



04/27-02/46

Rev. bras. alerg. imunopatol.

Copyright © 2004 by SBAI

ARTIGO ORIGINAL

Verificação da potência de extratos alergênicos comerciais de *Dermatophagoides pteronyssinus* para imunoterapia

Evaluation of the potency of commercially available *Dermatophagoides pteronyssinus* allergenic extracts for immunotherapy.

Alexsandro F. Zavadniak¹, Nelson A. Rosário Filho¹, L. Karla Arruda²,
Fabio F. Morato Castro³, Dirceu Solé⁴, Wilson T. Aun⁵, Alfeu T. França⁶, Dirceu B. Greco⁷

Resumo

Objetivo: Verificar a potência *in vivo* e *in vitro* de oito extratos alergênicos comerciais de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) para imunoterapia.

Métodos: Foram adquiridos, sem o conhecimento dos fabricantes, os extratos mais concentrados utilizados em imunoterapia. Os alérgenos Der p 1 e Der p 2 foram quantificados por método imunoenzimático, em oito extratos alergênicos de diferentes laboratórios. Os extratos foram avaliados por testes cutâneos de leitura imediata pela técnica de puntura (TCA) realizados com puntor descartável (Alko). Pacientes alérgicos a Dp (n=210) e indivíduos não alérgicos (n=31) foram submetidos a TCA em seis serviços de alergia. A intensidade das reações foi aferida pelo diâmetro médio das pápulas, em leitura após 15 minutos.

Resultados: Os níveis de alérgenos Der p 1 ou Der p 2 foram indetectáveis ou muito baixos (0,02 a 0,58 µg/mL) na maioria dos extratos, exceto no extrato I (68,3 e 31,7 µg/mL, respectivamente). Em pacientes alérgicos, a mediana dos diâmetros das pápulas obtidas em testes cutâneos foi < 3mm para 7/8 extratos analisados, enquanto que a mediana do diâmetro das pápulas obtidas com histamina foi de 6mm, e com o extrato I, de 7mm. A positividade dos testes (pápula ≥ 3 mm) com os sete extratos variou de 2 a 36%. O extrato I teve positividade de 97,2%.

Conclusão: A maioria dos extratos alergênicos testados *in vitro* e *in vivo* apresentou níveis de alérgenos insuficientes para alcançar as doses efetivas preconizadas internacionalmente para imunoterapia.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004; 27(2):46-54
composição alergênica; vacina alergênica; imunoterapia; Der p 1; Der p 2.

Abstract

Objective: To verify *in vitro* and *in vivo* potency of eight commercially available *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) allergenic extracts for immunotherapy.

Methods: Levels of allergens Der p 1 and Der p 2 were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay method in concentrated allergenic extracts for immunotherapy from different manufacturers. Extracts were also evaluated by skin prick testing (SPT) with a disposable device (Alko). Patients allergic to Dp (n=210) as well as non allergic subjects (n=31) from six different allergy clinics were tested. Reactions were read after 15 minutes considering the mean crossed diameters of wheals.

Results: Der p 1 and Der p 2 allergen levels were undetectable or very low (range 0.02 to 0.58 µg/mL) in most extracts, except in extract I (68.3 and 31.7 µg/mL, respectively). Among allergic patients, median values of wheal diameters in skin tests was < 3 mm for 7/8 extracts, as compared to 6 mm for histamine and 7 mm for extract I. The frequency of positive SPT (wheal ≥ 3 mm) with seven extracts varied from 2 to 36%, while extract I gave 97.2% positive reactions with similar frequencies in all centers.

Conclusion: Most of the allergenic extracts tested both *in vitro* and *in vivo* did not have sufficient amounts of the major Dp allergens necessary for effective doses in immunotherapy.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2004; 27(2):46-54
allergen content; allergen vaccine; immunotherapy; Der p 1; Der p 2.

1 - Universidade Federal do Paraná; 2 - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto; 3 - Universidade de São Paulo - São Paulo; 4 - Universidade Federal de São Paulo; 5 - Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo; 6 - Universidade Federal do Rio de Janeiro; 7 - Universidade Federal de Minas Gerais

Introdução

O controle das doenças alérgicas baseia-se em evitar a exposição aos alérgenos, educação do paciente, terapia farmacológica e imunoterapia alérgeno-específica¹.

A imunoterapia alérgeno-específica tem como finalidade modificar ativamente os mecanismos imunológicos envolvidos nas doenças alérgicas. Consiste na administração de doses graduais e progressivas de um extrato alergênico a um indivíduo sensibilizado, com o objetivo de aumentar sua tolerância a esse alérgeno².

A imunoterapia com alérgenos mostrou-se eficaz no tratamento de pacientes com asma, rinoconjuntivite alérgica e nas reações anafiláticas por venenos de insetos. A imunoterapia alérgeno-específica é o único tratamento capaz de alterar a história natural da doença alérgica ao prevenir asma em pacientes com rinite alérgica, além de dificultar o desenvolvimento de novas sensibilizações em crianças^{3,4}.

Recomendações internacionais enfatizam a necessidade de garantir-se a qualidade dos extratos alergênicos, visando a segurança e a eficácia do tratamento. A padronização dos extratos utilizados permite ainda a redução da frequência e da gravidade das reações sistêmicas secundárias à imunoterapia. A padronização de um extrato baseia-se na determinação da potência biológica *in vivo* através de testes cutâneos de hipersensibilidade imediata, e *in vitro*, através de ensaios de inibição de RAST ou ELISA. Em ambos os casos realiza-se a comparação entre o extrato testado e um extrato considerado de referência pela Organização Mundial de Saúde². Mais recentemente tem sido utilizada a medida de alérgenos principais em unidades de massa para padronização de alguns extratos alergênicos.

Uma das questões cruciais na avaliação de um extrato alergênico diz respeito à determinação de alérgenos específicos presentes na solução, já que a eficácia da imunoterapia está relacionada à ad-

ministração de quantidade fixa e regular do alérgeno⁵.

O objetivo deste estudo é verificar a potência, *in vivo* e *in vitro*, de diferentes extratos alergênicos de *Dermatophagoides pteronyssinus* para imunoterapia.

Materiais e métodos

Obtenção dos extratos

Extratos comerciais de *Dermatophagoides pteronyssinus* para imunoterapia foram adquiridos sem informar ao fabricante sobre a realização da pesquisa. Foram escolhidos preferencialmente extratos comerciais aquosos concentrados para diluição ou de maior concentração já preparados para utilização por via subcutânea.

Foram obtidos extratos comercializados no Brasil por sete empresas, além de extrato da Bayer Co (Hollister-Stier, EUA) 30000 AU/mL, solução de histamina 10 mg/mL (IPI-ASAC) e glicerina 50%. Um dos fabricantes dispunha somente de extrato para “inalantes” (extrato D); outro apenas de extrato precipitado em gel de AIOH (extrato H).

Codificação e preparo dos extratos

As dez soluções (8 extratos alergênicos, 1 de histamina e 1 de glicerina) foram preparadas em câmara de fluxo laminar com material estéril para manipulação e acondicionamento das soluções e então codificadas pelo Serviço de Farmácia Hospitalar com letras de A a J sem o conhecimento dos pesquisadores. O código só foi aberto após o término da análise estatística.

Foram preparadas duas alíquotas de cada extrato: uma para determinação de alérgenos principais e outra para testes cutâneos.

Inicialmente foram retiradas amostras de cada frasco para quantificação dos alérgenos *in vitro*. Foi retirado 1 ml de cada um dos sete extratos comercializados no Brasil, da solução de histamina e glicerina 50%. Do extrato da Bayer foi retirado 0,3 mL e diluído em frasco contendo 0,6 mL de solução fisiológica 0,9%, resultando em uma solução final de 10000 AU/mL. As concentrações dos extratos estão listadas na tabela 1.

A seguir, foram preparadas as soluções para testes cutâneos. Aos sete extratos nacionais comerciais brasileiros foi adicionada glicerina na proporção 1:1 v/v, resultando em soluções glice-

rinadas a 50% dispostas em frascos conta-gotas. Ao extrato Bayer foi também adicionada glicerina, resultando uma solução glicerinada 50% com 10.000 AU/mL. Glicerina a 50% e histamina 10 mg/mL foram acondicionadas em frascos conta-gotas para servirem de controle negativo e positivo, respectivamente.

Cada centro participante recebeu um “kit” que continha: carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa, 1 caixa de isopor com 10 frascos conta-gotas identificados com as letras de A a J, 1 régua acrílica milimetrada (Trident mod. 7115), 65 envelopes de puntores descartáveis (Alko do Brasil) contendo 10 puntores cada, cópias do consentimento informado, 1 resumo do estudo, 1 pasta com fichas para anotação dos resultados acompanhada de 1 sumário da pesquisa e 1 página de orientação para o registro de dados nas fichas.

Seis serviços de alergia participaram do estudo, realizado no período de dezembro de 1999 a maio de 2000, com um pesquisador responsável pela realização dos testes cutâneos em cada local: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Escola Paulista de Medicina, Universidade de São Paulo, Hospital do Servidor Público Estadual –SP, Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto e Universidade Federal do Rio de Janeiro. O protocolo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa das instituições envolvidas.

Participantes

Grupo casos (N=218): Os testes cutâneos de leitura imediata foram realizados em pacientes atópicos selecionados nos respectivos ambulatórios especializados, de ambos os sexos, de qualquer grupo étnico, com idade superior a sete anos, após autorização por consentimento livre e esclarecido. Ainda como critérios de inclusão estavam as seguintes condições: diagnóstico clínico de asma (de acordo com os critérios do *Global Strategy for Asthma*) e/ou rinite alérgica (de acordo com os critérios do *Guidelines of the Joint Task Force on Practice Parameters in Allergy, Asthma and Immunology*, 1998), história familiar de doença atópica, teste cutâneo alérgico prévio positivo para *D. pteronyssinus*. Foram excluídos os pacientes com lesões cutâneas em antebraços ou condições patológicas que comprometessem a reatividade cutânea, com história prévia de reação

anafilática, em uso de medicamentos (anti-histamínicos, antidepressivos, conforme tempo de supressão da reatividade cutânea) ou submetidos à imunoterapia específica por mais de três meses e há menos de três anos.

Grupo controle (N=32): indivíduos não atópicos constituindo o grupo controle foram igualmente testados em cada centro, para afastar a ocorrência de reações inespecíficas.

Testes cutâneos de leitura imediata

Foram realizados testes cutâneos por puntura com puntor descartável na linha mediana das faces anteriores dos antebraços, com distância mínima de 3 cm entre as soluções.

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

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

O diâmetro da pápula foi considerado como representativo da sensibilidade cutânea. O teste foi considerado positivo quando houve a formação de pápula com diâmetro médio igual ou superior a 3 mm.

Determinação da quantidade alergênica in vitro

A determinação da concentração alergênica das soluções foi realizada no Laboratório de Alergia e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP. Inicialmente as soluções foram recodificadas, para que os pesquisadores permanecessem desinformados sobre o conteúdo alergênico das soluções.

Foram quantificados os níveis dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 por ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo “sandwich”, conforme descrito por Luczynska *et al*⁶. Em resumo, em cada poço da placa de microtitulação de poliestireno (Immunolon II Dynatech, Alexandria, VA, USA)

foram colocados 1 µg dos respectivos anticorpos monoclonais: anti-Der p 1 (5H8) e anti-Der p 2 (1D8) em tampão carbonato-bicarbonato, 50 mM, pH 9,6 e incubados por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2 (PBS) contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas por uma hora, em temperatura ambiente com 0,1 mL de PBS-T acrescido de soroalbumina bovina a 1% (PBS-T-BSA). Etapas subseqüentes foram realizadas utilizando PBS-T-BSA como diluente e lavagens foram efetuadas entre as etapas da reação.

Adicionou-se 0,1 mL das amostras em diluições crescentes entre 1:2 até 1:4096. Paralelamente, foram realizadas, em duplicata, as curvas padrões, em diluições seriadas em PBS-Tween+BSA a 1%, variando de 250 a 0,25 ng/mL. Foram utilizados extratos de ácaros com concentrações conhecidas, obtidos da Universidade da Virgínia, EUA: Der p 1 (UVA 93/03) e Grupo 2 (UVA 92/02). O extrato UVA 93/03 contém 2500 ng/mL de Der p 1 foi subpadronizado contra a referência de *D. pteronyssinus* da WHO/IUIS (NIBSC 82/518) que contém 12,5 µg/mL de Der p 1. O extrato UVA 92/02 contém 2500 µg/mL de Der p 2 foi subpadronizado contra a preparação de referência CBER/FDA E1-Dp, que contém 50 µg/mL de Der p 2.

Após uma hora de incubação à temperatura ambiente foram adicionados os anticorpos monoclonais biotinizados: anti-Der p 1 (4C1) na diluição 1:1000 ou anti-Der p 2 (7A1) na diluição de 1:3000 em PBS-Tween +BSA a 1%. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma S5512) a 1:1000 foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente.

Adicionou-se 0,1 mL do substrato enzimático consistindo de solução ABTS a 1mM em Tampão Citrato-Fosfato 70 mM, pH 4,2 e contendo 0,03 % de H₂O₂. A leitura foi realizada quando a absorbância do topo da curva controle alcançou 2,0-2,4 em leitor de microplacas (E-max, Molecular devices corporation, Sunny Vaile, CA, USA) a 405 nm. A absorbância obtida é diretamente proporcional à quantidade de alérgenos ligados, e os valores foram obtidos de suas respectivas curvas controle.

Os dados foram analisados com o auxílio do programa estatístico PRIMER OF BIOSTATISTICS.

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

A frequência de positividade dos testes em cada centro foi analisada por teste não paramétrico de comparação entre duas proporções. Para correlação entre os diâmetros médios das pápulas de cada paciente, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

Resultados

Potência alergênica dos extratos in vitro

Após a realização dos testes cutâneos por todos os centros envolvidos, recebimento das fichas de registro e análise dos extratos pelo coordenador da pesquisa e análise estatística dos dados, foi realizada a decodificação dos frascos identificando-se, portanto, as soluções avaliadas *in vivo* e *in vitro*. A solução de histamina (controle positivo) e a solução de glicerina (controle negativo), tinham sido codificadas, respectivamente, como extratos A e J. O extrato de referência internacional (Bayer) havia recebido o código I. Os níveis dos alérgenos de *D. pteronyssinus* (Der p 1 e Der p 2) determinados por ELISA tipo sandwich nas dez soluções estão demonstrados na tabela 1.

Na maioria dos extratos avaliados a quantidade dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 foi inferior a 0,002 µg/mL, sendo detectáveis níveis baixos destes alérgenos nos extratos F e G. Uma quantidade relevante de alérgenos foi exclusivamente detectada na solução I.

Avaliação dos extratos in vivo

Foram excluídos da análise oito pacientes que apresentaram média dos diâmetros das pápulas inferiores a 3 mm para a solução de histamina 10 mg/mL (controle positivo) ou testes positivos para a solução de glicerina 50% (controle negativo). Foi excluído ainda um paciente do grupo de não atópicos que teve teste cutâneo positivo a algum dos extratos alergênicos testados. Assim, foram analisados os dados de 210 pacientes atópicos e 31 pacientes não atópicos.

Os pacientes atópicos incluídos na análise tinham idade entre 7 e 63 anos (média de 19,3 anos; 96 M;114 F). A maioria dos pacientes tinha diagnóstico de asma e rinite alérgica (67%), en-

quanto 26% apresentavam somente rinite alérgica e 7% somente asma. Os indivíduos não atópicos tinham idade entre 11 e 72 anos (média de 26,9 anos; 18 M: 13 F).

Os 31 indivíduos não atópicos incluídos na análise apresentaram reatividade cutânea à solução de histamina semelhante aos pacientes atópicos (média das pápulas: $6,26 \pm 1,69$ mm, com varia-

ção de 2,5 a 10,0 mm). Estes pacientes não apresentaram reações cutâneas às outras soluções testadas.

A mediana dos diâmetros das pápulas obtidas em testes cutâneos foi < 3 mm para 7/8 extratos analisados, enquanto que a mediana do diâmetro das pápulas obtidas com histamina foi de 6mm, e com o extrato I, de 7mm (tabela 2).

Tabela 1 - níveis de der p 1 e der p 2 em extratos de *D. pteronyssinus* utilizados em imunoterapia

Soluções	Tipo	Concentração final avaliada*	alérgenos	
			Der p 1 (μ g/ml)	Der p 2 (μ g/ml)
A	Histamina	10 mg/ml	<0,002	<0,002
B	<i>D. pteronyssinus</i>	10.000 UBT/ml	<0,002	<0,002
C	<i>D. pteronyssinus</i>	800 URC	<0,002	<0,002
D ⁺	“inalantes”	2000 PNU/ml	<0,002	<0,002
E	<i>D. pteronyssinus</i>	860 UBE/ml	<0,002	<0,002
F	<i>D. pteronyssinus</i>	100.000 PNU/ml	0,017	<0,002
G	<i>D. pteronyssinus</i>	10 HEP/ml	0,133	0,582
H ⁺	<i>D. pteronyssinus</i>	2000 PNU/ml	<0,002	<0,002
I	<i>D. pteronyssinus</i>	10.000 AU/ml	68,33	31,73
J	Glicerina	50%	<0,002	<0,002

* As unidades são de acordo com as especificações dos fabricantes:

PNU: Protein Nitrogen Unit; UBE: Unidade Biológica Equivalente; HEP: Histamine Equivalent Potency AU: Allergic units; URC: Unidade de Reatividade Cutânea.

⁺ Extratos aquosos concentrados não disponíveis: optou-se pela aquisição dos extratos comercializados com maior quantidade de alérgenos de *Dp*; (D=inalantes, H=precipitado em gel de AIOH).

A figura 1 mostra a frequência de reações positivas ao teste cutâneo para todas as soluções entre pacientes atópicos. Reações cutâneas intensas, com formação de pseudópodos, ocorreram com as soluções de histamina (A) e com o extrato I, e em casos isolados com os extratos C e G.

Discussão

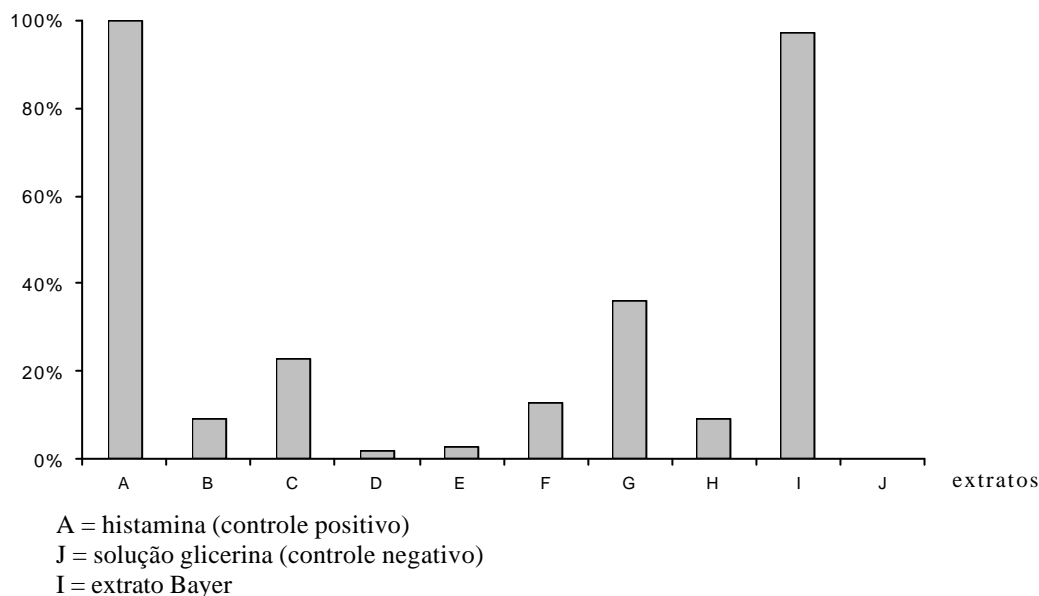
A imunoterapia alérgeno-específica é o mais importante recurso terapêutico modificador da resposta imunológica e é o único tratamento que

interfere nos mecanismos fisiopatológicos básicos das doenças alérgicas. A Sociedade Brasileira da Alergia e Imunopatologia reconhece a imunoterapia com alérgenos como um procedimento inerente à especialidade e recomenda, a exemplo da Organização Mundial de Saúde, sua utilização criteriosa no tratamento de determinadas doenças alérgicas. Sua eficácia clínica depende da correta seleção dos pacientes e utilização de protocolos adequados de tratamento com extratos alergênicos de potência conhecida⁷.

Tabela 2 - Diâmetros das pápulas (mm) produzidas pelos diferentes extratos aos testes por puntura (n=210)

soluções	mediana	mínimo-máximo (mm)
A (Histamina)	6	3-15
B	0	0-5,5
C	1	0-6
D	0	0-3
E	0	0-3,5
F	0	0-5
G	2	0-7
H	0	0-10
I	7	0-22,5
J (Sol. salina glicerina 50%)	0	0-2

Figura 1 – Frequência de positividade ao teste cutâneo com os diferentes extratos



As alterações promovidas pela imunoterapia não estão completamente esclarecidas. Estudos recentes, no entanto, sugerem que os efeitos da imunoterapia sobre os linfócitos T interferem na produção de anticorpos e eosinofilia tissular, produção de mediadores e recrutamento e ativação de mastócitos. A imunoterapia induz a produção de IFN- γ e IL-2 por linfócitos do tipo Th1, além de reduzir a reação inflamatória promovida por

linfócitos Th2. Desta forma, a imunoterapia altera o equilíbrio entre linfócitos Th2 e Th1, favorecendo as respostas celulares do tipo Th1⁸.

Uma metaanálise de diversos estudos⁹ mostrou que pacientes asmáticos submetidos a imunoterapia apresentam melhora dos sintomas, redução do uso de medicamentos regulares e diminuição da hiperreatividade brônquica. Como a maioria dos estudos incluídos não utilizou antígenos padroni-

zados, os resultados obtidos com a imunoterapia são provavelmente melhores que os observados.

A quantidade de alérgenos principais em extratos de ácaros para testes cutâneos comercializados nos Estados Unidos é variável em diferentes extratos de *Dermatophagoides pteronyssinus*¹⁰. Extratos de ácaros submetidos à análise por quatro laboratórios mostraram variação não somente no conteúdo alergênico, mas também na distribuição dos alérgenos principais, Der p 1 e Der p 2¹¹. Nelson¹² quantificou os níveis de Der p 1 em 28 extratos de *D. pteronyssinus* para imunoterapia e encontrou grande variabilidade na quantidade de alérgenos dos extratos (68 a 385 µg/mL), com níveis médios de 172 ± 74 µg/mL de Der p 1.

Estudo de Taketomi *et al*¹³ para avaliar o perfil imunológico das vacinas de alérgenos contendo *D. pteronyssinus* revelou que somente um deles poderia ser caracterizado como apropriado para imunoterapia pelas concentrações de Der p 1 (409 µg/mL) e Der p 2 (210, 7 µg/mL), embora também fossem detectados níveis baixos destes alérgenos em outros dois extratos.

No presente estudo, confirmando os dados de Taketomi *et al*¹³, sete extratos apresentaram quantidades indetectáveis ou muito baixas dos alérgenos Der p 1 e Der p 2. Somente no extrato I o nível de Der p 1 estava dentro dos limites encontrados por Nelson¹².

Os consensos internacionais recomendam que as doses de manutenção devem conter 5 a 20 µg do alérgeno principal por injeção, pelos resultados satisfatórios obtidos com estes níveis em estudos controlados^{2,17}. Por sua vez, extratos com baixas concentrações de alérgenos comprometem a eficácia da imunoterapia no tratamento das doenças alérgicas¹⁴⁻¹⁶.

A técnica utilizada para a verificação *in vivo* da potência dos extratos alergênicos foi a dos testes cutâneos de leitura imediata, que detectam anticorpos IgE específicos. Optou-se pela punção em virtude da segurança, maior especificidade, rapidez e facilidade de execução, menor desconforto para o paciente além da possibilidade de utilização de extratos glicerinados¹⁹. A glicerina é bem tolerada nos locais de teste e não altera a resposta cutânea, além de garantir maior estabilidade aos extratos²⁰.

Os testes cutâneos por punção são melhor realizados e têm maior sensibilidade com a utilização de instrumentos especialmente criados em

substituição à agulha. Comparações entre instrumentos para realização de testes cutâneos, no entanto, têm revelado diferenças significativas entre a reatividade cutânea à solução de histamina ou a extratos alergênicos mesmo quando são utilizados por indivíduos treinados e experientes^{21,22}. Por esta razão, no presente estudo o dispositivo utilizado para os testes de punção foi o mesmo para todos os centros.

A reatividade cutânea depende basicamente de duas variáveis: concentração do alérgeno no extrato utilizado e da sensibilidade dos indivíduos testados. A técnica utilizada para a realização do teste e os valores que definem sua positividade têm importante influência nos resultados²³.

A margem de erro na medida é inversamente relacionada ao diâmetro da pápula. Assim, reações pouco intensas podem ser erroneamente superestimadas. Corroboram para esta afirmação o fato de raramente terem sido observadas reações com pseudópodos, portanto mais intensas, com os extratos em que as discrepâncias nas frequências das reações positivas em relação ao teor de alérgenos no extrato tornaram-se evidentes. Outro fator para explicar estas diferenças pode estar relacionado ainda à técnica de realização dos testes ou ao registro das medidas das pápulas. Ocorrem diferenças nos resultados obtidos entre investigadores que utilizam o mesmo método. O diâmetro médio da pápula pode variar significativamente mesmo quando são utilizados o mesmo método e extrato alergênico para realização do teste cutâneo²⁴.

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

Houve discordância entre a frequência de positividade dos extratos C (22,5%) e G (36%) e suas quantidades dos alérgenos Der p 1 e Der p 2. Neste caso aplicam-se considerações sobre a análise de extratos com características diferentes e de um determinado lote. Por outro lado, não foi pesquisada a presença de outras substâncias nos extratos que pudessem promover reações cutâneas inespecíficas. Além disso, poderia haver outros alérgenos, derivados ou não de ácaros, aos quais os pacientes testados eram sensibilizados.

A despeito destas considerações, cabe ressaltar que o extrato I apresentou alta frequência de rea-

ções positivas, condizentes com o conteúdo alérgico encontrado na avaliação *in vitro*. Além disso, não houve diferença significativa entre os resultados dos testes cutâneos com este extrato, realizados nos diferentes centros participantes.

Estes resultados revelaram que os extratos alérgicos brasileiros de *Dermatophagoides pteronyssinus* para imunoterapia avaliados não apresentavam níveis dos alérgenos Der p 1 e Der p 2 que atingissem as doses de manutenção internacionalmente recomendadas. As possíveis limitações do presente estudo incluem as características dos extratos avaliados, que podem ter relevância nas diferenças dos extratos. Havia diferenças na padronização das unidades alérgicas, com grande variabilidade entre os extratos. Como nem todas as empresas possuíam extratos aquosos, foram analisadas também vacinas de depósito ou modificadas. A modificação de vacinas pode ocasionar alterações, ainda pouco conhecidas, na estrutura molecular dos alérgenos². Além disso, as informações obtidas são restritas aos lotes de extratos que foram testados. Os componentes dos extratos alérgicos dependem de vários fatores, que incluem a fonte do material, a natureza e tempo dos processos de extração, o armazenamento e a manipulação de produtos intermediários e podem ainda ser influenciados pela purificação e outros processos industriais¹⁸.

Em síntese, o presente estudo utilizando extratos comerciais mostra que a quantidade dos alérgenos presentes nos extratos analisados não é suficiente para a eficácia da imunoterapia. Como perspectiva, será necessário implementar medidas para a efetiva padronização dos alérgenos comercialmente disponíveis no Brasil para imunoterapia.

Referências bibliográficas

1. Lemanske RF Jr, Busse WW. Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(2):S502-S519.
2. Bousquet J, Lockey RF, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. WHO Position Paper. *Allergy* 1998;53 (suppl 44):1-42.
3. Des Roches A, Paradis L, Menardo JL. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:450-453.
4. Valorvirta E. Can the natural course of allergy and asthma be changed by allergen vaccinations? *Allergy* 1999;54:27-9.
5. Van Ree R. Standardization of allergen extracts: a mission impossible? *Allergy and Clinical Immunol Intern* 1999;11:55-59.
6. Luczynska CM, Arruda LK, Platts-Mills TAE, Miller JD, Lopez M, Chapman MD. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, Der p 1 and Der f 1. *J Immunol Methods* 1989; 118:227-235.
7. Seba J. Rumos da imunoterapia alérgico-específica. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2001;24:171-2.
8. Creticos, PS. The consideration of immunotherapy in the treatment of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:559-574.
9. Alvarez-Cuesta E, Gonzelez-Mancebo E. Immunotherapy in bronchial asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2000;6:50-54.
10. Chapman M, Alshishtawi M. Standardized mite and cat extracts: analysis of major allergens content by monoclonal immunoassay. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:178.
11. Ford AW, Rawle FC, Lind P. Standardization of *Dermatophagoides pteronyssinus*: assessment of potency and allergen content in ten coded extracts. *Intern Arch Allergy Appl Immunol* 1985; 76:58-67.
12. Nelson HS. The use of standardized extracts in allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:41-45.
13. Taketomi EA, Silva DAO, Cunha Jr JP. Perfil imunológico das vacinas comerciais de *D pteronyssinus* para imunoterapia. *Rev. bras. alerg. imunopatol.* 2001;24:173-182.
14. Ewan PW, Alexander MM, Snape C. Effective hyposensitization in allergic rhinitis with a potent partially purified extract of house dust mite. *Clin Allergy* 1998;18:501-508.
15. Haugaard L, Dahl R, Jacobsen L. A controlled dose-response study of immunotherapy with standardized, partially purified extract of house dust mite: clinical efficacy and side effects. *J Allergy Clin Immunol* 1993;91:621-625.
16. Olsen OT, Larsen KR, Jacobsen L. A 1-year, placebo-controlled, double-blind house-dust-mite immunotherapy study in asthmatic adults. *Allergy* 1997;52:853-859.
17. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Position statement: the use of standardized allergen extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:583-586.
18. Dreborg S. Standardization of allergenic preparation by *in vitro* and *in vivo* methods. *Allergy* 1993; 48(supl):63-70.

19. Malling HJ. Methods of skin testing. *Allergy* 1993;48(supl):55-56.
20. Van Metre Jr TE, Adkinson Jr NF, Kagey-Sobotta A. How should we use skin testing to quantify IgE sensitivity? *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:583-586.
21. Adinoff AD, Rosloniec DM, McCall LL. A comparison of six epicutaneous devices in the performance of immediate hypersensitivity skin testing. *J Allergy Clin Immunol* 1989;84:168-174.
22. Nelson HS, Lahr J, Buchmeier A. Studies of allergen extract stability: the effects of dilution and mixing. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:382-388.
23. Haahtela T. Skin tests used for epidemiologic studies. *Allergy* 1993;48(supl):76-80.
24. Basomba A, Sastre A, De Laez A. Standardization of the prick test: a comparative study of three methods. *Allergy* 1985;40:395-401.

Endereço para correspondência

Dr Nelson A. Rosário Filho
Rua Julia Wanderley, 657
80430-030 - Curitiba - PR
E-mail: alergia@hc.ufpr.br