

Testes intradérmicos e *imunodots* podem ser úteis no diagnóstico de alergia canina à carne

Intradermal testing and immunodot may be useful in diagnosing dog allergy to meat

Data de receção / Received in: 20/12/2017

Data de aceitação / Accepted for publication in: 08/03/2018

Rev Port Imunoalergologia 2019; 27 (1): 21-27

Luís Lourenço Martins^{1,2}, Isabela Esteves de Campos³, Célia Miguel Antunes^{4,5}, Ana Rodrigues Costa^{4,5}, Ana Goicoa Valdevira⁶, Ofélia Pereira Bento^{2,7}

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora

² Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM), Universidade de Évora

³ Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo

⁴ Departamento de Química, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora

⁵ Instituto de Ciências da Terra (ICT-IIFA), Universidade de Évora

⁶ Hospital Veterinário Universitário Rof Codina, Faculdade Veterinária de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha

⁷ Departamento de Zootecnia, Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora

RESUMO

Fundamentos: O diagnóstico de alergia alimentar em cães é geralmente realizado com recurso a dietas de exclusão e provas de provocação. **Objetivos:** Contribuir para a avaliação do valor diagnóstico de testes intradérmicos (TID) e de *imunodots* na alergia canina à carne. **Métodos:** Onze cães suspeitos de alergia alimentar seguidos em consulta externa de alergia foram submetidos a TID para os ácaros do pó e de armazenamento mais comuns, pólenes de gramíneas, carne de vaca, de porco, de borrego e de frango. A IgE específica foi determinada comercialmente para ácaros e pólenes e avaliada por *imunodots* para diferentes carnes. **Resultados:** A IgE específica média, em unidades de absorção ELISA (UAE) foi especialmente elevada para *Dermatophagoides farinae* (1665), *Acarus siro* (2063) e *Tyrophagus putrescentiae* (1644). Os TID revelaram-se especialmente positivos para *Dermatophagoides farinae* (5 doentes), *Dermatophagoides pteronyssinus* (6), carne de vaca (10), de frango (6) e de porco e de borrego (5). Os *immunodots* revelaram-se positivos em todos os doentes para carne de vaca, de porco e de borrego e em 8 para frango. Observou-se uma correlação positiva entre os TID e os *imunodots* para carne de vaca e frango. **Conclusões:** A exclusão da

carne de vaca, de porco, de borrego ou de frango da dieta dos cães com TID respetivamente positivos resultou em sensível melhora clínica. Os testes baseados nas IgE específicas revelaram-se ferramentas rápidas de diagnóstico razoavelmente preditivo na alergia à carne. Serão necessários estudos moleculares para esclarecer possíveis reações cruzadas e avaliação da imunidade celular para identificar alergia alimentar não mediada por IgE.

Palavras-chave: Cão, alergia alimentar, carne, sensibilização.

ABSTRACT

Background: Food allergy diagnosis in dogs usually runs through exclusion diets with provocation tests. **Aims:** To evaluate the diagnostic value of Intradermal Tests (IDT) and Immunodots in dogs with allergy to meat. **Methods:** From an allergy outpatient consultation 11 dogs suspected of food allergy were subjected to intradermal testing (IDT) for the most common dust and storage mites, grass pollens, beef, pork, lamb and chicken. Specific IgEs were commercially assessed for mites and pollens, and in immunodots to beef, pork, lamb and chicken. **Results:** Mean sIgE in ELISA-Absorbance-Units (EAU) was especially high to *Dermatophagoides farinae* (1665) *Acarus siro* (2063) and *Tyrophagus putrescentiae* (1644). IDT revealed positivity mostly for *D. farinae* (5 patients), *D. pteronyssinus* (6), beef (10), chicken (6) and pork and lamb (5). Immunodots revealed positive in all patients to beef, pork and lamb, and in 8 to chicken. Positive correlation was found between IDT and immunodot to beef and chicken. **Conclusions:** Avoidance of beef, pork, lamb or chicken in IDT positive dogs revealed clinical improvement. sIgE-based tests revealed quick reasonably predictive diagnosis tools in meat allergy. Molecular studies will be needed to clarify possible cross-reactions and assessment of cell immunity to identify non-IgE-mediated food allergy.

Key-words: Dog, food allergy, meat, sensitization.

INTRODUÇÃO

A dermatite de contato^{1,2} e a dermatite alérgica alimentar^{3,4} caracterizam-se por uma condição cutânea inflamatória, mais ou menos localizada, apresentando-se o prurido, tal como na alergia às pulgas e à *Malassezia*, como a principal queixa de base⁵. No entanto, em relação à alergia alimentar, estima-se que cerca de 10-15% apresentará sinais digestivos⁶. O diagnóstico atual de dermatite atópica canina baseia-se na história clínica e na exclusão de outras causas de dermatite, como infeções parasitárias ou bacterianas, bem como intolerância alimentar^{1,5}. A identificação da reatividade cutânea mediada por IgE, através de TID, e

a determinação sorológica de IgE alérgénio-específicas visam um diagnóstico mais específico, particularmente quando se objetiva a imunoterapia específica para o tratamento^{7,8}. As reações cutâneas adversas a alimentos constituem as manifestações predominantes em cães com alergia alimentar, sendo a carne de vaca, os produtos lácteos, o frango e o trigo os alimentos mais frequentemente implicados⁹. Como nos seres humanos, os testes cutâneos e sorológicos, por si mesmos, não apresentam suficiente fiabilidade no diagnóstico de alergia alimentar⁵. O recurso a dietas de eliminação ou a dietas hipoalérgicas comerciais tem constituído a metodologia proposta para o diagnóstico de alergia alimentar^{10,11}. Um subsequente passo diagnóstico é muitas

vezes necessário e inclui provas de provocação alimentar com alimentos individuais, para identificar o(s) alimento(s) especificamente envolvido(s)⁹. Encontram-se atualmente disponíveis no mercado opções analíticas com vista à identificação de alergia alimentar canina, quer baseadas no Western Blot, como o Cyno-DIAL[®] (Galileo Diagnostics, França), quer no ELISA, como o Teste Screening Alimentar e o Painel de Alergénios Alimentares (LETI Animal Health, Espanha). Porém, o recurso a essa opção como método diagnóstico único, mesmo para a metodologia baseada no Western Blot, considerada mais sensível e específica, não está recomendado para o diagnóstico de alergia alimentar no cão, face à insuficiente sensibilidade e especificidade^{11,12}. No entanto, alguns estudos haviam já revelado resultados controversos. Investigação laboratorial levada a cabo por Puigdemont *et al.* (2006)¹³ revelou concordância com as manifestações clínicas, enquanto Kunkle e Horner (1992)¹⁴ haviam observado resposta positiva a alergénios alimentares em cães apenas com alergia ambiental. Ausência de reatividade celular a antigénios alimentares foi também verificada em cães com reatividade alérgica alimentar¹⁵.

Em face da frequente suspeita de alergia alimentar e dado o insuficiente valor diagnóstico individual dos métodos laboratoriais estudados e a positividade dos TID para algumas carnes, em associação com a melhoria clínica após a sua exclusão da dieta, pretendeu-se, neste estudo, avaliar a relevância da abordagem diagnóstica combinada: i) história clínica; ii) TID; iii) IgE específica e iv) provas dietéticas de exclusão e provocação no diagnóstico de alergia alimentar, de forma mais rápida e com razoável fiabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos doentes

De 85 cães atendidos nas consultas externas de dermatologia e alergologia do Hospital Veterinário da Uni-

versidade de Évora (Portugal) e do Hospital Veterinário Universitário Rof Codina (Lugo, Espanha), 11 (5 do sexo masculino e 6 do sexo feminino) foram selecionados pela história clínica e TID, por suspeita de alergia alimentar. Consideraram-se suspeitos de alergia alimentar os doentes que, mesmo não apresentando manifestações digestivas, apresentavam dermatite alérgica sem agravamento estacional e TID positivos para alimentos. Todos os selecionados apresentavam dermatite pruriginosa e, pelo menos, seis dos critérios de Favrot para dermatite atópica¹⁶, sem queixas de natureza digestiva. Os TID foram realizados com extratos comerciais, incluindo controlo positivo (solução de histamina) e negativo (solvente dos extratos) (Bial Aristegui, Bilbao, Espanha) de acordo com os procedimentos diagnósticos internacionalmente aceites para, pelo menos, *Dermatophagoides farinae* (Der f), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p), *Acarus siro* (Aca s), *Tyrophagus putrescentiae* (Tyr p), *Lepidoglyphus destructor* (Lep d), *Dactylis glomerata* (Dac g), *Phleum pratense* (Phl p), carne de vaca, de porco, de borrego e de frango.

Determinação das IgE específicas

A IgE específica para um painel dos ácaros e pólenes mais comuns foi determinada de acordo com Lee *et al.* (2009)¹⁷ em laboratório comercial (Leti-Univet, Barcelona, Espanha). A avaliação das IgE específicas para carne de vaca, de porco, de borrego e de frango foi realizada em *imunodot blots* como segue: i) músculo fresco de cada uma das espécies, refrigerado, cortado em pedaços muito finos (<3 mm) e submetido a extração proteica sob agitação orbital suave, a 1:3, em tampão fosfato salino pH 7,4, durante 30 min a +4 °C; ii) o sobrenadante foi obtido por centrifugação a 3000 g durante 20 min a +4 °C; iii) a concentração proteica do extrato foi medida segundo o método de Warburg e Christian¹⁸ em espectrofotómetro (Beckman DU530 UV-VIS, Beckman Coulter, Brea, EUA) e repartido em alíquotas conservadas a -20 °C; iv) as tiras de nitrocelulose (NC) de 4 mm de largura foram preparadas

pingando por ponto (*dot*) 2 µL de solução de extrato de cada carne a 500 µg/mL; v) as tiras de NC foram bloqueadas 2x0,5 h em tampão de bloqueio (1% leite em pó desnatado – 0,1% Tween-20, em tampão Tris salino pH 7,4) à temperatura ambiente; vi) as tiras foram incubadas durante 2 h com soros individuais a 1:10 em tampão de bloqueio, seguido de lavagens de 4x5 min com solução de lavagem (0,9% NaCl – 0,1% Tween-20); vii) foi realizada incubação durante 2 h com anticorpo monoclonal marcado com biotina a 1:1000 em tampão de bloqueio (AbDSerotec, Kidlington, Reino Unido), seguido de lavagem 4x5 min e 1 h de incubação com ExtrAvidin-fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) a 1:5000; viii) as tiras de NC foram submetidas a um ciclo adicional de lavagem de 4x5 min e a visualização da marcação IgE específica foi realizada por reação cromogénica com nitrozol de tetrazólio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Sigma-Aldrich) em tampão substrato. Os controlos de *imunodot* foram realizados sem soro e sem soro e sem anti-IgE canina.

RESULTADOS

Os TID e a intensidade dos *imunodots* foram classificados de 1 a 4 e lidos, respetivamente, aos 15 min após a administração e aos 30 min de revelação, por três observadores separados, e os resultados positivos podem observar-se no Quadro I. A representação dos 5 graus dos TID é exemplificada na Figura 1. A IgE específica média, em UAE, foi de 1665 (Der f), 297 (Der p), 2063 (Aca s), 1644 (Tyr p), 105 (Lep d), 547 (Dac g) e 601 (Phl p), considerando um *cut-off* de 150 UAE. Os TID observaram-se positivos em 5 doentes (Der f), 6 (Der p), 4 (Aca s), 1 (Tyr p), 3 (Lep d), 4 (Dac g), 3 (Phl p), 10 (carne de vaca), 5 (porco), 5 (borrego) e 6 (frango). Os *imunodots* IgE específicos revelaram-se positivos para todos os doentes, relativamente às carnes de vaca, porco e borrego, e, em 8 deles, para frango (Figura 2). Foi possível uma semi-quantificação dos resultados dos *imunodots*, tendo-se observado uma forte correlação positiva entre IgE específica e TID para Der p ($r = 0,881$; $p = 0,048$), TID e

Quadro I. IgE específicas positivas (≥ 150 UAE), resultados positivos dos TID e dos *imunodots* para as diferentes fontes alergénicas

Cão N.º	Gramíneas				Ácaros								Alimentos									
	Dac g		Phl p		Der f		Der p		Aca s		Tyr p		Lep d		Vaca		Porco		Borrego		Frango	
	IgE	IDT	IgE	IDT	IgE	IDT	IgE	IDT	IgE	IDT	IgE	IDT	IgE	IDT	IDT	Dot	IDT	Dot	IDT	Dot	IDT	Dot
1	159		262		987		172		791		810				2	3		2		1		
2				3											3	4		3		4		1
3	880		1685		1863	3	502	3	3733	4	3635		137		4	4	3	4		3	3	2
4		1		1	327				217	1					3	4	3	3		3	2	2
5	602	1	393		3481		403	1	3509	1	3478		142	2	3	4	4	3		3	2	2
6											205				4	4	4	4	3	3	2	2
7		4				4		4		2		3		3	3	4		3	2	4		
8						2		3							3	3		3		1		1
9		1		1		1		1						2	4	4		3	1	3	1	1
10															3		4	1	3	1	1	
11						3		3		3					3	4	1	4	2	4		

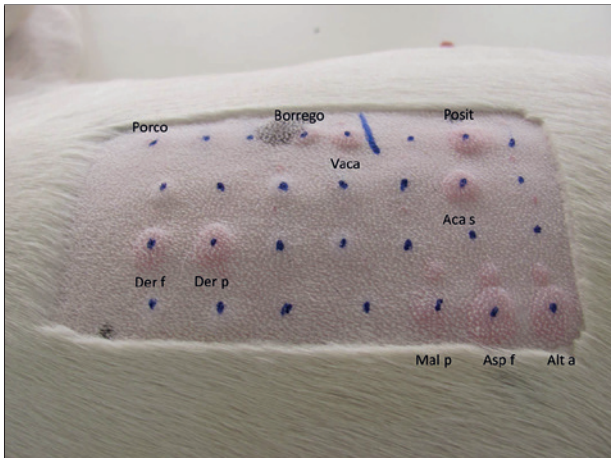


Figura 1. Representação dos 5 graus dos TID (15 minutos após inoculação)

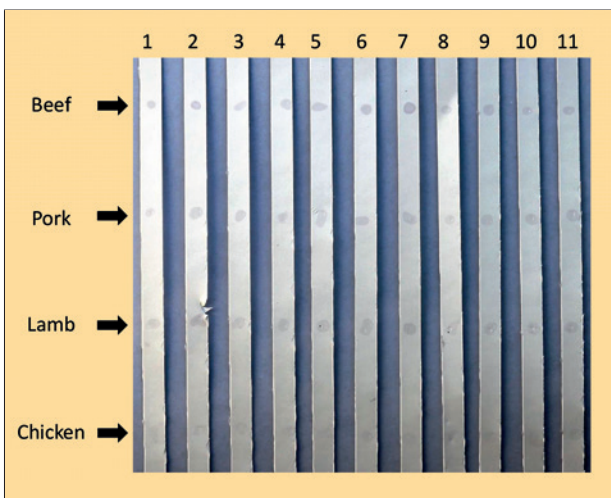


Figura 2. Imunodots IgE específicos relativamente às carnes de vaca, porco, borrego e frango

imunodots para carne de vaca ($r = 0,702$; $p = 0,015$) e frango ($r = 0,878$; $p = 0,0003$) e entre os *imunodots* para vaca e borrego ($r = 0,800$; $p = 0,006$). Foram observadas diferentes tendências de associação em dupletos dos índices TID/*imunodots* para carne de bovino (3,2/3,73), suíno (3/3,27), borrego (1,8/2,91) e frango (1,8/1,3). Dado o objetivo diagnóstico subjacente em cães que apresentaram TID positivos para a carne de vaca, porco, borre-

go ou frango, foi recomendada a exclusão alimentar respectiva, com melhora clínica significativa, especialmente quando a carne bovina ou o frango estavam implicados.

DISCUSSÃO

Com base em parâmetros relacionados com alergia, como a reatividade cutânea e a sensibilização subjacente, pode considerar-se que a combinação de diferentes métodos de diagnóstico representará um valor acrescentado. Assim, poder-se-á igualmente considerar a possibilidade de combinação do estudo da IgE específica para alimentos por métodos *in vivo* (TID) e *in vitro* (*imunodot blot*) como uma ferramenta útil para um diagnóstico preditivo mais rápido de alergia alimentar. Esta via diagnóstica apresentará, ainda, a vantagem de permitir evitar o recurso a alimentos comerciais de proteínas extensamente hidrolisadas, cujo elevado custo e baixa palatabilidade estão frequentemente associados a má aderência ao processo. A deteção de IgE específicas para as diferentes carnes, recorrendo a antigénios preparados a partir das respetivas fontes em natureza, por oposição à deteção sobre substrato antigénico preparado a partir de alimentos compostos comerciais, tal como sucede com alguns métodos comerciais, apresenta a vantagem de avaliar a resposta à carne de cada espécie animal individualmente, independentemente de qualquer interferência relacionada com aditivos alimentares. Para este objetivo o recurso a métodos como o ELISA apresentará a desvantagem de ser mais elaborado e requerer mais equipamento. Também o Western Blot após separação eletroforética de proteínas, permitindo a identificação de alergénios moleculares, perde vantagem, na medida em que, possibilitando a identificação de alergénios moleculares, estará direcionado à investigação diagnóstica por componentes, à qual se associará uma imunoterapia igualmente resolvida por componentes, mais específica, mas que não se perspectiva nas situações de alergia alimentar^{5,19}.

No que respeita à carne de vaca, uma fonte importante de alérgenos alimentares para o cão⁹, a possível reação alérgica por sensibilização cruzada à galactose- α -1,3-galactose (α -Gal)²⁰, associada à picada de ixodídeos, deve igualmente ser investigada nos cães com aquela alergia, tal como vem sendo estudado para os humanos²¹. Com efeito, apesar da ampla gama de produtos inseticidas e acaricidas atualmente disponíveis no mercado veterinário, em termos práticos uma total exclusão da suscetibilidade à picada de ixodídeos não é possível, favorecendo a sensibilização primária através da picada, com a subsequente resposta alérgica cruzada após a ingestão de carne de vaca. Além disso, estudos por citometria de fluxo, de avaliação da ativação de basófilos⁵, da libertação de citocinas inflamatórias, como TNF- α com baixa expressão de TGF- β 1, mediada por células T²², ou a expressão de IL-33 monocítica^{23,24}, devem também ser conduzidos, visando a padronização destes métodos para o cão, o que será especialmente importante em termos diagnósticos, perante uma suspeita de alergia alimentar grave, mediada ou não por IgE²⁵.

CONCLUSÕES

Não obstante os resultados observados, inicialmente inesperados, de associação positiva entre os TID e a resposta clínica favorável após exclusão alimentar das carnes implicadas, mais investigação é necessária no que toca à alergia alimentar mediada por IgE, com uma população de estudo maior.

A investigação futura deverá aferir a utilidade real dos TID, em associação com o *imunodot* ou outros métodos, no diagnóstico de alergia alimentar, tendo em conta a inerente demora da prova diagnóstica clássica, constituída pela dieta de exclusão (raramente inferior a 2 meses)³.

O recurso a métodos de diagnóstico alergológico molecular poderá permitir esclarecer fenómenos inerentes a reatividade cruzada, e métodos de avaliação da imunidade celular poderão, adicionalmente, permitir identificar processos de alergia alimentar não mediados por IgE.

Contacto:

Luís Miguel Lourenço Martins
E-mail: lmlm@uevora.pt

REFERÊNCIAS

1. Hensel P, Santoro D, Favrot C, Hill P, Griffin C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res* 2015;11:196.
2. Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010;21:23-31.
3. Lloyd D. Diagnosis and management of adverse food reactions in the dog. *Proceedings of the World Congress WSAVA/ FECAVA/ /CSAVA*. Prague, Czech Republic. 2006;232-5.
4. Picco F, Zini E, Nett C, Naegeli C, Bigler B, Rufenacht S, et al. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Vet. Dermatol* 2008;19:150-5.
5. Martins L, Bento O, Inácio F. Veterinary allergy diagnosis: past, present and future perspectives. *Allergo J Int* 2016;25:20-32.
6. Osborn SC. Food allergy dermatitis. *Proceedings of the North American Veterinary Conference*. Orlando, USA. 2006;20:365-6.
7. Loewenstein C, Mueller RS. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Vet Dermatol* 2009;20:84-98.
8. Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Vet Res* 2015;11:210.
9. Mueller RS, Olivry T, Prélud P. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (2): common food allergen sources in dogs and cats. *BMC Vet Res* 2016;12:9.
10. Mueller RS, Olivry T, Prélud P. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (1): duration of elimination diets. *BMC Vet Res* 2015;11:225.
11. Mueller RS, Olivry T. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (4): can we diagnose adverse food reactions in dogs and cats with in vivo or in vitro tests? *BMC Vet Res* 2017;13:275.
12. Favrot C, Linek M, Fontaine J, Beco L, Rostaher A, Fischer N, et al. Western blot analysis of sera from dogs with suspected food allergy. *Vet Dermatol* 2017;28:189-e42.
13. Puigdemont A, Brazis P, Serra M, Fondati A. Immunologic responses against hydrolyzed soy protein in dogs with experimentally induced soy hypersensitivity. *Am J Vet Res* 2006;67:484-8.
14. Kunkle G, Horner S. Validity of skin testing for diagnosis of food allergy in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:677-80.

15. Ishida R, Masuda K, Kurata K, Ohno K, Tsujimoto H. Lymphocyte blastogenic responses to inciting food allergens in dogs with food hypersensitivity. *J Vet Int Med* 2004;18:25-30.
16. Olivry T. International Task Force of Canine Atopic Dermatitis. New diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2010;21:123-6.
17. Lee KW, Blankenship KD, McCurry ZM. Performance characteristics of a monoclonal antibody cocktail-based ELISA for detection of allergen-specific IgE in dogs and comparison with a high affinity IgE receptor-based ELISA. *Vet Dermatol* 2009;20:157-64.
18. Muller H, Schweizer B. Biochemical applications for UV/Vis spectroscopy. Norwalk, USA: Perkin-Elmer Corporation, 1993.
19. Saridomichelakis MN, Olivry T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet J* 2016;207:29-37.
20. Nunen S. Tick-induced allergies: mammalian meat allergy, tick anaphylaxis and their significance. *Asia Pac Allergy* 2015;5:3-16.
21. Fischer J, Lupberger E, Hebsaker J, Blumenstock G, Aichinger E, Yazdi AS, et al. Prevalence of type I sensitization to alpha-gal in forest service employees and hunters. *Allergy* 2017;72:1540-7.
22. Tan JA, Smith WB. None IgE-mediated gastrointestinal food hypersensitivity syndrome in adults. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014;2:355-7.
23. Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I, Roth-Walter F. Outstanding animal studies in allergy I. From asthma to food allergy and anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2017;17:169-79.
24. Lott JM, Sumpster TL, Turnquist HR. New dog and new tricks: evolving roles for IL-33 in type 2 immunity. *J Leukoc Biol* 2015; 297:1037-48.
25. Suto A, Suto Y, Onohara N, Tomizawa Y, Yamamoto-Sugawara Y, Okayama T, et al. Food allergens inducing a lymphocyte-mediated immunological reaction in canine atopic-like dermatitis. *J Vet Med Sci* 2015;77:251-4.