



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Allergenspecifik immunterapi som behandling av atopisk dermatit hos hund

Emma May Genfeldt

*Uppsala
2017*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien 2017:58

Allergenspecifik immunterapi som behandling av atopisk dermatit hos hund

Allergen-specific immunotherapy as a treatment in canine atopic dermatitis

Emma May Genfeldt

Handledare: Magnus Åbrink och Caroline Fossum, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0700

Program: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2017:58

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Allergenspecifik immunterapi, ASIT, atopisk dermatit, hund

Key words: Allergen-specific immunotherapy, ASIT, CAD, canine atopic dermatitis, dog

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder.....	3
Litteraturoversikt.....	4
Atopisk dermatit hos hund	4
Patogenes.....	4
Diagnos.....	5
Behandling	5
Allergenspecifik immunterapi (ASIT)	5
Indikationer	5
Administrering och olika typer av ASIT	6
Effektivitet.....	6
Faktorer som påverkar hur framgångsrik behandlingen är	7
Biverkningar.....	7
Immunologiska förändringar efter ASIT-behandling	8
Diskussion	11
Referenslista	14

SAMMANFATTNING

Atopisk dermatit eller canine atopic dermatitis (CAD) är en vanlig inflammatorisk, kliande hudsjukdom hos hund kopplad till en överkänslighetsreaktion av typ 1, vilket innebär ett överdrivet Th2-svar med produktion av IgE-antikroppar. En behandlingsmetod för CAD som anses både säker och effektiv är allergenspecifik immunterapi (ASIT). Detta innebär att djuret injiceras med gradvis ökande mängder av det orsakande allergenet tills en underhållsdos uppnåtts. I denna rapport presenteras ASIT som metod, dess effektivitet och vilka immunologiska mekanismer som kan tänkas ligga bakom eventuella förbättringar vid behandling.

ASIT har potential att förbättra de kliniska symptomen och det finns även studier som visat att det hos människa förebygger sensibilisering mot nya allergen och alltså eventuellt har en förmåga att påverka patogenesen vid CAD. Hos hundar är det vetenskapliga underlaget för ASITs effektivitet inte så brett som den förhållandevis utbredda användningen av behandlingen kanske indikerar. Det finns många studier som visat goda resultat, men av dessa är enbart en studie placebokontrollerad. ASIT kan administreras på olika sätt, med olika doser och injektionsintervall. Den vanligaste administrationsvägen i dagsläget är subkutana injektioner. Vilket administrationssätt och doseringsprotokoll som är bäst är fortfarande oklart. Det är även kontroversiellt om effektiviteten påverkas av andra faktorer som kön, ålder vid insjuknande, duration av sjukdomen innan behandling satts in, ras, antal allergen eller typ av allergen hunden är känslig för.

På en immunologisk nivå har studier på humansidan visat att ASIT minskar basofil- och mastcellsaktiviteten. Det har även visats att ASIT vrider om Th2-profilen i immunsvaret mot en profil mer karaktäriserad av Th1-cytokiner. Efter en lång tids ASIT-behandling ses IgE minska. IgG, speciellt IgG4 och IgG1 ökar istället. IgG4 verkar ha en viktig roll då den tros tävla med IgE om bindning till allergener och därmed leda till en kompetitiv blockering. Detta leder till en minskad degranulering av mastceller och basofiler. Även regulatoriska T-celler (Treg), som har en nedreglerande funktion på immunsystemet, påverkas vid ASIT. De ses öka efter behandling och korrelationer mellan klinisk förbättring och ökade nivåer Treg har setts. Treg tycks dock ha en komplicerad roll i både patogenesen bakom CAD och effektiviteten bakom ASIT. Studier har visat ökade nivåer Treg hos atopiker. Vissa indikationer finns på att Treg hos allergiska individer har en nedsatt funktion. Dessutom har försök visat att Tregar under specifika förhållanden delvis kan anta en Th2-cellsfunktion.

ASIT är en behandlingsform under konstant utveckling. Nya adjuvans, olika modifieringar av allergener och olika sätt att administrera behandlingen är bara några exempel på saker som testas för närvarande.

Det finns även andra mycket effektiva behandlingsmetoder för CAD, exempelvis ciclosporin eller anti-IL-31-antikroppar. Dessa skulle i framtiden kunna göra ASIT överflödigt. ASIT är dock i dagsläget den enda metod som skulle kunna ha potential att påverka patogenesen vid CAD, eller åtminstone ge upphov till en långvarig förbättring, vilket gör det troligt att ASIT även i framtiden kommer ha en viktig roll inom allergibehandlingen.

SUMMARY

Canine atopic dermatitis (CAD) is a common inflammatory, pruritic skin-disease in dogs. It is caused by a type 1 hypersensitivity reaction, characterized by a Th2 response and the production of IgE antibodies. One of the therapeutic options for treating this disease, considered both effective and safe, is allergen-specific immunotherapy (ASIT). ASIT involves injecting the patient with the causing allergen in gradually increasing doses until a maintenance dose is achieved. In this report ASIT as a method for treating CAD is presented as well as what is known about the efficacy and the possible immunological mechanisms responsible for the improvement after treatment.

ASIT has the potential to ameliorate the symptoms of CAD and there are studies in humans suggesting that ASIT can prevent sensitization to new allergens and thus may be able to partly reverse the pathogenesis behind CAD. The scientific basis for the use of ASIT in dogs consists mostly of small, uncontrolled studies and only one blinded, placebo-controlled study. Despite of this the use of ASIT in dogs is relatively common.

ASIT can be administered in different ways, with different doses and by different dosage regimens. The most common way to administer ASIT today is via subcutaneous injections. Which of the methods for administration, dosing and what dosage regimen is preferable is not known. If the dogs age, gender, breed, duration of disease or if the type or number of allergen(s) affects the efficacy of ASIT is still to be determined.

In humans ASIT is shown to decrease the activity of basophiles and mast-cells. ASIT also shifts the Th2-profile towards a profile characterized by Th1-cytokines. After some time of treatment the levels of IgE have been shown to decrease. ASIT also cause the levels of IgG, especially IgG1 and IgG4, to increase. IgG4 is believed to compete with IgE for the binding of allergens, which decreases mediator release from mast-cells and basophiles. Tregs, responsible for down-regulating the immuneresponses, have also been seen to increase after ASIT. Correlations between a good response to the treatment and an increased number of Tregs have been seen. On the other hand Tregs seem to have a complicated role in both the pathogenesis behind CAD and the efficacy behind ASIT. Studies have shown increased levels of Tregs in atopic humans and dogs. Some studies indicate a compromised function of the Tregs in atopic patients. There are also indications that Tregs can adopt a Th2-like role in certain circumstances.

New methods for ASIT are constantly evolving. New adjuvants, modifications of the allergens and different administration-routes are a few examples of new things being tested at the moment.

There are other highly efficient methods in allergy treatment, for example ciclosporin or anti-IL-31-antibodies which one day might render ASIT redundant. However, ASIT is the only known treatment with potential to alter the course of the disease, or at least achieve long-term

improvement, which makes it likely that ASIT will still be a part of successful allergy treatment in the future.

INLEDNING

Atopisk dermatit hos hund, eller canine atopic dermatitis är en av de vanligaste hudsjukdomarna hos hund (Hillier & Griffin, 2001). Det är en inflammatorisk, kliande hudsjukdom kopplad till en överkänslighetsreaktion av typ 1 med ett överdrivet Th2-svar och produktion av IgE-antikroppar (Halliwell, 2006). En behandlingsmetod för denna sjukdom är allergenspecifik immunterapi, vilket innebär att hunden injiceras med gradvist ökande mängder av det orsakande allergenet tills en underhållsdos uppnåtts. Både behandlade hundar och människor har uppgetts bli hjälpta av denna metod och det finns uppgifter om att metoden inte bara kan förbättra symptomen, utan även modifiera sjukdomens utveckling och förebygga sensibilisering mot nya allergen (Pajno *et al.*, 2001; DeBoer, 2017). Fokus för detta arbete ligger på att undersöka det vetenskapliga underlaget för allergenspecifik immunterapi på hund. Fungerar det, hur går det till och vilka immunologiska mekanismer kan ligga till grund för en eventuell förbättring? En annan frågeställning som diskuteras är hur framtiden för allergenspecifik immunterapi skulle kunna se ut.

MATERIAL OCH METODER

Mellan 7:e februari och 13:e mars har sökningar gjorts i databaserna PubMed och Web of Science. Följande sökord har använts i olika kombinationer: Canine, dog, CAD, canine atopic dermatitis, allergy, atopic dermatitis, AIT, ASIT, SIT, allergen-specific immunotherapy, hyposensitization, Treg. Flera artiklars och reviewartiklars referenslistor har använts för att hitta ytterligare källor. Vissa artiklar har hämtats i fysisk form på SLU-biblioteket.

LITTERATURÖVERSIKT

Atopisk dermatit hos hund

Atopisk dermatit är en av de vanligaste hudsjukdomarna hos hund med en prevalens på 3-15% (Hillier & Griffin, 2001). Sjukdomen Canine Atopic Dermatitis (CAD) har definierats som: "A genetically predisposed inflammatory and pruritic allergic skin disease with characteristic clinical features associated with IgE antibodies most commonly directed against environmental allergens" (Halliwell, 2006). Allergener som anses kunna vara viktiga för utvecklingen av CAD hos hund har påvisats hos husdammskvalster (*Dermatophagoides farinae* och *D. pteronissynus*), förråds kvalster (*Tyrophagus putrescentiae*, *Lepidoglyphus destructor* och *Acarus siro*) och hos olika typer av pollen, loppor och mögel (Mueller *et al.*, 2016).

Patogenes

Patogenesen bakom CAD är komplex och inte helt förstådd men involverar troligen en överkänslighetsreaktion av typ 1, vilket leder till ett överdrivet Th2-svar och produktion av IgE-antikroppar. Kliniskt finns stora likheter mellan CAD och atopisk dermatit hos människa och mycket tyder på att de immunologiska mekanismerna är jämförbara (Jensen-Jarolim *et al.*, 2015; Pucheu-Haston, 2016). Sjukdomen har en tydlig koppling till ras och mycket tyder på att det finns en genetisk faktor bakom utvecklingen av CAD. Flera gener uttrycks på ett annat sätt hos atopiker än hos friska individer, men dessa skillnader ser olika ut hos olika raser och på olika platser i världen. De genetiska faktorerna är komplexa och ännu inte fullt förstådda men de förklarar inte allt, utan även miljömässiga omständigheter tros spela en roll för utvecklingen av CAD (Nuttall *et al.*, 2013).

En hypotes är att det finns abnormaliteter i hudbarriärfunktionen hos atopiker, vilket leder till en ökad epidermal penetration av allergen. Allergenerna fångas upp av Lagerhanska celler i huden som migrerar till de regionala lymfknutorna och presenterar dessa allergen i form av peptidpitoper bundna till MHC klass II molekyler för naiva CD4+ T-lymfocyter. De naiva T-cellerna differentierar till TH2-celler som börjar producera IL-4, IL-5, IL-9 och IL-13. Dessa cytokiner har flera reglerande och effektor-funktioner, bland annat produktion av allergenspecifika IgE, samt utvecklingen och rekryteringen av eosinofiler. Allergenspecifika IgE-molekyler sensibiliserar mastceller och basofiler genom att binda till FcεRI-receptorn som uttrycks på ytan av dessa celler. När allergenerna presenteras på nytt går de genom epidermis och bildar ett komplex med IgE och FcεRI som då krossbinder. Detta leder till en degranulering av cellerna och histamin, proteaser, prostaglandiner, kemokiner och andra cytokiner frisätts. IgE binder även FcεRI på dendritiska celler och monocyter samt FcεRII (CD23) på B-celler vilket ökar upptaget av antigen av antigenpresenterade celler och därmed även presentationen av allergenpeptider till specifika CD4+ T-celler som driver den sena fasen i den allergiska reaktionen som bland annat involverar de *de novo* syntes av inflammatoriska mediatorer som leukotriener, prostaglandiner och andra cytokiner som rekryterar inflammatoriska celler till huden.

Diagnos

Diagnosen bygger på kliniska kriterier (se faktaruta), av vilka inget är patognomont, och förutsätter uteslutandet av sjukdomar med liknande klinisk bild som till exempel födoämnesallergier som inte kliniskt kan skiljas från CAD (Favrot *et al.*, 2010). IgE-serologi och intradermala tester kan vara användbart vid val av immunterapi när diagnosen väl fastställts (Griffin & Hillier, 2001), men bör ej användas som enda diagnostiska kriterie då även friska hundar kan få positiva resultat på dessa tester (Lian & Halliwell, 1998; Roque *et al.*, 2011).

1. Symptomen börjar innan 3 års ålder
2. Hunden lever mestadels inomhus
3. Klåda som svarar på behandling med kortikosteroider
4. Kroniska eller återkommande jästsvampsinfektioner
5. Frambenen är påverkade
6. Ytteröronen är påverkade
7. Öronlappskanterna är inte påverkade
8. Dorsolumbarområdet är inte påverkat

(Favrot *et al.*, 2010)

Behandling

För att hålla CAD under kontroll används flera olika strategier, exempelvis undvikande av allergen (så långt det är möjligt), behandling av sekundära infektioner, användning av essentiella fettsyror eller läkemedel som antihistaminer, glukokortikoider eller allergenspecifik immunterapi (Loewenstein & Mueller, 2009).

Allergenspecifik immunterapi (ASIT)

Allergenspecifik immunterapi innebär att hunden injiceras med gradvist ökande mängder av det allergen som hunden är allergisk mot för att förbättra de kliniska symptomen genom att vrida om det immunologiska svaret. ASIT är i dagsläget den enda behandlingsform som har potential att modifiera eller delvis reversera patogenesen bakom allergier, vilket både förbättrar de kliniska symptomen och förhindrar vidareutveckling av sjukdomen (DeBoer, 2017). På humansidan har ASIT setts kunna förebygga sensibilisering mot nya allergen (Pajno *et al.*, 2001).

Indikationer

ASIT är indikerat hos alla hundar som diagnosticerats med CAD där relevanta allergener identifierats via IgE-serologi eller intradermala tester, för allergen som är svåra att undvika och i de fall där symptomatisk behandling är ineffektiv eller har oacceptabla sidoeffekter (Griffin & Hillier, 2001). Allergenspecifik immunterapi är en individuell terapi då den kliniska responsen verkar vara allergenspecifik (Griffin & Hillier, 2001; Willemsen *et al.*, 2009). Därför är det viktigt att allergenen väljs baserat på hundens resultat från IgE-serologi eller intradermala tester. Nyligen har dock försök att behandla hundar med CAD med RESPIT (regionally-specific immunotherapy) utvärderats. RESPIT innebär att ASIT-mixturen sammansätts baserat på hundens geografiska läge och inte hundens individuella testresultat. I en retrospektiv studie fann författarna med denna metod fick 57% av hundarna ett bra eller

mycket bra resultat av behandlingen, en siffra som ligger i samma område som de siffror som presenterats för framgång inom traditionell ASIT (Plant & Neradilek, 2016). På humansidan har det visat sig att vad gäller gräspollenallergen är behandling med singel-allergen immunterapi lika effektivt för polysensiterade som monosensiterade patienter (Calderón *et al.*, 2012). Detta öppnar för möjligheten att i framtiden behandla patienter med ett enda dominant allergen.

Administrering och olika typer av ASIT

Administrering kan ske subkutant, intradermalt, oralt, sublinguallt eller intralymfatiskt. Den traditionella administrationsvägen hos hund är subkutana injektioner med ökande doser och tidsintervall. Det optimala doseringsintervallet finns inte dokumenterat för varken uppdosering eller underhållsdos. Uppdosering med injektionsintervaller mellan 2-7 dagar har rapporterats och för underhållsdosering har injektionsintervall på allt mellan 5 dagar till 12 månader redovisats. En anpassning av både dos och injektionsintervall baserat på individens svar kan vara det bästa sättet att optimera den terapeutiska effekten av behandlingen. Dosering kan dock ske även på andra sätt, exempelvis genom rush vilket innebär ett kort, intensivt uppdoseringsprotokoll eller lågdosdosering (Loewenstein & Mueller, 2009; Saridomichelakis & Olivry, 2016).

Det förekommer olika typer av ASIT-mixturer. I USA används framförallt adjuvansfria lösningar, men i Europa används ofta aluminium som adjuvans. Aluminiumadjuvansen ger en långsammare frisättning, vilket är fördelaktigt då injektionerna kan ges mer sällan. Trots att aluminium anses säkert i det akuta skedet finns anledning att se över användningen med avseende på effekter efter kronisk exponering (Jensen-Jarolim, 2015). Nya sätt att sätta samman ASIT är ett aktivt forskningsområde. På människa har modifierade allergenpreparationer som allergoider, rekombinanta allergen eller allergenpeptider prövats. För att öka effekten av ASIT har även exempelvis paketering i virus-like particles och koadministration av immunmodulatorer som CpG oligodeoxynukleotider testats (DeBoer, 2017).

Effektivitet

Flera öppna, okontrollerade studier har visat att ASIT är en effektiv behandlingsmetod mot CAD med en förbättring på 50% eller mer i 50-100% av fallen (Loewenstein & Mueller, 2009). I en blind, placebokontrollerad studie med 51 deltagande hundar fick 59% av de ASIT-behandlade en >51% förbättring, mot 21% av de placebobehandlade hundarna (Willemse *et al.*, 1984). Hos människa anses ASIT vara en effektiv behandlingsmetod för säsongsbunden allergisk rhinit och astma kopplad till allergener. Hur väl det fungerar för atopisk dermatit är dock mer kontroversiellt. Det finns flera okontrollerade, öppna studier som tyder på att ASIT fungerar även mot atopisk dermatit, men antalet kontrollerade studier är få och det krävs fler välgjorda studier för att kunna säga med säkerhet att ASIT är en bra behandlingsmetod i dessa fall (Loewenstein & Mueller, 2009; Slavyanakaya *et al.*, 2016).

Ett problem är att tiden till maximal klinisk fördel inte är klarlagd. Det finns uppgifter om att det tar allt mellan 2-12 månader innan vissa av hundarna svarar (Gosselin *et al.*, 1983;

Willemse *et al.*, 1984; Scott *et al.*, 2001; Zur *et al.*, 2002; Schnabl *et al.*, 2006). Detta innebär att det kan krävas en lång behandlingsperiod innan behandlingen kan utvärderas.

Långtidseffekten av ASIT är inte heller känd. Det finns tecken på att förbättringen kan hålla i sig hos en del hundar efter avslutad behandling om behandlingen pågått tillräckligt länge och gett resultat. Det finns dock inga kontrollerade studier i ämnet och de resultat som finns skiljer sig mycket åt. Därför kan en ASIT-behandling förväntas vara livslång hos många hundar (Griffin & Hillier, 2001; Loewenstein & Mueller, 2009; Saridomichelakis & Olivry, 2016). Hos människa har studier visat att förbättringen av de kliniska symptomen efter ASIT kan hålla i sig i flera år, dock tycks en progressiv ökning av antalet patienter som återfår kliniska symptom ske med tiden (Loewenstein & Mueller, 2009).

Faktorer som påverkar hur framgångsrik behandlingen är

Om ålder vid insjuknande, ålder vid påbörjande av immunoterapi och duration av sjukdomen innan terapin satts in gör någon skillnad för utfallet av behandlingen är inte helt klarlagt. Många menar att det inte spelar någon roll för framgången vid ASIT-behandling (Zur *et al.*, 2002; Schnabl *et al.*, 2006). Trots att konsensus är att dessa faktorer inte har någon inverkan så finns det studier som indikerar lägre respons i äldre hundar eller hundar som haft symptom i över 60 månader (Loewenstein & Mueller, 2009).

Andra faktorer som kön, ras, antal och typ av allergen som hunden är känslig emot och antal och typ av allergen som används i ASIT-mixturen har också oklar inverkan på behandlingens framgång (Loewenstein & Mueller, 2009).

Ytterligare en faktor som skulle kunna påverka framgången av en ASIT-behandling är närvaron av mögelproteaser. De kan degradera vissa pollenallergener om de hålls i samma injektionsflaska (Rosenbaum *et al.*, 1996). En studie visade lägre förbättringsfrekvens för hundar som behandlades med ASIT innehållande mögelallergener än för hundar som behandlades med ASIT innehållande enbart pollen- eller husdammskvalsterallergener (Mueller & Bettenay, 1996). I annan studie hölls mögelantigenet i en annan injektionsflaska och då sågs en ökning i framgång för de hundar som behandlades även med mögelallergener (Schnabl *et al.*, 2006).

Biverkningar

Biverkningar anses vara ovanliga till sällsynta vid ASIT-behandling. Den vanligaste biverkningen av ASIT är ökad pruritus (klåda) efter administration. Lokala reaktioner vid injektionsstället förekommer också. Den rapporterade incidensen av biverkningar varierar mellan 5-50%. Systemiska reaktioner har rapporterats i ca 1% av fallen. Exempel på sådana är svaghet, depression, ängslighet, trötthet, hässjande, hyperaktivitet, diarré, kräkningar, urtikaria/angioödem, kollaps och anafylaxi (Griffin & Hillier, 2001; Loewenstein & Mueller, 2009; Warren, 2013).

Det finns en studie som tyder på att adjuvansen skulle kunna orsaka reaktioner; 3 av 27 hundar som fick en ASIT-mixtur med alumadjuvans och 2 av 24 hundar som fått placebo med alumadjuvans fick generaliserad priuritus (Willemse *et al.*, 1984).

Immunologiska förändringar efter ASIT-behandling

Vad som sker immunologiskt vid ASIT-behandling är inte helt klarlagt varken för hundar eller för människor. På humansidan har dock mer gjorts för att klarlägga dessa mekanismer, av vilka en del redogörs för som bakgrund till de studier på hund som presenteras nedan.

Minskad mastcells- och basofilaktivitet

Hos människor har det visats att ASIT leder till minskad basofil-och mastcellsaktivitet, vilket minskar mediatorfrisättningen. Det har visats att histamin och leukotriener frisätts under ASIT utan att inducera en systemisk respons. Frisättningen under tröskelvärde skulle kunna leda till minskat granulainnehåll och skulle även kunna leda till ett höjt tröskelvärde. Även alstringen av allergen-specifika regulatoriska T-celler (Treg) och minskning i allergenspecifika IgE kan vara faktorer som leder till minskad aktivitet hos dessa celltyper (Akdis & Akdis, 2015).

Förändrat T-cellssvar och förändrad cytokinprofil

Atopisk dermatit karaktäriseras av ett Th2-svar med hög produktion av IL-4, IL-5, IL-13 och låg eller ingen produktion av IFN- γ . IL-4 och IL-13 stimulerar B-celler att producera IgE och IL-5 initierar och upprätthåller en eosinofil inflammation. Både friska och atopiska individer uttrycker alla grupper av T-celler; allergenspecifika Th1, Th2 och regulatoriska T-celler (Treg) i olika proportioner. Balansen mellan T-cellssubtyper bestämmer utvecklingen av ett normalt eller patogent immunsvaret. Få Treg och ett dominerande Th2-svar leder till en allergisk respons.

Förändringar i T-cellssammansättningen sker tidigt under ASIT-behandling. ASIT har visat sig öka produktionen av både IL-10 och TGF- β . TGF- β har visat sig bidra till den regulatoriska T-cellsfunktionen. IL-10 inhiberar IgE-beroende aktivering av mastceller och ökar eosinofilcellöd, det minskar även både total och allergenspecifikt IgE och ökar produktionen av IgG4. Hos monocyter och dendritiska celler nedreglerar IL-10 kostimulatoriska molekyler och MHCII (Larché *et al.*, 2006; Akdis & Akdis, 2015; Jutel *et al.*, 2016).

Hos humana patienter har en ökning av TGF- β 1, IFN- γ och IL-10 och en minskning av IL-4 observerats efter 2 års ASIT-behandling. De patienter som förbättrades eller förbättrades signifikant hade en större ökning i IFN- γ och TGF- β 1-nivåer och en större minskning av IL-4 än de som inte svarade lika bra (Zhong *et al.*, 2015).

Hos atopiska hundar uppmättes lägre nivåer IFN- γ och IL-4-mRNA än hos friska hundar. De atopiska hundarna hade dessutom en låg IFN- γ /IL-4 ratio, vilket tyder på ett TH2-svar. Efter immunterapi var IFN- γ -nivåerna signifikant högre hos de atopiska hundarna. Uttrycket av IL-4-mRNA förändrades inte. Detta innebär att ration blev högre, vilket tyder på ett shift mot TH1-svar genom ökat IFN- γ -uttryck (Shida *et al.*, 2004).

Ökning av IL-10 har setts även hos hund efter ASIT-behandling. Atopiska hundar hade ungefär samma nivåer IL-10 som friska djur vid studiens start. Vid studiens slut hade de atopiska immunterapibehandlade hundarna en signifikant ökning av IL-10. Alla hundar med CAD hade i stort sett samma IL-10 nivåer i början av studien, men de som svarade på

behandlingen hade ökat sina IL-10-nivåer mer än de icke-svarande i slutet av studien (Keppel *et al.*, 2008).

Ökning av regulatoriska T-celler (Treg)

ASIT har setts ge upphov till allergenspecifika Treg. De har en nedtryckande effekt på både allergenspecifika Th1 och Th2-celler. Treg utsöndrar IL-10 och TGF- β . Treg och IL-10 har en effekt på B-celler – IgE-produktionen minskar och produktionen av IgG4 induceras. En korrelation mellan klinisk förbättring och ökning av antalet Treg under ASIT har setts. Uttrycket av FOXP3 (forkhead box protein 3) hos Treg korrelerar med den nedtryckande kapaciteten av Treg. Ökat FOXP3-uttryck korrelerar negativt med serum-IgE, IFN- γ och eosinofili. Hos humana patienter med astma och atopisk dermatit är ration FOXP3+ T-celler mot totala CD4+ T-celler lägre i jämförelse med friska individer (Akdis & Akdis, 2015; Jutel *et al.*, 2016).

Det finns indikationer på att Treg hos allergiska individer har en nedsatt funktion. Bland annat har in vitro-studier på perifera CD4+CD25+ T-celler visat att Treg från atopiska individer var sämre på att nedtrycka allergidrivna proliferation av CD4+ effektor-T-celler, liksom deras Th2-cytokinutsöndring. Utöver detta finns det även tecken på att Treg kan anta vissa Th1- eller Th2-cellsfunktioner, något som är begränsat under normala förhållanden, men under kronisk inflammation tycks denna begränsning förloras. Detta leder till en patogen reprogrammering av Treg till Th-celler. Under allergisk inflammation skulle den inflammatoriska miljön göra att det allergenspecifika Treg-svaret omvänds till ett patogent svar med proinflammatorisk fenotyp med IL-4-produktion samtidigt som FOXP3-uttrycket bibehålls (Noval Rivas & Chatila, 2016).

Två studier på hundar har visat motstridiga resultat vad gäller proportionerna Treg i friska och atopiska hundar. I den ena studien kunde författarna inte finna någon skillnad i proportionen FOXP3+CD4+ Treg hos friska och atopiska hundar. När atopikerna behandlats med immunterapi hade nivåerna Treg ökat signifikant. De som svarade bra på behandlingen hade en större ökning än de som svarade sämre, men deras nivåer var desamma i början av studien (Keppel *et al.*, 2008). Detta står i strid med resultatet från en annan studie där högre proportioner FOXP3+CD4+CD25+ Treg kunde uppmätas hos atopiska hundar än hos friska kontrollhundar, även om nivåerna överlappade. Även FOXP3+CD4+ Treg fanns i större proportioner hos de atopiska djuren, men det fanns ett överlapp mellan grupperna även här. Proportionerna FOXP3+CD4+CD25+ Treg och FOXP3+CD4+ Treg var starkt korrelerade. Cirka 30% av FOXP3+CD4+ var också CD25+. Författarna kunde dessutom korrelera de högre nivåerna Treg till allvarlighetsgrad av allergin (Hauck *et al.*, 2016).

Ökning av IgG

IgG-molekyler, speciellt IgG4, tros tävla med IgE om bindning till allergen och kallas därför blockerande antikroppar. Allergenspecifika IgG kan riktas direkt mot samma epitop som allergenspecifika IgE vilket leder till en kompetitiv blockering. Genom att binda allergenen innan IgE kan IgG på detta sätt reducera den allergenspecifika IgE-medierade degranulationen av mastceller och basofiler, vilket leder till minskning av allergisk inflammation. IgG-

isotyperna som ökar mest vid ASIT är IgG1 och IgG4, mindre responser ses för IgG2. Det finns ingen stark korrelation mellan klinisk förbättring och ökning av IgG-antikroppar, däremot finns en bättre korrelation mellan nivån antikroppar och dosen allergen som administrerats vid ASIT (Larché *et al.*, 2006; Akdis & Akdis, 2015; Jutel *et al.*, 2016).

Hos människor sågs efter två års behandling med ASIT en signifikant ökning av IgG4 riktat mot husdammskvalster hos patienter sensibiliserade mot dessa. IgG4 ökade mer i grupperna som hade bättre kliniskt resultat (Zhong *et al.*, 2015).

Hos hundar har allergenspecifika IgG uppmätts i både friska och atopiska djur. IgG-antikroppar mot *Dermatophagoides farinae* har hittats hos både friska och atopiska hundar och i en studie sågs ingen signifikant skillnad i IgG-nivåer i de två grupperna (Hou *et al.*, 2005). I en annan studie var den enda signifikanta skillnaden i *D. farinae*-specifika IgG-antikroppar att atopiska hundar hade en högre IgG1-svar mot ett av proteinerna än friska djur (Hou *et al.*, 2006). I en något äldre undersökning uppmättes allergenspecifika IgG hos friska hundar, dessa fanns i lite högre nivåer hos atopiska hundar och ännu högre nivåer hos hundar som genomgick ASIT (Hites *et al.*, 1989). Ospecifika IgG-antikroppar har också undersökts och fanns i en studie hos alla undersökta hundar. Nivåerna skilde sig signifikant mellan friska arbetande hundar som hade lägre nivåer och atopiska arbetande/sällskapshundar och greyhounds som hade högre nivåer. De fann även en signifikant ökning av IgG hos ASIT-behandlade hundar. De tyckte sig kunna se en koppling mellan klinisk förbättring och stor skillnad på IgG-nivåer innan och efter ASIT, men det var mycket få hundar i denna grupp (Fraser *et al.*, 2004). Hundars IgG-antikroppar har setts öka efter ASIT-behandling även i två andra studier. I den ena studien kunde en ökning av *D. farinae*-specifika IgG-antikroppar påvisas hos 15 hundar som ASIT-behandlades för sin känslighet mot *D. farinae*. Ökningen sågs för antikroppar mot flera olika proteiner från *D. farinae*, ökningen var signifikant för 98 kDa, 50–70 kDa and 30–45 kDa proteiner. 98 kDa antas motsvara den högmolekylär-viktiga chitinasen Der F 15, en viktig *D. farinae*-allergen för hundar med CAD. Författarna anser att detta stödjer teorin att IgG-antikropparna konkurrerar ut IgE-antikropparna genom att binda till samma allergen. Om ökningen av IgG mot de andra mer lågmolekylära proteinerna har någon klinisk relevans eller bidrar till ASITs effektivitet är oklart. Hundarnas kliniska förbättring i förhållande till ökningen av IgG-antikroppar mättes inte (Hou *et al.*, 2008). Även efter sublingual ASIT-behandling sågs hundarnas IgG-nivåer öka. Hundarnas allergenspecifika IgG-nivåer varierade över tid och hade generellt ett omvänt förhållande till IgE-nivåerna. IgG-nivåerna ökade de två första månaderna, minskade de två kommande månaderna, följt av en ökning efter ytterligare två månader, men slutresultatet var totalt en signifikant ökning av nivåerna. Kliniskt var en ökning inte alltid detsamma som en klinisk förbättring, men djuren med högst nivåer vid 6 månader verkade få bäst kliniskt resultat (DeBoer *et al.*, 2016).

Minskning av IgE

Hos människa har nivåerna av allergenspecifikt IgE setts öka initialt efter påbörjad ASIT-behandling. Kommande månader och år minskar nivåerna. Anledningen till att det tar så lång tid för nivåerna att minska är oklart, men en teori är att det beror på den långa livslängden hos

IgE-producerande plasmaceller i benmärgen. Minskade nivåer av IgE har inte kunnat korreleras till klinisk förbättring, då denna sker snabbare än minskningen av IgE (Akdis & Akdis, 2015; Zhong *et al.*, 2015; Jutel *et al.*, 2016). Hos atopiska människor är totalantalet (och ofta även allergenspecifika) IgE förhöjt vid den vanligaste formen av atopisk dermatit. Hundar har däremot högre nivåer ospecifika IgE även om de är friska. Allergenspecifik IgE verkar dock korrelera bättre till sjukdomen hos hund (Pucheu-Haston, 2016).

En minskning av allergenspecifika IgE-antikroppar har setts även hos hundar efter sublingual ASIT-behandling. Antikropparna minskade de första två månaderna, ökade de kommande två för att sedan minska de sista två. Den totala minskningen efter 6 månader var signifikant. Detta mönster kunde ses hos de flesta, men inte alla hundar (DeBoer *et al.*, 2016).

DISKUSSION

De flesta studier gällande ASITs effektivitet på hundsidan tyder på att den ger goda resultat. Tyvärr är de flesta studier öppna och okontrollerade och bara en placebokontrollerad, randomiserad studie har gjorts. Trots detta verkar användningen förhållandevis utbredd och ASIT anses av många vara en effektiv behandlingsmetod (Warren, 2013). Fler välgjorda studier på området är önskvärt. Anledningen till att detta inte gjorts skulle möjligen kunna vara att denna typ av studie både är dyr och tidskrävande då det kan dröja flera månader innan resultatet kan utvärderas. Dessutom finns det en risk att djur faller bort när djurägarna inte ser de resultat de önskat tillräckligt fort, eller när hundarna kräver ytterligare behandling, exempelvis i form av glukokortikoider. På humansidan finns det fler välgjorda studier på ASITs effektivitet. Där anses ASIT vara en effektiv behandlingsmetod, men för atopisk dermatit är effektiviteten inte tillfredsställande utredd.

Det finns i dagsläget fortfarande en hel del frågetecken angående hur väl ASIT fungerar för djur i olika åldrar, av olika kön, med olika allergier, med olika typer av ASIT. Många studier visar motstridiga resultat. Detta kan ha sin grund i att många av dessa studier har få hundar i varje grupp och att olika metoder använts, både för själva ASIT och för utvärdering av resultaten. Många studier är otydliga vad gäller vilken koncentration av varje allergen som använts, hur administrationsprotokollen sett ut och hur utvärderingen gått till. Detta gör att det blir svårt att jämföra dessa studier. För att kunna göra reproducerbara, jämförbara studier krävs det standardiserade protokoll både för administration och utvärdering, något som saknas i dagsläget. Idag sker mycket av utvärderingen genom subjektiva mätmetoder. Objektiva sätt att mäta förändringar vore önskvärt. Sådana finns dock inte definierade inom veterinärmedicinen i dagsläget (DeBoer, 2017). Det råder även oklarheter kring hur doserings- och administreringsprotokollen bör se ut, hur lång tid det tar till förbättring och hur lång tid förbättringen håller i sig. Innan detta klarlagts kan det vara svårt att utvärdera exempelvis ovanstående punkters inverkan på ASITs effektivitet. Utöver detta finns även många frågetecken kring hur själva ASIT-injektionslösningen skall sättas samman. Huruvida antalet allergen borde begränsas och i sådana fall till hur många och om mögelproteaser borde inkluderas eller injiceras separat är fortfarande oklart.

ASIT har länge administrerats subkutant antingen utan adjuvans eller med aluminiumadjuvans. Nya metoder är dock konstant under utveckling. Olika modifieringar av allergenet i sig, nya adjuvanser och nya sätt att administrera är under utveckling och många verkar lovande. En intressant paradox i dagens adjuvansanvändning är att aluminiumadjuvans är kända för att dra mot ett TH2-svar, precis det svar som behandlingen är menat att minska. Trots detta verkar behandlingen förhållandevis framgångsrik (Jensen-Jarolim, 2015). Kanske kan framgångsfrekvensen ökas avsevärt med nya adjuvans. Förutom ASIT finns andra mycket effektiva metoder inom allergiterapi, som till exempel ciklosporin eller anti-IL-31-antikroppar. Detta skulle kunna göra ASIT överflödigt. Dock kräver många av dessa alternativa behandlingar livslång behandling och eventuella långtidseffekter är inte alltid kända. ASIT har en potential att inte bara förbättra de kliniska symptomen, utan även påverka patogenesen och med ASIT finns ändå förhoppningen om en ”bot” eller åtminstone ett resultat som kan hålla i sig länge (DeBoer, 2017).

Vilka immunologiska mekanismer som ligger bakom förändringarna efter ASIT är fortfarande inte helt klarlagda. CAD är en komplicerad, multifaktorell sjukdom som i dagsläget inte är helt förstådd, vilket gör det svårt att fullt ut klargöra vilka mekanismer som gör ASIT till en framgångsrik behandlingsmetod. En gedigen kunskap om vad som sker och hur det skulle kunna kopplas till klinisk förbättring är relevant att utreda. Detta skulle kunna användas för att objektivt kunna mäta och utvärdera svaret på behandlingen, liksom att vidareutveckla behandlingsmetoden.

Cytokinprofilen påverkas vid ASIT-behandling och går från en Th2-profil till en profil karakteriserad av IFN- γ , IL-10 och TGF- β . I vissa studier har en koppling mellan ökade nivåer av dessa cytokiner eller minskade nivåer av IL-4 och förbättrad klinisk bild kunnat påvisas, ett resultat som inte överensstämmer i alla studier. Minskade IgE-nivåer tar lång tid att uppnå och eventuella svar på immunterapin kan ses redan innan IgE-nivåerna minskat. Vad gäller IgG finns en utbredd konsensus att ASIT ökar antalet allergenspecifika IgG, men att denna ökning skulle vara kopplad till klinisk förbättring är kontroversiellt. Här skiljer sig resultaten åt både på hund- och humansidan. Dessa faktorer är därmed inte i dagsläget användbara som objektiva mätmetoder för utvärdering av behandlingen.

Treg har setts öka efter ASIT-behandling både hos djur och hos människa. Då en korrelation mellan dessa och klinisk förbättring har setts skulle dessa eventuellt kunna användas som ett objektivt sätt att mäta svar på ASIT-behandling. (Hauck *et al.*, 2016) kunde dock koppla höga nivåer Treg hos atopiska hundar till allvarlighetsgraden av atopin. Detta har även setts i studier på atopiska människor. Detta överensstämmer inte med studien av (Keppel *et al.*, 2008), där författarna inte kunde se någon skillnad mellan antalet Treg hos sjuka och friska individer. Motstridiga resultat finns även på humansidan. Möjliga skäl till detta är att olika definitioner för Treg använts samt existensen av olika subtyper av Treg. Andra skäl skulle kunna vara skillnader i ålder, tidigare behandling, allvarlighetsgrad av atopin eller andra skillnader hos djuren eller människorna som undersökts. Som tidigare nämnts tycks Treg ha en mycket komplex roll hos allergiker. För att kunna använda dessa som ett objektivt sätt att mäta svaret på en behandling krävs förmodligen en större förståelse för Tregs funktioner och

vilka subtyper som är inblandade, både i sjukdom och efter ASIT-behandling, samt enkla, bra metoder för att avgöra vilken typ av Treg som dominerar.

Sammanfattningsvis kan det konstateras att det i många avseenden vad gäller ASIT som behandlingsmetod för CAD saknas bra studier. Metoden verkar fungera förhållandevis bra, men med ett bättre vetenskapligt underlag skulle behandlingsmetoden kunna effektiviseras och vidareutvecklas. Utöver detta skulle det kunna visa sig att injektioner kan bytas ut mot sublingual eller oral administration och att behandlingsperioden inte behöver vara livslång. Detta i kombination med ett gediget vetenskapligt underlag för ASITs effektivitet skulle kunna hjälpa kliniker att motivera ägare till atopiska patienter och ge en större följsamhet och ett minskat lidande för drabbade hundar. Att utreda de immunologiska mekanismerna bakom CAD och ASIT skulle vara fördelaktigt ur flera perspektiv. Det skulle kunna ge upphov till mer tillförlitliga tester och mätmetoder som skulle göra det lättare att forska på området och en solid förståelse för immunologin kanske i framtiden kan leda till en ”bot” för CAD.

REFERENSLISTA

- Akdis, C. A. & Akdis, M. (2015). Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organization Journal* [online], 8(1). Available from: <http://www.waojournal.org/content/8/1/17>. [Accessed 2017-03-08].
- Calderón, M. A., Cox, L., Casale, T. B., Moingeon, P. & Demoly, P. (2012). Multiple-allergen and single-allergen immunotherapy strategies in polysensitized patients: looking at the published evidence. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online], 129(4), pp 929–934. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674911018240>. [Accessed 2017-03-13].
- DeBoer, D. J. (2017). The future of immunotherapy for canine atopic dermatitis: a review. *Veterinary Dermatology* [online], 28(1), pp 25-e6. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vde.12416/abstract>. [Accessed 2017-02-28].
- DeBoer, D. J., Verbrugge, M. & Morris, M. (2016). Clinical and immunological responses of dust mite sensitive, atopic dogs to treatment with sublingual immunotherapy (SLIT). *Veterinary Dermatology* [online], 27(2), pp 82-e24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/vde.12284>. [Accessed 2017-02-16].
- Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W. & Picco, F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology* [online], 21(1), pp 23–31. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x/abstract>. [Accessed 2017-02-28].
- Fraser, M. A., McNeil, P. E. & Gettinby, G. (2004). Examination of serum total IgG1 concentration in atopic and non-atopic dogs. *Journal of small animal practice* [online], 45(4), pp 186–190. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2004.tb00222.x/pdf>. [Accessed 2017-02-16].
- Gosselin, Y., Malo, D., Papageorges, M. & Chalifoux, A. (1983). Intradermoreaction and Hyposensitization in Canine Atopy. *The Canadian Veterinary Journal* [online], 24(4), pp 101–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1790284/>. [Accessed 2017-03-13].
- Griffin, C. E. & Hillier, A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online], 81(3–4), pp 363–383. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242701003488>. [Accessed 2017-02-13].
- Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online], 114(3–4), pp 207–208. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242706002431>. [Accessed 2017-02-28].
- Hauck, V., Hügli, P., Meli, M. L., Rostaher, A., Fischer, N., Hofmann-Lehmann, R. & Favrot, C. (2016). Increased numbers of FoxP3-expressing CD4+ CD25+ regulatory T cells in peripheral blood from dogs with atopic dermatitis and its correlation with disease severity. *Veterinary Dermatology* [online], 27(1), pp 26-e9. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vde.12279/abstract>. [Accessed 2017-02-22].
- Hillier, A. & Griffin, C. E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online], 81(3–4), pp 147–151. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242701002963>. [Accessed 2017-02-28].
- Hites, M. J., Kleinbeck, M. L., Loker, J. L. & Lee, K. W. (1989). Effect of Immunotherapy on the Serum Concentrations of Allergen-Specific IgG Antibodies in Dog Sera. *Vet. Immunol. Immunopathol.*(22), pp 39–51.
- Hou, C.-C., Day, M. J., Nuttall, T. J. & Hill, P. B. (2006). Evaluation of IgG subclass responses against *Dermatophagoides farinae* allergens in healthy and atopic dogs. *Veterinary Dermatology* [online], 17(2), pp 103–110. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2006.00509.x/abstract>. [Accessed 2017-02-13].

- Hou, C.-C., Griffin, C. E. & Hill, P. B. (2008). *Dermatophagoides farinae* -specific IgG responses in atopic dogs undergoing allergen-specific immunotherapy with aqueous vaccines. *Veterinary Dermatology* [online], 19(4), pp 215–220. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3164.2008.00682.x>. [Accessed 2017-02-16].
- Hou, C.-C., Pemberton, A., Nuttall, T. & Hill, P. B. (2005). IgG responses to antigens from *Dermatophagoides farinae* in healthy and atopic dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online], 106(1–2), pp 121–128. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242705000322>. [Accessed 2017-02-20].
- Jensen-Jarolim, E. (2015). Aluminium in Allergies and Allergen immunotherapy. *World Allergy Organization Journal* [online], 8(1), p 7. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40413-015-0060-5>. [Accessed 2017-03-12].
- Jensen-Jarolim, E., Einhorn, L., Herrmann, I., Thalhammer, J. G. & Panakova, L. (2015). Pollen Allergies in Humans and their Dogs, Cats and Horses: Differences and Similarities. *Clinical and Translational Allergy* [online], 5(1), p 15. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13601-015-0059-6>. [Accessed 2017-02-22].
- Jutel, M., Kosowska, A. & Smolinska, S. (2016). Allergen Immunotherapy: Past, Present, and Future. *Allergy, Asthma & Immunology Research* [online], 8(3), pp 191–197. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4773206/>. [Accessed 2017-02-22].
- Keppel, K. E., Campbell, K. L., Zuckermann, F. A., Greeley, E. A., Schaeffer, D. J. & Husmann, R. J. (2008). Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online], 123(3–4), pp 337–344. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242708000743>. [Accessed 2017-02-16].
- Larché, M., Akdis, C. A. & Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* [online], 6(10), pp 761–771. Available from: <http://www.nature.com/nri/journal/v6/n10/full/nri1934.html>. [Accessed 2017-02-13].
- Lian, T. M. & Halliwell, R. E. W. (1998). Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online], 66(3–4), pp 203–223. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242798001998>. [Accessed 2017-03-11].
- Loewenstein, C. & Mueller, R. S. (2009). A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Veterinary Dermatology* [online], 20(2), pp 84–98. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3164.2008.00727.x>. [Accessed 2017-02-16].
- Mueller, R. S. & Bettenay, S. V. (1996). Long-term Immunotherapy of 146 Dogs with Atopic Dermatitis - a Retrospective Study. *Australian Veterinary Practitioner*, 26(3), pp 128–132.
- Mueller, R. S., Janda, J., Jensen-Jarolim, E., Rhyner, C. & Marti, E. (2016). Allergens in veterinary medicine. *Allergy* [online], 71(1), pp 27–35. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12726/abstract>. [Accessed 2017-03-11].
- Noval Rivas, M. & Chatila, T. A. (2016). Regulatory T cells in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online], 138(3), pp 639–652. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674916304997>. [Accessed 2017-03-13].
- Nuttall, T., Uri, M. & Halliwell, R. (2013). Canine atopic dermatitis-what have we learned? *Vet Rec* [online], 172(8), pp 201–207. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Tim_Nuttall/publication/235717967_Canine_atopic_dermatitis_-_what_have_we_learned/links/00b7d53ca32204162a000000.pdf. [Accessed 2017-03-11].
- Pajno, G. B., Barberio, G., De Luca, F., Morabito, L. & Parmiani, S. (2001). Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study. *Clinical & Experimental Allergy* [online], 31(9), pp 1392–1397. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2222.2001.01161.x/abstract>. [Accessed 2017-03-11].
- Plant, J. D. & Neradilek, M. B. (2016). Effectiveness of regionally-specific immunotherapy for the management of canine atopic dermatitis. *BMC Veterinary Research* [online], 13(1). Available

- from: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0917-z>. [Accessed 2017-03-13].
- Pucheu-Haston, C. M. (2016). Atopic dermatitis in the domestic dog. *Clinics in Dermatology* [online], 34(2), pp 299–303. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X15001893>. [Accessed 2017-03-13].
- Roque, J. B., O’Leary, C. A., Kyaw-Tanner, M., Latter, M., Mason, K., Shipstone, M., Vogelnest, L. & Duffy, D. (2011). High allergen-specific serum immunoglobulin E levels in nonatopic West Highland white terriers. *Veterinary Dermatology* [online], 22(3), pp 257–266. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2010.00939.x/abstract>. [Accessed 2017-02-28].
- Rosenbaum, M., Esch, R. & Schwartzman, R. (1996). Effects of mold proteases on the biological activity of allergenic pollen extracts. *American Journal of Veterinary Research*, 57(10), pp 1447–1452.
- Saridomichelakis, M. N. & Olivry, T. (2016). An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *The Veterinary Journal* [online], 207, pp 29–37. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109002331500386X>. [Accessed 2017-03-11].
- Schnabl, B., Bettenay, S. V., Dow, K. & Mueller, R. S. (2006). Results of allergen-specific immunotherapy in 117 dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Record* [online], 158(3), pp 81–85. Available from: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/158/3/81>. [Accessed 2017-03-11].
- Scott, D., Miller, W. & Griffin, C. (2001). Skin Immune System and Allergic Skin Diseases. *Small Animal Dermatology*. pp 543–666. Philadelphia, PA: WB Saunders.
- Shida, M., Kadoya, M., Park, S.-J., Nishifuji, K., Momoi, Y. & Iwasaki, T. (2004). Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* [online], 102(1–2), pp 19–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242704001734>. [Accessed 2017-02-16].
- Slavyanakaya, T. A., Derkach, V. V. & Sepiashvili, R. I. (2016). Debates in allergy medicine: specific immunotherapy efficiency in children with atopic dermatitis. *World Allergy Organization Journal* [online], 9(1), p 15. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40413-016-0106-3>. [Accessed 2017-02-22].
- Warren, S. (2013). The role of allergen-specific immunotherapy in the treatment of canine atopic dermatitis: Part 2. *Companion Animal* [online], 18(1), pp 27–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2044-3862.2012.00262.x>. [Accessed 2017-03-12].
- Willemse, A., Van den Brom, W. & Rijnbeck, A. (1984). Effect of hyposensitization on atopic dermatitis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 10, pp 1277–1280.
- Willemse, T., Bardagi, M., Carlotti, D. N., Ferrer, L., Fondati, A., Fontaine, J., Leistra, M., Noli, C., Ordeix, L., Scarpella, F., Schleifer, S., Sinke, J. & Roosje, P. (2009). Dermatophagoides farinae-specific immunotherapy in atopic dogs with hypersensitivity to multiple allergens: A randomised, double blind, placebo-controlled study. *The Veterinary Journal* [online], 180(3), pp 337–342. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023308000154>. [Accessed 2017-03-11].
- Zhong, H., Deng, X., Song, Z., Darsow, U., Chen, W., Chen, S., Luo, N. & Hao, F. (2015). Immunological changes after ASIT in AD allergen-specific immunotherapy and their potential correlation with clinical response in patients with atopic dermatitis patients sensitized to house dust mite. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online], 29(7), pp 1318–1324. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jdv.12813>. [Accessed 2017-03-08].
- Zur, G., White, S. D., Ihrke, P. J., Kass, P. H. & Toebe, N. (2002). Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992–1998. Part II. Response to hyposensitization. *Veterinary Dermatology* [online], 13(2), pp 103–111. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3164.2002.00286.x/abstract>. [Accessed 2017-03-11].

