

Exposição a Alergênicos dos Ácaros em Doentes com Alergia Respiratória aos Ácaros do Pó da Casa

JOSÉ LUÍS PLÁCIDO*, JP MOREIRA DA SILVA**, MÁRIO MIRANDA*, CARLOS CUESTA**, PILAR VENTAS*, MARIANELA VAZ***

RESUMO

Neste trabalho quantificamos os níveis de *Der p I*, *Der f I*, *Der II* e *Lep d I* (anticorpos monoclonais específicos, Abelló SA) nas amostras de pó das habitações de doentes sensibilizados aos ácaros do pó da casa e estudámos a sua relação com a sensibilização aos ácaros, avaliada por testes cutâneos "prick" (TCP) e IgE sérica específica (sIgE). Incluímos 15 doentes (20 ± 12 anos) exclusivamente sensibilizados ao *D. pteronyssinus* (*Dp*) e/ou *farinae*, comparativamente a um grupo controle constituído por 14 doentes não atópicos (27 ± 15 anos), todos portadores de asma e/ou rinite. Todas as 29 amostras continham níveis detectáveis de *Der p I* e *Der II*, verificando-se uma correlação estatisticamente significativa entre os dois alergénios ($r_s=0,82$ $p<0,001$), enquanto *Der f I* e *Lep d I* eram indetectáveis em 7 e 38% das amostras respectivamente. Os doentes sensibilizados aos ácaros apresentavam relativamente ao grupo controle uma exposição significativamente mais elevada ao *Der p I* (14,5 vs 8,0 µg/g, $p=0,03$), *Der II* (7,1 vs 3,5 µg/g, $p=0,02$) e *Lep d I* (0,14 vs 0,08 µg/g, $p=0,02$). Níveis de *Der p I* >2 µg/g (risco de sensibilização) e >10 µg/g (risco de crises de asma) estavam presentes respectivamente em 100 e 60% das habitações de doentes sensibilizados aos ácaros. Observamos uma correlação estatisticamente significativa entre a

exposição ao *Der p I* e a sensibilização ao *Dp*, avaliada pela área da pápula obtida nos TCP ($r_s=0,62$ $p=0,03$) e pelos níveis de sIgE ($r_s=0,54$ $p=0,04$). Os nossos resultados vêm reforçar a importância das medidas de evicção aos ácaros na doença alérgica respiratória, com o objectivo de prevenir a sensibilização entre os indivíduos geneticamente predispostos e um melhor controle da doença nos que já se encontram sensibilizados.

PALAVRA-CHAVE: Ácaros do pó da casa, níveis de alergénios, exposição, sensibilização.

SUMMARY

We quantified *Der p I*, *Der f I*, *Der II* and *Lep d I* levels (specific monoclonal antibodies) in house dust samples of asthmatic and/or rhinitic patients, comparing 15 patients exclusively sensitized to *D. pteronyssinus* (*Dp*) and/or *farinae* (mean age 20±12) to 14 non-atopic patients (27±15 years). We also studied the relationship between exposure to these allergens and sensitization to mites, defined by skin "prick" tests (≥ 7 mm²) and RAST (\geq class 2). *Der p I* and *Der II* were present in detectable levels in all the 29 dust samples and a significant correlation was found between these two allergens ($r_s=0.82$ $p<0.001$). *Der f I* and *Lep d I* were undetectable in 7 and 38% of the samples and were always present in concentrations under 2 µg/g of dust. Patients sensitized to dust mites were exposed to significantly higher levels of *Der p I* (14.5 vs 8.0 µg/g, $p=0.04$), *Der II* (7.1 vs 3.5 µg/g, $p=0.02$) and *Lep d I* (0.14 vs 0.08 µg/g, $p=0.02$) than patients from the control group. *Der p I* values >10 µg/g of dust (regarded as increased risk for acute asthma) were present respectively in 60% and 29% of the house dust samples from mite atopic and non-atopic patients. Levels of *Der p I* <2 µg/g (under the risk of sensitization) were detected in 36% of the samples from non-atopic patients and in none of the

* Interno Complementar de Imunoalergologia.

** Assistente Hospitalar de Imunoalergologia.

• Alergia e Imunologia, Abelló, SA, Madrid, Espanha.

*** Chefe de serviço de Imunoalergologia.

Directora da Unidade de Imunoalergologia. H. S. João. Porto

Este trabalho foi galardoado com o prémio atribuído às melhores comunicações apresentadas no XVI Congresso Europeu de Alergologia e Imunologia Clínica, Madrid, Junho de 1995. Encontra-se publicado em resumo no *Allergy* 1995; 50 (Suppl 26): 22-23.

sensitized patients. We also observed a significant correlation between the magnitude of exposure to Der p I with the degree of sensitization to Dp, assessed both by the wheal area at skin testing ($r_s=0.62 p=0.03$) and by the level of serum specific IgE ($r_s=0.54 p=0.04$). Our results reinforce the capital importance of mite avoidance measures in the management of allergic diseases, both to prevent sensitization among the genetically susceptible persons and the clinical exacerbations in mite allergic patients.

KEY-WORDS: House dust mites, mite allergen levels, exposure, sensitization.

INTRODUÇÃO

Os ácaros do género *Dermatophagoides* são desde há muito reconhecidos como a principal fonte de alergénios domésticos^{1,2}, representando em todo o mundo, uma importante causa de sensibilização e de doença alérgica³.

A quantificação dos seus alergénios por imunoenaios e anticorpos monoclonais, técnica largamente utilizada dada a sua reproductibilidade, elevada sensibilidade e especificidade⁴, veio abrir novas perspectivas no estudo do ambiente doméstico e modificou radicalmente o nosso conhecimento sobre o papel dos alergénios na doença alérgica respiratória. Estudos realizados em diversos países, vieram definir índices de exposição aos alergénios do Grupo I do *Dermatophagoides*, relacionados quer com o risco de sensibilização em indivíduos geneticamente predispostos ($>2\mu\text{g/g}$ de pó), quer com o de crises de asma ($>10\mu\text{g/g}$ de pó) nos doentes já sensibilizados^{3,5}. A exposição alérgica crónica é também reconhecida como uma importante causa de inflamação e de hiperreactividade brônquica, verificando-se que a redução prolongada desta exposição diminui os sintomas de asma e a hiperreactividade brônquica inespecífica^{6,8}.

Parece evidente que a prevalência das doenças alérgicas e em particular da asma brônquica tem vindo a aumentar de uma forma constante em diversos países^{9,12}. Apesar das razões não se encontrarem ainda totalmente esclarecidas^{13,14}, alguns autores têm sugerido que a exposição cada vez mais intensa e prolongada a alergénios domésticos poderia ser um dos principais factores envolvidos¹⁵. Esta situação resultaria sobretudo das modificações introduzidas no ambiente doméstico e do estilo de vida das populações, com a criação de um microclima favorável ao aumento da densidade alérgica¹⁶⁻²⁰.

Estes aspectos têm despertado o interesse de numerosos investigadores no estudo da exposição aos alergénios dos ácaros em diferentes áreas geográficas e nos factores ambientais que são determinantes para o crescimento da sua população.

Neste trabalho fomos determinar os níveis de alergénios dos ácaros *Dermatophagoides* (*Der p I*, *Der f I*, *Der II*) e *Lepidoglyphus destructor* (*Lep d I*) presentes no pó das habitações de doentes sensibilizados aos ácaros do pó da casa e estudamos a sua relação com o grau de sensibilização aos ácaros, avaliada por testes cutâneos "prick" e doseamento da IgE sérica específica.

DOENTES E MÉTODOS

a) Doentes

Neste estudo foram incluídos 15 doentes com asma e/ou rinite peruanais (9 do sexo feminino e 6 do sexo masculino, com idade média de 20 ± 12 anos), exclusivamente sensibilizados ao *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e/ou *farinae* (Df).

Como critério de sensibilização consideramos a obtenção de uma pápula com área $> 7\text{mm}^2$ nos testes cutâneos "prick" e uma IgE sérica específica para Dp e/ou Df $\geq 0,70$ HRU/ml (Hamlet, Alergia e Imunologia Abelló SA), equivalente a um RAST de classe igual ou superior a 2. Nos testes cutâneos uma bateria de alergénios comuns biologicamente estandardizada à qual associamos um extracto de *Lepidoglyphus destructor* (Ld), sendo os extractos de Dp, Df e Ld doseados a 100 BU/ml (Alergia e Imunologia Abelló, SA).

Como grupo controle, incluímos 14 doentes não atópicos (10 do sexo feminino e 5 do sexo masculino, com idade média de 27 ± 15 anos) também portadores de asma e/ou rinite.

Todos os 29 doentes incluídos neste estudo habitam na cidade do Porto ou na sua periferia. Esta cidade caracteriza-se por um clima temperado e húmido, com uma temperatura anual média de 14°C , elevada pluviosidade (1200 mm/ano) e uma humidade relativa anual média de 79% (os dados são relativos a 1992, ano em que decorreu este estudo e foram fornecidos pelo Observatório Meteorológico da Serra do Pilar, Vila Nova de Gaia).

b) Recolha das amostras de pó

A recolha do pó das habitações foi efectuada pelos próprios doentes durante o mês de Abril de 1992, de acordo com instruções verbais e escritas. Utilizaram os seus aspiradores (cuja potência variava entre os 1000 e 1200 W segundo as informações técnicas fornecidas nos aparelhos) providos de um novo saco de papel para recolha do pó aspirado. As amostras foram recolhidas do quarto do doente e sala de estar, aspirando durante 2min/m^2 o colchão, alcatifas, tapetes e sofás. Terminado o processo de colheita, cada saco de papel contendo as amostras de pó foi retirado do aspirador e guardado dentro de uma bolsa de plástico, hermeticamente fechada e armazenada à temperatura de -20°C até ao seu processamento.

c) Preparação das amostras de pó e determinação dos níveis de alergénios

Foi efectuada a filtragem das amostras através de uma malha com orifícios de 300µm para obtenção de poeira fina. Seguidamente procedeu-se à extracção de 3 mg de poeira fina em 20 ml de uma solução tampão salina (15%, p/v) com agitação magnética durante 90 mn a 4°C. Após centrifugação a 12 000 rpm durante 5 mn e filtragem por filtro de 0,45µm (Milipore Flow Rate, Flow Laboratories, Germany) seguiu-se a realização do imunoensaio.

A determinação dos níveis de *Der p I*, *Der f I* e *Lep d I* foi efectuada por ELISA em fase sólida, utilizando anticorpos monoclonais específicos: Pt1513 para o *Der p I*, Fa1511 para o *Der f I* e Le9E4 para o *Lep d I*, segundo método descrito anteriormente^{21,22}. Os níveis de *Der II* foram quantificados por RIA, utilizando o monoclonal CLB-DpX segundo o método descrito por Heymann e colaboradores²³. As curvas-padrão foram obtidas através da utilização do respectivo alergénio purificado mediante cromatografia e com concentração previamente determinada por RIA, sendo os resultados expressos em µg/g e com o limiar de detecção a situar-se nos 0,01 µg/g.

Os níveis de alergénios foram classificados de acordo com um score proposto por Platts-Mills e colaboradores para os alergénios do Grupo I do *Dermatophagoides*²⁴

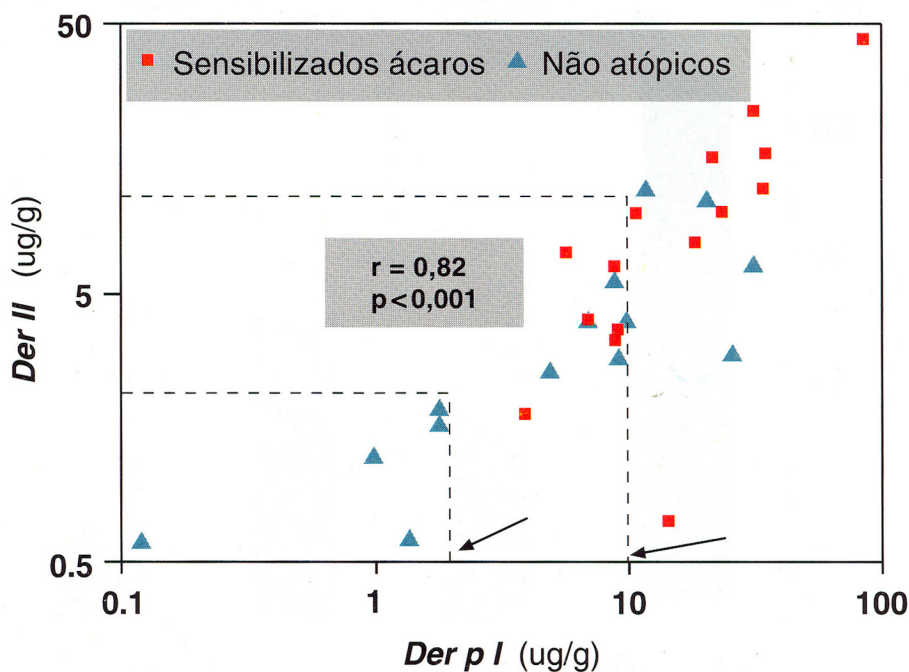
e que neste trabalho foi alargada aos restantes alergénios: indetectável (<0,05), baixo (0,05 - 0,20), moderado (0,21 - 2,00), elevado (2,01 - 10) e muito elevado (>10µg/g).

d) Análise estatística

Os resultados são expressos em mediana, mínimo e máximo. Na comparação dos níveis de alergénios entre os dois grupos utilizamos o teste de Mann-Whitney e no estudo da correlação entre variáveis o teste de Spearman. Foi igualmente utilizado o teste de Qui-quadrado no estudo da diferença de distribuição dos níveis de exposição alergénica relacionados com o risco de sensibilização e crises de asma. Foi considerado com significado estatístico um $p < 0,05$.

RESULTADOS

Todas as 29 amostras continham níveis detectáveis de *Der p I* e *Der II*, verificando-se níveis muito elevados destes dois alergénios respectivamente em 45% e 28% das habitações (Quadro I). Observamos uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de *Der p I* e *Der II* ($n=29$; $r_s=0,82$ $p<0,001$) (Fig. 1). Pelo contrário *Der f I* e *Lep d I*, eram indetectáveis respectivamente em 7 e 38% das amostras e estavam sempre presentes em concentrações inferiores a 2µg/g de pó (Quadro I).



	<i>Der p I</i>	<i>Der f I</i>	<i>Der II</i>	<i>Lep d I</i>
<0,05	0	7	0	38
0,05 - 0,20	3	69	3	31
0,21 - 2,00	11	24	28	31
2,01 - 10,00	41	0	41	0
>10	45	0	28	0

Quadro I - Percentagem das 29 amostras com níveis indetectáveis (<0,05), baixos (0,05 - 0,20), moderados (0,21 - 2,00), elevados (2,01 - 10,00) e muito elevados (> 10µg/g de pó) dos alergénios *Der p I*, *Der f I*, *Der II* e *Lep d I*.

As amostras de pó provenientes das habitações de doentes sensibilizados aos ácaros (n=15) apresentavam em relação ao grupo controle (n=14), níveis significativamente mais elevados de *Der p I* (14,5; 3,9 - 88,0 versus 8,0; 0,1 - 32,0µg/g; p=0,03), *Der II* (7,8; 0,7 - 49,0 versus 3,0; 0,6 - 12,4µg/g; p=0,02 e *Lep d I* (0,14; 0,01 - 1,00 versus 0,08; 0,01 - 1,00µg/g; p=0,02) (Fig. 2). Quanto ao *Der f I*, apesar de se encontrar em concentrações mais elevadas nas habitações dos doentes sensibilizados, não existiam diferenças estatisticamente significativas em relação aos não atópicos 0,14; 0,05 - 0,4 versus 0,13; 0,01 - 0,9).

Todos os doentes sensibilizados aos ácaros estavam expostos a níveis de *Der p I* >2µg/g (risco de sensibilização), enquanto níveis >10µg/g (risco de crises de asma) estavam presentes em 60% das habitações (Fig. 1). No grupo controle níveis <2µg/g e >10µg/g de

pó foram encontrados respectivamente em 36% e 29% das habitações (Fig. 1). Assim, o número de doentes que se encontravam expostos a níveis de *Der p I* >2µg/g ($\chi^2=11$ p<0,001 e < a 10µg/g ($\chi^2=5$ p=0,03) era significativamente diferente entre os doentes sensibilizados e os não atópicos.

Os níveis de *Der p I* a que os doentes sensibilizados aos ácaros se encontravam expostos no interior das suas habitações, correlacionaram-se com o grau de sensibilização ao *D pteronyssinus*, avaliado pela área da pápula (mm²) obtida nos testes cutâneos (n=15; $r_s=0,62$ p=0,03) (Fig. 3) e pelos níveis de IgE sérica específica (n=15; $r_s=0,54$ p=0,04) (Fig. 4).

DISCUSSÃO

Estudos realizados em diversas regiões do globo apontam para que a principal fonte de sensibilização ambiental sejam os alergénios domésticos, estando implicados neste processo os alergénios que se encontram em maiores concentrações dentro das habitações¹⁵. Nos últimos anos além dos ácaros do género *Dermatophagoides*, outros alergénios igualmente presentes no pó da casa têm vindo a ser objecto de estudo^{18,25-27}. Os ácaros de armazenamento podem desempenhar um importante papel nesta sensibilização doméstica^{28,29}, uma vez que mesmo em áreas urbanas e com clima temperado a exposição aos

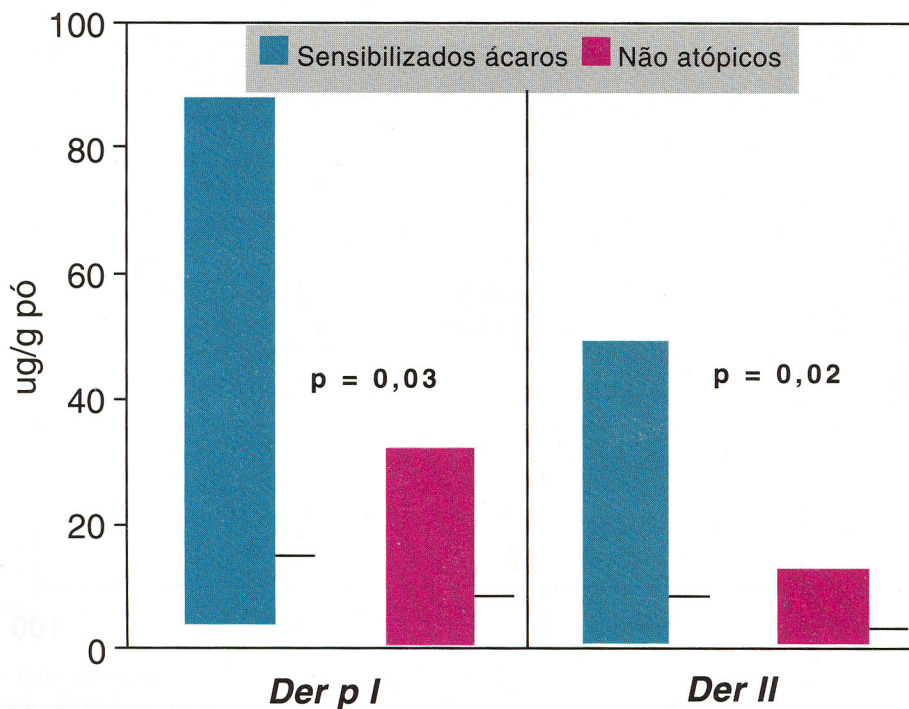


Fig. 2 - Exposição aos alergénios *Der p I* e *Der II* em doentes sensibilizados aos ácaros e não atópicos (grupo controle). Os doentes sensibilizados aos ácaros do pó da casa apresentavam em relação aos doentes do grupo controle, uma exposição significativamente mais elevada aos alergénios *Der p I* (mediana 14,5; 3,9 - 88,0 versus 8,0; 0,1 - 32,0µg/g; p=0,03) e *Der II* (7,8; 0,7 - 49,0 versus 3,0; 0,6 - 12,4µg/g; p=0,02).

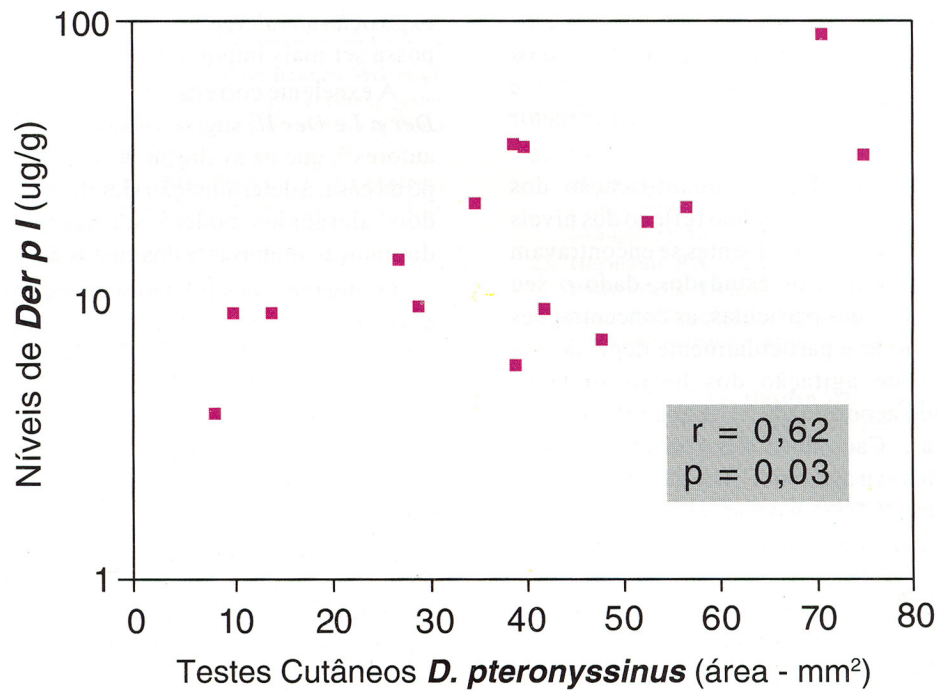


Fig. 3 - Níveis de exposição ao *Der p I* e sensibilização cutânea ao *D. pteronyssinus*. Observamos uma correlação estatisticamente significativa ($r_s=0,62$ $p=0,03$) entre a exposição ao *Der p I* ($\mu\text{g/g}$) e a área da pápula (mm^2) obtida nos testes cutâneos "prick" com um extracto de *D. pteronyssinus* (100 BU/ml; Alergia e Imunologia Abelló SA).

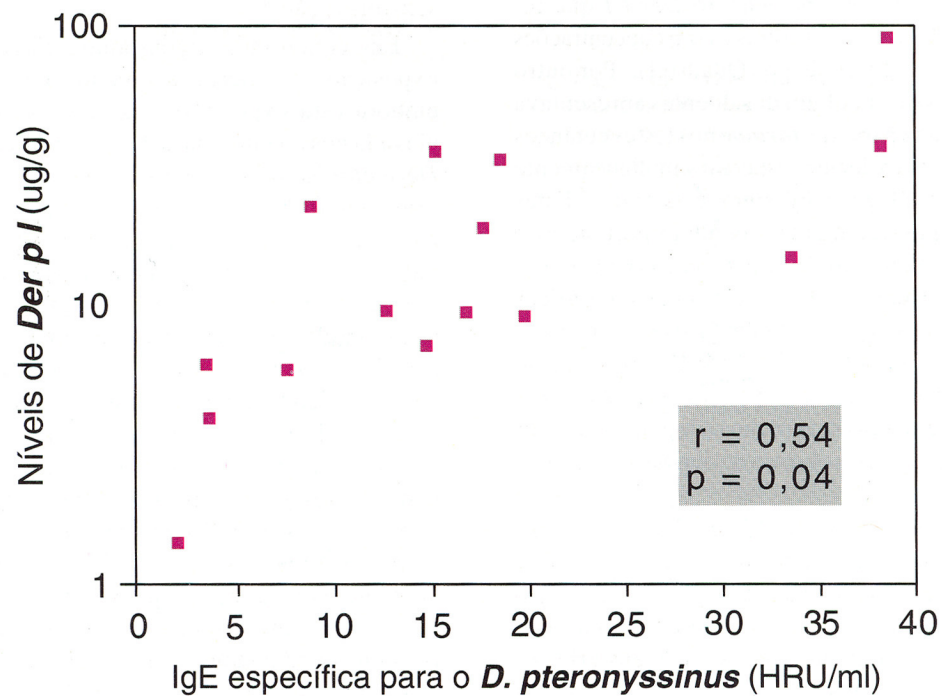


Fig. 4 - Níveis de exposição ao *Der p I* e IgE específica sérica para o *D. pteronyssinus*. Verificamos uma correlação estatisticamente significativa ($r_s=0,54$ $p=0,04$) entre a exposição ao *Der p I* ($\mu\text{g/g}$) e os níveis da IgE específica para o *D. pteronyssinus* (Hamlet, Alergia e Imunologia Abelló SA).

seus alérgénios pode ser relevante^{28,30}. Estes aspectos levaram-nos a incluir neste estudo além dos alérgénios dos ácaros *Dermatophagoides* (*Der p I*, *Der f I* e *Der II*), o alérgénio major do *Lepidoglyphus destructor* (*Lep d I*).

Neste trabalho utilizamos a quantificação dos alérgénios na poeira doméstica como reflexo dos níveis habituais de exposição a que os doentes se encontravam sujeitos. Para os alérgénios estudados, dado o seu tamanho e o peso das suas partículas, as concentrações são muito baixas no ar e particularmente dependentes dos movimentos de agitação dos locais onde se depositam³¹, sendo aconselhada a sua quantificação na poeira doméstica⁵. Cada doente procedeu à colheita das amostras com o seu aspirador, método utilizado em trabalhos similares^{18,19,30,32-34}, havendo contudo o cuidado de descrever a maneira como ela foi efectuada, a presença ou ausência de filtros no aspirador, número e local onde foram colhidas as amostras⁵. No nosso estudo a diferença máxima de potência entre os diversos aspiradores utilizados foi de 200W, sendo esta diferença pouco significativa e minimizada pelas unidades em que os alérgénios são representados: μ por grama de pó aspirado³¹.

Neste trabalho *Der p I* e *Der II* foram os principais alérgénios presentes na poeira doméstica, apresentando concentrações detectáveis em todas as amostras, independentemente de estas serem provenientes das habitações de doentes sensibilizados ou não atópicos. Apresentavam também níveis muito elevados em 45% e 28% das amostras, em oposição ao *Der f I* que foi indetectável em 7% das 29 amostras e com concentrações sempre inferiores a $2\mu\text{g/g}$ de pó (Quadro I). Por outro lado, verificámos que nenhum dos doentes apresentava positividade isolada para o *D. farinae* nos testes cutâneos "prick", enquanto 6/15 doentes estavam simultaneamente sensibilizados ao *D. pteronyssinus* e *farinae*. Estes dados traduzem possivelmente a menor importância do *D. farinae* em relação ao *D. pteronyssinus* no nosso clima temperado e húmido. Já noutras zonas geográficas onde existem invernos prolongados, frios e secos (mais de 3 meses com humidade relativa < 60%), esta relação entre as duas espécies de ácaros poderá estar invertida, já que o *D. pteronyssinus* está menos adaptado a manter o balanço hídrico e a sobreviver nestas condições adversas².

O alérgénio major do *Lepidoglyphus destructor* (*Lep d I*) foi indetectável em 38% das 29 amostras (Quadro I) e tal como *Der f I* manteve-se sempre em níveis inferiores a $2\mu\text{g/g}$ de pó, apontando para que esta espécie seja pouco frequente no nosso meio urbano. No nosso estudo, a sensibilização a este ácaro foi encontrada em apenas 2 doentes que estavam igualmente sensibilizados ao *D. pteronyssinus* e *farinae*. Contudo, é possível que em ambiente rural a sensibilização e

exposição aos alérgénios dos ácaros de armazenamento possa ser mais importante.

A excelente correlação verificada entre os níveis de *Der p I* e *Der II*, sugere tal como proposto por alguns autores³⁵, que na avaliação da exposição aos ácaros do pó da casa, a determinação simultânea dos níveis destes dois alérgénios poderá ser dispensável com uma diminuição importante dos custos deste tipo de estudos.

Os doentes sensibilizados aos ácaros apresentavam uma exposição significativamente mais elevada aos alérgénios *Der p I*, *Der II* e *Lep d I* que o grupo controle (Fig. 2). Por outro lado, todos os 15 doentes estavam sujeitos a uma exposição ao *Der p I* $>2\mu\text{g/g}$ de pó, confirmando que este possa ser de facto o limiar de exposição com risco de sensibilização^{3,5}, enquanto 60% tinham níveis de *Der p I* $>10\mu\text{g/g}$ de pó (risco de ataques de asma) no interior das suas habitações (Fig. 1). No grupo controle níveis < 2 e $>10\mu\text{g/g}$ de pó foram encontrados respectivamente em 36% e 29% das habitações. Estes resultados estão em acordo com outros estudos^{36,37}, confirmando que os doentes sensibilizados aos ácaros estão sujeitos a uma exposição mais intensa que os não sensibilizados.

Neste trabalho demonstramos que a intensidade da exposição ao alérgénio *Der p I*, se correlacionava com o grau de sensibilização ao *D. pteronyssinus*, recorrendo quer a métodos "in vivo" (área da pápula nos testes cutâneos "prick") (Fig. 3), quer a métodos "in vitro" (níveis da IgE sérica específica) (Fig. 4), comprovando a relação existente entre a exposição alérgica e sensibilização³⁸.

Em conclusão, encontramos elevados níveis de exposição aos alérgénios major *Der p I* e *Der II*, embora esta exposição seja significativamente mais elevada nos doentes que estão sensibilizados aos ácaros *Dermatophagoides*, comparativamente aos doentes do grupo controle. Pelo contrário os alérgénios *Der f I* e *Lep d I* parecem não ter entre nós a relevância dos outros dois alérgénios estudados. Verificamos também que a intensidade da exposição ao *Der p I* está relacionada com o grau de sensibilização ao *D. pteronyssinus*. Estes dados vêm reforçar a importância das medidas de evicção aos ácaros na abordagem das doenças alérgicas respiratórias, com o objectivo de prevenir a sensibilização entre os indivíduos geneticamente predispostos e um melhor controlo da doença nos que já estão sensibilizados. Estudos futuros direccionados para um melhor conhecimento do ambiente doméstico em que vivem os nossos doentes, permitindo que medidas de correcção ambiental possam ser adaptadas a características particulares do nosso meio, poderá ser um factor decisivo na prevenção e controlo da doença alérgica respiratória, contribuindo para a diminuição da sua prevalência, morbidade e mortalidade.

1. **Azevedo M, Ferraz Oliveira F, Castel-Branco MG et al.** Alergia ao pó da casa: correlação entre testes cutâneos, testes de provocação nasal, IgE total e IgE específica. *Reumatologia Multidisciplinar* 1985; 16: 35-42.
2. **Platts-Mills TAE, Chapman MD.** Dust mites: immunology, allergic disease and environmental control. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 755-75.
3. **Platts-Mills TAE, De Weck AL.** Dust mite allergens and asthma - a worldwide problem. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 416-27.
4. **Chapman MD.** Allergen specific monoclonal antibodies: new tools for the management of allergic disease. *Allergy* 1988; 43 (Suppl 5): 7-14.
5. **Platts-Mills TAE, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Chapman MD.** Dust mite allergens and asthma: Report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 1046-60.
6. **Vervloet D, Penaud A, Razzouk H, Senft M, Arnaud A, Boutin C, Charpin J.** Altitude and house dust mites. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 69: 290-96.
7. **Enhert B, Lau-Schadendorf S, Weber A, Buettner P, Schou C, Wahn U.** Reducing domestic exposure to dust mite allergens reduces bronchial hypersensitivity in sensitive children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 135-8.
8. **Boner AL, Peroni D, Sette L, Valetta EA, Piacentini G.** Effects of allergen exposure-avoidance on inflammation in asthmatic children. *Allergy* 1993; 48 (Suppl 17): 119-24.
9. **Aberg N.** Asthma and allergic rhinitis in Swedish conscripts. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 59-63.
10. **Robertson CF, Heycock E, Bishop J et al.** Prevalence of asthma in Melbourne school children: changes over 26 years. *Br Med J* 1991; 302: 1116-8.
11. **Burr L, Limb ES, Andrea S et al.** Childhood asthma in four countries: a comparative survey. *Int J Epidemiol* 1994; 23: 341-7.
12. **Vicent PM, Rodrigues T, Silva AM, Tzer TS, Barros H.** Prevalência de asma em estudantes das escolas secundárias portuguesas. *Arq Med* (em publicação).
13. **Burney PGJ.** Evidence for an increase in atopic diseases and possible causes. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 484-92.
14. **Peat JK.** The rising trend in allergic illness: which environmental factors are important? *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 797-800.
15. **Platts-Mills TAE, Sporik RB, Chapman MD, Heymann PW.** The role of indoor allergens in asthma. *Allergy* 1995; 50 (Suppl 22): 5-22.
16. **Feather IH, Warner JA, Holgate ST, Thompson PJ, Stewart GA.** Cohabiting with domestic mites. *Thorax* 1993; 48: 5-9.
17. **Custovic A, Taggart SCO, Woodcock A.** House dust mite and cat allergen in different indoor environments. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 1164-8.
18. **Munir AKM, Einarsson R, Kjellman N-IM, Björkstén B.** Mite (*Der p I, Der f I*) and cat (*Fed d I*) allergens in the homes of babies with a family history of allergy. *Allergy* 1993; 48: 158-63.
19. **Lintner TJ, Brame KA.** The effects of season climate and air-conditioning on the prevalence of *Dermatophagoides* mite allergens in household dust. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 862-7.
20. **Van Strien RT, Verhoeff AP, Brunekreef B, Van Wijnen JH.** Mite antigens in house dust: relationship with different housing characteristics in the Netherlands. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 843-53.
21. **Ventas P, Lombardero M, Duffort O, Carreira J.** Cuantificación de los alérgenos *Der p I* and *Der f I* de los ácaros del polvo doméstico Y *Fel d I* de gato mediante un ELISA en fase sólida. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1990; 5: 71-5.
22. **Ventas P, Carreira J, Polo F.** Cuantificación del alérgeno mayoritario de *L. destructor* (*Lep d I*) mediante anticorpos monoclonales. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1990; 5 (Suppl 3): 88.
23. **Heymann PW, Chapman MD, Aalberse RC, Fox JW, Platts-Mills TAE.** Antigenic and structural analysis of group II allergens (*Der f II* and *Der p II*) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). *J Allergy Clin Immunol* 1989; 83: 1055-67.
24. **Platts-Mills TAE, Hayden ML, Chapman MD, Wilkins SR.** Seasonal variation in dust mite and grass-pollen allergens in dust from the houses of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 781-91.
25. **Cuesta C, Plácido JL, Miranda M et al.** Indoor allergens in patients with respiratory allergy. *Allergy Clin Immunol* 1994; Suppl 2: 194.
26. **Plácido JL, Cuesta C, Delgado L, Ventas P, Hernandez D, Vaz M.** Cockroach allergy: *Bla g I* and *Bla g II* levels and clinical presentation. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 526.
27. **Delgado L, Plácido JL, Cuesta C, Ramos JP, Fleming Torrinha JA.** Utilidade da pesquisa "in vitro" de IgE específica para o pó da casa. Relação com a sensibilização a alérgenos da Barata. *Cadernos Imuno-alergologia Pediátrica* 1994; 9: 22-6.
28. **Spieksma FThM.** Domestic mites: Their role in respiratory allergy. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 655-60.
29. **Alfarroba E, Casanovas J, Almeida AB.** Ácaros da poeira doméstica e alergia respiratória. *Archivos de Bronconeumologia* 1993; 29: 73.
30. **Echecipía S, Ventas P, Audicana M, Urrutia I, Gastaminza G, Polo F, Corres LF.** Quantitation of major allergens in dust samples from urban populations collected in different seasons in two climatic areas of the Basque region (Spain). *Allergy* 1995; 50: 478-82.
31. **Platts-Mills TAE, Chapman MD, Pollart S, Luczynska CM, Ward Jr GW.** Specific allergens evoking immune reactions in the lung: relationship to asthma. *Eur Respir J* 1991; 4 (Suppl 13): 68-77.
32. **Barber D, Chamorro MJ, Carpizo JA et al.** Valoración de la presión alérgica ambiental. Interés de esta determinación en la prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1990; 5: 125-32.
33. **Wickman M, Nordvall SL, Pershagen G, Korsgaard J, Johansen N, Sundell J.** Mite allergens during 18 months of intervention. *Allergy* 1994; 49: 114-9.
34. **Munir AKM, Björkstén B, Einarsson R et al.** Mite allergens in relation to home conditions and sensitization of asthmatic children from three climatic regions. *Allergy* 1995; 50: 55-64.
35. **Pauli G, de Blay F, Stenger R, Verot A, Ott M.** Group I and Group II mite antigen levels in the house dust of mite-allergic patients and control subjects. *Allergy* 1993; 48 (16): 107.
36. **Verhoeff AP, Van Strien RT, Van Wijnen JH, Brunekreef B.** House dust mite allergen (*Der p I*) and respiratory symptoms in children: a case-control study. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 1061-9.
37. **Lau S, Falkenhorst G, Weber A et al.** High mite-allergen exposure increases the risk of sensitization in atopic children and young adults. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 718-25.
38. **Kuher J, Frischer T, Meinert R et al.** Mite allergen exposure is a risk for the incidence of specific sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 44-52.