

Anticorpos IgG para o *Penicillium frequentans* na Doença Respiratória dos Trabalhadores da Indústria da Cortiça (Suberose). Aplicação de um Novo Método de Doseamento Fluoro-Enzimo-Imunológico na sua Quantificação

LUÍS DELGADO*, JOÃO CARLOS WINCK, JOSÉ MANUEL SAPAGE, SÍLVIA TORRES, JOÃO MOURA E SÁ E JOSÉ AUGUSTO FLEMING TORRINHA*

RESUMO

A Suberose é uma doença respiratória associada à exposição ocupacional ao *Penicillium frequentans*, o fungo que mais frequentemente coloniza a cortiça durante o seu processamento industrial. É habitualmente descrita como uma doença pulmonar intersticial associada à presença de anticorpos precipitantes para o antígeno em causa. No entanto, o aparecimento de quadros clínicos que sugerem um envolvimento brônquico e a ausência de anticorpos precipitantes, possivelmente relacionada com a pouca sensibilidade dos métodos laboratoriais para a sua detecção, dificultam com frequência o diagnóstico.

Objectivos - avaliar a utilidade de um método de doseamento fluoro-enzimo-imunológico com um novo tipo de fase sólida (ImmunoCAP®, Kabi-Pharmacia) na pesquisa e quantificação de anticorpos para o *Penicillium frequentans* no soro e no lavado broncoalveolar.

Doentes e Métodos - avaliámos, do ponto de vista clínico e laboratorial, 20 doentes com queixas

respiratórias relacionadas com a exposição ocupacional na indústria da cortiça. De acordo com a história clínica, provas funcionais respiratórias, registos seriados dos débitos expiratórios, Radiografia de Tórax e lavagem broncoalveolar (LBA), em 9 doentes foi feito o diagnóstico de pneumonite de hipersensibilidade e em 11 de asma brônquica. Em todos foi realizado o despiste de atopia (*Phadiatop*), a pesquisa de precipitinas e a quantificação de anticorpos IgG, IgG4 e IgE para o *Penicillium frequentans* (CAP RAST® FEIA).

Principais Resultados - encontrámos níveis significativamente mais elevados de IgG específica no soro e LBA dos doentes com pneumonite de hipersensibilidade e nos 8 casos (40%) com precipitinas positivas. Os níveis de IgG específica na LBA, mas não no soro, correlacionaram-se inversamente com a função pulmonar (CVF, DLCO e DLCO/VA) e, nos doentes com pneumonite de hipersensibilidade, com a celularidade e linfocitose da LBA. Os níveis de IgG4 correlacionaram-se com os de IgG específica no respectivo compartimento (soro ou LBA), mas não apresentaram qualquer relação com os dados da avaliação clínica e do LBA. Em nenhuma amostra se demonstrou a presença de IgE específica e apenas 3 doentes eram atópicos.

Conclusões - o método de doseamento fluoro-enzimo-imunológico que avaliámos permite, nas diluições utilizadas, a detecção de IgG específica para o *Penicillium frequentans* em doentes com precipitinas positivas. Além disso, ao possibilitar

* Serviço de Imunologia, Faculdade de Medicina e Hospital de S. João, Porto (Director: Prof. Doutor JA Fleming Torrinha)

Consulta de Doenças Profissionais de Causa Inalatória e Sector de Broncologia, Departamento de Pneumologia, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia (Director: Dr. A Ramalho de Almeida)

Trabalho apresentado no XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology, EAACT'95. Madrid, Spain, Junho de 1995. Publicado em resumo no *Allergy* 1995; 50 (suppl 26): 94.

uma quantificação relativa destes anticorpos no líquido de lavagem broncoalveolar permitiu encontrar uma boa correlação desses níveis com as alterações funcionais e com a intensidade da resposta imune/inflamatória do pulmão profundo, levando a prever que possa constituir um método útil para o diagnóstico e avaliação evolutiva da Suberose.

Palavras chave: Suberose, IgG específica, lavado broncoalveolar, diagnóstico.

ABSTRACT

*Suberosis is a respiratory disease associated with occupational exposure to *Penicillium frequentans*, the most frequent mould colonising cork in its processing industry. It is usually described as an interstitial lung disease associated with precipitating antibodies against this mould. However, the occurrence of clinical syndromes suggesting airway involvement and the absence of precipitins, possibly linked with the low sensitivity of laboratory methods for its detection, make the diagnosis sometimes difficult.*

*Aims - to evaluate the value of a fluoro-immunoenzymatic assay with a new solid phase in the detection and quantification of antibodies to *Penicillium frequentans*.*

*Patients and Methods - we studied 20 patients with respiratory symptoms associated with occupational exposure in the cork industry. According to history, pulmonary function tests, monitoring of PEF, chest radiograph and bronchoalveolar lavage (BAL), 9 patients had hypersensitivity pneumonitis and 11 bronchial asthma. Atopy screening (Phadiatop), precipitins and specific IgG, IgG4 and IgE antibodies to *Penicillium frequentans* were performed in all cases.*

Results - we found a significantly higher level of specific IgG in serum and BAL of patients with hypersensitivity pneumonitis and in 8 cases (40%) with positive precipitins. Specific IgG levels in BAL, but not in serum, were inversely correlated with pulmonary function (FVC, DLCO and DLCO/VA) and, in patients with hypersensitivity pneumonitis, with total cell and lymphocyte counts in BAL. IgG4 levels correlated with specific IgG in both compartments (serum and BAL), but without any apparent relationship with clinical and BAL data. We could not find specific IgE in any sample and only three patients were atopic.

*Conclusion - the fluoro-immunoenzymatic assay applied in our study allows the detection of specific IgG for *Penicillium frequentans* in precipitin-positive patients. Moreover, the detection of these antibodies in bronchoalveolar lavage fluid showed a good*

correlation with lung function impairment and with the intensity of interstitial immune/inflammatory changes, suggesting it may be an useful marker for the diagnosis of Suberosis.

Key words: Suberosis, specific IgG, bronchoalveolar lavage, diagnosis.

INTRODUÇÃO

A Suberose é uma doença respiratória ocupacional associada à exposição industrial a poeiras de cortiça^{1,2}. É habitualmente descrita como uma doença pulmonar intersticial - uma forma de pneumonite de hipersensibilidade^{3,4} - com a formação de granulomas no pulmão e a presença no soro de anticorpos precipitantes para o *Penicillium frequentans*, o fungo que mais frequentemente coloniza a cortiça durante o seu processamento industrial^{2,5}. No entanto, o aparecimento de quadros clínicos de bronquite crónica ou «asmátiformes», já reconhecido por Villar e Ávila na sua descrição inicial da doença^{1,2}, pressupõe o envolvimento predominante das vias aéreas nalgumas formas clínicas da doença.

A importância relativa dada aos anticorpos precipitantes na patogenia e diagnóstico das pneumonites de hipersensibilidade tem sido modificada nos últimos anos. Assim, de um papel inicialmente proposto na formação local de complexos antigénio/anticorpo e num mecanismo de hipersensibilidade tipo III^{1,6}, a sua presença é actualmente considerada um marcador de exposição ao antigénio e não necessariamente de doença^{1,7,8}. Por outro lado, a sua detecção por métodos imunoquímicos de precipitação pouco sensíveis e face a extractos antigénicos mal caracterizados levanta a questão da sua utilidade para afirmar o diagnóstico destas situações. No entanto, a utilização nos últimos anos de métodos imunoenzimáticos mais sensíveis, tem permitido uma quantificação mais precisa desses anticorpos e uma melhor caracterização da sua especificidade^{9,10,11}.

Foi nosso objectivo neste estudo, avaliar a utilidade de um método de doseamento fluoro-enzimo-imunológico com um novo tipo de fase sólida¹² (o CAP® System FEIA) na pesquisa e quantificação de anticorpos para o *Penicillium frequentans*. Para além da quantificação de anticorpos IgG procurámos também anticorpos IgG4 ou IgE, na tentativa de os relacionar com a diferente expressão clínica e resposta imune/inflamatória do pulmão profundo na doença ocupacional dos trabalhadores da indústria da cortiça.

DOENTES E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 20 doentes (15 do sexo masculino e 5 do sexo feminino) com queixas respiratórias relacionadas com a exposição na indústria

da cortiça. A média de idade destes doentes era de 39±11 anos, sendo 2 fumadores e 2 ex-fumadores.

Avaliação clínica - todos foram submetidos a um protocolo que incluiu: história clínica e ocupacional, exame físico, testes cutâneos «prick» para 15 alérgenos ambientais comuns, telerradiografia de tórax, pletismografia corporal/espirometria (*Erich Jaegger*), difusão de CO, estudo da hiperreactividade brônquica inespecífica, gasometria arterial em repouso. Consideraram-se atópicos os doentes com mais de um teste «prick» positivo ou *Phadiatop* positivo (ver adiante). No caso de suspeita de asma ocupacional foi realizado registo seriado de Débito Expiratório Máximo Instantâneo (*Vitalograph Peak-Flow Meter*) e, no caso de existência de um quadro sugerindo pneumonite de hipersensibilidade, cicloergometria (*Eosprint, Erich Jaegger*). A classificação dos doentes nos diversos síndromes foi feita de acordo com critérios clínicos, funcionais e análise do líquido de lavagem broncoalveolar (LBA): 1) Asma brônquica - dispneia e pieira paroxísticas com agravamento durante a exposição ocupacional, associada a obstrução reversível das vias aéreas e/ou presença de hiperreactividade brônquica inespecífica; a existência de um registo seriado de débitos expiratórios médios instantâneos (DEMI) positivos sugeria o diagnóstico de asma ocupacional. 2) Pneumonite de hipersensibilidade - tosse e dispneia de esforço associadas a mialgias, astenia, emagrecimento, com ou sem um síndrome ventilatório restritivo ou defeito de difusão, e uma alveolite linfocítica intensa no LBA (≥40%). No estudo funcional respiratório considerou-se critério de reversibilidade significativa o aumento de 15% dos débitos expiratórios após inalação de um broncodilatador. Para a avaliação da hiperreactividade brônquica inespecífica utilizou-se a Histamina, segundo um protocolo adaptado de Cockroft, já descrito¹³. No registo seriado do DEMI foi pedido ao doente para anotar o valor mais elevado obtido em três ensaios efectuados de duas em duas horas, desde que acordava até que se deitava. Os registos foram efectuados em pelo menos 2 períodos sucessivos: em actividade profissional num período de pelo menos 10 dias, seguido de registos durante pelo menos 10 dias de afastamento. Para a representação gráfica dos registos utilizou-se o DEMI médio diário. Foram considerados positivos quando, após análise visual, pelo menos dois de três observadores decidiram que os registos em período laboral eram significativamente mais baixos dos em fase de afastamento^{14,15}.

Broncofibroscopia com lavagem broncoalveolar (LBA) - todos os doentes foram submetidos a LBA, segundo as recomendações do European Task Group on BAL (16). Resumidamente, instilaram-se 4x50 ml de soro fisiológico, a 37°C, no lobo médio, aspirando suavemente o líquido após cada instilação. As amostras

recuperadas foram misturadas e avaliada a celularidade total (câmara de *Neubauer*), viabilidade (exclusão do azul tripano) e contagem diferencial em preparações de citocentrífuga (*Wright-Giemsa*). Os sobrenadantes acelulares da LBA foram congelados para posterior doseamento de IgG e Albumina (nefelometria cinética) e pesquisa de anticorpos específicos.

Imuno-fenotipagem celular da LBA - em casos selecionados procedeu-se a imuno-fenotipagem por citometria de fluxo (FACScan, *Becton-Dickinson Co*) usando anticorpos monoclonais directamente conjugados com fluorocéina ou ficoeritrina, reactivos com o CD45, CD14, CD2, CD19, CD4 e CD8 (*Becton-Dickinson Co*). Após preparação das amostras a percentagem de linfócitos positivos foi calculada nas suspensões celulares, após «gating» electrónico nos linfócitos, avaliado pela dispersão de luz característica e a reactividade com os anticorpos anti CD45, CD14, CD2 e controles isotópicos apropriados.

Pesquisa de IgE específica e despiste de atopia - para o despiste de atopia a alérgenos ambientais utilizou-se o *Phadiatop* CAP® e o CAP® IgE RAST com uma mistura de fungos (*Mx1-Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium notatum* e *Alternaria alternata*). Os resultados são dados como positivos ou negativos por comparação a um soro de referência, no *Phadiatop* CAP®, ou a uma concentração de referência IgE (0,35 KU/L) no CAP® IgE RAST.

Pesquisa de anticorpos específicos para o *Penicillium frequentans* - foram pesquisados utilizando métodos de precipitação em gelose (pesquisa de precipitinas) ou de doseamento fluoro-enzimo-imunológico. Nas precipitinas utilizou-se um método de difusão dupla em gelose (a 1,5% em tampão de citrato) (17) com um extracto salino do *P. frequentans* a 20mg/ml (antigénio gentilmente cedido pelo Prof. Ramiro Ávila). Após difusão de 72 horas em câmara húmida foi feita a leitura e as lâminas lavadas, desidratadas e novamente observadas após coloração proteica. A pesquisa de IgG e IgG4 específica foi feita por doseamento fluoro-enzimo-imunológico (CAP® RAST FEIA, *Kabi Pharmacia*), seguindo as instruções do fabricante e avaliando diferentes diluições das amostras. A ligação do antigénio à fase sólida do CAP® foi realizada pela *Kabi Pharmacia (Special Allergen Service)*. Os resultados são expressos como percentagem de uma referência (%R) - uma mistura de soros contendo IgG e IgG4 específica para o videiro (*Betula verrucosa*), obtidos de indivíduos submetidos a imunoterapia com extractos desse pólen. Em amostras selecionadas estudamos também a reactividade com outros antigénios, ligados a uma fase sólida idêntica: *Betula verrucosa*, *Penicillium notatum* e *Alternaria alternata*.

Análise estatística - todas as comparações entre grupos ou variáveis foram feitas por testes não paramétricos (Mann-Whitney ou correlação de Spearman), considerando-se significativo um $p < 0,05$. A diferença de distribuição das precipitinas entre grupos foi estudada pelo χ^2 com a correcção de Yates. Os resultados são apresentados em média aritmética \pm desvio padrão da média, excepto quando assinalado.

RESULTADOS

Os resultados da avaliação clínica e da lavagem broncoalveolar estão sumarizados no Quadro I e II. De acordo com essa avaliação o diagnóstico de asma brônquica foi feito em 11 doentes (n.ºs 1 a 11) e o de pneumonite de hipersensibilidade em 9 (n.ºs 12 a 20). O tempo médio de exposição ocupacional foi ligeiramente superior nos doentes com asma brônquica (20,8 *versus* 14,7; $p=0,35$), e correlacionou-se inversamente com o índice de Tiffeneau ($r=-0,461$; $p=0,04$; $n=20$).

O diagnóstico de asma brônquica foi estabelecido com base nas oscilações do DEMI durante a exposição ocupacional em 5 doentes (n.ºs 2, 4, 7, 9 e 11, Fig. 1). Nos restantes o registo de DEMI seriado foi negativo (n.ºs 1, 5, 10), ou duvidoso (n.ºs 3 e 8), sendo o diagnóstico baseado na presença de hiperreactividade brônquica à histamina significativa (n.ºs 1, 5, 8 e 10) e/ou reversibilidade significativa (n.ºs 3 e 5). Dos 9 doentes com pneumonite de hipersensibilidade, 5 tinham um síndrome ventilatório restritivo ligeiro e/ou defeito de difusão alveolo-capilar (doentes n.ºs 12, 13, 14, 19, 20). Num caso, apenas a prova de esforço em cicloergómetro foi positiva (doente n.º 15, com dessaturação significativa) e noutro existia síndrome ventilatório obstrutivo associado a alteração da difusão de CO (doente n.º 17). Apenas os doentes n.º 16 e 18 tinham exames funcionais respiratórios normais, incluindo ciclo-ergometria.

QUADRO I - Dados clínicos dos doentes com asma (n.º 1 a 11) e pneumonite de hipersensibilidade (n.º 12 a 20). Os dois grupos diferem apenas na CVF, DLCO e DLCO/VA ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney para amostras não emparelhadas).

Doente n.º	Idade	Sexo	Testes «prick»	Tempo Exposição (anos)	CPT % Teórico	CVF % Teórico	VEMS % Teórico	IT %	VR %	DLCO % Teórico	DLCO/VA % Teórico
1	55	M	neg.	30	102,0	106,0	98,3	74,7	111,0	133,0	128,0
2	38	M	neg.	11	109,0	109,0	97,9	94,6	137,0	119,0	87,6
3	37	M	neg.	20	122,0	98,2	68,5	55,8	184,0	138,0	100,0
4	47	F	n.r.	33	105,0	99,9	89,9	76,6	132,0	121,0	112,0
5	46	M	neg.	31	101,0	94,5	89,5	77,5	149,0	n.r.	n.r.
6	28	F	pos.	8	129,0	123,0	112,0	79,3	140,0	114,0	88,4
7	31	F	neg.	12	108,0	96,1	69,3	62,6	144,0	163,0	130,0
8	40	F	neg.	13	123,0	147,0	157,0	91,9	81,0	147,0	95,0
9	53	M	neg.	15	112,0	129,0	105,0	66,7	94,2	148,0	115,0
10	43	F	neg.	18	82,7	86,0	85,0	90,5	92,9	108,0	109,0
11	56	M	neg.	38	81,4	106,0	111,0	84,0	60,5	131,0	152,0
<i>média</i>	<i>43</i>			<i>21</i>	<i>106,8</i>	<i>108,6</i>	<i>97,6</i>	<i>77,7</i>	<i>120,5</i>	<i>132,3</i>	<i>111,7</i>
<i>d.p.</i>	<i>9</i>			<i>10</i>	<i>15,1</i>	<i>17,8</i>	<i>23,9</i>	<i>12,3</i>	<i>35,9</i>	<i>17,2</i>	<i>20,5</i>
12	24	M	neg.	10	81,5	78,4	77,6	85,4	131,0	51,7	55,3
13	35	M	neg.	24	108,0	89,3	87,9	85,0	176,0	51,6	55,6
14	25	M	neg.	8	113,0	122,0	125,0	87,4	128,0	99,5	78,0
15	44	M	neg.	18	91,4	85,3	84,9	82,9	113,0	91,8	105,0
16	27	M	neg.	13	92,0	96,3	96,1	84,7	114,0	114,0	97,6
17	39	M	neg.	25	103,0	85,4	66,1	64,4	151,0	59,7	52,8
18	41	M	n.r.	12	106,0	115,0	115,0	83,8	98,8	153,0	115,0
19	16	M	neg.	3	86,6	76,1	82,8	90,0	120,0	70,8	64,0
20	48	M	neg.	19	65,3	72,0	68,6	78,0	54,5	65,2	63,7
<i>média</i>	<i>33</i>			<i>15</i>	<i>94,1</i>	<i>91,1</i>	<i>89,3</i>	<i>82,4</i>	<i>120,0</i>	<i>84,1</i>	<i>76,3</i>
<i>d.p.</i>	<i>11</i>			<i>7</i>	<i>15,1</i>	<i>17,2</i>	<i>19,8</i>	<i>7,5</i>	<i>33,7</i>	<i>33,9</i>	<i>23,7</i>

CPT - capacidade pulmonar total; CVF - capacidade vital forçada; VEMS - volume expiratório máximo no 1.ºs; IT - Índice de Tiffeneau; VR - volume residual; DLCO - difusão do CO; VA - ventilação alveolar; neg. - negativos; pos. - positivos; n.r. - não realizado.

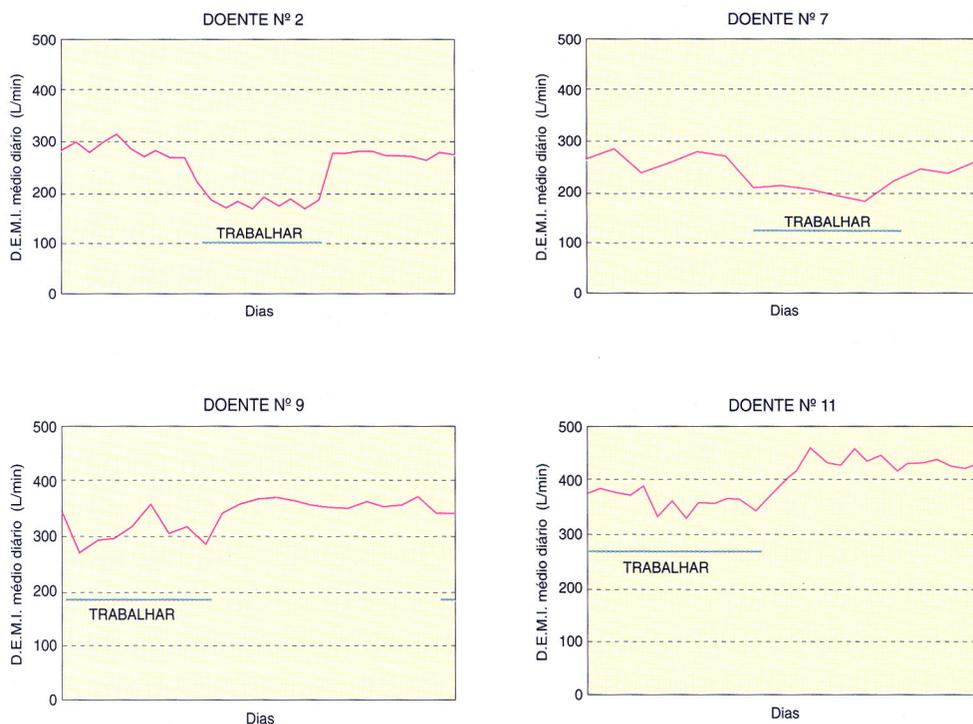


Fig. 1 - Registos seriados dos DEMI de quatro doentes com um padrão sugestivo de asma ocupacional.

QUADRO II - Resultados da lavagem broncoalveolar dos doentes com asma (1 a 11) e pneumonite de hipersensibilidade (12 a 20). Com exceção do volume recuperado todas as variáveis da LBA são significativamente diferentes entre dois grupos ($p < 0,01$, teste de Mann-Whitney).

Doente n.º	Fumador	Volumeml.	Células Totais $\times 10^6 \text{ml}^{-1}$	Macróf. Alveolares %	Linfócitos %	P.M.N. %	Eosinóf. %	% de Linfóc. CD8+	% de Linfóc. CD4+	«Ratio» CD4/CD8	Albumina mg/100ml	IgG mg/100ml
1	N	135	1,60	74,2	20,3	4,9	0,6	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
2	N	124	0,50	74,8	16,0	1,4	7,8	n.r.	n.r.	n.r.	<4,2	<6,9
3	S	75	1,75	72,0	26,8	0,8	0,4	35,3	45,6	1,29	<4,2	<6,9
4	N	112	2,50	91,0	19,0	4,0	1,2	n.r.	n.r.	n.r.	6,6	1,4
5	N	121	1,60	62,4	34,8	2,2	0,4	n.r.	n.r.	n.r.	3,1	<1,1
6	N	128	0,60	58,5	21,6	1,0	17,7	n.r.	n.r.	n.r.	7,4	1,5
7	N	89	3,10	50,1	44,1	1,0	1,4	49,6	42,6	0,8	65,4	<1,1
8	N	129	1,47	82,3	14,3	0,0	0,4	23,7	38,1	1,6	13,2	<1,1
9	N	35	1,08	83,1	14,3	1,4	1,0	n.r.	n.r.	n.r.	4,1	<1,1
10	N	66	0,70	87,0	8,2	4,0	0,4	16,0	65,5	4,09	2,6	<1,1
11	N	120	2,40	58,6	40,0	1,2	0,2	56,0	35,0	0,63	4,3	<1,1
<i>média</i>		<i>103</i>	<i>1,57</i>	<i>72,2</i>	<i>23,6</i>	<i>2,0</i>	<i>2,9</i>	<i>36,1</i>	<i>45,4</i>	<i>1,70</i>	<i>4,1 *</i>	<i>1,3 *</i>
<i>d.p.</i>		<i>32</i>	<i>0,84</i>	<i>13,2</i>	<i>11,5</i>	<i>1,6</i>	<i>5,4</i>	<i>16,9</i>	<i>12,0</i>	<i>1,40</i>	<i>1,9</i>	<i>0,3</i>
12	N	115	22,80	19,6	63,5	16,6	0,0	76,5	15,0	0,20	11,6	49,3
13	S	132	12,80	19,0	71,8	6,2	2,6	n.r.	n.r.	n.r.	8,0	19,3
14	N	128	13,30	10,2	78,8	10,0	0,4	57,5	7,8	0,14	25,3	30,3
15	N	129	9,30	25,1	67,3	6,6	0,6	57,0	36,0	0,63	23,0	28,4
16	Ex	129	11,00	34,1	65,4	0,5	0,0	69,5	11,4	0,16	8,0	13,8
17	N	90	3,90	19,6	74,7	5,1	0,6	74,6	8,4	0,11	7,7	11,3
18	Ex	112	5,30	20,5	77,7	1,6	0,2	76,8	19,4	0,25	8,0	4,9
19	N	128	21,00	11,8	86,0	0,6	0,4	55,6	19,1	0,34	17,4	41,1
20	N	117	20,80	14,3	84,2	0,4	0,2	57,7	35,1	0,61	11,5	27,1
<i>média</i>		<i>120</i>	<i>13,30</i>	<i>19,4</i>	<i>74,4</i>	<i>5,3</i>	<i>0,6</i>	<i>65,7</i>	<i>19,0</i>	<i>0,31</i>	<i>13,4</i>	<i>25,1</i>
<i>d.p.</i>		<i>13</i>	<i>6,90</i>	<i>7,2</i>	<i>6,6</i>	<i>5,4</i>	<i>0,8</i>	<i>9,6</i>	<i>11,1</i>	<i>0,07</i>	<i>6,9</i>	<i>14,3</i>

Macróf. - Macrófagos; P.M.N. - Polimorfonucleares Neutrófilos; Eosinóf. - Eosinófilos; N - Não fumador; S - Fumador; Ex - Ex-fumador; n.r. - Não realizado. (*) Nos casos indoseáveis atribuiu-se o valor entre 0 e o limite inferior de doseamento.

Comparativamente aos doentes com asma brônquica este grupo apresentou valores significativamente mais baixos quer da Capacidade Vital Forçada (91,1±17,2 % do teórico vs 108,6±17,8%; p=0,03) quer da difusão de CO (DLCO- 84,1±33,9% vs 132,3±17,2%; p=0,005; DLCO/VA- 76,3±23,7% vs 111,7±20,5%; p=0,01).

As alterações radiológicas eram discretas, sendo mais evidentes nos doentes n.ºs 19 e 20 com um padrão p 1/0 e u 2/2 (Classificação ILO/UC 1980).

Despiste de atopia e IgE específica - dois doentes com asma brônquica eram atópicos (n.ºs 6 e 8), apresentando positividade na pesquisa de IgE específica para alérgenos ambientais comuns (*Phadiatop*). Ambos tinham IgE específica para uma mistura de fungos (CAPRAST positivo para *Mx1*) e, o doente n.º 6, testes «prick» e RAST positivo aos ácaros do pó da casa. O doente n.º 2, com IgE de 856 kU/L, apresentava IgE específica para o *Acarus siro* e *Tyrophagus putrescentiae* (CAP®RAST classe 2). Os níveis de IgE total não diferiram significativamente entre os doentes com asma - 108 kU/L - e pneumonite de hipersensibilidade - 152 kU/L (médias geométricas).

Em nenhum dos 20 doentes se encontrou IgE específica para o *Penicillium frequentans* no CAP®RAST.

Lavagem broncoalveolar (LBA) - os resultados da análise do líquido de lavagem broncoalveolar estão representados no Quadro II. Neste grupo de doentes a celularidade total e o n.º absoluto de linfócitos na LBA correlacionou-se inversamente com os parâmetros funcionais respiratórios (TLC, CVF, DLCO, DLCO/VA; p<0,05 qualquer das correlações); o n.º absoluto de linfócitos CD8+ correlacionou-se inversamente com a difusão de CO (DLCO/VA, r=-0,55; p=0,02; n=13).

Os volume recuperado foi ligeiramente mais baixo nos doentes com asma brônquica, mas sem diferença estatisticamente significativa (103±32ml vs 120±13ml). Os doentes n.ºs 12 a 20 apresentaram um maior número de células na LBA (13,3±6,9 vs 1,6±0,8x10⁵ ml⁻¹; p<0,001), com intensa linfocitose e neutrofilia em 5 casos, compatível com a «alveolite» linfocítica ou mista das pneumonites de hipersensibilidade.

Comparando os dois grupos, os doentes com o diagnóstico de asma brônquica apresentaram um maior

QUADRO III - IgG e IgE total e específica nos doentes com asma (n.º 1 a 11) e pneumonite de hipersensibilidade (n.º 12 a 20). As precipitinas e IgG específica para o *Penicillium frequentans* predominam nos doentes com pneumonite de hipersensibilidade.

Doente n.º	IgG total (mg %)	IgE total (kU/L)	Despiste de atopia <i>Phadiatop</i>	RAST p/ fungos (Mx1)	Precipitinas p/ <i>Penicillium frequentans</i>	IgG específica ^(*) p/ <i>Penicillium frequentans</i> (% R)		IgG4 específica ^(*) p/ <i>Penicillium frequentans</i> (% R)	
						soro (1:1000)	L.B.A. (1:10)	soro (1:100)	L.B.A. (1:1)
1	n.r.	124	-	-	+	33,1	5,2	4,1	7,3
2	1070	856	-	-	-	9,0	2,7	3,7	6,5
3	1100	130	-	-	-	21,5	2,7	4,2	5,9
4	1421	56	-	-	-	10,8	4,6	3,9	6,9
5	1074	75	-	-	-	7,0	3,2	4,0	5,9
6	1040	604	+	+	-	5,9	12,3	3,7	9,4
7	1067	15	-	-	-	8,2	8,2	5,4	12,0
8	1450	61	+	+	-	8,4	5,2	4,6	6,1
9	1312	101	-	-	-	5,3	10,5	4,5	8,6
10	1383	43	-	-	-	7,9	4,9	4,8	10,3
11	1615	163	-	-	-	12,1	7,5	5,5	8,6
<i>média</i>	<i>1253</i>	<i>203</i>				<i>11,7</i>	<i>6,1</i>	<i>4,4</i>	<i>8,0</i>
<i>d.p.</i>	<i>207</i>	<i>270</i>				<i>8,3</i>	<i>3,2</i>	<i>0,6</i>	<i>2,0</i>
12	4488	141	-	-	-	16,6	149,0	4,3	6,4
13	2358	557	-	-	-	63,3	46,0	4,4	8,4
14	1540	69	-	-	+	78,1	85,7	5,5	8,7
15	1543	15	-	-	+	92,1	112,0	4,4	7,6
16	1864	504	-	-	+	177,0	44,0	6,3	8,2
17	1473	152	-	-	+	49,4	48,3	4,4	10,3
18	1460	1540	-	-	+	67,9	30,3	5,4	24,5
19	2578	1930	-	-	+	167,0	159,0	4,7	9,6
20	2149	15	-	-	+	92,1	121,0	7,9	22,0
<i>média</i>	<i>1864</i>	<i>547</i>				<i>89,3</i>	<i>88,4</i>	<i>5,3</i>	<i>11,7</i>
<i>d.p.</i>	<i>965</i>	<i>709</i>				<i>52,3</i>	<i>48,8</i>	<i>1,2</i>	<i>6,6</i>

(*) Estão indicadas as diluições utilizadas; a reatividade obtida com o diluente foi para a IgG de 2,1% R e para a IgG4 de 2,5% R.

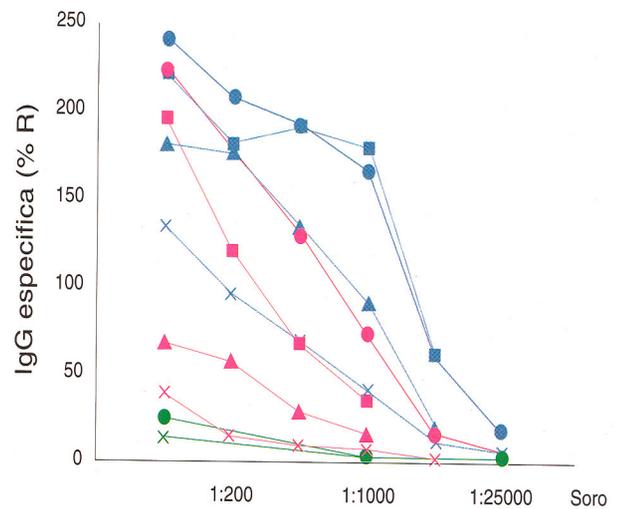
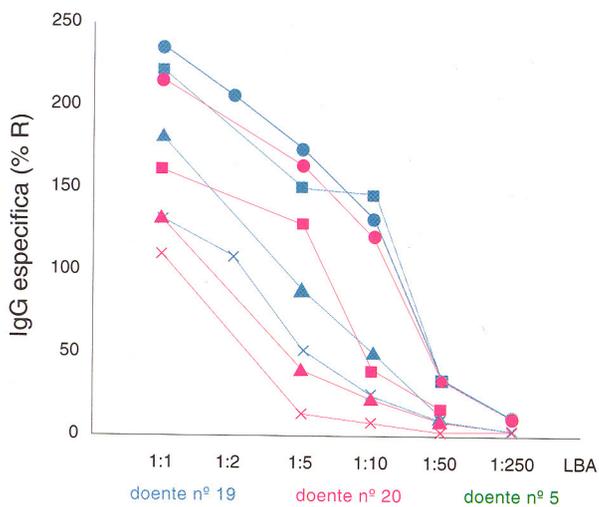


Fig. 2 - Pesquisa de IgG específica nas amostras de lavagem broncoalveolar (LBA) (em cima) e no soro (em baixo) em três dos doentes estudados. Estão representados os resultados com:



número relativo de macrófagos alveolares ($p < 0,001$) e de eosinófilos ($p < 0,001$) e um «ratio» de linfócitos CD4+/CD8+ superior ($1,7 \pm 1,4$; $p < 0,01$). Neste grupo, o número absoluto de neutrófilos na LBA correlaciona-se inversamente com os Volumes Pulmonares (CPT, $r = -0,71$; $p = 0,02$; CVF, $r = -0,58$; $p = 0,06$) e directamente com o tempo de exposição ($r = 0,70$; $p = 0,03$).

Os doentes com pneumonite de hipersensibilidade caracterizaram-se por um aumento significativo da proporção de linfócitos ($p < 0,001$) e neutrófilos ($p < 0,005$), assim como dos níveis de Albumina e IgG ($p < 0,001$) e um predomínio de linfócitos CD8+ ($CD4/CD8 = 0,31 \pm 0,07$).

Anticorpos precipitantes para o *Penicillium frequentans* - a pesquisa de anticorpos precipitantes (precipitinas) revelou-se positiva em 8 doentes (40%) e particularmente associada ao diagnóstico de pneumonite de hipersensibilidade (7/9, $\chi^2 = 7,08$; $p < 0,01$) (Quadro III). Este grupo apresentou, também, níveis séricos de IgG significativamente mais elevados do que os doentes com asma brônquica (1864 ± 965 mg/dl vs 1253 ± 207 mg/dl; $p < 0,001$).

Quantificação de IgG específica para o *Penicillium frequentans* por doseamento fluoro-enzimológico - dadas as concentrações elevadas de IgG nas amostras de soro e da LBA, particularmente nos doentes com pneumonite de hipersensibilidade, estudamos inicialmente a curva dose-resposta de dois casos com pneumonite de hipersensibilidade e precipitinas positivas (n.ºs 19 e 20) e de um caso com asma e precipitinas negativas (n.º 5) (Fig. 2).

Os resultados obtidos (Fig. 2) demonstram que com diluições inferiores a 1:1000, para as amostras de soro, e 1:10, para as amostras de LBA, poderá haver alguma

ligação inespecífica da IgG à fase sólida, nomeadamente pela resposta obtida com antígenos irrelevantes (nomeadamente a *Betula verrucosa*). A partir destes resultados, todas as amostras de soro foram estudadas diluídas a 1:1000 e as da LBA a 1:10, correspondendo às zonas intermédias das curvas dose-resposta e a concentrações de IgG total nessas amostras $\leq 4,5$ mg/100ml para o soro e $\leq 4,9$ mg/100ml para a LBA. Com estas diluições, a concentração média de IgG total nas amostras testadas foi, nos doentes com pneumonite de hipersensibilidade, de $1,86 \pm 0,96$ mg/dl para o soro e $2,71 \pm 1,43$ para a LBA ($p = 0,23$).

Encontramos níveis significativamente mais elevados de IgG específica no soro e na LBA dos doentes com pneumonite de hipersensibilidade ($p < 0,001$ para ambas as amostras) (Quadro III e Fig. 3). Do mesmo modo, os níveis de IgG específica foram mais elevados nas amostras de doentes com precipitinas positivas (soro $94,6 \pm 51,9$ vs $16,7 \pm 16,7$ %R; $p < 0,001$; LBA $41,1 \pm 10,8$ vs $21,6 \pm 41,8$ %R; $p = 0,001$).

Dado o líquido da LBA ser, à partida, uma amostra com diluição variável individualmente, normalizamos os resultados obtidos nas amostras de soro e da LBA pelas respectivas concentrações de IgG total. Ao comparar assim as duas amostras, não se verificaram diferenças significativas dos níveis médios de IgG específica no soro ou LBA dos doentes com pneumonite de hipersensibilidade ($47,1 \pm 25,7$ vs $37,9 \pm 11,3$ %R/IgG mg%; p n.s.). No entanto, não se encontrou correlação entre os níveis de IgG nos dois compartimentos, tendo 4 dos 9 doentes apresentado maiores concentrações na LBA (Fig. 4).

O coeficiente de variação intra-ensaio numa amostra positiva (LBA do doente n.º 19) foi de 3,1 %.

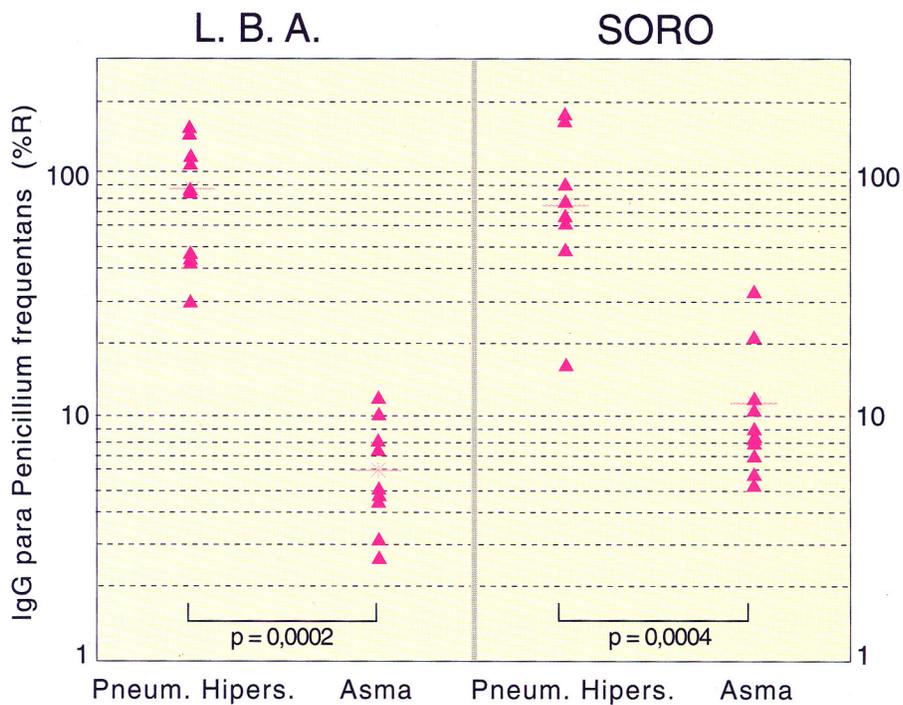


Fig. 3 - Pesquisa de IgG específica nas amostras de lavagem broncoalveolar (LBA) e no soro nos dois grupos de doentes estudados. Nos dois tipos de amostras os níveis de IgG específica são significativamente mais elevados dos doentes com pneumonite de hipersensibilidade.

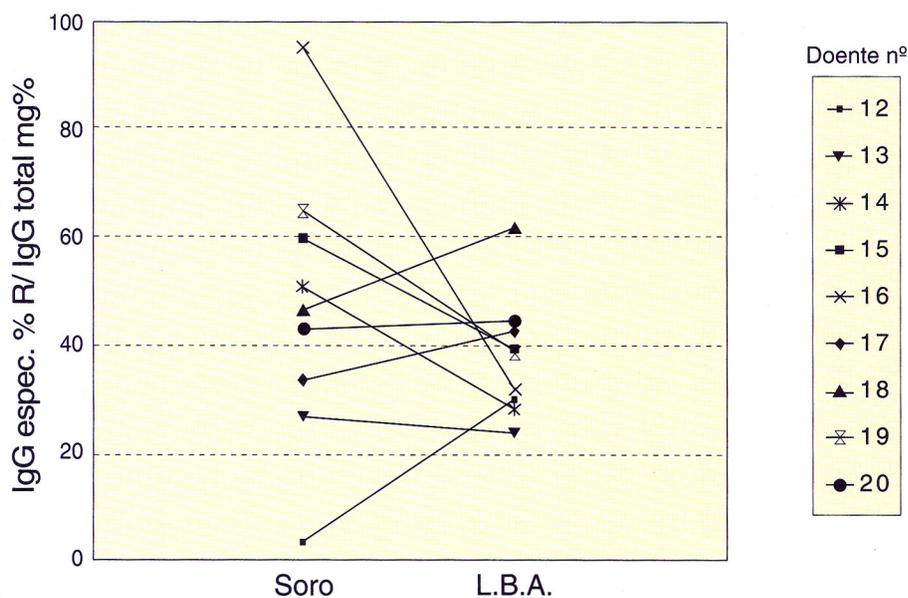


Fig. 4 - Valores individuais de IgG específica nos doentes com pneumonite de hipersensibilidade, normalizados em relação à concentração de IgG total em cada amostra. Os níveis médios de IgG específica não diferiram significativamente no soro e lavagem broncoalveolar (L.B.A.) dos doentes - $47,1 \pm 25,7$ vs $37,9 \pm 11,3$ %R/IgG mg%; p n.s. No entanto, 4 dos 9 doentes apresentaram maiores concentrações na L.B.A.

Pesquisa de IgG4 específica para o *Penicillium frequentans* - os resultados obtidos para a IgG4 foram, em percentagem do soro de referência, muito inferiores aos da IgG, mesmo quando se utilizaram as amostras de soro apenas diluídas a 1:100 e as da LBA integrais (Quadro III). Os resultados na LBA foram mais elevados que os obtidos nas amostras de soro ($9,7 \pm 4,9$ %R vs $4,8 \pm 1,0$ %R; $p < 0,0001$, teste de Wilcoxon) o que se verificou também em qualquer dos grupos.

A IgG4 correlacionou-se com a quantidade de IgG específica no respectivo compartimento (soro e LBA $r = 0,46$; $p = 0,04$) e, na LBA, com os níveis séricos ($r = 0,58$; $p = 0,01$). Os níveis de IgG4 específica não diferiram significativamente nos doentes com ou sem precipitinas, quer no soro quer na LBA (dados omitidos).

Relação da IgG específica para o *Penicillium frequentans* com parâmetros da avaliação clínica e da LBA - neste grupo de 20 doentes com sintomas respiratórios atribuídos à exposição ocupacional na indústria da cortiça, encontrámos uma correlação significativa entre os níveis de IgG específica para o *Penicillium frequentans* na LBA e a deterioração funcional respiratória (CVF $r = -0,48$; $p = 0,04$; DLCO/VA $r = -0,55$; $p = 0,02$; DLCO $r = -0,65$; $p = 0,006$). Contudo, não houve qualquer correlação significativa com os níveis de IgG específica no soro.

Do mesmo modo, os níveis de IgG específica na LBA correlacionam-se melhor que os do soro com a intensidade da resposta inflamatória no pulmão profundo quando avaliada pela LBA (Quadro IV).

No grupo de doentes com pneumonite de hipersensibilidade a IgG específica na LBA, mas não a do soro, correlacionou-se inversamente com a CVF ($r = -0,78$; $p = 0,03$) e, directamente, com o n.º de células ($r = 0,58$; $p = 0,01$) e de linfócitos na LBA ($r = 0,75$; $p = 0,03$), quer CD8+ ($p = 0,04$) quer CD4+ ($p = 0,04$). No grupo com asma brônquica apenas se encontrou correlação com a quantidade de Albumina na LBA ($r = 0,76$; $p = 0,02$).

DISCUSSÃO

Numerosos estudos têm demonstrado a presença de anticorpos precipitantes e IgG específica no soro de doentes expostos à inalação crónica de antígenos orgânicos e que, por esse facto, podem desenvolver uma pneumonite de hipersensibilidade. Esses antígenos podem estar presentes em diversos ambientes ocupacionais, como é o caso da indústria da cortiça^{2,18}, da criação de aves¹⁹, da agricultura²⁰, da exposição a humidificadores²¹ e mesmo a compostos químicos, como os isocianatos²².

A demonstração de anticorpos precipitantes para o antígeno em causa é hoje considerado um marcador de exposição e não de doença^{1,7,8}, sendo a não estandardização dos métodos de pesquisa *in vitro* a principal dificuldade na sua valorização clínica²³. No caso do *Penicillium frequentans*, a positividade em trabalhadores expostos varia entre os 16%¹⁸ e 32%²⁴ e, em doentes, dos 81% nas formas de pneumonite de hipersensibilidade a 27% nos doentes com quadros de asma². No entanto, em nenhum dos estudos publicados até à data^{18,24,25} a presença de precipitinas se relacionou com as alterações espirométricas, radiográficas ou da lavagem broncoalveolar.

O desenvolvimento de métodos imunológicos mais recentes tem permitido uma melhor caracterização dos anticorpos e antígenos envolvidos e, pela sua quantificação, uma informação mais precisa da relação destes com a exposição e fases clínicas da doença^{11,26,27}. O CAP® System é um sistema recentemente desenvolvido, que utiliza uma fase sólida hidrofílica, com uma larga superfície e capacidade de ligação ao antígeno, calculada em cerca de 50 vezes superior à de um tubo plástico¹². Tem sido sobretudo utilizado para a pesquisa de pequenas quantidades de anticorpos específicos no soro, como é o caso dos anticorpos da classe IgE. Ao permitir obter uma maior sensibilidade em relação a outras fases sólidas clássicas¹², uma quantificação rápida e uma automatização fácil, pareceu-nos ideal a sua aplicação na detecção de anticorpos específicos, quer no soro quer na LBA.

QUADRO IV - Coeficientes da correlação de Spearman e valor de p (itálico), entre os níveis de IgG específica para *Penicillium frequentans* e os dados da lavagem broncoalveolar.

IgG espec. % R (n)	Células $\times 10^5 \text{ml}^{-1}$ (20)	Linfócitos % (20)	Linfócitos $\times 10^4 \text{ml}^{-1}$ (20)	LinfCD8+ $\times 10^4 \text{ml}^{-1}$ (13)	LinfCD4+ $\times 10^4 \text{ml}^{-1}$ (13)	PMN $\times 10^3 \text{ml}^{-1}$ (20)	Albumina mg/100ml (19)
LBA	0,813 (0,0004)	0,783 (0,0006)	0,820 (0,0004)	0,929 (0,001)	0,890 (0,002)	0,698 (0,002)	0,924 (0,0001)
Soro	0,749 (0,001)	0,765 (0,0009)	0,742 (0,001)	0,627 (0,03)	0,800 (0,05)	0,646 (0,005)	0,694 (0,003)

IgG espec. - IgG específica; n - n.º casos; Linf - Linfócitos; PMN - Neutrófilos; LBA - Lavagem broncoalveolar.

Neste estudo incluímos 20 doentes com queixas respiratórias associadas a uma longa exposição na indústria da cortiça (Quadro I). Apesar de todos os doentes incluídos no grupo de asma brônquica referirem agravamento dos sintomas durante a exposição ocupacional, com melhoria aos fins de semana e férias, apenas em cinco foi possível documentá-lo objectivamente, através da monitorização dos DEMI (Fig.1). Nos outros casos, o diagnóstico de asma ocupacional não pode ser estabelecido, embora a existência de obstrução reversível das vias aéreas e/ou hiperreactividade brônquica inespecífica nos tenha levado a agregá-los, neste estudo, a esse mesmo grupo. A realização sistemática da LBA nestes doentes integrou-se num protocolo de diagnóstico da patologia respiratória nos trabalhadores da indústria da cortiça uma vez que, na nossa experiência²⁵, não existe concordância absoluta entre a apresentação clínica e o diagnóstico final após LBA, particularmente nas formas com sintomas brônquicos.

Em relação aos doentes classificados como pneumonite de hipersensibilidade (Quadro I e II) apenas dois apresentaram avaliação funcional respiratória normal, apesar de uma alveolite linfocítica intensa e sintomatologia típica. Estes achados poderão sugerir um estadio mais precoce do envolvimento intersticial, apenas detectável por métodos mais sensíveis²⁸.

Nesta série, as alterações radiográficas foram mínimas, tendo apenas dois casos apresentado padrões intersticiais (n.ºs 19 e 20), o que está de acordo com a já descrita baixa sensibilidade deste exame para o diagnóstico de pneumonite de hipersensibilidade^{2, 29}.

A análise das células da LBA nesta população permitiu-nos identificar dois perfis diferentes: um grupo com intensa alveolite linfocítica de predomínio CD8+ (CD4/CD8=0,31±0,07) associada ou não a neutrofilia, o que caracteriza habitualmente as pneumonites de hipersensibilidade³⁰; outro, com aumento do número de eosinófilos e neutrófilos, e linfocitose moderada com «ratio» CD4/CD8 mais elevado (1,7±1,4), que acompanha a asma brônquica³¹. Apesar da existência de dois perfis celulares distintos na LBA, de acordo com o valor desta técnica na orientação diagnóstica da Suberose²⁵ constatamos algumas excepções. Assim, a associação de uma alveolite linfocítica intensa (CD8+) com registo de DEMI seriado positivo em dois casos (n.ºs 7 e 11, Quadro II), conjuntamente com um doente não fumador com pneumonite de hipersensibilidade e padrão funcional respiratório de tipo enfisema (n.º 17), confirmam as observações que apontam para uma não rara associação do envolvimento das vias aéreas à doença do interstício^{2, 32-34}.

Apenas dois doentes foram positivos no despiste de atopia *in vitro* (*Phadiatop*). Num outro, foi possível demonstrar a sensibilização a ácaros de armazém.

Nenhum evidenciou a presença de IgE específica para o *Penicillium frequentans*. Apesar de, teóricamente, a presença de anticorpos IgG poder interferir com a detecção de IgE específica, a grande capacidade de ligação de antigénio da fase sólida utilizada - - ImmunoCAP® (Kabi-Pharmacia) - e os baixos níveis de IgG específica no soro dos doentes com asma, torna menos provável este tipo de interferência¹².

No entanto, não foi objectivo deste estudo clarificar a etiologia da asma ocupacional dos doentes expostos na indústria da cortiça. A exposição a múltiplos fungos que podem induzir sensibilização com produção de IgE, como são as espécies *Penicillium* e a *Alternaria*³⁵, levaria a suspeitar de alergia a fungos em alguns destes doentes. De facto, esse poderá ser o caso dos doentes n.ºs 6 e 8 (Quadro III) mas, de um modo geral, a atopia não parece caracterizar este grupo de doentes asmáticos. Estes dados, conjuntamente com a correlação encontrada nestes doentes entre o número de neutrófilos na LBA, os Volumes Pulmonares e tempo de exposição, poderão favorecer mais um mecanismo inflamatório do que imunológico, dependente de uma longa exposição industrial, tal como tem sido proposto para outras formas de asma ocupacional³⁶. Uma avaliação mais detalhada destes doentes poderá vir a esclarecer este ponto no futuro.

No nosso estudo as precipitinas para o *Penicillium frequentans* (Quadro III) estiveram presentes num dos doentes com asma (9%) e significativamente associadas às pneumonites de hipersensibilidade - 7 dos 9 casos (77,8%) - como seria de esperar². Contudo, dois doentes com este diagnóstico foram negativos: o n.º 12, que curiosamente apresentou um valor baixo na pesquisa de IgG específica no soro, mas não na LBA, e o n.º 13 que, dado o valor de IgG específica (63,3 %R) poderá ter sido um falso negativo. De facto, apesar da concordância entre diferentes métodos de precipitação em gelose para a pesquisa de anticorpos precipitantes ser genericamente boa³⁷, a utilização de uma técnica de precipitação com maior volume de soro e antigénio e maior tempo de difusão, do que a por nós usada, poderia ter maior sensibilidade^{17, 38}. Considerando a média mais dois desvios padrões dos valores de IgG específica obtidos no soro dos doentes com asma como limite inferior para a positividade do teste (i.e. 28,3 %R) a concordância entre os dois métodos foi excelente - 19 dos 20 casos testados. No mesmo sentido, verificámos que os níveis de IgG específica foram significativamente mais elevados nas amostras dos doentes com precipitinas positivas. Assim, estes dados sugerem-nos que, nas diluições utilizadas, o método é suficientemente sensível para detectar anticorpos precipitantes para o *Penicillium frequentans*.

Na pesquisa de IgG específica observámos, para as amostras positivas, alguma reactividade com outros

antigénios, quando se testaram diluições menores das amostras (Fig. 2). Em parte, essa reactividade poderá ser devida a ligações inespecíficas da IgG à fase sólida e/ou aos antigénios testados, e que se poderá atribuir às elevadas concentrações de IgG total nestas amostras como, aliás, tem sido verificado noutros métodos imunoenzimáticos que pesquisam IgG específica¹⁰. Outra hipótese, é a antigenicidade cruzada³⁹, como parece sugerir a curva de titulação das amostras dos doentes n.ºs 19 e 20 face ao *Penicillium notatum* e ao *frequentans* (Fig. 2). Ensaio preliminares sugerem-nos que a pré-incubação da fase sólida com o diluente proteico poderá reduzir um pouco a ligação inespecífica à fase sólida em diluições mais baixas, sem diminuição da reactividade com o *Penicillium frequentans* (observações não publicadas). Ensaio futuros poderão esclarecer melhor estas hipóteses.

Uma das vantagens do método de doseamento fluoro-enzimo-imunológico utilizado no nosso estudo é a possibilidade de uma quantificação precisa do título desses anticorpos. De facto, quando comparámos as quantidades de IgG específica na LBA dos doentes com pneumonite de hipersensibilidade relativamente às do soro, após normalização em relação às respectivas concentrações de IgG total (Fig. 4), foi possível verificar que, apesar de não diferirem significativamente em valores médios, não houve correlação entre elas e 4 dos 9 casos aparentavam concentrações superiores na LBA. Pelo facto destes doentes terem no LBA concentrações de IgG total cerca de 3,5 vezes superiores às do soro, quando comparadas às respectivas concentrações de Albumina (mediana do quociente IgG/Albumina- 1,73 no LBA *versus* 0,45 no soro, $p=0,006$ teste de Wilcoxon), os resultados obtidos sugerem a existência de títulos elevados de IgG específica na superfície broncoalveolar dos doentes com pneumonite de hipersensibilidade. A favor de uma relativa independência dos dois compartimentos na resposta humoral ao *Penicillium frequentans*, são também os resultados dos doentes n.ºs 1 e 12, com título elevado num compartimento e negativo no outro (Quadro III). O interesse da medição da IgG específica nas amostras obtidas do pulmão profundo foi bem aparente no nosso estudo, pelas correlações significativas obtidas com as perturbações funcionais respiratórias e com as alterações inflamatórias da LBA, que foram de menor significado ou não demonstráveis quando se analisaram os respectivos valores séricos (Quadro IV). Apesar do papel da resposta humoral na patogenia das pneumonites de hipersensibilidade continuar a ser controverso^{3,4,40} e ter sido progressivamente abandonado^{3,4,8}, os nossos dados reforçam observações mais recentes⁴¹⁻⁴³ que sugerem que a formação local de complexos antigénio-anticorpo participa de modo importante na ampliação inflamatória e activação celular do pulmão profundo,

consequente à inalação crónica do antigénio. O alargamento deste estudo a uma série maior de doentes, sobretudo se observados longitudinalmente, poderá dar maior consistência a esta hipótese.

Em relação à IgG4 específica, os valores encontrados foram bastante inferiores, como seria de esperar pela concentração relativa deste isotipo em relação à IgG total⁴⁴. A correlação encontrada, quer na LBA quer no soro, com as concentrações de IgG específica estão em parte de acordo com a presença de anticorpos deste isotipo em situações de estimulação antigénica crónica⁴⁵. A ausência de uma relação evidente entre a sua presença e concentração relativa, e os diferentes grupos clínicos, parâmetros funcionais e da LBA, não nos sugerem uma participação patogénica nem um contributo importante no diagnóstico da doença, como tem sido também referido noutras formas de pneumonite de hipersensibilidade¹¹.

Em conclusão o método de doseamento fluoro-enzimo-imunológico que avaliamos permite, nas diluições utilizadas, a detecção de IgG específica para o *Penicillium frequentans* em doentes com precipitinas positivas. Além disso, a correlação dos seus níveis com as alterações funcionais e com a intensidade da resposta imune/inflamatória do pulmão profundo, leva a prever que possa constituir um método útil para o diagnóstico e avaliação evolutiva da Suberose.

BIBLIOGRAFIA

1. **Ávila R, Villar TG.** Suberosis: Respiratory disease in cork workers. *Lancet* 1968; 1:620-623.
2. **Ávila R, Villar TG.** Respiratory disease in cork workers (Suberosis). *Thorax* 1973; 28:409-423.
3. **Sharma OP.** Hypersensitivity Pneumonitis. *Disease-a-Month* 1991; 411-471.
4. **Fink JN.** Hypersensitivity Pneumonitis. In: Lynch III JP, DeRemee RA, eds. Immunologically mediated Pulmonary Diseases. *JB Lippincott Company* 1991; 399-412.
5. **Ávila R, Lacey J.** The role of *Penicillium frequentans* in suberosis. (Respiratory disease in cork workers). *Clin Allergy* 1974; 4:109-117.
6. **Roska AKB, Moore VL, Abramoff P.** Immune complex disease in guinea pig lungs: elicitation with pigeon serum. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120:129-136.
7. **Siersted HC, Hansen NCG.** Precipitating antibodies against pigeon bloom antigen as a specific and sensitive measure of pigeon exposure. *Allergy* 1990; 293-297.
8. **Burrell R, Rylander R.** A critical review of the role of precipitins in hypersensitivity pneumonitis. *Eur J Respir Dis* 1981; 62:332-343.
9. **Khan ZU, Richardson MD, Warnock.** Rapid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG antibodies against *Microspora faeni* and *Thermoactinomyces vulgaris*. *Clin Allergy* 1984; 14:295-305.
10. **Simpson C, Shirodaria PV, Simpson DIH.** Comparison of immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of abnormal antibodies in pigeon breeder's disease. *J Clin Pathol* 1992; 45:490-493.

11. **Kaukonen K, Savolainen J, Viander M, Kotimaa M, Terho EO.** IgG and IgA subclass antibodies against *Aspergillus umbrus* in farmer's lung disease. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:851-856.
12. **Ewan PW, Coote D.** Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. *Allergy* 1990; 45:22-29.
13. **Melo I, Esteves I, Sá R.** Prova de provocação pela histamina. Aspectos Práticos. *Arquivos da S. P. P. R.* 1989; VI:69-73.
14. **Henneberger PK, Stanbury MJ, Trimbath LS, Kipen HM.** The use of portable Peak Flowmeters in the surveillance of occupational asthma. *Chest* 1991; 100:1515-1521.
15. **Coté J, Kennedy S, Chan-Young M.** Quantitative versus qualitative analysis of peak expiratory flow in occupational asthma. *Thorax* 1993; 48:48-51.
16. **Kleeh H, Pohl W, ed.** Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1989; 2:561-585.
17. **Milford-Ward A.** Immunoprecipitation in the evaluation of the proteins in plasma and body fluids. Techniques in Clinical Immunology. Thompson RA ed. *Blackwell Scientific Publications* 1981; 1-27.
18. **Carvalho A, Moura e Sá J, Rodrigues FF, Seada J, Brito MC, Caminha JC e cols.** Manifestações broncopulmonares em operários inalando poeiras de cortiça. *O Médico* 1986; 115: 310-318.
19. **Sá HC, Taveira N, Delgado L, João M, Afonso A, Parente B e cols.** Doença de criadores de pombos. Estudo numa população de risco. *Arq S. P. P. R.* 1987; IV (1):37-42.
20. **Hapke EJ, Seal RME, Thomas GO, Hayes W, Meek JC.** Farmer's lung. A clinical, radiographic, functional, and serological correlation of acute and chronic stages. *Thorax* 1968; 23:451-468.
21. **Fink JN, Banaszak, Barboriac JJ, Hensley GT, Kurup VP, Scanlon GT e cols.** Interstitial lung disease due to contamination of forced air systems. *Ann Int Med* 1976; 84:406-413.
22. **Delgado L, Lopes I, Pestana AI, Sapage JM, Fleming Torrinha.** Hipersensitivty pneumonitis to hexamethylene diisocyanate. *Sarcoidosis* 1989; 6 (suppl 1):87 (resumo).
23. **Richerson HB, Bernstein LI, Kink JN, Hunninghake GW, Novey HS e cols.** Guidelines for the clinical evaluation of Hypersensitivity Pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84, 5 (part 2):839-844.
24. **Ávila R, Lucas G, Araújo T, Lacey J, Heitor MC, Mendes EM e cols.** Estudo epidemiológico da doença respiratória dos trabalhadores da indústria da cortiça. *O Médico* 1973; 1146: 257-268.
25. **Sapage JM, Delgado JL, Torres S, Vicente P, Winck JC, Rodrigues P, Ribeiro JI.** Suberose: contributo da Lavagem Broncoalveolar no diagnóstico da patologia respiratória nos trabalhadores da Indústria da cortiça. *Arq S.P.P.R.* 1992; 9 (6):321-328.
26. **Banham SW, McKenzie H, McSharry C, Lynch PP, Boyd G.** Antibody against a pigeon bloom-extract: a further antigen in pigeon fancier's lung. *Clin Allergy* 1982; 12:173-178.
27. **Beer PM, Bouic PJ, Joubert JR.** Identification of a "Disease-Associated" antigen in pigeon breeder's disease by Western Blotting. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 91:343-347.
28. **Bourke SJ, Banham SW, Mckillop JH, Boyd G.** Clearance of 99m Tc-DTPA in Pigeon Fancier's Hypersensitivity Pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:1168-1171.
29. **Gurney JW.** Hypersensitivity Pneumonitis. *Radiol Clin N Am* 1992; 30 (6):1219-1230.
30. **Semenzato G, Bjermer L, Costabel U, Haslam PL, Olivieri D, Trentin L.** Clinical role of bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis. *Eur Respir Rev* 1992; 2:8, 69-74.
31. **Fabbri LM, De Rose V, Godard P, Bpschetto P, Rossi GA.** Guidelines and recommendations for the clinical use of bronchoalveolar lavage in asthma. *Eur Respir Rev* 1992; 2:8, 114-120.
32. **Torres Da Costa J, Winck JC, Sapage J, Melo I, Azevedo M, Delgado L.** Bronchial hyperreactivity in the respiratory disease of cork workers. *Clin Exp Allergy* 1993; 23 (suppl 1) (resumo).
33. **Selman-Lama M, Pérez-Padilla R.** Airflow obstruction and airways lesions in hypersensitivity pneumonitis. *Clin Chest Med* 1993; 14 (4):699-714.
34. **Fink JN.** Hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74(1):1-9.
35. **Licorish K, Novey HS, Kozak P, Fairshter R, Wilson A.** Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76:819-825.
36. **Fabbri LM, Ciaccia A, Maestrelli P, Saetta M, Mapp CE.** Pathophysiology of occupational asthma. Asthma in the Workplace. Bernstein IL, Chan-Yeung M, Malo J-L, Bernstein DI ed., *Mercel Dekker, Inc. New York* 1993; 61-92.
37. **Bergmann K CH, Aiache JM, Bartmann K, Fooke-Achtrath M, Kraft D, Longbottom JL e cols.** Precipitins to inhaled avian antigens: a case study. *Clin Allergy* 1983; 13:451-457.
38. **Villar TG, Ávila RG.** Granulomatoses pulmonares de causa inalatória. *Lisboa* 1976; 51-70.
39. **O'Neil CE, Reed MA, Hughes J, Butcher BT, Lehrer SB.** *Fusarium solani*: evidence for common antigenic/allergenic determinants with other Fungi Imperfecti. *Clin Allergy* 1987; 17:127-133.
40. **Rodrigues J, Silva JPM, Delgado JL, Castel-Branco MG.** Pneumonites de hipersensibilidade. *Rev Port Imunoalergol* 1992; 1(3):34-39.
41. **Salvaggio JE, Milhollon B.** Induction and modulation of pulmonary inflammation by organic dusts: cytokines, immune complexes and "all of those things". *Clin Exp Allergy* 1992; 22:731-733.
42. **Mulligan MS, Ward PA.** Immune complex-induced lung and dermal vascular injury. Differing requirements for Tumor Necrosis Factor- α and IL-1. *J Immunol* 1992; 149:331-339.
43. **Denis M, Cormier Y, Fournier M.** Tumor necrosis factor plays an essential role in determining hypersensitivity pneumonitis in a mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5:477-483.
44. **Bodas MA, Cardoso MJ, Delgado L, Fleming Torrinha JA.** Subclasses de IgG. Avaliação de seis meses da sua quantificação num Laboratório de Imunologia. *Rev Port Imunoalergol* 1993; 1(4):153-158.
45. **Aalberse RC, Van Milligen F, Tan KY, Stapel SO.** Allergen-specific IgG4 in atopic disease. *Allergy* 1993; 48:559-569.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a colaboração da Dr.ª Isabel Melo, do Dr Raul César Sá e do Dr José Albino Lopes na exploração funcional respiratória e na avaliação dos registos dos DEMI, a colaboração da Dr.ª Josefina Rodrigues no processamento da lavagem broncoalveolar e do Dr. Miguel Capão-Filipe no doseamento de anticorpos. Reconhece-se, também, a colaboração da Dr.ª Rosário Boavida (Kabi Farmacia, Portugal) e Anita Kober (Kabi Farmacia, Suécia) na preparação dos ImmunoCAP com *Penicillium frequentans*.