

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANTICORPOS IgE, IgG pan E SUBCLASSES IgG1-4 ESPECÍFICOS
AOS ÁCAROS *Dermatophagoides pteronyssinus* E *Blomia tropicalis* EM
PACIENTES ASMÁTICOS E CONTROLES NO MUNICÍPIO DE
UBERLÂNDIA, MG.**

JOÃO BATISTA ALVES DE SOUZA

**Monografia apresentada à coordenação
do curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

Uberlândia - MG
Agosto - 1999

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANTICORPOS IgE, IgG pan E SUBCLASSES IgG1-4 ESPECÍFICOS
AOS ÁCAROS *Dermatophagoides pteronyssinus* E *Blomia tropicalis* EM
PACIENTES ASMÁTICOS E CONTROLES NO MUNICÍPIO DE
UBERLÂNDIA, MG.**

JOÃO BATISTA ALVES DE SOUZA

ORIENTADOR: PROF. DR. ERNESTO AKIO TAKETOMI

**Monografia apresentada à coordenação
do curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

**Uberlândia - MG.
Agosto - 1999**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA

ANTICORPOS IgE, IgG pan E SUBCLASSES IgG1-4 ESPECÍFICOS AOS
ÁCAROS *Dermatophagoides pteronyssinus* E *Blomia tropicalis* EM
PACIENTES ASMÁTICOS E CONTROLES NO MUNICÍPIO DE
UBERLÂNDIA, MG.

JOÃO BATISTA ALVES DE SOUZA

Aprovada pela banca examinadora em ___/___/___ Nota _____

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Orientador

Prof. Dra. M.^a Aparecida de Souza
Co-orientadora

Dr. Rodolfo Pereira Mendes
Co-orientadora

Uberlândia, 03 de Agosto de 1999

*Meus pais Ivo e Terezinha,
agradecimentos a vocês pelo
exemplo de trabalho e apoio,
fundamentais durante esta etapa
da minha vida.*

*Não há batalha mais
amargamente perdida do que
aquela em que não se lutou !*

(Raja Marausha)

Agradecimentos

Aos meus Irmãos Paulo, Lizete, Leila, Rogério e Julho Brás, e à aqueles que apesar da distância indiretamente contribuíram para execução deste trabalho.

A minha namorada, Rosângela pelo carinho, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

Ao orientador Ernesto Akio Taketomi, pela confiança e presença durante todas etapas da pesquisa.

As professoras Deise e Maria Aparecida pela atenção e disponibilidade dispensadas nos momentos necessários.

Ao professor Rodolfo por aceitar de imediato o meu convite.

A Erika Arruda pela sua atenção e disposição de última hora.

Aos alunos da medicina que auxiliaram na seleção dos pacientes.

As amigas e colegas de pesquisa, Mônica e Aurélia pelos seus conhecimentos de informática indispensáveis durante a finalização deste trabalho.

Aos funcionários e amigos, Juninho e Junão pelos seus esforços e colaboração na manutenção dos materiais durante todo este período.

Aos alunos e pesquisadores do laboratório de imunologia, Cidinha, Hugo, Omar, Patrícia, Alexandre, Beth, Gabriela e outros.

Resumo

A incidência da asma tem aumentado drasticamente na população de diferentes regiões do mundo. Os alérgenos dos ácaros da poeira são relatados como os mais importantes agentes envolvidos no desenvolvimento da asma alérgica. Para analisar o grau de sensibilização por IgE e a correlação com a presença de IgG pan e subclasses IgG1-4 específicas a *D. pteronyssinus* (Dpt) e *B. tropicalis* (Blo t), foram analisados 89 soros de pacientes asmáticos e 34 de indivíduos controles utilizando os testes cutâneos, punctura e intradérmico, e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). A positividade encontrada pelo teste de punctura para Dpt (50,6%) foi significativamente maior que para Blo t (33,7%). Aproximadamente 60% dos pacientes asmáticos apresentaram resultados positivos para Dpt pelo teste intradérmico e cerca de 50% foram positivos à Blo t. A positividade por ELISA (34,8% para Dpt e 13,5% para Blo t) foi menor do que os testes cutâneos e correlacionou-se melhor com o teste de punctura para os dois alérgenos. Os níveis de IgG pan e subclasses IgG1-4 específicas a Dpt e Blo t foram significativamente maiores entre os pacientes asmáticos do que controles, com exceção de IgG2 para o alérgeno Blo t. Comparando-se os níveis de IgE com IgG pan e IgG1-4 específicas a Dpt entre pacientes asmáticos atópicos (IgE positivos por testes cutâneos ou ELISA), notou-se correlação positiva entre níveis de IgE com IgG3 e IgG4. Não houve correlação entre os níveis de IgE com nenhuma das subclasses de IgG específicas a Blo t. Em contraste, pacientes asmáticos não atópicos (IgE negativos por testes cutâneos e ELISA) a Dpt e Blo t apresentaram níveis de IgG1 e IgG2 significativamente maiores do que IgG3 e IgG4. Pode-se concluir que os níveis de todas as subclasses IgG específicas

apresentaram-se mais elevados entre os pacientes asmáticos que os indivíduos controles. Além disso, foi possível verificar uma correlação entre os níveis de IgG3 e IgG4 específicas a Dpt com os níveis de IgE entre pacientes asmáticos atópicos. Por outro lado, IgG1 e IgG2 específicas a Dpt e Blo t apresentaram-se em níveis maiores que IgG3 e IgG4 entre os pacientes asmáticos não atópicos. Assim, neste estudo, foi possível verificar uma grande diversidade envolvendo a resposta de subclasses de IgG entre pacientes asmáticos atópicos e não atópicos . Maiores estudos serão necessários para elucidar o real papel exercido pelas subclasses IgG3 e IgG4 na imunopatogenia da asma.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Casuística	11
3.1.1. Pacientes	11
3.1.2. Controles	12
3.2. Testes cutâneos	12
3.2.1. Teste de punctura	12
3.2.2. Teste intradérmico	13
3.3. Coleta de sangue	14
3.4. Testes sorológicos	14
3.4.1. ELISA para detecção de IgE específica aos alérgenos de <i>D. pteronyssinus</i> e <i>B. tropicalis</i>	14
3.4.2. ELISA para IgG pan específica aos ácaros <i>D.</i> <i>pteronyssinus</i> e <i>B. tropicalis</i>	16
3.4.3. ELISA para subclasses IgG1-4 específicas aos ácaros <i>D. pteronyssinus</i> e <i>B. tropicalis</i>	18
3.5. Normas de biossegurança	19
3.6. Análise estatística	19
4. RESULTADOS	20
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
8. ANEXOS	51

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos, a morbidade, mortalidade e prevalência da asma têm aumentado drasticamente entre a população mundial, sendo uma das principais causas de admissão hospitalar e ausência escolar entre as crianças (PLATTS-MILLS & SQUILACE, 1997). Este aumento tem sido observado desde 1970 e continuado até 1990, de acordo com dados apresentados em um estudo envolvendo vários países de diferentes regiões do mundo (SLY, 1994).

As causas consideradas responsáveis por este aumento como: predisposição genética, infecção pulmonar, poluição ambiental, mudança no estilo de vida, cigarro e mudança no diagnóstico, por si só não têm conseguido explicar satisfatoriamente o aumento da asma (RING, 1997; TOGIAS *et al.*, 1997). Estudos genéticos têm mostrado que a predisposição genética para atopia é um fator considerado básico para o processo de sensibilização e conseqüentemente o desenvolvimento de doenças alérgicas (ROSENWASSER, 1997). O processo de urbanização observado mais recentemente em alguns

países da África e América, mudança do ambiente doméstico e um maior tempo permanecendo em repartições fechadas, possivelmente tenham contribuídos para o aumento do desenvolvimento da asma alérgica (PLATTS-MILLS, 1996).

A presença dos alérgenos externos e da poeira domiciliar, principalmente os alérgenos dos ácaros, tem sido demonstrada por vários autores estar associado com a sensibilização de indivíduos atópicos e o aumento da prevalência da asma no homem (BAGGIO, 1989; PLATTS-MILLS *et al.*, 1989; KUERH, 1997).

A importância dos alérgenos de ácaros para o desenvolvimento da asma alérgica iniciou em 1967, quando os holandeses Voorhorst e Speiksma (apud SPORIK & PLATTS-MILLS, 1992), identificaram a espécie *Dermatophagoides pteronyssinus* como sendo o principal ácaro da poeira doméstica. Hoje, evidências suficientes têm acumulado e sabe-se que a exposição aos alérgenos dos ácaros da poeira domiciliar influenciada por outros fatores já citados, é considerada como a mais importante causa para o desencadeamento da asma (TUPKER, 1996; SPORIK *et al.*, 1990; PLATTS-MILLS *et al.*, 1995; KOREN, 1997). Aproximadamente 10% da população e 80 a 90% dos asmáticos alérgicos possuem sensibilização aos alérgenos dos ácaros da poeira detectada pelo teste cutâneo (FIREMAN & JELKS, 1996; ROSE *et al.*, 1996).

Os ácaros são de vida livre na sua maioria, cosmopolitas e considerados de grande importância para a economia humana. Estão envolvidos em problemas de saúde humana, animal e na armazenagem de cereais. São também importantes no processo de reciclagem do material orgânico em diferentes ecossistemas (SPIEKSMÁ, 1997). As substâncias orgânicas acumuladas na poeira doméstica, aliadas a uma umidade acima de 60% e uma temperatura de 25 a 30°C em regiões de baixa altitude, constituem os principais fatores

envolvidos na proliferação de cada espécie de ácaro em distintas regiões (CARVALHO & RIOS, 1982; NELSON & FERNANDEZ-CALDAS, 1995; PEAT *et al.*, 1996). Estas variáveis têm possibilitado o encontro de um grande número de ácaros no pó domiciliar, porém com variações da predominância de espécies tanto entre regiões diferentes como no próprio domicílio (AMBRÓSIO *et al.*, 1989).

Em regiões de clima temperado, as espécies encontradas com maior frequência pertencem à família *Pyroglyphidae* como *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* e são consideradas como próprias do ambiente domiciliar devido ao seu constante encontro neste ambiente (ROSE *et al.*, 1996; VEGA *et al.*, 1999).

Os avanços da biologia molecular têm permitido a caracterização e clonagem de vários antígenos destas espécies, sendo os grupo I (Der p 1, Der f 1) e grupo II (Der p 2, Der f 2) os mais importantes (CHAPMAN *et al.*, 1997). Os alérgenos do grupo I são proteínas relacionadas com os restos fecais das espécies *D. pteronissinus* e *D. farinae* e o grupo II, são proteínas que estão presentes em sua estrutura corporal (REIS, 1998). Atualmente, técnicas de imunoenaios têm demonstrado que mais de 80% dos indivíduos alérgicos a estes ácaros possuem anticorpos IgE e IgG específicos a estes dois grupos de alérgenos (PLATTS-MILLS *et al.*, 1997).

Em regiões de clima tropical e subtropical, a espécie *Blomia tropicalis* da família *Glycyphagidae* tem sido encontrada com muita frequência na poeira domiciliar associada com o desenvolvimento de sensibilização em indivíduos atópicos (BAGGIO, 1989; GELLER, 1996; TSAI *et al.*, 1997; CHEW *et al.*, 1999). Esta espécie é considerada uma espécie de estocagem, uma vez que é encontrada normalmente junto a alimentos estocados dos quais se alimentam

(MALHEIROS, 1990). Vários alérgenos foram sequenciados e clonados desta espécie, sendo o *Blo t 5* o mais reativo com IgE de indivíduos alérgicos a este ácaro. Além disso, esta espécie não tem mostrado reação cruzada com antígenos de *Dpt*, possuindo antígenos espécie-específicos e, portanto, considerada de grande importância clínica para as doenças alérgicas (ARRUDA, 1997).

O Brasil, por suas condições geográficas e climáticas, tem mostrado uma prevalência maior das espécies *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* em diferentes regiões (NETO, 1980; SARINHO *et al.*, 1996; SERRAVALLE & MEDEIROS Jr, 1999). Em Recife, uma cidade litorânea de temperatura e umidade elevadas, ALBUQUERQUE *et al.* (1998) demonstraram uma maior prevalência das espécies *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* presentes na poeira doméstica.

Estes achados justificam o envolvimento destas duas espécies nos estudos de sensibilização entre pacientes com asma alérgica em países tropicais como o Brasil.

Na escala evolutiva dos animais, estas duas espécies de ácaros têm sua classificação taxonômica segundo BARNES & RUPPERT (1996), resumida da seguinte forma:

Reino: Metazoa

Filo: Artropoda

Classe: Arachnida

Ordem: Acarinae

Família: Pyriglyphidae

Família: Glycyphagidae

Gênero: *Dermatophagoides*

Gênero: *Blomia*

Espécie: *D. pteronyssinus*

Espécie: *B. tropicalis*

A palavra asma teve sua origem na Grécia e foi utilizada pela primeira vez na língua inglesa para designar as doenças que envolviam o sistema respiratório caracterizadas por respiração difícil (McFADDEN Jr & STEVENS, 1983).

A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas inferiores que se manifesta com obstrução dos brônquios, reversível espontaneamente ou com tratamento, sintomas de dispnéia, sibilos, tosse e recrutamento de leucócitos, principalmente mastócitos e eosinófilos (ATS, 1987). É uma doença de caráter imunológico com inter-relação de uma complexa cadeia de células efetoras, citocinas, e outros mediadores interagindo no microambiente pulmonar (KOREN, 1997).

Os avanços da medicina em relação à prevenção e tratamento das doenças, não têm conseguido diminuir o aumento drástico da incidência da asma entre a população mundial nas últimas décadas. Os gastos com a asma brônquica somam 3,6 bilhões de dólares anualmente nos Estados Unidos (SKONER, 1996). No Brasil, a incidência de novos casos de asma tem sido em média de 20%, observado no período de 1975 a 1995 em São Paulo e uma prevalência de 13,3% entre crianças de 6 a 14 anos e 10% entre a população geral. Os gastos com hospitalizações e terapêutica chegam a 76 milhões de reais por ano, o que representa o terceiro maior gasto do SUS com uma doença em todo país (II CONSENSO BRASILEIRO NO MANEJO DA ASMA, 1998).

Quando iniciada por formação de anticorpos anafiláticos IgE e IgG específicos, a asma é classificada como asma extrínseca com características alérgicas (GREENBERGER *et al.*, 1980). Pode se manifestar imediatamente, cerca de 10 minutos após a exposição aos alérgenos, ou tardiamente, 2 a 4 horas após a exposição, atingindo 50 a 60% dos pacientes asmáticos (BOOY-NOORD

et al., 1971).

Outra forma de manifestação da asma pode ocorrer com o envolvimento de fatores inespecíficos como: infecção viral, poluição ambiental, mudança climática e fumaça de cigarro. Nestes casos, sem a formação de anticorpos IgE específicos aos alérgenos, é classificada como asma intrínseca (AARONSON, 1980; GAROFALO *et al.*, 1992; PLATTS-MILLS *et al.*, 1995).

O processo de sensibilização em indivíduos atópicos pode ocorrer com a formação de anticorpos das classes IgE e IgG, porém o tempo de ligação dos anticorpos IgG à superfície dos mastócitos é pequeno, enquanto que os anticorpos IgE permanecem por um tempo maior ligado aos mastócitos, sendo assim considerados mais importantes para as doenças alérgicas (FRICK, 1980).

Durante o período de sensibilização ou quando se desenvolve o quadro asmático do tipo imediato, um padrão de interleucinas 2, 3, 4 e 5 tem sido observado em lavado broncoalveolar de pacientes atópicos, correspondendo com o padrão de citocinas da subpopulação Th2 responsável pelo direcionamento da defesa humoral com produção de anticorpos principalmente da classe IgE (ROBINSON, 1992).

Os riscos de sensibilização aos alérgenos de ácaros em indivíduos com predisposição genética para desenvolver alergia podem variar de acordo com o nível de exposição a alérgenos do ambiente. Níveis de alérgenos de ácaros ≥ 2 $\mu\text{g/g}$ de poeira são considerados como limite para a sensibilização, enquanto que níveis ≥ 10 $\mu\text{g/g}$ de poeira são considerados como fator de risco para o aparecimento de ataques agudos de asma (DUFF & PLATTS-MILLS, 1992; CHAPMAN *et al.*, 1995). SPORIK *et al.* (1990) observaram forte associação entre o nível de exposição aos alérgenos da poeira e o desenvolvimento da asma em crianças de 5 a 11 anos de idade, ao encontrar sensibilização aos ácaros por

teste cutâneo em mais de 90% das crianças com asma severa. CALL *et al.* (1992) detectaram, pela técnica RAST, níveis de anticorpos IgE específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* em 40% das crianças com asma.

No Brasil, GELLER *et al.* (1993), demonstraram uma positividade pelo teste cutâneo de 59% e 61%, respectivamente aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e *Blomia tropicalis* (Blo t) em 540 pacientes com asma ou rinite alérgica no Rio de Janeiro. OLIVEIRA *et al.* (1998) encontraram, em estudantes de medicina da UNICAMP, uma prevalência pelo teste cutâneo de 50% e 33,3% e, pelo RAST, 63,6% e 27%, respectivamente aos ácaros Dpt e Blo t. Comparando com um estudo realizado anteriormente entre pacientes atendidos no ambulatório de alergia da UNICAMP, foi observado uma menor sensibilização ao ácaro *Blomia tropicalis*. Em Salvador, MEDEIROS Jr *et al.* (1997) encontraram 62,7% de positividade para ambas espécies de ácaros Dpt e Blo t pelo teste cutâneo entre pacientes com asma brônquica ou rinite crônica.

Estudos envolvendo a sensibilização por anticorpos IgG têm sido realizados por vários autores. No entanto, seu verdadeiro papel nas doenças alérgicas permanece obscuro (GWYNN *et al.*, 1978; AAAAI, 1995). A presença de sensibilização por IgG e subclasses contra os alérgenos de ácaros pode ser detectada pela técnica de ELISA com bastante especificidade nas pesquisas (RUIZ *et al.*, 1994; NAHN *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 1998).

A IgG tem mostrado requerer um tempo superior ao da IgE para o processo de sensibilização e a duração do efeito dos anticorpos IgG tem demonstrado ser pequeno pelo seu menor tempo de ligação à superfície dos mastócitos (JAN, 1979). Estudos realizados por GWYNN *et al.* (1982), utilizando teste de bronco-provocação com alérgenos de ácaro e pólen em

pacientes com asma, têm revelado que os pacientes com resposta do tipo tardia apresentaram níveis de IgG elevados, enquanto a resposta tipo imediata estava relacionada com níveis de IgE.

Outros autores têm atribuído a subclasses de IgG o papel protetor nas doenças alérgicas por encontrar níveis elevados da subclasse IgG4 em pacientes sob imunoterapia (OHASHI *et al.*, 1987; AALBERSE *et al.*, 1993).

SMITH *et al.* (1998), encontraram níveis elevados de IgG1 e IgG4 específica a Der p 2 (alérgeno do grupo 2 de *D. pteronyssinus*) em mais de 90% das crianças expostas a alto nível de alérgenos, enquanto a IgG1 apresentou elevada em mais de 60% das crianças expostas a baixo nível de alérgenos. Entretanto, somente 25% das crianças do grupo de baixa exposição apresentaram níveis significativos de IgG4. Experimentos realizados por KOBAYASHI *et al.* (1996), comparando a reatividade de IgE e IgG4 ao alérgeno Der p 2 de *D. pteronyssinus* e suas frações peptídicas, mostraram diferenças na reatividade para IgE e IgG4, sendo os anticorpos IgE mais reativos à fração completa de Der p 2 enquanto IgG4 mostrou-se reativa a várias frações peptídicas do alérgeno Der p 2.

ROSE *et al.* (1996), pesquisaram anticorpos IgG específicos a *D. farinae* em pacientes asmáticos e encontraram a presença destes anticorpos em quase todos pacientes com IgE específica positiva. TAME *et al.* (1996), demonstraram que níveis séricos de IgE e, em menor grau, IgG4 específicos a Der p 2 foram maiores em crianças alérgicas do que em controles não alérgicos, porém não houve correlação entre IgE e IgG4 específicas. Além disso, os autores concluíram que a produção de IgE ou outras subclasses de IgG são independentes. RIZZO *et al.* (1993), encontraram correlação significativa entre os níveis de IgE e IgG específicos a *D. farinae* e *D. pteronyssinus* para os

grupos asmáticos e controles na cidade de São Paulo.

NAHM *et al.* (1998), observaram uma correlação entre os níveis das subclasses IgG2 e IgG4 com os níveis de exposição aos alérgenos dos ácaros, enquanto que as subclasses IgG1 e IgG3 não mostraram variação significativa com os níveis de exposição.

Para compreender melhor a resposta de IgE, IgG e suas subclasses, este estudo teve como objetivo detectar níveis de IgE, IgG pan e subclasses específicas aos extratos brutos de *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* no soro de pacientes asmáticos e de indivíduos controles da região de Uberlândia. Além disso, correlacionar os níveis séricos de IgG pan e suas subclasses com a presença ou não de IgE específica a estes alérgenos, detectada por ELISA ou testes cutâneos de hipersensibilidade imediata.

2. OBJETIVOS

1. Determinar, por meio do teste ELISA, os níveis de IgE, IgG pan, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicas aos extratos brutos de *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* no soro de pacientes adultos portadores de asma e pacientes controles.
2. Correlacionar os níveis séricos de IgG pan, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 com a presença de IgE específica a *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* detectada *in vitro* por ELISA ou *in vivo* por meio de testes cutâneos de hipersensibilidade imediata.
3. Analisar a importância da resposta de anticorpos IgG de subclasses IgG1-4 específicas a estes alérgenos em pacientes negativos para IgE, tanto pelo teste cutâneo como pelo ELISA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

3.1.1. Pacientes asmáticos

Foram analisados 89 soros de pacientes com diagnóstico clínico de asma brônquica, na faixa etária de 18 a 60 anos, sem distinção de sexo, raça e classe social. Estes pacientes foram selecionados pelo Serviço de Pesquisa em Alergia e Doenças Infecciosas da Disciplina de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), junto à Divisão de Arquivos Médicos (DIAME), do Hospital de Clínicas desta Instituição.

Após esta seleção, os pacientes foram convocados a comparecerem ao Laboratório de Imunologia onde foram submetidos aos testes de punctura e intradérmico para vários alérgenos, com termo de consentimento previamente assinado pelos pacientes (anexo 1). Na seqüência, os pacientes responderam a

um questionário clínico para confirmar a história pessoal e familiar de aspectos clínicos da asma (anexo 2).

Somente os indivíduos que apresentassem os critérios estabelecidos conforme a Sociedade Torácica Americana (ATS) para presença de asma foram enquadrados no grupo de asmáticos.

3.1.2. Pacientes controles

De acordo com um questionário respondido pelos indivíduos, foram selecionados 34 pacientes sem história de asma, e testes cutâneos (punctura e intradérmico) negativos para vários alérgenos. Estes pacientes foram avaliados na Unidade de Alergia Clínica da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram submetidos aos mesmos procedimentos realizados com os pacientes asmáticos.

3.2. Testes Cutâneos

3.2.1. Teste de Punctura

Para a realização do teste cutâneo de punctura foram utilizados os extratos dos alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) (Bayer Corporation, Spokane, Washington, USA) e *Blomia tropicalis* (Blo t) (University of South Florida, USA). O teste foi aplicado na face interna do braço após antissepsia, depositando-se 10µl de cada alérgeno, distanciados 3 cm um do outro, e sobre

este foi feito uma punctura com agulha descartável 13 x 4 mm ou lanceta de metal devidamente esterilizada. Após um período de 15 minutos, a leitura do teste foi realizada com régua específica (Morrow Brown Disposable/Skin Test Needle da Aller Guard®) graduada em mm, obedecendo como critério de positividade, uma pápula $\geq 5,0$ mm, obtida pela média de dois diâmetros perpendiculares da reação. Em seguida, estes dados foram anotados em uma ficha de controle dos testes (anexo 3).

O controle positivo foi realizado com cloridrato de histamina (1 mg/ml - Bayer Corporation-USA) diluído em solução salina fisiológica com glicerol a 50% (Bayer Corporation- USA) e, para o controle negativo, foi usado somente glicerol em solução fisiológica.

As concentrações dos extratos alergênicos dos ácaros para a realização dos testes de punctura foram padronizadas pelo fabricante, segundo normas internacionais.

3.2.2. Teste Intradérmico

O teste intradérmico foi realizado com os extratos dos alérgenos de Dpt e Blo t. As aplicações foram feitas na região interna do antebraço do indivíduo, utilizando seringas de 1 ml com agulhas 13 x 4 mm, descartáveis e injetando, por via intradérmica, 0,02 ml de cada extrato alergênico, distanciados 3 cm um do outro. Os extratos foram utilizados numa diluição seqüencial obedecida conforme protocolo empregado na Universidade de Virgínia, USA (anexo 4). A leitura do teste foi realizada com régua específica após um período de 15 minutos. O critério utilizado para determinar a positividade ao teste foi a

presença de pápula com média $\geq 8,0$ mm, calculada tomando-se dois diâmetros perpendiculares da reação.

3.3. Coleta de Sangue

As amostras de soros dos pacientes dos grupos de pesquisa e controle foram obtidas na ocasião da realização dos respectivos testes cutâneos de punctura e intradérmico, utilizando tubos de 20 ml com agulha 25 x 8 mm ou 25 x 7 mm (VACUTAINER®- Precision Glide/Becton Dickinson Vacutainer Systems europe) para punção venosa na região do antebraço. O sangue foi mantido à temperatura ambiente até a formação do coágulo e posteriormente centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. O soro colhido foi aliquoteado e estocado a -20°C até à realização dos testes *in vitro*.

3.4. Testes Sorológicos

3.4.1. ELISA para detecção de IgE específica aos alérgenos de *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*

Anticorpos IgE específicos aos alérgenos *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dpt) e *Blomia tropicalis* (Blo t) foram detectados por meio do teste ELISA de dupla camada. Microplacas de poliestireno de alta afinidade

(CORNING®- Laboratory Sciences Company, N.Y., USA.) foram sensibilizadas com 50µL/poço dos extratos dos ácaros diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6 a uma concentração de 40 µg/ml, incubando-se por 18 horas em câmara úmida a 4°C. Paralelamente, na mesma placa, foram sensibilizados poços com extratos de *Dermatophagoides farinae* (Bayer Corporation, USA) a uma concentração de 200 AU/mL, para a realização da curva padrão.

Após a lavagem das placas em solução salina tamponada com fosfatos 0,01M (PBS) pH 7,2 adicionada de Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate - SIGMA®) a 0,05% (PBS-T), as placas foram bloqueadas (200µL/poço) com PBS-T adicionado de soroalbumina bovina (BSA - SIGMA®) a 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Como anteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T e as amostras de soro dos pacientes asmáticos e controles adicionadas (50µL/poço), em duplicata, na diluição de 1/2 em PBS-T + BSA 1% por 2 horas a 37°C. A curva padrão foi realizada com um pool de soros de pacientes alérgicos a ácaros (UVA 87/01), subpadronizado de acordo com um soro de referência internacional (National Institute for Biological Standards and Control - NIBSC), como tendo 1000 Unidades RAST (RU/ml) de IgE contra *Dermatophagoides farinae*. Este soro foi diluído para 250 RU/mL em PBS-T + BSA 1% para a obtenção da curva em diluições duplas seriadas. Na seqüência, as placas foram lavadas 5 vezes em PBS-T e adicionou-se (50µl/poço) o anticorpo secundário anti-IgE humana biotilado (Kirkegaard & Perry Laboratories, Maryland - USA.) na diluição de 1/1000 em PBS-T + BSA 1% por 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas como anteriormente descrito, e adicionou-se (50µl/poço) estreptavidina-peroxidase (SIGMA®- Sigma Chemical Co., USA) a 1/1000 em PBS-T + BSA 1% ,

incubando-se por 30 minutos à temperatura ambiente. Após novas lavagens a revelação foi realizada com a adição do substrato enzimático (50µl/poço) consistindo de ABTS (2,2-azino bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid-SIGMA®) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 com 0,03% de H₂O₂. Após um tempo de 5 a 15 minutos, a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Titertek Multiskan Plus - Flow Laboratories, USA) em filtro de 405 nm, em tempos variáveis, de acordo com os valores de absorbância da curva padrão.

A média dos valores de absorbância obtida das amostras de soros foi convertida em Unidades ELISA (EU/mL), segundo a curva padrão para cada alérgeno, tendo como referência as unidades RAST (RU/mL) do respectivo soro padrão, utilizando para isto o Software Microplate Manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

O limiar de positividade (“cut off”) da reação de ELISA foi determinado pela média dos valores obtidas das absorbâncias (EU/ml) dos pacientes controles acrescido de 5 desvios padrões (X+5DP), para cada alérgeno.

3.4.2. ELISA para IgG pan específica aos ácaros *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*

A pesquisa de anticorpos IgG pan específicos a *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis* foi realizada no soro de pacientes asmáticos e indivíduos controles, utilizando a técnica de ELISA indireto, segundo SMITH *et al.* (1998), com algumas modificações. As microplacas de poliestireno de alta afinidade (CORNING®), foram sensibilizadas (50µL/poço) com os extrato de alérgenos, na concentração de 10µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato

0,06M, pH 9,6 por 18 horas 4°C. Após a lavagem por 3 vezes com PBS-T as placas foram bloqueadas (200µl/poço) com solução de PBS-T + BSA a 5% por 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas em PBS-T e procedeu-se a adição dos soros (50µl/poço) nas diluições de 1/10, 1/100 e 1/1000 em PBS-T + BSA 1% e incubou-se por 1 hora a 37°C. Em todas as placas foram incluídos dois soros de crianças, previamente determinados como controles negativos da reação e controles da amostra (adição apenas do diluente das amostras, PBS-T + BSA 1%). Após a lavagem das placas por 5 vezes em PBS-T, foi adicionado (50µl/poço) o conjugado anti-IgG humana marcada com peroxidase (SIGMA®-Chemical Company, St. Louis, USA.), na diluição 1/1000 em PBS-T + BSA 1% e incubado a 37°C por 1 hora. Como anteriormente descrito, as placas foram novamente lavadas e, em seguida, a reação foi revelada com a adição (50µl/poço) do substrato, consistindo de 1,2-ortofenilenodiamina (OPD, MERK - Schuchardt - Germany), 0,4g/mL diluído em tampão citrato 0,01M, pH 5,0 e 0.03% de H₂O₂. Após um período de 10 a 15 minutos, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N (25µl/poço) e a leitura realizada em leitor de ELISA determinando-se os valores de absorbância a 492 nm.

Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE), conforme descrito por NAHM *et al.*, (1998), considerando-se a diluição 1/100 das amostras, de acordo com a fórmula seguinte: $IE = \frac{S - B}{N - B}$, onde S = Absorbância da amostra, B = Absorbância somente do diluente da reação (branco), N = Absorbância do controle negativo.

3.4.3. ELISA para subclasses IgG1- 4 específicas aos ácaros *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*

As subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicas aos ácaros *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* foram pesquisadas no soros de pacientes asmáticos e indivíduos controles, por meio de ELISA segundo SMTH *et al* (1998), com algumas modificações. Microplacas de poliestireno (CORNING®), foram sensibilizadas com 50µL/poço de cada alérgeno na concentração de 10µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6 e incubadas por 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes em PBS-T, e subsequentemente bloqueadas com 200µl/poço de PBS-T + BSA a 5% por 1 hora a 37°C. Após a lavagem das placas em PBS-T, as amostras foram adicionadas (50µL/poço) nas diluições 1/10 (para IgG1 e IgG2) e 1/2 (para IgG3 e IgG4) em PBS-T + BSA 1% e incubadas por 1 hora a 37°C. Em cada placa, foram incluídos dois soros de indivíduos positivos previamente determinados para cada subclasse e dois soros de indivíduos negativos como controles da reação. Além disso, foram incluídos controles da amostra (adição apenas do diluente da amostra). Em seguida, as placas foram lavadas por 5 vezes em tampão PBS-T e procedeu-se a adição (50µL/poço) dos anticorpos monoclonais anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 humanas (SIGMA) nas diluições 1/1000 (IgG2 e IgG4), 1/500 (IgG3) e 1/800 (IgG1) em PBS-T + BSA 1% e incubou-se por 1 hora a 37°C. Como anteriormente, as placas foram lavadas 5 vezes e adicionou-se o conjugado IgG de cabra anti- IgG de camundongo marcada com peroxidase (preparada segundo WILSON e NAKANE, 1978) nas diluições de 1/500 (IgG2 e IgG4), 1/250 (IgG3) e 1/1000 (IgG1) em PBS-T + BSA 1% por 1 hora a 37°C. Em seguida, as

placas foram lavadas e procedeu-se a adição do substrato consistindo de OPD e H_2O_2 . Após um período de 10 a 15 minutos, a reação foi interrompida com H_2SO_4 2N, (25 μ l/poço) e a leitura realizada em leitor de ELISA a 492 nm.

Os valores de absorbância obtidos foram expressos em Índice ELISA (IE), conforme anteriormente descrito para detecção de IgG pan.

3.5. Normas de biossegurança

Todas as atividades realizadas durante a pesquisa foram executadas obedecendo-se as normas de biossegurança, segundo BORGES & MINEO, (1997).

3.6. Análise estatística

Análise estatística da diferença entre duas proporções e das médias aritméticas obtidas entre os grupos e entre as classes ou subclasses de anticorpos foram realizadas utilizando o Software Bio Statistic for Windows, considerando significativo todos resultados com $p < 0,05$. O teste de correlação linear foi feito utilizando o software GraphPad Prism.

4. RESULTADOS

4.1. Testes Cutâneos de Punctura e Intradérmico

Foram realizados testes cutâneos de leitura imediata, punctura e intradérmico, em 89 pacientes asmáticos e 34 indivíduos controles, para avaliar o grau de sensibilização frente aos alérgenos de *D. pteronyssinus* (Dpt) e *B. tropicalis* (Blo t). Todos os pacientes controles apresentaram teste cutâneo negativo aos alérgenos.

Dentre os 89 pacientes asmáticos, 45 (50,6%) apresentaram teste de punctura positivo a Dpt e 52 (58,4%) pacientes foram positivos pelo teste intradérmico ($p > 0,05$). Em relação a *B. tropicalis*, 30 (33,7%) foram reativos ao extrato alergênico de Blo t pelo teste de punctura e 44 (49,4%) apresentaram teste intradérmico positivo a Blo t ($p < 0,05$) (Fig. 1). A positividade para Dpt foi significativamente maior do que para Blo t somente pelo teste de punctura ($p < 0,05$).

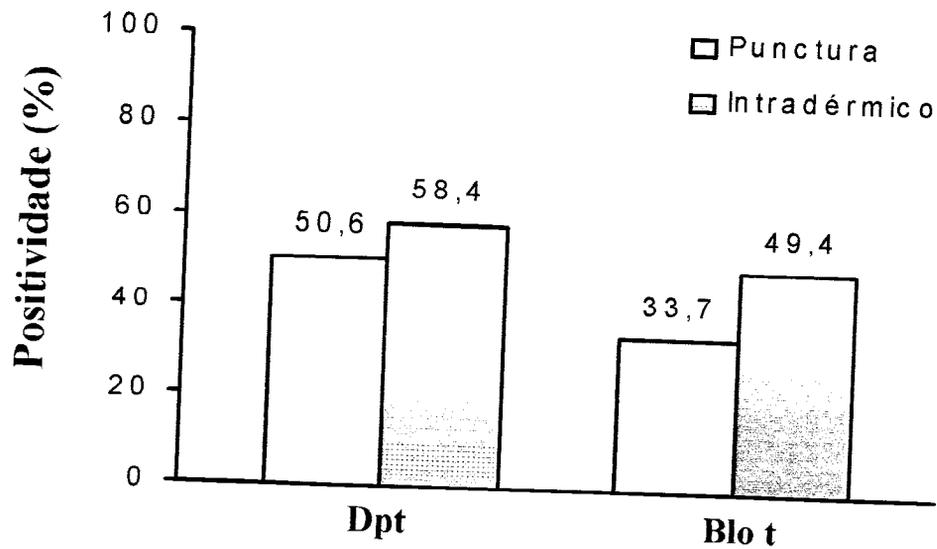


Fig.1. Frequência de positividade aos ácaros *D. pteronyssinus* (Dpt) e *B. tropicalis* (Blo t) determinadas por teste de punctura e intradérmico (n= 89)

4.2. Níveis de IgE sérica específica aos ácaros *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* determinados por ELISA

Anticorpos IgE séricos específicos a Dpt e Blo t foram quantificados em 89 soros de pacientes asmáticos e 34 indivíduos controles (Fig. 2).

Os limiares de positividade, (“cutt uff”) obtidos para Dpt e Blo t em Unidades ELISA (EU/mL), foram de 3,4 EU/ml e 5,0 EU/ml, respectivamente.

Os níveis de IgE específica a Dpt variaram desde abaixo do limiar de positividade (3,4 EU/mL) a 277,8 EU/mL, com média geométrica de 33,5 EU/mL, sendo que 31 (34,8%) pacientes foram positivos a Dpt. Doze (13,5%) pacientes apresentaram níveis de IgE específica a Blo t \geq 5,0 EU/mL (limiar de positividade), sendo o nível mais elevado no valor de 51,8 EU/mL e a média geométrica de 10,9 EU/mL. A positividade observada pelo ELISA a Dpt foi

significativamente maior do que para Blo t entre os pacientes asmáticos ($p < 0,001$).

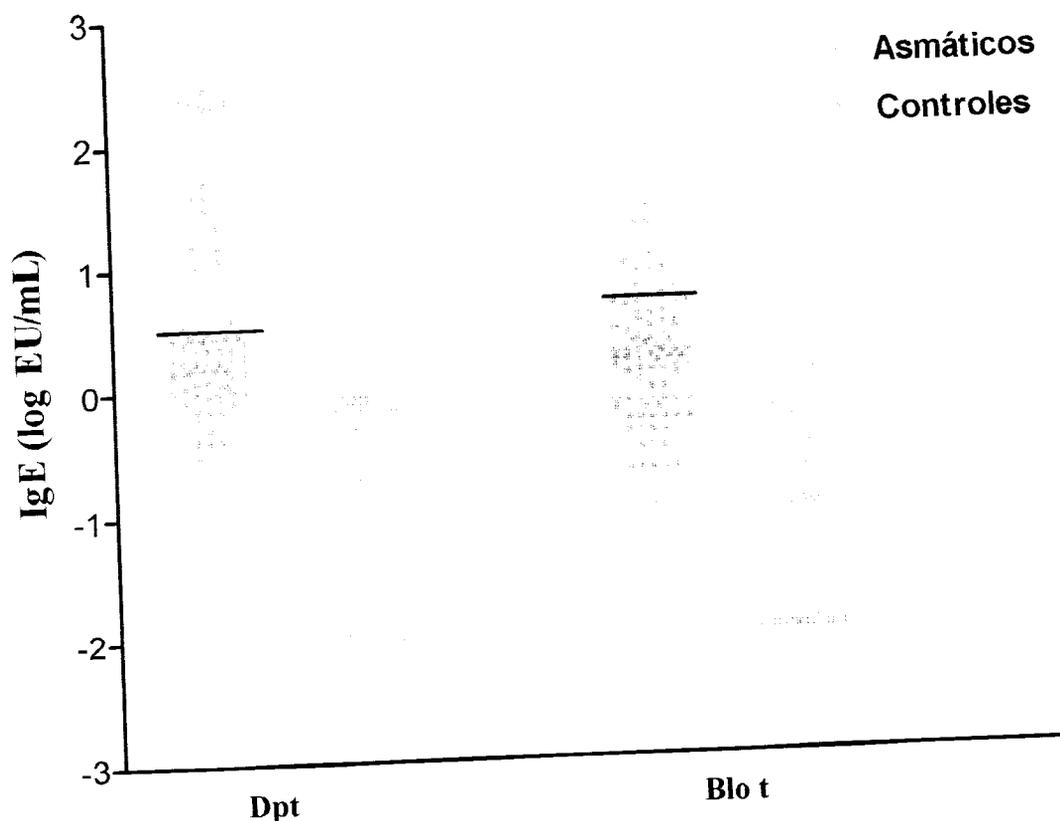


Fig.2. Níveis de IgE específica determinados por ELISA em pacientes asmáticos (n=89) e controles (n=34). As barras horizontais representam o limiar de positividade: 3,4 EU/mL (log 0,5) e 5,0 EU/mL (log 0,7) para *D. pteronyssinus* (Dpt) e *B. tropicalis* (Blo t) respectivamente.

4.3. Níveis de IgG pan séricos específicos aos ácaros *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* determinados por ELISA

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de IgG pan específica aos ácaros *D. pteronyssinus* (Dpt) e *B. tropicalis* (Blo t) no

soro de 89 pacientes asmáticos e 34 controles. Os níveis de IgG pan específica a Dpt em Índice ELISA (IE) variaram de 0,5 a 28,1 ($5,6 \pm 4,6$) entre os pacientes asmáticos e, no grupo controle, os índices variaram de 0,8 a 8,7 ($2,9 \pm 1,4$). Esta diferença foi estatisticamente significativa entre estes grupos ($p < 0,01$). Os níveis de IgG pan específica a Blo t foram similares aos obtidos para Dpt ($6,6 \pm 4,7$ para pacientes asmáticos e $3,4 \pm 2,8$ para controles; $p < 0,01$) (Fig. 3).

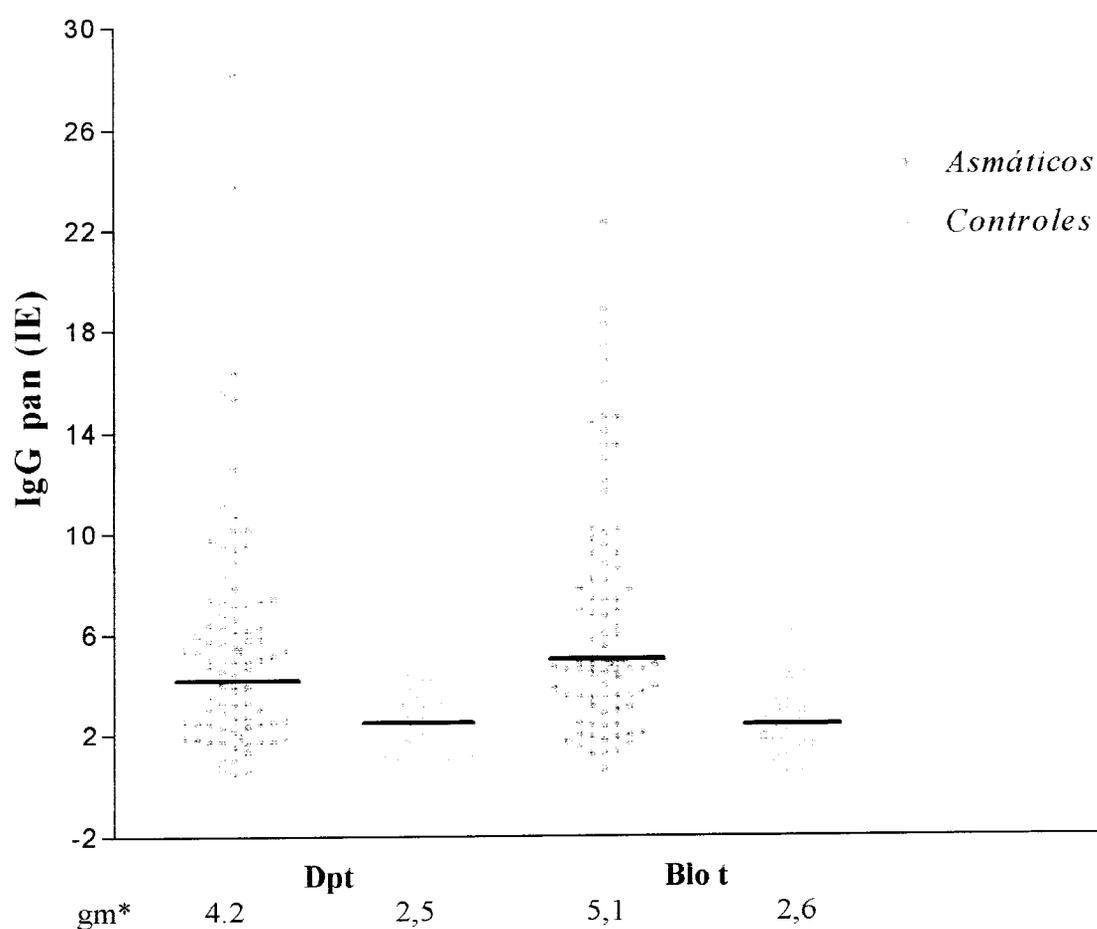


Fig. 3. Níveis de IgG pan em (IE) índice ELISA, específica a *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* detectados no soro de pacientes asmáticos (n = 89) e indivíduos controles (n = 34). As barras representam as médias geométricas. *Médias geométricas.

4.4. Níveis de subclasses IgG 1 a 4 específicas a *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* determinados por ELISA

Foram quantificados os níveis séricos das subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicas aos alérgenos de Dpt e Blo t em 89 pacientes asmáticos e 34 controles (Figs. 4 e 5). Os valores obtidos para a subclasse IgG1 específica a Dpt variaram de 0,4 a 29,8 ($9,1 \pm 7,5$) entre os pacientes asmáticos e de 0,1 a 20,4 ($3,1 \pm 3,9$) para o grupo controle, com diferença significativa entre estes grupos ($p < 0,001$). Os níveis de IgG2 específica a Dpt apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados, variando de 0,6 a 42,1 ($8,1 \pm 7,7$) para asmáticos e de 0,8 a 16,4 ($4,5 \pm 4,1$) para controles ($p < 0,01$). Os valores obtidos para IgG3 anti-Dpt apresentaram variações de 0,7 a 10,0 ($3,4 \pm 1,9$) entre asmáticos e de 0,8 a 3,8 ($1,9 \pm 0,9$) em controles, com diferença significativa entre os dois grupos ($p < 0,001$). A subclasse IgG4 apresentou níveis variando de 0,4 a 14,7 ($3,8 \pm 2,6$) e 0,4 a 5,9 ($1,9 \pm 1,3$) para os grupos asmáticos e controles, respectivamente, com diferença significativa ($p < 0,001$).

Os níveis de IgG1 e IgG2 específicas a Dpt não apresentaram diferenças significativas entre os pacientes asmáticos, o mesmo ocorrendo entre IgG3 e IgG4 ($p > 0,05$). Porém, os níveis de IgG1 e IgG2 foram significativamente maiores do que os obtidos para IgG3 e IgG4 ($p < 0,001$) (Fig. 4).

Resultados obtidos para as subclasses IgG1-4 específicas a Blo t (Figs. 5) foram similares aos do alérgeno Dpt, com níveis significativamente maiores entre os pacientes asmáticos em relação aos controles ($p < 0,001$), exceto para IgG2 ($p > 0,05$). A subclasse IgG1 demonstrou os níveis mais elevados ($8,1 \pm 4,8$) seguida de IgG2 ($4,9 \pm 3,6$), IgG4 ($3,9 \pm 2,1$) e IgG3 ($2,9 \pm 1,6$). Entretanto,

diferentemente ao encontrado para o alérgeno Dpt, todas as subclasses IgG1-4 específicas a Blo t apresentaram níveis significativamente diferentes entre si em pacientes asmáticos ($p < 0,05$).

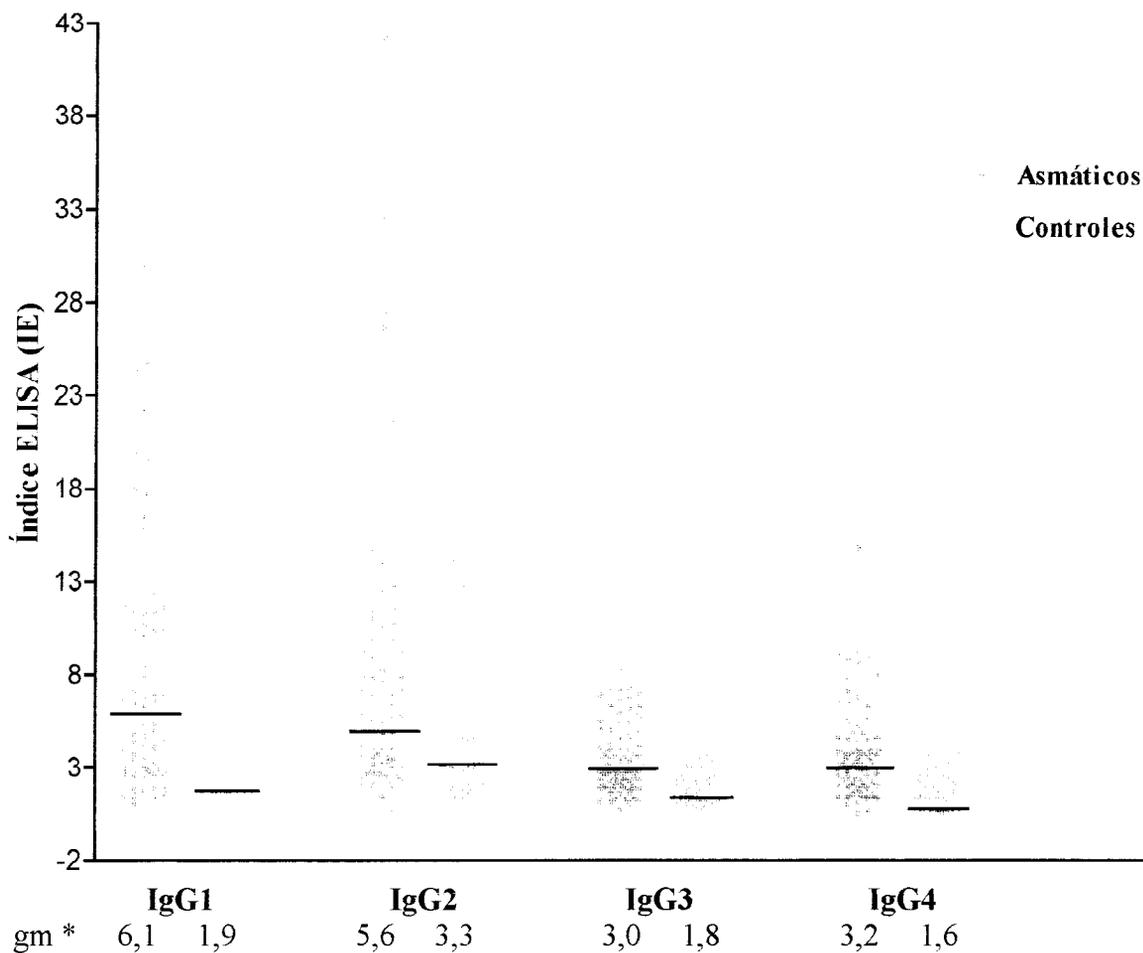


Fig. 4. Níveis de IgG1-4 específicas a *D. pteronyssinus*, determinados por ELISA no soro de pacientes asmáticos (n=89) e controles (n=34), em IE (índice ELISA). As barras representam as médias geométricas. * Médias geométricas.

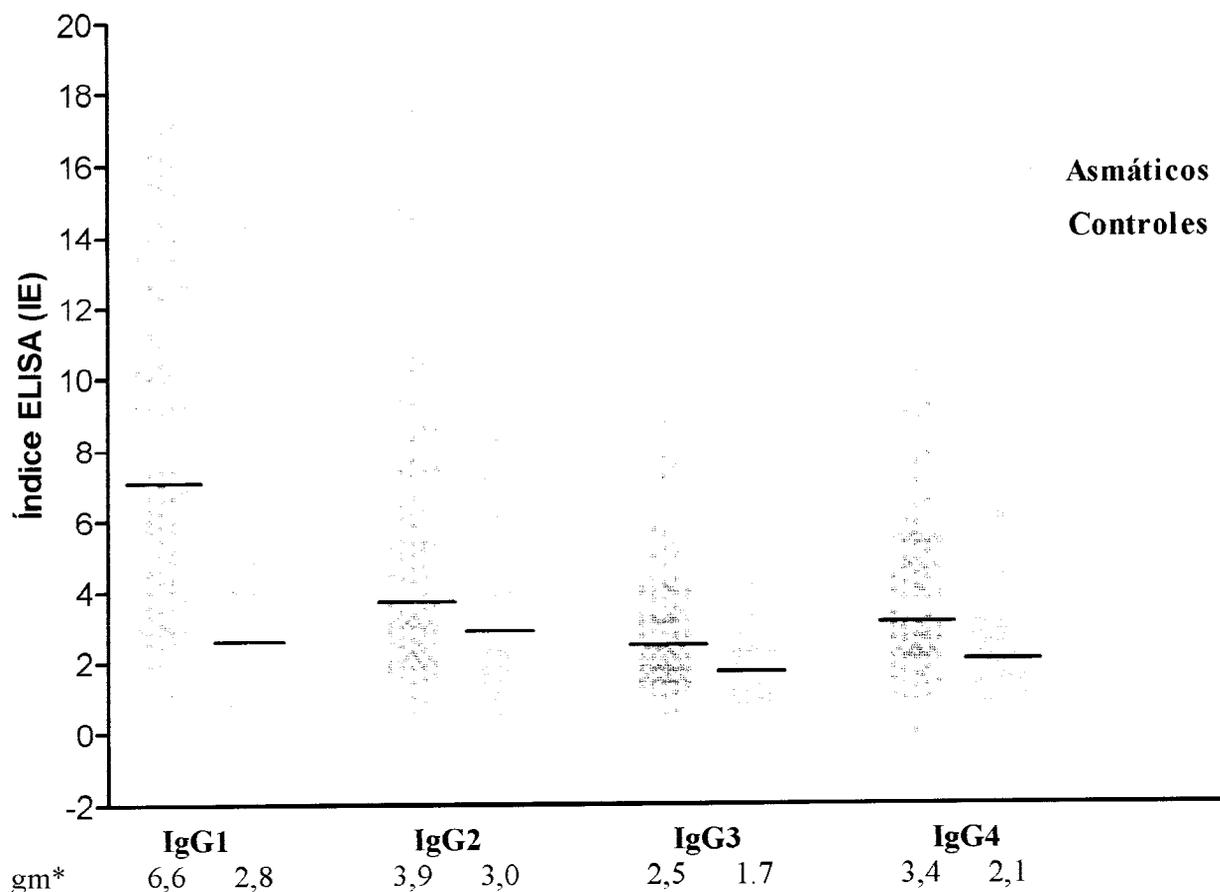


Fig. 5. Níveis de subclasses de IgG específicas a *B. tropicalis* em Índice ELISA determinados no soro de pacientes asmáticos (n = 89) e controles (n = 34). As barras horizontais representam as médias geométricas. * média geométrica.

4.5. Análise da sensibilização aos alérgenos de *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* em pacientes asmáticos pelos testes cutâneos e ELISA

As frequências dos resultados dos testes cutâneos de punctura (P), intradérmico (ID) e ELISA estão representados na Tabela 1 para análise da sensibilização aos ácaros *D. pteronyssinus* (Dpt) e *B. tropicalis* (Blo t).

Entre os 89 pacientes asmáticos, 29 (32,6%) apresentaram testes

concordantes positivos (P+/ID+/ELISA+) a Dpt e 35 (39,3%) apresentaram resultados concordantes negativos (P-/ID-/ELISA-). Resultados discordantes entre os três testes para Dpt foram encontrados em 25 (28,1%) pacientes. Concordância positiva aos três testes para Blo t foi observada em 10 (11,2%) e concordância negativa em 44 (49,4%) pacientes asmáticos. Trinta e cinco (39,3%) pacientes apresentaram resultados discordantes aos três testes para Blo t.

Os resultados concordantes positivos e negativos (71,9%) para Dpt foram significativamente maiores do que os resultados discordantes (28,1%) ($p < 0,0001$). Resultados similares foram obtidos para Blo t (60,7% versus 39,3%; $p < 0,01$).

Tab. 1. Frequência dos resultados concordantes positivos e negativos e discordantes entre os testes punctura, intradérmico e ELISA para IgE específica aos ácaros *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*, em 89 pacientes asmáticos.

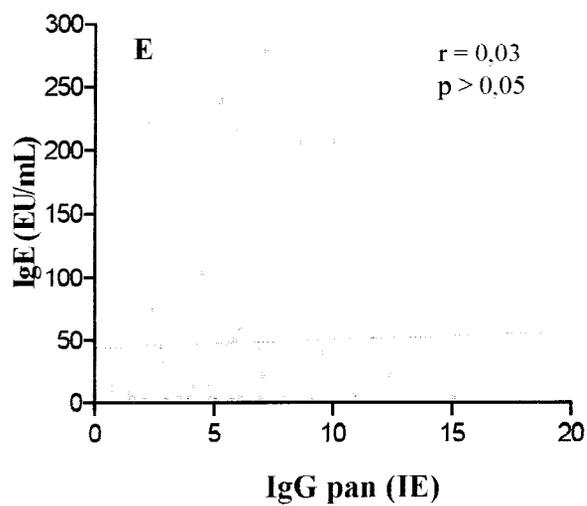
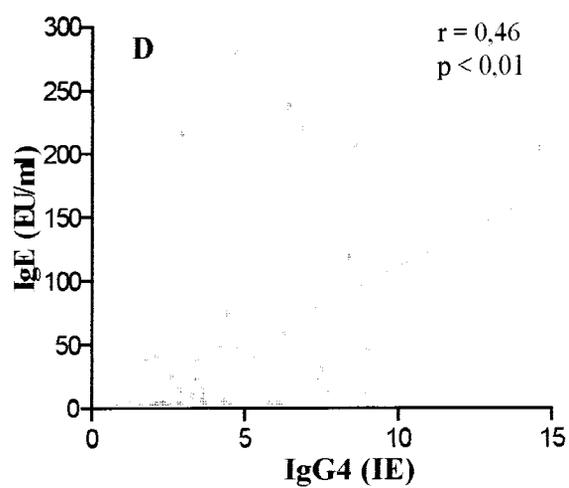
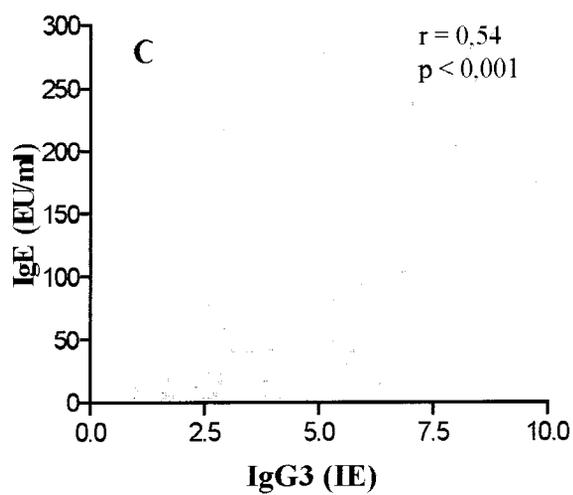
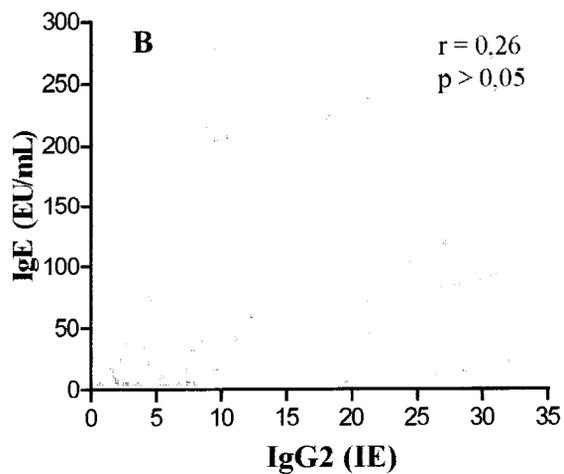
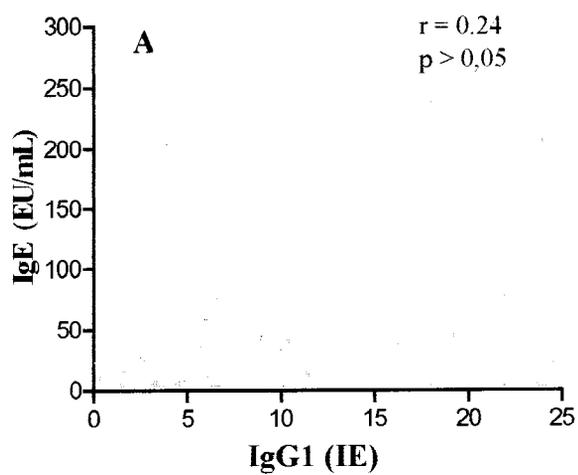
Resultados	Testes	Alérgenos	
		Dpt	Blo t
Concordantes	P - / ID - / ELISA -	35	44
	P + / ID + / ELISA +	29	10
Discordantes	P + / ID + / ELISA -	15	19
	P - / ID + / ELISA -	7	13
	P + / ID - / ELISA -	1	1
	P - / ID - / ELISA +	1	0
	P - / ID + / ELISA +	1	2
	P + / ID - / ELISA +	0	0
Total		89	89

P = Teste Punctura ID = Teste Intradérmico ELISA = Teste ELISA

4.6. Correlação entre os níveis de IgE, IgG pan e subclasses IgG1-4 específicas a *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* entre pacientes asmáticos atópicos

Foi analisada a correlação entre os níveis de IgE com IgG pan, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicas a Dpt entre 47 pacientes asmáticos atópicos, ou seja, que apresentaram IgE positiva detectada por teste de punctura ou ELISA. Observou-se maior correlação positiva entre os níveis de IgE e IgG3 ($r = 0,54$; $p < 0,001$) e IgG4 ($r = 0,46$; $p < 0,01$) quando comparado com IgG1 ($r = 0,24$; $p > 0,05$) e IgG2 ($r = 0,26$; $p > 0,05$) ou mesmo IgG pan ($r = 0,03$; $p > 0,05$) (Fig. 6).

A comparação entre os níveis de IgE com IgG pan, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicas a Blo t foi realizada em 32 pacientes atópicos, isto é, positivos para IgE por teste de punctura ou ELISA. Não houve correlação significativa entre os níveis de IgE com IgG pan e subclasses de IgG específicas a Blo t.



4.7. Análise da resposta de IgG pan e subclasses de IgG1-4 específicas *D. pteronyssinus* (Dpt) e *B. tropicalis* (Blo t) em pacientes asmáticos não atópicos

Foi analisada a resposta de anticórpous IgG pan e subclasses IgG específicas a Dpt e Blo t em pacientes asmáticos não atópicos, ou seja, negativos para IgE tanto pelo teste cutâneo como pelo ELISA. Um total de 42 pacientes apresentaram resultados concordantes negativos para IgE aos três testes realizados, considerando os 7 pacientes que apresentaram somente teste intradérmico positivo a Dpt, uma vez que esta positividade foi observada apenas quando foi utilizado uma concentração do extrato de Dpt ≥ 10 AU/mL. Entre estes pacientes, os níveis de IgG pan, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram semelhantes aos obtidos no grupo total de asmáticos ($n = 89$). As médias aritméticas obtidas entre estes pacientes foram: IgG pan ($5,0 \pm 4,7$), IgG1 ($8,1 \pm 7,6$), IgG2 ($5,6 \pm 3,7$), IgG3 ($3,0 \pm 1,8$) e IgG4 ($2,9 \pm 1,8$). As subclasses IgG1 e IgG2 não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), o mesmo ocorrendo entre as subclasses IgG3 e IgG4 ($p > 0,05$). Semelhantemente ao que ocorreu com o grupo total de pacientes asmáticos, os níveis de IgG1 e IgG2 foram significativamente maiores do que IgG3 e IgG4 nestes pacientes ($p < 0,001$) (Fig. 7).

Da mesma forma, considerando os 13 pacientes que apresentaram positividade a Blo t somente pelo teste intradérmico quando foi utilizado concentração do extrato de Blo t $\geq 0,2\mu\text{g/mL}$, 2 apresentaram positividade a este alérgeno em concentrações inferiores a $0,2\mu\text{g/mL}$. Assim, 11 foram considerados como negativos, perfazendo um total de 55 pacientes com IgE negativa aos três

testes realizados. Entre estes pacientes, as médias aritméticas encontradas foram: IgG pan ($5,9 \pm 3,9$), IgG1 ($7,7 \pm 4,7$), IgG2 ($4,1 \pm 2,6$), IgG3 ($2,6 \pm 1,6$) e IgG4 ($3,3 \pm 2,0$). Ao contrário dos resultados obtidos para Dpt entre estes pacientes não atópicos, os níveis de todas as subclasses IgG1-4 específicas a Blo t apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), similarmente ao observado para o grupo total dos pacientes asmáticos (Fig. 8).

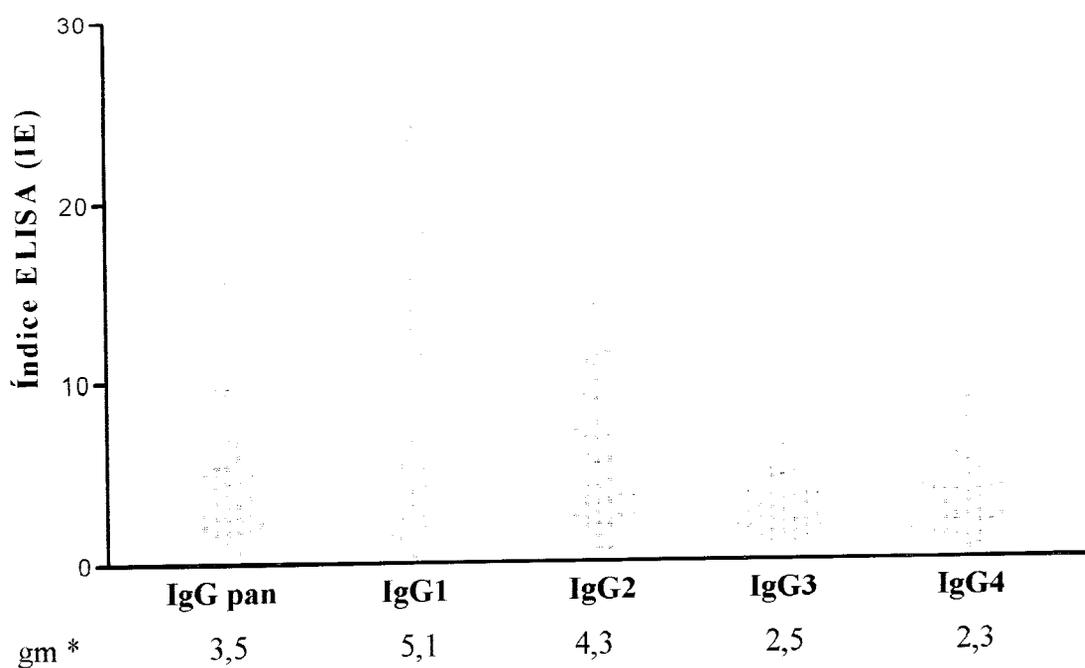


Fig. 7. Níveis de IgG pan e subclasses IgG1-4 específicas a *D. pteronyssinus* determinados em Índice ELISA em pacientes asmáticos IgE negativos pelos testes cutâneos e ELISA (n = 42). * Médias geométricas.

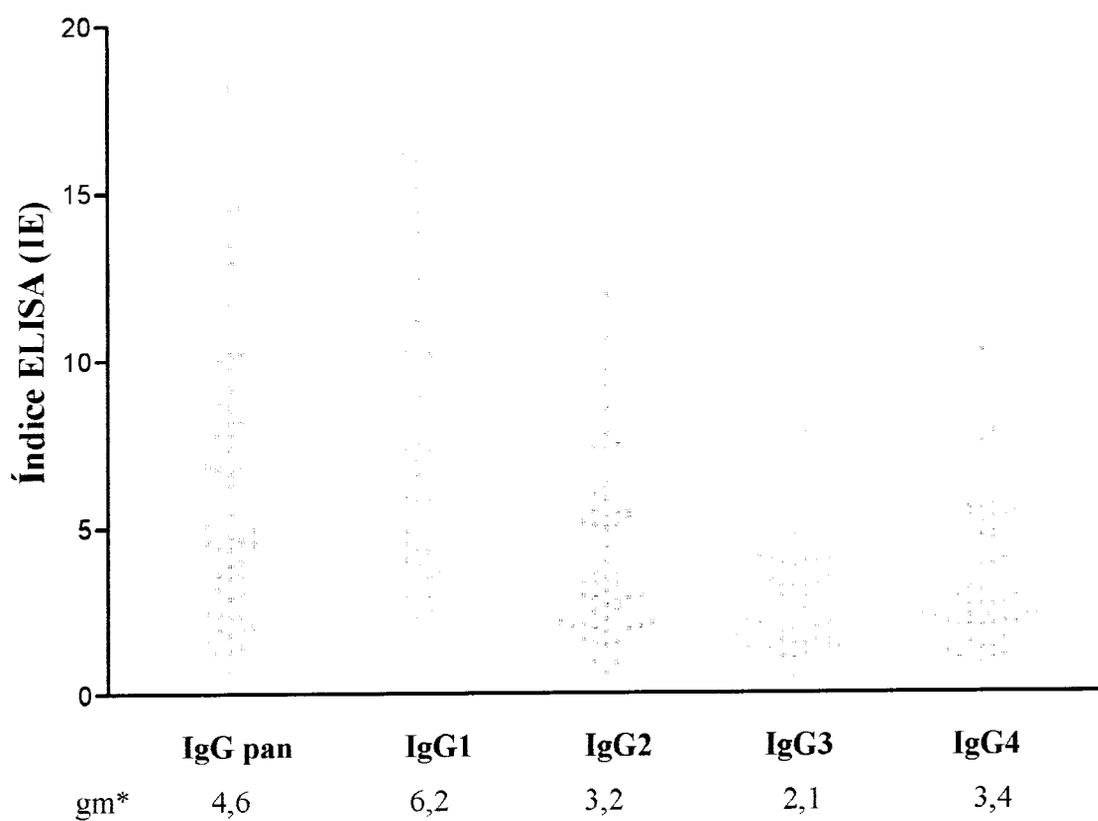


Fig. 8. Níveis de IgG pan e subclasses IgG1-4 específicas a *B. tropicalis* determinados em Índice ELISA em pacientes asmáticos (n = 55) IgE negativos pelos testes cutâneos e ELISA. * Médias geométricas.

5. DISCUSSÃO

A presença dos alérgenos de ácaros na poeira domiciliar constitui um dos mais importantes fatores de risco para a sensibilização de indivíduos atópicos e desenvolvimento de asma alérgica entre a população mundial (BAGGIO, 1989; PLATTS-MILLS *et al.*, 1989).

Neste estudo, foi avaliada a sensibilização aos ácaros *D. pteronyssinus* (Dpt) e *B. tropicalis* (Blo t) pela detecção de IgE por testes cutâneos, punctura e intradérmico, e ELISA, bem como a resposta de IgG e subclasses IgG1-4 específicas. Estas duas espécies de ácaros foram escolhidas para o trabalho por serem as mais prevalentes na poeira domiciliar de países tropicais como o Brasil (SARINHO *et al.*, 1996; GELLER *et al.*, 1993).

Os índices de positividade obtidos pelos testes cutâneos para Dpt e Blo t demonstraram uma considerável sensibilização a estes ácaros na população estudada. A positividade encontrada para Dpt de 58,4% ao teste intradérmico e punctura de 50,6% demonstra uma maior sensibilização a este ácaro entre a

população estudada. Estes resultados podem ser considerados bastantes satisfatórios uma vez que foi utilizado como critério de positividade pápula $\geq 5,0$ mm para o teste de punctura e pápula $\geq 8,0$ mm para o teste intradérmico. Prevalência ligeiramente superior (62,7%) foi encontrada por MEDEIROS Jr *et al.* (1997) utilizando teste punctura entre pacientes com asma brônquica e/ou rinite crônica em Salvador-BA, porém, utilizando como critério de positividade pápula $\geq 3,0$ mm. No entanto estes resultados foram concordantes com OLIVEIRA *et al.* (1998) ao encontrar positividade de 50% para Dpt utilizando teste punctura em estudantes de medicina da Unicamp.. Assim, a prevalência pode variar conforme a procedência do extrato, seleção de pacientes em serviços gerais ou especializados, tipo de teste cutâneo empregado, critérios de positividade, entre outros.

A prevalência ligeiramente inferior obtida para Blo t utilizando-se os testes intradérmico de 49,4% e punctura 33,7% evidencia uma menor sensibilização a este ácaro em nosso grupo estudado do que Dpt. No entanto, estes índices podem ser considerados elevados em função dos critérios utilizados. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por OLIVEIRA *et al.* (1998) de 33,3% utilizando o teste de punctura. Prevalência superior de 61,0% foi encontrada por GELLER *et al.* (1993) em pacientes asmáticos do Rio de Janeiro, utilizando teste de punctura, porém, utilizando critério de positividade pápula $\geq 3,0$ mm.

Apesar de termos encontrado uma maior positividade para Dpt do que Blo t aos testes de punctura e intradérmico, somente os resultados obtidos com teste de punctura demonstraram positividade significativamente maior para Dpt. A não ocorrência de diferença obtida para Dpt e Blo t utilizando-se o teste intradérmico é controverso e sugere resultados falso positivos para Blo t. Uma vez que estudos realizados em várias cidades brasileiras demonstraram uma

maior prevalência dos alérgenos de Dpt do que Blo t envolvidos na sensibilização de indivíduos atópicos. (ALBUQUERQUE *et al.*, 1998; SERRAVALLE & MEDEIROS Jr, 1999). Vale ressaltar que, entre os pacientes que apresentaram positividade a Dpt e Blo t somente pelo teste intradérmico, o resultado positivo ocorreu apenas em altas concentrações do extrato, ou seja, ≥ 10 AU/mL e $\geq 0,2$ μ g/mL, respectivamente para Dpt e Blo t, o que pode ter contribuído para os resultados mais elevados para o teste intradérmico.

A positividade de IgE específica encontrada para Dpt por ELISA foi de 34,8%, discordantes dos resultados obtidos por OLIVEIRA *et al.* (1998) que encontrou 63,6% de positividade entre estudantes de medicina da UNICAMP, utilizando a técnica de RAST. Os resultados obtidos por ELISA a Dpt foram significativamente menores em relação aos testes cutâneos, punctura e intradérmicos, A positividade ao Blo t de 13,5% pelo ELISA foi significativamente menor do que aos testes cutâneos de punctura e intradérmico. Resultados estes inferiores ao obtido por OLIVEIRA *et al.* (1998) ao encontrar 27,3% de positividade utilizando a técnica de RAST. O baixo índice de positividade encontrado a Dpt e Blo t pelo ELISA em relação aos testes cutâneos, possivelmente está ligado ao valor do limiar de positividade obtido neste estudo de 3,4 EU/mL e 5,0 EU/ml para Dpt e Blo t respectivamente, resultados falsos positivos obtidos nos testes cutâneos ou uma maior especificidade do ELISA.

A resposta de IgG pan e IgG1-4 específicas a Dpt, mostrou-se níveis significativamente mais elevados entre os pacientes asmáticos do que controles. Estes resultados foram concordantes aos encontrados por OSHIKA *et al.* (1992) e RIZZO *et al.* (1993), que encontraram níveis de IgG pan e subclasses específicas aos alérgenos de ácaros mais elevados em crianças com asma

brônquica do que controles. Estes resultados sugerem uma exposição por tempo prolongado aos alérgenos deste ácaro no grupo de pacientes asmáticos, uma vez que a resposta IgG geralmente ocorre secundariamente e exige um maior tempo de exposição frente ao alérgeno.

As subclasses IgG1 e IgG2 específicas a Dpt apresentaram níveis semelhantes entre os pacientes asmáticos, o mesmo ocorrendo com as subclasses IgG3 e IgG4. No entanto os níveis de IgG1 e IgG2 foram maiores do que IgG3 e IgG4. Resultados semelhantes foram obtidos por SMITH *et al.* (1998), quando encontraram níveis mais elevados de IgG1 específica a Der p 2 em mais de 60% das crianças expostas a baixo nível de alérgeno de Dpt. No entanto, estes mesmos autores encontraram níveis mais elevados de IgG1 e IgG4 entre as crianças expostas a níveis elevados deste alérgeno. A mudança no nível de IgG4 encontrada por este autor também foi observado por AALBERSE *et al.* (1993), ao encontrado maior nível de subclasse IgG1 específica ao veneno de abelhas em apicultores amadores, enquanto que entre apicultores profissionais foi encontrado níveis elevados de IgG1 e IgG4. Diante destes resultados a subclasse IgG4 parece ser mais sensível às mudanças dos níveis de exposição aos alérgenos dos ácaros. NAHM *et al.* (1998), observaram também uma mudança dos níveis de IgG2 e IgG4 específicas a *D. pteronyssinus* proporcional aos níveis deste alérgeno na poeira domiciliar de pacientes asmáticos. Sendo assim os níveis mais elevados de IgG1 encontrados nestes pacientes pode estar ligado a uma exposição a níveis menos elevados do alérgeno.

Analisando a correlação entre os níveis de IgG1-4 específicas e níveis de IgE entre os pacientes asmáticos atópicos, isto é, com teste de punctura ou ELISA positivo à Dpt, foi encontrado uma boa correlação entre IgG3 e IgG4. Semelhantes resultados foram obtidos por ROSE *et al.* (1998), ao encontrar uma

correlação entre os níveis de IgE com níveis de IgG entre pacientes asmáticos recebendo imunoterapia ao extrato de *Dermatophagoides*. Resultados estes discordantes aos encontrados por SMITH *et al.* (1998), quando não encontraram correlação entre níveis de IgE e subclasses de IgG1-4 específicas a Der p 2 em crianças asmáticas expostas níveis altos e baixos de Dpt. A correlação encontrada por nós neste estudo, evidencia uma ligação da resposta entre estes anticorpos, provavelmente estimuladas pelos mesmos mecanismos imunológicos.

A não correlação entre as subclasses IgG1 e IgG2 com níveis de IgE entre os pacientes asmáticos atópicos, sugere que estas subclasses de IgG são produzidas por mecanismos independentes da IgE.

A IgG pan e subclasses de IgG específicas a *B. tropicalis* também foram significativamente maiores entre os pacientes asmáticos do que os indivíduos controles exceto para IgG2 ($p > 0,05$). Diferente ao encontrado para Dpt, nenhuma das subclasses de IgG específicas a Blo t apresentaram correlação com níveis de IgE entre os pacientes asmáticos atópicos. Resultados estes semelhantes aos encontrados por RIZZO *et al.* (1993) e SMITH *et al.* (1998) ao não encontrarem correlação entre os níveis de IgE e IgG pan e subclasses de IgG entre pacientes com asma alérgica.

A discordância encontradas entre os níveis de IgE e subclasses de IgG específicas à Blo t, entre pacientes asmáticos atópicos, foram também obtidas por GWYNN *et al.* (1982) e SMITH *et al.* (1998), quando encontraram níveis elevados de subclasses de IgG tanto em pacientes RAST positivos e RAST negativos. O fato de não ter ocorrido uma correlação da resposta IgG para Blo t sugere uma menor exposição a este alérgeno, diante dos resultados de IgE obtidos por ELISA.

Os níveis elevados de subclasses de IgG entre os pacientes asmáticos pode indicar um papel protetor nas doenças alérgicas, como foi observado por OHASHI *et al.* (1987) e ROSE *et al.* (1996), ao encontrarem níveis elevados de subclasses de IgG e principalmente IgG4, entre pacientes asmáticos recebendo imunoterapia ao alérgeno de *Dermatophagoides*

Desta forma, a resposta de subclasses de IgG específicas aos ácaros Dpt e Blo t entre pacientes asmáticos atópicos e não atópicos, demonstra uma dinâmica muito grande e estudos futuros são necessários para melhor elucidar o papel das subclasses de IgG nas doenças alérgicas.

6. CONCLUSÃO

A utilização de concentrações \geq AU/mL e \geq 0,2 μ g/ml para Dpt e Blo t respectivamente, podem causar resultados falsos positivos no teste intradérmico.

Os níveis de IgG pan e subclasses de IgG específicas a Dpt e Blo t foram mais elevados entre os pacientes asmáticos do que os controles.

A correlação encontrada entre IgE com IgG3 e IgG4 específicas a Dpt sugere que estas subclasses de IgG podem ser produzidas por mecanismos semelhantes ao da IgE.

Os níveis mais elevados de IgG pan e subclasses IgG1-4 a Dpt e Blo t foram encontradas tanto em pacientes asmáticos atópicos como também entre os não atópicos. Isto mostrou que a resposta IgG específica aos ácaros da poeira em pacientes asmáticos é dinâmica e complexa e futuros estudos serão necessários para melhor compreender a fisiopatologia da resposta IgG entre estes pacientes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAAAI Board directors. Measurement of specific and nonspecific IgG4 levels as diagnostic and prognostic tests for clinical allergy. **J Allergy Clin Immunol.**, vol. 95, n. 3, 652-4, 1995.

AALBERSE, R. C., MILLIGEN, F. V., TAN, K. Y. *et al.* Allergen-specific IgG4 in atopic disease. **Allergy**, vol. 48, May, 559-69, 1993.

AARONSON, D. W. Asthma: general concepts. In: PATTERSON, R. **Allergic Diseases: Diagnosis & Management**, 2 ed. Philadelphia. J. B. Lippincott company. 1980. 697p.

- ALBUQUERQUE, A. C., GUIMARÃES, A. M. T. FERNANDES & MARCO, A. K. A. *et al.* Estudo da acarofauna em poeira domiciliar em pernambuco. In: **XXII Congresso Brasileiro de Zoologia**, 1998. Pernambuco. Universidade Federal de Pernambuco. 365p, p. 107.
- AMBRÓSIO, L. C., BAGGIO, D., MORI, J. C. *et al.* Sudásia pontifica: alergizantes de vias respiratórias? Investigação preliminar de antígenos de outros gêneros de ácaros da poeira domiciliar. **Rev Bras Alerg Imunopatol**, vol.12, n.1, 14-23, 1989.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. Standards for the Diagnosis and care of patients with chronic obstructive Pulmonary Disease (COPD) and Asthma. **Am Rev Respir Dis**, New York, vol.136, n.1, p.225-30, 1987.
- ARRUDA, L. K., VAILES, L. D. PLATTS-MILLS, T. A. E. *et al.* Sensitization to *blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. **Am J resp Crit care Med**, vol. 155, n.1, 343-350, 1997.
- BAGGIO, D., AMBRÓZIO, L. C., ANTILLA, M. A. Ácaros ambientais e as manifestações alérgicas. **Rev Bras alergia imunopatol**, vol.12, n.2, 56-68, 1989.
- BARNES, R. D., RUPPERT, E. E. **Zoologia dos Invertebrados**, Traduzido por Paulo Marcos Oliveira. 6^aed. São Paulo, Roca LTDA.1996, 1026p.

- BOOY-NOORD, H., ORIE, N. G. M. VRIES, D. Immediate and late bronchial obstructive reaction to inhalation of house dust and protective effects of disodium cromoglycate and prednisolone. **J Allergy clin Immunol**, vol. 48, n. 6, 344-54, 1971.
- BORGES, F. A. C., MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**, Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1997.
- CALL. R. S., SMITH, T. F. MORRIS, E. *et al.* Risk factor of asthma in inner city. **J Pediatrics**, vol. 121, n. 6, 862-6, 1992.
- CARVALHO, L. P. RIOS, J. B. M. Alergia no Aparelho Respiratório. In: **Alergia Clínica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 460p. p.150-174.
- CHAPMAN, M. D., HEYMAN, P. W., SPORIK, R. B. *et al.* Monitoring allergen exposure in Asthma: new treatment strategies. **Allergy**, Stockholm, vol.50, n.1, p.29-33, 1995.
- CHAPMAN, M. D., SMITH, A. M., ARRUDA, V. L. D. Recombinant mite allergen. **Allergy**, vol.52, n. 4, 374-79, 1997.
- II CONSENSO BRASILEIRO NO MANEJO DA ASMA. **Rev Bras Alergia Imunopatol**, vol.21, (Suple 1), 176-77, 1998.

- CHEW, F. T., ZHANG, L., HO, T. M., *et al.* House dust mite of tropical singapore. **Clin Exp Allergy**, vol. 29,n. 2, 201-6, 1999.
- DUFF, A. L., PLATTS-MILLS, T. A. E. Allergens and Asthma. **Pediatric Clinics of North America**, vol. 39, n. 6, p.1277-91, 1992.
- FIREMAN, P., JELKS, M. Allergens. In: FIREMAN, P., SLAVIN, R. **Atlas of allergies**, 2^a ed. Mosby-Wolfe. 1996, p.161.
- FRICK, O. L. Hipersensibilidade Imediata. In: FUDENBERG, H. H., STITES, D. P., CALDWELE, J. L. et al., **Imunologia Básica e clínica**, 2^a ed. Rio de Janeiro. Guanabara Coogan.1980, 244-64, 727p.
- GAROFALO, R., KIMPEN, J. L. L., WELLIVER, R. C. *et al.* Eosinophil degranulation in the respiratory tract during naturally acquired Respiratory Syncytial Virus infection. **J Pediatr**, vol. 120, n. 1, 28-32, 1992.
- GELLER, M. ESCH, R. E. CALDAS, E. F. Sensibilização acarina na atopia respiratória do Rio de Janeiro - Considerações Preliminares. **An Acad Nac Med**, vol.153, n.4, p.174-75, 1993.
- GELLER, M. Alergia aos ácaros no rio de Janeiro. **JBM**, vol. 71, n.1, 164-70, 1996.

GREENBERGER, P. A., PATTERSON, R., FALLERONI, A. Asthma Management. In: PATTERSON, R.. **Allergic Diseases: Diagnosis & Management**, 2^a ed. J. B. Leppencatt company. 1980, p279-325, 697p.

GWYNN, C. M., SMITH, J. M., LEON, L. G. *et al.* Role of IgG4 subclass in childhood. **Lancet**, vol. I, n. 8070, 910-11, 1978.

GWYNN, C. M., INGRAM, J. ALMOUSAWI, T. *et al.* Bronchial provocation tests in atopic patients with allergen-specific IgG4 antibodies. **Lancet**, vol.I, 254-6, 1982

JAN, A.K. **Asma em crianças**, Traduzido por Jose Mendonça Primo. São Paulo: Manole, 1979. 143p.

KOBAYASHI, I., SKIYAMA, Y., TAME, A. *et al.* IgE and IgG4 antibodies from patients with mite allergy recognize different epitopes of Dermatoghaoides pteronyssinus group 2 antigen (Der p2). **J Allergy Clin Immunol**, vol.97, n.2, p.638-45, 1996.

KOREN, H. S. Enviromental risk factors in atopic asthma. **Int Arch Allergy Immunol**, vol. 113, n. 1-3, 65-68, 1997.

KUEHR, J. Mensurement of mite allergen in the environment. **Allergy**, vol.52, n.4, 380-82, 1997.

- McFADDEN Jr, E. R., STEVENS, J. B. A History of asthma. In: MIDDLETON Jr, E., RIED, C. E., ELLIS, E. F.. **Allergy: Principles and Praticce**, 2 ed. St. Louis. The C. V. Mosby-Company. 1983. 805-06. 1429p.
- MALHEIROS, M. T. S. R., BARROS, M. A. M. T. MACHADO, L. *et al.* Ácaros de estocagen: Importância na sensibilização de doentes com sintomas de alergia respiratória. **Rev Bras Alergia Imunopatol**, vol.13, n.6, 1990.
- MEDEIROS JR., M. FIGUEIREDO, J. P. Sensibilização a Aeroalérgenos em Indivíduos com Asma brônquica e/ ou Rinite Crônica em Salvador, Bahia. **Rev Bras Alergia Imunopatol**, vol. 20, n. 4, 1997.
- NAHM, D. H., PARK, H. S., KIM, C. W. *et al.* Seasonal variation of IgG subclass antibodies to house dust mite in sera from mite-sensitive asthmatic patients. **Ann Allergy Asthma Immunol**, vol. 80, May, 411-15, 1998.
- NELSON, H. S. & FERNANDEZ-CALDAS, E. Prevalência of house dust mites in the Rocky Moutain states. **Ann allergy Asma Immunol**, vol.75, n.4, 337-39, 1995.
- NETO, J., CROCE, J., BAGGIO, D. Ácaros da poeira domiciliar na cidade de São Paulo - considerações preliminares. **Rev Bras Alergia Imunopatol**, vol. 2, n.3, 140, 1989.

- OHASHI, Y., NAKAI, Y., KIHARA, S. *et al.* House dust mite-specific IgE, IgG4 antibodies in patients with perennial rhinitis. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, vol. 96, n. 4, 434-7, 1987.
- OLIVEIRA, C. H., TAKATA, L. M. H., JUN, H. S. *et al.* Avaliação da sensibilização imediata a aeroalérgenos. **Rev Bras alergologia Imunopatol**, vol. 21, n. 1, 3-4, 1998.
- OSHIKA, E., KUROKI, Y., SAKIYAMA, Y. *et al.* Measurement of IgG subclass antibodies to the group II antigen of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p II) in sera from children with bronchial asthma. **Ann allergy**, Vol. 69, 427-432, 1992.
- PEAT, J. K., TOVEY, E., TOELLE, B. G. *et al.* House dust mite allergens. **Am Resp Crit Care Med**, vol. 153, n. 1, 141-6, 1996.
- PLATTS-MILLS, T. A. E., THOMAS, W. R., AALBERSE, R. C. *et al.* Dust mite allergens and asthma: Report of a second international workshop. **J Allergy Clin Immunol**, vol. 89, n. 5, 1046-60, 1992.
- PLATTS-MILLS, T. A. E., ESPORIK, R. B., CHAPMAN, M. D. *et al.* The role of indoor allergens in asthma. **Allergy**, vol. 50(suppl 22), 5-12, 1995.

- PLATTS-MILLS, T. A. E. Estimation of allergen concentration in indoor environments: Prediction of health-related effects. In: CAMAGE, R. B., BERVEN, B. A. **Indoor Air and Human Health**, 2 ed. Lewis Publishers. 1996. 197-207.
- PLATTS-MILLS, T. A. E., WECK, A. L. Dust mite allergens and asthma a worldwide problem. Report of an International Workshop. **J Allergy Clin Immunol**, vol.83, p.416-427, 1989.
- PLATTS-MILLS, T. A. E., SQUILLACE, S. P. Allergen sensitization and perennial asthma. **Int Arch Allergy Immunol**, vol. 113, 83-86, 1997.
- REIS, A. P. Controle ambiental das doenças alérgicas: pros e contras. **Rev Bras Alergia Immunopatol**, vol.21, n. 4, 112-121, 1998.
- RING, J. Allergy and modern society: does 'western life style' promote the development of Allergies?. **Int Arch Allergy Immunol**, vol. 113, n. 1-3, 7-10, 1997.
- 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 Brasil. **Ann Allergy**, vol.71, n.2, 152-58,1993.
- ROBINSON, D. S., HAMID, Q., YING, S. *et al.* Predominant Th2-like broncho alveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **N Eng J Med**, vol. 326, n. 5, 298-304, 1992.

- ROSE, G., ARLIAN, L., BERNSTEIN, D. *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. **J Allergy Clin Immunol**, vol. 97, n. 5, 1071-8, 1996.
- ROSENWASSER, L. Genetics of atopic and asthma: Promoter-Based candidate gene studies for IL-4. **Int Arch Allergy Immunol**, vol. 113, n.1-3, 61-4, 1997.
- RUIZ, R. G., PRICE, J. F., DEMENY, D. M. Specificity of ELISA for IgG subclass antibodies against inhalant antigens in early childhood. **Allergy**, vol. 49, n. 9, 719-23, 1994.
- SARINHO, E. CALDAS, E. F. JUST, E. SALE, D. Ácaros da poeira domiciliar em residências de crianças asmáticas e controles da cidade de Recife, PE. **Rev Bras alergia imunopatol**, Vol. 19, n. 5, p.228-30.
- SERRAVALLE, K., MEDEIROS, Jr, M. Ácaros da poeira domiciliar na cidade de salvador-BA. **Rev Bras Alergia Imunopatol**, vol. 22, n. 1, 19-24, 1999.
- SKONER, D. P. Asthma. In: FIREMAN, R., SLAVIN, R. G. **Atlas of allergies**, 2ªed. Pittsburgh: Mosby- Wofe, 1996. 295p. p. 75-108.
- SLY, R. M. Changing asthma mortality. **Ann Allergy**, washington, vol.73, n. 3, 259-68, 1994.

SMITH, J. M. Epidemiology and natural history of asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis (eczema). In: MIDDLETON Jr., RIED, D. E., ELLIS, E. F. **Allergy: principles and practice**, 2^a ed. ST.Louis. The C. V. Mosby-company. 1983. 771-803.

SMITH, A. M., YAMAGUCHI, H. PLATTS-MILLS, T. A. E. *et al.* Prevalence of IgG anti-Der p 2 antibodies in children from high and low antigen exposure groups: relationship of IgG and subclass antibody responses to exposure and allergic symptoms. **Clin Immunol Immunopathol**, Charlottesville USA, vol. 86, n.1, p.102-109, 1998.

SPIEKSMAN, F. TH. M. Domestic mites from an acarologic perspective. **Allergy**, vol. 52, n.4, 360-68, 1997.

SPORIK, F., PLATTS-MILLS, T. A. E. Epidemiology of dust-mite-related disease. **Exp Appl Acarol**, vol.16, p.141-51, 1992.

SPORIK, R. B., HOLGATE, S. T., PLATTS-MILLS, T. A. E. *et al.* House dust mite allergen (Der p 1) exposure and development of sensitization and asthma in childhood: a prospective study. **N Engl J Med**, vol.323, n.8 p.502-507, 1990.

- TAME, A. SAKIYAMA, Y., KOBAYASHI, I. *et al.* Differences in titres of IgE, IgG4 and other subclass anti-Der p 2 antibodies in allergic and non allergic patients measured with recombinant allergen (Abstrat). **Clin Exp Allergy**, vol 26, n.1, p.43-49, 1996.
- TOGIAS, A., HOROWITZ, D., JOYNER, D. *et al.* Evaluating the factores relate to asthma severity in adolescents. **Int Arch Allergy Immunol**, vol. 113, n. 1-3, 87-95, 1997.
- TSAI, J., WU, H. L., SHEN, D. H. *et al.* Sensitization to *Blomia tropicalis* among asthamtic patients in Taiwan. **Int Arch Allergy Immunol**, vol. 115, n. 2, 144-49, 1998.
- TUPKER, R. A., CONCHHY, J. G. R., COENRAADS, P. B. *et al.* Indution of atópic by inhalation of house dust mite. **J Allergy Clin Immunol**, vol. 97, n.5, 1064-70, 1996.
- VEGA, L., GUÉRIN, L., HART, B. House dust mite (HDM) in the Rio Negro and Neuquém Upper valley, north Patagonia, argentina: a preliminary approach. **Allergy**, vol. 53, n. 43, 44, 1998.
- WILSON, M. B., NAKANE, P. K. Antibody conjugated to horse-radish peroxidase. In: Karpp, W., HALUBAR, K. **Immunofluorescence and related staing technique**, Elsevier North Holland Biomedical press, 1978, p. 215-224.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Departamento de Patologia

Disciplina de Imunologia

Unidade de Pesquisa em Alergia e Doenças Infecciosas

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,.....

consinto na utilização de parte do sangue colhido no Laboratório Central da Universidade Federal de Uberlândia para realização de testes sorológicos em prol da pesquisa de alergia à ácaros da poeira de casa, sob orientação do Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi no Laboratório de Imunologia desta mesma Universidade.

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação.

Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação.

Uberlândia,de.....de 199....

.....
Assinatura

IDENTIFICAÇÃO:

NOME:

IDADE:

SEXO:

PROFISSÃO:

QUESTIONÁRIO

A- ASMA

1) Já teve chiado no peito ou crise de bronquite ou asma?

SIM

NÃO (pule para o item B)

2) Quando foi a primeira vez?

< 1 ano

1-5 anos

6-12 anos

>12 anos

3) Quantas vezes por ano tem crise?

1-3

4-12

>12

4) Nos últimos 12 meses quantas crises teve?

nenhuma

1-3

4-12

> 12

5) Qual a pior época do ano?

ano todo

verão

inverno

6) Qual o período do dia que mais aparece?

durante o dia

à noite

ambos

7) Acorda à noite com tosse ou falta de ar?

SIM

NÃO

8) Tem crise quando toma aspirina ou AAS?

SIM

NÃO

9) Tem crise quando corre ou faz exercício?

SIM

NÃO

10) Quais os sintomas que tem durante a crise?

chiado no peito falta de ar tosse outros _____

11) Tem crise após contato com:

poeira de casa mofo cão gato

bebida gelada cheiro forte fumaça de cigarro

gripe ou resfriado frio calor

Alimentos(qual? _____)

outros _____

12) Você fuma?

SIM

NÃO(pular para item 15)

13) Quantos cigarros por dia?

<10

10-20

>20

14) Tem alguém próximo a você que fuma (em casa ou no trabalho)?

SIM

NÃO

15) Já precisou de pronto-socorro para melhorar da crise?

SIM (só inalação) SIM (inalação + “soro” na veia) NÃO

16) Quantas vezes ao ano foi ao pronto-socorro?

1-3

4-12

>12

17) Já ficou internado pelo chiado ou por falta de ar?

SIM

NÃO

18) Quantas vezes?

1-3

4-12

>12

19) Qual o tempo máximo de internação que já teve?

1 dia

até 3 dias

até 1 semana

> 7 dias

C - RINITE

1) Já teve problema de rinite (espirros ou corrimento ou obstrução ou coceira no nariz) sem estar gripado ou resfriado?

SIM NÃO (pule para o item C)

2) Qual o sintoma que mais lhe afeta?

espirros coceira coriza obstrução todos

3) Desde que idade?

<1 ano 1-4 anos 5-12 anos >12 anos

4) Quantas vezes no último ano?

1-3 4-12 >12

5) Em que época do ano ocorreu?

ano todo verão inverno

6) Qual o pior período do dia?

dia todo manhã noite

7) Esse problema nasal já foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos? SIM NÃO

8) Quantas vezes no último ano suas atividades diárias foram atrapalhadas pela rinite e/ou asma?

nenhuma poucas moderadamente muitas

9) Faz uso de medicação contínua?

NÃO SIM. Quais _____

20) Já necessitou de UTI para tratar a crise?

SIM NÃO

21) Quantas vezes?

1 2-5 > 5

22) Faz uso de medicação contínua?

NÃO SIM (quais).....

B- DERMATITE

1) Já teve manchas vermelhas com coceira na pele (eczema) em região de cotovelos, joelhos, tornozelos, abaixo das nádegas, pescoço, orelhas ou perto dos olhos ?

SIM NÃO (pule para o item C)

2) Desde que idade?

<1 ano 1-4 anos 5-12 anos >12 anos

3) Alguma vez no último ano as lesões desapareceram completamente?

SIM NÃO

4) A coceira prejudicou seu sono?

SIM NÃO

5) As lesões aparecem ou pioram com:

poeira perfume talco desinfetante giz
 alimentos (quais? _____)
 medicamentos (quais? _____)
 outros _____
 nada

6) Já teve que tomar corticóide (oral ou tópico) para melhorar a pele?

SIM NÃO

D- INFECCÕES

1) Já teve sinusite?

SIM

NÃO (pule para a questão 4)

2) Quantas vezes?

1

2-5

5-12

>12

3) Tratou com antibiótico?

SIM

NÃO

4) Já teve otite (infecção de ouvido)?

SIM

NÃO (pule para a questão 7)

5) Quantas vezes?

1

2-5

5-12

>12

6) Tratou com antibiótico?

SIM

NÃO

7) Já teve pneumonia?

SIM

NÃO (pule para a questão 10)

8) Quantas vezes?

1

2-5

5-12

>12

9) Tratou com antibiótico?

SIM

NÃO

10) Teve outros tipos de infecção? Quais?

Skin Prick Test __ Asma Controle

Nome:

Data Nasc.:

Endereço:

Telefone.:

Antígeno	Pápula	Eritema	Antígeno	Pápula	Eritema
<i>Bt</i>					
<i>Df</i>					
<i>Dpt</i>					
<i>Controle</i>					
<i>Histamina</i>					

Skin Prick Test __ Asma Controle

Nome:

Data Nasc.:

Endereço:

Telefone.:

Antígeno	Pápula	Eritema	Antígeno	Pápula	Eritema
<i>Bt</i>					
<i>Df</i>					
<i>Dpt</i>					
<i>Controle</i>					
<i>Histamina</i>					

rBlo t 5 and rDer p 5 - SKIN TESTING

Name _____ Age _____
Address _____ Phone No. _____
History number _____ Date _____
Diagnosis _____

PRICK SKIN TESTS:

Histamine _____
HSA diluent _____
D. pteronyssinus _____
B. tropicalis _____
rDer p 5 _____
rBlo t 5 _____
GST _____

INTRADERMAL TESTS:

D. pteronyssinus

0.001 AU/ml _____
0.01 AU/ml _____
0.1 AU/ml _____
1 AU/ml _____
10 AU/ml _____
100 AU/ml _____

B. tropicalis

2×10^{-4} _____
 2×10^{-3} _____
 2×10^{-2} _____
 2×10^{-1} _____
 2×10^0 _____
 $20 \mu\text{g/ml}$ _____

rDer p 5

10^{-5} _____
 10^{-4} _____
 10^{-3} _____
 10^{-2} _____
 10^{-1} _____
 $10^0 \mu\text{g/ml}$ _____

rBlo t 5

10^{-5} _____
 10^{-4} _____
 10^{-3} _____
 10^{-2} _____
 10^{-1} _____
 $10^0 \mu\text{g/ml}$ _____

Please record wheal size and erythema (in parenthesis) for each skin test performed.