

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

**Anticorpos anti-*Demodex canis* e
Dermatophagoides pteronyssinus em soro
de cães com demodicose**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte das exigências
para obtenção do Título de Mestre

Maria Cecília de Oliveira

**UBERLÂNDIA
2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

**Anticorpos anti-*Demodex canis* e
Dermatophagoides pteronyssinus em soro
de cães com demodicose**

Maria Cecília de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Neide Maria da Silva

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte das exigências
para obtenção do Título de Mestre

**UBERLÂNDIA
2005**

SUMÁRIO

ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Tipo de Demodicose	17
1.2. Aspectos Imunológicos	18
1.3. Diagnóstico	19
1.4. Tratamento	20
1.5. Outros Ácaros mais frequentemente envolvidos em dermatites animais	20
1.5.1. <i>Sarcoptes scabiei</i>	20
1.5.2. <i>Myocoptes musculinus</i>	21
1.5.3. <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	21
1.6. Fungos	22
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVO	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Inquérito epidemiológico	25
4.2. Animais e amostras biológicas	25
4.3. Análise do raspado de pele	26
4.4. Preparo do antígeno solúvel homólogo de <i>Demodex canis</i> (SDAg)	27
4.5. Preparo dos antígenos solúveis heterólogos SMAg (<i>Myocoptes musculinus</i>) e SDpt (<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>)	27
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida	29
4.7. Padronização de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>D. Canis</i>	30

4.8. Padronização de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>M. musculus</i> e anti- <i>D. pteronyssinus</i>	31
4.9. Padronização de ELISA para detecção de anticorpos IgE anti- <i>M. musculus</i> e anti- <i>D. pteronyssinus</i>	32
4.10. Contagem de eosinófilos	33
4.10.1. Preparação do corante de Wright	33
4.12. Análise estatística	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Inquérito epidemiológico	35
5.2. Análise de positividade do raspado de pele	36
5.3. Perfil protéico dos antígenos SDAg, SMAg e SDpt	37
5.4. Padronização de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>D. canis</i>	40
5.5. Padronização da técnica ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>D. canis</i> utilizando os antígenos heterólogos de <i>D. pteronyssinus</i> e <i>M. musculus</i>	42
5.6. Detecção de anticorpos IgG anti- <i>D. pteronyssinus</i> e <i>M. musculus</i>	46
5.7. Detecção de anticorpos IgE anti- <i>D. pteronyssinus</i> e anti- <i>M. musculus</i> por ELISA em soros de cães com sintomas clínicos de doenças de pele	51
5.8. Quantificação de eosinófilos no sangue periférico de cães com sintomas clínicos de sarna demodécica e positivos no raspado de pele e de cães aparentemente saudáveis	55
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	60

A Deus, por estar sempre presente em minha vida me dando força para atravessar todos os obstáculos.

À minha família que sempre me apoiou de todas as formas.

À Profa. Dra. Neide Maria da Silva, pelos ensinamentos, paciência e exemplo de dedicação e competência.

À Deise Aparecida de Oliveira e Silva, por sua dedicação e ajuda indispensável.

À Profa. Dra. Janethe Deolina de Oliveira Pena, pela colaboração, disponibilidade e amizade.

À Profa. Dra. Ronize Andréia Ferreira, por ter aceitado o convite para participar de minha banca.

À Profa. Dra. Margareth Leitão Gennari, pela amizade e por ter aceito participar de minha banca.

Ao Prof. Dr. José Eugênio Dinis Bastos, pela contribuição com materiais biológicos apoio didático.

A Adalberto de Albuquerque Pajuaba Neto, pela contribuição com amostras biológicas.

Ao Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, pela colaboração e pelos reagentes gentilmente cedidos.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, pelo uso de seus reagentes e laboratório.

À Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz, pelos ensinamentos e colaboração.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda nos momentos difíceis, amizade e descontração, que foram fundamentais.

Aos secretários do curso e aos técnicos de laboratório, que sempre me auxiliaram com muito carinho.

RESUMO

A demodicose canina é uma das doenças mais comuns da pele encontradas na prática veterinária. As lesões típicas são feridas eritematosas alopecicas encontradas na cabeça e ou membros. Afim de verificar a produção de anticorpos IgG e IgE contra antígenos homólogos de *Demodex canis* (SDAa) e antígenos heterólogos solúveis de *Dermatophagoides pteronyssinus* (SDpt) e de *Myocoptes musculus* (SMAg). Raspados de pele e amostras de sangue foram coletados para analisar a presença de ácaros na pele, eosinófilos e produção de anticorpos por ELISA, respectivamente. As amostras foram coletadas de 27 cães, sendo três saudáveis com mais de 12 meses, 20 de cães com lesões de pele e 4 de cães saudáveis com menos de 12 meses. Os antígenos homólogos não foram hábeis para discriminar amostras de soros controles positivas e negativas. Quando antígenos heterólogos foram usados para detectar anticorpos IgG eles não podiam discriminar cães sintomáticos de assintomáticos, além disso observou-se que cães com menos de 12 meses sintomáticos e assintomáticos eram reativos ao antígenos heterólogos. Entretanto quando os antígenos heterólogos eram usados para detectar anticorpos IgE, observou-se que os cães sintomáticos, apresentaram anticorpos IgE específicos quando tinham mais de 12 meses de idade. Os cães assintomáticos não apresentavam anticorpos específicos contra antígenos heterólogos. Contudo antígenos solúveis de *D. canis*, *D. pteronyssinus* e *M. musculus* apresentavam algumas proteínas com pesos moleculares semelhantes. Isto sugere que *D. canis*, *D. pteronyssinus* e *M. musculus* sejam parentes e compartilham alguns antígenos semelhantes, induzindo produção de anticorpos com reatividade cruzada

Palavras chave: *D. canis*, *D. pteronyssinus*, *Myocoptes musculus*, Cães, IgG, IgE

ABSTRACT

Canine demodicosis is one of the more common skin diseases encountered in veterinary practice. Typical lesions are erythematous and alopecic patches on the head and / or forelegs. In order to verify the specific IgG and IgE antibody production against homologous, *Demodex canis* soluble antigen (SDAg), and heterologous, *Dermatophagoides pteronyssinus* (SDpt) and *Myocoptes musculus* (SMAg) soluble antigens, this study was done. Skin scrapes, blood and serum samples, were collected to analyze the presence of the acarian in the skin, eosinophils and antibody production by ELISA, respectively. The samples were collected from 27 dogs, 3 from healthy dogs that were more than 12 months old, 20 from dogs with skin lesions and 4 from healthy young dogs (less than 12 months old). The homologous antigen was not able to discriminate between positive and negative control serum samples. When heterologous antigens were used to detect IgG antibodies, both of them were not able to discriminate symptomatic and non symptomatic dogs. In addition, it was observed that young dogs (those with less than 12 months old) symptomatic and non symptomatic dogs were reactive to heterologous antigen. However, when heterologous antigens were used to detect IgE antibodies, it was observed that symptomatic dogs presented IgE specific antibodies when they were more than 12 months old. The non symptomatic dogs did not presented specific antibody against heterologous antigens. Additionally, soluble antigens from *D. canis*, *D. pteronyssinus* and *M. musculus* presented some proteins with similar molecular weight. These data suggest that *D. canis* and related parasites *D. pteronyssinus* and *M. musculus* shared some antigens that induce production of cross reactive antibodies.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	microgramas
µL	microlitro
°C	grau Celsius
HV-FAMEV	Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária
mM	milimolar
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	<i>phenylmethysulfonyl fluoride</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
SDAg	antígeno solúvel de <i>Demodex canis</i>
LEA	Laboratório de Experimentação Animal
PBS	solução salina tamponada com fosfato
ABNT	associação brasileira de normas técnicas
SDpt	antígeno solúvel de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
SMAg	antígeno solúvel de <i>Myocoptes musculus</i>
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida contendo sulfato duodecil de sódio
HCl	ácido clorídrico
EDTA	ácido etileno diamino tetra acético
APS	persulfato de amônio
IgG	imunoglobulina G
PBS-T	solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20 (<i>polyoxyethylene-sorbitan monuaurate</i>)
BSA	soro albumina bovina
OPD	ortofenilenodiamina
H ₂ O ₂	água oxigenada
DO	densidade óptica
<i>cut off</i>	limite de positividade
IE	índices ELISA
IgE	Imunoglobulina E

kDa

kilodalton

1. INTRODUÇÃO

A sarna demodécica é também conhecida como “Sarna do Folículo Piloso”, “Sarna Folicular” ou “Sarna da Lepra dos Cães”, ela é causada pelo ácaro *Demodex canis* (LEYDIG, 1859). Este ácaro pertence ao reino Animália, sub-reino metazoa, filo Athropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Actinedida, subordem trombidiforme, família Demodicidae (MARCONDES, 2001; NEVES, 2005). Esta espécie faz parte da fauna normal da pele canina, estando presente em números diminutos nos cães saudáveis. Desordens clínicas (alterações de defesa local da pele, supressão da imunidade celular, etc.) resultam em alopecia e eritema que são conhecidos como demodicose (NORN, 1970; SCOTT; MULLER; GRIFFIN, 2001; SARKAR et al., 2004).

O gênero *Demodex* é encontrado em muitos animais, por exemplo, *D. folliculorum* e *D. brevis* em humanos (NORN, 1970), *D. aurati* e *D. ricceti* em hamsters (NUTTING, 1961) e *D. canis* e *D. injai* em cães (NUTTING, 1976; CHESNEY, 1999).

A pele de cães portadores de demodicose torna-se ecologicamente favorável à reprodução e crescimento da sarna demodécica. Os parasitos se valem dessa oportunidade para colonizar os folículos pilosos, elevando sua população em milhares de ácaros (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985).

Em alguns mamíferos, incluindo humanos, as lesões provenientes de demodicose são localizadas (NORN, 1970; ROIHU, 1998) e manifestações da forma generalizada não tem sido relatadas (AYDINGOZ; MANSUR; DERVENT, 1997; SARKAR et al., 2004). Sob imunossupressão o número de *Demodex* não aumenta em humanos (AYDINGOZ; MANSUR; DERVENT, 1997). Em contraste, demodicose generalizada é frequentemente

detectada em cães (SCOTT; MULLER; GRIFFIN, 2001) e hamsters (TANI et al., 2001) indicando estar relacionada à imunossupressão (TANI et al., 2005).

O parasito habita o interior dos folículos pilosos e ocasionalmente as glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas apócrinas cutâneas, onde o ácaro subsiste alimentando-se de células (cortando e aprofundando-se no epitélio e invadindo os acinos glandulares) (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985).

Quanto a morfologia, podem ser demonstrados quatro estágios de *D. canis* nos raspados de pele. Os ovos fusiformes eclodem, dando origem a pequenas larvas de seis pernas, que se transformam em ninfas de oito pernas, e finalmente em adultos, também com oito pernas. Os adultos medem de 0,1 a 0,4mm (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985; MARCONDES, 2001). Os parasitos (em todos os estágios) podem ser encontrados nos linfonodos, parede intestinal, baço, fígado, rins, bexiga, pulmão, tireóide, sangue, urina e fezes. Entretanto as sarnas observadas nesses órgãos, extracutâneas, estão usualmente mortas e degeneradas, representando apenas simples drenagem para qualquer dessas áreas, via corrente sanguínea ou linfática (CORRÊA, 1983; MULLER; KIRK; SCOTT, 1985).

O ciclo biológico é conhecido parcialmente em diferentes espécies e, para se ter uma idéia aproximada do que deve acontecer com todas as espécies do gênero, serão reunidas as informações. Os demodécideos habitam o folículo piloso ou a glândula sebácea anexa ao folículo, na grande maioria das vezes, os machos, as larvas e as ninfas ficam na parte mais rasa do folículo, quase que sobre a camada de queratina da pele, que sofre invaginação da abertura externa do folículo. As fêmeas fecundadas aprofundam-se no folículo piloso e atacam vorazmente as células, alimentando-se do líquido extravasado; ovipõem no fundo do folículo e, após o desenvolvimento embrionário, acontece a eclosão dos ovos, com liberação de larvas hexápodes, que se deslocam para a superfície da pele; alimentando-se e mudam

para a protoninfa, depois para a deutoninfa e deste estágio para os adultos, machos e fêmeas (MARCONDES, 2001).

A transmissão ocorre por contato direto da cadela com os neonatos em aleitamento, durante os 2-3 primeiros dias de vida neonatal (GAAFER; GREVE, 1966). As sarnas poderão ser demonstradas nos folículos pilosos de filhotes com apenas 16 horas de idade. Elas são inicialmente evidenciadas no focinho dos filhotes, enfatizando a importância do contato direto e da amamentação. As tentativas de transmissão da enfermidade por meio de administração oral dos ácaros, injeção intraperitoneal ou intratraqueal de *D. canis* ou pela colocação de animais enfermos em contato com animais sadios não-neonatos falharam (SAKO; YAMANE, 1962; SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974). Filhotes extraídos por secção cesariana e criados longe da cadela matriz não hospedavam ácaros, indicando que a transmissão *in utero* não ocorre (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; NUTTING, 1976).

Em filhotes natimortos não se observa a ocorrência de sarna (SAKO; YAMANE, 1962). Verificou-se que, uma vez na superfície da pele, os ácaros são rapidamente exterminados por dessecação em 45-60 minutos a 20°C e sob uma umidade relativa de 40% (NUTTING, 1976).

Nos cães a demodicose parece ser mais grave devido ao grande envolvimento do sistema imune; a pele torna-se edemaciada, eritematosa e eczematosa, evoluindo com exsudação e complicando com a infecção bacteriana pelo gênero *Staphylococcus*. O período modal em que a doença torna-se patente corresponde à faixa do terceiro mês de idade até o primeiro ano de vida, sendo a gravidade do quadro clínico proporcional à quantidade de ácaros. Embora não se conheça bem o mecanismo pelo qual acontece a transformação da parasitose em “lepra”, a maioria das explicações está associada a falha do sistema imune

mediado por células, (HIRSH; BAKER; WIGER, 1975; SCOTT; SCHULTZ; BAKER, 1976; LEMARIE; HOROHOV, 1996; MARCONDES, 2001).

As lesões iniciam-se pelos apêndices torácicos, ao nível de mãos, e destas se estendem para todo o corpo, sendo mais bem percebidas nas áreas com pouco pêlo (MARCONDES, 2001).

Ácaros da poeira domiciliar foram encontrados em cães por toda parte do mundo em cães que residiam em casas onde esses ácaros são prevalentes. Cães produzem ambas IgG e IgE contra os alérgenos da poeira domiciliar e freqüentemente causam dermatites atópicas (ARLIAN; MORGAN, 2000).

1.1 Tipos de Demodicose

São reconhecidos dois tipos de demodicose: a localizada e a generalizada. A demodicose localizada ou escamosa evidencia-se sob a forma de uma ou mais áreas alopécicas pequenas, circunscritas, eritematosas, escamosas, não-pruriginosas a pruriginosas, mais freqüentemente na face e patas dianteiras. O curso é benigno e a maioria dos casos se resolve, via de regra, espontaneamente (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985; MUELLER, 2004).

Na demodicose generalizada, as lesões são variáveis e podem apresentar pápulas foliculosas e crostas. Em pacientes mais afetados observa-se foliculite e furunculose com severa exsudação hemorrágica. A demarcação entre áreas afetadas e não afetadas é nítida. Linfadenopatia é comum. Infecções bacterianas secundárias também são comuns. Em demodicose canina pode haver ocorrência de otite externa (GARFIELD; REEDY, 1992; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

A maioria dos casos de demodicose generalizada inicia-se como uma lesão localizada em cães jovens. Se as lesões não experimentam remissão espontânea ou não recebem tratamento adequado, o paciente irá carrear a enfermidade até a fase adulta (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985).

A demodicose generalizada pode ser subdividida em: surto juvenil (3 a 12 meses), representando a forma mais séria e comum; surto adulto (mais de 5 anos), forma mais rara; pododermatite demodécica crônica (pododemodicose), confinada às patas (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985).

1.2. Aspectos Imunológicos

A resposta imune representa um papel vital no desenvolvimento da demodicose. Essa patologia foi produzida em cães com soro antilinfócitos (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974), azatioprina (OWEN, 1969) e corticoesteróides por longo tempo (SCOTT, 1977; TIZARD, 1998). Nesses casos foram descobertas enfermidades subjacentes de natureza possivelmente imunossupressora; por exemplo, neoplasia maligna, hepatopatia, hiperadrenocorticismo. A correção desses estados subjacentes, quando possível, ocasionou na resolução da demodicose. É interessante especular sobre o papel do sabido declínio natural da resposta imune celular-mediada no paciente canino idoso, nos casos de demodicose dos cães idosos (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985).

Não há evidência de imunodeficiência humoral em cães com demodicose generalizada. A resposta de células B nesses animais parece ser excessiva (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985).

Observa-se uma severa depressão das células T em cães com demodicose generalizada (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; SCOTT, 1975). A resposta de células T a mitógenos, como fitoemaglutinina e concanavalina A fica deprimida (TIZARD, 1998). Para se erradicar, terapeuticamente, os ácaros deve-se restaurar a função destas células T (SCOTT; FARROW; SCHULTZ, 1974; SCOTT; SCHULTZ; BAKER, 1976). O soro desses animais também é capaz de suprimir a reatividade das células T dos animais normais. Clinicamente, quando a sarna demodécica se instala é observado que a reação ao redor dos ácaros e dos fragmentos de ácaros tendo a ser infiltrada por células mononucleares juntamente com alguns plasmócitos. Podendo ocorrer a formação de um granuloma (TIZARD, 1998).

1.3. Diagnóstico

O principal diagnóstico da demodicose é feito por exame microscópico do material obtido de raspados de pele, feitos na direção do pelo (MUELLER, 2000; SCOTT; MULLER; GRIFFIN, 2001). Biópsia de pele são necessários em alguns casos. Como *Demodex* spp faz parte da fauna normal da pele canina, pode ser encontrada em esfregaços e biópsia de pele destes animais. Se houver suspeitas de demodicose será necessário obtenção de múltiplos raspados de pele, tricogramas e biópsia (MUELLER, 2004).

1.4. Tratamento

A demodicose localizada, na maioria dos casos se resolve espontaneamente (MUELLER, 2004). Para Tratamento da demodicose generalizada canina é indicada a associação de banhos de amitraz a 0,025-0,06% por 7-14 dias e diariamente, ivermectina oral ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$), milbemycina (2mg kg^{-1}) e moxidectina ($400 \mu\text{g kg}^{-1}$) (MUELLER, 2004).

1.5. Outros Ácaros mais freqüentemente envolvidos em dermatites animais

1.5.1. *Sarcoptes scabiei*

O ácaro *Sarcoptes scabiei* é o causador da Sarna sarcóptica ou escabiose (MARCONDES, 2001). Este ácaro se instala na pele de animais domésticos (como cães) e é responsável por intensos pruridos, que levam a lesões cutâneas, representando uma porta de entrada para bactérias patogênicas, especialmente *Streptococcus pyogenes*, o que resulta em um grande índice de morbidade (MCCARTHY et al., 2005). O parasito instala-se na epiderme, sob a camada córnea onde cava túneis. Ao abrir os túneis provoca a exsudação da linfa que, em contato com o ar, forma crostas úmidas, contornadas por áreas de descamação eritematosas (MARCONDES, 2001). A espécie *Sarcoptes scabiei* pertence ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Astigmata, família Sarcoptidae (MCCARTHY, 2005).

1.5.2. *Myocoptes musculus*

Myocoptes musculus (KOCH, 1844), o ectoparasito em estudo, infesta camundongos e outras espécies de roedores de biotério causando a sarna miocóptica. Diferente de *S. scabiei*, este ácaro não cava túneis na epiderme (JUNGSMANN et al., 1996) e permanece mais tempo preso aos pêlos do hospedeiro do que sobre a pele (Marcondes, 2001).

Os sintomas provocados por infestações com *M. musculus* na maioria das vezes não são aparentes, contudo, quando há uma grande quantidade de ácaros os sinais clínicos aparecem. Animais com infestações maciças apresentam queda de pêlo, eritema no pescoço, ombro e dorso, podendo ocorrer prurido e dermatite principalmente na região do abdômen (JUNGSMANN et al., 1996a). *Myocoptes musculus* pertence ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, subclasse Acari, ordem Astigmata, família Mycoptidae (MARCONDES, 2001).

1.5.3. *Dermatophagoides pteronyssinus*

Alérgenos derivados de ácaros da poeira domiciliar têm sido reconhecidos como uma importante causa na indução da síntese de IgE e as espécies de ácaros da família Pyroglyphidae (*Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*) constituem a fauna predominante na poeira domiciliar das regiões tropicais e temperadas do mundo todo (PLATTS-MILLS et al., 1992). Segundo Platts-Mills e Weck (1989), estes ácaros se alimentam principalmente de descamações da pele humana e de animais domésticos. As

proteínas provenientes do metabolismo e que são excretadas nas fezes pelos ácaros são os principais alérgenos indutores da reação alérgica em indivíduos susceptíveis. Geralmente, as principais substâncias capazes de induzir uma resposta imune e causar alergia são proteínas ou glicoproteínas.

A classificação taxonômica de *Dermatophagoides pteronyssinus*, segundo Arlian e Platts-Mills (2001), pode ser resumida em: Reino Metazoa; Filo Arthropoda; Classe Arachnida; Subclasse Acari; Ordem Astigmata, Família Pyroglyphidae; Gênero *Dermatophagoides*; Espécie *Dermatophagoides pteronyssinus*.

1.6. Fungos

Os fungos que mais frequentemente causam dermatofitose em cães são *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*. As dermatofitoses são mais contagiosas que a maioria das outras infecções fúngicas, podem ser transmitidas através de contato com o Homen ou adquiridas do solo (MULLER; KIRK; SCOTT, 1985).

Os sinais clínicos da dermatofitose, da demodicose e das piodermatites de superfície são semelhantes. Por esta razão, o diagnóstico feito com base apenas nos sinais clínicos pode ser falso, o que leva a superestimação da dermatofitose, doença de baixa incidência em relação aos casos examinados. O diagnóstico definitivo baseia-se na história; nos achados do exame clínico e nos resultados de cultura fúngica; nos exames citopatológicos, histopatológicos ou cultura seguida de exame histopatológico e exame com luz ultravioleta (MACIEL; VIANA, 2005). Devido a dificuldade diagnóstica em decorrência de resultados falso negativos no raspado de pele, o desenvolvimento de outros métodos diagnósticos torna-se necessário.

2. JUSTIFICATIVA

Este trabalho se justifica pela necessidade de desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos para detecção de sarna demodécica, uma vez que os métodos diagnósticos convencionais podem levar a resultados falso-negativos em casos de baixa parasitemia.

3. OBJETIVOS

3.1. Determinar, em um estudo retrospectivo, a prevalência da demodicose em cães com sintomas de dermatite e alopecia, atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária (HV-FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2. Comparar o perfil eletroforético de antígenos solúveis de *Demodex canis* (SDAg) com antígenos heterólogos solúveis de *Myocoptes musculus* (SMAg) e de *Dermatophagoides pteronyssinus* (SDpt).

3.3. Padronizar testes imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-*D. canis* utilizando antígeno homólogo o solúvel SDAg e IgG e IgE contra antígenos heterólogos solúveis SMAg e SDpt.

3.4. Avaliar a taxa de reatividade de anticorpos IgG e IgE a antígenos de ácaros da sarna demodécica em cães com dermatite e alopecia atendidos no HV-FAMEV e cães doados ao Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Uberlândia.

3.5. Avaliar a reatividade de anticorpos IgG e IgE de cães com dermatite e alopecia frente aos antígenos heterólogos SMAg e SDpt.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Inquérito epidemiológico

Um inquérito epidemiológico foi primeiramente conduzido para verificar a incidência da sarna demodécica em cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária (HV-FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia. O levantamento da incidência da sarna demodécica assim como da sarna sarcóptica e dermatomicoses foi realizado em fichas clínicas de cães atendidos no HV-FAMEV no ano de 2004.

4.2. Animais e amostras biológicas

Amostras de soro, esfregaço sanguíneo, raspado de pele e fezes foram coletadas de 27 cães de raças e idades variadas, de ambos os sexos, com sintomas de sarna, tais como, alopecia, prurido, vermelhidão e presença de crostas na pele. Como controle, foram coletadas amostras correspondentes de três cães saudáveis com raça definida, com idade entre 12 a 36 meses e sem sintomas aparentes de doenças de pele. Quatro cães saudáveis com aproximadamente dois meses de idade foram também utilizados como controle. As amostras de cães com sintomas de dermatite e alopecia foram coletadas de animais atendidos no HV-FAMEV da Universidade Federal de Uberlândia e de animais doados ao Centro de Controle de Zoonoses da cidade de Uberlândia, MG, durante o período de maio a setembro de 2005.

Volumes de aproximadamente 3 mL de sangue sem anticoagulante foram obtidos por punção da veia cefálica ou da veia safena. Imediatamente após a coleta, uma gota de sangue era utilizada para confecção do esfregaço sanguíneo e no mínimo 2 (duas) lâminas foram preparadas para cada animal. O restante do sangue das amostras foi centrifugado a $720 \times g$ por 10 minutos e os soros obtidos foram armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

Raspados de pele foram realizados em cães com sintomas clínicos sugestivos de sarna. Para realização destes, a pele era raspada com o auxílio de lâmina de bisturi (Wiltex, China) até sangramento suave e o material obtido constituído de debris celulares da pele, ácaros quando presentes e células sanguíneas foi analisado sob microscopia de luz.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991).

4.3. Análise do raspado de pele

Uma parte do material obtido do raspado de pele dos animais com sintomas clínicos de sarna foi macerado em solução de NaOH (Merck) 10% em lâmina de vidro de microscopia óptica comum com auxílio de um bastão de vidro. A seguir o material era recoberto com lamínula de vidro e analisado com auxílio de microscópio de luz (Olympus Optical CO., LTD, Tóquio Japão) em aumento original de 10X.

4.4. Preparo do antígeno solúvel homólogo de *Demodex canis* (SDAg)

Raspados de pele de cães com sintomas clínicos de sarna demodécica foram coletados e analisados sob microscopia de luz. Quando positivos para *D. canis* o restante do material obtido do raspado era colocado em placas de petri para obtenção do antígeno. O antígeno solúvel de *Demodex canis* (SDAg) foi preparado como descrito anteriormente por Kumar et al. (1998), com algumas modificações. Resumidamente, após centrifugação a 2500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente, o sedimento foi ressuspenso em tampão borato 5 mM (pH 8,0). Para maceração do conteúdo antigênico, foi adicionado nitrogênio líquido ao conteúdo sendo o mesmo macerado com a ajuda de um pistilo até adquirir aspecto de pó. Posteriormente, foram adicionados os seguintes inibidores de proteases: aprotinina 10 µg/mL (SIGMA); leupeptina 50 µg/mL (SIGMA); benzamidina 1 mM (SIGMA) e PMSF 1,6 mM (Phenylmethylsulfonyl fluoride, SIGMA). O material foi submetido à agitação por 18 horas a 4°C e posteriormente foi centrifugado (Sorval, Du Pont, EUA) a 46.000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido (antígeno solúvel SDAg) foi concentrado sob nitrogênio gasoso e estocado a – 20°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). SDAg foi utilizado em ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

4.5. Preparo dos antígenos solúveis heterólogos: SMAg (*Myocoptes musculus*) e SDpt (*Dermatophagoides pteronyssinus*)

Camundongos Swiss naturalmente infestados pelo ácaro *Myocoptes musculus* e camundongos BALB/c experimentalmente infestados com o ectoparasito foram utilizados

para obtenção do antígeno heterólogo. Camundongos BALB/c foram utilizados devido a sua alta susceptibilidade ao ácaro, sendo possível a obtenção nestes de grande número de ectoparasitos. Para infestação experimental de camundongos BALB/c, estes eram mantidos na mesma gaiola que camundongos Swiss naturalmente infestados com *M. musculus* durante no mínimo 30 dias. Os camundongos foram mantidos no Centro de Bioterismo do Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia.

M. musculus foi isolado de camundongos BALB/c experimentalmente infestados pelo menos 30 dias anteriormente. Para tanto, o pêlo dos camundongos infestados foi raspado com o auxílio de lâmina de bisturi (Wiltex, China), desta forma grande quantidade de pêlos foi coletado. O material obtido foi colocado em placas de petri e examinado sob microscópio estereoscópio (Metrimpex) sendo os ectoparasitos coletados um a um (aproximadamente 6.000 ácaros) com a ajuda de agulhas finas e mantidos em PBS. O antígeno solúvel heterólogo de *M. musculus* (SMAg) foi obtido como descrito no item 3.4.

Dermatophagoides pteronyssinus foi obtido de aproximadamente 200 g de material seco de cultivo do ácaro (gentilmente cedido pelo Dr. Federico Montealegre, Immunochemistry Laboratory, Medical School of Ponce, Porto Rico, EUA) que foi peneirado (Granutest-Telastem Peneiras para Análise LTDA, ABNT 35, abertura em mm = 0,50/TYLER 32) para separar corpos e fezes dos ácaros do restante do material de cultivo. Em seguida, 5 g do material peneirado foram misturados a 50 mL de solução salina tamponada com borato a 5mM (pH 8,0) contendo inibidores de proteases para a extração do antígeno solúvel heterólogo (SDpt) conforme descrito no item 3.4.

4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os antígenos SDAg, SMAg e SDpt foram avaliados quanto ao perfil protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato duodecil de sódio (SDS-PAGE). Os antígenos foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE a 12% como descrito por Laemmli (1970). Este foi composto de uma solução de poliacrilamida constituída de 30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida. A poliacrilamida foi acrescida de Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8), SDS (sulfato duodecil de sódio) a 0,1%, EDTA (ácido etileno diamino tetra acético), TEMED (2 mM, N,N,N,N – tetrametil etileno diamino) a 0,125% e APS (persulfato de amônio) a 0,125%. Após o gel de separação ter completado sua polimerização, foi acrescentado à preparação o gel de empilhamento, contendo Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 0,1%, EDTA 2 mM, TEMED 0,125%, APS 0,125% e solução de acrilamida – bis-acrilamida a 5%.

Amostras das preparações testadas, bem como alíquotas de amostras de padrão de referência de massa molecular (SIGMA, St. Louis, MO, USA) foram diluídas em tampão de amostra (v/v), constituído de 0,1 M Tris (pH 6,8), SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% e glicerol 20% e fervidos durante 5 minutos a 100°C em banho-maria. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 20 mA, por aproximadamente 2 horas, utilizando-se fonte 2301 Macrodrive 1 LKB (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Após a migração eletroforética das preparações, o gel foi corado pelo nitrato de prata e Coomassie Blue R-250.

4.7. Padronização de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*D. canis*

O ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG anti-*Demodex canis* em soros de cães com lesões cutâneas e positivos para sarna demodécica no raspado de pele foi desenvolvido como anteriormente descrito para sarna miocóptica de camundongos (WELTER, 2005), com modificações. Placas de poliestireno (Corning Costar 3590, Corning incorporated Costar®, Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL do extrato antigênico de *D. canis* (SDAg) na concentração de 20 µg/mL, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate, SIGMA) a 0,05% (PBS-T). A seguir, foi adicionado PBS-T contendo Soro Albumina Bovina (BSA) (SIGMA) a 1% (PBS-T- BSA) no volume de 100 µL por poço e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavar as placas por 3 vezes com PBS-T, soros a serem testados, em duplicata, no volume de 50 µL, diluído 1:25 em PBS-T-BSA foram adicionados aos poços sensibilizados com o antígeno e incubados por 2 horas a 37°C. Após um ciclo de seis lavagens com PBS-T, dois conjugados foram testados: (1) anti-IgG de cão marcado com peroxidase (preparado segundo o método de Wilson e Nakane, 1978) diluído a 1:1000 em PBS-T-BSA e (2) Proteína A-peroxidase (SIGMA) diluído 1:4000 em PBS-T-BSA. Os conjugados foram adicionados no volume de 50 µL por poço e incubados por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após lavar as placas por 6 vezes com PBS-T, a reação onde se utilizou o conjugado (1) foi desenvolvida pela adição do substrato enzimático consistindo de 1 mg/mL de ortofenilenodiamina (OPD; Merck, Rio de Janeiro, Brasil) em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 5,0) contendo H₂O₂ a 0,03%. Após incubação por 10 minutos à temperatura

ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL/ poço de solução de ácido sulfúrico 2 N.

A densidade óptica (DO) foi determinada a 492 nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, EUA). O limite de positividade (*cut off*) foi determinado pela média da DO dos soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Títulos de anticorpos foram expressos em índices ELISA (IE), de acordo com Silva et al. (2002), como segue: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$.

Quando se utilizou o conjugado (2) a reação foi desenvolvida pela adição do substrato enzimático consistindo de solução ABTS, (2,2'-azinobis-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid, SIGMA) a 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,07M, pH 4,2 contendo 0,03% de H₂O₂ (CAAL). A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Mclean, VA, EUA). O limite de positividade e os títulos de anticorpos foram expressos como anteriormente descrito.

4.8. Padronização de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- *M. musculus* e anti-*D. pteronyssinus*

A reação foi realizada conforme item 3.7. com modificações. Foram utilizados os antígenos de *M. musculus* (SMAg) e de *D. pteronyssinus* (SDpt) na concentração de 20 µg/mL. Como conjugado foi utilizado IgG de coelho anti-IgG de cão marcado com peroxidase em diferentes diluições (1:2000, 1:4000, 1:6000 e 1:8000). A reação foi desenvolvida utilizando-se o substrato enzimático ABTS.

4.9. Padronização de ELISA para detecção de anticorpos IgE anti-*M.musculus* e anti-*D. pteronyssinus*

O ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgE anti-*M.musculus* e anti-*D. pteronyssinus* em amostras de soros de cães foi desenvolvido como anteriormente descrito por Silva et al. (2001), com algumas modificações. Placas de poliestireno (Corning Costar 3590, Corning incorporated Costar®, Corning, NY, EUA) foram sensibilizadas com os antígenos de *M. musculus* (SMAg) e de *D. pteronyssinus* (SDpt) na concentração de 20 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. Após lavagem das placas por três vezes com PBS-T, sítios ativos das placas foram bloqueados com PBS-T- BSA por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens como anteriormente descrito, amostras de soros diluídas 1:2 em PBS-T-BSA foram adicionadas e incubadas por 2 horas a 37°C. Após um ciclo de seis lavagens com PBS-T, foi adicionado anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgE canina (Serotec Inc, Raleigh, NC, EUA) diluído 1:500 em PBS-T-BSA e incubado por 1 hora a 37°C. Após novo ciclo de lavagens com PBS-T, o conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase (Sigma Chemical Co.) foi adicionado na diluição de 1:1000 em PBS-T-BSA e incubado por 1 hora a 37°C. A reação foi revelada pela adição do substrato enzimático (ABTS a 0,01M e H₂O₂ a 0,03%). A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Mclean, VA, EUA). O limite de positividade e os títulos de anticorpos foram expressos em índices ELISA (IE) como descrito no item 3.7.

4.10. Contagem de eosinófilos

A quantificação dos eosinófilos foi realizada a partir de esfregaços sanguíneos. Para tanto, aplicou-se uma gota de sangue sobre a lâmina e com o auxílio de uma segunda lâmina o material foi espalhado de modo a formar um esfregaço. Após preparo do esfregaço de sangue, este foi seco ao ar e a seguir corado com o corante de Wright por um minuto, após esse tempo adicionar água destilada e aguardar mais oito minutos, decorrido esse tempo, lavar a lâmina em água corrente e deixar secar à temperatura ambiente. O esfregaço foi examinado ao microscópio de luz (Olympus Optical CO., LTD, Tóquio Japão) em aumento de 400X sendo contados 100 leucócitos por lâmina, e o número de eosinófilos por leucócitos analisados foi quantificado.

4.10.1. Preparação do corante de Wright

1- Corante de Wright em pó--- 9g

Corante de Giemsa em pó --1g

Glicerina -----90mL

Álcool metílico absoluto ----5.910mL

3.12. Análise estatística

Para análise estatística foram utilizados os programas computadorizados específicos (Microsoft[®] Excel 2000; GraphPad Prism versão 3.0 e 4.0– GraphPad Software, Inc). Os dados obtidos da contagem de eosinófilos e comparação da reatividade de anticorpos frente aos diferentes antígenos foram analisados pelo teste *t* de Student bicaudal: duas amostras presumindo variâncias equivalentes. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Inquérito epidemiológico

Do total de 2599 fichas clínicas de cães analisadas do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária (HV-FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia no período de janeiro a dezembro de 2004, 2488 eram de animais que não apresentavam alterações aparentes na pele, 111 eram de animais que apresentavam algum tipo de alterações de pele, destas 82 (73,9 %) representavam cães com dermatofitose, 6 (5,6%) cães com sarna sarcóptica e 23 (20,9%) cães com sarna demodécica.

Tabela 1. Análise de Fichas Clínicas do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária (HV-FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia no período de janeiro a dezembro de 2004

Sem alterações aparentes na pele	Número de Animais (%)		
	Dermatofitoses	Sarna Sarcóptica	Sarna Demodécica
2488	82 (73,9)	06 (5,6)	23 (20,9)

Os cães que apresentavam alterações aparente de pele foram subdivididos em idade, raça e sexo, observando-se que no caso de dermatofitose os cães com menos de 12 meses (33) e aqueles com mais de 24 meses (38) representam a maioria dos infectados, sendo 59 com raça definida (CRD) e menos da metade (29) sem raça definida (SRD), quanto ao sexo 30 eram machos e 52 eram fêmeas. Com relação à sarna sarcóptica, 3 animais tinham menos

de 12 meses, 1 entre 12 e 24 meses e 2 com idade superior a 24 meses, sendo 2 SRD e 4 CRD, quanto ao sexo, 1 era macho e o restante (5) fêmea. Com sarna demodécica, 14 tinham menos de 12 meses, 5 tinham entre 12 e 24 meses e 4 tinha mais que 24 meses, sendo 6 CRD e 17 SRD, visto que houve um equilíbrio entre machos (11) e fêmeas (12).

Tabela 2. Incidência de dermatite em cães atendidos no HV-FAMEV de acordo com idade, raça e sexo.

	Idade (meses)			Raça		Sexo	
	0 – 12	12 - 24	Acima de 24	^a SRD	^b CRD	Macho	Fêmea
Dermatômicos	33	11	38	23	59	30	52
Sarna Sarcóptica	3	1	2	2	4	1	5
Sarna Demodécica	14	5	4	6	17	11	12

^aSRD: sem raça definida

^bCRD: com raça definida

5.2. Análise de positividade do raspado de pele

De 16 amostras de raspado de pele coletadas de cães com sintomatologia sugestiva de sarna demodécica, 3 (18,75%) amostras foram positivas para a presença do ácaro no raspado de pele, 6 (37,5%) amostras foram positivas para dermatomicose, nas quais foram observadas a presença de macroconídeas e hifas septadas no raspado de pele e as 7 (43,75%) amostras restantes permaneceram sem diagnóstico definido. Em nenhuma amostra foi encontrado o ácaro *Sarcoptes scabiei*, o agente causal da sarna sarcóptica. Estes resultados sugerem que apesar da menor frequência da sarna demodécica em relação às

dermatomicoses, a ocorrência deste tipo de acaríase é maior que da sarna sarcóptica. Entretanto, na maioria das amostras o raspado de pele não definiu o diagnóstico.

Tabela 3 – Presença dos ácaros *D. canis*, *S. scabiei* ou macroconídeas ou hifas septadas no raspado de pele de cães com sintomas sugestivos de demodicose.

Agente causal de lesões de pele comumente encontrado em cães	Número de animais positivos
<i>D. canis</i>	3
<i>S. scabiei</i>	0
Macronídeas ou hifas septadas	6
Sem diagnóstico definido	7
Total	16

5.3. Perfil protéico dos antígenos SDAg, SMAg e SDpt

De acordo com o gel de poliacrilamida corado pelo *Coomassie Blue* (Figura 1A), observou-se que o antígeno de *D. canis* (SDAg) apresentou pelo menos 6 proteínas dominantes com massas moleculares aparentes (Mr) de 15, 28, 50, 60, 72 e 89 kDa enquanto o antígeno de *D. pteronyssinus* revelou duas proteínas principais (15 e 28 kDa). Nenhuma banda protéica pôde ser visualizada no antígeno de *M. musculus* (SMAg) corado por *Coomassie Blue*.

Quando o gel foi corado pelo nitrato de prata (Figura 1B), o antígeno SDAg apresentou um perfil protéico com Mr variando de 15 a 111 kDa, com pelo menos 8 proteínas dominantes com Mr de 15, 28, 45, 50, 60, 72, 89 e 111 kDa, enquanto o antígeno

SMAg mostrou proteínas variando de 16 a 200 kDa, com pelo menos 3 proteínas dominantes (50, 72 e 111 kDa). O antígeno SDpt revelou um perfil protéico com Mr variando de 15 a 120 kDa, apresentando proteínas dominantes com Mr de 15, 28, 72 e 120 kDa.

Pode ser verificado que os 3 antígenos compartilham proteína com Mr de 72 kDa e os antígenos SDAg e SMAg compartilham proteínas com Mr de 50, 72 e 111 kDa.

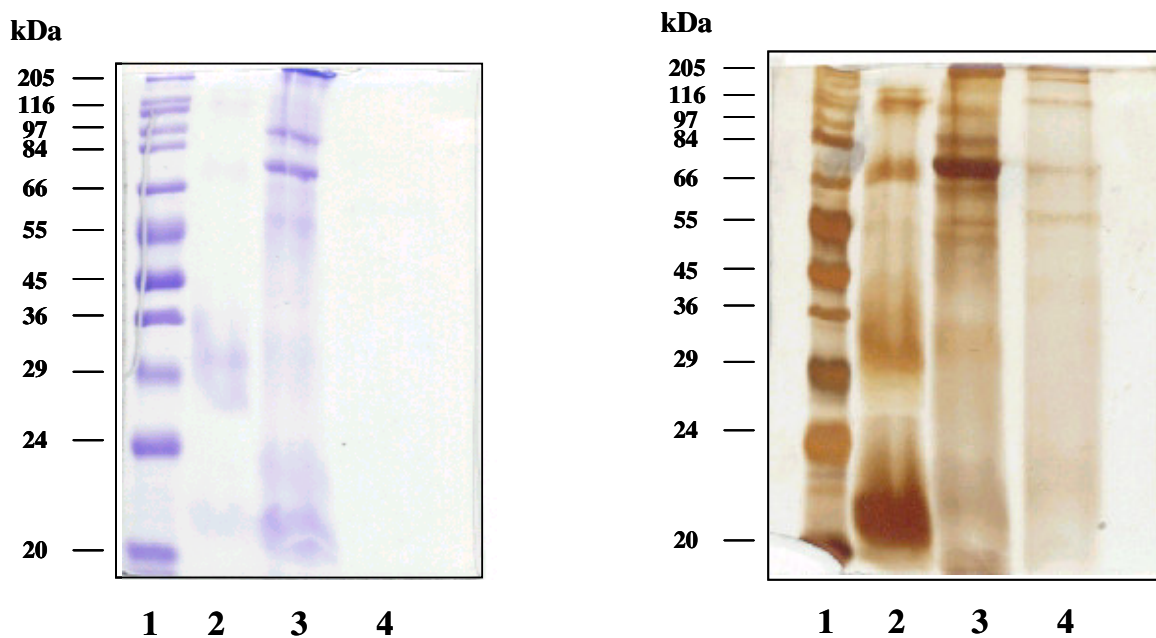


Figura 1. SDS-PAGE (12%) corado pelo *Coomassie Blue* (A) e nitrato de prata (B) dos antígenos de *D. pteronyssinus* (SDpt), *D. canis* (SDAg) e *M. musculus* (SMAg). Pista 1, marcador de massa molecular; pista 2, SDpt; pista 3, SDAg e pista 4, SMAg.

5.4. Padronização de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*D. canis*

Para otimização da técnica ELISA indireta para detecção de anticorpos IgG anti-*D. canis* em amostras de soros de cães com sintomas de demodicose e positivos no raspado de pele, utilizou-se um protocolo anteriormente utilizado para detecção de anticorpos IgG anti-*M. musculus*, um ácaro relacionado. Foram utilizados três amostras de soros de cães com sintomas de demodicose e positivos no raspado de pele e três amostras de soros controles negativos (cães saudáveis e sem nenhum sintoma de doença de pele). Foram testados 2 conjugados enzimáticos diferentes: (1) anti-IgG de cão marcado com peroxidase e (2) Proteína A-peroxidase.

A Tabela 4 demonstra os resultados da padronização do ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*D. canis* em soros de cães.

Foi observado que os conjugados enzimáticos anti-IgG de cão/peroxidase e proteína A-peroxidase foram incapazes de discriminar entre soros controles positivos e negativos. Além disso, reatividade similar foi observada quando a placa foi incubada apenas com PBS, indicando que o conjugado estava reagindo com o antígeno da sarna demodécica aderido na placa. A partir destes dados, o antígeno da sarna demodécica como obtido pelo nosso protocolo não foi utilizado nas reações seguintes.

Tabela 4. Resultados da padronização do ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*D. canis* em amostras de soros controles positivos (P) e negativos (N) de cães, utilizando dois conjugados: anti-IgG de cão/peroxidase e proteína A/peroxidase.

Soros	Conjugados enzimáticos			
	anti-IgG cão/peroxidase		Proteína A/peroxidase	
	DO (492 nm) ^a	IE ^b	DO (405 nm) ^a	IE ^b
P1	1,430	0,99	0,598	1,15
P2	1,410	0,98	0,569	1,09
P3	1,386	0,96	0,603	1,16
M ± DP ^c	1,409 ± 0,020	0,98 ± 0,02	0,590 ± 0,020	1,13 ± 0,03
N1	1,418	0,98	0,535	1,03
N2	1,403	0,97	0,518	1,00
N3	1,414	0,98	0,518	1,00
M ± DP ^c	1,407 ± 0,010	0,97 ± 0,01	0,520 ± 0,010	1,02 ± 0,02
PBS	1,389	0,96	0,540	1,04
S/R ^d	1,0		1,1	

^a Resultados expressos em valores de densidade óptica (DO) a 492 nm (OPD) ou 405 (ABTS);

^b Resultados expressos em Índices ELISA (IE) calculados como descrito em Material e Métodos.

^c M ± DP: média ± desvio padrão

^d S/R (sinal/ruído): razão entre a média de DO ou IE dos soros controles positivos e negativos.

5.5. Padronização da técnica ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*D. canis* utilizando os antígenos heterólogos de *D. pteronyssinus* e *M. musculus*

Para detecção de anticorpos IgG anti-*D. canis* em amostras de soros de cães, primeiramente a reação foi otimizada utilizando antígeno heterólogo solúvel de *D. pteronyssinus* e soros controles positivos e negativos. Foi utilizado um soro controle positivo obtido de cão com suspeita de dermatite atópica e ELISA-IgE positivo, apresentando teste intradérmico (ID) positivo para *D. pteronyssinus*. Os soros controles negativos foram obtidos de cães saudáveis sem sinais ou história de dermatite atópica, apresentado teste ID negativo e ELISA-IgE negativo para *D. pteronyssinus*. Estes soros foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ernesto Akio Taketomi do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia. Nesta reação o conjugado enzimático anti-IgG de cão/peroxidase foi testado em 4 diluições diferentes: 1:2000, 1:4000, 1:6000; 1:8000.

Como demonstrado na tabela 3, não houve uma distinção marcante entre o soro IgE positivo e os soros IgE negativos para *D. pteronyssinus*, principalmente em diluições menores do conjugado. Em diluições maiores, como 1:4000, 1:6000 e 1:8000 a razão sinal/ruído (S/R) foi igual a 2. Estes resultados podem ser devido à presença de anticorpos IgG anti-*D. pteronyssinus* em soros de cães saudáveis, refletindo a exposição natural aos alérgenos de ácaros da poeira domiciliar. Desta forma, nas próximas reações decidimos utilizar como controles negativos, soros de cães sadios e jovens (1 a 2 meses de idade).

Tabela 5. Resultados da padronização do ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*D. pteronyssinus* em amostras de soros IgE positivo (P) e IgE negativos (N) de cães com sintomas de dermatite atópica, utilizando o conjugado anti-IgG de cão/peroxidase em quatro diferentes diluições.

Soros	anti-IgG cão/peroxidase							
	1:2000		1:4000		1:6000		1:8000	
	DO ^a	IE ^b	DO ^a	IE ^b	DO ^a	IE ^b	DO ^a	IE ^b
P1	1,233	1,12	1,031	1,27	0,823	1,34	0,775	1,5
N1	0,930	0,80	0,674	0,80	0,538	0,90	0,422	0,80
N2	0,817	0,70	0,588	0,70	0,492	0,80	0,367	0,70
M ± DP ^c	0,874 ± 0,08	0,80 ± 0,07	0,631 ± 0,06	0,75 ± 0,07	0,515 ± 0,03	0,85 ± 0,07	0,395 ± 0,04	0,75 ± 0,07
S/R ^d	1,5		1,6		1,6		2,0	

^a Resultados expressos em valores de densidade óptica (DO) a 405 nm;

^b Resultados expressos em Índices ELISA (IE) calculados como descrito em Material e Métodos.

^c M ± DP: média ± desvio padrão

^d S/R (sinal/ruído): razão entre a média de DO ou IE dos soros controles positivos e negativos.

Em uma próxima etapa, foram utilizados antígenos solúveis de *M. musculus* e *D. pteronyssinus* como antígenos heterólogos e soros controles positivos de cães com sintomas clínicos de demodicose e positivos no exame de raspado de pele e a diluição do conjugado foi fixada em 1:4000. Foi utilizado também um soro controle de cão com ELISA-IgE positivo para *D. pteronyssinus*. Como controle negativo, foram utilizados soros de cães saudáveis, com cerca de 2 meses de idade. Foi observada uma clara distinção entre soros positivos e negativos, mostrando uma reatividade cruzada entre imunoglobulinas específicas para *D. canis* e os antígenos heterólogos dos ácaros relacionados, *M. musculus* e *D. pteronyssinus* (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da padronização do ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*D. pteronyssinus* e anti-*M. musculus* em amostras de soros controles positivos (P) de cães com sintomas de demodicose e positivos no raspado de pele, soro de cão com dermatite atópica e positivo para *D. pteronyssinus* (Dp+) e de soros controles negativos (N) de cães saudáveis.

Soros	SDpt		SMAg	
	DO ^a	IE ^b	DO ^a	IE ^b
P1	0,856	3,80	0,826	3,37
P2	0,845	3,77	0,749	3,10
P3	0,865	3,86	0,874	3,56
Dp+	0,854	3,80	0,798	3,26
N1	0,198	0,88	0,206	0,84
N2	0,170	0,75	0,177	0,72
N3	0,178	0,79	0,166	0,68
M(N) ± DP ^c	0,182 ± 0,014	0,80 ± 0,07	0,183 ± 0,020	0,75 ± 0,07
S/R ^d	4,7		4,4	

^a Resultados expressos em valores de densidade óptica (DO) a 405 nm;

^b Resultados expressos em Índices ELISA (IE) calculados como descrito em Material e Métodos.

^c M ± DP: média ± desvio padrão

^d S/R (sinal/ruído): razão entre a média de DO ou IE dos soros controles positivos e negativos.

5.6. Detecção de anticorpos IgG anti-*D. pteronyssinus* e anti-*M. musculus* por ELISA em soros de cães com sintomas clínicos de dermatite e alopecia

Os soros de cães foram analisados em 6 sub-grupos: cães atópicos, cães com dermatite e alopecia com mais de 12 meses de idade (> 12 meses), cães com dermatite e alopecia com menos de 12 meses de idade (< 12 meses), cães sintomáticos e positivos para *D. canis* no raspado de pele, cães saudáveis sem nenhum sintoma com mais de 12 meses (> 12 meses) e cães sem sintomas com 1 a 2 meses de idade (< 12 meses). Esta distribuição foi feita devido a maior probabilidade de exposição dos animais com mais de 12 meses ao ácaro da poeira domiciliar.

Como pode ser observado na figura 2, cães atópicos ou com sintomas de dermatite com mais de 12 meses de idade apresentaram alta reatividade de anticorpos IgG ao antígeno SDpt. Dentre estes cães com mais de 12 meses, 3 apresentaram a presença de macroconídeas e hifas septadas no raspado de pele, diagnóstico sugestivo de dermatomicose e os demais não apresentaram agente causal das lesões de pele no raspado. Este fato indica uma exposição natural ambiental destes animais ao ácaro da poeira domiciliar. Cães com sarna demodécica apresentaram uma reatividade similar, sugerindo uma reatividade cruzada de anticorpos IgG anti-*D. canis* com o antígeno heterólogo SDpt, ou ainda, que estes animais poderiam ter sido previamente expostos ao ácaro da poeira domiciliar. Dos 6 animais jovens com menos de 12 meses que apresentaram sintomas de dermatite e alopecia, 3 destes apresentaram presença de macroconídeas e hifas septadas no raspado de pele e o restante não apresentou nenhum agente causal no raspado. Este grupo de animais apresentou uma

baixa reatividade de anticorpos IgG ao antígeno SDpt, indicando que provavelmente não haviam sido expostos anteriormente a *D. pteronyssinus*.

Dentre os animais assintomáticos, aqueles com mais de 12 meses de idade apresentaram alta reatividade de anticorpos IgG ao antígeno SDpt, reforçando a hipótese de contato prévio com o ácaro da poeira domiciliar. Os animais com menos de 12 meses de idade (1 a 2 meses) apresentaram uma baixa reatividade ao antígeno SDpt, sugerindo que ainda não entraram em contato com o ácaro *D. pteronyssinus* (Figura 2).

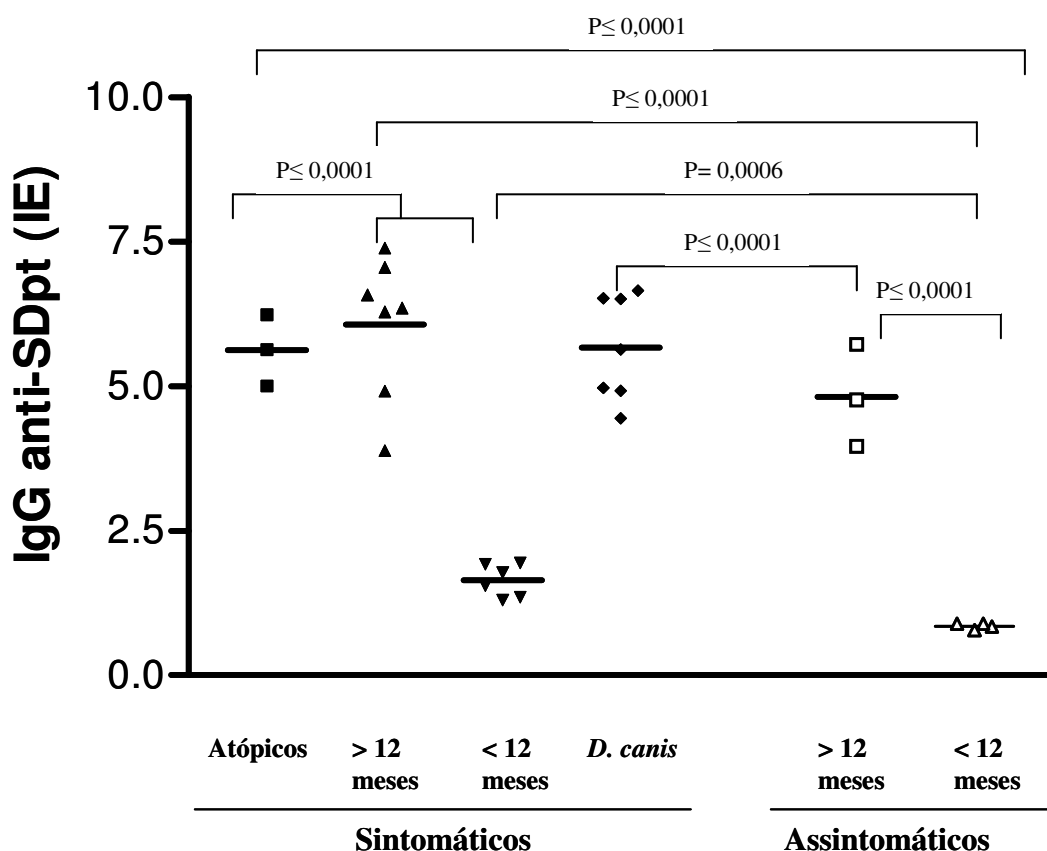


Figura 2. Níveis de anticorpos IgG anti-SDpt, expressos em índice ELISA (IE), determinados em 30 amostras de soros de cães. As amostras foram analisadas nos seguintes subgrupos: (I) Sintomáticos: cães com dermatite atópica (teste ID positivo e IgE anti-*D.*

pteryonyssinus positivo, n = 3), cães com dermatite e alopecia com > 12 meses de idade (n = 7), cães com dermatite e alopecia com < 12 meses de idade (n= 6), cães com dermatite e alopecia e positivos no raspado de pele para *D. canis* (n = 7) e (II) Assintomáticos: cães saudáveis com > 12 meses de idade (n = 3) e cães saudáveis com < 12 meses de idade (n= 4).

Quando as mesmas amostras foram testadas com o antígeno solúvel de *M. musculus* (SMAg) observou-se uma menor reatividade de anticorpos IgG em comparação com o antígeno SDpt, embora com um perfil similar de reatividade observado para este antígeno (Figura 3). Os animais sintomáticos com mais de 12 meses apresentaram índice ELISA para IgG anti-SMAg maior que animais sintomáticos com menos de 12 meses. Da mesma forma, animais sem sintomas com mais de 12 meses de idade também mostraram um índice ELISA maior que animais sem sintomas com menos de 12 meses. Estes resultados indicam reatividade cruzada entre os antígenos relacionados de *M. musculus* e o ácaro da poeira doméstica, podendo os animais com mais de 12 meses estarem sensibilizados a antígenos deste parasito ou terem tido contato prévio com ácaros que causam dermatite canina como *D. canis*.

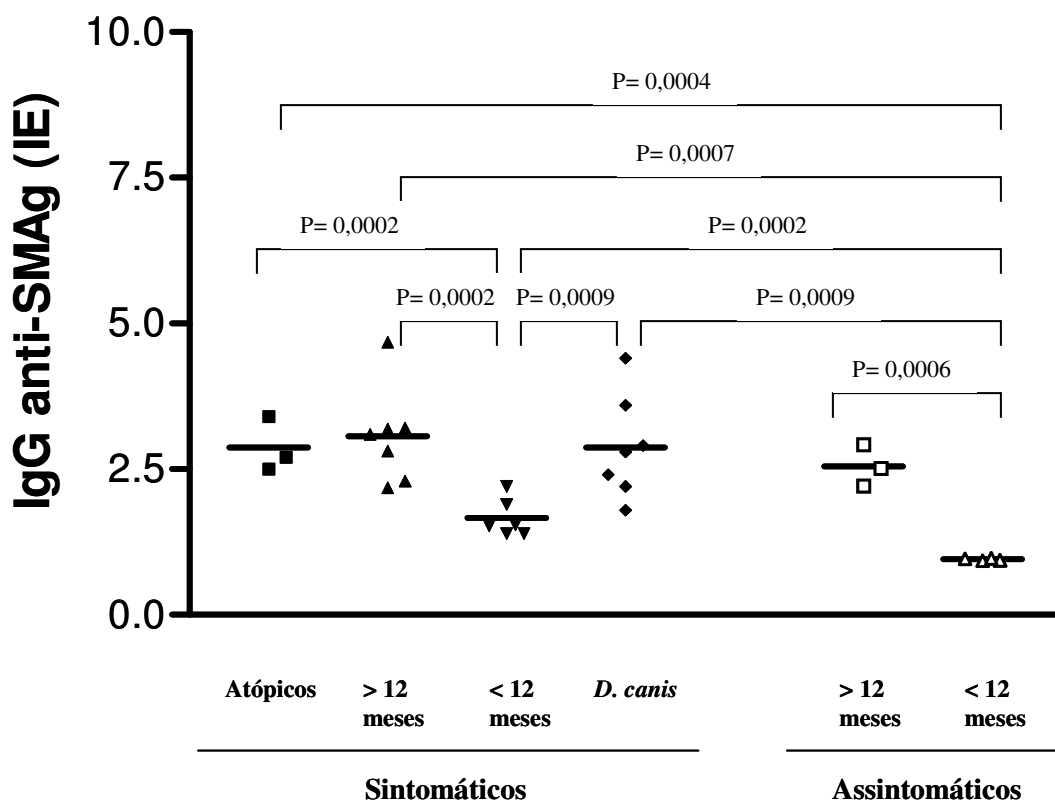


Figura 3 - Níveis de anticorpos IgG anti-SMAg, expressos em índice ELISA (IE), determinados em 30 amostras de soros de cães. As amostras foram analisadas nos seguintes sub-grupos: (I) Sintomáticos: cães com dermatite atópica (teste ID positivo e IgE anti-*D. pteronyssinus* positivo, n = 3), cães com dermatite e alopecia com > 12 meses de idade (n = 7), cães com dermatite e alopecia com < 12 meses de idade (n = 6), cães com dermatite e alopecia e positivos no raspado de pele para *D. canis* (n = 7) e (II) Assintomáticos: cães saudáveis com > 12 meses de idade (n = 3) e cães saudáveis com < 12 meses de idade (n = 4).

5.7. Detecção de anticorpos IgE anti-*D. pteronyssinus* e anti-*M. musculus* por ELISA em soros de cães com sintomas clínicos de doença de pele

Os soros de cães foram também analisados quanto à presença de IgE específica para os antígenos heterólogos SDpt e SMAg.

Animais com dermatite atópica e teste ID positivo apresentaram níveis elevados de anticorpos IgE positivos para SDpt (Figura 4). Animais com dermatite e alopecia com mais de 12 meses de idade e aqueles com diagnóstico de demodicose também apresentaram níveis elevados de IgE positivos para SDpt. Estes dados inferem que estes 2 grupos de animais tiveram contato prévio com o ácaro *D. pteronyssinus* ou com ácaros causadores de sarna canina. Cães assintomáticos apresentaram baixos níveis de IgE específicos a SDpt. Animais sintomáticos com menos de 12 meses de idade apresentaram índices baixos de positividade, similar aos observados em animais assintomáticos. Baixos níveis de IgE anti-SDpt encontrados em animais assintomáticos com mais de 12 meses de idade em comparação com altos níveis encontrados em animais sintomáticos com mais de 12 meses e animais positivos para demodicose podem indicar que altos níveis de IgE anti-SDpt em cães sintomáticos estão relacionados a contato prévio com ácaros causadores da sarna canina.

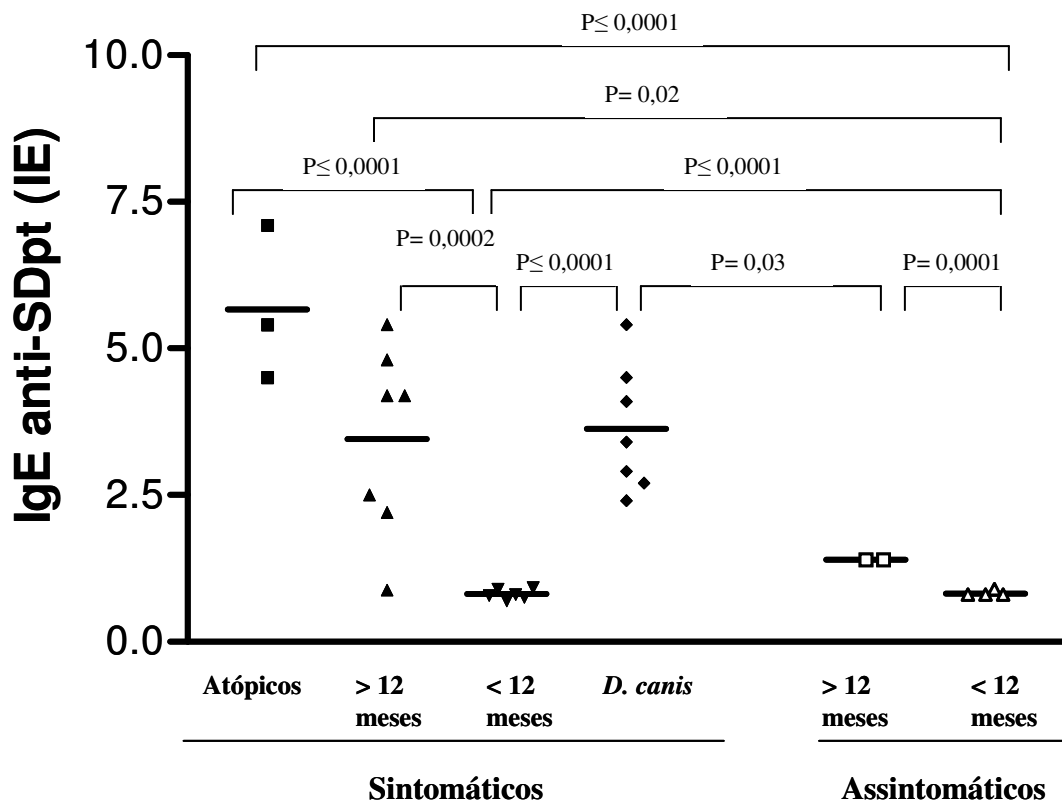


Figura 4 - Níveis de anticorpos IgE anti-SDpt, expressos em índice ELISA (IE), determinados em 30 amostras de soros de cães. As amostras foram analisadas nos seguintes sub-grupos: (I) Sintomáticos: cães com dermatite atópica (teste ID positivo e IgE anti-*D. pteronyssinus* positivo, n = 3), cães com dermatite e alopecia com > 12 meses de idade (n = 7), cães com dermatite e alopecia com < 12 meses de idade (n = 6), cães com dermatite e alopecia e positivos no raspado de pele para *D. canis* (n = 7) e (II) Assintomáticos: cães saudáveis com > 12 meses de idade (n = 3) e cães saudáveis com < 12 meses de idade (n = 4).

Cães atópicos, cães sintomáticos com mais de 12 meses de idade e animais com demodicose apresentaram níveis de IgE anti-SMAg mais elevados que animais sintomáticos com menos de 12 meses e aqueles assintomáticos (Figura 5), embora com reatividade inferior aquela observada quando se utilizou o antígeno SDpt. Os resultados indicam que os animais sintomáticos com mais de 12 meses de idade poderiam ter tido contato prévio com ácaros causadores de sarna canina.

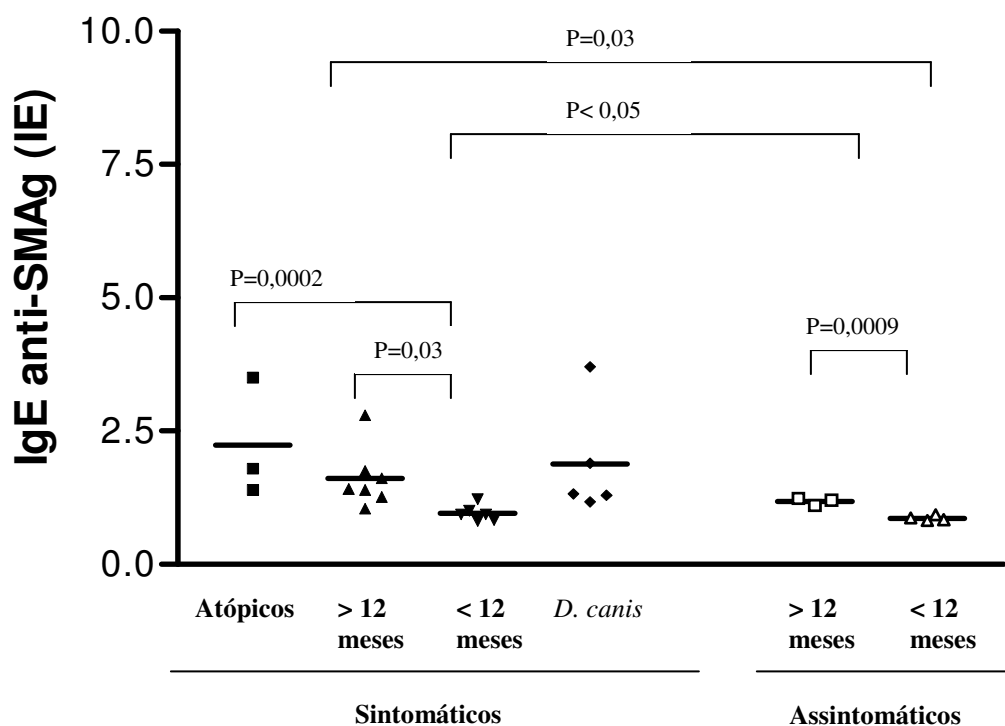


Figura 5 - Níveis de anticorpos IgE anti-SMAg, expressos em índice ELISA (IE), determinados em 30 amostras de soros de cães. As amostras foram analisadas nos seguintes sub-grupos: (I) Sintomáticos: cães com dermatite atópica (teste ID positivo e IgE anti-*D. pteronyssinus* positivo, n = 3), cães com dermatite e alopecia com > 12 meses de idade (n = 7), cães com dermatite e alopecia com < 12 meses de idade (n = 6), cães com dermatite e alopecia e positivos no raspado de pele para *D. canis* (n = 7) e (II) Assintomáticos: cães saudáveis com > 12 meses de idade (n = 3) e cães saudáveis com < 12 meses de idade (n = 4).

5.8. Quantificação de eosinófilos no sangue periférico de cães com sintomas clínicos de sarna demodécica e positivos no raspado de pele e de cães aparentemente saudáveis

Por meio de esfregaço sanguíneo, eosinófilos do sangue periférico foram quantificados. Foi feita a leitura em microscópio óptico, sendo contados um total de 100 leucócitos de lâminas de esfregaços de cães saudáveis e que apresentavam algum sintoma sugestivo de demodicose.

Tabela 7. Número de eosinófilos em 100 leucócitos analisados em esfregaços no esfregaço sanguíneo.

Porcentagem de eosinófilos por 100 leucócitos analisados			
Saudáveis	Demodicose	Dermatofitose	Dermatite sem diagnóstico
$6,5 \pm 2,3$	$3,0 \pm 3,2$	$9,2 \pm 3,5$	$8,5 \pm 3,6$

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico da demodicose muitas vezes é complicado devido a resultado de raspado de pele falso negativo, por outro lado a demonstração de ácaro adulto ocasional num raspado de pele é compatível com o diagnóstico de pele normal. Neste estudo, a maioria das análises de raspados de pele dos cães estudados permaneceram sem diagnóstico definido. Isto pode ser devido a dificuldade de se encontrar o parasito nas amostras biológicas (MUELLER, 2004) sugerindo a necessidade de desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis.

Nossos estudos mostraram que cães com dermatite e positivos no raspado de pele para *D. canis* apresentam anticorpos IgG contra antígeno heterólogo dos ácaros *D. pteronyssinus* e *M. musculus*, ambos pertencentes ao mesmo filo Arthropoda, subclasse Chelicerata, subordem Acari. Quando antígenos dos 3 ácaros foram analisados eletroforeticamente, eles apresentaram proteínas com massas moleculares de peso aparente de 72 kDa e os antígenos SDAg e SMAg apresentaram proteínas com Mr de 50, 72 e 111 kDa em comum. Cães saudáveis apresentam quantias detectáveis de IgE e / ou IgG para proteína do extrato de *S. scabiei*, provavelmente resultante de sensibilização a ácaro da poeira doméstica que compartilha epítomos com o antígeno de *S.* (ARLIAN; MORGAN, 2000). Como observado para *S. scabiei*, a detecção de IgG anti-Dpt em soro de cães com demodicose provavelmente é devido a presença de antígenos de reatividade cruzada entre os parasitos *D. canis* e *D. pteronyssinus*. Foi observada também a presença de anticorpos IgG específicos anti-SDpt em soros de cães com dermatite e alopecia tais como: atópicos, sintomáticos com menos de 12 meses, e cães sintomáticos e assintomáticos com mais de 12 meses de idade. Ácaros da poeira domiciliar são encontrados em casas por todo mundo e

cães residem em residências em clima onde estes ácaros são prevalentes. Recentes estudos mostraram que os principais alérgenos do ácaro da poeira domiciliar Der p1, Der p2, Der f1 e Der f2 para humanos não são os principais alérgenos em cães com dermatite atópica (NOLI et al., 1996). Além disso, existe uma alta frequência de anticorpos IgE específicos para *D. pteronyssinus* e *D. farinae* em cães normais e atópicos (LIAN; HALLIWELL, 1998), o que dificulta um diagnóstico definitivo. Os animais saudáveis com menos de 12 meses de idade (1 a 2 meses) apresentaram uma baixa reatividade ao antígeno SDpt, sugerindo que ainda não entraram em contato com o ácaro *D. pteronyssinus*. A reatividade cruzada entre *D. canis* e *D. pteronyssinus* pode ser devido a uma proximidade filogenética entre estes ácaros, como foi sugerido no estudo realizado por Taskapan et al.(2003), quando analisaram a resposta a antígenos de *D. pteronyssinus* em pacientes com *S. scabiei*.

De forma semelhante a *D. canis*, foi observado a presença de reatividade cruzada entre antígenos de *D. pteronyssinus* e *Myocoptes musculus*, entretanto, em menores proporções. Estudos semelhantes foram realizados com cães infestados com sarna sarcóptica, onde se observou uma reatividade cruzada entre seus antígenos e antígenos de *D. pteronyssinus*, existindo bandas semelhantes entre eles (ARLIAN; MORGAN, 2000; SCHUMANN, 2001).

Foi observado que não houve reatividade cruzada, utilizando como antígeno proteínas de SDpt, entre os soros de cães com dermatofitoses (soros de 3 animais do grupo com dermatite e alopecia com menos de 12 meses de idade e que apresentaram no raspado de pele a presença de macroconídeas e hifas septadas). Esse resultado está de acordo com a distância filogenética entre ácaros e fungos, sugerindo a ausência de antígenos de

reatividade cruzada entre eles (ARLIAN; PLATTS-MILLS, 2001; MARCONDES, 2001; MACCARTHY, 2005).

Da mesma forma que para os ensaios ELISA para detecção de IgG para Dpt e SMAg, foi observado também a presença de anticorpos IgE específicos para *D. pteronyssinus* e *M. musculus* em soro de cães com dermatite atópica, cães com mais de 12 meses de idade e dermatite e cães com demodicose. Entretanto, em cães assintomáticos os níveis de IgE anti-SDpt e SMAg apresentaram índices ELISA menores em relação aos sintomáticos. Isto sugere que anticorpos do isotipo IgE conseguem discriminar melhor cães com dermatite e cães saudáveis, mesmo aqueles em idade que tenha permitido contato prévio com o ácaro domiciliar (ARLIAN; MORGAN, 2000). Pela primeira vez foi demonstrado a detecção de anticorpos IgE anti-SDpt em soro de cães com demodicose podendo refletir a presença de reatividade cruzada entre os antígenos dos 2 ácaros, *D. pteronyssinus* e *D. canis*. Além disso, uma outra hipótese é que a presença de anticorpos IgE anti-Dpt em soro de cães com dermatite com mais de 12 meses de idade pode indicar contato prévio com ácaros causadores de sarna em cães que não foram diagnosticados.

Estudos com camundongos infestados com *M. musculus* revelaram concentração elevada de IgE no soro, sendo que estes altos níveis estavam associados com dermatites e lesões de pele (MORITA et al., 1999). Quando o antígeno SMAg foi utilizado para pesquisa de anticorpos IgE em soro de cães com atopia, dermatite e alopecia em cães com mais de 12 meses e menos de 12 meses e cães com demodicose foi observada uma reatividade a este antígeno, embora em menores proporções. Então, a menor reatividade ao antígeno SMAg pode refletir a menor concentração de anticorpos IgE no soro destes animais e reatividade cruzada entre os antígenos SMAg, SDpt e SDAg.

De acordo com estudos anteriores, anticorpos IgG e IgE anti-*S. scabiei* são encontrados em soro de cães com dermatite atópica e anti-*D. pteronyssinus* em cães com escabiose (ARLIAN; MORGAN, 2000). Nossos estudos revelaram que também existe uma reatividade cruzada entre os antígenos de SDpt, SMAg e SDAg e que cães com dermatite e alopecia aqueles com demodicose apresentam IgG e IgE específicas no soro contra estes antígenos. Estudos posteriores são necessários para definir antígenos que sejam específicos do ácaro *D. canis* e que possam discriminar animais com dermatite atópica e sarna demodécica.

7. CONCLUSÕES

Foram avaliados as fichas de cães atendidos no HV-FAMEV, com sintomas de dermatite e alopecia, onde concluiu-se que grande parte destes cães apresentavam-se contaminados com fungos e sarna, sendo que destes com sarna a maioria estava infestado com *D. canis*.

Foi observado também, através do perfil eletroforético, que haviam bandas semelhantes entre antígenos solúveis de *D. canis* (SDAg) e antígenos heterólogos solúveis de *M. musculus* (SMAg) e de *D. pteronyssinus* (SDpt). Explicando-se assim a reatividade cruzada entre estes antígenos.

Através da padronização do teste ELISA para detecção de anticorpos anti-*D. canis* utilizando antígeno homólogo, antígeno solúvel SDAg, foi encontrado uma reatividade inespecífica deste antígeno, no entanto para a detecção de antígenos heterólogos solúveis SMAg e SDpt o resultado foi satisfatório, inferindo-se assim que o uso de antígenos heterólogo para detecção de sarna demodécica seria uma opção para seu diagnóstico.

Nossos estudos revelaram que também existe uma reatividade cruzada entre os antígenos de SDpt, SMAg e SDAg e que cães com dermatite e alopecia aqueles com demodicose apresentam IgG e IgE específicas no soro contra estes antígenos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S. Serum antibody to *Sarcoptes scabiei* and house dust mite prior to and during infestation with *S. scabiei*. **Veterinary Parasitology**, n. 90, p. 315-326, 2000.

ARLIAN, L. G.; PLATTS-MILLS, T. A. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v.107, p. 406-413, 2001.

AYDINGOZ, I. E. *Demodex folliculorum* in renal transplant patients. **Dermatology**. n.195, v.3, p.232-234. 1997.

CHESNEY, C. J. Short form of *Demodex* species mite in the dog: occurrence and measurements. **J Small Anim Pract.** v. 40, p. 58-61, 1999.

CORRÊA, O. Contribuição à determinação dos índices helmintológicos e entomológicos de *Canis familiaris* Linnaeus na cidade de Porto Alegre. Porto Alegre, Escola de Agronomia e Veterinária, 1947. 86 pp. (Tese).

GAAFER, S. M.; GREVE, J. Natural transmisson of *Demodex canis* in dogs. **J.A.V.M.A.**, v. 148, p. 1043, 1996.

GARFIELD, R. A.; REEDY, L. M. The use of oral milbemycin oxime (interceptor) in the treatment of chronic generalized canine demodicosis. **Veterinary Dermatology**, v. 3, p. 231-235, 1992.

HIRSH, D. C.; BAKER, B. B.; WIGER, N.; YASKULSKI, S. G.; OSBURN, B. I. Suppression of in vitro lymphocyte transformation by serum from dogs with generalized demodicosis. **Am. J. Vet. Res.** v. 36, p. 1591-1595, 1975.

KAWAMOTO, S; AKI, T; YAMASHITA, M; TATEGAKI, M; FUJIMURA, T; TSUBOI, S; KATSUTANI, T; SUZUKI, O; SHIGETA, S; MUROOKA, Y; ONO, K. Toward Elucidating the Full Spectrum- State of the Art of Mite Allergens. **Journal of Biooscience and Bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 285-298, 2002.

KUMAR, L.; SRIDHARA, S.; SINGH, B. P.; GANGAL, S. V. Characterization of cogon grass (*Imperata cylindrica*) pollen extract and preliminary analysis of grass group 1, 4 and 5 homologues using monoclonal antibodies to *Phleum pratense*. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 117, n. 3, p. 174-179, 1998.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.277, p. 680 - 685, 1970.

LEMARIE, S. L.; HOROHOV, D. W. Evaluation of interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in the dogs with generalized demodicosis. **Veterinary Dermatology**, v. 7, p. 213-219, 1996.

LIAN, T. M., HALLIWELL, R. E. W., Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** n. 66, 203-223, 1998.

LOWRY, O, H; ROSEBROUGH, N, J; FARR, L; RANDALL, R, J. Protein mensurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACCARTHY, J. S.; KEMP, D. J.; WALTON, S. F.; CURRIE, B. J. *Scabies*: more than just an irritation. **Postgrad. Med. J.**, v. 80, 382-387, 2005.

MACIEL, A. S.; VIANA, J. A. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão – segunda parte. *Clínica Veterinária*, n. 57, p. 74-82, 2005.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, São Paulo: Atheneu, 2001, p. 289-291.

MORITA, E; KANEKO, S; HIRAGUN, T; SHINDO, H; TANAKA, T; FURUKAWA, T; NOBUKIYO, A; YAMAMOTO, S. Fur mites induce dermatitis associated with IgE hyperproduction in an inbred strain of mice, NC/Kuj. **J. Dermatol. Sci.**, n.19, v. 1, p. 37-43, 1999.

MOURA, R. A. *Técnicas de Laboratório*. 3.ed., Rio de Janeiro, Atheneu, 1987, p. 359.

MUELLER, R. S. Treatment protocols for demodicosis an evidence-based review. *Veterinary Dermatology*, v. 15, p. 75-89, 2004.

MUELLER, R. S. Dermatology for the small Animal Practitioner. **Teton New Media**, Jackson, FL, p. 21-30, 2000.

MULLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D. W. **Dermatologia dos Pequenos Animais**, 3 ed., São Paulo: Manole, 1985, p. 349-369.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARD, P. M.; VITOR, R. W. A. *Parasitologia Humana*, 11 ed., Belo Horizonte: Atheneu, 2005, p.457-458.

NOLI, C., BERNARDINA, W. E., WILLEMSE, T.. The significance of reactions to purified fractions of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in canine atopic dermatitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** n.52, p. 147-157, 1996.

NORN, M. S. *Demodex folliculorum*. Incidence and possible pathogenic role in the human eyelid. **Acta Ophthalmol. Suppl.**, n. 108, p. 7-85, 1970.

NUTTING, W. B. *Demodex aurati* sp.nov. and *D. criceti*, ectoparasites of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Parasitology**, v. 51, p. 515-522, 1961.

NUTTING, W. B. Hair follicle mites (Acari: Demodicidae) of man. **Int. J. Dermatol.** v. 15, p.79, 1976.

NUTTING, W. B. Hair follicle mites (*Demodex* spp.) of medical and veterinary concern. **Cornell. Vet.** v. 66, p. 214, 1976.

OWEN, L. N. Transplantation of canine osteosarcoma. **Eur. J. Cancer**, v. 5, p. 615, 1969.

PING, Z; YANZHUO, D; JINGKAI, S; YUN'E, Z; CHEN, C. Enzyme immunoassay using a crossed-beam thermal lens technique. **Microchemical Journal.** v.64, p. 257-262, 2000.

PLATTS-MILLS, T. A. E., WECK, A. L. Dust mite allergens and asthma: a worldwide problem. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 83, p. 416-427, 1989.

PLATTS-MILLS, T. A. E., THOMAS, W. R., AALBERSE, R. C., VERVLOET, D., CHAPMAN, M. D. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 89, p. 1046-1060, 1992.

ROIHU, T.; KARINIEMI, A. L. *Demodex* mites in acne rosacea. **J. Cutan. Pathol.** v. 25, p. 550-552, 1998.

SAKO, S.; YAMANE, O. Studies on the canine demodicosis. III. Examination of the oral-intestinal infection and infection through respiratory tract. **Jpn. J. Parasitol.** v. 11, p. 499, 1962.

SARKAR, P.; MUKHERJEE, J.; GHOSH, A.; BHATTACHARJEE, M.; MAHATO, S.; CHAKRABORTY, A.; MONDAL, M.; BANERJEE, C.; CHAUDHURI, S. A comparative analysis of immunorestitution and recovery with conventional and immunotherapeutic protocols in canine generalized demodicosis: a newer insight of immunotherapeutic efficacy of T11TS. **Immunol Invest.** n. 33, v. 4, p. 453-468, 2004.

SCHUMANN, R. J.; MORGAN, M. S.; GLASS, R.; ARLIAN, L. G. Characterization of house dust mite and scabies mite allergens by use of canine serum antibodies. **Am. J. Vet. Res.** N.62, v. 9, p. 1344-1348, 2001.

SCOTT, D. W.; FARROW, B. R. H.; SCHULTZ, R. D. Studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. **J.A.A.H.A.** v. 10, p. 233, 1974.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. 2001. pp. 423-516. *In*: Muller and Kirk's **Small Animal Dermatology**, 6th ed. (SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. Eds), W. B. Sanders, Philadelphia.

SCOTT, D. W.; SCHULTZ, R. D.; BAKER, E. B. Further studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 12, p. 203-213, 1976.

SILVA, D.A.O., SILVA, N.M., MINEO, T.W.P., PAJUABA-NETO, A.A., FERRO, E.A., MINEO, J.R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. *Vet. Parasitol.*, v. 107, p. 181-195, 2002.

TANI, K.; IWANAGA, T.; SONODA, K.; HAYASHIYA, S.; HAYASHIYA, M.; TAURA, Y. Ivermectin treatment of demodicosis in 56 hamsters. **J. Vet. Med. Sci.** v. 63, p. 1245-1247, 2001.

TANI, K.; UNE, S.; HASEGAWA, A.; ADACHI, M.; KANDA, N.; WATANABE, S.; NAKAICHI, M.; TAURA, Y. Infestivity of *Demodex canis* to hamster skin engrafted onto SCID mice. **J. Vet. Med. Sci.** n. 67, v. 4, p. 445-448, 2005.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**, 5 ed., São Paulo: Roca, 1998, p. 340.

WELTER, A. Infestação prévia com *Myocoptes musculus* altera a resposta imune induzida por *Toxoplasma gondii*. 2005. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

WILSON, M.B.; NAKANE, P.K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W.; Holubar, K.; Wick, G. (Eds.), **Immunofluorescence and related staining techniques**. Amsterdam: Elsevier North Holland Biomedical Press, pp. 215-224, 1978.