



Teste de contato atópico com aeroalérgenos: uma ferramenta promissora no diagnóstico da dermatite atópica

Atopy patch test with aeroallergens: a promising tool in the diagnosis of atopic dermatitis

Sérgio Duarte Dortas Junior, MD, MSc^{1,2}, Soloni Afra Pires Levy, MD¹, Andrea Huguenim Silva Pires, MD, MSc¹, Augusto Tiaqui Abe, MD¹, Solange Oliveira Rodrigues Valle, MD, PhD^{1,3}, Vilma Perez Coelho, MD¹, Ludwig Ruppert Hahnstadt, MSc⁴, Alfeu Tavares França, MD, PhD^{1,3}

RESUMO

Objetivos: Avaliar a padronização do método com relação à concentração do aeroalérgeno, tempo de oclusão, de interpretação; e determinar a especificidade e a sensibilidade do teste de contato alérgico (TCA) em relação ao teste por punção e a dosagem de IgE específica, na verificação da sensibilização a ácaros em crianças com dermatite atópica (DA). **Métodos:** Foram selecionadas 72 crianças com idade entre 2 e 12 anos, acompanhadas no ambulatório de alergia do Hospital São Zacharias. Estas foram submetidas a teste de punção, dosagem de IgEs específicas e TCA para ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*). Os testes foram realizados em 3 grupos: (1) DA com ou sem rinite e asma, (2) Rinite e/ou asma sem DA, (3) Saudáveis (controle). **Resultados:** No grupo 1, 40% dos pacientes apresentaram reação positiva. A sensibilidade foi maior nos pacientes com maior tempo de exposição (48 h e 72 h). No grupo 2, o TCA foi mais específico que sensível para todos os extratos, com aumento da sensibilidade quanto maior o tempo de exposição (72 h). No grupo 3, apenas 8,3% apresentaram positividade a algum aeroalérgeno do TCA. **Conclusão:** O TCA mostrou ter valor diagnóstico em relação às reações de fase tardia a ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*), com elevada especificidade. Ele demonstrou ser um teste confiável quando comparado aos resultados do grupo controle.

Descritores: Dermatite atópica, teste de contato atópico, ácaros.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the standardization of the atopy patch test (APT) with regard to concentration of aeroallergens, occlusion time, and interpretation, and to determine the specificity and sensitivity of the method in relation to prick test and serum specific IgE determination in the investigation of dust mite sensitization in children with atopic dermatitis (AD). **Methods:** Seventy-two children, ranging from 2 to 12 years of age, were selected among those receiving care at the allergy outpatient clinic of São Zacharias Hospital. Children underwent skin prick testing, specific IgE measurements, and APT for mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, and *Blomia tropicalis*). Tests were performed in three groups: (1) AD with or without rhinitis and asthma; (2) rhinitis and/or asthma without AD; (3) healthy individuals (controls). **Results:** In group 1, 40% of the patients presented positive reactions. Sensitivity was higher in patients with longer exposure times (48 h and 72 h). In group 2, APT was more specific than sensitive for all extracts, with increasing sensitivity associated with longer times of exposure (72 h). In group 3, only 8.3% of the individuals were positive to any aeroallergen on APT. **Conclusion:** APT seems to have diagnostic value in identifying late phase reactions to mites (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*, and *B. tropicalis*), with high specificity, and proved to be a reliable test when compared with the results obtained for controls.

Keywords: Atopic dermatitis, atopy patch test, mites.

¹ Serviço de Alergia, Hospital São Zacharias, Rio de Janeiro, RJ.

² Hospital Geral de Nova Iguaçu, Nova Iguaçu, RJ.

³ Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ.

⁴ FDA Allergenic.

Correspondência para:
Sérgio Duarte Dortas Junior
sdortasjr@gmail.com

Conflitos de interesse:
Ludwig Ruppert Hahnstadt é presidente e CEO da FDA Allergenic Group, Representante para América Latina da ALK-Abelló. Nenhum dos outros autores declararam conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Submetido em 15.02.2012,
aceito em 23.09.2012.

INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA), é uma condição inflamatória e pruriginosa de curso crônico, recidivante, multifatorial, e acomete 10-20% das crianças e 1-3% adultos¹.

Alimentos e ácaros estão envolvidos na etiopatogenia da síndrome. Níveis elevados de anticorpos IgE para aeroalérgenos são importantes fatores de risco, embora nem sempre seja possível detectar uma relação causal. Os alérgenos mais frequentemente envolvidos são os ácaros e outros como insetos incluindo barata, saliva e epitélio de animais (cães e gatos). Entre os ácaros, os mais importantes são o *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* e a *Blomia tropicalis*.

Diversos mecanismos estão envolvidos na fisiopatogenia da DA. As reações mediadas por IgE (imediatas) são bem caracterizadas. Por outro lado, as reações imunológicas do tipo tardio são pouco compreendidas. Um teste cutâneo de puntura (TCP) positivo parece refletir uma reação imediata ao antígeno testado, assim como a dosagem de IgE específica sérica e o teste de provocação. O teste de contato alérgico (TCA) parece ter relevância na investigação alergológica de pacientes com suspeita de reação tardia, com ou sem participação de IgE¹.

As primeiras descrições do TCA datam de 1982², como uma reação cutânea induzida em pele íntegra a aeroalérgenos^{1,2}.

Os objetivos deste estudo foram determinar a especificidade e a sensibilidade do TCA em verificar a sensibilização a ácaros em crianças com DA, e avaliar a padronização do método com relação à concentração do alérgeno ao tempo de oclusão e ao tempo de leitura.

MÉTODOS

De abril/2007 a março/2010, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram avaliadas 72 crianças (34 meninas, 38 meninos), com idades entre 2 e 12 anos (média 6,6 anos). Destas, 32 apresentavam DA definida pelos critérios de Hanifin & Rajka³ (grupo 1); vinte e seis pacientes apresentavam diagnóstico clínico de Rinite Alérgica e/ou Asma segundo critérios das IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma⁴ sem DA (grupo 2); e 14 eram crianças não atópicas, que constituíram o grupo controle (grupo 3).

Medida da IgE específica

Foram coletadas amostras de sangue dos pacientes para a dosagem de anticorpos IgE específicos para ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*) por ImmunoCAP (Phadia). O limite de detecção foi de 0,35 kU/l, e as crianças foram

consideradas sensibilizadas quando a IgE específica encontrava-se acima do limite de detecção⁵.

Teste cutâneo de puntura (TCP)

Os antígenos utilizados para TCP foram os ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*), na concentração de 1:10, (FDA Allergenic, Rio de Janeiro, Brasil), tendo a histamina (10 mg/ml) como controle positivo e a solução salina como controle negativo. Foi realizada antisepsia com álcool a 70%, na pele sã da região volar do antebraço. As aplicações dos antígenos foram feitas com intervalo de 2 cm, e foi utilizado puntor (ALKO, Rio de Janeiro, Brasil). A leitura foi realizada após 20 minutos. O teste foi considerado positivo quando a pápula apresentava diâmetro superior a 3 mm que o controle negativo. Todos os pacientes foram orientados a não utilizar anti-histamínico oral e/ou aplicar corticosteroide tópico por pelo menos uma semana antes do teste^{5,6}.

Teste de contato alérgico (TCA)

O TCA foi realizado com alérgenos de ácaros (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis*) na concentração de 1:10 (FDA Allergenic, Rio de Janeiro, Brasil), como sugerido por Darsow et al.⁷, com o veículo vaselina como controle negativo, usando câmaras de alumínio de 8 mm de diâmetro (Finn Chamber on Scanpor®, Epitest Ltd Oy, Tuusula, Finlândia). Os testes foram realizados em duplicata, e aplicados em pele saudável do dorso. O primeiro adesivo (TCA I) foi retirado após 24 horas, e o segundo (TCA II) após 48 horas. Foram realizadas leituras do TCA I após 24, 48 e 72h; e TCA II após 48 e 72h. A reação foi quantificada segundo os critérios da Revised European Task Force on Atopic Dermatitis (ETFAD) para leitura de TCA^{8,9}.

Análise estatística

Analisamos a correlação entre IgE específica, TCP e TCA em cada grupo estudado, entre os grupos de atópicos (grupos 1 e 2) e em relação ao grupo controle (grupo 3). Estudamos a sensibilidade e especificidade do TCA quando comparado à dosagem de IgE específica e ao TCP, considerando significativo um valor de $p < 0,05$. A sensibilidade mede a proporção de TCP e anticorpos IgE específicos positivos que foi corretamente identificada por um TCA positivo. A especificidade mede a proporção de TCP e anticorpos IgE específicos negativos que foi corretamente identificada por um TCA negativo. Para a análise estatística foi utilizado o software estatístico SPSS versão 13. A concordância ou não entre os resultados em relação ao TCA I e ao TCA II foi baseada no coeficiente Kappa.

RESULTADOS

Houve elevada percentagem de positividade ao TCA com ácaros, principalmente com *D. pteronyssinus* (56% no grupo 1, e 34,6% no grupo 2). No grupo 1, 56% (18/32) dos pacientes apresentaram reação após 48 horas a *D. pteronyssinus*; 15,5% (5/32) a *D. farinae*; 31,25% (10/32) a *B. tropicalis*; sendo as reações a *D. pteronyssinus* mais intensas.

No grupo 2, composto por indivíduos atópicos (com rinite e/ou asma) sem DA, 34,6% (9/26) apresentaram TCA positivo a *D. pteronyssinus*; 23% (6/26) a *D. farinae*; 30% (8/26) a *B. tropicalis*.

No grupo controle (grupo 3), um paciente apresentou positividade a *D. pteronyssinus* após 72 horas e outro paciente a *B. tropicalis*, o que corresponde a 7% de positividade.

Nesta amostra não foram evidenciadas reações imediatas (urticária) ao TCA, e nem piora da reação tardia caracterizada por exacerbação do eczema em nenhum paciente.

No grupo 1 (DA), um paciente apresentou reação irritativa com 24 horas para *D. farinae*, a qual não se manteve nas demais leituras. Apenas dois pacientes apresentaram reação após 24 horas para *D. pteronyssinus*, que se mantiveram nas demais leituras. Outros pacientes só apresentaram reatividade nas leituras de 48 ou

72 horas. No grupo 3 apenas um indivíduo controle manifestou reação irritativa.

Quando comparado à dosagem de IgE sérica específica e ao teste de puntura, o TCA se mostrou um teste altamente específico, porém de baixa sensibilidade. A sensibilidade ao teste aumentou nos testes de maior exposição e em leituras mais tardias (72 horas). Além disso, quanto maior o tempo de exposição, maior a especificidade (Tabelas 1, 2 e 3). O p valor foi < 0,05, notando-se maior concordância com 48 h e melhor com 72 h.

O índice kappa com 72 h mostrou concordância bilateral, sendo com 48 h mais significativo. No grupo controle, o kappa foi negativo.

DISCUSSÃO

A dermatite atópica é uma das doenças crônicas mais comuns da infância¹⁰, de fácil diagnóstico sindrômico, porém de difícil diagnóstico etiológico. Para muitos, a DA é um estado de hipersensibilidade cutânea, capaz de responder a uma variedade de antígenos internos e do meio ambiente. A associação de DA, asma, rinite alérgica com evidência familiar é bem aceita, mas o comprometimento de reação tardia pelo contato com aeroalérgenos ainda é controverso¹¹.

Tabela 1 - Sensibilidade e especificidade do Teste de Contato Atópico (TCA) em pacientes com dermatite atópica

Sensibilidade e especificidade do TCA quando comparado à IgE específica						
Tempo de leitura	IgE <i>D. pteronyssinus</i>		IgE <i>D. farinae</i>		IgE <i>B. tropicalis</i>	
	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)
Esq 24h	10,0	100	5,0	100	0,0	100
Esq 48h	0,0	100	0,0	100	5,9	91,7
Dir 48h	35,0	88,9	0,0	100	5,9	83,3
Esq 72h	45,0	88,9	5,0	100	11,8	91,7
Dir 72h	50,0	44,4	10,0	66,7	29,4	58,3

Sensibilidade e especificidade do TCA quando comparado ao TCP						
Tempo de leitura	TCP <i>D. pteronyssinus</i>		TCP <i>D. farinae</i>		TCP <i>B. tropicalis</i>	
	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)
Esq 24h	5,9	92,3	5,6	100,0	0,0	100
Esq 48h	29,4	84,6	0,0	100,0	7,7	94,1
Dir 48h	47,1	92,3	0,0	100,0	0,0	82,4
Esq 72h	47,1	84,6	5,6	100,0	15,4	94,1
Dir 72h	58,8	61,5	16,7	83,3	30,8	64,7

S = sensibilidade, E = especificidade, TCP = teste cutâneo de puntura.

Tabela 2 - Sensibilidade e especificidade do Teste de Contato Atópico (TCA) em pacientes com rinite e ou asma

Sensibilidade e especificidade do TCA quando comparado à IgE específica						
Tempo de leitura	IgE <i>D. pteronyssinus</i>		IgE <i>D. farinae</i>		IgE <i>B. tropicalis</i>	
	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)
Esq 24h	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Esq 48h	13,3	100,0	0,0	100,0	0,0	93,3
Dir 48h	20,0	81,8	6,3	90,0	0,0	100,0
Esq 72h	40,0	72,7	12,5	100,0	9,1	73,0
Dir 72h	54,5	25,0	0,0	80,0	27,3	66,7

Sensibilidade e especificidade do TCA quando comparado ao TCP						
Tempo de leitura	TCP <i>D. pteronyssinus</i>		TCP <i>D. farinae</i>		TCP <i>B. tropicalis</i>	
	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)
Esq 24h	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Esq 48h	11,8	100,0	0,0	100,0	0,0	94,7
Dir 48h	29,4	100,0	8,3	92,9	0,0	100,0
Esq 72h	41,2	77,8	8,3	92,9	14,3	79,0
Dir 72h	58,8	77,8	41,7	92,9	14,3	63,2

S = sensibilidade, E = especificidade, TCP = teste cutâneo de puntura.

Tabela 3 - Sensibilidade e especificidade do Teste de Contato Atópico (TCA) em indivíduos controle

Sensibilidade e especificidade do TCA quando comparado à IgE específica						
Tempo de leitura	IgE <i>D. pteronyssinus</i>		IgE <i>D. farinae</i>		IgE <i>B. tropicalis</i>	
	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)
Esq 24h	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Esq 48h	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Dir 48h	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Esq 72h	16,7	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Dir 72h	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0

Sensibilidade e especificidade do TCA quando comparado ao TCP						
Tempo de leitura	TCP <i>D. pteronyssinus</i>		TCP <i>D. farinae</i>		TCP <i>B. tropicalis</i>	
	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)
Esq 24h	0,0	91,7	0,0	100,0	0,0	100,0
Esq 48h	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Dir 48h	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
Esq 72h	0,0	91,7	0,0	100,0	0,0	100,0
Dir 72h	0,0	100,00	0,0	100,0	0,0	88,9

S = sensibilidade, E = especificidade, TCP = teste cutâneo de puntura.

Tem sido verificado que os aeroalérgenos têm importância na etiologia da doença em alguns pacientes, embora nem sempre seja possível detectar uma relação causal através da anamnese^{6,10,11}. O TCA é um teste diagnóstico importante para definir o processo tardio e de gravidade cutânea em quadros de difícil controle, podendo orientar melhor a terapêutica⁶.

Os estudos de testes de contato com aeroalérgenos foram iniciados por Mitchell et al. em 1982², e têm variado quanto aos métodos utilizados¹². As vias de sensibilização aos aeroalérgenos são a inalatória e a cutânea¹¹. Mudde et al. observaram que células de Langerhans expressando IgE são mais eficientes em capturar e apresentar alérgenos às células T alérgeno específicas¹²; e Stingl & Maurer¹³ demonstraram, *in vitro*, que anticorpo IgE ligados a FcεRI em células dendríticas aumentam a capacidade de apresentação de antígenos às células T antígeno específica em 100-1.000 vezes. Isto explica que a IgE específica é uma via de aumento para resposta ao TCA. Após penetrar a pele, o antígeno se liga a receptor FcεRI das células de Langerhans, dando início à cascata de eventos imunológicos. Nas primeiras 48 h ativa células T alérgeno-específicas, principalmente da subclasse TH2, levando ao aumento de IL4, IL5, e reduz Interferon^{6,10,11}. Isto resulta em um infiltrado de células inflamatórias, com participação de eosinófilos e produção de eotaxina por fibroblastos cutâneos¹⁴. Após 48 h a resposta muda para Th1 e o quadro histopatológico é semelhante à biópsia cutânea da pele eczematizada da DA¹⁵. A presença de células de Langerhans IgE positivas é um pré-requisito para um resultado positivo no TCA¹¹. A similaridade macro e microscópica entre os sítios da TCA e da DA indicam que o TCA é um modelo válido de estudo da inflamação alérgica da DA¹⁰. Diferentemente do teste de contato convencional, o TCA parece ter um pico de reação com 48 horas, e após este período, a reação tende a diminuir¹⁰. A reação parece ser específica para pacientes com DA sensibilizados, e não ocorre em indivíduos saudáveis¹¹.

Na literatura há pouca informação a respeito de uma concentração ótima para TCA com inalantes. Niggemann e cols.¹⁰ sugerem a realização do TCA com extrato *in natura* e na concentração de 1:10 a fim de excluir resultados falso-positivos por irritação local. Eles utilizaram Finn Chambers com câmaras de 12 mm a fim de reduzir os resultados falso-negativos¹⁰. No nosso estudo, todos os testes foram realizados na concentração 1:10, a mesma utilizada nos testes de puntura, e utilizamos vaselina pura (diluyente) como controle negativo. Não houve nenhum caso de reação irritativa no grupo controle (falso-positivo). As câmaras utilizadas foram as de 8 mm, as quais também já foram utilizadas em outros estudos^{7,16}. Utilizamos as referidas câmaras, porque na época da realização do estudo, as câmaras de 12 mm não estavam disponíveis no Brasil.

O TCA parece não ser específico para DA. Verificamos positividade do TCA em pacientes com outras enfermidades atópicas (rinite e/ou asma) (grupo 2), levando a especular, como relatado em outros trabalhos, que alto nível de IgE no soro não necessariamente leva à TCA positivo, e vice-versa¹⁷. Alguns pacientes não tiveram teste positivo e a perda de reprodutibilidade tem sido relatada¹⁸, e existe uma possível correlação entre a concentração e o escore de resultado do teste.

Em nosso trabalho, o TCA, quando comparado à dosagem de IgE sérica específica e ao teste de puntura, se mostrou um teste altamente específico, porém de baixa sensibilidade. A sensibilidade aumentou nos testes de maior exposição e em leituras mais tardias (72 horas). Além disso, quanto maior o tempo de exposição, maior a especificidade.

CONCLUSÕES

O TCA mostrou ter valor diagnóstico em relação às reações de fase tardia a ácaros (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*), apresentando elevada especificidade e moderada sensibilidade, especialmente quando a oclusão permaneceu por 48 horas.

A prevalência de positividade foi maior para *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* entre os pacientes atópicos, principalmente entre aqueles com dermatite atópica. A melhor resposta foi ao *D. pteronyssinus*.

Este teste parece ser uma ferramenta promissora para elucidar a etiologia a ácaros em manifestações tardias de asma e dermatite atópica, uma vez que é difícil se identificar através da anamnese. Entretanto, mais estudos necessitam ser realizados para avaliar a padronização de concentração de reagentes, método de aplicação e interpretação, para seu uso rotineiro na prática clínica.

AGRADECIMENTOS

- Phadia divisions Thermo Fisher Scientific.
- Alko do Brasil.
- Rosangela Prendin Tortora (Biomédica SME-Imunologia HUCFF/UFRJ).

REFERÊNCIAS

1. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). Atopic Eczema in Children: Management of atopic eczema in children from birth up to the age of 12 years [Internet]. London: RCOG Press; 2007 Dec. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49365/>
2. Mitchell EB, Crow J, Chapman MD, Jouhal SS, Pope FM, Platts-Mills TA. Basophils in allergen-induced patch test sites in atopic dermatitis. *Lancet*. 1982;1:127-30.

3. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Dermatovener.* 1980;(Suppl 92):44-7.
4. Sociedade Brasileira de Alergia e Imunopatologia, Sociedade Brasileira de Pediatria, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol.* 2006;32(Suppl 7):S447-74.
5. Solé D & Daher S. *IgE: da Síntese à prática clínica.* São Paulo: Ed. Rosconi; 2008.
6. Holm L, Matuseviciene G, Scheynius A, Tengvall LM. Atopy patch test with house dust mite allergen an IgE-mediated reaction? *Allergy.* 2004;59:874-82.
7. Darsow U, Vieluf D, Ring J. Atopy patch test with different vehicles and allergen concentrations: An approach to standardization. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;95:677-84.
8. Chung BY, Kim HO, Park CW, Lee CH. Diagnostic Usefulness of the Serum-Specific IgE, the Skin Prick Test and the Atopy Patch Test Compared with That of the Oral food Challenge Test. *Ann Dermatol.* 2010;22:404-11.
9. Sporik R, Hill DJ, Hosking CS. Specificity of allergen skin testing in predicting positive open food challenges to milk, eggs, and peanut in children. *Clin Exp Allergy.* 2000;30:1540-6.
10. Niggemann B, Reibel S, Wahn U. The atopy patch test (APT) - a useful tool for the diagnosis of food allergy in children with atopic dermatitis. *Allergy.* 2000;55:281-5.
11. Langeveld-Wildschut EG, van Marion AM, Thepen T, Mudde GC, Bruinzeel PL, Bruinzeel-Koomen CA. Evaluation of variables influencing the outcome of the atopy patch test. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;96:66-73.
12. Mudde GC, Van Reisen FC, Boland GJ, De Gast GC, Bruunzeel PLB, Bruunzeel-Koomen CAFM. Allergen presentation by epidermal Langerhans cells from patients with atopic dermatitis is mediated by IgE. *Immunology.* 1990;69:335-41.
13. Stingl G, Maurer D. IgE-mediated allergen presentation via Fc epsilon RI on antigen-presenting cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;113:24-9.
14. Bruunzeel PLB, Kuiper PHM, Kapp A, Warringa RAJ, Betz S, Bruunzeel-Koomen CAFM. The involvement of eosinophil in the patch test reaction to aeroallergens in atopic dermatitis: its relevance for the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy.* 1993;23:97-109.
15. Thepen T, Langeveld-Wildschut EG, Bihari IC, van Wichen DF, van Reijssen FC, Mudde GC. Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from initial Th2 response to a Th1 response in situ: an immunocytochemical study. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97:828-37.
16. Niggemann B, Ziegert M, Reibel S. Importance of chamber size for the outcome of atopy patch test in children with atopic dermatitis and food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:515-6.
17. Johansson C, Sandström MH, Bartosik J, Sarnhult T, Christiansen J, Zargari A, et al. Atopy patch test reactions to *Mallassezia* allergens differentiate subgroups of atopic dermatitis patients. *Br J Dermatol.* 2003;148:479-88.
18. Heinemann C, Schliemann-Willers S, Kelterer D, Metzner U, Kluge K, Wigger-Alberti W, et al. The atopy patch test-reproducibility and comparison of different evaluation methods. *Allergy.* 2002;57:641-5.