

Testes cutâneos por picada (TCP) na obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) equina

Skin prick tests (SPT) use in equine recurrent airway obstruction (RAO)

Data de receção / Received in: 15/10/2010

Data de aceitação / Accepted for publication in: 27/11/2010

Rev Port Imunoalergologia 2010; 18 (6): 561-584

Paula Tilley¹, José Paulo Sales Luís¹, Manuel Branco Ferreira^{2,3}

¹ Departamento de Clínica / *Department of Clinics*, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa

² Serviço de Imunoalergologia / *Immunoallergy Department*, Hospital Santa Maria – Centro Hospitalar Lisboa Norte

³ Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

RESUMO

Introdução: Embora dados recentes sugiram que a alergia possa desempenhar um papel importante na obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) no cavalo, à semelhança da asma na espécie humana, são necessárias avaliações mais objectivas para um maior rigor no diagnóstico. **Objectivos:** Avaliar a resposta a testes cutâneos de alergia por picada (TCP) com aeroalergénios comuns em cavalos com ORVA e caracterizar a ORVA em Portugal através da identificação de factores alergénicos relevantes. **Material e métodos:** 30 casos de ORVA e 10 controlos saudáveis foram avaliados, através da história clínica e do exame físico, complementados por radiografia torácica, endoscopia do aparelho respiratório e lavado broncoalveolar (LBA). Efectuaram-se TCP com 16 aeroalergénios relevantes em Portugal (fungos, ácaros, pólenes e epitélios). **Resultados:** Todos os cavalos com ORVA obtiveram TCP positivos a pelo menos 6 aeroalergénios. Quatro controlos apresentaram todos os TCP negativos e 6 obtiveram TCP positivos a 1 a 3 aeroalergénios, embora com uma reacção muito menor: diâmetro médio da pápula 30-50% da histamina, contrastando com 30-127% da histamina nos TCP positivos dos cavalos com ORVA. Os resultados nesta população altamente seleccionada mostraram que a hipersensibilidade imediata a aeroalergénios é significativa, sendo a alergia um mecanismo etiopatogénico provável em todos os cavalos do grupo ORVA. A bateria de TCP usada mostrou grande utilidade na identificação de potenciais desen-

cadeantes de origem alérgica, podendo contribuir para a redução da carga alérgica ambiental. De facto, os sintomas respiratórios foram reduzidos após terem sido implementadas medidas de evicção. **Conclusão:** Os TCP podem constituir um importante contributo na determinação dos aeroalergénios aos quais os cavalos com ORVA possam estar sensibilizados, permitindo estabelecer medidas de evicção eficazes e, eventualmente, ponderar imunoterapia específica.

Palavras-chave: Doença pulmonar, equinos, ORVA, Portugal, testes cutâneos em picada.

ABSTRACT

Introduction: Although recent data suggests that allergy may play an important role in recurrent airway obstruction (RAO) in horses, similar to asthma in humans, more objective assessments are necessary for a more accurate diagnosis. **Objectives:** To evaluate the response to skin prick tests (SPT) with common aeroallergens in horses with RAO and to characterize RAO in Portugal by identifying relevant allergic factors. **Material and methods:** 30 RAO cases and 10 healthy controls were studied, taking into account the medical history and physical examination, supported by thoracic radiography, respiratory tract endoscopy and bronchoalveolar lavage (BAL). SPT to 16 locally relevant aeroallergens (moulds, mites, pollens and dander) were performed. **Results:** All RAO horses had positive SPT to at least 6 aeroallergens. Four control horses had all negative SPT and 6 had positive SPT to 1-3 aeroallergens, although with much lesser reactivity: mean wheal diameter 30-50% of histamine, contrasting with 30-127% of histamine for the positive SPT in RAO horses. Our results in this highly selected population show that immediate aeroallergen hypersensitivity is significant, allergy being a probable aetiopathogenic mechanism in all RAO group horses. The SPT were a valuable means of identifying potential allergic triggers, in order to try to reduce the allergen load. In fact, respiratory symptoms were reduced after effective allergen eviction measures were implemented. **Conclusion:** SPT may be a step towards accurate determination of allergens to which RAO horses may be sensitized in order to establish successful eviction measures and, eventually, specific immunotherapy.

Key-words: Airway obstruction, equine diseases, pulmonary disease, Portugal, skin prick tests.

INTRODUÇÃO

Os cavalos desempenharam um papel importante na história da imunologia, tendo sido neles que o médico Emil von Behring desenvolveu os “anticorpos” para tratamento da difteria que lhe valeram o primeiro Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia em 1901, há mais de um século¹.

Os países desenvolvidos estão a sofrer uma epidemia de afecções imunológicas. A obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) é uma das afecções pulmonares mais

INTRODUCTION

Horses have played an important role in the history of immunology. Dr. Emil von Behring developed the antibodies, in horses, for the diphtheria treatment, which earned him the first Nobel Prize for Medicine and Physiology, in 1901, over a century ago¹.

Developed countries are suffering from an epidemic of immunological diseases. Recurrent airway obstruction (RAO) is one of the most frequently seen lung diseases in horses, affecting around 50% of horses worldwide², leading

frequentes no cavalo, afectando cerca de 50% destes animais em todo o mundo², provocando inflamação e obstrução marcadas das vias aéreas inferiores, resultando num incremento evidente do esforço respiratório em repouso, interferindo ainda no seu desempenho desportivo. Os sinais clínicos e a obstrução das vias aéreas podem ser revertidos pela administração de corticosteróides, broncodilatadores ou pela modificação ambiental³. A demonstração de níveis elevados de mRNA de IL-4 e de IL-13 nas vias aéreas e no sangue periférico de cavalos com ORVA indicia um componente atópico². Os casos de ORVA tendem a ocorrer em cavalos de meia idade (> 7 anos) a idade avançada (> 15 anos)⁴, considerando a esperança de vida do cavalo entre 20 a 25 anos. A designação doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), anteriormente utilizada, foi abandonada por ser fundamentalmente diferente da DPOC humana, frequentemente associada a uma exposição crónica ao tabaco. A nomenclatura actualmente aceite, ORVA, assenta no reconhecimento de uma fisiopatologia semelhante à envolvida na asma humana^{2,3,5}.

No cavalo com ORVA o envolvimento da desgranulação mastocitária mediada por IgE é corroborado por uma resposta de hipersensibilidade imediata após injeção intradérmica⁶.

Mediadores dos mastócitos, como a histamina, ou outros mediadores, como os cisteinil-leucotrienos ou várias proteínas granulares, primariamente associados a reacções alérgicas de tipo I, induzem a contracção do músculo liso e poderão contribuir para o broncospasmo na ORVA^{7,8}. O aumento de IgE no líquido de lavagem bronco-alveolar (LLBA) dos cavalos com ORVA é também característico dos processos de hipersensibilidade imediata de tipo I⁸. Na ORVA parece haver ainda uma hipersensibilidade retardada tipo IV, mediada por resposta tipo Th2 (subgrupo de linfócitos T CD4+), envolvendo metaplasia de células caliciformes e hiperprodução de muco⁹. Esta resposta é também caracterizada pela produção de mRNA das citocinas IL-4 e IL-13, as quais estimulam a produção de IgE¹⁰.

to marked inflammation and obstruction of the lower airways, resulting in a distinct increase of resting respiratory effort, which impacts on the horse's sports performance. The clinical signs and the obstruction of the airways can be reversed by the administration of corticosteroids, bronchodilators or by making changes in the surrounding environment³. The increased levels of IL-4 and IL-13 mRNA in the airways and peripheral blood of horses with RAO indicates an atopic component². RAO tends to occur in middle-aged (> 7 years of age) and elderly (> 15 years of age) horses⁴, considering their life expectancy as 20-25 years. The disease's former designation, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), was abandoned as the disease is very dissimilar to human COPD, which is frequently associated with chronic exposure to smoke. The currently accepted name, RAO, is based on the recognition that a similar pathophysiology to that in human asthma is involved²⁻⁵.

In a horse with RAO, the involvement of IgE-mediated degranulation of mast cells is corroborated by an immediate-onset hypersensitivity response following intradermal injection⁶.

Mast cell mediators such as histamine, or other mediators such as cysteinyl-leukotrienes or various granular proteins, primarily associated with type I allergic reactions, induce smooth muscle contraction and can contribute to bronchospasm in RAO^{7,8}. The increase in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) IgE in horses with RAO is also typical of a type I hypersensitivity response⁸. There also seems to be a delayed-onset type IV hypersensitivity at work in RAO, mediated by type Th2 response (T CD4+ lymphocyte subgroup), involving metaplasia of goblet cells and hyperproduction of mucus⁹. This response is also characterised by production of cytokines, IL-4 and IL-13, which stimulate IgE production¹⁰.

As the clinical history and physical examination are not totally reliable to exclude other diagnoses or characterize airway impairment, a more objective evaluation is needed to arrive at a more accurate diagnosis.

Recent data suggest allergy can play an important role in RAO in horses, similar to allergic asthma in humans,

Uma vez que a história clínica e o exame físico *per se* não são suficientes para excluir outros diagnósticos nem para caracterizar os factores possivelmente implicados nas alterações das vias aéreas, é necessário uma avaliação mais objectiva para um maior rigor no diagnóstico.

Dados recentes sugerem que a alergia pode desempenhar um papel importante na ORVA no cavalo, à semelhança da asma alérgica na espécie humana, na qual tem sido utilizada com sucesso a imunoterapia específica para os alérgenos mais relevantes^{11,12}. A imunoterapia específica também se tem mostrado eficaz na asma alérgica felina^{13,14}. Seria ideal poder beneficiar da eficácia desta terapêutica também nos cavalos com ORVA. Para isso será essencial uma rigorosa selecção dos alérgenos possivelmente implicados na fisiopatologia da doença.

O sucesso da dessensibilização na espécie humana está ligado à indução de células T reguladoras, secretoras de interleucina 10 (IL-10) e/ou de factor de crescimento tumoral- β (TGF- β)¹⁵. No cavalo, a regulação negativa da interleucina-4 pela IL-10 e pelo TGF- β sugere também um efeito supressor destas citocinas nos processos de hipersensibilidade¹⁶.

Neste artigo, é apresentado pela primeira vez o uso de testes cutâneos por picada (TCP) em cavalos com ORVA, no seguimento da indicação de Wagner¹⁷ de que deveria ser feita investigação adicional conducente ao desenvolvimento de melhores ferramentas de investigação alergológica.

OBJECTIVOS

Avaliar a resposta aos TCP com aeroalérgenos comuns em cavalos com ORVA e avaliar a relação das sensibilizações encontradas com as manifestações clínicas e com o resultado da implementação de medidas de evicção alérgica.

where specific immunotherapy to the most relevant allergens has been successfully used^{11,12}. Specific immunotherapy has also been effective in the management of feline allergic asthma^{13,14}. It would be ideal for horses with RAO to also benefit from this treatment's efficiency. For this, a rigorous selection of the allergens likely to be involved in the pathophysiology of the disease is necessary.

Success in desensitisation in man is linked to inducing regulatory T cells, secretors of interleukin-10 (IL-10) and/or transforming growth factor- β (TGF- β)¹⁵. Down regulation of interleukin-4 by IL-10 and TGF- β in horses also suggests a suppressive effect of these cytokines in hypersensitivity processes¹⁶.

This article is the first report of the use of skin prick tests (SPT) on horses with RAO following Wagner's recommendation¹⁷, which stated that additional research should be carried out to develop improved allergy tests.

OBJECTIVES

To evaluate the response to SPT to common aeroallergens in horses with RAO and assess the relationship between sensitisations found and both clinical manifestations and the result of implementing allergen-avoidance measures.

MATERIAL AND METHODS

Horses

Forty Lusitano or Lusitano-cross horses were studied, 30 of which were RAO cases referred to the equine hospital of Lisbon's Veterinary Medicine College and 10 of which were healthy control subjects of similar ages. Clinical history, thoracic X-ray, respiratory tract endoscopy and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology and protein concentration were used to classify each in terms of RAO stage¹⁸.

All the horses' vaccinations were up-to-date and they were regularly dewormed. They had been treated with

MATERIAL E MÉTODOS

Cavalos

Estudámos 40 cavalos Lusitanos ou cruzados de Lusitano: 30 casos de ORVA referenciados para o hospital de equinos da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa e 10 controlos saudáveis, com idades semelhantes. Com base na história clínica e exame físico, radiografia torácica, endoscopia do aparelho respiratório e citologia e doseamento proteico no LLBA, foi atribuído a cada caso um estágio classificativo de ORVA¹⁸.

Todos os cavalos eram vacinados regularmente e submetidos a um programa anti-helmíntico regular, tendo sido tratados com ivermectina (Eqvalan®, MSD-AgVet*) um mês antes de serem avaliados, não tendo mostrado evidência de larvas LI de *Dictyocaulus arnfieldi* no LLBA usando a técnica de Baermann¹⁹.

TCP (ALK-Abello™)**)

Após sedação com um α_2 -agonista, Detomidina (Domosedan®, Pfizer***, 0,1 ml / 100 kg), executaram-se os TCP nos 40 cavalos, utilizando lancetas ALK-Abello¹ com ponta de 1 mm, de acordo com as recomendações da Academia Europeia de Alergologia e Imunologia Clínica²⁰.

A Alk-Abello forneceu extractos de alergénios glicerinados histamina-equivalentes, estandarizados para TCP (HEP, *histamine-equivalent prick*) e os cavalos foram testados com 16 aeroalergénios com relevância local (fungos – *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium mix*, *Mucor mucedo*, *Penicillium notatum*; ácaros – *Dermatophagoides (D.) pteronyssinus*, *D. farinae*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*; gramináceas – *Dactylis glomerata*, *Phleum pratense*, *Lolium*

ivermectin (Eqvalan®, MSD-AgVet*) a month prior to being evaluated. There was no evidence of the equine lungworm *Dictyocaulus arnfieldi* LI larvae in the BALf as assessed using the Baermann technique¹⁹.

Skin prick tests (SPT) (ALK-Abello™**)

Following sedation with an α_2 -agonist, detomidine (Domosedan®, Pfizer***, 0.1 ml/100 Kg), SPT were performed on the 40 horses, using ALK-Abello¹ lancets with a 1 mm tip as recommended by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology²⁰.

ALK-Abello provided histamine-equivalent glycerinated allergen extracts standardized for SPT (HEP, histamine-equivalent prick), and SPT to 16 locally relevant aeroallergens were carried out on the horses. These were: moulds *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium mix*, *Mucor mucedo* and *Penicillium notatum*; mites *Dermatophagoides (D.) pteronyssinus*, *D. farinae*, *Lepidoglyphus destructor* and *Tyrophagus putrescentiae*; grass pollens of *Dactylis glomerata*, *Phleum pratense*, *Lolium perenne* and *Secale cereale*; tree pollen of *Olea europaea*; weed pollen of *Parietaria judaica* and dog dander. Saline was used as a negative control and histamine chlorhydrate 10mg/ml as a positive control. Presence of the five environmental moulds was investigated by the National Veterinary Research Laboratory by mycological analysis of hay, straw and grain from the stables of the horses included in this study.

The SPT were performed in duplicate on each horse, using both sides of the neck where a 20 × 30 cm rectangle was clipped to allow three lines with six inoculation points each, with a 5 cm distance between them. Prior to the SPT, a swab was placed beneath each inoculation line to prevent the allergens from slipping from their specific inoculation sites. After 25 minutes, the perimeter of the wheals was outlined with a fine marker and transferred to a paper using transparent tape (Figure 1).

* MSD AgVet, Kirkland, PQ, Canada.

** ALK-Abello, Bøge Allé 1, DK-2970 Hørsholm, Denmark; T +45 45 74 75 76.

*** Pfizer, 235 East 42nd Street, New York 10017, NY, USA; T +1-212-733-2323.

* MSD AgVet, Kirkland, PQ, Canada.

** ALK-Abello, Bøge Allé 1, DK-2970 Hørsholm, Denmark; T +45 45 74 75 76.

*** Pfizer, 235 East 42nd Street, New York 10017, NY, USA; T +1-212-733-2323.

perenne e *Secale cereale*; árvores – *Olea europaea*; ervas – *Parietaria judaica*; e epitélio de cão, usando soro fisiológico como controlo negativo e cloridrato de histamina 10mg/ml como controlo positivo. A presença de cada um dos cinco fungos no ambiente foi investigada no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária por análise micológica do feno, palha e ração oriundas dos estábulos dos cavalos incluídos no estudo.

Os TCP foram efectuados em duplicado em cada cavalo, usando ambos os lados do pescoço, onde se procedeu à tricotomia de um rectângulo com 20 x 30 cm de forma a permitir três linhas com 6 pontos de inoculação cada e uma distância de 5 cm entre os locais de inoculação. Antes de iniciar os TCP, foi colocado um penso de algodão envolto em gaze por baixo de cada linha de inoculação, de forma a impossibilitar a ocorrência de deslizamento das gotas de alergénios dos seus locais específicos. Após 25 minutos, o perímetro das pápulas foi delineado com marcador fino e transferido para papel com a ajuda de fita-cola transparente (Figura 1). Calculou-se a média de dois diâmetros ortogonais para cada alergénio e utilizou-se a média dos testes duplicados.

Relevância clínica da sensibilização a aeroalergénios

A raça Lusitana é uma raça autóctone valiosa, e os cavalos incluídos neste estudo eram todos propriedade de particulares. Este facto colocou alguns entraves, nomeadamente na utilização de testes de provocação inalatória para esclarecer a importância dos aeroalergénios identificados através dos TCP.

Após a identificação, através dos TCP, dos aeroalergénios relevantes para cada cavalo, os proprietários foram instruídos a tomar medidas de evicção adequadas. Nos 30 cavalos com ORVA foi feito um exame clínico detalhado em dois tempos distintos (início do estudo e um ano após evicção dos aeroalergénios iden-

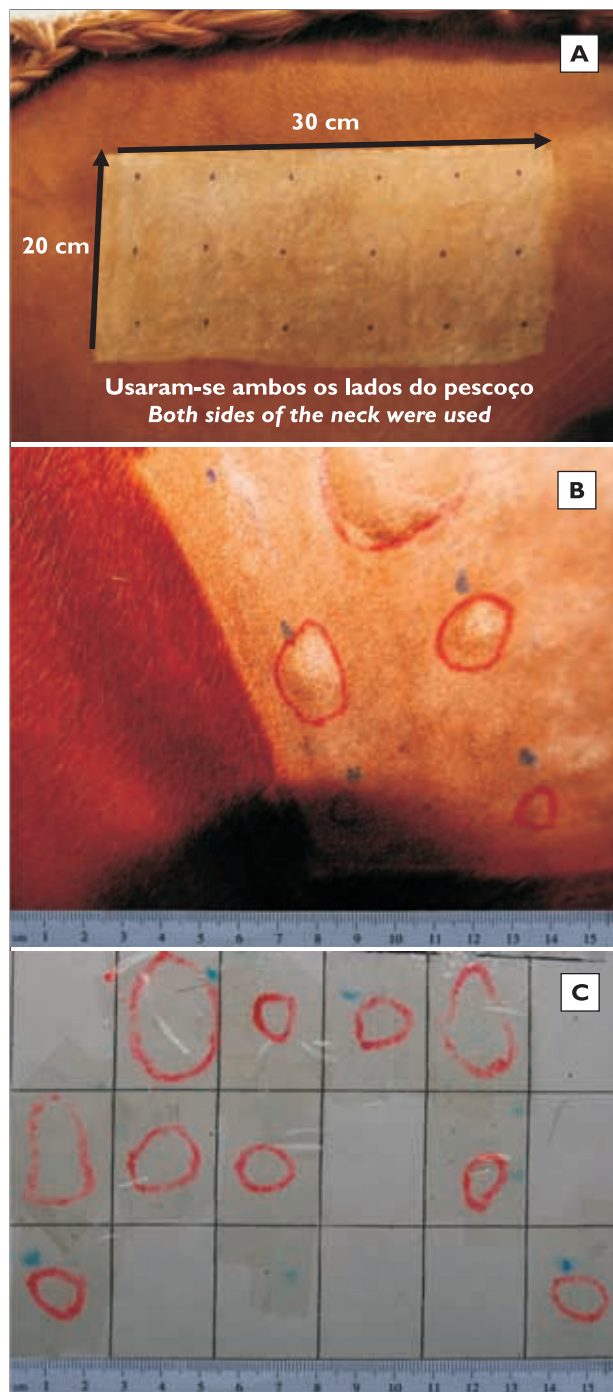


Figura 1. Execução de testes cutâneos por picada (TCP) no cavalo: **(A)** Preparação do pescoço; **(B)** Exemplo de TCP do grupo com obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA); **(C)** Decalque das pápulas para registo

Figure 1. Performing skin prick tests (SPT) in horses: **(A)** Preparation of the neck; **(B)** An example of SPT in the group with recurrent airway obstruction (RAO); **(C)** Outline of the wheals for recording

tificados por TCP do ambiente do cavalo), incluindo avaliação da tosse, corrimento nasal, adejo nasal, resalto abdominal (utilização visível de músculos expiratórios acessórios), intolerância ao exercício, frequência respiratória e auscultação pulmonar. De modo a poder confirmar se as medidas indicadas tinham sido implementadas, investigou-se o meio ambiente dos cavalos e foi solicitado aos donos que respondessem a um questionário.

Foi avaliada a redução de sintomas clínicos do foro respiratório e a eficácia da modificação do meio ambiente dos cavalos através da comparação dos resultados de exames clínicos iniciais e finais, de avaliações do meio ambiente e de questionários.

Análise estatística

O teste de Student foi utilizado para avaliar a diferença entre as idades dos cavalos dos grupos ORVA e controlo e o teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição.

Foi utilizado o teste Qui-quadrado com correcção de Yates para avaliar as diferenças estatísticas entre os grupos ORVA e controlo.

De forma a contribuir para a determinação de um valor de *cut off* para os TCP no cavalo, foram determinadas a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN), considerando quatro valores possíveis.

RESULTADOS

Cavalos

Todos os 30 cavalos com ORVA foram referenciados para a Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa maioritariamente em duas épocas do ano, 17 casos de Fevereiro a Maio (com um pico em Abril) e 10 de Junho a Setembro (uniformemente distribuídos). Os restantes 3 foram referenciados em Outubro, Novembro e Dezembro. A

The mean of two orthogonal diameters for each allergen was calculated and the mean of the duplicate tests used.

Clinical relevance of sensitivity to aeroallergens

The Lusitano breed of horse is a valuable autochthonous breed and the horses included in this study were all privately owned. This created some drawbacks, particularly in the use of inhaled challenge tests to clarify the relevance of the aeroallergens identified using SPT.

After the SPT identification of the relevant aeroallergens for each horse, the owners were advised to take suitable allergen eviction measures.

The 30 horses with RAO underwent detailed clinical examinations at two points during the study, one at the beginning and the second a year after eviction of the aeroallergens identified by SPT from the horse's environment. The examination included evaluation of cough, nasal discharge, nasal flare, abdominal lift (visible use of accessory expiratory muscles), exercise intolerance, respiratory rate and pulmonary auscultation. To confirm if the appropriate measures had been implemented, the horses' surrounding environments were checked and the owners asked to reply to a questionnaire.

Reduction of clinical respiratory symptoms and efficiency of modifying the horses' environment were evaluated comparing the results of the initial and the final clinical exams, the evaluation of the horse's environment and the questionnaire.

Statistical analysis

Student's *t* test was used to assess the difference between the ages of the horses in the RAO and the control group, and the Shapiro-Wilk test was used to verify normal distribution. The Chi-square test with Yates's correction was used to evaluate the statistical differences between the RAO and control groups.

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were calculated to help determine a cut-off value for the SPT, with four possible values considered.

idade não foi significativamente diferente entre os dois grupos (ORVA e controlo) ($p=0,25$) e apresentou distribuição normal (teste Shapiro-Wilk).

Nos Quadros 1 e 2 pode ver-se uma caracterização sumária dos cavalos do grupo ORVA e do seu ambiente.

Testes cutâneos por picada (TCP)

No presente estudo, o diâmetro médio da pápula de histamina foi de 2,3 cm, sem diferenças significativas entre os cavalos dos grupos ORVA e controlo. O controlo negativo não apresentou pápulas em nenhum animal, o que representou um diâmetro médio da pápula de 0,0 cm. Contudo, quer o número de TCP positivos, quer os diâmetros das pápulas induzidas pelos alergénios, foram significativamente diferentes nos grupos ORVA e controlo ($p<0,05$).

Todos os cavalos com ORVA apresentaram TCP positivos a pelo menos 6 aeroalergénios diferentes. Quatro cavalos do grupo controlo apresentaram todos os TCP negativos e 6 tiveram TCP positivos a 1-3 alergénios (Quadro 4), embora com reactividade muito menor: diâmetro médio da pápula 1,0-1,9 cm (30-50% da histamina) contrastando com 1,0-3,3 cm (30-127% da histamina), dos TCP positivos nos cavalos com ORVA. O alergénio *A. alternata* foi aquele que induziu no grupo ORVA pápulas de maiores dimensões (média $1,7\pm 0,6$ cm). No grupo controlo, o ácaro de armazenamento *T. putrescentiae* induziu quatro TCP positivos (média $1,3\pm 0,4$ cm). 98% dos diâmetros de pápula dos cavalos com ORVA foram superiores a 1 cm, contrastando com apenas 27% nos cavalos do grupo controlo.

De entre os alergénios que utilizámos, se analisarmos aqueles que se podem agrupar entre si, teremos três grupos, os ácaros, os fungos e os pólenes de gramíneas. Dentro destes três grupos de alergénios, alguns cavalos com ORVA só apresentaram positividade a um dos alergénios de cada grupo (Quadro 4). Nomeadamente no grupo dos ácaros, dois cavalos apenas reagiram a *D. pteronyssinus* e quatro apenas a *T. putrescentiae*. No grupo dos fungos, um

RESULTS

Horses

All the horses with RAO were referred to the Lisbon's *Veterinary Medicine College* mainly in two seasons of the year: 17 cases in February-May, with a peak in April, and 10 in June-September, evenly distributed. The remaining three cases were referred in October, November and December. Age was not significantly different between the two groups (RAO and control) ($p = 0.25$) and there was normal distribution (Shapiro-Wilk Test).

Tables 1 and 2 summarise the characteristics of the RAO group horses and their surrounding environments.

Skin prick tests (SPT)

In our study, mean histamine wheal diameter was 2.3 cm, with no significant differences between the RAO and control groups. The negative control (saline) presented no wheals in any of the horses, representing a mean wheal diameter of 0 cm. Nevertheless, both the number of positive SPT and the allergen-induced wheal diameters, were significantly different between the RAO and control groups ($p < 0.05$).

All the horses with RAO had positive SPT to at least six different aeroallergens. Four control group horses had all negative SPT and six had positive SPT to 1-3 aeroallergens (Table 4), although with much lesser reactivity: mean wheal diameter 1.0-1.9 cm (30-50% of histamine), contrasting with 1.0-3.3 cm (30-127% of histamine) in the horses with RAO. The *A. alternata* allergen induced the largest wheal diameter in the RAO group (mean 1.7 ± 0.6 cm). The *T. putrescentiae* storage mite presented four positive SPT in the control group (mean 1.3 ± 0.4 cm).

Ninety-eight per cent of the wheal diameters in the RAO group were greater than 1 cm, contrasting with only 27% in the control group horses.

If we analyse the allergens used in terms of groups, we have three groups with more than one allergen: mites, moulds and grass pollens. Within these three groups, some horses with RAO were only positive to one aeroallergen

Quadro I. Resultados do exame clínico e confirmação clínica da redução dos sintomas no grupo ORVA

N.º do cavalo	ORVA-estádio*	Idade	Mês de avaliação/ Exacerbação	Tosse*	Corrimento nasal*	Ressalto abdominal*	Adejo nasal em repouso*	Letargia	Anorexia	Intolerância ao exercício*	Temperatura rectal (°C)	Frequência cardíaca (bpm)	Frequência respiratória (cpm)	Auscultação pulmonar				Auscultação da traqueia-flutter	Prurido cutâneo	Papulas cutâneas			
														Alterações inspiração/ expiração	Alterações bilaterais	Sibilos	Crepitações						
Resultados do exame clínico no início do estudo																							
1	1	10	Abr	2	1	1	1	x		2	37,1	27	18	x	x		x						
2	4	19	Abr	3	2	2	2	x	x	2	37,0	42	24	x	x		x	x					
3	1	11	Nov	2	2	2	2			2	37,4	40	22	x	x		x	x	x				
4	4	18	Dez	3	2	1	1		x	2	37,2	37	20	x	x	x	x	x					
5	4	23	Mar	3	3	3	3	x	x	3	37,4	48	36	x	x	x	x	x					
6	3	14	Mar	2	3	2	2	x	x	2	37,3	48	30	x	x	x	x	x					
7	4	10	Fev	3	0	2	2			2	38,0	38	20	x	x	x	x	x					
8	3	14	Jun	3	2	2	2	x	x	2	37,0	40	20	x	x	x	x	x					
9	2	18	Jun	2	3	2	2	x	x	3	37,1	60	36	x	x	x	x	x					
10	3	20	Jul	2	2	2	2	x	x	2	37,2	46	24	x	x	x	x	x					
11	3	19	Set	3	3	3	3	x	x	1	37,4	42	24	x	x	x	x	x					
12	2	9	Set	2	0	2	2		x	1	37,7	28	30	x	x	x		x					
13	2	13	Set	2	1	1	0	x		1	37,0	50	24	x	x		x						
14	3	16	Set	2	1	2	2			2	37,4	66	30	x	x	x		x					
15	3	13	Out	2	1	2	2	x		2	37,2	58	28	x	x	x	x	x					
16	2	18	Mar	2	0	2	2	x	x	2	37,1	58	24	x	x		x						
17	3	16	Mar	3	0	2	2	x		2	37,9	48	36	x	x	x	x						
18	1	13	Abr	1	0	1	0	x		1	37,5	43	20	x	x		x						
19	4	20	Abr	3	3	3	3	x	x	3	37,6	60	30	x	x	x	x	x					
20	3	15	Abr	2	3	2	1	x		1	37,8	48	18	x	x		x						
21	2	14	Abr	2	0	2	1			1	37,8	50	24	x	x		x			x			
22	4	11	Abr	2	0	3	2			3	38,1	30	19	x	x			x					
23	2	14	Maio	2	0	2	2			1	37,2	40	18	x	x								
24	2	7	Maio	1	1	1	0	x		1	37,4	48	30	x	x		x						
25	3	12	Maio	2	1	2	2	x	x	2	37,0	48	24	x	x	x	x	x					
26	4	30	Maio	2	3	3	2	x		2	38,1	42	24	x	x		x	x					
27	4	16	Fev	2	3	3	3	x	x	3	37,6	46	30	x	x	x	x	x					
28	4	20	Jun	2	1	3	2	x	x	3	38,0	60	30	x	x	x	x	x					
29	1	8	Jun	1	1	1	0	x	x	1	37,9	42	18	x	x								
30	3	15	Jul	2	0	1	1			1	38,0	42	30	x	x		x	x					
Resultados do exame clínico 1 ano após evicção dos alérgenos identificados pelos TCP																							
1	Não avaliado	11	Abr	0	0	0	0			0	37,2	26	10										
2		20	Abr	0	0	0	0			0	37,1	38	14				x						
3		12	Nov	0	0	0	0			0	37,2	34	12										
4		19	Dez	0	0	0	0			0	37,2	32	14					x					
5		24	Mar	0	0	0	0			0	37,2	40	16					x					
6		15	Mar	0	0	0	0			0	37,1	40	16										
7		11	Fev	2	0	1	1			2	38,0	36	16	x	x		x	x					
8		15	Jun	1	0	1	1			1	37,2	38	16	x	x		x						

(continua)

(continuação)

N.º do cavalo	ORVA-estádio*	Idade	Mês de avaliação/ Exacerbação	Tosse*	Corrimento nasal*	Ressalto abdominal*	Adejo nasal em repouso*	Letargia	Anorexia	Intolerância ao exercício*	Temperatura rectal (°C)	Frequência cardíaca (bpm)	Frequência respiratória (cpm)	Auscultação pulmonar				Auscultação da traqueia-flutter	Prurido cutâneo	Papulas cutâneas	
														Alterações inspiração/ expiração	Alterações bilaterais	Sibilos	Creptitações				
9	Não avaliado	19	Jun	1	0	0	0			0	37,1	42	14	x	x						
10		21	Jul	0	0	0	0			0	37,0	38	14								
11		20	Set	3	3	3	3	x	x	2	37,4	50	30	x	x	x	x	x			
12		10	Set	0	0	0	0			0	37,5	26	14								
13		14	Set	1	1	1	0	x		1	37,2	46	20	x	x		x				
14		17	Set	2	1	2	2			2	37,4	66	30	x	x	x		x			
15		14	Out	2	1	2	2	x	x	2	37,2	58	30	x	x	x	x	x			
16		19	Mar	0	0	0	0			0	37,1	40	12								
17		17	Mar	0	0	0	0			0	37,5	42	14								
18		14	Abr	0	0	0	0			0	37,2	38	12								
19		21	Abr	3	3	3	3	x	x	3	37,6	60	36	x	x	x	x	x			
20		16	Abr	0	0	0	0			0	37,6	42	15								
21		15	Abr	1	0	1	0			1	37,7	44	19	x	x		x				
22		12	Abr	0	0	0	0			0	38,0	30	14								
23		15	Maio	0	0	0	0			0	37,2	40	12								
24		8	Maio	0	0	0	0			0	37,3	42	10								
25		13	Maio	0	0	0	0			0	37,2	38	15								
26		31	Maio	0	0	0	0			0	37,9	42	18					x			
27		17	Fev	3	3	3	3	x	x	3	37,6	52	36	x	x	x	x	x			
28		21	Jun	1	1	2	1	x		2	38,0	48	24	x	x	x	x				
29	9	Jun	0	0	0	0			0	37,2	34	8									
30	16	Jul	0	0	0	0			0	37,8	40	16									
Confirmação clínica da redução dos sintomas respiratórios																					
Elicção dos alergénios identificados pelos TCP	Totalmente implementada					Parcialmente implementada					Não implementadas					Total final de cavalos					
	N.º cavalos / Estádio ORVA (E)				N.º total cavalos	N.º cavalos / Estádio ORVA (E)				N.º total cavalos	N.º cavalos / Estádio ORVA (E)				N.º total cavalos						
	E 1	E 2	E 3	E 4		E 1	E 2	E 3	E 4		E 1	E 2	E 3	E 4							
Total	3	3	5	3	14	1	1	1	2	5	0	0	0	0	0	0	19				
Parcial	0	0	0	0	0	0	2	1	2	5	0	0	0	0	0	0	5				
Ligeira	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1				
Ausente	0	0	0	1d	1	0	0	1d	0	1	0	0	2	1d	3	5					

Legenda: d = morreu; x = presente; ORVA – obstrução recorrente das vias aéreas; TCP – testes cutâneos por picada

* (Tilley *et al* 2010): ESTÁDIO DE ORVA – 0 – Sem ORVA, 1 – ORVA latente, 2 – ORVA ligeira, 3 – ORVA moderada, 4 – ORVA severa; TOSSE – 0 – Sem, 1 – tosse em alturas específicas do dia (refeições / exercício / limpeza de camas), 2 – Tosse frequente com períodos sem tosse, 3 – Tosse muito frequente; CORRIMENTO NASAL – 0 – Sem, 1 – Seroso (escasso ou abundante), 2 – Mucoso (escasso), 3 – Mucoso (abundante); RESSALTO ABDOMINAL (Adaptado de Gerber *et al*, 2000) – 0 – Sem, 1 – Ligeiro achatamento dos flancos ventrais, 2 – Achatamento abdominal óbvio e linha de esforço estendendo-se até não mais de meio entre a articulação cubital e a tuberosidade coxal, 3 – Ressalto abdominal óbvio e linha de esforço estendendo-se para além de meio entre a articulação cubital e a tuberosidade coxal; ADEJO NASAL (Adaptado de Gerber *et al*, 2000) – 0 – Sem, 1 – Adejo nasal na inspiração (volta ao normal no final da inspiração), 2 – Adejo nasal na inspiração e expiração (pode ainda ver-se movimento ligeiro), 3 – Adejo nasal na inspiração e expiração (não pode já ver-se movimento); INTOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO – 0 – Sem, 1 – Limitação ligeira ou muito ligeira, 2 – Moderadamente ou muito limitado, 3 – Extremamente ou completamente limitado.

TESTES CUTÂNEOS POR PICADA (TCP) NA OBSTRUÇÃO RECORRENTE DAS VIAS AÉREAS (ORVA) EQUINA / ARTIGO ORIGINAL

Table 1. Results of the physical examination and clinical confirmation of symptom reduction in the RAO group

Horse no.	RAO stage*	Age	Month of evaluation/ exacerbation	Cough*	Nasal discharge*	Abdominal lift*	Nasal flare on resting*	Lethargy	Anorexia	Exercise intolerance*	Rectal temp. (°C)	Heart rate (bpm)	Respiratory rate (cpm)	Lung auscultation				Tracheal auscultation- "flutter"	Cutaneous pruritus	Cutaneous wheals
														Inspiratory/ expiratory changes	Bilateral changes	Wheezing	Crackles			
Results of the physical examination at the beginning of the study																				
1	1	10	Apr	2	1	1	1	x		2	37.1	27	18	x	x		x			
2	4	19	Apr	3	2	2	2	x	x	2	37.0	42	24	x	x		x	x		
3	1	11	Nov	2	2	2	2			2	37.4	40	22	x	x		x	x	x	
4	4	18	Dec	3	2	1	1		x	2	37.2	37	20	x	x	x	x	x		
5	4	23	Mar	3	3	3	3	x	x	3	37.4	48	36	x	x	x	x	x		
6	3	14	Mar	2	3	2	2	x	x	2	37.3	48	30	x	x	x	x	x		
7	4	10	Feb	3	0	2	2			2	38.0	38	20	x	x	x	x	x		
8	3	14	Jun	3	2	2	2	x	x	2	37.0	40	20	x	x	x	x	x		
9	2	18	Jun	2	3	2	2	x	x	3	37.1	60	36	x	x	x	x	x		
10	3	20	Jul	2	2	2	2	x	x	2	37.2	46	24	x	x	x	x	x		
11	3	19	Sep	3	3	3	3	x	x	1	37.4	42	24	x	x	x	x	x		
12	2	9	Sep	2	0	2	2		x	1	37.7	28	30	x	x	x		x		
13	2	13	Sep	2	1	1	0	x		1	37.0	50	24	x	x		x			
14	3	16	Sep	2	1	2	2			2	37.4	66	30	x	x	x		x		
15	3	13	Oct	2	1	2	2	x		2	37.2	58	28	x	x	x	x	x		
16	2	18	Mar	2	0	2	2	x	x	2	37.1	58	24	x	x		x			
17	3	16	Mar	3	0	2	2	x		2	37.9	48	36	x	x	x	x			
18	1	13	Apr	1	0	1	0	x		1	37.5	43	20	x	x		x			
19	4	20	Apr	3	3	3	3	x	x	3	37.6	60	30	x	x	x	x	x		
20	3	15	Apr	2	3	2	1	x		1	37.8	48	18	x	x		x			
21	2	14	Apr	2	0	2	1			1	37.8	50	24	x	x		x		x	
22	4	11	Apr	2	0	3	2			3	38.1	30	19	x	x			x		
23	2	14	May	2	0	2	2			1	37.2	40	18	x	x					
24	2	7	May	1	1	1	0	x		1	37.4	48	30	x	x		x			
25	3	12	May	2	1	2	2	x	x	2	37.0	48	24	x	x	x	x	x		
26	4	30	May	2	3	3	2	x		2	38.1	42	24	x	x		x	x		
27	4	16	Feb	2	3	3	3	x	x	3	37.6	46	30	x	x	x	x	x		
28	4	20	Jun	2	1	3	2	x	x	3	38.0	60	30	x	x	x	x	x		
29	1	8	Jun	1	1	1	0	x	x	1	37.9	42	18	x	x					
30	3	15	Jul	2	0	1	1			1	38.0	42	30	x	x		x	x		
Results of the physical examination 1 year after allergen avoidance measures																				
1	Not evaluated	11	Apr	0	0	0	0			0	37.2	26	10							
2		20	Apr	0	0	0	0			0	37.1	38	14				x			
3		12	Nov	0	0	0	0			0	37.2	34	12							
4		19	Dec	0	0	0	0			0	37.2	32	14				x			
5		24	Mar	0	0	0	0			0	37.2	40	16				x			
6		15	Mar	0	0	0	0			0	37.1	40	16							
7		11	Feb	2	0	1	1			2	38.0	36	16	x	x		x	x		
8		15	Jun	1	0	1	1			1	37.2	38	16	x	x		x			

(continues)

(continued)

Horse no.	RAO stage*	Age	Month of evaluation/ exacerbation	Cough*	Nasal discharge*	Abdominal lift*	Nasal flare on resting*	Lethargy	Anorexia	Exercise intolerance*	Rectal temp. (°C)	Heart rate (bpm)	Respiratory rate (cpm)	Lung auscultation				Tracheal auscultation- "flutter"	Cutaneous pruritus	Cutaneous wheals
														Inspiratory/ expiratory changes	Bilateral changes	Wheezing	Crackles			
9	Not evaluated	19	Jun	1	0	0	0			0	37.1	42	14	x	x					
10		21	Jul	0	0	0	0			0	37.0	38	14							
11		20	Sep	3	3	3	3	x	x	2	37.4	50	30	x	x	x	x	x		
12		10	Sep	0	0	0	0			0	37.5	26	14							
13		14	Sep	1	1	1	0	x		1	37.2	46	20	x	x		x			
14		17	Sep	2	1	2	2			2	37.4	66	30	x	x	x		x		
15		14	Oct	2	1	2	2	x	x	2	37.2	58	30	x	x	x	x	x		
16		19	Mar	0	0	0	0			0	37.1	40	12							
17		17	Mar	0	0	0	0			0	37.5	42	14							
18		14	Apr	0	0	0	0			0	37.2	38	12							
19		21	Apr	3	3	3	3	x	x	3	37.6	60	36	x	x	x	x	x		
20		16	Apr	0	0	0	0			0	37.6	42	15							
21		15	Apr	1	0	1	0			1	37.7	44	19	x	x		x			
22		12	Apr	0	0	0	0			0	38.0	30	14							
23		15	May	0	0	0	0			0	37.2	40	12							
24		8	May	0	0	0	0			0	37.3	42	10							
25		13	May	0	0	0	0			0	37.2	38	15							
26		31	May	0	0	0	0			0	37.9	42	18				x			
27		17	Feb	3	3	3	3	x	x	3	37.6	52	36	x	x	x	x	x		
28		21	Jun	1	1	2	1	x		2	38.0	48	24	x	x	x	x			
29		9	Jun	0	0	0	0			0	37.2	34	8							
30		16	Jul	0	0	0	0			0	37.8	40	16							

Clinical confirmation of reduced respiratory symptoms

Reduction of symptoms	Totally implemented					Partially implemented					Not implemented					Total no. horses	Final total no. of horses
	No. horses / RAO stage (E)				Total no. horses	No. horses / RAO stage (E)				Total no. horses	No. horses / RAO stage (E)				Total no. horses		
	E 1	E 2	E 3	E 4		E 1	E 2	E 3	E 4		E 1	E 2	E 3	E 4			
Total	3	3	5	3	14	1	1	1	2	5	0	0	0	0	0	19	
Partial	0	0	0	0	0	0	2	1	2	5	0	0	0	0	0	5	
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
None	0	0	0	1d	1	0	0	1d	0	1	0	0	2	1d	3	5	

Key: d = died; x = present; RAO – recurrent airway obstruction; SPT – skin prick tests

* (Tilley et al. 2010): RAO STAGE – 0 – no RAO, 1 – latent RAO, 2 – mild RAO, 3 – moderate RAO, 4 – severe RAO; COUGH – 0 – None, 1 – Cough at specific times of day (feeds / exercise / mucking out), 2 – Frequent cough, with cough-free periods, 3 – Very frequent cough; NASAL DISCHARGE – 0 – None, 1 – Serous (slight or abundant), 2 – Mucous (slight), 3 – Mucous (abundant); ABDOMINAL LIFT (Adapted from Gerber et al. 2000) – 0 – None, 1 – Mild flattening of ventral flanks, 2 – Obvious abdominal flattening and heave line extended to no more than halfway between the cubital joint and coxal tuberosity, 3 – Obvious abdominal flattening and heave line extended to over halfway between the cubital joint and coxal tuberosity; NASAL FLARE (Adapted from Gerber et al. 2000) – 0 – None, 1 – Nasal flare on inspiration (returning to normal at end of inspiration), 2 – Nasal flare on inspiration and expiration (mild movement can still be seen), 3 – Nasal flare on inspiration and expiration (movement can no longer be seen); EXERCISE INTOLERANCE – 0 – None, 1 – Mild or very mild limitation, 2 – Moderate or great limitation, 3 – Extremely or completely limited.

cavalo apenas reagiu a *C. mistura* e um a *M. mucedo*. Finalmente, no grupo dos pólenes de gramíneas, seis cavalos apenas reagiram a *D. glomerata*, cinco a *P. pratense* e três a *L. perenne*.

Numa análise estatística com vista a encontrar o valor de *cut-off* mais indicado para o diâmetro de pápula dos TCP, o valor de 1 cm como *cut-off* para a positividade dos TCP foi o que forneceu um melhor equilíbrio de valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativo e positivo (Quadro 3, Figura 2). Com este

within each group (Table 4). Specifically, in the mites group, two horses were only sensitised to *D. pteronyssinus* and four only to *T. putrescentiae*. In the moulds group, one horse only reacted to *C. mix* and one only to *M. mucedo*. Finally, in the grass pollens group, six horses only reacted to *D. glomerata*, five only to *P. pratense* and three only to *L. perenne*.

A statistical analysis was performed, aiming to find the more suitable cut-off value for the wheal diameter of the positive SPT. The value of 1 cm as a positive SPT cut-off point was the one which gave a better balance between

Quadro 2. Caracterização dos cavalos com ORVA e do seu meio ambiente (n.º de cavalos)

Género			Pelagem				
Garanhão	Égua	Macho castrado	Ruça	Baia	Castanha	Preta	Lazã
16	8	6	17	1	9	1	2

Área Geográfica				Área de Portugal	
Rural	Cidade	Vila	Aldeia	Estremadura	Ribatejo
19	6	1	4	22	8

Ambiente			Ventilação no estábulo				Com fontes de pólen próximo
Estabulado	Misto (estabulado e a campo)	Cama de palha	2 aberturas acima do corpo do cavalo	2 aberturas ao nível do corpo do cavalo	Apenas uma abertura	Sem aberturas para além da porta	
19	11	30	12	2	15	1	11

Alimentos									Pó nos alimentos			Água		
Palha	Feno	Luzerna	Ração granulada	Ração de mistura	Ração com melaço	Farelo	Cenouras	Aveia presente na ração	Palha	Feno	Ração	Bebedouros automáticos	Balde	Água apenas fora da boxe
21	22	4	3	27	8	6	6	30	20	19	17	16	11	3

Superfície de trabalho				Intensidade de trabalho		
Picadeiro interior	Picadeiro exterior	Campo (passeios)	Superfície de trabalho com muito pó	Mínimo	Moderado (passeio/ensino)	Máximo (obstáculos)
9	21	8	23	5	23	2

Legenda: ORVA – obstrução recorrente das vias aéreas

Table 2. Characterization of the horses with RAO and their surrounding environment (no. of horses)

Gender			Coat				
Stallion	Mare	Gelding	Grey	Dun	Bay	Black	Chestnut
16	8	6	17	1	9	1	2

Geographical area				Area of Portugal	
Rural	City	Town	Village	Estremadura	Ribatejo
19	6	1	4	22	8

Environment			Ventilation in stables				Pollen sources nearby
Stabled	Mixed (stabled and turned out)	Straw bedding	2 openings above the body of the horse	2 openings at the level of the body of the horse	Only one opening	No openings other than the door	
19	11	30	12	2	15	1	11

Feed									Dust in the feed			Water		
Straw	Hay	Alfalfa	Pelleted grain	Whole grain	Grain with molasses	Wheat bran	Carrots	Grain containing oats	Straw	Hay	Grain	Automatic drinking fountain	Bucket	Water outside the box only
21	22	4	3	27	8	6	6	30	20	19	17	16	11	3

Work surface				Intensity of work		
Indoor ring	Outdoor ring	Field (rides)	Very dusty work surface	Minimal	Moderate (Rides/Dressage)	Maximum (Show jumping)
9	21	8	23	5	23	2

Key: RAO – recurrent airway obstruction

valor de *cut-off*, a sensibilidade global dos TCP com estes 16 aeroalergénios para detectar pelo menos uma sensibilização num cavalo com ORVA foi de 0,98, embora com uma especificidade global inferior (0,73), significando que alguns cavalos sem ORVA poderão também ter sensibilizações assintomáticas e sem relevância, tal como acontece também em medicina humana. Os valores preditivos negativo e positivo foram respectivamente 0,73 e 0,98.

Relevância clínica da sensibilização a alergénios

Observou-se uma redução significativa dos sintomas respiratórios após um ano de evicção eficaz dos aeroaler-

sensitivity, specificity, NPV and PPV values (Table 3, Figure 2). With this cut-off value, the overall sensitivity of SPT to these 16 aeroallergens to detect at least one sensitisation in a horse with RAO was 0.98, although with lower overall specificity (0.73), meaning that some horses without RAO could also have asymptomatic and non-relevant sensitisations, as is the case in human medicine. The NPV and PPV were 0.73 and 0.98, respectively.

Clinical relevance of sensitisation to allergens

A significant reduction in respiratory symptoms was observed after one year of effective aeroallergen avoidance

génios aos quais foi identificada sensibilização nos testes cutâneos (Quadro 1). Visto que nem todos os proprietários implementaram as medidas de evicção propostas, a relação entre a redução dos sintomas e a implementação eficiente das alterações ambientais foi também analisada e é apresentada no Quadro 1.

DISCUSSÃO

Neste estudo demonstrou-se que, nesta população seleccionada, todos os cavalos com ORVA tiveram vários resultados positivos de TCP com aeroalergénios comuns, fortemente sugestivos de reacções de hipersensibilidade IgE mediadas e do papel que estas reacções possam desempenhar na ORVA²¹. Os TCP são o método convencional para investigar a presença de IgE específicas para os alergénios, detectando as IgE específicas ligadas à superfície dos mastócitos na pele, constituindo um dos meios de diagnóstico mais eficientes e correlacionando-se bem com outros testes, sendo por isso o método mais amplamente utilizado para demonstrar a presença de IgE específica no homem. São ainda uma mais-valia na exclusão de alergénios como potenciais causadores de sintomas, visto que os resultados falso negativos não são frequentes^{22,23,24}.

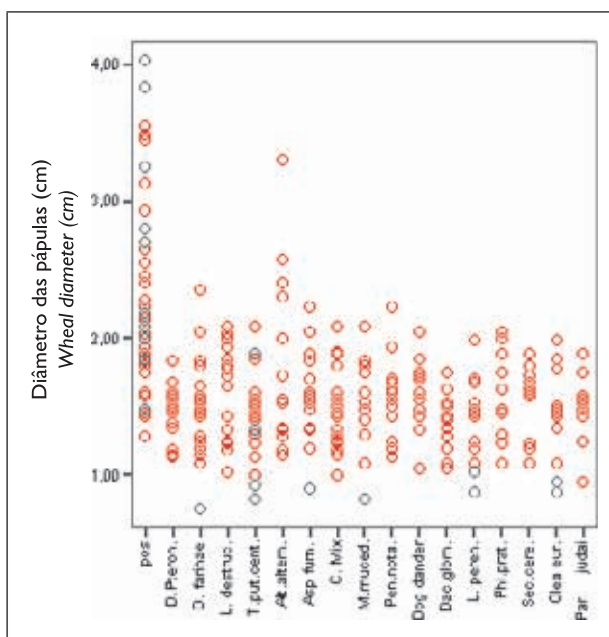
Relativamente a resultados positivos sem relevância clínica (“falsos positivos”), é de referir que o ácaro *T. putrescentiae* originou reacções positivas em vários cavalos com ORVA (Quadro 4, Figura 2) mas, uma vez que este alergénio originou também quatro reacções positivas no grupo-controlo, os autores consideram que a sua relevância clínica deverá ser questionada e que deverá ser retirado da bateria originalmente proposta, mantendo-se todos os restantes.

Pensa-se que os estímulos antigénicos que desencadeiam a ORVA possam variar com a localização geográfica e²⁵, na população estudada, os ácaros e os fungos foram os principais alergénios aos quais os cavalos com ORVA se mostraram sensibilizados. A maioria dos nossos ca-

measures (Table 1). As not all owners implemented the recommended measures, the relationship between the reduction in symptoms and the efficient implementation of the environmental changes was also analysed and is shown in Table 1.

DISCUSSION

This study shows that in this selected population, all horses with RAO had several positive SPT results to common



Legenda: ○ – Diâmetro das pápulas dos cavalos do grupo-controlo; ○ – Diâmetro das pápulas dos cavalos do grupo com obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA); pos – Controlo positivo (histamina)

Key: ○ – Wheal diameters of the control group horses; ○ – Wheal diameters of the recurrent airway obstruction (RAO) group horses; pos – positive control (histamine)

Nota: Para melhor percepção do limiar de cut-off, representam-se todos os valores de pápulas superiores a 0,6 cm.

Note: For better understanding of the cut off value, all wheal diameters over 0.6cm are represented.

Figura 2. Diâmetro das pápulas (cm) obtidas pelos testes cutâneos em picada para aeroalergénios

Figure 2. Papule's wheal diameters (cm) obtained in the skin prick tests with the aeroallergens

valos do grupo ORVA estavam estabulados com cama de palha, sendo a ventilação feita em 15/30 dos casos através de uma única abertura (Quadro 3). Este facto poderia ajudar a explicar a importância dos alergénios fúngicos nesta população equina. A *A. alternata* encontra-se entre os dez esporos fúngicos de ocorrência mais frequente em Portugal. Em Lisboa (Portugal) ocorrem picos atmosféricos de concentração de esporos fúngicos em Abril e Agosto e em toda a região mediterrânica ocorrem elevadas contagens de esporos fúngicos durante quatro meses (Junho a Setembro), ao passo que no Norte da Europa se registam períodos mais curtos de contagens elevadas de esporos fúngicos²⁶. Estes períodos corresponderam às épocas em que a maioria dos

aeroallergens, strongly suggesting IgE-mediated hypersensitivity reactions and the role these reactions may play in RAO²¹. SPT are the conventional method used to investigate the presence of aeroallergen-specific IgE, detecting specific IgE bound to the surface of skin mast cells and are believed to be one of the most efficient means of diagnosis and one which correlates well with other tests. They are, thus, the method most widely used to show any specific IgE in humans. They are also an asset in excluding allergens as likely causes of symptoms, seeing as false negative results are infrequent²²⁻²⁴.

In reference to positive results with no clinical relevance – false positives – the *T. putrescentiae* mite caused positive reactions in several horses with RAO (Table 4, Figure 2) but, as this allergen also caused four positive reactions in the

Quadro 3. Avaliação estatística de diferentes valores de *cut-off* para positividade dos TCP

Diferentes valores para positividade dos TCP (diâmetro da pápula)				
	Positivo se diâmetro > 0,9 cm Negativo se diâmetro ≤ 0,9 cm	Positivo se diâmetro > 1 cm Negativo se diâmetro ≤ 1 cm	Positivo se diâmetro > 1,1 cm Negativo se diâmetro ≤ 1,1 cm	Positivo se diâmetro > 1,2 cm Negativo se diâmetro ≤ 1,2 cm
Sensibilidade do teste	1	0,98	0,93	0,84
Especificidade do teste	0,55	0,73	0,82	0,82
VPN	1	0,73	0,39	0,22
VPP	0,98	0,98	0,99	0,99

Legenda: TCP – testes cutâneos por picada; VPN – valor preditivo negativo; VPP – valor preditivo positivo

Table 3. Statistical evaluation of different cut-off values for positiveness of SPT

Different cut-off values for positive SPT (wheal diameter)				
	Positive if diameter > 0.9 cm Negative if diameter ≤ 0.9 cm	Positive if diameter > 1 cm Negative if diameter ≤ 1 cm	Positive if diameter > 1.1 cm Negative if diameter ≤ 1.1 cm	Positive if diameter > 1.2 cm Negative if diameter ≤ 1.2 cm
Test sensitivity	1	0.98	0.93	0.84
Test specificity	0.55	0.73	0.82	0.82
NPV	1	0.73	0.39	0.22
PPV	0.98	0.98	0.99	0.99

Key: SPT – skin prick tests; NPV – negative predictive value; PPV – positive predictive value

cavalos foi referenciada por exacerbação dos sintomas de ORVA.

O elevado número de TCP positivos a ácaros no grupo ORVA (Quadro 4, Figura 2) pode estar relacionado com a proporção importante de proprietários que afirmaram alimentar os seus cavalos com palha e feno que apresentavam quantidades significativas e visíveis de pó, assim como com o facto de trabalharem os cavalos em superfícies que levantam muito pó (Quadro 2), muito comuns no nosso clima quente e seco, especialmente entre Junho e Setembro, que constituíram meses com elevadas taxas de referência de animais.

Até à data não temos conhecimento de estudos que tenham efectuado TCP em cavalos, não havendo por isso menção prévia a valores para *cut off* no que se refere ao diâmetro da pápula. No presente estudo propõe-se que esse valor seja de 1 cm. Este valor é muito superior ao valor de 0,3 cm que a *World Allergy Organization* aponta para *cut-off* de positividade para os TCP na espécie humana. No entanto, na nossa população total de cavalos, os valores do controlo positivo (histamina) foram também muito superiores aos que normalmente se registam na espécie humana. A razão desta tão acentuada diferença interespecies na reactividade cutânea à histamina não é imediatamente evidente e deverá ser investigada.

Apesar de, como dissemos, não termos conhecimento de trabalhos que tenham efectuado TCP em cavalos, existem trabalhos que descrevem testes intradérmicos (TID) em cavalos, havendo algumas referências ao diâmetro das pápulas. Vários autores, como Halliwell *et al*⁶ consideraram que, para TID no cavalo, a pápula seria positiva quando o diâmetro fosse 5 ou mais milímetros superior à da histamina. Nesse estudo, os cavalos do grupo-controlo tiveram pápulas 5 a 14 mm maiores que a da histamina (100 pápulas 5 a 9 mm e apenas 16 pápulas 10 a 14 mm superiores à da histamina). O grupo com ORVA teve pápulas 5 a 20 mm superiores à da histamina (258 testes 5 a 9 mm, 73 testes 10 a 14 mm,

control group, the authors felt its clinical relevance should be questioned and, thus, it should be removed from the group of aeroallergens originally proposed and the rest retained.

It is thought that the antigenic stimuli that triggers RAO may vary from place to place²⁵; in our population mites and moulds were the main aeroallergens to which the horses with RAO were sensitised.

The majority of the horses in the RAO group were stabled with straw bedding, with ventilation in 15/30 of cases via a single opening (Table 2). This could help explain the significance of mould allergens in this equine population. *A. alternata* is one of the ten most frequently occurring mould spores in Portugal. Lisbon (Portugal) has atmospheric peaks of mould spores in April and August, and throughout the Mediterranean region there are high mould spore counts for four months (June-September). The north of Europe has shorter high-count periods of mould spores²⁶. These periods corresponded to the seasons during which the majority of horses were referred for exacerbation of RAO symptoms.

The high number of positive SPT to mites in the RAO group (Table 4, Figure 2) could be related to the significant proportion of owners reporting that they had fed their horses dusty straw and hay, plus the fact that they work the horses on very dusty terrain (Table 3). This is very common in Portugal's hot, dry climate, particularly in June-September, which corresponded to a high referral period.

Up to the present time we are unaware of studies of SPT on horses, and thus there is no prior mention of cut-off values for wheal diameter. Our study proposes this value should be 1 cm. This is significantly higher than that of 0.3 cm that the World Allergy Organization gives as the positive cut-off for SPT in humans. In our total equine population, however, the positive control (histamine) values were also remarkably greater than those normally seen in humans. The reason for this marked interspecies difference in cutaneous reactivity to histamine is not immediately evident and needs investigating.

Quadro 4. Resultados dos TCP (diâmetro médio da pápula em cm) nos grupos ORVA e controlo

			Alergénios														N.º TCP positivos/cavalo				
			Dermatophagoides (D.) pteronyssinus	D. farinae	Lepidoglyphus destructor	Tyrophagus putrescentiae	Alternaria alternata	Aspergillus fumigatus	Cladosporium mix	Mucor mucedo	Penicillium notatum	Epitélio de cão	Dactylis glomerata	Lolium perenne	Phleum pratense	Secale cereale		Olea europaea	Parietaria judaica		
Grupo-controlo	N.º do cavalo	1	2,7				1,0													1	
		2	1,9																		1
		3	2,8				1,0												1,0		2
		4	1,5																		0
		5	2,0																		0
		6	3,8				1,9														1
		7	3,3		1,0							1,0									2
		8	2,2				1,3			1,0											2
		9	4,0																		0
		10	2,1																		0
N.º TCP positivos/alergénio			0	1	0	4	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0			
N.º cavalos com pelo menos 1 TCP positivo a:			Ácaros				Fungos				Pólenes										
			5				2				2										

			Alergénios														N.º TCP positivos/cavalo				
			Dermatophagoides (D.) pteronyssinus	D. farinae	Lepidoglyphus destructor	Tyrophagus putrescentiae	Alternaria alternata	Aspergillus fumigatus	Cladosporium mix	Mucor mucedo	Penicillium notatum	Epitélio de cão	Dactylis glomerata	Lolium perenne	Phleum pratense	Secale cereale		Olea europaea	Parietaria judaica		
Grupo ORVA	N.º do cavalo	1	1,8	1,2	1,1	1,2	1,3		1,5			1,3							1,5	7	
		2	3,6	1,5					1,4	1,3		1,6	1,7	1,4					1,4	1,0	8
		3	1,4				1,0			1,2	1,1			1,3	1,3		1,1				6
		4	2,0	1,1	1,2		1,1	1,4		1,5		1,7	1,3				1,6	2,0			9
		5	3,5		2,4	1,4	1,9					1,8			1,3	1,5		1,9	1,9		8
		6	1,9	1,5			1,4	1,2			1,2		1,2		1,4			1,6		1,3	8
		7	1,9	1,5	1,5	1,7	1,5		1,7			1,8					1,8		1,8		9
		8	1,9				1,3										1,1		1,2	1,1	6
		9	1,8	1,2	1,2	1,0	1,2	1,2	1,4		1,4	1,6	1,5		1,1					1,6	11
		10	1,3			1,1		1,5	1,2			1,0		1,1	1,2		1,2		1,4		9
		11	1,8				1,2	1,3				1,8	1,1			1,3	1,2			1,4	7
		12	1,6				1,2	1,1	1,4			1,3		1,6		1,2					6
		13	1,5		1,3	1,3		1,3	1,2					1,5				1,2			7
		14	2,9		1,7	1,7	1,9	1,6	1,6			2,1	1,6	1,8			1,8	1,4	1,8		11
		15	2,1		1,3		1,5	1,7				1,6	1,7		1,5	1,7		1,6			8
		16	2,7	1,4	1,6		1,3			1,7	2,1	1,8	1,9	1,7							9
		17	2,5	1,6						1,6	1,8	1,8				1,1				1,4	6
		18	2,7	1,6	1,4			2,4	1,8	1,9				2,1		1,5	2,0	2,1			7
		19	2,6	1,7	1,8	1,9		3,3	2,2				2,2		1,5	2,0	2,1				11
		20	2,1		2,1	1,8		2,3	2,1	1,9										1,9	7
		21	2,3			1,8	1,4		1,6	1,6						1,5	1,5	1,6			7
		22	2,2		1,5	1,7	1,6							1,6	1,8			1,7			7
		23	2,2	1,6	1,8	1,9		1,5		1,6								2,0			6
		24	1,6		1,6		1,5	1,5	1,5	1,3					1,5	1,4	1,48		1,5		9
		25	1,8		1,5	1,3			1,3		1,5	1,4			1,4		1,5			1,5	8
		26	3,1	1,5	1,5	2,1		2,6	1,9	1,5					1,4						7
		27	2,4				1,6			1,3	1,4					1,7	1,5				5
		28	2,3	1,8			1,9		1,6				1,7	1,6				1,6	1,5	1,5	8
		29	1,9	1,4	1,5	2,0	1,6								1,6						5
		30	3,5		1,4	2,0	2,1	2,0				1,5				2,0	1,7			1,6	8
N.º TCP positivos /alergénio			14	20	16	21	16	16	16	13	13	12	14	10	12	13	11	11			
N.º cavalos com pelo menos 1 TCP positivo a:			Ácaros				Fungos				Pólenes										
			30				28				30										

Legenda: TCP – testes cutâneos por picada; ORVA – obstrução recorrente das vias aéreas.
 Nota: As quadrículas em branco representam diâmetros de pápula inferiores a 1 cm.

Table 4. SPT results (mean wheal diameter in cm) in the RAO and control groups

Control Group	No. of horse	Positive control (histamine)	Aeroallergens														No. of positive SPT per horse		
			Dermatophagoides (D.) pteronyssinus	D. farinae	Lepidoglyphus destructor	Tyrophagus putrescentiae	Alternaria alternata	Aspergillus fumigatus	Cladosporium mix	Mucor mucedo	Penicillium notatum	Dog dander	Dactylis glomerata	Lolium perenne	Phleum pratense	Secale cereale		Olea europaea	Parietaria judaica
	1	2.7				1.0													1
	2	1.9																	1
	3	2.8				1.0										1.0			2
	4	1.5																	0
	5	2.0																	0
	6	3.8				1.9													1
	7	3.3		1.0						1.0									2
	8	2.2				1.3			1.0										2
	9	4.0																	0
	10	2.1																	0
No. positive SPT/allergen			0	1	0	4	0	1	0	1	0	0	0	2	0	0	2	0	
No. of horses with at least one positive SPT to:			Mites				Moulds				Pollens								
			5				2				2								

RAO Group	No. of horse	Positive control (histamine)	Dermatophagoides (D.) pteronyssinus	D. farinae	Lepidoglyphus destructor	Tyrophagus putrescentiae	Alternaria alternata	Aspergillus fumigatus	Cladosporium mix	Mucor mucedo	Penicillium notatum	Dog dander	Dactylis glomerata	Lolium perenne	Phleum pratense	Secale cereale	Olea europaea	Parietaria judaica	No. of positive SPT per horse	
	1	1.8	1.2	1.1	1.2	1.3		1.5			1.3							1.5	7	
	2	3.6	1.5					1.4	1.3		1.6	1.7	1.4				1.4	1.0	8	
	3	1.4				1.0			1.2	1.1			1.3	1.3		1.1			6	
	4	2.0	1.1	1.2		1.1	1.4		1.5		1.7	1.3				1.6	2.0		9	
	5	3.5		2.4	1.4	1.9				1.8			1.3	1.5		1.9	1.9		8	
	6	1.9	1.5			1.4	1.2		1.2		1.2		1.4			1.6		1.3	8	
	7	1.9	1.5	1.5	1.7	1.5		1.7		1.8		1.4			1.8		1.8		9	
	8	1.9				1.3			1.2				1.1		1.1	1.2	1.1		6	
	9	1.8	1.2	1.2	1.0	1.2	1.2	1.4	1.4	1.6	1.5		1.1					1.6	11	
	10	1.3		1.1		1.5	1.2		1.0		1.6	1.1	1.2		1.2		1.4		9	
	11	1.8				1.2	1.3			1.8	1.1			1.3	1.2			1.4	7	
	12	1.6			1.2	1.1	1.4			1.3		1.6		1.2					6	
	13	1.5		1.3	1.3		1.3	1.2				1.5		1.5		1.2			7	
	14	2.9		1.7	1.7	1.9	1.6	1.6		2.1	1.6	1.8				1.8	1.4	1.8	11	
	15	2.1		1.3		1.5	1.7			1.6	1.7		1.5	1.7		1.6			8	
	16	2.7	1.4	1.6		1.3		1.7	2.1	1.8	1.9	1.7		1.1					9	
	17	2.5	1.6					1.6	1.8	1.8		1.9			1.6			1.4	6	
	18	2.7	1.6	1.4			2.4	1.8	1.9			2.1			1.9				7	
	19	2.6	1.7	1.8	1.9		3.3	2.2			2.2		1.5	2.0	2.1				11	
	20	2.1		2.1	1.8		2.3	2.1	1.9									1.9	7	
	21	2.3			1.8	1.4		1.6	1.6					1.5	1.5	1.6			7	
	22	2.2		1.5	1.7	1.6						1.6	1.8			1.7	1.5		7	
	23	2.2	1.6	1.8	1.9		1.5		1.6								2.0		6	
	24	1.6		1.6		1.5	1.5	1.5	1.3				1.5	1.4	1.48		1.5		9	
	25	1.8		1.5	1.3			1.3		1.5	1.4				1.5			1.5	8	
	26	3.1	1.5	1.5	2.1		2.6	1.9	1.5				1.4						7	
	27	2.4				1.6			1.3	1.4				1.7	1.5				5	
	28	2.3	1.8			1.9		1.6			1.7	1.6				1.6	1.5	1.5	8	
	29	1.9	1.4	1.5	2.0	1.6							1.6						5	
	30	3.5		1.4	2.0	2.1	2.0			1.5					2.0	1.7		1.6	8	
No. positive SPT/allergen			14	20	16	21	16	16	16	13	13	12	14	10	12	13	11	11		
No. of horses with at least one positive SPT to:			Mites				Moulds				Pollens									
			30				28				30									

Key: SPT – skin prick tests; RAO – recurrent airway obstruction.
 Note: Spaces left blank represent wheal diameters < 1 cm.

9 testes 15 a 19 mm e apenas 2 testes 20 ou mais milímetros superiores à da histamina). Lebis *et al.*²⁷ efectuaram TID em cavalos com alergia respiratória, tendo obtido para a histamina pápulas com $1,802 \pm 0,214$ cm no grupo-controlo e $1,829 \pm 0,225$ cm no grupo com alergia respiratória, e para o controlo negativo com $0,458 \pm 0,514$ cm no grupo-controlo e $0,443 \pm 0,512$ cm no grupo com alergia respiratória. Neste estudo considerou-se que um alérgico apresentava um teste positivo quando entre 20 minutos e 1 hora após a sua inoculação se obtinha uma pápula com 1 cm ou uma pápula com 1,3 cm associada a uma espessura semelhante à do controlo positivo. Tahon *et al.*²¹ descreveram no cavalo diâmetros de pápula de 1,875 a 2,08 cm para a histamina 1 hora após inoculação. Este autor considerou que os TID seriam positivos quando as pápulas apresentassem diâmetro igual a pelo menos metade do diâmetro da histamina ao fim de 1 hora. Sloet van Oldruitemborgh-Oosterbaan *et al.*²⁸ utilizaram TID para avaliar cavalos com hipersensibilidade a culicídeos, referindo aos 30 minutos diâmetros médios de pápula de 1,7 cm para a histamina, de 1,5 cm para o alérgico (culicídeos) no grupo com hipersensibilidade e de 1,1 cm para o mesmo alérgico no grupo-controlo.

Todos estes valores apresentam algumas semelhanças com os presentes resultados.

Em outros animais também se tem tentado realizar testes cutâneos na investigação alergológica: no cão são descritas pápulas com 0,3 a 0,5 cm de diâmetro para os TID²⁹, enquanto no gato não há consenso quanto ao modo de interpretação dos TID, tendo-se em consideração vários factores, como a presença de eritema, edema, firmeza do edema, diâmetro do edema, e a presença de pseudópodes³⁰.

Martins *et al.*³¹ efectuaram TID em cães atópicos em Portugal, tendo obtido diâmetros médios de pápula de 0,4 cm para o controlo negativo, 0,9 a 1,2 cm para o controlo positivo e 0,8 a 1,2 cm para os alérgicos. A positividade foi considerada quando a pápula tinha diâmetro igual ou superior a metade da soma das pápulas dos controlos positivo e negativo.

While we are unaware, as was said above, of studies of SPT on horses, there are studies reporting intradermal tests (IDT) on horses, with some reference to wheal diameters. Several authors, such as Halliwell *et al.*⁶, consider that the wheal for IDT in horses is positive when the diameter is at least 5 mm or greater than the histamine wheal. In that study, the control group horses showed wheals 5-14 mm greater than histamine (100 wheals 5-9 mm and only 16 wheals 10-14 mm greater than the histamine wheal). The RAO group had wheals 5-20 mm greater than the histamine wheal (258 tests 5-9 mm; 73 tests 10-14 mm; nine tests 15-19 mm and only two tests 20 or more millimeters greater than the histamine wheal). Lebis *et al.*²⁷ performed IDT in horses with respiratory allergy and obtained histamine wheals of 1.802 ± 0.214 cm in the control group and 1.829 ± 0.225 cm in the respiratory allergy group. They obtained for the negative control 0.458 ± 0.514 cm in the control group and 0.443 ± 0.512 cm in the respiratory allergy group. In that study the authors considered that an allergen presented a positive test when between 20 minutes and one hour after its inoculation a 1 cm wheal was obtained or a wheal of 1.3 cm associated with a thickening similar to that of the positive control. Tahon *et al.*²¹ described in horses, wheal diameters of 1.875-2.08 cm for histamine, one hour after inoculation. This author considered IDT to be positive when the wheals had a diameter of, at least, half the diameter of the histamine wheal after one hour. Sloet van Oldruitemborgh-Oosterbaan *et al.*²⁸ used IDT to assess horses with hypersensitivity to culicoides, reporting at 30 minutes mean wheal diameters of 1.7 cm for histamine, of 1.5 cm for the allergen (culicoides) in the group with hypersensitivity and of 1.1 cm for the same allergen in the control group.

All these above mentioned values are somewhat similar to our results.

Skin tests have also been performed on other animals in allergological research: in dogs, wheals of 0.3-0.5 cm diameter have been seen in IDT²⁹, while in cats there is no consensus as how to interpret the IDT, considering such factors as erythema, oedema, firmness of the oedema, diameter of the oedema and the presence of pseudopodia³⁰.

Comparando os TCP com os testes intradérmicos, Nelson *et al.*³² mostraram que, no diagnóstico de alergia a pólen de gramíneas na espécie humana, um teste intradérmico com resultado positivo na presença de um TCP negativo não é indicativo de uma sensibilização com significado clínico.

Em cavalos, embora alguns autores ainda advoguem os testes intradérmicos³³, verifica-se que estes induzem frequentemente reacções falso positivas em cavalos clinicamente saudáveis^{34,35} e exigem uma técnica e uma interpretação dos resultados mais especializadas³⁶. De forma análoga, na espécie humana, os testes intradérmicos foram substituídos, na maioria dos casos, pelos TCP.

Acresce ainda que os resultados dos TCP estão imediatamente disponíveis e acarretam um custo relativamente pequeno, permitindo ao clínico demonstrar a reacção cutânea a um proprietário mais difícil de convencer³⁷. Os cavalos mostram muito pouco desconforto durante a execução dos TCP, embora seja necessário sedá-los e rapar o pêlo do pescoço.

Constituem contra-indicações dos TCP as doenças extensas da pele com ausência de um local apropriado para executar os testes, o risco de anafilaxia, principalmente com certos alergénios alimentares, ou a falta de disponibilidade de um clínico experiente²³.

O significado clínico das IgE específicas demonstradas tanto pelos TCP como por ELISA deve ter sempre em conta, tal como em medicina humana, a história e o exame clínico^{35,37}, devendo ser interpretados com prudência e englobados no contexto clínico. Neste trabalho, procedemos adicionalmente à confirmação clínica da redução dos sintomas respiratórios após a evicção alergénica. Os sintomas que mostraram uma melhoria mais evidente foram a tosse, o adejo nasal e o ressalto abdominal (linha de esforço ventral). Catorze dos quinze cavalos cujos donos implementaram correctamente medidas de evicção dos alergénios identificados mostraram redução total dos sintomas. Houve um cavalo cujos proprietários fizeram a correcta evicção alergénica sem terem obtido qualquer melhoria dos sintomas e que veio a morrer. Tratou-se de uma égua

Martins *et al.*³¹ performed IDT in atopic dogs in Portugal, obtaining mean wheal diameters of 0.4 cm for the negative control, 0.9-1.2 cm for the positive control and 0.8-1.2 cm for the allergens. A reaction was considered positive when the wheal showed a diameter equal or greater than half the sum of the positive and negative control wheals.

In comparing the SPT with the IDT, Nelson *et al.*³² showed that in diagnosing allergy to grass pollens in humans, a positive IDT coupled with a negative SPT does not indicate a sensitivity with clinical significance.

In horses, although some authors still argue in favour of IDT³³, they frequently induce false positive reactions in clinically healthy horses^{34,35} and require a more specialised technique and interpretation of results³⁶. Similarly, in humans, IDT have been largely replaced by SPT.

We further add that SPT results are immediately available and incur a relatively small cost, allowing the clinician to show a cutaneous reaction to a hard-to-convince owner³⁷. Horses experience relatively little discomfort during SPT, although they have to be sedated and the skin of their necks shaved.

Extensive skin diseases not leaving a large enough skin area available to perform the test are a contraindication for SPT. Other contraindications are the risk of anaphylaxis, mainly to certain food allergens, or the lack of availability of an appropriately trained clinician²³.

The clinical significance of specific IgE shown by SPT or ELISA should always consider – just as in human medicine – the patient's history and physical examination^{35,37}. These should be carefully interpreted and seen within the clinical context. In this study, we also had clinical confirmation of a reduction of the respiratory symptoms after aeroallergen evicção. The symptoms with more marked improvement were cough, nasal flare and abdominal lift. Fourteen of the fifteen horses whose owners had correctly implemented allergen avoidance measures showed total reduction of symptoms.

idosa, de 21 anos, que tinha sido classificada como apresentando um estágio de ORVA grave (estádio 4 de ORVA³⁸) e que na necropsia mostrou lesões extensas nos pulmões sem sinais de infecção respiratória concomitante.

Pelo contrário, os três cavalos cujos donos não procederam à implementação de nenhuma medida não mostraram qualquer melhoria dos sintomas. Um destes cavalos, com 17 anos e classificado como caso grave de ORVA (estádio 4 de ORVA³⁸), também veio a falecer após o início do estudo.

Os doze cavalos cujos donos implementaram algumas, mas não todas, das medidas de evicção aconselhadas, apresentaram melhoria clínica intermédia (Quadro 1). Neste grupo também veio a falecer um cavalo com 20 anos, classificado como caso moderado de ORVA (estádio 3 de ORVA³⁸) e no qual os proprietários só fizeram evicção parcial dos alérgenos identificados pelos TCP, não se tendo observado nenhuma melhoria dos sintomas respiratórios.

CONCLUSÃO

Os presentes resultados, obtidos com uma população altamente seleccionada, mostraram que a hipersensibilidade aos aeroalérgenos foi significativa em todos os cavalos com ORVA, sendo a alergia um mecanismo etiopatogénico provável nestes animais. Os TCP mostraram-se valiosos na identificação de potenciais desencadeantes de alergia, permitindo tentar minorar as causas ambientais de ORVA, registando-se melhoria clínica evidente após a implementação de medidas de evicção adequadas.

A sensibilização aos fungos (nomeadamente *A. alternata*) pareceu ser muito importante nos cavalos com ORVA. Por outro lado, o *T. putrescentiae* não pareceu ser uma boa escolha como aeroalérgeno para utilização em TCP para diagnóstico em cavalos com ORVA. Sugerimos então que seja utilizada a bateria de alérgenos por nós usada, retirando o *T. putrescentiae*. A partir dos resultados que obtivemos,

In one case, the horse's owners correctly implemented allergen avoidance measures but did not obtain any improvement in symptoms. The horse eventually died. This was an elderly 21 year old mare, with severe RAO (stage 4 RAO³⁸) which showed extensive pulmonary lesions in the autopsy, with no signs of concomitant respiratory infection.

The three horses whose owners did not implement any aeroallergen elimination measures showed no improvement of respiratory symptoms. One of these horses, aged 17 and classified as having severe RAO (stage 4 RAO³⁸), also died after the beginning of this study.

The 12 horses whose owners implemented some, but not all, of the recommended aeroallergen avoidance measures, showed an intermediate clinical improvement (Table 1). One of the horses in this group also died, at the age of 20. It was classified as a moderate case of RAO (stage 3 RAO³⁸), the owners had only partially eliminated the aeroallergens identified by the SPT and no improvement in the respiratory symptoms had been seen.

CONCLUSION

Our study into a highly select population showed that hypersensitivity to aeroallergens was significant in all horses with RAO, with allergy being a probable aetiopathogenic mechanism in these animals. The SPT were of value in identifying possible triggers of allergy, in an attempt to minimize environmental causes of RAO, having achieved evident clinical improvement after implementation of suitable aeroallergen avoidance measures.

Sensitization to moulds, particularly to *A. Alternata*, seems to be very important in horses with RAO. *T. putrescentiae*, however, did not seem to be a good choice as an aeroallergen for use in diagnostic SPT in horses with RAO. Therefore we suggest maintaining the group of aeroallergens we used, with *T. putrescentiae* being removed. From the results obtained, we suggest a wheal

sugerimos que seja considerado o diâmetro de pápula de 1 cm como requisito para positividade dos TCP.

Os TCP podem constituir um passo em frente no sentido de possibilitar a determinação precisa dos alérgenos aos quais os cavalos com ORVA estão sensibilizados, de modo a estabelecer medidas de evicção adequadas para os alérgenos relevantes, e, eventualmente, efectuar imunoterapia específica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos cavalos e aos seus proprietários, à Dr.^a Joana Simões e à Eng.^a Marta Vacas Carvalho por tornarem este projecto possível.

Financiamento: Este trabalho foi financiado pela FMV (Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa) e pelo CIISA (Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal), o ramo da FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) na FMV.

Declaração de conflitos de interesse: Nenhum.

Contacto / Contact

Paula Tilley

paulatilly@fmv.utl.pt

REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Steinbach F, Deeg C, Mauel S, Wagner B. Equine immunology: offspring of the serum horse. *Trends Immunol* 2002; 23:223-5.
2. Bowles KS, Beadle RE, Mouch S, Pourciau SS, Littlefield-Chabaud MA, Le Blanc C, et al. A novel model for equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 87:385-9.
3. Couëtil LL, Hoffman AM, Hodgson J, Buechner-Maxwell V, Viel L, Wood JLN, et al. Inflammatory airway disease of horses. ACVIM Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 2007; 21:356-61.
4. Couëtil LL, Ward MP. Analysis of risk factors for recurrent airway obstruction in North American horses: 1,444 cases (1990–1999). *JAVMA* 2003; 223:1645-50.
5. Deaton C. The role of oxidative stress in an equine model of human asthma. *Redox Report* 2006; 11:46-52.
6. Halliwell REW, Fleischmann JB, Mackay-Smith M, Beech J, Gunson DE. The role of allergy in chronic pulmonary disease of horses. *JAVMA* 1979; 174:277-81.

of 1 cm diameter as a requisite for considering a positive SPT.

Skin prick tests can represent a step forward in allowing accurate determination of the aeroallergens to which horses with RAO are sensitised, so as to establish suitable aeroallergen avoidance measures and eventually perform specific immunotherapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the horses and their owners, to Dr. Joana Simões and Eng.^a Marta Vacas Carvalho for making this project possible.

Funding: This study was funded by FMV (*Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa*) and CIISA (*Centro Interdisciplinar de Investigação em Sanidade Animal*), the branch of FCT (*Fundação para a Ciência e Tecnologia*) at FMV.

Conflict of interest disclosure: None.

7. Olszewski M, Robinson NE, Zhu F-X, Zhang X-Y, Tithof PK. Mediators of anaphylaxis but not activated neutrophils augment cholinergic responses of equine small airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999; 276:522-9.
8. Marti E, Horohov DW, Antzak DF, Lazary S, Lunn DP. Advances in equine immunology: Havemeyer workshop reports from Santa Fe, New Mexico and Hortobagy, Hungary. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91:233-43.
9. Anton F, Leverkoehne I, Mundhenk L, Thoreson WB, Gruber, AD. Overexpression of CLCA1 in small airways of horses with recurrent airway obstruction. *J Histochem Cytochem* 2005; 53:1011-21.
10. Horohov DW, Beadle RE, Mouch S, Pourciau, SS. Temporal regulation of cytokine mRNA expression in equine recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 108:237-45.
11. Holgate ST, Polosa R. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:218-30.
12. Leatherman B. Injection and sublingual immunotherapy in the management of allergies affecting the unified airway. *Otolaryngologic Clinics North Am* 2008; 41:359-74.

13. Reiner CR, Cohn LA, Delgado C, Spinka CM, Schooley EK, DeClue AE. Adjuvanted rush immunotherapy using CpG oligodeoxynucleotides in experimental feline allergic asthma. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 121:241-50.
14. Lee-Fowler TM, Cohn LA, DeClue, AE, Spinka CM, Ellebracht RD, Reiner CR. Comparison of intradermal skin testing (IDST) and serum allergen-specific IgE determination in an experimental model of feline asthma. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132:46-52.
15. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:780-9.
16. Wagner B, Miller WH, Erb HN, Lunn DP, Antczak DF. Sensitization of skin mast cells with IgE antibodies to culicoides allergens occurs frequently in clinically healthy horses. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132:53-61.
17. Wagner B. IgE in horses: Occurrence in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132:21-30.
18. Hoffman AM. Bronchoalveolar lavage: sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. *Vet Clin Equine* 2008; 24:423-35.
19. Hare JE, Viel L. Pulmonary eosinophilia associated with increased airway responsiveness in young racing horses. *J Vet Intern Med* 1998; 12:163-70.
20. Dreborg S. Skin tests used in type I allergy testing. *Allergy*. 1989; 44(Suppl 10):S22-30.
21. Tahon L, Baselgia S, Gerber V, Doherr MG, Straub R, Robinson NE, et al. In vitro allergy tests compared to intradermal testing in horses with recurrent airway obstruction. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 127:85-93.
22. Yunginger JW, Ahlstedt S, Eggleston PA, Homburger HA, Nelson HS, Ownby DR, et al. Quantitative IgE antibody assays in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:1077-84.
23. O'Brien RM. Skin prick testing and *in vitro* assays for allergic sensitivity. *Aust Prescriber* 2002; 25:91-3.
24. Scharma HP, Wood RA, Bravo AR, Matsui EC. A comparison of skin prick tests, intradermal skin tests, and specific IgE in the diagnosis of mouse allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121:933-9.
25. Seahorn TL, Beadle RE, McGorum BC, Marley CL. Quantification of antigen-specific antibody concentrations in tracheal lavage fluid of horses with summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. *AJVR* 1997; 58:1408-11.
26. Nunes C, Câmara I, Ferreira MB, Almeida MM, Gaspar A, Loureiro C, et al. Airborne fungal spores in Portugal. *Rev Port Imunoalergologia* 2008; 16:377-94.
27. Lebis C, Bourdeau P, Marzin-Keller F. Intradermal skin tests in equine dermatology: study of 83 horses. *EVJ* 2002; 34:666-72.
28. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Van Poppel M, De Raat IJ, Van Den Boom R, Savelkoul HFJ. Intradermal testing of horses with and without insect bite hypersensitivity in the Netherlands using an extract of native *Culicoides* species. *Vet Dermatol* 2009; 20:607-14.
29. Baker KP. Intradermal tests as an aid to the diagnosis of skin disease in dogs. *J Small Anim Pract* 1971; 12:445-52.
30. Prost C. Feline atopic dermatitis: clinical signs and diagnosis. *EJCAP* 2009; 19:223-9.
31. Martins AM. 2010. Comunicação pessoal.
32. Nelson HS, Oppenheimer J, Buchmeier A, Kordash TR, Freshwater LL. An assessment of the role of intradermal skin testing in the diagnosis of clinically relevant allergy to timothy grass. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97:1193-1201.
33. Jose-Cunilleras E, Kohn CW, Hillier A, Saville WJA, Lorch G. Intradermal testing in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease, recurrent urticaria, or allergic dermatitis. *JAVMA* 2001; 219:1115-21.
34. DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based 'allergy' tests. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81:277-87.
35. O'Driscoll BR, Powell G, Chew F, Niven RM, Miles JF, Vyas A, et al. Comparison of skin prick tests with specific serum immunoglobulin E in the diagnosis of fungal sensitization in patients with severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2009; 39:1677-83.
36. Wagner B, Miller WH, Morgan EE, Hillegas JM, Erb HN, Leibold W, et al. IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse. *Vet Res* 2006; 37:813-25.
37. Lorch G, Hillier A, Kwochka KW, Saville WJ, Kohn CW, LeRoy, BE. Comparison of immediate intradermal test reactivity with serum IgE quantitation by use of radioallergosorbent test and two ELISA in horses with and without atopy. *JAVMA* 2001; 218:1314-22.
38. Tilley P, Sales Luis JP, Branco Ferreira M. Correlation and discriminant analysis between clinical scores, endoscopic scores, thoracic X-ray scores and bronchoalveolar lavage fluid cytology scores, for staging horses with recurrent airway obstruction (RAO). 2010 (submetido para publicação).