrumento para o teste, verificamos diferenças significativas nos diâmetros das pápulas aferidas.

A margem de erro na medida é inversamente relacionada ao diâmetro da pápula. Assim, reações pouco intensas podem ser erroneamente superestimadas. Corroboram para esta afirmação o fato de raramente terem sido observadas reações com pseudópodos, portanto mais intensas, com os extratos em que as discrepâncias nas frequências das reações positivas em relação ao teor de alérgenos no extrato tornaram-se evidentes.

A despeito de todas essas considerações, cabe ressaltar que o extrato (I) apresentou alta frequência de reações positivas condizentes com seu conteúdo alergênico, sem haver diferença significativa entre os resultados aferidos em cada centro participante.

A imunoterapia associada às medidas que evitam a exposição a alérgenos são as únicas modalidades terapêuticas voltadas à etiologia das doenças respiratórias alérgicas. Desta forma, tem sido recomendada a realização de estudos que caracterizem os alérgenos de cada região do país (TAKETOMI, 1999).

Há variabilidade de seis a sete vezes nos níveis de Der p 1 em amostras de poeira domiciliar de diferentes países. Os níveis de alérgenos das camas podem ser utilizados como um índice de exposição aos alérgenos de ácaros (PLATTS-MILLS, VERVLOET, THOMAS et al, 1997).

Os resultados obtidos nos domicílios de Curitiba confirmam que as camas são a principais fontes de alérgenos de ácaros no ambiente domiciliar, especialmente se considerarmos o contato próximo e prolongado dos pacientes nestes locais.

Níveis de alérgenos de ácaros iguais ou superiores a 2 e 10 $\mu\text{g/g}$ de poeira, respectivamente, foram sugeridos como fatores de risco para sensibilização e

desencadeamento de crises de asma (PLATTS-MILLS & DE WECK, 1989; SPORIK, HOLTGATE, PLATTS-MILLS et al, 1990).

Os níveis de sensibilização foram confirmados posteriormente em diversos estudos. Os níveis de 10 µg/g de poeira como desencadeantes de sintomas em pacientes asmáticos, por sua vez, são questionados por muitos autores mas são comumente utilizados como referência em estudos que avaliam a exposição ambiental (ROSE, ARLIAN, BERNSTEIN et al, 1996).

Todos os pacientes avaliados neste estudo eram expostos a níveis considerados de sensibilização para alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, além da maioria possuir em seus domicílios níveis superiores a 10 µg/g de poeira. Dados semelhantes, com níveis médios de alérgenos superiores aos de estudos realizados em outros países, foram observados na cidade de São Paulo e relacionados pelos autores às condições climáticas daquela cidade (umidade relativa anual em torno de 70-80% com temperaturas de 20-25°C) (ARRUDA, RIZZO, CHAPMAN et al, 1991). Durante o período de coleta da poeira, Curitiba apresentou características climáticas semelhantes, favoráveis à proliferação dos ácaros.

Estudos posteriores realizados em São Paulo confirmaram a presença de níveis elevados de exposição aos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, em contraste aos níveis indetectáveis ou muito baixos de Der f 1 (RIZZO, ARRUDA, CHAPMAN et al, 1993; RIZZO, NASPITZ, FERNÁNDEZ-CALDAS et al, 1997).

Os níveis do alérgeno Der f 1 foram indetectáveis ou baixos na maioria das amostras coletadas em Curitiba. Dois domicílios apresentaram níveis superiores a 10 µg/g deste alérgeno, motivando a busca de possíveis fatores ambientais envolvidos a esta exposição. Em um destes domicílios houve a introdução de tapetes usados, adquiridos em leilão, o que nos levou a especular sobre possíveis modificações da fauna acarina, com a aquisição de objetos

contaminados por diferentes espécies de ácaros domiciliares comuns em outras cidades. Obviamente não é possível estabelecer qualquer relação causal neste fato isolado, porém o mesmo sugere que os níveis de exposição a alérgenos devem ser considerados também sob o aspecto individual.

Embora sejam baixos os níveis de Der f 1, sua detecção sinaliza a presença do *Dermatophagoides farinae* em domicílios de Curitiba. Em um estudo anterior, realizado nesta cidade, raramente foi observada a presença desta espécie de ácaro nas amostras de poeira (ROSÁRIO FILHO, BAGGIO, SUZUKI et al, 1992).

Estudos recentes têm mostrado mudanças nas espécies de ácaros encontradas no Brasil. Em 1997 e 1998, nas cidades de Ribeirão Preto e São Paulo foram observados níveis elevados do alérgeno Der f 1 em uma alta proporção de amostras de poeira domiciliar; análises microscópicas da poeira de 8 camas da cidade de São Paulo mostraram a presença deste ácaro em 6 amostras. Em São Paulo, níveis de Der p 1 maiores que 2 µg/g de foram encontrados em 42% das amostras. (RIZZO, ESTEVES, COSTA et al, 1999 ; COSTA, 1998).

Em Uberlândia, Der f 1 foi encontrado em alta concentração (≥ 10 µg/g) em 78% dos domicílios de asmáticos, enquanto Der p 1 atingiu menor frequência destes níveis (41%). Os níveis de Der f 1 nas amostras de cama foram significativamente maiores que os observados para Der p 1 (SOPELETE, 2000).

Isto indica a necessidade de reavaliação periódica dos alérgenos domiciliares, uma vez que ocorrem mudanças no micro e macroambiente com as conseqüentes modificações na flora e fauna alergênica.

Estes dados sugerem que extratos de *D. farinae* devem ser incluídos para o diagnóstico e tratamento das doenças alérgicas no Brasil. Em Curitiba, este alérgeno pode ser relevante para alguns pacientes e estudos subseqüentes são necessários para avaliar uma

possível mudança da fauna acarina local ou eventualmente flutuações sazonais da população deste ácaro.

Em regiões tropicais e subtropicais os alérgenos de *Blomia tropicalis* causam sensibilização mediada por IgE em pacientes asmáticos. Esta espécie é distinta e tem baixa ou moderada reatividade cruzada com os alérgenos de *D pteronyssinus* (ARRUDA, VAILES, PLATTS-MILLS, 1997). A maioria dos pacientes avaliados apresentava sensibilização a *Blomia tropicalis* e confirmam a importância local deste alérgeno. Estudos subsequentes em Curitiba devem, portanto, incluir a exposição a alérgenos de *Blomia tropicalis*.

O grupo avaliado era constituído por pacientes com doenças respiratórias alérgicas, conhecidamente sensibilizados ao *Dermatophagoides pteronyssinus*. Os testes cutâneos de leitura imediata novamente mostraram a sensibilização destes pacientes expostos a níveis elevados de alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* no ambiente domiciliar, corroborados pelos altos níveis de IgE total e específica.

Uma reação positiva a uma concentração adequada de alérgeno indica a presença de IgE específica à substância testada. Sob condições ideais, os resultados dos testes cutâneos de leitura imediata são comparáveis com a medida *in vitro* dos níveis de anticorpos IgE (ROSÁRIO & VILELA (1997). Neste estudo, confirmando achados anteriores, observamos correlação entre os níveis de IgE específica e o grau de reatividade cutânea.

Foi observado ainda que os níveis de IgE total e específica estão correlacionados, o que sugere a contribuição dos anticorpos específicos para *Dp* aos altos níveis de IgE total.

O grau de exposição ao alérgeno é um dos fatores, mas não o único, que determina variações na concentração de IgE específica. A duração de tempo desta exposição, além do grau e tempo de exposição a diferentes alérgenos, que podem ter reatividade cruzada, idade e uso de imunoterapia influenciam os seus níveis.

Registrou-se menor frequência de sensibilização a outros alérgenos domiciliares (cães, gatos e baratas). Embora a presença de um teste cutâneo positivo não signifique necessariamente que o paciente seja alérgico, outros alérgenos podem ser relevantes na avaliação diagnóstica e planejamento terapêutico (DEMOLY, MICHEL & BOUSQUET, 1998).

Níveis de alérgenos de baratas de 2 e 8 U/g de poeira, são considerados, respectivamente, como níveis de sensibilização e desencadeamento de sintomas. Assim como em Curitiba, outros estudos demonstram que os alérgenos de baratas são encontrados em diversos locais do domicílio, inclusive nas amostras de camas (WOOD, 1998). Embora os maiores níveis deste alérgeno sejam encontrados na cozinha, observou-se que a mais consistente correlação entre os níveis do alérgeno Bla g 1 e a presença de sensibilização ocorre com as amostras de cama (EGGLESTON, ROSENSTREICH, LYNN et al., 1998).

Embora sejam baixos os níveis do alérgeno Bla g 1 encontrados no estudo, níveis de sensibilização são encontrados em uma parcela significativa dos domicílios de Curitiba e são semelhantes aos encontrados em domicílios de pacientes asmáticos de Uberlândia (SOUZA, SOPELETE, MOREIRA et al, 1998).

Observamos que os alérgenos de cães e gatos distribuem-se similarmente em todos os locais do domicílio, além serem detectados independentemente da presença dos animais, como descrito por outros autores (INGRAM, SPORIK, ROSE et al, 1995).

No entanto, a presença de gatos eleva significativamente os níveis de exposição domiciliar, com a detecção de níveis relevantes ($> 8 \mu\text{g/g}$) para este alérgeno. A presença de cães promove também o aumento significativo dos níveis de Can f 1 em relação aos encontrados nas casas onde não havia a presença do animal, condizente com observações de outros autores (GELBER, SELTZER, BOUZOKIS et al., 1993).

As características aerodinâmicas destes aeroalérgenos, transportados em roupas e objetos pessoais, contribuem para a ampla distribuição nos diversos ambientes. Recentemente foi descrita presença de alérgenos de cães e gatos em veículos de transporte público da cidade de Helsinki, na Finlândia, em níveis suficientes para desencadear sintomas em pessoas alérgicas. Dos 324 pacientes alérgicos entrevistados, 53% relatava já ter apresentado sintomas nestes veículos (PARTTI, MARTILLA, MÄKINEN et al, 2000).

Avaliamos em nosso estudo a relação entre os níveis de exposição domiciliar ao Der p 1 e a presença de anticorpos específicos no sangue de pacientes atópicos. Assim como outros autores, não encontramos correlação entre essas variáveis (RIZZO, ARRUDA, CHAPMAN et al, 1993; WICKENS, PEARCE, SIEBERS et al, 1999).

É importante considerar, baseado em medida única, que a exposição a níveis elevados de alérgenos naquele momento não determina o grau de sensibilização, mas reflete um processo que demanda tempo, persistência, além do nível de exposição (EGGLESTON, ROSENSTREICH, LYNN et al., 1998).

A concentração dos alérgenos de ácaros no piso de um único local do domicílio é altamente variável. É possível encontrar níveis indetectáveis em 1 m², enquanto em amostras de outra área níveis extremamente elevados, questionando a prática de avaliar somente 1 m² nesta técnica comumente empregadas para pesquisas (WARNER, 2000).

Existe uma interrelação complexa entre fatores ambientais e predisposição genética que determina a ocorrência de sensibilização e o desenvolvimento de doenças alérgicas. A maioria dos estudos que comparou casas de pacientes asmáticos com as de controles (não asmáticos e não atópicos), por exemplo, demonstraram não haver diferenças significativas nos níveis de exposição a alérgenos (PLATTS-MILLS, SPORIK, WHEATLEY et al, 1995).

A gravidade da asma em crianças e adultos está relacionada aos níveis de exposição alergênica, e os sintomas da asma e da hiperreatividade brônquica melhoram com a diminuição da exposição aos alérgenos (NELSON, 2000).

O nível de exposição alergênica é um fator de risco para a sensibilização em crianças. Estudos têm demonstrado porém que os níveis de sensibilização não são aplicáveis a todos os indivíduos indistintamente e que crianças com risco genético (ex: história familiar de atopia) são suscetíveis mesmo quando expostas a níveis baixos de alérgenos. Se a exposição a alérgenos promove o desenvolvimento da asma de maneira similar à sensibilização atópica é algo ainda a ser esclarecido. Em contraste com os processos imunológicos envolvidos na produção de anticorpos IgE específicos, os mecanismos indutores da asma podem não ser suscetíveis a alterações dos níveis de exposição alergênica (VON MUTIUS, 2000).

O conhecimento dos níveis de alérgenos locais informa sobre sua relevância e traz conseqüências diretas sobre os planos de tratamento, especialmente às medidas que visam a diminuir a exposição ambiental e modificar a resposta imunológica, como a imunoterapia.

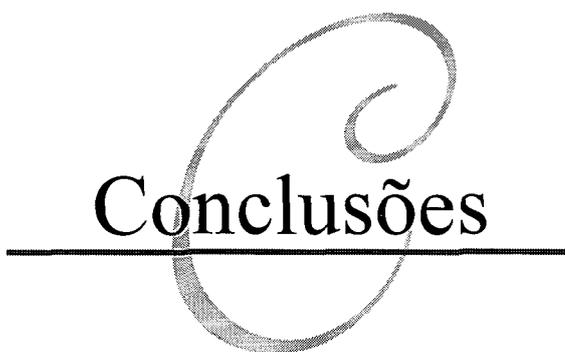
Algumas das limitações à imunoterapia incluem a possibilidade de reações sistêmicas graves, longo tempo para atingir doses de manutenção adequadas, a falta de padronização dos extratos e de um controle de qualidade das vacinas de alérgenos disponíveis, como verificado neste estudo.

A clonagem molecular tornou possível obter, com engenharia genética, variantes sintéticas e hipoalergênicas que ligam-se menos a IgE enquanto mantêm a atividade estimulatória sobre os linfócitos T. Estudos clínicos devem investigar a eficácia e segurança destes derivados de alérgenos ou adjuvantes na imunoterapia.

A eficácia da imunoterapia depende das doses utilizadas, sendo ineficaz quando são empregadas baixas doses. Estudos subseqüentes devem reavaliar o conteúdo de alérgenos principais nos extratos para imunoterapia e motivar a padronização dos mesmos.

Nossa recomendação, quando a dosagem de Der p 1 não é possível para a escolha de extratos com maior potência para imunoterapia, é a realização de teste cutâneo por puntura com o próprio material. As reações produzidas são mais intensas se o extrato é de potência suficiente para tal. Com isto facilita ao clínico obter para o paciente uma vacina eficaz para o seu tratamento.

Conclusões



7. CONCLUSÕES

1- Os resultados dos testes cutâneos por puntura com agulha ou puntor descartável são comparáveis.

2- Há variabilidade individual na leitura da reação cutânea imediata. A medida das pápulas mostrou-se ser mais confiável na avaliação dos resultados dos testes cutâneos. Estas devem ser consideradas em estudos com a realização de testes por investigadores diferentes.

3- A maioria dos extratos de *Dp* comercializados no Brasil não contém alérgenos principais do *Dermatophagoides pteronyssinus* em quantidades suficientes para imunoterapia.

4- A maioria dos extratos alergênicos testados *in vivo* demonstrou pouca reatividade cutânea, concordante com os resultados da análise *in vitro*.

5- Houve alta frequência de positividade do teste cutâneo a alguns extratos testados, atribuível parcialmente à variabilidade dos resultados registrados por diferentes investigadores.

6- Os níveis de IgE total circulante correlacionaram-se com os títulos de anticorpos IgE específicos ao *Dermatophagoides pteronyssinus*

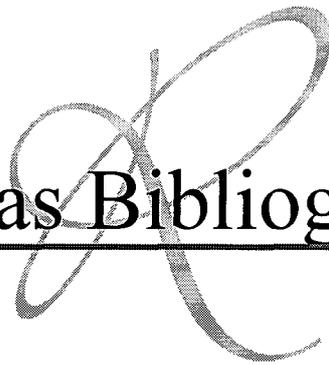
7- É alta a exposição a alérgenos de ácaros, sendo a cama a fonte alergênica principal nos domicílios de pacientes atópicos de Curitiba.

8- De forma geral o *Dermatophagoides farinae* não contribui de maneira relevante aos níveis de alérgenos de ácaros, exceto em alguns domicílios em particular.

9- Níveis de alérgenos de animais domésticos são detectados mesmo sem a presença dos animais nos domicílios, mas são maiores quando há cães ou gatos no local.

10- Níveis de alérgenos de baratas são baixos e predominam nas amostras da cozinha, porém são encontrados em níveis de sensibilização em outros locais do domicílio.

Referências Bibliográficas



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. Antibodies and antigens. In : ____ **Cellular and Molecular Immunology**. WB Saunders, p. 34-64, 1994.

ADINOFF, A. D.; ROSLONIEC, D. M.; McCALL, L. L. et al. A comparison of six epicutaneous devices in the performance of immediate hypersensitivity skin testing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 84, p. 168-174 1989.

ADINOFF, A. D.; ROSLONIEC, D. M.; McCALL, L. L. et al. Immediate skin test reactivity to Food and Drug Administration – approved standardized extracts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 86, p. 766-774, 1990.

ALMQVIST, C.; LARSSON, P. H.; EGMAR, A. C. et al. School as risk environment for children allergic to cats and a site for transfer of cat allergen to homes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, p. 1012-1017, 1999.

ALVAREZ-CUESTA, E.; GONZÉLEZ-MANCEBO, E. Immunotherapy in bronchial asthma. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 6, p. 50-54, 2000.

AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY. Position Statement: the use of standardized allergen extracts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 91, p. 583-586, 1993.

AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY. Position Statement: allergen skin testing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 92, p. 636-637, 1993.

AMERICAN ACADEMY OF ALERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY. Position statement: the use of standardized allergen extracts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 99, n. 5, p. 583-586, 1997.

ARRUDA, L.K., RIZZO, M.C., CHAPMAN, M.D. et al. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clinical Experimental Allergy**, v. 21, p. 433-439, 1991.

ARRUDA, L. K.; VAILES, L. D.; PLATTS-MILLS, T. A. et al. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen *Blo t 5*. **American Journal of Critical Care Medicine**, v. 155, p. 343-350, 1997.

ARRUDA, L.K., FERIANI, V. P. L.; OLIVER, C. et al. *Blomia tropicalis* and cockroaches as important allergens. **Allergy & Clinical Immunology International**, v. 11, p. 167-170, 1999.

- BAENA-CAGNANI, C. E.; PATIÑO, C. M.; NEFFEN, H. E. et al. Mite allergen sensitization and exposure in asthma patients in Latin America. **Allergy & Clinical Immunology International**, v. 11, p. 162-166, 1999.
- BARNES, P. J. Is immunotherapy for asthma worthwhile? **New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 531-532, 1996.
- BARNES, P. J. Pathophysiology of allergic inflammation. In: MIDDLETON, E.; ELLIS, E.F.; YUNGINGER, J.W. et al. **Allergy Principles and Practice**. St. Louis : Mosby-Year Book, p. 356-365, 1998.
- BASOMBA, A.; SASTRE, A.; DE LAEZ, A. Standardization of the prick test: a comparative study of three methods. **Allergy**, v. 40, p. 395-401, 1985.
- BOUSQUET, J.; CALVAYRAC, P.; GUERIN, B. et al. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *In vivo* parameters after a short course of treatment. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 77, p. 734-744, 1985.
- BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; CHANAL, I. et al. Comparison between RAST and Pharmacia CAP System: a new automated specific IgE assay. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 85, p. 1039-1043, 1990.
- BOUSQUET, J. Pathophysiology of skin tests. **Allergy**, v. 18, suppl. 14, p. 450-454, 1993.
- BOUSQUET, J.; MICHEL, F-B. Specific immunotherapy in asthma: Is it effective? the effects of dilution and mixing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 94, p. 1-11, 1996.
- CALL, R. S; SMITH, T. F; CHAPMAN, M. D et al. Risk factors for asthma in inner city children. **Journal Pediatrics**, v. 121, p. 862-866, 1992.
- CARSWELL, Fleming. House dust allergy. **Allergy and Clinical Immunology International**, v. 11, p. 43-47, 1999.
- CHAPMAN, M.D.; AALBERSE, R. C.; BRAUN, M. J. et al. Monoclonal antibodies to the major feline allergen, Fel d 1. Single step affinity purification of Fel d 1, N-terminal sequence analysis and development of a sensitive two-site immunoassay to assess Fel d 1 exposure. **Journal Immunology**, v. 140, p. 812-818, 1988.
- CHAPMAN, M.; ALSHISHTAWI, M. Standardized mite and cat extracts: analysis of major allergens content by monoclonal immunoassay. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 87, p. 178, jan. 1991.

COLLOFF, M. J.; STEWART, G. A. House Dust Mites. In: BARNES, P. J.; LEFF, A. R.; GRUNSTEIN, M. M.; WOOLCOCK, A.J. **Asthma**. New York : Lippincott-Raven, 1997. p. 1089-1103.

II CONSENSO BRASILEIRO NO MANEJO DA ASMA. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, n. 21 (suppl 1), p. 170-276, 1998.

COSTA, L. F. **Exposição domiciliar a alérgenos de ácaros e a endotoxinas em grupos de crianças com asma leve, moderada e grave na cidade de São Paulo**. São Paulo, 1998. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

CRETICOS, P. S. The consideration of immunotherapy in the treatment of allergic asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, p. 559-574, 2000.

DES ROCHES, A.; PARADIS, L.; MENARDO, J.L. et al. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 99, p. 450-453, 1997.

DEMOLY, P.; MICHEL, F. B.; BOUSQUET, J. B. *In vivo* Methods for study of allergy skin tests, techniques, and interpretation. In: MIDDLETON, E.; ELLIS, E.F.; YUNGINGER, J.W. et al. **Allergy Principles and Practice**. St. Louis : Mosby-Year Book, p. 430-439, 1998.

DREBORG, S. Standardization of allergenic preparation by *in vitro* and *in vivo* methods. **Allergy**, v. 48, suplemento, p. 63-70, 1993.

DREBORG, S. The skin prick test: an update. **Allergology and Immunophatology**, v. 35, p. 3-11, 1988.

EGGLESTON, E. A.; ROSENSTREICH, D.; LYNN, H. et al. Relationship of indoor allergen exposure to skin test sensitivity in inner-city children with asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, p. 563-570, 1998.

ESTEVEZ, P.C.; ROSÁRIO, N.A.; ZAVADNIAK, A.F. Prevalence of perennial and seasonal rhinitis in Curitiba, Brazil. **Allergy & Clinical Immunology International**, suplemento 2, p. 138, 2000.

EWAN, P. W.; ALEXANDER, M. M.; SNAPE, C. et al. Effective hyposensitization in allergic rhinitis with a potent partially purified extract of house dust mite. **Clinical Allergy**, v. 18, p. 501-508, 1998.

FERRARI, Flávio Pierette. **Prevalência de asma, rinite alérgica e eczema atópico em escolares de Curitiba**. Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Pediatria) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

FORD, A. W.; RAWLE, F. C.; LIND, P. et al. Standardization of *Dermatophagoides pteronyssinus*: assessment of potency and allergen content in ten coded extracts. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 76, p. 58-67, 1985.

GELBER, L. E.; SELTZER, L. H.; BOUZOUKIS, J. K. et al. Sensitization and exposure to indoor allergens (dust mite, cat, and cockroach) as factors for asthma among patients presenting to hospital. **American Review of Respiratory Disease**, v. 147, p. 573-578, 1993.

GELLER, M. Alergia aos ácaros no Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 71, p. 164-169, 1996.

GERRITSEN, J.; KOETER, G. H.; MONCHY, J. G. R.; KNOL, K. Allergy in subjects with asthma from childhood to adulthood. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Philadelphia, v. 85, p.116-125, 1990.

HAAHTELA, T. Skin tests used for epidemiologic studies. **Allergy**, v. 48, suplemento, p. 76-80, 1993.

HAYDEN, M. L. W. Environmental control and the management of allergic diseases. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 19, p. 83-99, 1999.

HAUGAARD, L.; DAHL, R.; JACOBSEN, L. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite: clinical efficacy and side effects. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Philadelphia, v. 91, p. 621-625, 1993.

HEYMANN, P. W.; CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. Antigen *Der f 1* from the dust mite *Dermatophagoides farinae*: structural comparison with *Der p 1* from *D. pteronyssinus*. **Journal of Immunology**, v. 137, p. 842-847, 1986.

INGRAM, J. M.; SPORIK, R.; ROSE, G. et al. Quantitative assessment of exposure to dog (Can f 1) and cat (Fel d 1) allergens: relationship to sensitization and asthma among children living in Los Alamos – New Mexico. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 96, p. 449-456, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Climatologia. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/cgi-bin/grafmet.pl.cgi>> Acesso em outubro de 2000.

INTERNATIONAL CONSENSUS REPORT ON THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF RHINITIS. **Allergy**, v. 49, p. 5-34, 1994.

IPSEN, H.; LARSEN, J. N.; NIEMEIJER, N. R. et al. Allergenic extracts. In: MIDDLETON, E.; ELLIS, E.F.; YUNGINGER, J.W. et al. **Allergy Principles and Practice**. St. Louis : Mosby-Year Book, 1998. p. 404-416.

LARSEN, J. N.; LOWENSTEIN, H. Allergen nomenclature. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, p. 577-578, 1996.

LUCZYNSKA, C. M.; ARRUDA, L. K.; THOMAS, A. E. et al. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, *Der p 1* and *Der f 1*. **Journal of Immunological Methods**, v. 118, p. 227-235, 1989.

MALLING, H. J. Methods of skin testing. **Allergy**, v. 48, suplemento, p. 55-56, 1993.

MALLOL, J.; CLAYTON, T.; ASHER, I. et al. ISAAC Findings in children Aged 13-14 Years – An Overview. **Allergy & Clinical Immunology International**, v.11, p. 176-182, 1999.

NATIONAL HEART, LUNG AND BLOOD INSTITUTE. **Global Initiative for Asthma**. NIH publication 95-3659. Bethesda, NHLBI, 1995.

NELSON, H. S.; ILKÉ, D.; BUCHMEIER, A. Studies of allergen extract stability: the effects of dilution and mixing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Philadelphia, v. 98, p. 382-388, 1996.

NELSON, H. S.; LAHR, J.; BUCHMEIER, A. et al. Clinical aspects of allergic disease: Evaluation of devices for skin prick testing. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, p. 153-156, 1998.

NELSON, H. S. The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, p. 628-632, 2000.

NELSON, H. S. The use of standardized extracts in allergen immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, p. 41-45, 2000.

OLIVEIRA, C. H.; BINOTTI, R. S.; MUNIZ, J. R. O. et al. Fauna acarina da poeira de colchões na cidade de Campinas – SP. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 22, p. 188-197, 1999.

OLSEN, OT.; LARSEN, K.R.; JACOBSEN, L. et al. A 1-year, placebo-controlled, double-blind house-dust-mite immunotherapy study in asthmatic adults. **Allergy**, v. 52, p. 853-859, 1997.

PARTTI PELLINEN, K.; MARTTILA, O.; MÄKINEN KIILJUNEN, S. et al. Occurrence of dog, cat, and mite allergens in public transport vehicles. **Allergy**, v. 55, p. 65-68, 2000.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; DE WECK, A. L. Report of an international workshop. Dust mite allergens and asthma: A world problem. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 83, p. 416-427, 1989.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; CHAPMAN, M. D.; POLLART, S. M. et al. Allergen standardization. **Toxicology and Industrial Health**, v. 43, p. 197-208, 1990.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; CHAPMAN, M. D. Allergen standardization. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 87, p.621-625, 1991.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; SPORIK, R. B.; WHEATLEY, L. M. et al. Is there a dose-response relationship between exposure to indoor allergens and symptoms of asthma? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 96, p. 435-440, 1995.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W. R.; AALBERSE, R. C.; CHAPMAN, M. D. Indoor allergens and asthma: Report of the Third International Workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 100, part I, p. 2-24, 1997.

PLATTS-MILLS, T. A. E. The role of allergens in allergic airway disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, p. 5364-5366, 1998.

POLLART, S. M.; SMITH, T. F.; MORRIS, E. et al. Environmental exposure to cockroach allergens: analysis with monoclonal antibody-based enzyme immunoassays antibodies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 87, p. 505-510, 1991.

POLLART, S. M.; MULLINS, VAILES, L. D. et al. Identification, quantitation, and purification of cockroach allergens using monoclonal antibodies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 87, p. 511-521, 1991.

RIZZO, M. C.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D. et al. IgG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. **Annals of Allergy**, v. 71, p. 152-158, 1993.

RIZZO, M. C.; NASPITZ, C. K.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E. et al. Endotoxin exposure and symptoms in asthmatic children. **Pediatric Allergy Immunology**, v.8, p. 121-126, 1997.

RIZZO, M. C.; ESTEVES, N.; COSTA, L. F. et al. Changes in house dust mite allergens in Brazil. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 1, p. 526, 1999.

ROSÁRIO FILHO, N. A.; BAGGIO, D.; SUZUKI, M. M. et al. Ácaros na poeira domiciliar em Curitiba. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 15, p. 25, 1992.

ROSÁRIO, N.A.; VILELA, M.M.S. Quantitative skin prick tests and serum IgE antibodies in atopic asthmatics. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 7, p. 40-45, 1997.

ROSÁRIO FILHO, N. A. **Aspectos clínicos e epidemiológicos da asma na criança, em Curitiba**. Curitiba, 1997. Tese (Concurso de Professor Titular do Departamento de Pediatria) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

ROSÁRIO FILHO, N. A.; FARIAS, L.; RIEDI, C. A. et al. Sensibilização a baratas em crianças asmáticas: relação com a gravidade da doença. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 22, p. 151-155, 1999.

ROSE, G.; ARLIAN, L.; BERNSTEIN, D. B. et al. Evaluation of household dust mite exposure and levels of specific IgE and IgG antibodies in asthmatic patients enrolled in a trial of immunotherapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, p. 1071-1078, 1996.

ROSENSTREICH, D. L.; EGGLESTON, P. A.; KATTAN, M. et al. The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 1356-1362, 1997.

SANTOS, A. B. R.; CHAPMAN, M. D.; AALBERSE, R. C. et al. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, p. 329-337, 1999.

SARINHO, E.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; JUST, E. et al. Ácaros da poeira domiciliar em residências de crianças asmáticas e controles da cidade de Recife – Pernambuco. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 19, p. 228-230, 1996.

SARPONG, S.; HAMILTON, R. G.; EGGLESTON, P. A. et al. Socioeconomic status and race as risk factors for cockroach allergen exposure and sensitization in children with asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, p. 1393-1401, 1996.

SCHOU, C.; LIND, P.; FERNANDEZ-CALDAS, E. et al. Identification and purification of an important cross-reactive allergen from American (*Periplaneta americana*) and German (*Blattella germanica*) cockroach. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Philadelphia, v.86, p. 935-946, 1990.

SCHOU, C.; HNASSEN, G.; LINTER, T. et al. Assay for the major dog allergen, Can f 1. Investigation of house dust samples and commercial dog extracts. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 88, p. 847-853, 1992.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. Instituto de Saúde do Paraná - ISEP. Perfil Municípios. Disponível em :
<http://www.saude.pr.gov.br/perfil_municipios/index.htm> Acesso em novembro de 2000.

SELNER, J. C.; SULLIVAN, T. J.; AHLSTEDT, S. et al. Current issues relating to in vitro testing for allergen – specific IgE: a workshop report. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 82, n. 5, p. 407-412, 1999.

SERRAVALLE, K.; MEDEIROS, M. Ácaros da poeira domiciliar da cidade de Salvador – Bahia. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 22, p. 19-24, 1999.

SHEARER, W. T.; FLEISHER, T. A. The immune system. In: MIDDLETON, E.; ELLIS, E.F.; YUNGINGER, J.W. et al. **Allergy Principles and Practice**, Mosby-Year Book, p. 1-27, 1998.

SOPELETE, M.C.; SILVA, D. A. O.; ARRUDA, L. K. et al. *Dermatophagoides farinae* (Der f 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) allergen exposure among subjects living in Uberlândia, Brazil. **International Archives of Allergy and Immunology**, v.122, p. 257-263, 2000.

SOUZA, G. G.; SOPELETE, M. C.; MOREIRA, M. R. et al. Exposição a alérgenos inalantes domiciliares entre pacientes asmáticos de Uberlândia, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 21, p. 148, 1998.

SPORIK, R.; HOLGATE, S. T.; PLATTS-MILLS, T. A. E. et al. Exposure to house-dust mite allergen (Der p 1) and the development of asthma in childhood. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, p. 502-507, 1990.

SQUILLACE, S. P.; SPORIK, R. B.; RAKES, G. et al. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for adolescent asthma: multiple regression analysis of a population-based study. **American Journal of Critical Care Medicine**, v. 156, p. 1760-1764, 1997.

TAKETOMI, E. A. Fauna acarina: A importância do conhecimento da exposição aos ácaros nas diversas cidades brasileiras (editorial). **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 22, p. 170-172, 1999.

THOMAS, W. R.; SMITH W. Allergy Review. Series II. An update on allergens. House dust mite allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.53, p. 821-832, 1998.

VAN METRE Jr., T. E.; ADKINSON Jr., N. F.; KAGEY-SOBOTKA, A. et al. How should we use skin testing to quantify IgE sensitivity? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 86, p. 583-586, 1990.

VAN REE, R.. Standardization of allergen extracts : a mission impossible? **Allergy and Clinical Immunology International**, v. 11, n. 2, p. 55-59, 1999.

VON MUTIUS, E. The environmental predictors of allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, p. 9-19, 2000.

WARNER, J. A.; LITTLE, S.A.; POLLOCK, I. et al. The influence of exposure to house dust mite, cat, pollen, and fungal allergens in the home on primary sensitization in asthma. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 1, p. 79-86, 1991.

WARNER, J. A. Controlling indoor allergens. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 11, p. 208-219, 2000.

WICKENS, K.; PEARCE, N.; SIEBERS, R. et al. Indoor environment, atopy and the risk of asthma in children in New Zealand. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 10, p. 199-208, 1999.

WOOD, R. A, MUDD, K. E.; EGGLESTON, P. A. The distribution of cat and dust mite allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 89, p.126-130, 1992.

WOOD, R. A. The importance of environmental controls in the management of pediatric asthma. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 18, p. 183-197, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Position Paper Allergen Immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. **European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 53, suplemento, 1998.

Anexos

Curitiba, 23 de outubro de 1998.

Ilmo. Sr.
Dr. Nelson Augusto do Rosário Filho
Departamento de Pediatria
Neste

Prezado Senhor:

Comunico-lhe que o **Projeto de Pesquisa** intitulado **"AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE EXTRATOS ALERGÊNICOS COMERCIAIS PARA IMUNOTERAPIA ESPECÍFICA"**, aprovado em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no dia 29 de setembro de 1998.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente



Prof. Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) Você ou seu filho tem tipo de doença denominada de asma ou rinite alérgica e está sendo convidado a participar de um estudo intitulado Avaliação da potência de extratos alergênicos comerciais para imunoterapia específica em pacientes alérgicos ao Dermatophagoides pteronyssinus. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância.

b) O objetivo desta pesquisa é verificar a variabilidade na potência de diferentes extratos comerciais do alérgeno Dermatophagoides pteronyssinus já comercializados e utilizados no Brasil para imunoterapia (vacinas específicas para doenças alérgicas).

c) Caso você participe da pesquisa, será necessário fazer exames (teste cutâneo, coleta de sangue para dosagem de IgE específica) e consulta médica de rotina neste serviço de Alergia.

d) Você (ou seu filho) poderá experimentar pequenos desconfortos, principalmente relacionados a utilização dos puntores para penetração de solução na camada mais superficial da pele, prurido transitório (coceira) após alguns segundos da aplicação, formação de pápulas e eritema (vermelhidão) no local. Os riscos que envolvem a realização de testes cutâneos são reações sistêmicas isoladas (não somente localizadas na pele e não foi aplicada a solução, envolvendo múltiplos órgãos).

e) Para tanto você deverá comparecer neste serviço para consulta médica e realização do teste cutâneo em apenas uma ocasião. Continuará o seu tratamento e acompanhamento regular de acordo com os critérios de seu médico.

f) Contudo os benefícios esperados são: o melhor conhecimento das soluções utilizadas como vacinas para o tratamento de doenças alérgicas no Brasil, além do conhecimento do perfil de reatividade cutânea do paciente testado aos alérgenos (substâncias responsáveis pelo desencadeamento de reações alérgicas na asma e na rinite atópica) do Dermatophagoides pteronyssinus (principal ácaro da poeira doméstica).

g) Os médicos....., são os responsáveis pela pesquisa e poderão ser contatados... (local, hora)....., farão o acompanhamento através de consultas ambulatoriais programadas individualmente para cada paciente, conforme julgamento clínico do responsável, conforme consta no padrão Ético e Vigente no Brasil.

h) A pesquisa não inclui alteração do esquema terapêutico vigente antes de sua realização. Alterações no tratamento poderão ser propostas de acordo com a avaliação clínica do médico responsável, no entanto não fazem parte do protocolo de pesquisa.

i) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.

j) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar o consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de seu atendimento, que está assegurado.

l) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

m) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos, etc...) não são da responsabilidade do paciente.

n) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no próprio hospital ao qual pertence o Serviço de Alergia responsável pela pesquisa.

o) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

p) No dia da realização dos testes cutâneos, você deverá informar ao médico responsável todos os medicamentos que estiver utilizando como tratar a utilização de vacinas ou outras substâncias para o tratamento de sua alergia.

Eu, _____ (ou responsável pelo paciente) li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento com o meu médico. Eu entendi e sei que qualquer problema relacionado a realização dos testes cutâneos será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do paciente

Data

Nome do pesquisador

Data

Identificação:

Idade (anos) :

Sexo: M FDiagnóstico: Asma Rinite Não atópico

ANEXO 3

Solução	Pápula (mm)				Eritema (mm)		
	a	b	$\frac{a+b}{2}$	pseudópodos	a	b	$\frac{a+b}{2}$
A							
B							
C							
D							
E							
F							
G							
H							
I							
J							

Identificação:

Idade (anos) :

Sexo: M FDiagnóstico: Asma Rinite Não atópico

Solução	Pápula (mm)				Eritema (mm)		
	a	b	$\frac{a+b}{2}$	pseudópodos	a	b	$\frac{a+b}{2}$
A							
B							
C							
D							
E							
F							
G							
H							
I							
J							

Identificação:

Idade (anos) :

Sexo: M FDiagnóstico: Asma Rinite Não atópico

Solução	Pápula (mm)				Eritema (mm)		
	a	b	$\frac{a+b}{2}$	pseudópodos	a	b	$\frac{a+b}{2}$
A							
B							
C							
D							
E							
F							
G							
H							
I							
J							

Sumário

Casuística:

- 50 pacientes atópicos, com diagnóstico clínico de doença atópica (asma ou rinite alérgica), história familiar positiva e teste cutâneo anterior positivo para *Dermatophagoides pteronyssinus*.
- 5 indivíduos não atópicos.
- idade superior a 7 anos, de ambos os sexos
- observar critérios de exclusão:
 - Presença de lesões cutâneas em antebraços que comprometam a reatividade cutânea (ex; eczema extenso , dermatografismo)
 - Presença de condições patológicas que interfiram na reatividade cutânea: neoplasias, lesões espinhais ou anomalias de nervos periféricos, neuropatia diabética.
 - História de reação anafilática prévia.
 - Uso de medicamentos: antihistamínicos, cetotifeno, antidepressivos, conforme tempo de supressão da reatividade cutânea:

medicamento	tempo de supressão
astemizol	60 dias
outros antihistamínicos H-1	10 dias
antihistamínicos H-2	24 horas
antidepressivos	14 dias

- imunoterapia específica para *D. pteronyssinus* há mais de três meses e há menos de três anos.

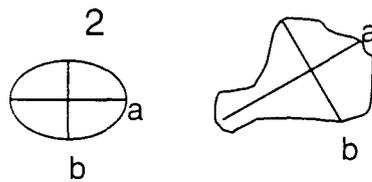
Consentimento:

- Fornecer ao paciente todas as informações sobre a pesquisa, obtendo consentimento do mesmo para sua inclusão.
- O consentimento informado deve ser assinado e datado (2 vias) pelo paciente e pelo pesquisador. No campo **g** deve ser preenchido o nome do médico responsável pela realização do teste cutâneo, bem como o local e horário onde o mesmo possa ser encontrado pelo paciente
- Fornecer uma via do consentimento informado ao paciente.

Teste cutâneo:

- Puntura (prick test) com puntor descartável para cada solução
- Aplicar as soluções A,B,C,D,E no antebraço direito
- Aplicar as soluções F,G,H, I,J no antebraço esquerdo
- distância entre as soluções = 2 cm
- leitura em 15 minutos

- Medida dos diâmetros das pápulas e eritemas, com régua transparente graduada em milímetros: média do maior diâmetro(a) e do maior diâmetro ortogonal a este (b). $a + b$



- observar a presença de pseudópodos
- Anotar **todos os dados solicitados** na ficha de registro.
- **O teste cutâneo deve ser realizado por médico do serviço de Alergia, com material de emergência para o tratamento de reações sistêmicas disponível na sala de exame.**

Contato:

Dr. Alexandro F. Zavadniak
Dr. Nelson A. Rosário Filho (coordenador)

Tel: 0xx(41)360-1800 ramal 6199 (Hospital de Clínicas UFPR)

Fax: 0xx(41)360-1800 ramal 6494 (Hospital de Clínicas UFPR)

celular (Curitiba) (41) 913-3071

e-mail: pediatr@hc.ufpr.br

zavadnia@zaz.com.br

ORIENTAÇÃO PARA REGISTRO DOS DADOS

1. **ID** = Identificação do paciente através de iniciais e número de registro hospitalar (exemplo : FGZ, 1238765)
2. **Idade** = preencher com a idade em anos
3. **Sexo** = preencher com “X” na coluna correspondente (Masculino ou Feminino)
4. **Diagn** = Diagnóstico do paciente
 - A = Asma
 - R = Rinite
 - NA = Não atópico

5. **Pápula** = anotar na coluna correspondente a cada frasco (identificada pela letra correspondente que o rotula) os diâmetros das pápulas:

a = maior diâmetro da pápula,

b = maior diâmetro ortogonal ao primeiro

média do diâmetro das pápulas: $\frac{a + b}{2}$

2

pseudópodos = anotar com um “x” sua presença

Exemplo : maior diâmetro 8 mm

maior diâmetro ortogonal ao primeiro 4 mm

$$\frac{8+4}{2} = 6 \text{ mm}$$

Anotar, portanto o valor 8 na primeira coluna, 4 na segunda e 6 na terceira.

Se houver a presença de pseudópodos, anotar “x” na próxima coluna

6. **Eritema** = anotar na coluna correspondente a cada frasco (identificada pela letra correspondente que o rotula) os diâmetros do eritema de maneira análoga ao diâmetro das pápulas.

Nome _____ Registro _____

Idade _____ sexo _____ M F ANEXO 6

Telefone: _____ Responsável: _____

Ficha de avaliação clínica

1. Idade de início dos sintomas (meses) _____ 2. Tempo de acompanhamento (m) _____

3. Número de internações: _____ 4. Número de pneumonias _____

4. História familiar: ausente primeiro grau segundo grau

5. Diagnóstico inicial: Asma leve moderada grave

6. sintomas

ausentes ≤ 2 vezes/semana >2 vezes/semana mas < 1x/dia diários

7. sintomas noturnos

ausentes ≤ 2 vezes/mês >2 vezes/mês >1 vez/semana

8. crises

ausentes < 1 vez/mês mensais quinzenais semanais

9. Diagnóstico atual: Asma leve moderada grave

10. sintomas

ausentes ≤ 2 vezes/semana >2 vezes/semana mas < 1x/dia diários

11. sintomas noturnos

ausentes ≤ 2 vezes/mês >2 vezes/mês >1 vez/semana

12. crises

ausentes < 1 vez/mês mensais quinzenais semanais

13. Outros diagnósticos: RAP rinite sazonal dermatite atópica

14. Medicação

	Tempo de uso (m)	Dose diária
Cetotifeno		
Teofilina		
Corticóide inalatório		
Corticóide oral regular		
β2 de ação prolongada		
antileucotrieno		

uso regular? sim não

Rinite em atividade? sim não

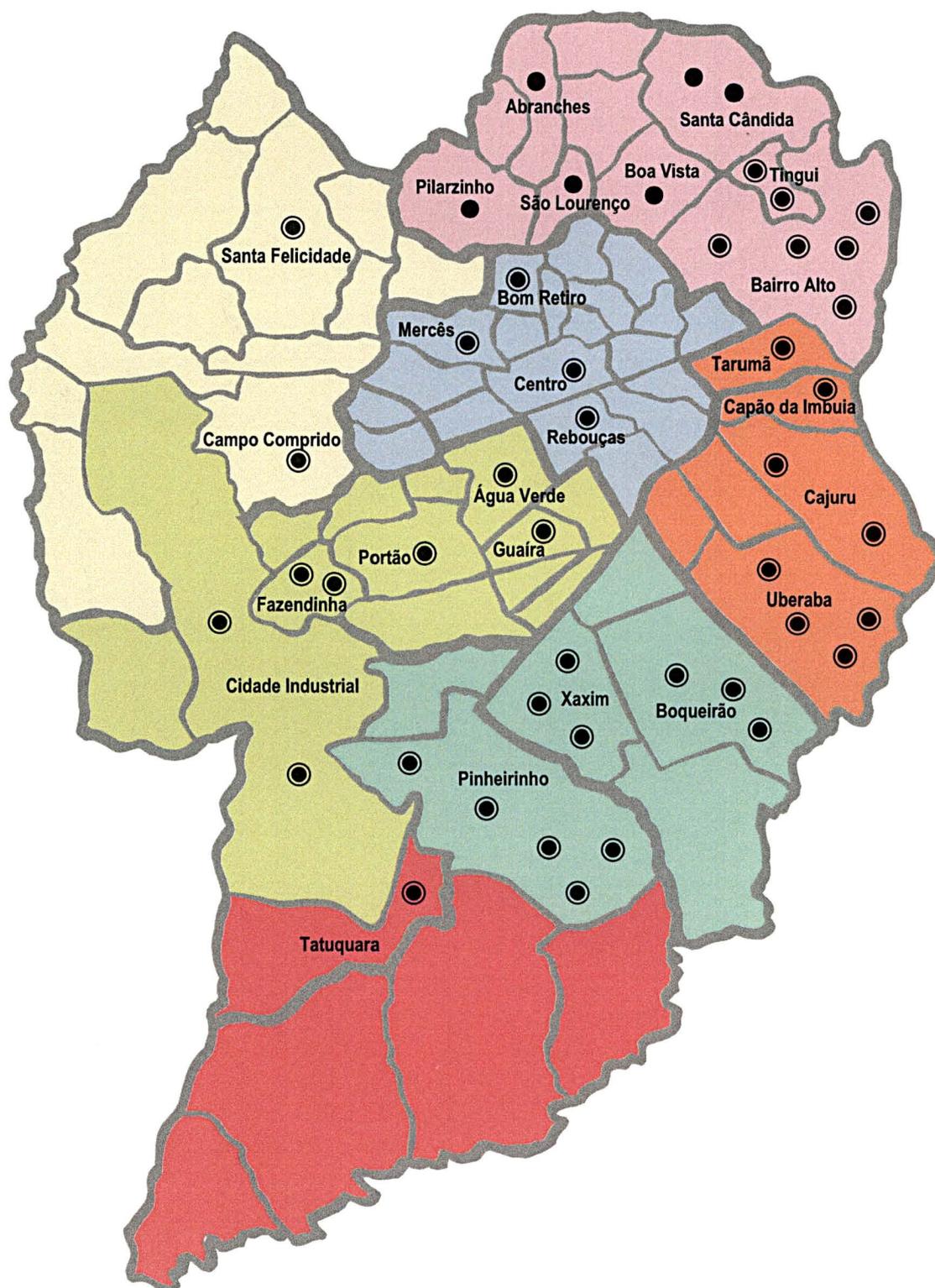
técnica adequada? sim não

Espirometrias

datas		
CVF		
VEF1		
FEV 25-75		
VEF1/CVF		
PFE		
Laudo		

Parasitológico	
Coleta sangue e teste cutâneo	

ANEXO 7 - DISTRIBUIÇÃO DOS DOMICÍLIOS NA CIDADE DE CURITIBA



Nome _____ idade _____
 Endereço: _____ Registro _____
 Telefone: _____ Responsável: _____

Número de moradores no domicílio () 2 () 3 () 4 () 5 () 6 ou +

Número de pessoas no dormitório () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 ou +

Renda domiciliar () até 3 SM
 () 3 a 5 SM
 () 5 a 10 SM

 () > 10 SM

Sala de TV

() Sofá material
 () tecido
 () plástico
 () _____

() almofada
 () tapete
 () carpete
 () cortina
 () outros: _____

Quarto (Paciente)

() tapete
 () carpete
 () cortina
 () piso: _____
 () armário
 () ar condicionado
 () ventilador
 () outros: _____

Cozinha

() Presença de barata
 () por inspeção
 local: _____
 () por informação

Cama

() almofadas
 () bichos de pelúcia
 () outros: _____

Animais

() cachorro
 () gato
 () pássaros
 () outros: _____

Fumantes

() Não
 () Sim () Pai
 () Mãe
 () outros

Limpeza geral

() ótima
 () boa
 () regular

Procedimentos de limpeza

() aspirador de pó
 () pano úmido
 () vassoura

Roupas de cama paciente

Frequência de troca / mês
 () 1 () 2 () 3 () 4
 Expõe colchão ao sol () sim () não
 Alterna lados do colchão () sim () não

TABELA - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r) E SIGNIFICÂNCIA ENTRE O DIÂMETRO DAS PÁPULAS E DOS ERITEMAS

EXTRATOS	CORRELAÇÃO	PROBABILIDADE	SIGNIFICÂNCIA
A	$r = 0,2264$	$p = 0,0031$	S
B	$r = 0,6051$	$p < 0,0001$	S
C	$r = 0,6512$	$p < 0,0001$	S
D	$r = 0,7132$	$p < 0,0001$	S
E	$r = 0,5739$	$p < 0,0001$	S
F	$r = 0,6648$	$p < 0,0001$	S
G	$r = 0,6924$	$p < 0,0001$	S
H	$r = 0,7177$	$p < 0,0001$	S
I	$r = 0,4909$	$p < 0,0001$	S
J	$r = 0,6418$	$p < 0,0001$	S

NOTA: Aplicado o coeficiente de correlação de *Pearson* (*Primer of Biostatistics*).

TABELA - VARIABILIDADE, ENTRE OBSERVADORES, NA LEITURA DE REAÇÃO CUTÂNEA IMEDIATA (DIÂMETRO MÉDIO DAS PÁPULAS)

EXTRATOS	entre 4 observadores			entre 3 observadores			entre 2 observadores		
	resultado do teste	probabilidade	significância	resultado do teste	probabilidade	significância	resultado do teste	probabilidade	significância
A	4,04	p=0,008	S	1,60	p=0,205	NS	-	-	-
B	1,85	p=0,139	NS	-	-	-	-	-	-
C	4,08	p=0,008	S	4,27	p=0,016	S	1,37	p=0,245	NS
D	8,91	p<0,0001	S	1,60	p=0,204	NS	-	-	-
E	11,05	p<0,0001	S	0,61	p=0,544	NS	-	-	-
F	1,57	p=0,197	NS	-	-	NS	-	-	-
G	2,82	p=0,040	S	0,74	p=0,480	NS	-	-	-
H	4,68	p=0,003	S	0,83	p=0,437	NS	-	-	-
I	1,73	p=0,162	NS	-	-	-	-	-	-
J	-	-	-	28,08	p<0,0001	S	0,77	p=0,381	NS

NOTA: Análise da Variância (ANOVA)

TABELA - COMPARAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE TESTES CUTÂNEOS POSITIVOS ENTRE OS OBSERVADORES

situação	Extrato C			Extrato G		
	resultado do teste	probabilidade	significância	resultado do teste	probabilidade	significância
obs 1 x obs 2	0,549	p=0,583	NS	1,097	p=0,273	NS
obs 1 x obs 3	0,896	p=0,370	NS	2,753	p=0,006	S
obs 1 x obs 4	1,366	p=0,172	NS	0,291	p=0,771	NS
obs 2 x obs 3	1,431	p=0,152	NS	3,534	p<0,0001	S
obs 2 x obs 4	0,560	p=0,576	NS	0,445	p=0,657	NS
obs 3 x obs 4	2,122	p=0,034	S	2,750	p=0,006	S

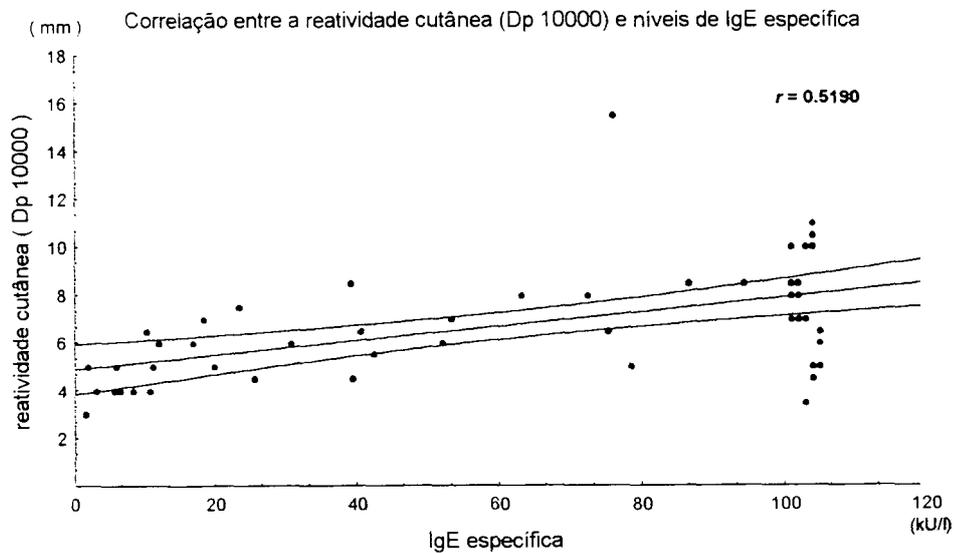
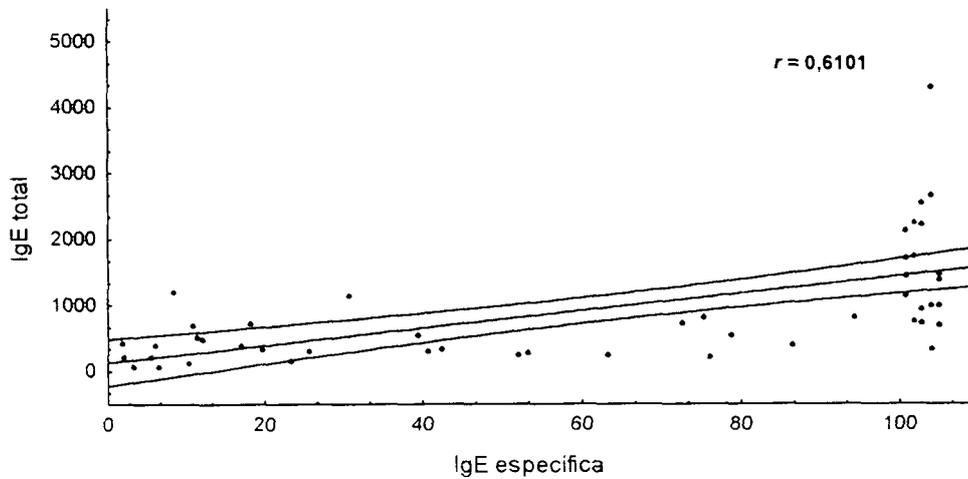
NOTA: Teste COMPARAÇÃO ENTRE DUAS PROPORÇÕES (*Primer of Bioestistics*)

código	IGE total	IGE espec
1	695	10,7
2	289	40,6
3	1136	> 100
4	317	25,7
5	1421	> 100
6	818	75,3
7	1688	> 100
8	706	18,3
9	436	1,6
10	2101	> 100
11	199	76
12	2247	> 100
13	756	> 100
14	1742	> 100
15	338	42,5
16	472	12
17	384	5,95
18	2198	>100
19	925	>100
20	287	53,2
21	2518	> 100
22	2198	> 100
23	709	>100
24	525	11,2
25	68	3,07
26	973	> 100
27	397	16,8
28	2680	> 100
29	4298	> 100
30	530	78,6
31	237	52
33	1199	8,25
34	544	39,5
35	332	19,9
36	2644	> 100
37	141	23,5
38	819	94,3
39	329	> 100
40	986	> 100
41	219	5,5
42	131	10,2
43	226	1,9
44	695	> 100
45	1473	> 100
46	379	86,6
47	1373	> 100
48	1139	30,9
49	56	6,33
50	517	39,3
51	230	63,2
52	711	72,5

Coefficiente de correlação de Pearson (r) para análise da dependência entre diâmetro das papulas, níveis de Der p I no domicílio e anticorpos IgE no soro

VARIÁVEIS	CORRELAÇÃO	PROBABILIDADE
IgE Total x IgE Específica	$r = 0,6101$	$p < 0,0001$
IgE Específica x Dp 5 000	$r = 0,3796$	$p = 0,0060$
IgE Específica x Dp 10 000	$r = 0,5190$	$p < 0,0001$
Der p I x IgE Específica	$r = -0,0995$	$p = 0,4871$
Der p I x Dp 5 000	$r = -0,1682$	$p = 0,2380$
Der p I x Dp 10 000	$r = -0,1218$	$p = 0,3944$

Correlação entre IgE total e IgE específica



**RESULTADOS DOS TESTES CUTÂNEOS (DIÂMETRO MÉDIO DAS PÁPULAS)
NOS DIFERENTES CENTROS**

Variáveis	idade			extratos										
	Obs 1 (UFPR)			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	
Número	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77
Média	12,013			6,664	0,513	1,688	0,292	0,331	0,896	1,896	0,481	6,857	0,052	
DP	3,571			1,970	1,127	1,310	0,775	0,785	2,474	1,481	1,140	2,314	0,320	
Mínimo	7			3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	
Máximo	30			10,5	5,5	4	3	3	20	4,5	4,5	15,5	2	
Mediana	12			5,5	0	2	0	0	0	2	0	6,5	0	

Obs 2 (EPM)														
Variáveis	idade			extratos										
	Obs 2 (EPM)			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	
Número	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48
Média	11,875			6,656	0,948	1,792	0,802	0,979	1,385	1,844	1,167	7,365	0,760	
DP	2,438			1,941	0,773	1,304	0,735	0,831	1,073	1,341	0,986	2,677	0,758	
Mínimo	8			4	0	0	0	0	0	0	0	3	0	
Máximo	16			14,5	3	6	3	3,5	5	5	4	13	2,5	
Mediana	12			6,5	1	2	1	1	1	1,5	1	7,5	1	

Obs 3 (USP)														
Variáveis	idade			extratos										
	Obs 3 (USP)			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	
Número	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44
Média	30,023			7,250	0,659	1,273	0,068	0,182	1,159	2,568	0,614	7,920	0,000	
DP	12,347			2,047	1,458	1,847	0,452	0,683	1,778	2,230	1,817	4,760	0,000	
mínimo	13			3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
máximo	54			13,5	5	5,5	3	3	5	7	10	22,5	0	
mediana	27			7	0	0	0	0	0	3	0	7,5	0	

Obs 4 (HSE)														
Variáveis	idade			extratos										
	Obs 4 (HSE)			a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	
Número	41	41		41	41	41	41	41	41	41	41	41	41	41
média	30,317			6,366	0,463	0,854	0,293	0,232	0,585	1,549	0,256	6,524	0,122	
DP	16,226			2,118	1,080	1,402	0,798	0,742	1,095	1,749	0,799	2,763	0,545	
mínimo	9			3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
máximo	63			15	4	4	2,5	3	3,5	5,5	3	14	2,5	
mediana	27			6	0	0	0	0	0	0	0	7	0	

TOTAL PÁPULAS 210