

**Doença Respiratória
dos Trabalhadores
da Indústria da Cortiça
(Suberose): da Imunopatologia ao Diagnóstico**

João Carlos Winck Fernandes Cruz

2003

**Doença Respiratória
dos Trabalhadores
da Indústria da Cortiça**
(Suberose): da Imunopatologia ao Diagnóstico

João Carlos Winck Fernandes Cruz

2003

**Título: Doença Respiratória dos Trabalhadores da Indústria da
Cortiça (Suberose): da Imunopatologia ao Diagnóstico**

Autor: João Carlos Winck Fernandes Cruz

Edição: Do Autor

ISBN: 972-9025-34-7

Depósito Legal: 195779/03

Produção Gráfica: MEDISA - Edições e Divulgações Científicas, Lda

Ano: 2003

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

PROFESSORES EFECTIVOS - CATEDRÁTICOS

Doutor Alberto Manuel Barros da Silva
Doutor Alexandre Aberto Guerra de Sousa Pinto
Doutor Altamiro Manuel Rodrigues Costa Pereira
Doutor Álvaro Jerónimo Leal Machado de Aguiar
Doutor António Carlos Freitas Ribeiro Saraiva
Doutor Belmiro dos Santos Patrício
Doutor Cassiano Pena de Abreu e Lima
Doutor Daniel Filipe de Lima Moura
Doutora Deolinda Maria Valente Alves Lima Teixeira
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutora Isabel Maria Amorim Pereira Ramos
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutor José Agostinho Marques Lopes
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Henrique Pinto de Barros
Doutor José Manuel Lopes Teixeira Amarante
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutora Maria Amélia Duarte Ferreira
Doutora Maria Dulce Cordeiro Madeira
Doutora Maria de Fátima Machado Henriques Carneiro
Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo
Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares da Silva
Doutor Rui Manuel Almeida Mota Cardoso
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães

PROFESSORES JUBILADOS E APOSENTADOS

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina Silva Leal
Doutor António Luís Tomé da Rocha Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor Celso Renato Paiva Rodrigues da Cruz
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Ferreira
Doutor Francisco de Sousa Lê
Doutor Henrique José Ferreira Lecour de Menezes
Doutor João Silva Carvalho
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Joaquim Oliveira da Costa Maia
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral
Doutor José Pinto de Barros
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís António Mota Prego Cunha Soares de Moura Pereira Leite
Doutor Manuel Teixeira Amarante Junior
Doutor Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald
Doutor Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso

O Decreto-Lei n 388/70, art. 8, parágrafo 2, refere: "É admitido na elaboração da dissertação o aproveitamento, total ou parcial, do resultado de trabalhos publicados, mesmo em colaboração, devendo, neste caso, o candidato esclarecer a sua contribuição pessoal".

Ao abrigo deste Decreto-Lei, utilizaram-se nesta dissertação dados publicados nos seguintes trabalhos:

Morais A, Winck JC, Delgado L, Palmares MC, Fonseca J, Moura e Sá J, Marques JA. Suberosis and Bird Fancier's disease: a comparative study of radiological, functional and bronchoalveolar lavage profiles. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2003 (in press)

Winck JC, Delgado L, Vanzeller M, Guimarães T, Torres S, Sapage JM. Monitoring of peak expiratory flow rates in cork worker's occupational asthma. *Journal of Asthma* 2001; 38(4): 357-62

Winck JC, Delgado L, Vanzeller M, Guimarães T, Torres S, Sapage JM. Bronchoalveolar inflammation in cork worker's asthma. *Allerg Immunol (Paris)* 2002 ; 34 (6): 199-203

Winck JC, Delgado L, Murta R, Vanzeller M, Marques JA. Cork worker's occupational asthma. Lack of association with allergic sensitisation to fungi of the work environment (enviado para publicação)

Winck JC, Delgado L, Murta R, Lopez M, Marques JA. Antigenicity of major cork moulds in Suberosis (cork workers' pneumonitis) determined by Immunoblotting (enviado para publicação)

O candidato participou na definição dos objectivos e da metodologia, na colheita e análise dos resultados e na elaboração do texto final em cada um dos trabalhos referidos. A ordem destes trabalhos não corresponde às datas de publicação; o desencontro é explicado por diferenças nos tempos de conclusão, apresentação pública e preparação da publicação.

AGRADECIMENTOS

O interesse pelo estudo da patologia respiratória ocupacional despontou em mim em 1989 quando, trabalhando voluntariamente no serviço de Imunologia da Faculdade de Medicina do Porto e ainda interno de especialidade do 1º ano, o Doutor José Luís Delgado me entusiasmou pela exploração celular do pulmão profundo no âmbito das doenças profissionais ocupacionais. Devo ainda ao Dr. José Manuel Sapage (responsável da consulta de doenças profissionais de causa inalatória do Departamento de Pneumologia do Centro Hospitalar de Gaia) a visão clínica das doenças respiratórias ocupacionais, quando iniciei o meu internato de Pneumologia naquela instituição, sedimentando posteriormente com a minha participação activa, a partir de 1993, na referida consulta. Foi durante esses anos que muitos dos doentes que então observámos serviram de base para as questões que, entretando, fomos levantando e investigando.

A minha gratidão vai também para todos os colegas do serviço de Pneumologia 1 do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia, pela sua solidariedade e espírito de grupo, em especial ao seu director, o Dr. Fernando Filipe Rodrigues (obrigado pela sua "visão de Raios-X"!), à Dra. Aurora Carvalho (obrigado pelo espírito científico e organizativo!), à Dra. Manuela Vanzeller (tantas horas de recolha de dados...), à Dra. Sílvia Torres e Dr. José Albino Lopes (tantos gráficos de DEMI...) e à Enfermeira Gina (colheita de amostras de sangue). Não posso esquecer também o insigne broncologista Dr. João Moura e Sá que me abriu a janela da técnica da lavagem broncoalveolar.

Ao Professor Doutor José Agostinho Marques devo agradecer a visão crítica da Pneumologia moderna, a sua forte influência no meu amadurecimento como médico, o seu incentivo e ensinamento omnipresentes essenciais para conseguir levar por diante este projecto.

Ao Professor Doutor José Luís Delgado (companheiro de longas horas de trabalho desde há longos anos) devo o impulso da investigação, o seu "insight" imbatível nas análises dos resultados, a crítica construtiva, e a amizade que perdurará, sem os quais este trabalho nunca teria sido concluído.

Agradeço a todos os colegas do serviço de Pneumologia do Hospital de São João, em particular ao Dr. António Morais, pelo seu entusiasmo e colaboração no trabalho nº 1. Devo ainda agradecer a todo o "staff" da Unidade de Fisiopatologia e Reabilitação Respiratória (em especial ao seu Director, o Dr João Almeida), onde me integro, o óptimo sentido de entrega e solidariedade que demonstraram ao longo destes anos.

Ao Dr Miguel Casanovas (CBF Leti, Madrid) e à Dra Vitória San Romão (ITQB, Oeiras) a ajuda valiosa na preparação dos extractos de fungos que testámos.

À Dra. Maria do Carmo Palmares (Serviço de Imunologia, Hospital São João) e à Eng.ª Rita Murta (AmerLab, Lisboa) pela preciosa colaboração no processamento do líquido de lavagem broncoalveolar e immunoblotting, respectivamente. Ao Dr. João Fonseca (Unidade de Imunoalergologia, Hospital São João) pelo incansável apoio na análise estatística.

Às secretárias Fátima Pimentel e Teresa Bernardes e ao serviço bibliográfico da *Boheringer Ingelheim* (D. Esmeralda Violas) agradeço a inestimável ajuda no apoio bibliográfico.

Um agradecimento infinito à minha mulher Cristina e aos meus filhos João Martim e Mariana pela paciência, compreensão e suporte ao longo destes anos.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL	1
PNEUMONITE DE HIPERSENSIBILIDADE	3
1. Epidemiologia	3
1.1. As Pneumonites de Hipersensibilidade em Portugal	4
1.2. Breve história da Suberose	5
2. Apresentação Clínica	5
3. Imagiologia	7
4. Imunopatogénese	7
4.1. Alveolite subclínica	8
4.2. Linfócitos e Pneumonite de Hipersensibilidade	8
4.2.a) Subpopulações linfocitárias	9
4.2.b) Evolução das subpopulações linfocitárias	9
4.3. Citocinas e outros mediadores solúveis na Pneumonite de Hipersensibilidade	10
5. Patologia/Anatomia Patológica	11
6. Diagnóstico	12
6.1. Provas Funcionais Respiratórias	12
6.2. Imagiologia	13
6.3. Lavagem Broncoalveolar	13
6.4. Outros exames complementares de diagnóstico	15
6.4.a. Precipitinas	15
6.4.b. Biópsia Pulmonar	15
6.4.c. Provocação inalatória específica	16
6.5. Critérios de diagnóstico de Pneumonite de Hipersensibilidade	16
7. Tratamento	17
8. Prognóstico/Evolução	18
ASMA OCUPACIONAL	19
1. Definição	19
2. Prevalência	20
3. Factores de Risco	21
4. Fisiopatologia	21
5. Diagnóstico	22
5.1. Testes imunológicos	23
5.2. Provas Funcionais Respiratórias	23
OBJECTIVOS PROPOSTOS	25

PUBLICAÇÕES	29
Trabalho 1 Suberose e Doença dos Criadores de Aves: estudo comparativo do perfil radiológico, funcional e do lavado broncoalveolar <i>Suberosis and Bird Fancier's disease: a comparative study of radiological, functional and bronchoalveolar lavage profiles</i>	31
Trabalho 2 Monitorização dos débitos expiratórios máximos instantâneos no diagnóstico da asma ocupacional dos corticeiros <i>Monitoring of peak expiratory flow rates in cork worker's occupational asthma</i>	43
Trabalho 3 Inflamação broncoalveolar na asma dos corticeiros <i>Bronchoalveolar inflammation in cork worker's asthma</i>	51
Trabalho 4 Asma ocupacional dos corticeiros. Ausência de associação com a sensibilização alérgica a fungos do ambiente ocupacional <i>Cork worker's occupational asthma. Lack of association with allergic sensitisation to fungi of the work environment</i>	59
Trabalho 5 Caracterização antigénica dos principais fungos da cortiça na Suberose - estudo por <i>immunoblotting</i> <i>Antigenicity of major cork moulds in Suberosis (cork workers' pneumonitis) determined by immunoblotting</i>	67
DISCUSSÃO GERAL	79
RESUMO/SUMMARY/RÉSUMÉ	91
EPÍLOGO	105
BIBLIOGRAFIA	109

"Em 1966 (...) iniciámos os nossos estudos imunológicos da Suberose tendo em vista, não só tentar compreender a etiopatogenia desta afecção, como também, provar que ela pertencia ao grupo das chamadas alveolites alérgicas extrínsecas. Foi uma tarefa árdua, mas cremos ter conseguido obter elementos de particular interesse diagnóstico e que, por outro lado, vieram abrir novos horizontes ao conhecimento da afecção."

Thomé G Villar e Ramiro G Ávila
In Granulomatoses pulmonares de causa inalatória, Lisboa 1976

Introdução Geral

PNEUMONITE DE HIPERSENSIBILIDADE

A pneumonite de hipersensibilidade (PH) ou alveolite alérgica extrínseca (AAE) é uma doença granulomatosa do pulmão¹⁻³ associada à exposição a vários agentes, incluindo poeiras orgânicas e químicos. A inalação repetida de determinado(s) antigénio(s) desencadeia uma reacção de hipersensibilidade em indivíduos imunologicamente sensibilizados ao(s) antigénio(s) em questão¹⁻³. Esta patologia foi inicialmente descrita por Campbell em 1932, em agricultores expostos a feno com bolor (Pulmão do fazendeiro)⁴, reconhecendo-se hoje que se pode associar à exposição a uma variedade de antigénios, geralmente de natureza orgânica e de origem diversa, aviária, fúngica, bacteriana, entre outras, mas também substâncias de origem química como, por exemplo, os isocianatos, compostos de baixo peso molecular que podem funcionar como haptenos⁵⁻⁹. A inalação crónica e/ou intensa destas substâncias é o ponto de partida para uma reacção inflamatória de mediação imunológica, com atingimento principalmente da região interstício-alveolar e dos bronquíolos terminais¹⁻³. Hoje em dia existem mais de 30 fontes ambientais e ocupacionais descritas como indutoras de Pneumonite de Hipersensibilidade (Quadro I)¹⁰.

1. EPIDEMIOLOGIA

A prevalência da PH varia de acordo com o País e ainda de região para região, consoante o tipo, frequência e intensidade da exposição¹¹. Nos Estados Unidos da América e na Europa as formas de PH mais frequentes são a *doença de criadores de aves (DCA)* e o *pulmão do fazendeiro (PF)*. Já no Japão predomina a PH do verão ("*summer-type*" *Hypersensitivity Pneumonitis*) que ocorre nos meses húmidos e quentes, que facilitam o crescimento de *Trichosporon cutaneum*, nas casas de madeira com baixas condições de ventilação, típicas do sudoeste deste país. Estima-se que entre 8 a 30% dos columbófilos tenham DCA e que 0,5 a 5% dos fazendeiros apresentem sintomas compatíveis com PF¹.

QUADRO I: Causas mais frequentes de Pneumonite de Hipersensibilidade

Doença	Fonte de exposição	Antigénio provável
Suberose	Poeiras de cortiça bolorenta	<i>Penicillium glabrum</i> (ex <i>P. Frequentans</i>)
Doença dos Criadores de Aves	Excrementos/Penas de Aves	IgA, mucina intestinal, proteínas do pó das penas
Pulmão do Fazendeiro	Poeiras de feno	<i>Sacharopolyspora Rectivirgula</i> (ex <i>Mycropolyspora Faeni</i>) <i>Thermoactinomyces vulgaris</i>
Pneumonite de Hipersensibilidade do Verão ("summer-type")	Poeiras das paredes das casas (Japão)	<i>Trichosporon asahii</i> (ex <i>T. cutaneum</i>) <i>T. mucoides</i>
Pulmão dos Humidificadores	Humidificadores e ar condicionado contaminados	<i>Actinomyces Termophilus</i> <i>Micromycetes</i> Outros fungos
Pneumonite de Hipersensibilidade dos trabalhadores das madeiras	Poeiras de madeira	<i>Alternaria spp</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Rhizopus spp</i> <i>Mucor spp</i> Outros?
Pulmão dos queijeiros	Queijos e casca	<i>Penicillium caseii</i> <i>Penicillium Roqueforti</i>
Pneumonite de Hipersensibilidade aos Isocianatos	Tintas, lacas, vernizes, espumas	<i>Haptenos</i> (TDI, MDI, HDI)

Para listagem mais pormenorizada e bibliografia respectiva consultar a referência¹⁰.

1.1. As Pneumonites de Hipersensibilidade em Portugal

Em Portugal existem duas formas de PH que se destacam pela sua frequência: a Suberose, que é a forma mais frequente no Norte e reflectindo a concentração desta indústria na região¹², e a Doença dos Criadores de Aves (DCA)¹³⁻¹⁵.

De acordo com os estudos epidemiológicos publicados, estima-se que entre 9 e 19% dos trabalhadores da indústria da cortiça tenham Suberose^{8,9}.

A DCA, definida em meados dos anos 60, resulta da inalação de antigénios provenientes de excrementos e/ou de penas oblongas^{16,17}. Apesar de poder ocorrer com a exposição a várias aves domésticas, a maior parte destes doentes são criadores de pombos. A prevalência em Portugal da DCA em columbófilos oscila entre 2 e 5%¹³⁻¹⁵.

1.2. Breve história da Suberose

A doença respiratória dos corticeiros atraiu desde sempre um enorme interesse nos investigadores portugueses¹⁸.

Foi Vinte-e-Um Mendes quem pela primeira vez, em 1947, fez referência a alterações respiratórias em trabalhadores da indústria da cortiça que poderiam ter a ver com a exposição à poeira da cortiça, tendo proposto a designação destas alterações de *Suberose* (Pneumoconiose produzida pela cortiça – *Suber*)¹⁹. Mais tarde, na década de 60, e após os estudos pioneiros de Lopo Cancellia Abreu e Silva Horta¹⁹⁻²⁴, o grupo de Ramiro Ávila e Thomé Villar, da Faculdade de Medicina de Lisboa, descreveu as várias formas clínicas de apresentação desta doença e a sua relação com a exposição à poeira da cortiça. Assim, para além de quadros de asma brônquica e bronquite crónica foi descrita uma forma de AAE (a mais típica e frequente) com um quadro clínico, apresentação radiológica, achados patológicos e laboratoriais semelhantes às outras AAE então descritas²⁵⁻³¹. Estes autores demonstraram também o papel do *Penicillium frequentans* na Suberose, como o desencadeador da resposta imunológica associada à doença²⁹⁻³¹. De facto, foi possível identificar precipitinas específicas no soro dos doentes com Suberose e induzir alterações funcionais respiratórias após prova de provocação inalatória com aquele fungo²⁷.

Recentemente, dois trabalhos chamam a atenção para a *Chrysonilia sitophila* como fungo dominante em quase todas as fases de processamento industrial da cortiça, o que poderá apontar também para um papel deste fungo nalgumas formas de doença respiratória da indústria da cortiça^{32,33}.

2. APRESENTAÇÃO CLÍNICA

Classicamente descrevem-se três formas clínicas da PH- *aguda, subaguda e crónica*³⁴⁻³⁷. A *forma aguda* é caracterizada por episódios recorrentes de febre, mialgias, tosse seca e dispneia que ocorrem 4 a 8 horas após a exposição ao antigénio e que desaparecem nas 24-48 horas seguintes ao afastamento da sua ocupação, podendo no entanto os sintomas prolongarem-se durante uma semana³⁵. Estes doentes apresentam febre, taquipneia, crepitações nas bases pulmonares e por vezes insuficiência respiratória (Fig. 1).

A *forma crónica* pode apresentar-se por uma sintomatologia intermitente durante vários anos sem haver lesão pulmonar progressiva ou pelo aparecimento dum quadro de fibrose pulmonar sem nunca ter havido anteriormente sintomatologia respiratória muito significativa. Uma proporção importante destes doentes (20 a 40%) apresenta sintomas de bronquite crónica. A expressão *subaguda* é

uma forma intermédia entre a forma aguda e a crónica, correspondendo como que a uma forma aguda mais prolongada. Em virtude das limitações desta classificação alguns autores têm vindo a propor a divisão da PH em *aguda progressiva*, *aguda intermitente não progressiva* e *crónica progressiva* e *não progressiva* de acordo com a evolução clínica e resposta aos corticóides³⁶. Assim, a *forma aguda progressiva* caracterizará os casos graves, geralmente necessitando de internamento hospitalar e com resposta incompleta à terapêutica. Já a *forma aguda intermitente não progressiva*, corresponde aos casos sem grande atingimento clínico/funcional, com sintomas repetidos mas autolimitados. Esta heterogeneidade de apresentação clínica é também patente na Suberose³⁷.

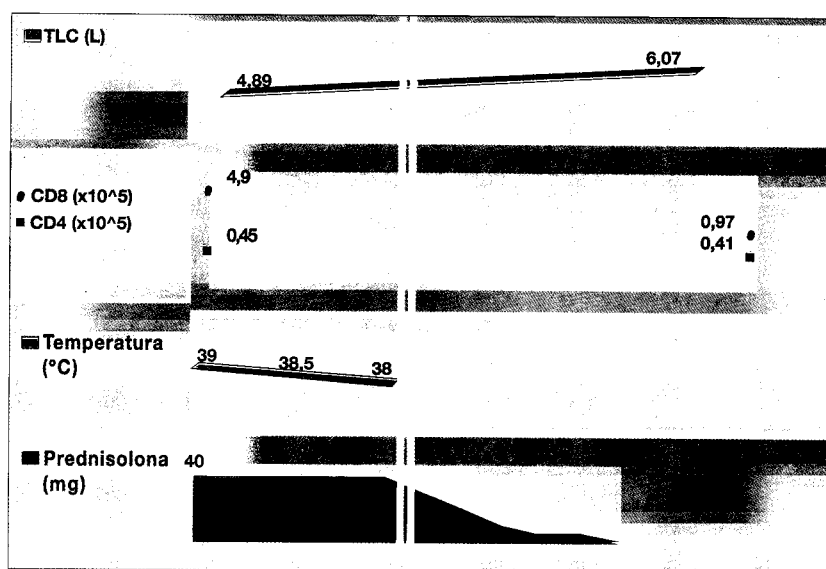


Fig. 1: Evolução clínica de um doente com forma aguda de Pneumonite de Hipersensibilidade (Suberose) – Doente de 31 anos, manobrador, admitido por febre, dispneia, mialgias e emagrecimento, crepitações pan-inspiratórias e leucocitose com neutrofilia. A radiografia de tórax mostrava um padrão s 2/2 e a TAC "vidro despolido" difuso. O exame funcional respiratório síndrome restritivo moderado com hipoxemia em repouso. Foi medicado com eritromicina oral e prednisolona durante 2 semanas. Ao fim de um ano, as provas funcionais estavam normais, a celularidade total do LLBA diminuiu significativamente (sobretudo à custa dos linfócitos CD8+).

As razões para estas diferentes formas de apresentação clínica não são claras, mas podem significar diferenças na intensidade e duração da exposição – por exemplo a exposição de baixa intensidade mas de longa duração tenderá a provocar formas crónicas de PH, enquanto exposição de alta intensidade mas curta duração tende a causar formas agudas de PH³⁴.

3. IMAGIOLOGIA

Nas fases agudas da PH, a radiografia de tórax revela opacidades micronodulares difusas mais evidentes nos lobos inferiores. Este padrão tende a desaparecer após cessar a exposição. A TAC torácica tem uma maior sensibilidade na avaliação radiológica dos doentes com PH, podendo apresentar alterações, mesmo quando a radiografia de tórax é normal³⁸. Tipicamente observam-se nestes doentes um padrão de vidro despolido associado a *micro-nódulos* de localização centri-lobular³⁹⁻⁴¹ (Fig 2-A)

Na doença crônica, as alterações radiológicas predominantes são opacidades lineares e nodulares difusas, sugerindo *fibrose pulmonar*; nesta fase os achados na TAC torácica incluem "pulmão em favo" e *enfisema*³⁹⁻⁴¹ (Fig 2-B).

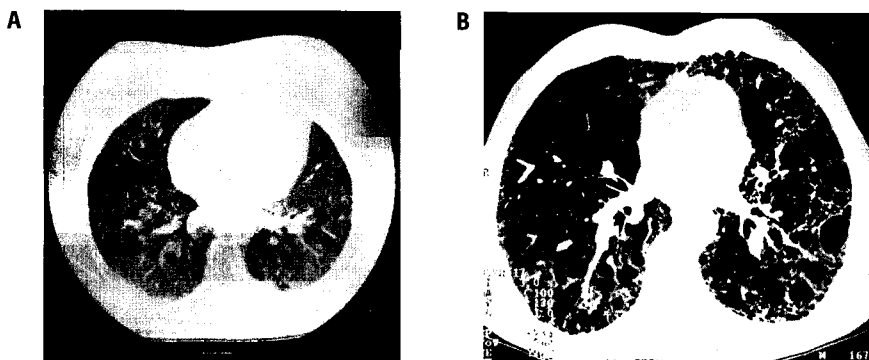


Fig. 2A: TAC de um doente com Suberose (forma aguda) – mostrando áreas de vidro despolido com distribuição geográfica (mesmo doente da figura 1); **B – TAC de um doente com Suberose (forma crônica)** – mostrando áreas de vidro despolido associado a fibrose ("pulmão em favo").

4. IMUNOPATOGÊNESE

A produção de anticorpos para o material antigénico inalado tem sido considerada uma característica fundamental da resposta imunológica nas Pneumonites de Hipersensibilidade. A identificação de anticorpos no soro e LBA de doentes expostos à inalação crônica de antígenos ocupacionais, é um dos argumentos fundamentais a favor da participação da hipersensibilidade de tipo III nesta doença, hipótese levantada por Pepys em 1963 e corroborada, mais recentemente, por modelos experimentais que demonstram o envolvimento da formação de imunocomplexos IgG ou IgA na superfície pulmonar, na activação local de células residentes, produção de citocinas e recrutamento celular. Estudos subsequentes têm evidenciado que a patogenia destas entidades é bastante mais complexa envolvendo,

nas suas fases subagudas e crónicas, a participação das diferentes subpopulações macrofágicas⁴², linfócitos citotóxicos⁴³ e Th1⁴⁴ e as respectivas citocinas⁴⁵, que caracterizam as formas de hipersensibilidade imunológica retardada, de tipo granulomatoso⁴⁶.

4.1. Alveolite subclínica

No início dos anos 80, com a introdução da técnica da lavagem broncoalveolar (LBA), foi possível demonstrar que, para além dos doentes com formas agudas de PH apresentarem aumento significativo dos linfócitos alveolares, também os fazendeiros assintomáticos apresentavam *alveolite linfocítica*, sendo esta mais intensa e frequente na presença de precipitinas positivas. O facto de alguns fazendeiros normais (com precipitinas negativas) apresentarem alveolite subclínica poderia ser explicado por o antigénio responsável ser diferente daquele testado ou dos níveis de IgG específica serem demasiado baixos para serem detectados pelos métodos correntes⁴⁷. Por outro lado, poderia também sugerir a existência de um estágio precoce da doença. Assim, seguiram-se outros trabalhos do mesmo grupo procurando analisar a evolução destas formas de alveolite subclínica: Cormier e col.⁴⁸ demonstraram a manutenção da linfocitose do líquido de LBA (LLBA) em fazendeiros assintomáticos ao fim de três anos de exposição, apesar de não haver deterioração funcional ou radiológica. Estes autores sugeriam ainda que o contacto com o ambiente mantinha a alveolite mas o tipo de actividade também teria influência (aqueles doentes com maior exposição a fungos tinham maior número absoluto de linfócitos). Estudando a evolução a longo prazo (6-7 anos), dos mesmos fazendeiros assintomáticos, este grupo canadiano demonstrou mais tarde⁴⁹ que, apesar de um número significativo de casos terem desenvolvido sintomas de Bronquite Crónica (6 em 33) ou terem alterações radiológicas "de novo" (9 em 33) – mantendo normalidade da DLCO e FVC –, não havia correlação da linfocitose com as alterações radiológicas ou da função respiratória.

À semelhança dos fazendeiros, também os columbófilos assintomáticos tendem a apresentar um certo grau de linfocitose alveolar que é mais intensa nos precipitino-positivos^{14,50}. Parece assim que, apesar de não se poder excluir que alguns destes indivíduos assintomáticos com alveolite possam vir a desenvolver PH, a presença de linfocitose neste grupo não deverá acarretar, só por si, um mau prognóstico.

4.2. Linfócitos e Pneumonite de Hipersensibilidade

Em virtude da possibilidade da presença de uma alveolite subclínica em indivíduos assintomáticos, a linfocitose do LLBA é pouco específica e tem um valor limitado na previsão da gravidade da PH⁵¹. No

entanto, a linfocitose intensa do LLBA pode ter um valor orientativo para o diagnóstico, sendo considerada evocativa de PH no contexto de uma exposição típica (ver 6.3)⁵².

Analisando-se 5 grupos de fazendeiros: uns com formas agudas de PH, outros com antecedentes de PH mantendo-se em actividade, outros com antecedentes de PH mas afastados do ambiente de trabalho, e indivíduos assintomáticos com ou sem precipitinas positivas, verificou-se que a linfocitose não se correlaciona significativamente com as alterações radiológicas ou funcionais dentro de cada grupo^{51,53}. Por outro lado, em doentes com formas agudas de Pulmão de Fazendeiro, o afastamento prolongado (cerca de 7 anos) diminui a intensidade da alveolite, mas o grau da linfocitose aos 7 anos não se correlaciona com a evolução da função respiratória⁵⁴.

4.2.a. Subpopulações linfocitárias

Nos estudos publicados não parece haver um consenso sobre qual o tipo subpopulações de linfócitos predominantes no LLBA destes doentes, embora a maioria refiram o predomínio das células CD8+, resultando numa relação CD4/CD8 baixa⁵⁵⁻⁵⁷. Curiosamente o mesmo tipo de PH (Pulmão do Fazendeiro) apresenta perfil diferente em diferentes regiões. Assim, nalgumas séries europeias a relação CD4/CD8 é baixa ($0,41 \pm 0,1$)^{55,58}, enquanto é elevada em séries do Canadá ($> 1,0$)⁵⁹, bem como no Japão ($3,4 \pm 0,7$)¹¹. Por outro lado a relação CD4/CD8 na DCA parece ser mais variável^{4,60} e o tipo antigénio, exposição (contínua *versus* intermitente), estágio da doença (fase aguda *versus* crónica), tabaco (aumenta a relação CD4/CD8), e outros inalantes inespecíficos parecem ter algum papel no perfil encontrado^{11,61}. Um outro aspecto que interessa analisar é o perfil dos doentes *versus* os assintomáticos: Semenzato e col.⁶² e Keller e col.⁶³ demonstraram que a relação CD4/CD8 não é diferente. Contudo apesar desta semelhança fenotípica, a actividade funcional destes linfócitos era claramente diferente nestes dois grupos^{62,63}: enquanto os linfócitos T do LLBA dos doentes com PF e dos fazendeiros assintomáticos tinham actividade supressora equivalente, já a actividade citotóxica era significativamente maior no primeiro grupo. Por outro lado, Segorbe Luís e col. num estudo englobando 13 columbófilos assintomáticos, demonstraram que estes apresentavam uma proporção significativa de linfócitos T "memória" (CD45RO+) enquanto a relação CD4/CD8 era variável^{4,64}.

4.2.b. Evolução das subpopulações linfocitárias

Num estudo em que foram analisadas, de modo seriado, as subpopulações linfocitárias num grupo de 8 doentes com PF que mantinham a actividade profissional, também não se encontraram diferenças significativas ao fim de 2 anos (isto é, os 5 casos que tinham relação CD4/CD8 baixa, per-

maneceram com relações baixas)⁶⁵. Os mesmos autores, num outro trabalho englobando maior número de doentes, não encontraram diferenças significativas nas relações CD4/CD8 (que estavam normais no grupo total) dos doentes com história prévia de PF, quer se mantivessem expostos quer afastados por vários anos⁵⁹. Drent e col.⁶⁶, num trabalho analisando 59 doentes com DCA, mostram uma relação CD4/CD8 relativamente elevada nos doentes em que a LBA se realizou a menos de 24 horas da última exposição e um aumento das células CD8+ ao fim de 2 dias de afastamento e até 1-12 meses. Em contraste, Reynolds e col.⁶⁷, num grupo de 6 criadores de pombos, mostraram que a provocação inalatória específica aumentava significativamente o número de linfócitos T, sem contudo haver alterações significativas na relação CD4/CD8. Johnson e col.⁵⁰ estudaram 13 doentes com DCA e 5 criadores de pombos assintomáticos com precipitinas positivas, não havendo diferenças significativas da relação CD4/CD8 nos dois grupos e em 6 doentes com DCA reavaliados ao fim de 3 semanas de afastamento. Yoshizawa, por outro lado, analisando o LLBA de modo sequencial num grupo de 14 doentes, mostra que, com o afastamento, os doentes com HP de verão diminuem gradualmente as células CD8⁶⁸, enquanto que nos doentes com DCA estas células diminuem mais lentamente, regressando a relação CD4/CD8 ao normal ao fim de 5 anos⁶⁰. Mais recentemente, num pequeno estudo comparando formas agudas de PF com fazendeiros assintomáticos, houve diferença significativa na relação CD4/CD8 dos dois grupos ($0,9 \pm 0,2$ versus $2,4 \pm 0,5$, respectivamente)⁶⁹. As diferenças encontradas não são necessariamente contraditórias podendo apenas derivar das diferentes populações estudadas⁵⁸. Além disso muitas vezes é difícil distinguir com rigor os doentes que conseguem evitar completamente a exposição, daqueles que mantêm exposição residual a pequenas quantidades do antigénio.

4.3. Citocinas e outros mediadores solúveis na Pneumonite de Hipersensibilidade

Denis e col. demonstraram que os doentes com formas agudas de PF tinham níveis significativamente mais elevados de TNF-alfa e IL-1 no LLBA do que controles saudáveis⁷⁰, o mesmo sucedendo com o MIP-1 alfa e IL-8⁷¹. Por outro lado, as citocinas pro-inflamatórias IL-8 e MCP-1 alfa estavam também presentes em níveis aumentados nas formas agudas de PH de verão⁷². Dakhama e col.⁶⁹ demonstraram que os doentes com formas agudas (ou antecedentes) de PF tinham níveis de IL-2 significativamente maiores no LLBA do que os fazendeiros sintomáticos com precipitinas negativas.

Mais recentemente, Takahashi e col.⁷³ sugerem que a concentração sérica de KL-6 (uma glicoproteína expressa pelos pneumócitos tipo II) é mais elevada nos doentes com formas agudas de PF do que nos indivíduos assintomáticos com precipitinas positivas ou negativas, podendo ter um papel na detecção de formas de PF subclínico.

Os factores fibrogénicos do LLBA têm também recebido alguma atenção, e assim, Bjermer e col.⁷⁴ mostram a existência de um aumento do Hialuronano (HA) e Procolagénio III no LLBA de doentes com formas agudas de PF (comparativamente com controles normais). Larsson e col.⁷⁵ demonstram que os níveis de HA no LLBA distinguem os fazendeiros com PH dos doentes com Alveolite subclínica (precipitino-negativos). Os níveis de HA e procolagénio III também se encontram elevados (embora menos) nos indivíduos expostos com história prévia de PF (há pelo menos 1 ano)⁷⁶. Contudo os níveis destes mediadores fibrogénicos (HA, colagénio tipo III, fibronectina e factor de crescimento dos fibroblastos) não se correlacionaram com a evolução radiológica e funcional ao fim de 6 anos⁷⁷.

Na Suberose, também demonstrámos a existência de níveis aumentados de HA no LLBA de doentes com formas subagudas/crónicas de PH comparativamente com indivíduos com patologia das vias aéreas, correlacionando-se directamente com o número absoluto de linfócitos e mastócitos e com a deterioração funcional⁷⁸.

5. PATOLOGIA/ANATOMIA PATOLÓGICA

A histologia é principalmente caracterizada pela presença de granulomas não caseosos, geralmente pequenos e mal formados, acompanhados por um infiltrado intersticial linfocítico difuso, com a presença de plasmócitos e macrófagos espumosos nos espaços alveolares^{79,80} (Fig. 3).

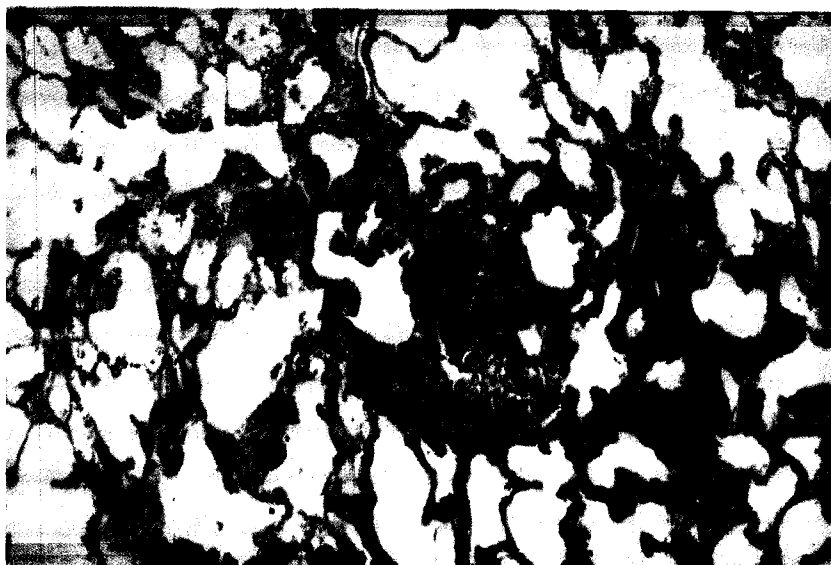


Fig. 3: Biópsia pulmonar de um doente com Pneumonite de Hipersensibilidade. Presença de histiócitos epitelióides com constituição de granuloma mal formado, não necrotizante. Associadamente observa-se infiltrado inflamatório mononucleado intersticial.

A fibrose das paredes alveolares pode estar presente em vários graus⁸⁰. Os mastócitos aparecem em número aumentado, sobretudo junto dos septos alveolares e nas formas agudas⁸¹. A pneumonia organizativa está frequentemente presente, com 15 a 25% dos doentes com PH a apresentarem bronquiolite obliterante com pneumonia organizativa (BOOP)⁸². A histopatologia nem sempre é decisiva no diagnóstico, visto que as suas alterações principais, nomeadamente a presença de granulomas, está ausente em 30% de casos, além de poder ser difícil a distinção de outras patologias granulomatosas^{79,80}.

6. DIAGNÓSTICO

Apesar de estarem propostos mecanismos comuns na etiopatogenia e imunopatologia das diferentes entidades clínicas das PH, a heterogeneidade e complexidade do material antigénico inalado nos diferentes ambientes ocupacionais, poderá originar diferenças nas características clínico-laboratoriais das várias entidades incluídas neste grupo^{11,61}.

Não há uma única característica clínica ou laboratorial que seja diagnóstica de PH¹⁻³. Assim, o diagnóstico deve assentar numa combinação de sintomas, sinais, alterações radiológicas, da função respiratória e testes imunológicos. De uma maneira geral, perante um doente com exposição repetida a antigénios reconhecidamente causadores de PH (Quadro I) com dispneia, tosse seca, crepitações inspiratórias, muitas vezes com sintomas constitucionais (perda de peso, astenia, mialgias) associadas a um síndrome ventilatório restritivo e/ou defeito de difusão, deve ser colocada a hipótese diagnóstica de PH. A melhoria dos sintomas após o afastamento é uma pista importante, embora nalguns casos possam persistir os sintomas respiratórios por períodos prolongados de afastamento. A radiografia de tórax é útil para excluir outras doenças, e a normalidade do LLBA exclui quase definitivamente o diagnóstico. As formas crónicas de PH, com sintomas mais insidiosos, são mais difíceis de diagnosticar, e apresentam-se frequentemente no contexto de quadro clínico de "Fibrose Pulmonar", havendo por vezes necessidade de recorrer a métodos mais invasivos (biópsia pulmonar e provocação específica)⁸³.

6.1. Provas Funcionais Respiratórias

A avaliação funcional respiratória mostra tipicamente um síndrome ventilatório restritivo, habitualmente com defeito de difusão. Existe ainda um subgrupo de doentes com PH em que é evidente um padrão obstrutivo^{36,37,84}. Nestes casos, a presença de bronquiolite e/ou enfisema pode explicar as alterações ventilatórias encontradas. Por outro lado, muitos doentes com PH (20 a 40%) mostram hiper-reatividade brônquica^{85,86}, chegando alguns deles a desenvolver asma brônquica^{36,37,87}.

A cicloergometria, para além de permitir uma avaliação correcta da capacidade de trabalho⁸⁸, é um teste mais sensível na detecção do compromisso intersticial do que a avaliação funcional em repouso^{84,89}.

6.2. Imagiologia

A PH não se consegue distinguir radiologicamente de outras doenças intersticiais. A radiografia de tórax pode ser normal ou mostrar padrão nodular ou fibrose dependendo da fase da doença⁴¹. A TAC (sobretudo de alta resolução) tem maior sensibilidade e especificidade, podendo ainda ajudar a direccionar a biópsia pulmonar, no caso dela estar indicada³⁸⁻⁴⁰.

6.3. Lavagem Broncoalveolar

A análise do líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA), constitui um procedimento importante, não só na investigação como no diagnóstico desta doença⁹⁰, revelando normalmente uma alveolite linfocítica intensa (> 40%) com predomínio de células CD8⁵⁵⁻⁵⁸ (Fig. 4). Além desta alteração, observam-se, com alguma frequência, a presença de um número aumentado de mastócitos e plasmócitos^{91,92}. Vários autores consideram que na presença de um quadro clínico compatível, com alterações funcionais e radiológicas características, associadas a uma exposição evidente, a presença de um LLBA com os achados referidos é suficiente para estabelecer o diagnóstico^{3,52,58}.

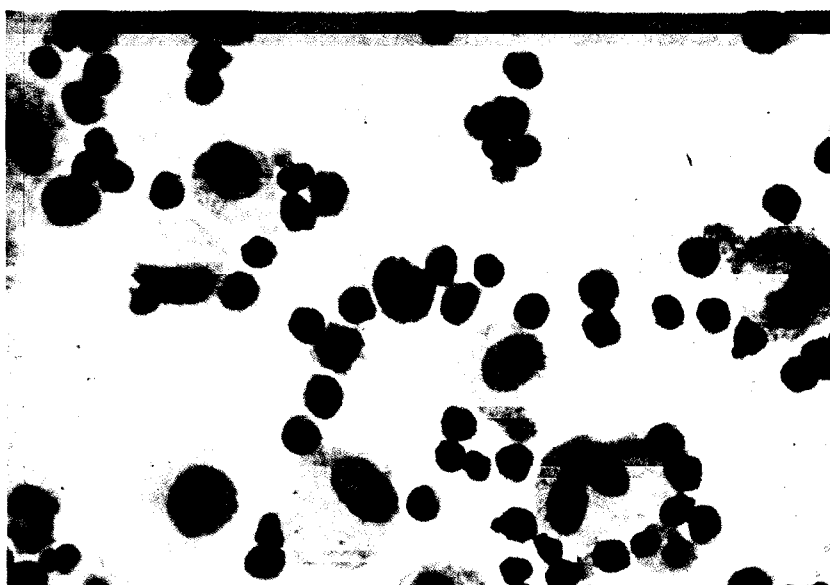


Fig. 4: Alveolite linfocítica típica de um doente com Suberose. Esfregaço de citocentrífuga corado pelo Wright-Giemsa.

O LLBA tem diferentes características conforme a altura da doença em que for efectuado^{66,67,93}. Assim, 6-24 horas após a exposição ao antigénio, observam-se as contagens mais elevadas dos neutrófilos e eosinófilos, estando, contudo, o número de linfócitos e o de mastócitos também aumentado. Ao fim de 2-7 dias de exposição, os neutrófilos diminuem, encontrando-se nesta altura os níveis mais elevados de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos. Um mês a um ano após a exposição, os eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos regressam ao normal, persistindo o número aumentado de linfócitos e mastócitos. Assim, Haslam e col. mostram que os mastócitos são células particularmente associadas à PH, encontrando valores do LLBA > 3% apenas nesta patologia⁹². Contudo têm sido também encontrados valores aumentados no LLBA em fazendeiros assintomáticos⁹⁴ e em doentes com antecedentes de formas agudas de PF já afastados⁹⁵, o que faz diminuir a sua especificidade.

A presença de mastócitos no LLBA está também associada à pneumonite de hipersensibilidade na Suberose e particularmente naqueles com maior compromisso funcional do interstício pulmonar⁹⁶.

Outra característica do LLBA nas PH é a presença de plasmócitos, com valores que variam entre 0,1 e 3,9%⁹¹.

Mas, a característica principal do LLBA no decurso da doença é a linfocitose. Muito recentemente demonstrou-se que uma das razões para a acumulação de um grande número de linfócitos na pneumonite de hipersensibilidade é a diminuição da sua apoptose⁹⁷. Geralmente, a alveolite linfocítica é mais intensa que em outras patologias que também cursam com linfocitose (como a sarcoidose), usualmente acima de 50% do número total de células^{57,58,98,99}. Esta linfocitose caracteriza-se por ser geralmente de predomínio CD8, apresentando uma relação CD4/CD8 baixa^{57,58,98,99} – Quadro II. Estes valores podem variar com a evolução da doença, apresentando alguns doentes, com o tempo, um aumento das células CD4, com uma elevação da relação CD4/CD8^{58,68}. Foi também observado no LBA desta patologia um aumento significativo dos marcadores das células NK CD56 e CD57, não havendo expressão do CD16^{3,62}.

QUADRO II: Linfócitos e Subpopulações no LLBA de alguns estudos publicados

Doença	Autores [ref]	Sintomáticos		Assintomáticos (Prec. +)			CD4/CD8
		N	%Linf	CD4/CD8	N	%Linf	
D. Criadores de Aves	<i>Johnson</i> ⁴⁹	13	44,0±14,0	0,9±0,3	5	29,0±19,0	1,1±0,6
	<i>Segorbe Luís</i> ⁶³				10	25,0±14,0	1,4±0,8
Pulmão do Fazendeiro	<i>Semenzato</i> ⁶¹	16	77,8±4,8	0,5±0,1	6	36,3±6,4	0,9±0,2
PH de Verão	<i>Ando</i> ¹⁰	197	69,0±1,0	0,6±0,1			
Suberose	<i>Delgado</i> ¹⁰⁶	9	74,4±6,6	0,3±0,1			

PH de Verão-Pneumonite de Hipersensibilidade do Verão (Japão); Linf-Linfócitos; Prec +-preципinas positivas

6.4. Outros exames complementares de diagnóstico

6.4.a. Precipitinas

A importância relativa dada aos anticorpos precipitantes no diagnóstico da PH tem sofrido algumas modificações nos últimos anos.

Se antigamente a presença de precipitinas para o antígeno envolvido era considerado o "*gold-standard*" para o diagnóstico, hoje em dia, a sua presença é considerada um marcador de exposição antigénica e não necessariamente da doença¹⁰⁰. Assim, enquanto em criadores de pombos assintomáticos, a prevalência de precipitinas é de 30 a 60%¹⁰¹, em fazendeiros assintomáticos é de 10,8%¹⁰². No caso da indústria da cortiça, a positividade das precipitinas varia entre os 16 e os 32%^{8,9} nos trabalhadores expostos, enquanto que nos doentes com PH ela é de 81%²⁶.

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. A utilização de métodos imunoenzimáticos, mais sensíveis, tem permitido uma quantificação mais precisa desses anticorpos e uma melhor caracterização da sua especificidade¹⁰³⁻¹⁰⁶. Na Suberose, a utilização de um método de doseamento fluoro-enzimo-imunológico de anticorpos IgG para o *Penicillium frequentans* permitiu encontrar níveis elevados no soro e LLBA de doentes com PH (incluindo em doentes com precipitinas séricas negativas) e, inclusivamente, encontrar uma correlação significativa dos seus níveis no LLBA com as alterações funcionais respiratórias¹⁰⁷.

O *immunoblotting* é um método útil para caracterizar diferenças qualitativas e quantitativas dos anticorpos produzidos contra antígenos complexos^{108,109}, tendo uma sensibilidade maior que os métodos tradicionais¹¹⁰ e permitindo o reconhecimento de antígenos "*major*" em várias formas de pneumonite de hipersensibilidade^{111,112}.

6.4.b. Biópsia Pulmonar

O recurso à biópsia pulmonar transbrônquica ou por toracoscopia raramente é necessário, uma vez que os seus achados não são patognomónicos⁷⁹ e também porque o contributo da imagiologia, serologia e do LLBA se têm mostrado de grande valia no diagnóstico da PH. Assim, apenas em circunstâncias muito pontuais (como em casos graves ou clinicamente atípicos) a biópsia pulmonar poderá estar indicada¹¹³. Nestes casos, o achado de granulomas mal formados, associado a infiltrado inflamatório com predomínio peri-bronquiolar, pode sugerir o diagnóstico⁷⁹.

6.4.c. Provação inalatória específica

A provação inalatória específica no contexto do diagnóstico de PH já foi descrita há alguns anos¹⁴. São usados aerossóis contendo o antigénio envolvido, sendo considerada positiva quando são desencadeados os sintomas e sinais da forma aguda; essa resposta ocorre 3 a 8 horas após a inalação do antigénio responsável, com febre, diminuição de pelo menos 15% da difusão de CO, crepitações à auscultação pulmonar, linfocitose e neutrofilia no LLBA. Nalguns casos observa-se um padrão de resposta bi-fásico, com uma resposta imediata "obstrutiva", seguida de resposta típica, "intersticial", tardia. É o caso da Suberose, em que a provação inalatória empregando antigénios de cortiça bolorenta e *Penicillium frequentans*, induz respostas brônquicas e intersticiais, independentemente do tipo de manifestações clínicas apresentadas (formas de PH, versus formas obstrutivas)²⁹. Apesar de serem muitas específicas, estas provas não são recomendadas na rotina, pois são difíceis de standardizar, impõem algum risco para o doente e o diagnóstico, na grande maioria dos casos, pode ser realizado por métodos menos agressivos. A observação do doente após a exposição ao antigénio suspeito no ambiente habitual⁵, com registo da temperatura e estudo funcional respiratório poderá ser também um elemento importante para o diagnóstico – o chamado "*workplace challenge*".

Apesar das dificuldades de padronização da metodologia, alguns autores propõem o recurso à provação inalatória específica para a confirmação dos casos duvidosos de PH, particularmente quando indistinguíveis de casos de Fibrose Pulmonar Idiopática. Neste contexto, muito recentemente um grupo japonês defende a utilidade desta prova no diagnóstico de formas crónicas de DCA⁸³.

6.5. Critérios de diagnóstico de Pneumonite de Hipersensibilidade

Têm sido propostos diferentes critérios de diagnóstico de PH, sendo um dos mais citados os de Richerson e col.¹¹⁵. Recentemente, outros autores, baseados no facto das recomendações de Richerson e col. se limitarem sobretudo às formas agudas, têm sugerido algumas alterações¹¹⁶, estando inclusivamente a decorrer uma validação prospectiva, multicêntrica, de critérios diagnósticos de PH¹¹⁷. Assim, um diagnóstico clínico de PH deve ser baseado sempre numa história de exposição a um agente causal, sinais e sintomas típicos e dados laboratoriais. No quadro III encontram-se discriminados os critérios baseados nas recomendações da American Thoracic Society¹¹⁶.

QUADRO III: Critérios diagnósticos de PH (adaptado da ref ¹¹⁶)

Critérios Major:

- Exposição antigénica específica
- Dispneia de esforço
- Crepitações inspiratórias
- Alveolite linfocítica (se se realizar LBA*)

Critérios Minor:

- Episódios febris recorrentes
- Infiltrados na radiografia de tórax
- Diminuição da DLCO
- Precipitinas para os antígenos envolvidos
- Granulomas na biópsia pulmonar
- Melhoria com a evicção antigénica

* Na presença de dois ou mais critérios minor a confirmação da linfocitose no LLBA não é necessária.

7. TRATAMENTO

O diagnóstico precoce e a evicção antigénica são as pedras angulares do tratamento¹¹⁸. Por vezes, sobretudo quando a exposição é de origem doméstica, a evicção alérgica pode ser muito difícil¹¹⁹. O uso de máscaras faciais e algumas medidas de higiene industrial podem ser necessárias para um melhor controlo da doença¹²⁰.

Os corticosteróides estão recomendados nos casos agudos, severos e na doença progressiva. No PF o único ensaio randomizado em dupla ocultação demonstra que os doentes a quem foi administrado prednisolona, durante 8 semanas, obtiveram melhoria mais significativa do defeito de difusão, mas contudo sem efeito benéfico a longo prazo¹²¹. Teoricamente os corticóides inalados poderiam ser usados com vantagens sobre os corticóides orais. No entanto, apenas um estudo (publicado em resumo) sugere que doses elevadas de dipropionato de beclometasona inalada podem atingir resultados semelhantes aos corticóides orais (sem os seus efeitos adversos) em doentes com formas subagudas/crónicas de PH¹²². Recentemente, em modelos experimentais de PH, foi demonstrado que a eritromicina reduz a inflamação neutrofílica pulmonar, podendo pois vir a ser eficaz no tratamento de formas agudas de PH¹²³.

8. PROGNÓSTICO/EVOLUÇÃO

Alguns trabalhos de seguimento a longo prazo de doentes com PH demonstram uma boa evolução, incluindo aqueles que mantêm contacto com a fonte antigénica¹²⁴⁻¹²⁷. Contudo o prognóstico varia consideravelmente com o tipo de PH ou a localização geográfica. Assim, os doentes canadianos com PF têm normalmente um bom prognóstico¹²⁶ enquanto os doentes finlandeses apresentam maior compromisso funcional e maior mortalidade¹²⁸. Por outro lado, os doentes europeus com DCA têm boa evolução funcional^{124,125} ao passo que os doentes mexicanos têm uma mortalidade de 30% aos 5 anos¹²⁹. Este pior prognóstico das formas de DCA no México pode ser explicado (em parte) pela natureza da exposição antigénica (exposição doméstica de baixa intensidade originando um quadro clínico mais insidioso). Por outro lado, algumas séries europeias, incluindo um pequeno número de doentes, mostram que o período de exposição após o início dos sintomas e a idade parecem ser os factores mais importantes a determinar recuperação da função respiratória¹²⁴. Na experiência dos autores mexicanos, são a gravidade da fibrose na biópsia, a idade avançada e o padrão radiológico "em favo" os mais importantes factores de mau prognóstico¹²⁹.

Nos estudos fisiológicos a longo prazo, envolvendo doentes com formas agudas de PF, constata-se que a maior parte da recuperação ocorre ao fim de 1 mês¹²⁷, sendo a difusão de CO o parâmetro mais frequentemente alterado ao fim de 5 anos^{127,130}. Além disso, não é possível constatar diferenças significativas da função respiratória dos doentes que se afastaram do ambiente profissional daqueles que mantiveram exposição^{126,127}. Mais recentemente, Pekkanen e col. num estudo caso-controlo confirmam a redução significativa da difusão de CO ao fim de 14 anos dos doentes com PF comparativamente com fazendeiros assintomáticos¹³¹. Estes autores demonstram ainda que 16% dos doentes com PF e 14% dos controles são diagnosticados de asma durante o seguimento, sugerindo uma susceptibilidade aumentada destes doentes para desenvolverem patologia brônquica¹³¹.

Na Suberose, constatámos que a recuperação da função pulmonar ocorre para a maioria dos parâmetros até ao 2º ano de afastamento, sendo a melhoria da PaO₂ mais precoce¹³².

Embora neste momento não haja dados seguros que façam prever a evolução de cada caso individual, será aconselhável, em primeiro lugar, sugerir o afastamento precoce; se tal não for possível, deve diminuir-se o mais possível a exposição (implementando medidas de higiene industrial) e proporcionar-se um seguimento clínico/funcional apertado.

ASMA OCUPACIONAL

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracterizada por obstrução brônquica episódica e reversível¹³³. Trata-se de uma patologia frequente, afectando aproximadamente 500.000 portugueses¹³⁴. À medida que a morbilidade e a mortalidade da asma continua a aumentar em todo o mundo, tem-se tido a percepção de que vários alergénios ocupacionais são importantes factores etiológicos desta doença¹³³. Assim, hoje em dia, na maioria dos países em desenvolvimento, a asma induzida pelo ambiente profissional é mais prevalente do que as pneumoconioses¹³⁵.

1. DEFINIÇÃO

Segundo a definição mais recentemente aceite¹³⁵, *asma ocupacional* (AO) é uma doença caracterizada por limitação variável do fluxo aéreo e/ou hiperreactividade brônquica devidas a causas e condições atribuíveis a um determinado ambiente ocupacional e não a estímulos encontrados fora do local de trabalho. Dois tipos de AO se podem distinguir dependendo de se apresentarem ou não após um período de latência: 1) AO *imunológica*, que aparece após um período de latência necessário para adquirir "sensibilização"; e 2) AO *não imunológica* também chamada de asma induzida por irritantes. A AO imunológica é a mais frequente, podendo distinguir-se dois tipos: a *IgE-dependente* e a *IgE-independente* (sendo esta a mais frequente e caracterizando-se por um período de latência mais curto). É ainda clássico separar os tipos de AO em induzidos por agentes de *alto peso molecular* (> 5kDa) e de *baixo peso molecular* (<1kDa). Enquanto os primeiros incluem proteínas de origem animal, vegetal ou bacteriana, os segundos incluem uma variedade de compostos químicos (como os isocianatos), ao todo contribuindo para os mais de 200 agentes etiológicos da AO¹³⁶. Os fungos, tradicionalmente ligados à Pneumonite de Hipersensibilidade, têm sido também relacionados com a etiologia da asma ocupacional, nomeadamente a *Chrysonilia sitophila* na indústria da madeira¹³⁷ e o *Aspergillus niger* na indústria de biotecnologia¹³⁸. No quadro IV estão descritos os agentes mais representativos dentro de cada um dos grupos.

QUADRO IV: Agentes indutores de Asma Ocupacional

Agentes	Indústria ou Profissão
<i>Alto peso molecular</i>	
Alergêneos animais	Trabalhadores de laboratórios, criadores, processadores de marisco
Cereais	Padeiros, moleiros
Enzimas (subtilisina, tripsina)	Farmacêuticos, Indústria dos detergentes
Insectos (ácaros)	Fazendeiros, Indústria dos cereais
Látex	Profissionais da Saúde, Indústria das luvas
Fungos	Indústria da madeira, biotecnologia
Psyllium	Farmacêuticos
<i>Baixo peso molecular</i>	
Anidridos	Indústria de resinas e plásticos
Antibióticos (penicilina)	Profissionais da saúde, Farmacêuticos
Corantes	Têxteis
Glutaraldeído, formaldeído	Profissionais da saúde
Colofónio	Indústria electrónica, soldadores
Isocianatos	Indústria de plásticos, borracha e espuma. Pintura a "spray"
Metais (platínio, níquel, etc)	Trabalhadores de refinarias
Madeiras	Carpinteiros, Madeiros

Adaptado de Mihalas¹³⁹. Para uma consulta mais detalhada, ver referência¹³⁶ ou <http://www.remcomp.com/asmanet/asmapro/agents.htm> e www.asthme.csst.qc.ca.

2. PREVALÊNCIA

A prevalência de asma ocupacional depende dos critérios para a sua definição e tipo de população estudada¹⁴⁰. Assim, os números provenientes de registos nacionais do Reino Unido e Finlândia¹⁴¹ revelam que 4,8% dos casos de asma recém-diagnosticados são de origem ocupacional. Um estudo prospectivo recente de base populacional mostrou que 0,2 a 0,5% dos adultos jovens europeus têm asma ocupacional ou agravada pelo trabalho, sendo mais frequente em fazendeiros, pintores e trabalhadores da indústria dos plásticos¹⁴². Num trabalho semelhante, Johnson e col. obtiveram uma prevalência de 15,7% de AO na população de asmáticos de seis comunidades do Canadá¹⁴³. Analisando um grupo de doentes com asma de uma consulta hospitalar, Tarlo e col. concluíram que 5% apresentavam provável AO¹⁴⁴. Assim, para além do tipo de estudo, a prevalência parece variar de país para país, dependendo dos padrões de emprego locais; por exemplo, na Finlândia há mais AO nos fazendeiros porque esta profissão é muito prevalente; por outro lado, os estudos que incluem profissões com elevado risco para AO como os padeiros, irão obter números mais elevados.

De acordo com o registo nacional SWORD ("Surveillance of work-related and occupational respiratory disease") no Reino Unido, nos últimos 10 anos a asma ocupacional é a doença respiratória ocupacional mais frequente, correspondendo a 25-30% dos casos¹⁴⁵. Quanto aos agentes mais frequentemente responsáveis por AO, eles pertencem ao grupo dos de alto peso molecular^{143,145}.

Em Portugal tem havido alguns estudos epidemiológicos em vários ambientes ocupacionais. Assim, em trabalhadores de silos de cereais, Duarte e col.¹⁴⁶ encontraram uma prevalência de Asma brônquica em 8% dos trabalhadores. Já Torres da Costa e col.,¹⁴⁷ referem uma prevalência de sintomas respiratórios de carácter ocupacional em 10,8% dos trabalhadores na indústria têxtil. Na indústria da cortiça, embora não haja estudos de prevalência da asma, nos vários estudos epidemiológicos da Suberose, verifica-se que as queixas brônquicas oscilam entre os 46%²⁷ e mais de 50%⁸.

3. FACTORES DE RISCO

Vários factores aumentam o risco de desenvolver AO, incluindo factores genéticos e ambientais^{139,148}. O tipo e duração da exposição, bem como o nível de exposição são importantes. Após a exposição a sais de platínio, 46% dos trabalhadores desenvolvem AO, enquanto a prevalência é bem menor noutras indústrias¹⁴⁹. Assim, a sensibilização a determinado alergénio será maior, quanto maior a exposição. Por outro lado, a atopia (isto é a propensão para produzir IgE a alergénios ambientais, habitualmente definida pela pápula nos testes cutâneos tipo "prick") é considerada um factor de risco para a AO induzida por agentes de alto peso molecular. Assim, a prevalência de AO é maior nos profissionais da saúde atópicos expostos a alergénios originados das luvas de látex^{139,148}. Por último, o tabagismo aumenta o risco de AO mediada por IgE, tal como nos trabalhadores de laboratórios com animais de experiência ou trabalhadores da indústria dos metais pesados^{139,148}. A atopia e o tabagismo não são determinantes para agentes que induzem AO não IgE-mediada. Assim, para a maioria dos agentes de baixo peso molecular que causam AO não IgE-mediada (como por exemplo os isocianatos e o cedro vermelho) os indivíduos não atópicos e não fumadores estão em maior risco do que os atópicos e fumadores¹⁴⁹.

4. FISIOPATOLOGIA

Os agentes de alto peso molecular comportam-se como antigénios completos enquanto os de baixo peso molecular podem funcionar com haptenos: necessitam de reagir com proteínas transpor-

tadoras autólogas ou heterólogas (especificamente macromoléculas humanas como a albumina) para produzirem um antígeno completo. Quando a IgE se forma em resposta à exposição a estes antígenos completos ou complexos hapteno-transportador, a exposição subsequente ao agente antigénico pode resultar na reacção com a IgE fixada aos mastócitos tecidulares, induzindo a cascata de eventos que resultam na libertação de mediadores inflamatórios, sendo o desfecho final a resposta clínica conhecida como Asma¹⁵⁰. Normalmente a sensibilização mediada pela IgE envolve o processamento do antígeno por células acessórias (por exemplo células dendríticas) que apresentam o antígeno aos linfócitos T auxiliares. As células T activadas (Th2) produzem citocinas (por exemplo IL-4) que estimulam as células B a produzirem anticorpos IgE-específicos. Os mastócitos e os basófilos libertam histamina e outros mediadores durante a resposta alérgica precoce; as citocinas produzidas estimulam o influxo de células inflamatórias características da fase tardia. Por outro lado, agentes como os isocianatos raramente produzem respostas IgE específicas, ocorrendo, a activação preferencial de linfócitos T CD8+. No entanto, estas células são também capazes de produzir citocinas (como a IL-5, IL-2 e o IFN-gama) conduzindo a perpetuação da inflamação das vias aéreas¹⁵¹.

Existem, pois, vários mecanismos fisiopatológicos comuns à Asma Ocupacional e à Asma não ocupacional. A característica fisiopatológica comum é a inflamação das vias aéreas¹⁵⁰. Este aspecto tem sido investigado em humanos e modelos animais, através do recurso a provocação brônquica, estudo do líquido de lavagem broncoalveolar, esputo induzido e biópsias brônquicas. Estes estudos têm demonstrado que as alterações inflamatórias das vias aéreas nos doentes com asma ocupacional são semelhantes aos casos com asma não ocupacional¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Para além disso não há diferença nos achados patológicos das vias aéreas entre os casos de AO devidos a agentes de baixo ou alto peso molecular. Existe um aumento da espessura da parede da via aérea, edema, hipertrofia do músculo liso, aumento da fibrose subepitelial, descamação epitelial e, nos casos mais graves (asma fatal), obstrução do lumen brônquico por exsudato e muco. Os linfócitos T, eosinófilos e mastócitos são as células principais, havendo um aumento dos eosinófilos e células T activadas nas camadas mucosa e submucosa e um aumento dos mastócitos no epitélio¹⁴⁸⁻¹⁵¹.

5. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de AO deve considerar-se em cada caso de asma iniciando-se ou agravando-se na idade adulta. Primeiro deve estabelecer-se a existência de asma e depois a sua relação com o trabalho. Para o diagnóstico é necessário uma história compatível, a presença de obstrução variável das vias aéreas ou, na sua ausência, a hiperreactividade brônquica à metacolina ou histamina^{148,149,152,153}.

Deve suspeitar-se de AO na presença de tosse, sibilância ou dispneia após exposição laboral e que melhoram aos fins-de-semana ou férias, reaparecendo com o regresso ao trabalho. A existência de um período de latência de meses ou anos antes do início dos sintomas e a presença prévia de sintomas nasais, oculares ou urticária, são altamente sugestivos de uma doença mediada por IgE. A asma induzida por irritantes ou síndrome de disfunção reactiva das vias aéreas (RADS), deve diagnosticar-se na presença de sintomas do tracto respiratório inferior, 24 horas após uma exposição inadvertida a tóxicos (por ex: cloro, amónia) ou fumos. Contudo, uma história clínica sugestiva de AO, mesmo num trabalhador exposto a um agente sensibilizante conhecido, não é suficiente para fazer o diagnóstico; os questionários são pois sensíveis mas não específicos. Daí que habitualmente se recorra a testes objectivos para confirmar o diagnóstico de Asma Ocupacional.

5.1. Testes imunológicos

Apesar de geralmente não estarem disponíveis de uma forma padronizada, os testes cutâneos "prick" preparados com proteínas encontradas no local de trabalho têm sido usados na investigação das doenças ocupacionais alérgicas^{149,154}. Os testes cutâneos positivos são indicadores sensíveis de AO nas formas IgE-mediadas. Contudo, a presença de reactividade cutânea imediata ou o aumento de anticorpos IgE ou IgG específicos no soro (detectáveis por métodos "*in vitro*" como o RAST) pode reflectir apenas exposição ou sensibilização e não doença, sendo o seu valor também dependente do tipo de agente envolvido. Assim, enquanto em trabalhadores da indústria do marisco com asma, a probabilidade de AO em doentes com testes cutâneos ou RAST positivos a extractos de marisco, é elevada, em indivíduos expostos a isocianatos não se pode excluir AO mesmo na presença de testes cutâneos ou IgE e IgG específicas negativas¹⁵⁵.

Nas formas não IgE-mediadas, testes de estimulação celular pelos antigénios, como a libertação de citocinas por estimulação de células mononucleares "*in vitro*" têm sido recentemente descritos. Berstein e col.¹⁵⁴ demonstraram que a produção estimulada "*in vitro*" de Proteína-1 Quimiotáctica para os Monócitos (MCP-1), a partir de células mononucleadas do sangue periférico, está aumentada nos doentes com asma a isocianatos, com uma sensibilidade de 79% e especificidade de 91%. No futuro, a aplicação deste novo método poderá ser também útil no diagnóstico de outros casos de asma ocupacional.

5.2. Provas Funcionais Respiratórias

Apesar do diagnóstico de Asma poder ser confirmado pela presença de obstrução reversível das vias aéreas (aumento do volume expiratório máximo no 1º segundo – VEMS – de mais de 15% após

a inalação de um β_2 agonista), a maior parte dos trabalhadores com suspeita de AO têm espirometria normal. Além disso, a monitorização do VEMS antes e após o trabalho não é suficientemente sensível ou específica para o diagnóstico de AO¹⁵⁵. Assim o recurso à avaliação da hiperreatividade brônquica (HRB) parece ser mais sensível: um teste de HRB negativo à metacolina, após um período de exposição significativo, praticamente exclui o diagnóstico de asma (ocupacional ou não ocupacional)¹⁴⁹. Se a prova de HRB for positiva deve recorrer-se ao registo de Débito Expiratório Máximo Instantâneo (DEMI) seriado. Este método tem-se revelado como o mais útil no diagnóstico da AO, consistindo na avaliação do DEMI de 2 em 2 horas, durante pelo menos 2 semanas em actividade laboral, seguido de 1 semana a 10 dias em período de afastamento¹⁵⁵. No caso deste teste se revelar negativo, devem realizar-se provas de provocação inalatória específica¹⁵⁶. Nestas provas, consideradas o "gold-standard" do diagnóstico, os indivíduos são expostos a doses controladas do agente suspeito em câmaras de provocação, medindo-se de forma seriada a função respiratória. Em virtude de estarem limitadas a centros especializados e de haver muitos casos em que o agente sensibilizante não está suficientemente caracterizado, tem-se recorrido a provas de provocação no local de trabalho ("*workplace challenge*") usando o mesmo protocolo^{152,154-156}. Recentemente, numa revisão das provocações inalatórias específicas, Lemière e col.¹⁵⁷ encontraram respostas alveolares em 5% dos casos de Asma Ocupacional, sobretudo nos casos expostos a agentes de baixo peso molecular. Estes dados confirmam as dificuldades em estabelecer, por vezes, uma fronteira entre o envolvimento das vias áreas e do pulmão profundo em doentes expostos a agentes potencialmente indutores de patologia respiratória ocupacional.

Objetivos Propostos

Depois da revisão que fizemos, a nossa investigação sobre a doença respiratória dos trabalhadores da indústria da cortiça, procurou responder às seguintes questões:

As diferentes formas de pneumonite de hipersensibilidade têm apresentação clínica, evolução fisiopatológica e prognóstico variáveis, sendo também heterogêneas as características da alveolite.

Será possível, recorrendo a métodos auxiliares de diagnóstico mais recentes, chegar a uma caracterização clínica e laboratorial mais precisa da pneumonite de hipersensibilidade da Suberose?

Nos diferentes estudos epidemiológicos da Suberose foi sempre uma constante uma prevalência elevada de queixas brônquicas. Paralelamente, nas descrições iniciais da Suberose, a provocação inalatória com cortiça bolorenta originava, simultaneamente, uma queda dos débitos expiratórios e alterações de tipo intersticial (por exemplo, redução da difusão de CO, crepitações à auscultação pulmonar). Estas observações levantam necessariamente dificuldades na interpretação diagnóstica que, associadas à dificuldade da estandardização destas provas e aos seus riscos inerentes, tornam difícil a sua utilização como elemento complementar de diagnóstico.

Assim sendo, será que a monitorização clínica e funcional destes doentes em actividade laboral e em afastamento será uma boa alternativa para apoiar o diagnóstico de asma ocupacional na indústria da cortiça?

Por outro lado, quer a Asma quer as Pneumonites de Hipersensibilidade acompanham-se de hiperreactividade brônquica inespecífica que, na Asma, está claramente associada a inflamação das vias aéreas. A lavagem broncoalveolar tem sido um método largamente utilizado na caracterização da inflamação da Asma Brônquica e na orientação diagnóstica das diferentes formas de apresentação clínica da Suberose.

Na presença de queixas brônquicas sugestivas de asma ocupacional nos corticeiros, será possível demonstrar a existência de inflamação brônquica e simultaneamente excluir uma alveolite linfocítica?

Os fungos são capazes de condicionar sensibilização alérgica e são uma das causas descritas de asma ocupacional por agentes de alto peso molecular.

Será a asma ocupacional dos corticeiros mediada imunologicamente por sensibilização aos fungos que mais frequentemente colonizam a cortiça?

O *Penicillium glabrum* (designação actual do *Penicillium frequentans*) tem sido descrito como o principal antigénio causal da Suberose. No entanto, entre os fungos frequentemente isolados da cortiça, a *Chrysonilia sitophila* está também associada a doença respiratória na indústria das madeiras. Por outro lado, o despiste da sensibilização a fungos do ambiente ocupacional, através de testes imunológicos como as "precipitinas", não é hoje significativo para o diagnóstico, não só porque traduzem essencialmente exposição mas também pela sua baixa sensibilidade e reprodutibilidade.

Será possível desenvolver testes imunológicos mais sensíveis que as precipitinas sem perda da sua especificidade? Será possível identificar antigénios "major" destes fungos, isto é que se associem preferencialmente à resposta imunológica que caracteriza a pneumonite de hipersensibilidade?

Publicações

TRABALHO 1

Suberosis and Bird Fancier's disease: a comparative study of radiological, functional and bronchoalveolar lavage profiles.

Suberosis and Bird Fancier's Disease: a comparative study of radiological, functional and bronchoalveolar lavage profiles

Suberosis and Bird Fancier's Disease: comparative study

A. Morais*, J.C. Winck*, L. Delgado**, M.C. Palmares**, J. Fonseca**, J. Moura e Sá***, J. A Marques**

Departments* of Pneumology and Immunology**, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, and ***Department of Pneumology, Centro Hospitalar de Gaia-PORTUGAL

Summary: Hypersensitivity Pneumonitis (HP) is an immunologically mediated interstitial lung disease that may result from repeated inhalation of many different environmental agents. Heterogeneity of the clinical presentation and bronchoalveolar lavage profiles have been described, possibly related to different occupational exposures. The aim of our study was to compare bronchoalveolar lavage fluid (BALF), clinical, functional and radiological characteristics of the two most frequent forms of HP seen in our practice: Suberosis (an HP related to moldy cork dust exposure) and bird fancier's disease (BFD). We included 81 patients with Suberosis, with a mean age of 38.8 ± 11.3 years and a mean exposure of 20.0 ± 10.5 years and 32 patients with BFD, with a mean age of 46.3 ± 11.8 years and mean exposure of 10.5 ± 1.0 years. Patients with BFD had more acute forms, while subacute and chronic presentations predominated in Suberosis. Restrictive defect was the most frequent pattern of lung function impairment, and more severe in BFD. Ground glass opacities were the most frequent pattern in high-resolution computed tomography. A normal chest x-ray was more frequently seen in Suberosis. Both types of HP had lymphocytic alveolitis in BALF: Suberosis - $6.6 \pm 5.7 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ cells, $58.8 \pm 18.9\%$ lymphocytes; bird fancier's disease - $9.0 \pm 6.5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ cells, $61.7 \pm 22.2\%$ lymphocytes. Although BALF CD8+ lymphocytes predominated in both diseases, the proportion of CD4+ and CD4/CD8 ratios were significantly higher in bird fancier's disease (Suberosis: 0.47 ± 0.33 versus BFD: 1.1 ± 1.5 ; $p < 0.005$). Moreover, BALF cellularity and mast cell counts were also significantly higher in BFD. In conclusion, Suberosis and bird fancier's disease are HP with different clinical and laboratory profiles, suggesting that despite their pathophysiological similarities, different antigenic exposures may cause different immune and inflammatory response dynamics in the lung.

Key Words: Bronchoalveolar lavage, HRCT, Suberosis, Bird Fancier's Disease

Introduction

Hypersensitivity Pneumonitis (HP) is an immunologically mediated interstitial lung disease resulting from repeated inhalation of a variety of environmental agents [1]. There are many different etiologies of HP, such as farmer's lung [2] and bird fancier's disease [3] and, according with clinical presentation, acute, subacute and chronic forms have been described. The diagnosis is based on a combination of clinical features, radiographic abnormalities, lung function tests and immunological tests [4,5]. High resolution computed tomography (HCRT) [6] and bronchoalveolar lavage (BAL) [7] have considerably improved diagnostic accuracy in interstitial lung diseases, including HP [8].

Although all HP share a common immune-mediated pathogenesis, some factors, like the intensity of exposure and diverse nature of the antigens, may lead to subtle clinical differences [3,9]. In fact, a low grade protracted exposure may favor the development of the chronic presentations of the disease, with lung fibrosis being the major outcome in bird fancier's disease [10]. Moreover, BAL lymphocyte subpopulations vary with the type of HP [9] and, concerning HRCT findings, emphysema predominates in farmer's lung [11].

Suberosis is a HP caused by inhalation of *Penicillium glabrum* that contaminates cork during its industrial processing [12]. It is especially prevalent in Portugal, and together with bird fancier's disease represents the most frequent type of HP in this country.

The aim of our study was to evaluate the clinical presentation, radiological and bronchoalveolar lavage findings of patients with suberosis in comparison with those of bird fancier's disease.

Materials and Methods

Our study included 113 patients with HP: a) 81 with Suberosis, with a mean age of 38.8 ± 11.3 years, (63 male, 18 female) and b) 32 patients with bird fancier's disease, with a mean age of 46.3 ± 11.8 years, (20 male, 12 female).

All patients were referred to an occupational lung disorders clinic for diagnosis and were still symptomatic and not receiving any treatment. The diagnostic work-up included lung function tests, chest x-ray, HCRT and BAL.

Diagnostic criteria

After confirming a relevant occupational exposure to moldy cork dust or birds, the diagnosis of HP was considered in the presence of: 1) cough and exertional dyspnea, with myalgia, fatigue or weight loss, and 2) a lymphocytic alveolitis in BAL fluid ($\geq 22\%$ of recovered cells) [13], with 3) lung function impairment or radiological abnormalities.

The *acute form* was defined by respiratory complains that occurred within hours of antigenic exposure, with systemic symptoms, and resolving within days after removal from exposure; the *subacute form* was considered when progressive symptoms occurred over days or weeks; the *chronic form* was characterized by an insidious onset of respiratory complains in patients with a long and persistent exposure to the organic dust [1].

Pulmonary Function Tests

Static lung volumes and pulmonary diffusion capacity (DLCO), by the single-breath method, were measured using a body plethysmograph (6200 Autobox DL, SensorMedics, Yorba Linda, USA), and dynamic lung volumes by mass flow sensors (*Vmax229*, SensorMedics, Yorba Linda, USA), with the patients

in the seated position according to standard procedure [14]. The predicted values of Quanjer et al [15] were used.

A restrictive pattern was considered when the forced vital capacity (FVC) was less than 80% and/or total lung capacity (TLC) less than 80%, with a normal forced expiratory volume in one second (FEV1). A FEV1/FVC ratio less than 75% or a residual volume (RV) superior to 120% defined an obstructive pattern.

High Resolution Computed Tomography

High Resolution Computed Tomography (HRCT) examination, performed with a model 9800 scanner (*GE Medical Systems, Milwaukee, Wis*), was done in 51 (63%) patients with Suberosis and 27 (84%) with BFD. For each subject, 1 to 5 mm thick slices were obtained at 10 mm intervals, using 120kw and 40 mA. Each scan was examined for the presence of the following: 1) areas of attenuation with the appearance of «ground glass», 2) reticulation and/or parenchymal nodules and 3) fibrosis.

The classification was performed by the authors (AM and JMS) and a thoracic radiologist, all experienced in the evaluation of interstitial lung diseases.

Fiberoptic bronchoscopy with broncho-alveolar lavage (BAL)

BAL was performed according to the recommendations of the European Society of Pneumology Task Group on BAL [16]. Briefly, four aliquots of 50ml sterile saline (37°C), were instilled in the middle lobe and gently aspirated with a syringe after each instillation. The recovered fluid (BALF) was pooled discarding the first aliquot and total cell numbers (Neubauer chamber) and viability (trypan blue exclusion) were estimated. Cell differentials were obtained by counting 500 cells on glass cover preparations stained with May-Grünwald-Giemsa.

Measurement of BALF lymphocyte subsets was performed by two-color direct immunofluorescence staining and flow cytometry. Briefly, 2.5×10^5 BALF cells were incubated for 30 min on ice in the dark, with 10 ml of FITC or PE conjugated monoclonal

antibodies anti-CD45, CD14, CD2, CD19, CD4 and CD8 (*Beckton Dickinson, Mountain View, CA.*). After washing and fixation, cells were analyzed on a flow cytometer (*FACScan, Becton Dickinson*) and data of 10,000 events acquired and stored in list mode. The lymphocyte gate was established based on forward and side scatter adjusted with a forward scatter/ CD45 contour plot [17].

Statistical analysis

All data were analyzed with the statistical package SPSS® for Windows® (*SPSS Inc., Chicago, IL*). Simple descriptive analysis was predominantly used and, unless otherwise stated, data are reported as mean \pm SD and frequencies as n (%). Differences between the two patient groups (Suberosis and BFD) were analysed using non-parametric tests. Fisher's exact test and Pearson Chi squared test were used for independent category data. Comparison of independent continuous data with patient groups as the ordinal level of measurement were analysed with Mann-Whitney's U Test. For multiple independent samples Kruskal-Wallis Test was used. Spearman correlation was used for comparison between continuous data namely BAL and Lung function parameters. Significance was accepted at 5%.

Results

Clinical presentation

The 81 patients with Suberosis had a mean exposure of 20.0 ± 10.5 years in the cork stoppers industry (punching and sorting of bottle corks) and the majority (74.1%) was still working at the time of study. Non-exposed patients (n=21) were away from exposure for 14.8 ± 16.6 months. Seven (9.1%) were smokers and 10 (13%) ex-smokers. The acute disease form occurred in 9 (12.2%), subacute forms in 33 (44.6%) and the chronic presentation in 32 (43.2%) cases.

The 32 patients with Bird fancier's disease had a mean exposure of 10.5 ± 1.0 year. The majority (84%) were pigeon breeders. Two (6.5%) patients were

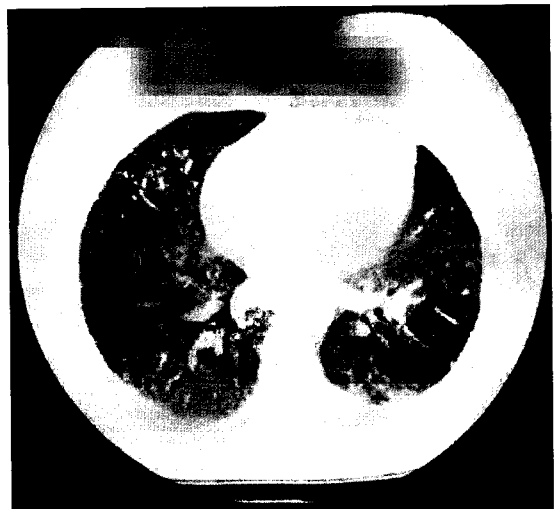
smokers and 6 (19.4%) were ex-smokers. Twenty-two (88%) were still exposed at the time of the study. Non-exposed patients (n=5) were away from exposure for 6.6 ± 9.8 months. Acute disease form occurred in 10 (40%) patients, subacute in 9 (36%) and chronic in 6 (24%).

Bird fancier's lung had more acute forms while Suberosis had more frequent subacute or chronic presentations ($p= 0.006$). Moreover, patients with Suberosis had a longer duration of exposure ($p<0.001$).

Radiology

Chest x-rays were normal in 22.7% of Suberosis cases and only in 3.2% of BFD patients ($p= 0.017$). In 53.8% of the cases with normal chest radiographs HRCT scans were abnormal. The most frequent HRCT pattern found in both diseases was ground glass opacifications (Fig 1 and 2). However, there was no significant difference between predominant HRCT patterns in both HP and according with clinical presentations.

Fig 1 – HRCT scan of a pigeon breeder with acute presentation, showing patchy areas of ground glass attenuation in both lungs

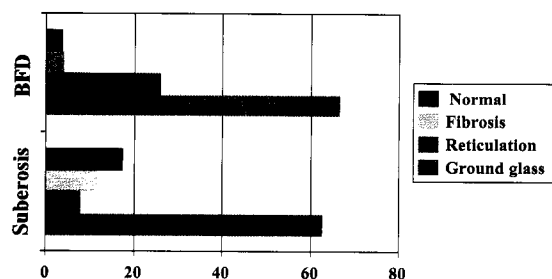


Lung function

In Suberosis there was a restrictive impairment in 47.1%, while an obstructive syndrome occurred in

5.7% and 30% had normal lung function. In Bird fancier's disease, 63.3% patients had a restrictive syndrome, 10% an obstructive syndrome and 6.7% had normal lung function. There were no significant differences in the distribution of lung function patterns (restrictive/obstructive) between Suberosis and BFD, and between different clinical presentations (acute/subacute/chronic).

Fig 2 – Predominant (in percentage) HRCT patterns in Suberosis and BFD



Moreover, Suberosis had significantly more normal lung function tests ($p=0.018$). DLCO was the most frequently abnormal parameter: 55% of patients had values under 80% of predicted: 48.2% in Suberosis and 70.8% in BFD, $p=0.03$. We found a significant difference between TLC ($p=0.036$), RV/TLC ($p=0.020$), DLCO ($p=0.000$) and DLCO/VA ($p=0.002$), with lower levels in BFD compared with Suberosis (Table 1).

Table 1 – Pulmonary Function Tests in BFD and Suberosis (data are presented as mean and standard deviation)

	Suberosis	BFD	<i>p</i>
FVC % pred	83.8 ± 24.5	76.2 ± 18.6	n.s
FEV1 % pred	80.3 ± 26.0	76.3 ± 18.8	n.s
FEV1/FVC	87.9 ± 16.4	89.3 ± 11.6	n.s.
TLC % pred	92.5 ± 17.9	83.7 ± 16.3	0.04
RV/TLC	119.2 ± 38.6	86.9 ± 57.6	0.02
DLCO % pred	83.1 ± 24	60.9 ± 24	<0.001
DLCO/VA % pred	95.2 ± 23.2	76.8 ± 27.7	0.002

FVC - forced vital capacity; FEV1 - forced expiratory volume in 1 second, TLC - total lung capacity; RV - residual volume; DLCO - pulmonary diffusion capacity; VA - alveolar volume; % pred - % of predicted

BAL findings (Table 2)

Both types of HP had a lymphocytic alveolitis (Suberosis: 58.8 ± 18.9%, BFD: 61.7 ± 22.2%;

$p=n.s.$) with predominant CD8+ lymphocytes, with Bird fancier's disease having a higher total cell count ($6.6 \pm 5.7 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ cells versus $9.0 \pm 6.5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ cells; $p=0.025$) – table 2. Moreover, BFD showed higher total lymphocyte counts ($p=0.048$), CD4/CD8 ratio ($p=0.002$), total CD4+ lymphocytes, and also a higher proportion of mast cells ($p=0.002$).

In Suberosis we only found a significantly higher proportion of CD8+ lymphocytes ($p=0.004$). Concerning patients away from exposure at the time of the study, the only significant finding in BALF data was a significantly lower proportion of CD8+ lymphocytes in Suberosis (exposed: $55.5 \pm 15.5\%$ versus non-exposed $49.3 \pm 15.1\%$, $p=0.012$), with no significant difference in their total numbers (exposed: $2.8 \pm 2.9 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$ versus non-exposed: $2.0 \pm 2.0 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$, $p=0.415$).

No significant differences were found in BALF differential counts in smokers (data not shown).

Relationship between clinical presentations, functional, radiological and BALF data

In patients with an acute presentation we found significantly higher BALF total cell counts (9.9 ± 7.8 versus $6.5 \pm 5.5 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$, $p=0.04$) and mast cell numbers ($0.23 \pm 0.38\%$ versus 0.08 ± 0.26 , $p=0.04$). No significant differences were found concerning neutrophil ($7.3 \pm 12.3\%$ versus $5.1 \pm 5.9\%$) and lymphocyte counts ($61.6 \pm 19.2\%$ versus $58.4 \pm 20.3\%$). In the BFD group, a significant negative correlation between DLCO and BALF total cell counts was found ($r_s = -0.4$, $p=0.03$), and acute patients (40% of all patients) had significantly higher BALF CD8+ lymphocytes ($54.5 \pm 15.8\%$ versus $34.1 \pm 14.2\%$ and 5.5 ± 5.2 versus $1.4 \pm 1.1 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$, $p=0.02$).

Suberosis patients had significantly different BALF profiles in relation to HRCT patterns: those with a ground glass pattern had significantly more BAL lymphocytes ($65.8 \pm 16.6\%$ versus $51.6 \pm 18.2\%$, $p=0.012$) and patients with a fibrosis pattern had significantly more mast cells ($0.15 \pm 0.28\%$ versus $0.01 \pm 0.04\%$, $p=0.029$). Moreover, when we analyzed different exposure intervals in Suberosis (<10 years, 10-20 years and >20 years), we found progressively

Table 1 – Bronchoalveolar lavage cell counts in BFD and Suberosis (data are presented as mean and standard deviation)

	Suberosis	BFD	p
Total cell counts	6.6 ± 5.7 x 10 ⁵ ml ⁻¹	9.0 ± 6.5 x 10 ⁵ ml ⁻¹	0.025
Macrophages	34.4 ± 17.8 %	30.5 ± 21.4%	n.s.
Lymphocytes	58.8 ± 18.9 %	61.7 ± 22.2 %	n.s.
Neutrophils	5.7 ± 7.6 %	4.4 ± 5.7 %	n.s.
Eosinophils	0.7 ± 1.1 %	1.3 ± 2.3 %	n.s.
Mast cells	0.04 ± 0.1 %	0.3 ± 0.6 %	0.002
CD4+ lymphocytes	23.5 ± 10.6 %	35.0 ± 17.3 %	<0.001
	1.0 ± 1.1 x 10 ³ ml ⁻¹	2.1 ± 1.5	<0.001
CD8+ lymphocytes	56.3 ± 13 %	45.8 ± 18.8 %	0.004
	2.5 ± 6.6 x 10 ³ ml ⁻¹	3.2 ± 3.7	n.s.
CD4/CD8 ratio	0.5 ± 0.3	1.1 ± 1.5	
Median [interquartile range]	0.4 [0.2-0.6]	0.6[0.4-1.7]	0.002

n.s - non significant

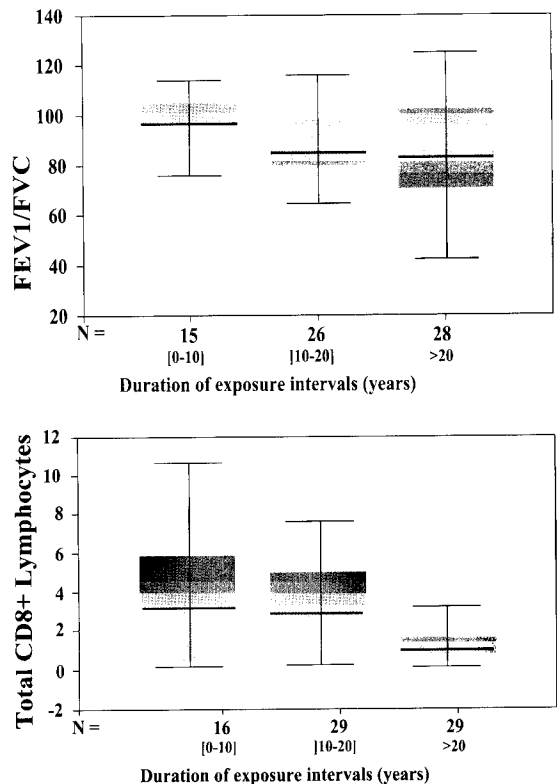
lower values of FEV1/FVC (p=0.044), total cell counts (p=0.001), total lymphocyte counts (p=0.001), total CD4 (p=0.002), and CD8 lymphocyte counts (p=0.001) (Figure 3).

Discussion

Hypersensitivity Pneumonitis is a complex syndrome, with a varying intensity of response that may depend on the type of antigen exposure: soluble pigeon antigens typically evoke a less intense reaction and response compared with the particulate fungal antigens [18]. The form and course of the disease may be determined by factors such as the intensity and frequency of antigen exposure, the severity of the first attack and host factors governing immunological responses, namely HLA alleles and TNF-promotor gene polymorphisms [19-22].

In our study, both HP forms belonged to the same age and gender group (35 to 45 year old male adults), in accordance with male predominance in both activities (cork industry and pigeon fanciers). Patients with BFD had more acute forms, according with the usual intermittent high intensity exposure experienced by bird fanciers[3]. In Suberosis, the signifi-

Fig 3 – Progressively lower FEV1/FVC (top) and BALF total CD8+ lymphocyte (bottom) with increasing exposure in Suberosis (<10 years, n=16; 10-20 years, n=29; >20 years, n=29). With increasing exposure duration, significantly lower numbers of total BALF lymphocytes and CD4+ cells were also found (not shown).



cantly longer exposure found in our series suggests a protracted low level antigenic exposure [12], also supported by the predominance of subacute and chronic forms we found.

In our group of patients with BFD and Suberosis with different clinical presentations, ground-glass opacifications were the predominant abnormal HRCT pattern (66.7% and 62.7% respectively), similarly to the reported in acute farmer's lung [23] and subacute and chronic BFD [24,25]. We did not find any significant difference between individual HRCT patterns and different clinical presentations in both HP. In up to a fifth of the patients, chest X-rays and HRCT scans were normal, especially in Suberosis. In other series, Hansell et al [26] found that 18% of patients with HP had normal HRCT and Remy-Jardin et al [25] found 30% of normal chest x-rays in subacute BFD. However it was within the Suberosis group that we found the most significant correlations between radiology and other disease characteristics: BALF total lymphocyte and CD8+ lymphocyte counts were significantly lower in patients with normal HRCT, suggesting a less active alveolitis. These may be considered milder forms of HP, in which radiological evaluation may fail to show abnormalities. Perhaps the use of a more sensitive exam, like ^{99m}Tc -DTPA clearance, could detect alveolar involvement in those patients [27,28]. The ground glass pattern on HRCT correlated significantly with the proportion of BALF lymphocytes, in accordance with what has been shown at the pathologic level, where ground glass opacifications are related with mononuclear cell infiltration of the alveolar walls [29]. Although in Suberosis the chronic forms were very representative (43.2% of cases) we only found evidence of honeycombing in 6 cases (11.8%). This figure is lower than in other chronic HP where honeycombing occurs between around 50% in BFD [25] and 68% of cases in a series with a wide range of etiologies [30]. Suberosis may be equivalent to summer-type hypersensitivity pneumonitis where it occurs only in 20% of cases [31]. Interestingly, BALF mast cell proportion in Suberosis correlated significantly with fibrosis HRCT pattern, supporting the

described role of these cells in lung fibrogenesis [32,33].

In our series, the most sensitive functional abnormality was a reduction in lung diffusion (DLCO). This finding is in accordance with previous studies in Farmer's Lung, where this test was a good marker for the presence and intensity of the disease [34]. A restrictive syndrome was clearly predominant, but airflow obstruction occurred in 5.7% of Suberosis cases and 10% of BFD cases. In fact, patients with chronic HP may develop an airways obstruction syndrome indistinguishable from emphysema [18,25], that may be due to peri-bronchiolar inflammation, fibrosis and obliterative bronchiolitis [35]. Although this was not a longitudinal study, we found that FEV1/FVC ratio significantly decreased in Suberosis patients with longer duration of exposure. In farmer's lung there is also evidence for a reduction in FEV1/FVC ratio in the long-term [36].

In BFD, functional impairment was more common, and a restrictive pattern with reduced diffusion capacity was more pronounced than in Suberosis. These findings together with BALF data, showing a more intense lymphocytic alveolitis and a negative correlation between DLCO and total cell counts, suggest that, comparatively with Suberosis, BFD induce a more severe lung impairment and alveolitis.

Mean BALF lymphocyte counts above 50% in both Suberosis and BFD confirm the characteristic high intensity alveolitis of these HP. In fact, only 1 patient with Suberosis and 3 with BFD had lymphocytosis under 25%.

There are many studies on the surface phenotypes of BAL lymphocytes in HP [37-41] and some of them study the differences between various HP [9,31]. Our study includes a larger number of patients than previous reports, and we were able to analyze cases with different clinical presentations (acute, subacute and chronic). In our BFD group, a significantly higher CD4/CD8 ratio was found in BALF comparatively with Suberosis (median and [interquartile range]) 0.6 [0.4-1.7] versus 0.4 [0.2-0.6]. In accordance with our results, it has been suggested that pigeon breeder's disease have higher CD4/CD8 ratios than other forms

of HP [3]. In fact in a large epidemiological study in Japan, Ando et al [9], report a CD4/C8 ratio of 2.0 ± 0.5 , in a group of 19 patients with bird fancier's disease.

In our series, we also found that BFD patients with an acute presentation had significantly higher proportion of CD8+ lymphocyte counts ($54.5 \pm 15.8\%$ versus $34.1 \pm 14.2\%$), with no significant differences in the CD4/CD8 ratios (median [interquartile range]: $0.6 [0.3-0.8]$ versus $1.2 [0.6-2.5]$). This pattern is somewhat contradictory with a series with 59 patients with acute forms of BFD from Drent et al [42] in which they showed a higher mean CD4/CD8 ratio. The technique employed for the identification of T-cell subpopulation (conventional indirect immunofluorescence technique in that study and flow cytometry in ours) may have account for some differences in these results.

In Suberosis, the CD4/CD8 ratio was significantly lower than BFD similar to what has been described in summer-type hypersensitivity pneumonitis [9]. Moreover, CD8+ lymphocyte counts, although still increased (49.3%) were significantly lower in non-exposed Suberosis patients. These findings are consistent with a study involving a small group of patients with farmer's lung, where CD8 + lymphocytes tended to fall in patients no longer in contact with the antigen [41]. In other cases of HP, Costabel et al also demonstrated a decrease in these cells after antigen avoidance [43].

In our series, smoking habits did not significantly affect differential counts as well as BAL lymphocyte phenotypes in both HP. Although this results are not consistent with the reported influence of smoking in total cell counts and CD4/CD8 ratios in patients with Farmer's lung and ventilation pneumonitis [9], the small percentage of smokers in our series may justify our findings.

Some possible explanation for the differences in BALF lymphocyte phenotypes in Suberosis and BFD, may be the differences in clinical presentations, the existence of other inhalants in the cork industry (cork dust itself) and the type of exposure (continuous in the cork industry versus intermittent in bird

breeders [44]), that may have an influence in the alveolar immune and inflammatory response.

Mast cells counts were significantly higher in BFD, probably reflecting the significantly higher percentage of acute forms in this group [32,45]. In our group of patients, average neutrophil counts (Table 2) were similar in both HP but were somewhat lower than those reported in the literature including patients with acute BFD [42] or Farmer's Lung [46]. However, the increase in neutrophils associated with acute forms of HP has been critically related to a very recent natural [42] or induced antigen exposure [47], that was not the case in our study. In our series, mean BALF neutrophils in patients with acute forms were not significantly different from subacute and chronic forms, but with a wide dispersion of values: acute forms $7.3 \pm 12.3\%$ versus chronic forms $5.1 \pm 5.9\%$. Eosinophils, although mildly increased and especially in BFD, were also lower than the described in acute BFD with recent (< 1 week) exposure [42]. In our experience, higher BALF eosinophil counts are associated with cork worker's occupational asthma and not with HP [48].

In conclusion, in a large group of patients with Hypersensitivity Pneumonitis, our study demonstrates that there are significant differences in clinical presentation, radiological and lung function findings as well as BALF profiles between Suberosis and Bird Fancier's Disease. Despite their pathophysiological similarities, different antigenic exposures may account for different immune and inflammatory dynamics in the lung.

Suberosis is a form of HP with a less striking radiological and functional involvement than bird fancier's disease, and is characterized by a less intense lymphocytic alveolitis with a lower CD4/CD8 ratio. HRCT appears to be more useful in the evaluation of the radiological involvement of Suberosis. DLCO is a sensitive lung function test in the evaluation of HP, especially in bird fancier's disease.

Our patients with Suberosis, although with a long exposure, have a less severe Hypersensitivity Pneumonitis than BFD, perhaps due to an earlier recognition and referral of this occupational disease in our

region, as opposed to bird fanciers that reach medical evaluation at a later and advanced stage. This issue may have practical consequences in the disease prognosis as it relates with the duration of exposure after symptoms develop [18].

Acknowledgments

We are very grateful to Dr Isabel Barbosa (Radiology Department, Centro Hospitalar de Gaia) for reviewing HRCT films.

References

1. Wild L, Lopez M. Hypersensitivity Pneumonitis: a comprehensive review. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2001; 11: 3-15
2. Cormier Y, Laviolette M. Farmer's Lung. *Semin Respir Med.* 1993;14: 31-36
3. Calvert J, Baldwin C, Allen A, Todd A, Bourke S. Pigeon fanciers' lung: a complex disease? *Clinical and Experimental Allergy.* 1999; 29: 166-175
4. Schuyler M, Cormier Y. The diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest.* 1997; 111: 534-536
5. American Thoracic Society. Respiratory Health Hazards in agriculture. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: S1-S76
6. Silver SF, Muller NL, Miller RR, Lefcoe MS. Hypersensitivity pneumonitis: evaluation with CT. *Radiology.* 1989; 173: 441-445
7. Trentin L, Facco M, Semenzato G. Hypersensitivity Pneumonitis. In: Mapp C, ed. *Occupational Lung Disorders.* Vol. 4: *European Respiratory Monograph;* 1999: 301-319
8. Costabel U, Guzman J. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med.* 2001; 7: 255-261
9. Ando M, Konishi K, Yoneda R, Tamura M. Difference in the phenotypes of bronchoalveolar lavage lymphocytes in patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis, farmer's lung, ventilation pneumonitis, and bird fancier's lung: report of a nationwide epidemiologic study in Japan. *J Allergy Clin Immunol.* 1991; 87: 1002-1009
10. Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R, Sanchez M, Carrillo G, Pérez R, Sansores R, Gaxiola M, Selman M. Mortality in mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial Pneumonia. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148: 49-53
11. Erkinjuntti-Pekkanen R, Rytkonen H, Kokkarinen J, Tukiainen H, Partanen K, Terho E. Longterm risk of emphysema in patient's with farmer's lung and matched control farmers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 662-665
12. Ávila R, Lacey J. The role of *Penicillium frequentans* in Suberosis (Respiratory disease in cork workers). *Clinical Allergy.* 1974; 4: 109
13. Leblanc P, Belanger J, Laviolette M, Cormier Y. Relationship among antigen contact, alveolitis, and clinical status in farmer's lung disease. *Arch Intern Med.* 1986; 146: 153-157
14. Official Statement of the European Respiratory Society. Standardized lung function testing. *Eur Respir J.* 1993; 6: 1-100
15. Quanjer P. Working Party on "Standardization of lung function test". *Bull Eur Physiopatol Respir.* 1983; 19 (suppl. 5): 7-10
16. Klech H, Hutter C. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European Society of Pneumology Task Force on BAL. *Eur Respir J.* 1990; 3: 937-974
17. Dauber J, Wagner M, Brunsvold S, Paradis I, Ernst L, Waggoner A. Flow cytometric analysis of lymphocyte phenotypes in broncho-alveolar lavage fluid: comparison of a two-color technique with a standard immunoperoxidase assay. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992; 7: 531-541
18. Zacharisen MC, Schlueter DP, Kurup VP, Fink JN. The long-term outcome in acute, subacute and chronic forms of pigeon breeder's disease hypersensitivity pneumonitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002; 88: 175-182
19. Bourke S, Banham S, Carter R, Lynch P, Boyd G. Longitudinal Course of Extrinsic Allergic Alveolitis in Pigeon Breeders. *Thorax.* 1989; 44: 415-418
20. Schuyler M. Are polymorphisms the answer in Hypersensitivity Pneumonitis? *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 1513-1514
21. Schaaf BM, Seitzer U, Pravica V, Aries SP, Zabel P. Tumor Necrosis Factor alpha-308 promotor gene polymorphism and increased tumor necrosis factor serum activity in Farmer's Lung patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 379-382
22. Camarena A, Juarez A, Mejia M, Estrada A, Carrillo G, Falfan R, Zuniga J, Navarro C, Granados J, Selman M. Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 1528-1533
23. Cormier Y, Brown M, Worthy S, Racine G, Muller NL. High-resolution computed tomographic characteristics in acute farmer's lung and in its follow-up. *Eur Respir J.* 2000; 16: 56-60
24. Hansell DM, Wells AU, Padley SP, Muller NL. Hypersensitivity pneumonitis: correlation of individual CT patterns with functional abnormalities. *Radiology.* 1996; 199: 123-128
25. Remy-Jardin M, Remy J, Wallaert B, Muller NL. Subacute and chronic bird breeder hypersensitivity pneumonitis: sequential evaluation with CT and correlation with lung function tests and bronchoalveolar lavage. *Radiology.* 1993; 189: 111-118
26. Hansell DM, Moskovic E. High-resolution computed tomography in extrinsic allergic alveolitis. *Clin Radiol.* 1991; 43: 8-12
27. Bourke MP, Banham S, J.H. M, Boyd G. Clearance of 99mTc-DTPA in pigeon fancier's hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 142: 1168-1171
28. Schmekel B, Wollmer P, Venge P, Linden M, Blom-Bulow B. Transfer of 99mTc DTPA and bronchoalveolar lavage findings in patients with asymptomatic extrinsic allergic alveolitis. *Thorax.* 1990; 45: 525-529

29. Leung AN, Miller RR, Muller NL. Parenchymal opacification in chronic infiltrative lung diseases: CT-pathologic correlation. *Radiology*. 1993; 188: 209-214
30. Adler BD, Padley SP, Muller NL, Remy-Jardin M, Remy J. Chronic hypersensitivity pneumonitis: high-resolution CT and radiographic features in 16 patients. *Radiology*. 1992; 185: 91-95
31. Yoshizawa Y, Ohtani Y, Hayakawa H, Sato A, Suga M, Ando M. Chronic hypersensitivity pneumonitis in Japan: a nationwide epidemiologic survey. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103: 315-320
32. Bjermer L, Engstrom-Laurent A, Lundgren R, Rosenhall L, Hallgren R. Bronchoalveolar mastocytosis in farmer's lung is related to the disease activity. *Arch Intern Med*. 1988; 148: 1362-1365
33. Delgado L, Cuesta C, Winck JC, Sapage JM, Moura e Sa J, Fleming Torrinha JA. [Suberosis: involvement of bronchoalveolar +mastocytes in the genesis of interstitial involvement]. *Arch Bronconeumol*. 1999; 35: 71-78
34. Cormier Y, Belanger J, Tardif A, Leblanc P, Laviolette M. Relationships between radiographic change, pulmonary function, and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in farmer's lung disease. *Thorax*. 1986; 41: 28-33
35. Lama M, Pérez-Padilla R. Airflow Obstruction and Airway Lesions in Hypersensitivity Pneumonitis. *Clinics in Chest Medicine*. 1993; 14
36. Erkinjuntii-Pekkanen R, Kokkarinen J, Tukianen H, Pekkanen J, Husman K, Terho E. Long-term outcome of pulmonary function in farmer's lung: a 14 year follow-up with matched controls. *Eur Respir J*. 1997; 10: 2046-2050
37. Milburn HJ. Lymphocyte subsets in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J*. 1992; 5: 5-7
38. Suda T, Sato A, Ida M, Gemma H, Hayakawa H, Chida K. Hypersensitivity pneumonitis associated with home ultrasonic humidifiers. *Chest*. 1995; 107: 711-717
39. Baur X. Hypersensitivity pneumonitis (extrinsic allergic alveolitis) induced by isocyanates. *J Allergy Clin Immunol*. 1995; 95: 1004-1010
40. Semenzato G, Agostini C, Zambello R, Trentin L, Chilosi M, Pizzolo G, Marcer G, Cipriani A. Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis: phenotypic and functional analyses. *J Immunol*. 1986; 137: 1164-1172
41. Cormier Y, Belanger J, Leblanc P, Hébert J, Laviolette M. Lymphocyte subpopulations in Extrinsic Allergic Alveolitis. *Ann NYAc Sci*. 1986; 465: 370-377
42. Drent M, van Velzen-Blad H, Diamant M, Wagenaar SS, Hoogsteden HC, van den Bosch JM. Bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis: effect of time elapsed since antigen exposure. *Eur Respir J*. 1993; 6: 1276-1281
43. Costabel U, Bross KJ, Marxen J, Matthys H. T-lymphocytosis in bronchoalveolar lavage fluid of hypersensitivity pneumonitis. Changes in profile of T-cell subsets during the course of disease. *Chest*. 1984; 85: 514-522
44. McSharry C, Anderson K, Boyd G. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30: 279-289
45. Haslam PL, Dewar A, Butchers P, Primett ZS, Newman-Taylor A, Turner-Warwick M. Mast cells, atypical lymphocytes, and neutrophils in bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis. Comparison with other interstitial lung diseases. *Am Rev Respir Dis*. 1987; 135: 35-47
46. Cormier Y, Belanger J, LeBlanc P, Laviolette M. Bronchoalveolar lavage in farmers' lung disease: diagnostic and physiological significance. *Br J Ind Med*. 1986; 43: 401-405
47. Reynolds SP, Jones KP, Edwards JH, Davies BH. Inhalation challenge in pigeon breeder's disease: BAL fluid changes after 6 hours. *Eur Respir J*. 1993; 6: 467-476
48. Winck JC, Delgado L, Vanzeller M, Guimaraes T, Torres S, Sapage JM. Broncho-alveolar inflammation in cork worker's asthma. *Allerg Immunol (Paris)*. 2002; 34: 199-203

TRABALHO 2

Monitoring of peak expiratory flow rates in cork worker's occupational asthma.

Monitoring of Peak Expiratory Flow Rates in Cork Worker's Occupational Asthma

J. C. Winck,^{1,*} L. Delgado,² M. Vanzeller,³
T. Guimarães,³ S. Torres,³ and J. M. Sapage³

¹*Pneumology Department, S. João Hospital and Porto Medical School, Porto, Portugal*

²*Imunology Department, S. João Hospital and Porto Medical School, Porto, Portugal*

³*Department of Pneumology, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia, Portugal*

ABSTRACT

Suberosis is an occupational lung disorder of cork industry workers usually presenting as an extrinsic allergic alveolitis, but airway involvement in some cases makes the diagnostic approach complex. We assessed peak expiratory flow rates (PEF) in 17 cork workers with asthma symptoms that worsened at work, comparing three methods of PEF graph analysis. Complete agreement (three observers) was found in 12 of 17 cases (70.6%) with the visual inspection of mean daily values and in 11 of 17 cases (64.7%) with the minimum, maximum, and mean daily values (without any consensus in two cases). According to the mean PEF graph, there were eight positive readings (47%), five negative readings (29%), and four dubious readings (24%); with the other graphic analysis, two of the dubious cases were reclassified as negative. When we analyzed daily variability $\geq 20\%$, we found only three positive results, one of which was in absolute disagreement with the visual analysis. Our results suggest that it is possible to demonstrate occupational asthma in cork work exposure. The visual inspection of PEF monitoring shows a greater number of

*Address correspondence to: João Carlos Winck, M.D., Pneumology Department, S. João Hospital and Porto Medical School, 4200 Porto-Portugal. E-mail: jcwinc@mail.telepac.pt

positive results than the index of daily variability; however, the latter may help to sort out dubious cases.

KEY WORDS: Diagnosis; Occupational asthma; Peak expiratory flow; Suberosis.

INTRODUCTION

Suberosis is an occupational disease of cork workers associated with repeated exposure to moldy cork dust in the cork industry, usually presenting as an interstitial lung disorder: extrinsic allergic alveolitis (EAA) (1). As in other forms of EAA, bronchoalveolar lavage shows a typical CD8+ lymphocytic alveolitis (2) and high levels of specific IgG to *Penicillium frequentans*, the most frequent mold colonizing cork (3). However, as in the early descriptions of suberosis (1), we have also seen cases of asthma with work-related symptoms, apparently without allergic sensitization to *P. frequentans* (3-4). In this setting, since a specific inhalation challenge to a relevant occupational agent cannot be performed, the assessment of peak expiratory flow rates (PEF) at and away from work may be a valuable diagnostic method in cork workers with suspected asthma.

In clinical practice, several authors have shown that visual inspection of PEF records is very useful in identifying individuals with occupational asthma (5-6). However, the value of qualitative versus quantitative analysis of PEF has not been addressed in cork workers with asthma symptoms. The aim of our study was to evaluate two qualitative methods of PEF analysis based on visual inspection and a quantitative index in the assessment of asthma symptoms in cork workers.

METHODS

We studied 17 cork workers (age: 42.1 ± 8.1 years, nine males and eight females) who had been referred to an occupational respiratory disorder clinic with asthma symptoms that they related to work.

Skin prick tests (Bencard) were carried out by using a battery of 15 common inhalant allergens (mites, dander, pollens, and molds: *Alternaria*, *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*, *Cladosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus nigricans*, and *Penicillium notatum*), a control solution, and histamine phosphate (1 mg/mL). Total IgE, Phadiatop[®], and, in selected cases, specific IgE were measured by the CAP FEIA (Pharmacia & Upjohn, Sweden). For the Phadiatop[®], results above a reference serum were considered positive, and for the CAP RAST results of >0.35 kU/L in an IgE reference curve were considered

positive. Atopy was diagnosed if there was one or more positive skin prick tests for common allergens and/or a positive RAST (at least one greater than 0.7 kU/L) or Phadiatop[®] were present.

All patients performed spirometry, body plethysmography, and carbon monoxide diffusing capacity (Erich Jaegger). Reversible airflow limitation was considered when the improvement of forced expiratory flow volume in 1 s (FEV₁) after an inhaled bronchodilator was greater than 15% and exceeded 200 mL. Bronchial hyperresponsiveness was measured by histamine challenge, using the protocol of Cockcroft et al. (7).

For PEF recordings, each patient was given a mini-Wright peak flowmeter with detailed instructions on its proper use. Patients were asked to measure PEF every 2 h and to record the best of three attempts during at least 10 days at work and 10 days away from work, in a consecutive fashion. The away-from-work period was adjusted to the worker's annual holidays and, whenever possible (12 cases), was the starting record period. For visual inspection 1 (VI-1), the mean daily values were plotted on a graph, and the record was visually analyzed and considered positive when two of the three physicians (without knowing the patient identification) agreed that the PEF graph showed a work-related change. For visual inspection 2 (VI-2), mean, maximum, and minimum daily values were plotted on a graph, and the same analysis was

Table 1

Characteristics of the Patients

Age	42.1 ± 8.1
Smokers	2/17
M/F	9/8
Exposure	21.3 ± 8
Symptoms	4.9 ± 4
FEV ₁ %	87.6 ± 25.6
RV%	135.7 ± 41.8
Atopy	5/13
BHR	11/13

M/F: male/female ratio; exposure: years of exposure in cork industry; symptoms: duration of symptoms (years); FEV₁%: % predicted FEV₁; RV%: percent predicted residual volume; BHR: bronchial hyperresponsiveness (PC₂₀ histamine <16 mg/mL); Atopy: considered if at least a RAST class 2 to any allergen.

performed as in VI-1. Daily variability (DV) was calculated by subtracting the minimum value for each day from maximum value for the same day divided by the maximum daily value times 100. PEF was considered positive if an excess of at least 3 days at work had daily changes greater than 20% when compared with the period away from work (6).

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) unless otherwise stated. Analysis of significance levels were made with the nonparametric Wilcoxon test and considered significant with p -values <0.05 .

RESULTS

The group of 17 workers (Table 1) we studied had a long history of exposure in the cork industry (21.3 ± 8 years) and in all of them the symptoms had begun after a long latency period (16.8 ± 8.8 years). The majority (41.2%)

worked in punching and sorting bottle corks. Seven patients had mild to moderate airflow limitation, while significant bronchial hyperresponsiveness (PC_{20} histamine <16 mg/mL) was present in 11 of 13 subjects tested (84.6%). Diffusion capacity was normal in all.

On the basis of the visual assessment of the mean daily PEF (VI-1), eight patients had patterns indicative of occupational asthma (47%), five had negative studies, and four had a dubious record. There was complete agreement between the three readers in 70.6% of the cases. Considering the visual analysis of the mean, maximum, and minimum daily PEF (VI-2), seven patients had a positive pattern (46.7%), seven had a negative pattern, and one had a dubious record. There was complete agreement in 64.7% of the cases, and no consensus could be reached in two cases. When we analyzed the DV, we only found three positive results, one of which was in absolute disagreement in the VI-2. Figures 1–3 illustrate the serial PEF measurements of three of the subjects whose peak flow values revealed

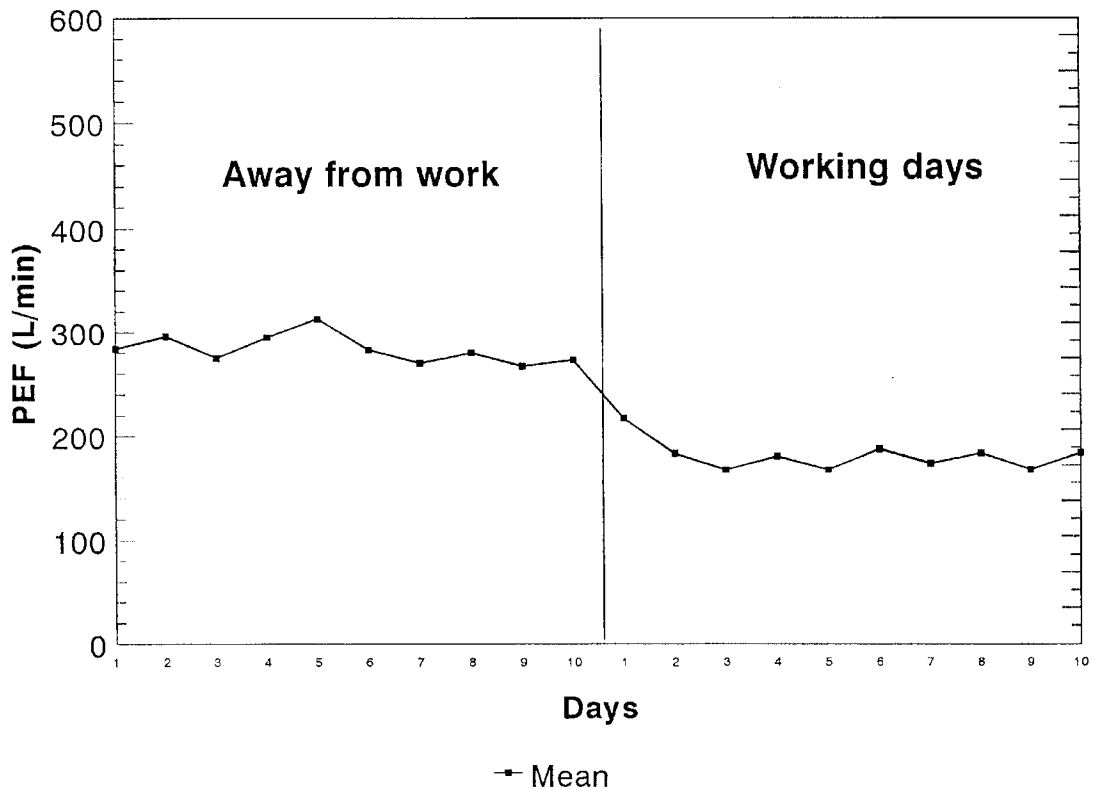


Figure 1. Peak expiratory flow record (graph with mean daily values, VI-1) of a 38-year-old male, showing significant variation with exposure.

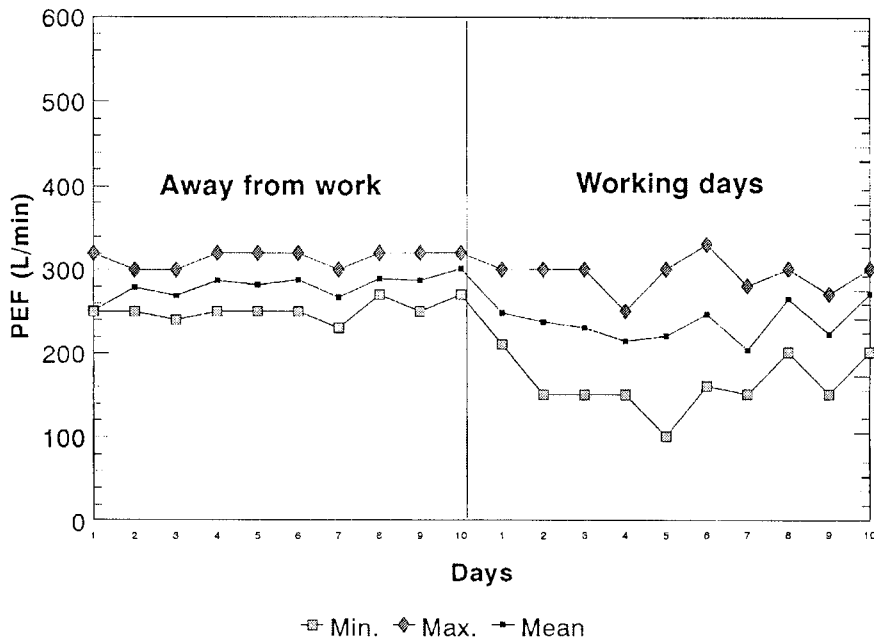


Figure 2. Peak expiratory flow record (graph with maximum, minimum, and mean daily values, VI-2) of a 47-year-old female, showing a work related change.

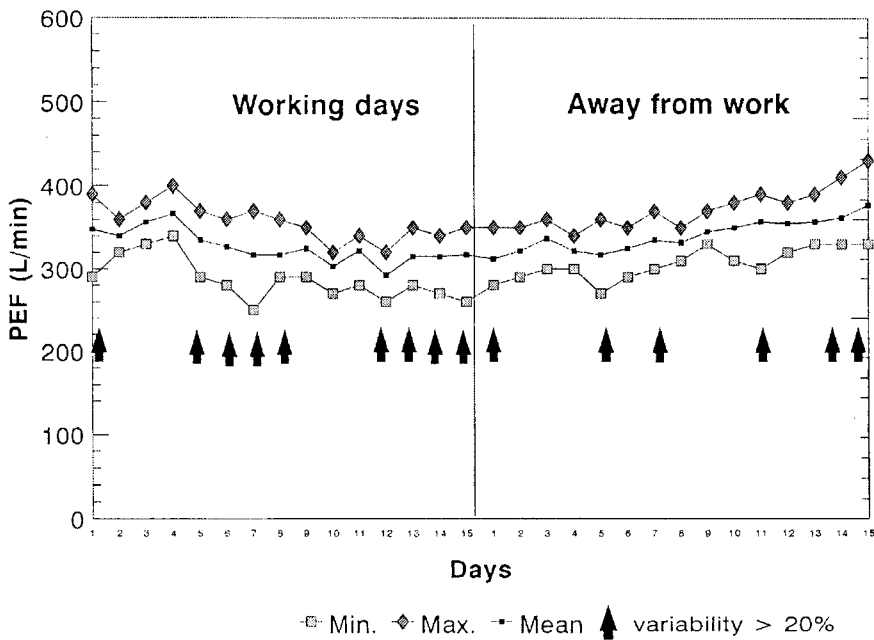


Figure 3. Peak expiratory flow record of a 36-year-old male showing an excess of more than 3 days at work with daily changes (DV) greater than 20% (arrows) compared with the period away from work.

Table 2
Comparison of Occupational and Nonoccupational Asthma Cases

	Occupational Asthma (n = 7)	Nonoccupational Asthma (n = 7)	p-Value
Age	40.9 ± 8.6	44.9 ± 8.9	0.55
Exposure	20.0 ± 9.0	23.4 ± 8.9	0.35
FEV ₁ %	99.1 ± 31.5	81.7 ± 23.6	0.89
RV%	118.6 ± 23.7	125.9 ± 52.9	0.75
BHR	5/5	4/5	

an occupational pattern according to visual inspection and quantitative analysis.

Five patients were atopic. Two had specific IgE to the mold mixture (positive CAP RAST to a mixture of *P. notatum*, *Cladosporium*, *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*-mx1), two had positive RAST to house dust mites (one also had associated positivity to *P. notatum*), and another, with IgE levels of 856 kU/L, also had specific IgE to *Acarus siro* and *Tyrophagus putrescentiae* (CAP RAST > 0.7 kU/L).

When we compared the seven asthmatics with positive PEF records with the other seven with negative PEF (according to VI-2), there was no significant difference in age, years of exposure, atopy (three in the positive group and two in the negative), lung function, or bronchial hyperresponsiveness (Table 2).

DISCUSSION

Portugal is the largest cork-producing country in the world, and its industry is an important economic resource. It is estimated that 11,000 individuals work in the Portuguese cork industry. In the early publications on suberosis, asthma-like syndromes were described together with the classical form of extrinsic allergic alveolitis (1); specific inhalation challenge with *P. frequentans* extract showed both interstitial and bronchial responses in these patients, making the diagnosis of occupational asthma difficult to ascertain in that setting (8). Moreover, the lack of standardization of these inhalation challenges does not make them useful for the diagnosis of occupational asthma.

The use of serial PEFs has been advocated as a major tool in the investigation of occupational asthma (9,10). Its role in the diagnosis of the occupational asthma of cork workers has never been assessed. In this study we have shown evidence of occupational asthma in the cork

industry. Although patient compliance is one of the known limitations of serial PEF monitoring, we were reasonably confident of our patients records, as they were performed in the initial diagnostic workup of these patients and not for compensation purposes.

The visual interpretation of peak flow measurements to document occupational asthma is considered one of the simplest and most sensitive and specific methods (9,10). In our study, the graphed mean daily PEF (IV-1) gave slightly more positive results but more indeterminate interpretations than did the graph of the mean, maximum, and minimum. The latter may give the observers a more confident interpretation and may be the procedure of choice as has been referred to in published guidelines (9).

Quantitative analysis of PEF using diurnal variation showed a low sensitivity (only three positive cases) but helped to classify as positive one of the cases without any agreement in the interpretation of the record between the three observers. However, as we used consecutive periods of record, we cannot exclude the possibility that in some of our patients, a work-related bronchial hyperresponsiveness could influence the beginning of the away-from-work period, decreasing the specificity of our quantitative analysis. Moreover, this index of daily variability, which was applied according to Perrin et al. (6), that is, if an excess of at least 3 days at work had daily changes greater than 20% when compared with the period away from work, could give more positive results if we used less strict criteria such as those of Liss and Tarlo (11) and those recently suggested by the Canadian Thoracic Society (12).

Recent description of asthma cases in individuals who are traditionally at risk to develop extrinsic allergic alveolitis, such as bird fanciers and farmers, and attributed to the exposure of potentially allergenic dusts (13,14) highlights the importance of a better characterization of airway involvement in these occupational environments. Although it was not our aim to clarify the etiology of asthmatic syndromes seen in workers of the cork industry, the exposure to multiple molds and chemical compounds also suggests several possible sensitizing agents (15,16).

When we analyzed patients with occupational asthma, we did not find any significant differences in the length of exposure or in atopy in comparison to the group with negative PEF records. However, in some patients our data suggest a relevant allergic sensitization (15,17): Two patients were sensitized to molds and one to storage mites (positive RAST to *Acarus siro* and *T. putrescentiae*).

Although the biological effects of the chronic inhalation of cork dust are still not completely understood, it may be associated with an inflammatory response of the airways. This hypothesis, also considered in other

forms of occupational asthma (18), is supported by the long duration of exposure that we have seen in these patients (20 years in this series), as well as by some previous findings. Accordingly, patients with asthma have increased numbers of bronchoalveolar neutrophils that correlate with the years of exposure (3), and in some we also found higher numbers of eosinophils in bronchoalveolar lavage (4). Further studies of the pathophysiological mechanisms of cork worker's asthma are in progress.

SUMMARY

Suberosis is an occupational lung disorder associated with inhalation of moldy cork dust in cork workers, usually presenting as an extrinsic allergic alveolitis. In patients with bronchial symptoms that worsen at work, it is possible, using PEF monitoring, to demonstrate the existence of occupational asthma, although its pathogenesis is still unknown.

CONCLUSIONS

In our study we presented evidence of occupational asthma in the cork industry, an occupational setting that is usually associated with extrinsic allergic alveolitis. The graph of the mean, maximum, and minimum daily PEF may be the procedure of choice to support the occupational nature of asthma cases, while the analysis of the daily variability may help in sorting out cases with dubious interpretation in the visual inspection.

REFERENCES

1. Pimentel, J.C.; Avila, R. Respiratory Disease in Workers in the Cork Industry (Suberosis): New Trends and Diagnostic Possibilities. *Thorax* **1973**, *28*, 409.
2. Delgado, L.; Winck, J.C.; Sapage, J.M.; Torres, S.; Ribeiro, J.I.; Sa, J.M. Respiratory Disease in Cork Worker's: Characterization of Suberosis Alveolitis by Bronchoalveolar Lavage. *Eur. Respir. J.* **1992**, *5*, 503.
3. Delgado, L.; Winck, J.C.; Sapage, J.M.; Torres, S.; Moura e Sá, J.; Torrinha, J.A.F. Antibodies to *Penicillium* frequentans in Cork Worker's Respiratory Disease (Suberosis): Application of the ImmunoCAP IgG RAST in Sera and Bronchoalveolar Lavage (BALF) Measurements. In *Proceeding of the XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology*; Basaomba, A.; Hernandez, M.D.; de Rojas, F., Eds.; 1995; 209-214.
4. Winck, J.C.; Sapage, J.M.; Torres, S.; Vanzeller, M.; Palmares, M.C.; Delgado, J.L. Work-Related Changes in Peak Expiratory Flow in Cork Worker's Respiratory Disease (Suberosis). *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, *103* (1. Pt. 2), 848.
5. Cote, J.; Kennedy, S.; Chan-Yeung, M. Quantitative Versus Qualitative Analysis of Peak Expiratory Flow in Occupational Asthma. *Thorax* **1993**, *48*, 48.
6. Perrin, B.; Lagier, F.; L'Archeveque, J.; Cartier, A.; Boulet, L.-P.; Cote, J.; Malo, J.-L. Occupational Asthma: Validity of Monitoring of Peak Expiratory Flow Rates and Non-Allergic Bronchial Responsiveness as Compared to Specific Inhalation Challenge. *Eur. Respir. J.* **1992**, *5*, 40.
7. Cockcroft, D.W.; Kilhan, D.N.; Mellon, G.J.A. Bronchial Reactivity to Inhaled Histamine: A Method and Clinical Survey. *Clin. Allergy* **1977**, *7*, 235.
8. Ávila, R.; Lacey, J. The Role of *Penicillium* Frequentans in Suberosis (Respiratory Disease in Cork Workers). *Clin. Allergy* **1974**, *4*, 109.
9. Moscato, G.; Godnic-Cvar, J.; Maestrelli, P.; Malo, J.-L.; Burge, P.S.; Coifman, R. Statement on Self-Monitoring of Peak Expiratory Flows in the Investigation of Occupational Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1995**, *96*, 295.
10. Chan-Yeung, M. Assessment of Asthma in the Workplace. *Chest* **1995**, *108*, 1084.
11. Liss, G.M.; Tarlo, S.M. Peak Expiratory Flow Rates in Possible Occupational Asthma. *Chest* **1991**, *100*, 63.
12. Tarlo, S.M.; Boulet, L.-P.; Cartier, A.; Cockcroft, D.; Côté, J.; Hargreave, F.E.; Holness, L.; Liss, G.; Malo, J.-L. Canadian Thoracic Society Guidelines for Occupational Asthma. *Can. Respir. J.* **1998**, *5*, 289.
13. Arlian, L.G.; Vyszeski-Moher, D.L.; Johansson, S.G.; van Hage-Hamsten, M. Allergenic Characterization of *Thyrophagus Putrescentiae* Using Sera from Occupationally Exposed Farmers. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **1997**, *79*, 525.
14. Colloff, M.J.; Merrett, T.G.; Merrett, J.; McSharry, C.; Boyd, G. Feather Mites Are Potentially an Important Source of Allergens for Pigeon and Budgerigar Keepers. *Clin. Exp. Allergy* **1997**, *27*, 60.
15. Licorish, K.; Novey, H.S.; Kozak, P.; Fairshier, R.; Wilson, A. Role of *Alternaria* and *Penicillium* Spores in the Pathogenesis of Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1985**, *76*, 819.
16. Chan-Yeung, M.; Malo, J.-L. Aetiological Agents in Occupational Asthma. *Eur. Respir. J.* **1994**, *7*, 346.
17. Warren, C.P.W.; Holford-Strevens, V.; Sinha, R.N. Sensitization in a Grain Handler to the Storage Mite *Lepidoglyphus Destructor* (Schrank). *Ann. Allergy* **1985**, *50*, 30.
18. Fabbri, L.M.; Ciaccia, A.; Maestrelli, P.; Saetta, M.; Mapp, C.E. Pathophysiology of Occupational Asthma. In *Asthma in the Workplace*; Bernstein, I.L.; Chan-Yeung, M.; Malo, J.-L.; Bernstein, D.I., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1993; 61-92.

TRABALHO 3

Bronchoalveolar inflammation in cork worker's asthma

BRONCHO-ALVEOLAR INFLAMMATION IN CORK WORKER'S ASTHMA

INFLAMMATION BRONCHO-ALVÉOLAIRE DANS L'ASTHME DES TRAVAILLEURS DE LIÈGE

J.-C. Winck (1), L. Delgado (2), M. Vanzeller (3),
T. Guimarães (3), S. Torres (3), J.-M. Sapage (3)

Summary

Suberosis is an occupational lung disease of cork workers associated with repeated exposure to mouldy cork dust in the cork industry, usually presenting as an interstitial lung disorder (Extrinsic Allergic Alveolitis). However, Occupational Asthma can also be associated with cork dust exposure and demonstrated by serial peak expiratory flow changes.

■ **Aim** : To investigate broncho-alveolar inflammation in patients with cork work-related occupational asthma, evaluated by Broncho-alveolar fluid cellular profiles and serial peak expiratory flow (PEF) rates monitoring.

■ **Results** : We studied 14 patients with respiratory symptoms associated with occupational exposure in the cork industry. Positive PEF monitoring occurred in 7 cases (Occupational Asthma-OA), and in 7 (Non-occupational asthmatics-NOA) PEF records were negative. There were no differences in age, lung function (FEV1%, RV%), bronchial hyperresponsiveness, years of exposure, and atopy between the two patients groups. However, patients with work-related asthma had higher BAL eosinophil counts than NOA ($1.9 \pm 2.6\%$ versus $0.2 \pm 0.3\%$; $p < 0.05$, Wilcoxon test).

■ **Conclusions** : Cork worker's asthma, demonstrated by work related changes in serial PEF recordings, is associated with eosinophilic lung inflammation as described in other forms of occupational asthma.

Key-words : Occupational asthma - Suberosis - Broncho-alveolar lavage.

INTRODUCTION

Portugal is the largest cork producing country in the world and its industry is an important economical resource. Cork workers are particularly susceptible to an occupational lung disease due to the repeated exposure to mouldy cork dust (Suberosis). It usually presents as an interstitial lung disorder (Extrinsic Allergic Alveolitis - EAA) (1), with a lymphocytic alveolitis (2) in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and high levels of specific IgG to *Penicillium glabrum* (formerly known as *Penicillium frequentans*), the most frequent mould colonizing cork (3).

However, as in the initial descriptions of Suberosis (1), we have also seen cases of work-related asthma, with

no apparent allergic sensitization to *Penicillium glabrum* (3,4). In this setting, the assessment of peak expiratory flow rates (PEFR), at and away from work, is a valuable diagnostic method to ascertain the occupational nature of cork worker's asthma (5).

Recent descriptions of asthma cases in occupational environments traditionally associated with extrinsic allergic alveolitis, like bird fanciers and farmers (6,7), highlight the importance of a better characterization of airways involvement in these patients. Moreover, in the early publications on Suberosis, inhalation challenge with *Penicillium* extracts showed both interstitial and bronchial responses in the same patients, making the diagnosis of occupational asthma difficult to establish (8), particularly with the lack of standardization of these challenges.

Broncho-alveolar lavage, a major tool in the differential diagnosis of interstitial lung diseases (2,9), has also been widely used to investigate the pathophysiological mechanisms of bronchial asthma (10).

(1) Pneumology - Hospital de São João and Faculdade de Medicina - Universidade do Porto - 4200 Porto (Portugal).

(2) Immunology Departments, Hospital de São João and Faculdade de Medicina - Universidade do Porto - 4200 Porto (Portugal).

(3) Department of Pneumology - Centro Hospitalar de Gaia - 4200 Porto (Portugal).

Accordingly, BALF studies in both isocyanate and western red cedar occupational asthma support an inflammatory component similar to atopic asthma (11, 12).

The aim of our study was to investigate broncho-alveolar inflammatory changes in patients with cork work-related occupational asthma, evaluated by BALF cellular profiles and serial peak expiratory flow rates monitoring.

MATERIALS AND METHODS

We studied fourteen cork workers, with a mean age of 42.1 ± 8.1 years, (8 males/6 females) referred to our department due to asthma symptoms they related to work.

Skin prick tests were carried out using a battery of 15 common inhalant allergens, (mites, dander, pollens and moulds - *Alternaria*, *Aspergillus Niger* and *Fumigatus*, *Cladosporium*, *Neurospora*, *Rhizopus Nigricans*, *Penicillium Notatum*) a control solution and histamine phosphate (1mg/ml). Total IgE, Phadiatop* and, in selected cases, specific IgE were measured by the CAP FEIA (Kabi Pharmacia, Sweden). For the Phadiatop® results above a reference serum were considered positive and for the CAP RAST if over 0,35 kU/L in an IgE reference curve. Atopy was diagnosed if one or more positive skin prick tests to common allergens and/or positive specific IgE (at least to one allergen greater than 0,7kU/L) or a positive Phadiatop® were present.

■ **Lung Function tests** : all patients performed spirometry, body plethysmography and carbon monoxide diffusing capacity (Erich Jaegger). Reversible airflow limitation was considered when the improvement of FEV1 after an inhaled bronchodilator was greater than 15% and exceeded 200 ml. Bronchial hyperresponsiveness was measured by histamine challenge, using the protocol of Cockcroft *et al.* (13).

■ **Peak Expiratory Flow (PEF) recordings** : for PEF recordings, each patient was given a mini-Wright peak flow meter with detailed instructions on its proper use. Patients were asked to measure PEF every two hours and to record the best of three attempts during at least 10 days at work and 10 days away from work. Mean, maximum and minimum daily values were plotted on a graph and the record was visually analysed and considered positive when two of three physicians (without knowing the patient identification) agreed that the PEF graph showed a work related change (5).

■ **Fiberoptic bronchoscopy with broncho-alveolar lavage (BAL)** : in all patients BAL was

performed according to the recommendations of the European Society of Pneumology Task Group on BAL (14). Briefly, after confirming that the patient was stable, supplemental oxygen was administered and continuous pulse oximetry was monitored. The procedure consisted of instillation of four aliquots of 50 ml sterile saline (37°C), in the middle lobe immediately followed by gentle aspiration (with a syringe) after each lavage. In the pooled recovered fluid (BALF) total cell numbers (Neubauer chamber) and viability (trypan blue exclusion) were estimated. Cell differentials were obtained by counting 500 cells on glass cover cytopsin preparations stained with *May-Grünwald-Giemsa*. After BAL all patients were kept under close observation and thoroughly evaluated for signs of airflow obstruction.

■ **Statistical methods** : data are presented as mean \pm standard deviation (SD), unless otherwise stated. Analysis of significance levels were made with the non-parametric Wilcoxon test and considered significant with p values < 0.05 .

RESULTS

The group of 14 workers we studied had a long history of exposure in the cork industry (24 ± 12 years) and in all patients symptoms developed after a long latency period (17 ± 2 years). The majority (60%) worked in punching and sorting bottle corks. Four patients had mild to moderate airflow limitation, while significant bronchial hyperresponsiveness (PC20 histamine < 16 mg/ml) was present in 9 out of 10 subjects tested. Diffusion capacity was normal in all.

According with the PEF readings, we classified 7 patients with typical work related changes as having occupational asthma (OA) and the other 7 as non-occupational asthmatics (NOA) (figure 1). There were no significant differences in age, years of exposure, lung function (FEV1%, RV %) and bronchial hyperresponsiveness, between asthmatics with positive or negative PEF recordings (table 1). No difference in the prevalence of atopy was seen between the two groups (2 in each).

Fiberoptic bronchoscopy was well tolerated in all subjects and there were no complications. Concerning BALF findings, no significant difference was found in total cell counts ($1.5 \pm 1 \times 10^5$ cell/ml in AO and $2.3 \pm 1 \times 10^5$ cell/ml in NOA) and alveolar macrophages were the predominant cell type in both groups ($79 \pm 13\%$ in AO and $74 \pm 24\%$ in NOA). Neutrophil and lymphocyte proportions were similar in both groups ;

however, patients with work-related asthma had higher BAL eosinophil counts than non-occupational asthmatics ($1.9 \pm 2.6\%$ versus $0.2 \pm 0.3\%$, $p < 0.05$) (figure 2).

DISCUSSION

In this study we characterize patients with occupational asthma related to cork dust exposure. Although the most frequent occupational lung disease in the cork industry is extrinsic allergic alveolitis, bronchial asthma is also one of the recognized lung disorders associated with the chronic exposure to cork dust (5). Similarly, a higher risk of obstructive lung disease has also been reported in bird fanciers and farmer's lung (6, 7, 15, 16).

We found a significant increase in broncho-alveolar lavage eosinophils in patients with typical work-related changes in PEF recordings. Furthermore, no differences were found in bronchial hyperresponsiveness and the presence of atopy when we compared these patients with non-occupational asthmatics with the

same exposure. Thus cork worker's asthma is associated with eosinophilic lung inflammation as described in other forms of occupational asthma. Our findings are consistent with other observations in occupational asthma, where increased numbers of eosinophils have been found in induced sputum (17), BAL (11) and bronchial mucosa (11, 18). Studies of broncho-alveolar lavage and bronchial biopsies suggest that the eosinophilic inflammation associated with low molecular weight agents is similar to atopic asthma (11, 18). Because BAL samples inflammatory cells from both airways and alveolar units, the origin of the increased numbers of eosinophils in our patients with cork worker's asthma cannot be established. Although bronchial mucosa has been considered the main site of inflammation in asthma (19), recent data suggest that small airways and alveolar wall tissue inflammation (20, 21) is also involved.

The etiology of cork worker's occupational asthma remains uncertain, but there is now some evidence that IgE is not an important element in most patients. Atopy does not seem to be a predisposing factor and, in previous studies, we didn't find any significant IgE sensitization to *Penicillium glabrum*, the major mould found

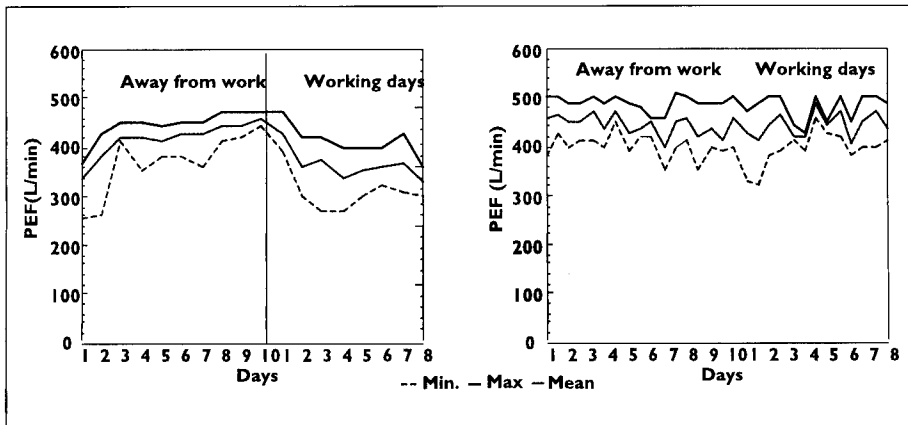


Figure 1 : Serial Peak Expiratory Flow (PEF) records. Mean, maximum and minimum daily values in a patient classified as occupational asthma (left) and in negative PEF record (right).

	Occupational asthma (n=7)	Non-Occupational asthma (n=7)	p
Age	40.9±8.6	44.9±8.9	0.55
Exposure	20.0±9.0	23.4±8.9	0.35
FEV1%	99.1±31.5	81.7±23.6	0.89
RV%	118.6±23.7	125.9±52.9	0.75
BHR	5/5	4/5	

Table 1 : Demographic characteristics, lung function and bronchial hyperresponsiveness (BHR) in the two study groups.

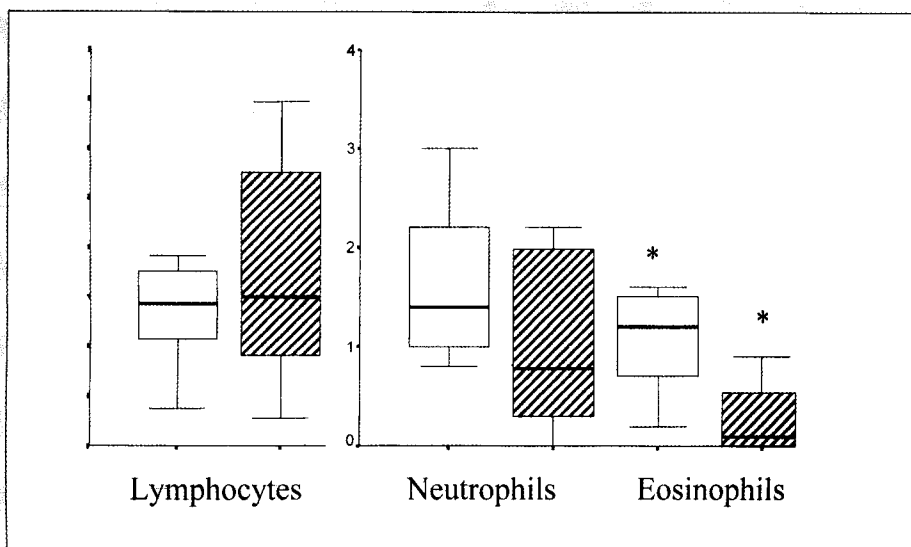


Figure 2 : Broncho-alveolar lavage fluid eosinophils, neutrophils and lymphocytes (% mean \pm SD) in patients with occupational (white bars) and non-occupational asthma (striped bars). A significantly higher number of broncho-alveolar eosinophils was seen in occupational asthma (* $p < 0.05$, Wilcoxon test).

in cork-processing factories (3). The mechanisms of eosinophil recruitment to the airways in non-IgE mediated occupational asthma have been attributed to the presence of activated T-lymphocytes with a Th2 pattern of cytokine production. (17, 22, 23). A small increase in BAL lymphocyte numbers was also seen in most of our cases (17.0 + 13.1%) and may warrant further studies of these cellular population. In conclusion, our study showed that, as in other forms of occupational asthma, cork worker's asthma may be demonstrated by work related changes in serial PEF recordings and is associated with eosinophilic lung inflammation.

REFERENCES

- Pimentel J.-C., Avila R. - Respiratory Disease in worker's in the cork industry (Suberosis) : new trends and diagnostic possibilities. *Thorax* 1973 ; 28 : 409-32.
- Delgado L., Winck J.-C., Sapage J.-M., Torres S., Ribeiro J.-I., Sa J.-M. - Respiratory disease in cork worker's: characterization of Suberosis alveolitis by broncho-alveolar lavage. *Eur Respir J* 1992 ; 5 : 503s-4s.
- Delgado L., Winck J.-C., Sapage J.-M., Torres S., Moura e Sá J., Torrinha JAF. - Antibodies to *Penicillium frequentans* in cork worker's respiratory disease (Suberosis). Application of the ImmunoCAP IgG RAST in sera and broncho-alveolar lavage (BALF) measurements. *Proceedings of the XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology*-Ed A Basaomba and MD Hernandez F de Rojas, 1995 ; 209-214.
- Winck J.-C., Sapage J.-M., Torres S., Vanzeller M., Palmares M.-C., Delgado J.-L. - Work-related changes in peak expiratory flow in cork worker's respiratory disease (Suberosis). *J Allergy Clin Immunol* 1999 ; 103(1, Pt2) : 848.
- Winck J.-C., Delgado L., Vanzeller M., Guimarães T., Torres S., Sapage J.-M. - Monitoring of Peak Expiratory Flow rates in cork worker's occupational asthma. *Journal of Asthma* 2001 ; 38(4) : 357-62.

- Arlian L.-G., Vyzeski-Moher D.-L., Johansson S.-G., van Hage-Hamsten M. - Allergenic characterization of *Thyrophagus putrescentiae* using sera from occupationally exposed farmers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997 ; 79 : 525-9.
- Collof M.-J., Merrett T.-G., Merrett J., McSharry C., Boyd G. - Feather mites are potentially an important source of allergens for pigeon and budgerigar keepers. *Clin Exp Allergy* 1997 ; 27 : 60-7.
- Avila R., Lacey J. - The role of *Penicillium frequentans* in suberosis (Respiratory disease in cork workers). *Clinical Allergy* 1974 ; 4 : 109-17.
- Hunninghake G.-W., Gadek J.-E., Kawanami O., Ferrans V.-J., Crystal R.-G. - Inflammatory and Immune processes in the Human Lung in Health and disease: evaluation by broncho-alveolar lavage. *Am J Pathol* 1979 ; 97 (1) : 149-98.
- Kavaru M.-S., Duveik R.-A., Thomassen M.-J. - Role of Bronchoscopy in asthma research. *Clin Chest Med* 1999 ; 20 (1) : 153-189.
- Frew A.-J., Chan H., Lam S., Chan-Yeung M. - Bronchial inflammation in occupational asthma due to western red cedar. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 ; 151 : 340-4.
- Fabbri L.-M., Boschetto P., Zocca E., Milani G., Pivrotto M., Plebani M., Burlina A., Licata B., Mapp C.-E. - Broncho-alveolar neutrophilia during late asthmatic reactions induced by toluene diisocyanate. *Am Rev Respir Dis* 1987 ; 136 : 36-42.
- Cockcroft D.-W., Kilhan D.-N., Mellon GJA. - Bronchial Reactivity to Inhaled histamine, a method and clinical survey. *Clin Allergy* 1977 ; 7 : 235-43.
- Klech H., Pohl W. ed. - Technical recommendations and guidelines for broncho-alveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1989 ; 2 : 561-85.
- Selman-Lama M., Pérez-Padilla R. - Airflow obstruction and airways lesions in hypersensitivity pneumonitis. *Clin Chest Med* 1993 ; 14 (4) : 699-714.
- Erkinjuntti-Pekannen R., Rytönen H., Kokkarinen J.-I., Tukiainen H.-O., Partanen K., Terho E. - Long-term risk of Emphysema in patients with Farmer's Lung and Matched controls. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 158(2) : 662-665.
- Lemière C., Chaboilliez S., Trudeau C., Taha R., Maghni K., Martin J.-G., Hamid Q. - Characterization of airway inflammation after repeated exposures to occupational agents. *J Allergy Clin Immunol* 2000 ; 106 : 1163-70.

18. Bentley A.-M., Durham S.-R., Kay A.-B. - Comparison of the immunopathology of extrinsic, intrinsic and occupational asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1994 ; 4(5) : 222-32.
19. Boulet L.-P., Boutet M., Laviolette M., Dugas, Milot J., Leblanc C., Paquette L., Côté J., Cartier A., Malo J.-L. - Airway inflammation after removal from causal agent in occupational asyhma due to high and low molecular weight agents. *Eur Respir J* 1994 ; 7 : 1567-1575.
20. Kraft M., Djukanovic R., Wilson S., Holgate S.-T., Martin R. - Alveolar Tissue Inflammation in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 ; 154 : 1505-1510.
21. Hamid Q., Song Y., Kotsimbos T.-C., Minshall E., Bai T.-R., Hegele R.-G., Hogg J.-C. - Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997 ; 100 : 44-51.
22. Frew A., Chang J.-H., Chan H., Quirce S., Noertjojo K., Keown P., Chan-Yeung M. - Lymphocyte responses to plicatic acid-human serum albumin conjugate in occupational asthma caused by western red cedar. *J Allergy Clin Immunol* 1998 ; 101 : 841-7.
23. Bentley A.-M., Maestrelli P., Saetta M., Fabbri L.-M., Robinson D.-S., Bradley B.-L., Jeffery P.-K., Durham S.-R., Kay A.-B. - Activated lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992 ; 89 : 821-9.



TRABALHO 4

*Cork worker's occupational asthma. Lack of association
with allergic sensitisation to fungi of the work environment*

CORK WORKER'S OCCUPATIONAL ASTHMA. LACK OF ASSOCIATION WITH ALLERGIC SENSITISATION TO FUNGI OF THE WORK ENVIRONMENT

João C Winck* MD, Luís Delgado** MD, PhD, Rita Murta*** ChEng,
Manuela Vanzeller**** MD, J Agostinho Marques* MD, PhD

Pneumology* and Immunology Departments**, Faculdade de Medicina,
Universidade do Porto and Hospital de S.João, Porto; Amerlab/DPC, Lisboa;
Pneumology Department, Centro Hospitalar de Gaia****-PORTUGAL

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate allergic sensitisation to *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum*, and *Thricoderma longibrachiatum* in cork workers with asthma.

Skin «prick» tests with a battery of common allergens and with the 3 fungi were performed in 10 cork workers with asthma and 8 non-exposed asthmatics. Based on serial Peak Expiratory Flow measurements, 5 were classified as occupational (AO) and 5 as non-occupational asthma (NOA). In exposed patients, specific antibodies for the 3 fungi were also studied by immunoblotting.

Positive skin «prick» tests to common allergens were present in 2/10 patients with occupational exposure and 4/8 of the control group. Moreover, 2/5 of patients with OA and 3/8 of controls had sensitisation to storage mites. All exposed patients (with OA or NOA) had negative skin prick tests for the fungal extracts. In patients with asthma and occupational exposure, immunoblotting results confirmed the absence of specific IgE.

In conclusion, atopy does not seem to characterise occupational asthma of cork workers but sensitisation to storage mites may be involved in some cases. Despite a long exposure to moulds, we could not find evidence of IgE sensitisation to the three most prevalent cork fungi in patients with occupational asthma.

Key-words: Occupational asthma, immunoblotting, IgE, fungi, cork industry

INTRODUCTION

Cork workers are at risk for developing an occupational lung disease (Suberosis) due to repeated exposure to mouldy cork dust⁽¹⁾. Usually they present with an interstitial lung disorder (Hypersensitivity Pneumonitis) with a CD8+ lymphocytic alveolitis and specific IgG antibodies to *Penicillium glabrum* (formerly known as *Penicillium frequentans*), one of the fungi most frequently isolated from cork samples^(1,2).

Asthma cases in occupational environments traditionally associated with hypersensitivity pneumonitis, like bird fanciers and farmers, have been attributed to previously unrecognised antigens^(3,4). However, in some cases, the same antigen may be implicated in both diseases⁽⁵⁾.

We previously identified cases of occupational asthma in the cork industry, confirmed with serial Peak Expiratory Flow recordings⁽⁶⁾, but its aetiology is still unknown. *Chrysonilia sitophila*, another prominent fungus colonising cork⁽⁷⁾, has also been identified as a cause of occupational asthma in the wood industry⁽⁸⁻⁹⁾.

So, the aim of our study was to search for IgE sensitisation to *Penicillium glabrum*, *Chrysonilia sitophila* and *Thricoderma longibrachiatum*, common fungi of the cork industry work environment, as a possible aetiology of cork worker's occupational asthma.

PATIENTS AND METHODS

We studied ten cork workers (age: 43.2 ± 9.8 years, 5 males/ 5 females) referred to an outpatient clinic of occupational respiratory diseases, due to asthma symptoms they related to work (cork stoppers production). Eight patients with asthma, referred to an allergy clinic, but with no exposure in the cork industry, were used as controls.

Correspondence:

João Carlos Winck
Pneumology Department
Faculdade de Medicina, Universidade do Porto
Hospital de S. João
4200 Porto – Portugal
Email: jwinck@hjsjoao.min-saude.pt

Lung Function tests

All patients performed spirometry, body plethysmography and carbon monoxide diffusing capacity (*MasterScreen Body, Erich Jaeger GmbH, Hoechberg, Germany*). Reversible airflow limitation was considered when the improvement of FEV₁ after an inhaled bronchodilator was greater than 15% and exceeded 200 ml. Bronchial hyperresponsiveness was measured by histamine challenge, using the protocol of Cockcroft et al⁽¹⁰⁾.

Peak Expiratory Flow records

Patients with occupational exposure performed serial Peak Expiratory Flow (PEF) measurements as previously described⁽⁶⁾: patients were asked to measure PEF every 2h and to record the best of three attempts during at least 10 days at work and 10 days away from work, in a consecutive fashion. The record was considered positive when two of three observers agreed that the PEF graph showed a work-related change.

According to these criteria, five patients were classified as having occupational asthma (OA) and another five as having non-occupational asthma (NOA).

Skin prick tests

All patients underwent skin «prick» testing with a panel of common allergens and storage mites (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Dactylis glomerata*, cat fur, *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Euroglyphus maynei*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides microceras*, *Tyrophagus putrescentiae*). We also tested glycerol-saline extracts (2mg/ml) obtained after reconstitution of freeze-dried samples of *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum* and *Thricoderma longibrachiatum* isolated from the industrial environment (kindly provided by Dr V San Romão⁽⁷⁾ and prepared by *CBF Leti, Madrid, Spain*). A negative control solution and a positive control (0.1 % histamine) were also used. Tests were considered positive when the mean diameter (in mm) of the wheal and flare was \geq positive control.

In vitro tests (Immunoblotting)

In 8 cork workers with asthma and work-related symptoms (3 with NOA and 5 with OA), we searched for specific antibodies (IgE, IgG4) to the 3 moulds (using the same antigenic material source as the «in vivo» tests) by immunoblotting (*AlaSTAT-AlaBlot System, DPC, Los Angeles, CA, USA*). *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum* and *Thricoderma longibrachiatum* allergen extracts were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (*SDS-PAGE*) and electrotransferred to nitrocel-

lulose membranes, which were cut into the strips provided in the *AlaBLOT* kits. A serum pool of four atopic patients with high specific IgE score (>17.5 IU/ml, Class 4 microplate *AlaSTAT*) to several moulds allergens was used by DPC as a positive control serum in production of *AlaBLOT* strips.

AlaBLOT strips specific for each antigen were used to identify specific IgE or IgG4 antibodies in patients' sera. The assay was performed in *AlaBLOT* reaction trays on a rocker at room temperature as described in the package insert. Briefly, the different antigen strips were incubated with 500 μ L of diluted patient serum (1:10) for 2 hours. The unbound serum was then removed by washing the membrane strips three times with 1 mL of wash solution for 5-10 min/wash. The specific antibodies bound to the strips were then probed by incubating them with 0.5 mL of enzyme-labeled anti-IgE Ab (or anti-IgG4) for 30 minutes. The unbound enzyme conjugate was further removed by washing the membrane strips three times with 1 mL wash solution for 5-10 min/wash. The recognized antigens were then visualized by addition of 0.5 mL substrate solution for 15 minutes. The color development was stopped by washing membrane strips 3 times with 1 mL of distilled water for 5 min/wash. Finally, the membrane strips were air dried on paper towels and pasted on a white filter paper. The molecular weight and intensity of each protein band was further evaluated with the help of *Quantiscan* software program (*Biosoft, Cambridge, UK*). The molecular weight (MW) of a specific determinant could be estimated by comparing its relative mobility to the relative mobility of protein markers of known molecular weight in a range from 6 to 250 kDa with a formula provided by the manufacturer (*DPC*).

Statistical methods

Data were computed into SPSS® software for Windows® (*SPSS Inc., Chicago, IL*). Descriptive analysis of variables was performed, and the data are presented as mean \pm standard deviation (SD). Differences between the two patient groups were analysed using *Fisher's exact test*, and the level of significance considered was 5%.

RESULTS

The group of workers we studied had a long history of exposure in the cork industry (18.8 ± 8.5 years) and, in all, symptoms began after a long latency period (5.3 ± 4.5 years).

All patients worked in cork stoppers production, most of them in punching and/or sorting of bottle corks. Five patients had mild to moderate airflow limitation, while

significant bronchial hyperresponsiveness (PC20 histamine < 16 mg/ml) was present in five out of six subjects tested (Table 1).

Table 1 – Demographic characteristics, lung function and bronchial hyperresponsiveness in cork workers with asthma.

	Occupational Asthma (N=5)	Non-Occupational Asthma (N=5)
Age	40.9±8.6	44.9±8.9
Gender	3F/2M	2F/3M
Symptoms duration (years)	6.8±6.0	3.8±2.2
Exposure (years)	15.8±6.5	21.8±10.0
FEV1%	89.4±22.7	74.0±19.1
RV%	123.4±20.4	166.8±48.4
BHR	3/3	2/2

F - female; M - male; FEV1 - Forced expiratory volume in 1 second; RV - Residual volume; BHR - Bronchial hyperresponsiveness

Positive skin «prick» tests to common allergens were present in 2/10 patients with occupational exposure and 4/8 of the control group (Table 2). Moreover, 2/5 of patients with OA and 3/8 of controls had sensitisation to storage mites (p.n.s.). While one polysensitised (house dust and storage mites) asthmatic patient from the control group had positive skin «prick» tests to fungi (*Penicillium glabrum* and *Chrysonilia sitophila*), all patients with OA and NOA had negative skin tests for the three fungi.

Table 2 – Positive skin prick tests in cork worker's asthma and non-exposed asthmatic controls. *Number of positive tests (mean diameter -in mm- of the wheal and flare ≥ positive control)

Allergens	Occupational Asthma* (n=5)	Non Occupational Asthma* (n=5)	Controls* (n=8)
House Dust Mites:			
<i>Dermatophagoides Farinae</i>	1/5	0/5	3/8
<i>Dermatophagoides Pteronyssinus</i>	1/5	0/5	4/8
total	2/5	0/5	4/8
Storage Mites:			
<i>Acarus siro</i>	2/5	0/5	1/8
<i>Lepidoglyphus destructor</i>	1/5	0/5	3/8
<i>Euroglyphus maynei</i>	1/5	0/5	3/8
<i>Blomia tropicalis</i>	1/5	0/5	1/8
<i>Dermatophagoides microceras</i>	1/5	0/5	3/8
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	2/5	0/5	2/8
total	2/5	0/5	3/8
Fungi:			
<i>Penicillium glabrum</i>	0/5	0/5	1/8
<i>Chrysonilia sitophila</i>	0/5	0/5	1/8
<i>Thricoderma longibrachiatum</i>	0/5	0/5	0/8
total	0/5	0/5	1/8

Testing the sera of three NOA cases and five OA cases by immunoblotting confirmed the absence of IgE antibodies to *Penicillium glabrum* (Fig. 1, left), *Chrysonilia sitophila* and also *Thricoderma longibrachiatum* (data not shown). However, IgG4 antibodies could be demonstrated to *Penicillium glabrum* (Fig. 1, right: lanes 5, 6, 8 and 12), and also to *Chrysonilia sitophila* (data not shown) but without a specific pattern of reactivity for occupational asthma.

DISCUSSION

Workers in the cork industry are exposed to dusts and moulds that can result in development of an occupational respiratory disorder - Suberosis^(1,2). Traditionally, as in other occupational settings, like bird fanciers and farmers, this exposure leads to the development of hypersensitivity pneumonitis. However, description of asthma cases in these settings is now more common, and its aetiology needs some clarification⁽³⁻⁶⁾. In the absence of an identifiable etiological agent, the assessment of peak expiratory flow rates, at and away from work, is a valuable diagnostic method to ascertain the occupational nature of a worker's asthma⁽⁶⁾. As in baker's asthma, fungal and mite allergens can be possible causes⁽¹¹⁾. Previous studies with bronchoalveolar lavage have shown that cork worker's asthma is associated with eosinophilic bronchoalveolar inflammation, a finding similar to occupational asthma to low molecular weight agents and atopic asthma⁽¹²⁾.

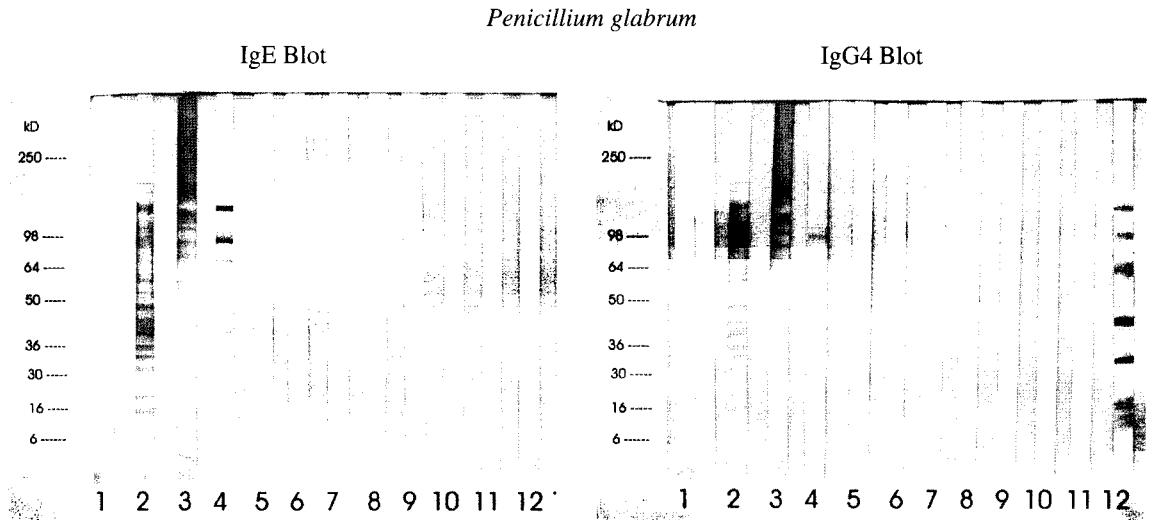


Figure 1 – IgE (left) and IgG4 (right) Immunoblots of *Penicillium glabrum* with individual sera of non-occupational asthma (lanes 5-7) and occupational asthma cases (lanes 8-12). The molecular weight standard (lane 1), protein stain (lane 2) and carbohydrate stain (lane 3) profiles are also shown. On lane 4 there is a positive serum pool. The IgG4 immunoblotting profile showed several protein bands from 13 to 136 kDa that were reactive with IgG4 from cork workers with both types of asthma. More intense binding was seen between 45-53 kDa and 86-92 kDa (easily seen in lanes 5, 6, 8 and 12).

Fungal spores are known to be related to the incidence of asthma and to produce IgE-mediated hypersensitivity^(13,14). Moreover, fungal allergens have also been implicated as causative agents of occupational asthma^(8,9). Apart from *Penicillium glabrum*, a fungus implicated in the early descriptions of Suberosis, recently *Chrysonilia sitophila* has been also identified all along the manufacturing process of cork⁽⁷⁾ and, as in the logging industry, may play a role in the cork worker's occupational asthma⁽⁸⁾.

In our study, using skin testing and immunoblotting for the detection of specific IgE antibodies to *Penicillium glabrum*, *Chrysonilia sitophila* and *Thricoderma longibrachiatum*, we did not find evidence of allergic sensitisation in patients with asthma in the cork industry, although an antibody response (IgG4) was evident in some cases (Fig.1). In fact, specific IgG4 has been previously associated with non-IgE mediated cases of occupational asthma to both organic⁽¹⁵⁾ and inorganic agents^(16,17), but its biological significance is still unknown⁽¹⁸⁾.

In our series, the finding of IgG4 binding bands in both occupational and non-occupational asthma cases (Fig. 1) supports the relationship of this antibody production with a long-term exposure to fungal antigens. Curiously, the patient with more intense IgG4 binding bands (Fig. 1, lane 12) combined clinical features of both occupational asthma and hypersensitivity pneumonitis. This patient with asthmatic symptoms, an obstructive defect with normal diffusing capacity and a positive serial PEF, had an uncommon bronchoalveolar lavage pattern, evocative of hypersensitivity pneumonitis (44.1%

lymphocytes, with a CD4/CD8 ratio 0.86). In fact, the combination of occupational asthma associated with bronchoalveolar lavage findings and specific antibodies suggestive of hypersensitivity pneumonitis has also been described in rare cases with exposure to decaying wood^(5, 19).

Although we have studied a small sample of asthmatic patients with proven work-related changes in PEF, atopy and fungal allergy does not seem to be an etiologic factor for these patients' asthma. In a previous study using a fluorometric immunoassay, we also did not find specific IgE to *Penicillium glabrum* in another sample of asthmatic cork workers⁽²⁰⁾. In the present study we included other common cork moulds and used a more sensitive technique to search for significant IgE. The lack of IgE sensitization to fungi known to colonize cork during its industrial processing points to the search for other causative agents, such as cork chemical compounds or contaminants⁽²¹⁾. Some contaminants, like isocyanates, are known to be used in some areas of the cork industry⁽²²⁾, like cork floor tile production. However, that was not the case of the population included in our study, all involved in punching and finishing cork stoppers.

Two occupational asthma cases had positive skin tests to storage mites (*Acarus siro* and *Tirophagus putrescentiae*) suggesting that, like in other forms of occupational asthma, they may be implicated in some cases of cork worker's asthma⁽²³⁻²⁵⁾. Humid conditions, like those seen in cork warehouses, may favour storage mites' growth and facilitate sensitisation to these mites in cork workers⁽²³⁾. These patients were also sensitised

to common house dust mites (one to *Dermatophagoides pteronyssinus* and another to *Dermatophagoides farinae*) and at least some response to storage mites may result from allergic cross-reactivity⁽²⁶⁾. The findings of a similar prevalence of sensitisation to mites in our controls suggest that storage mites are widespread in the environment and not an occupational allergen specific to cork workers.

In conclusion, although long-standing exposure to high levels of mould spores occurs and in spite of evidence of immunological sensitisation with specific IgG4 production in some patients, in patients with occupational asthma we could not find IgE sensitisation to the three most prevalent fungi in the cork industry. Our results do indicate that other mechanisms are responsible for inducing this disease. In fact, cork workers are chronically exposed to a wide diversity of chemicals and particles, potential airway irritants, which can have a role in the aetiology of cork worker's asthma. New studies exploring this hypothesis are warranted.

Acknowledgments:

We thank Dr Miguel Casanova from *CBF Leti* (Madrid, Spain) for the skin prick tests extracts, and Melissa Lopez from *DPC* (Los Angeles, USA) for immunoblotting preparation.

References

- 1- Pimentel JC, Avila R. Respiratory disease in workers in the cork industry (Suberosis): new trends and diagnostic possibilities. *Thorax* 1973; 28: 409
- 2- Delgado L, Winck JC, Sapage JM et al. Respiratory disease in cork workers: characterization of Suberosis alveolitis by bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 1992 ; 5: 503 [abstract]
- 3- Colloff MJ, Merrett TG, Merrett J et al. Feather mites are potentially an important source of allergens for pigeon and budgerigar keepers. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 60
- 4- Arlian LG, Vyszieski-Moher DL, Johansson SG, van Hage-Hamsten M. Allergenic characterization of *Thyrophagus putrescentiae* using sera from occupationally exposed farmers. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 79: 525-9
- 5- Hirakata Y, Katoh T, Ishii Y, et al. *Trichosporon asahii*-induced asthma in a family with Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88(3): 335-8
- 6- Winck JC, Delgado L, Vanzeller M, et al. Monitoring of peak expiratory flow rates in cork worker's occupational asthma. *J Asthma* 2001; 38: 357-62
- 7- Danesh P, Velez Caldas FM, Figueiredo Marques JJ, San Romão MV. Mycobiota in Portuguese "normal" and "green" cork throughout the manufacturing process of stoppers. *J Appl Microbiol* 1997; 82: 689-94
- 8- Tarlo S, Wai Y, Dolovich J, Summerbell R. Occupational asthma induced by *Chrysonilia sitophila* in the logging industry. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1409-13
- 9- Côté J, Chan H, Brochu G, Chan-Yeung M. Occupational asthma caused by exposure to *Neurospora* in a plywood factory worker. *Br J Ind Med* 1991; 48: 279-82

- 10- Cockcroft DW, Kilhan DN, Mellon GJA. Bronchial Reactivity to Inhaled histamine, a method and clinical survey. *Clin Allergy* 1977; 7: 235-43
- 11- Heederik D, Newman Taylor AJ. Occupational Asthma in the baking industry. In Bernstein IL, Chan-Yeung M, Malo J-L, Bernstein DI, eds. *Asthma in the workplace*. 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker, 1999; 377-97
- 12- Winck JC, Delgado L, Vanzeller M, et al. Bronchoalveolar inflammation in cork worker's asthma. *Allerg Immunol (Paris)* 2002 ; 34 (6) : 199-203
- 13- Licorish K, Novey HS, Kozak P et al. Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 819
- 14- Lehrer SB, Hughes JM, Altman LC et al. Relevance of basidiomycete allergy in the USA and Europe and its relationship to allergic respiratory symptoms. *Allergy* 1994; 49: 460-5
- 15- Devey ME, Panzani R. The IgG subclasses of antibodies to castor bean allergen in patients with allergic asthma: detection of a high incidence of antibodies of the IgG4 subclass. *Clin Allergy* 1975; 5: 353-61
- 16- Yokota K, Yamaguchi K, Takeshita T, Morimoto K. The significance of specific IgG4 antibodies to methyltetrahydrophthalic anhydride in occupationally exposed subjects. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 694-701
- 17- Park HS, Hong C-S. The significance of IgG and IgG4 antibodies to a reactive dye in exposed workers. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 357-62
- 18- Cullinan P. Occupational asthma, IgE and IgG. *Clin Exp Allergy* 1998; 28: 668-70
- 19- Halpin DMG, Graneek BJ, Turner-Warwick, Newman-Taylor AJ. Extrinsic allergic alveolitis and asthma in a sawmill worker: case report and review of the literature. *Occup Environ Med* 1994; 51: 160-4
- 20- Delgado L, Winck JC, Sapage JM et al. Antibodies to *Penicillium frequentans* in cork worker's respiratory disease (Suberosis). Application of the ImmunoCAP IgG RAST in sera and bronchoalveolar lavage (BALF) measurements. In: A Basomba and MD Hernandez F de Rojas Editors. *Proceedings of the XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology* 1995; 209-214.
- 21- Rocha S, Delgadillo I, Ferrer Correia AJ. GC-MS study of volatiles of normal and microbiologically attacked cork from *Quercus suber* L. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 865-71
- 22- Alegre J, Morell, Cobo E. Respiratory symptoms and pulmonary function of workers exposed to cork dust, toluene diisocyanate and conidia. *Scand J Work Environ Health* 1990; 16: 175-81
- 23- Blainey AD, Topping MD, Ollier S, Davies RJ. Allergic respiratory disease in grain workers: the role of storage mites. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84(3): 296-303
- 24- Alvarez MJ, Castillo R, Rey A et al. Occupational asthma in a grain worker due to *Lepidoglyphus destructor*, assessed by bronchial provocation test and induced sputum. *Allergy* 1999; 54: 884-9
- 25- Warren CPW, Holford-Strevens V, Sinha RN. Sensitization in a grain handler to the storage mite *Lepidoglyphus destructor* (Schrank). *Ann Allergy* 1985; 50:30
- 26- Luczynska CM, Griffin P, Davies RJ, Topping MD. Prevalence of specific IgE to storage mites (*A siro*, *L destructor* and *T longior*) in an urban population and cross reactivity with house dust mite (*D pteronyssinus*). *Clin Exp Allergy* 1990; 20(4): 403-6

TRABALHO 5

*Antigenicity of major cork moulds in Suberosis (cork workers' pneumonitis)
determined by Immunoblotting*

Antigenicity of major cork moulds in Suberosis (cork worker's pneumonitis) determined by immunoblotting

João Carlos Winck*, Luís Delgado**, Rita Murta***, Melissa Lopez**** J Agostinho Marques*

*Pneumology and **Immunology Departments, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto;

*** AmerLab (DPC), Lisboa-PORTUGAL, ****DPC, Los Angeles, USA

ABSTRACT

Background: *Penicillium glabrum* has been considered the main causative agent of cork workers hypersensitivity pneumonitis (HP). It remains unclear, however, which *Penicillium glabrum* components are responsible for the disease and if other fungi may be also involved.

Our aim was to characterize the antigenicity of *Penicillium glabrum* and *Chrysonilia sitophila*, the most frequent fungi colonizing cork.

Methods: We studied 9 cork workers with HP (all performing bronchoalveolar lavage, lung function tests and high-resolution CT scans) and 7 with asthma (all performing lung function tests and serial PEF records). In all patients serum specific IgG, IgG4 and IgE antibodies to *Penicillium glabrum* and *Chrysonilia sitophila* were quantitatively analysed using *Immunoblotting* and *Quantiscan* software.

Results: Patients with HP showed more intense IgG antibody responses to *Penicillium glabrum* than asthmatics; moreover, all HP sera but only two asthmatics recognized antigens of molecular weight of 12-13.5 kDa and 33 kDa. IgG4-binding was more common in HP except for 33 kDa antigen that had a higher frequency in asthmatics. IgG reactivity to *Chrysonilia sitophila* was also more intense in HP patients and the 16 kDa component was only reactive with HP sera. The frequencies of IgG4-binding to *Chrysonilia sitophila* were low. No specific IgE was found in any patient.

Conclusions: Immunoblotting with quantitative analysis is a suitable tool for the characterization of *Penicillium glabrum* and *Chrysonilia sitophila* antigenicity in Suberosis. The finding that asthmatic patients produce specific IgG4 but not IgE to 33kDa antigen of *Penicillium glabrum* suggests a modified Th2 response in the context of a high antigen occupational exposure.

Key Words

Suberosis, hypersensitivity pneumonitis, Immunoblotting, IgG, IgG4, *Penicillium glabrum*, *Chrysonilia sitophila*.

INTRODUCTION

Suberosis is a hypersensitivity pneumonitis (HP) resulting from repeated exposure to mouldy cork dust during its industrial processing⁽¹⁾. The main causative agent of Suberosis is *Penicillium glabrum* (formerly known as *Penicillium frequentans*) one of the most frequent fungi isolated in cork samples⁽²⁾. Precipitating antibodies to *Penicillium glabrum* as well as a high intensity CD8+ lymphocytic alveolitis are characteristic of the cork workers' pneumonitis in Suberosis^(3,4).

Patients with HP (like farmer's lung and bird fanciers' disease) have specific antibodies for a range of antigens including proteins, glycoproteins and polysaccharides^(5,6). However, its presence in asymptomatic exposed individuals makes its role in the pathogenesis unclear⁽⁷⁾. The search for 'disease-specific' antigens in HP, detected by precipitin reactions or immuno-enzymatic assays only in sera of symptomatic subjects, has given controversial results. While some authors claim that immuno-dominant antigens exist both in farmer's lung and bird fanciers' disease^(5,8), others state that these results are simply a reflection of the sensitivity of the immunochemical methods used⁽⁶⁾. Qualitative differences in the antibodies produced by symptomatic and asymptomatic patients have also been found, suggesting that IgG subclass of specific antibodies should also be studied⁽⁹⁾. In this context, specific IgG4 is seen as a marker of chronic fungal exposure, and may also be linked to a lower inflammatory potential compared with other isotypes⁽¹⁰⁾.

Recently, we have also characterized cases of occupational asthma in the cork industry, confirmed with serial Peak Expiratory Flow recordings, but could not find evidence for IgE sensitization to *Penicillium glabrum* both by in vitro and in vivo tests^(11,12). *Chrysonilia sitophila*, has also been identified as a cause of immunological sensitization and occupational asthma in the wood processing industry^(13,14) and is also a common mould in cork industrial samples⁽¹⁵⁾. Immunoblotting has been extensively used in the investigation of environmental allergies for the identification of major antigens and may have a higher sensitivity in the analysis of specific antibodies^(8,16). In a recent report⁽¹⁷⁾, immunoblotting had an important role in the confirmation of a fungal aetiology for a new case of extrinsic allergic alveolitis.

Improved characterization of the antibody response to different fungal antigens may be important for the study of the humoral and cellular immune response to the chronic inhalation of mouldy cork dust in Suberosis. So, the aim of our study was to characterize the antigenicity of *Penicillium*

Correspondence to:

João Carlos Winck,
Pneumology Department, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, PORTUGAL;
e-mail: jwinck@hsjoao.min-saude.pt

glabrum and *Chrysonilia sitophila* studying specific IgG, IgG4 and IgE antibodies by immunoblotting in cork worker's respiratory disease, evaluating both patients with hypersensitivity pneumonitis and airways disease.

MATERIALS AND METHODS

Patients

We included a group of nine cork workers with hypersensitivity pneumonitis (age: 34.4 ± 11.1 years, 7 males/2 females) with work-related symptoms of cough, exertional dyspnea and weight loss. All had a high intensity CD8+ lymphocytic alveolitis (bronchoalveolar lavage fluid total cells $9.1 \pm 6.0 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$, $78.4 \pm 9.1\%$ lymphocytes, CD8+ $55.5 \pm 11.6\%$), a restrictive pattern or lung diffusion impairment (5/9, 56%) and/or "ground-glass" attenuation (7/7, 100%) in high-resolution computed tomography scans. Another group of seven cork workers with asthma, complaining of wheezing and dyspnea worsening with occupational exposure, was also studied. Two of them had reversible airways obstruction and five a significant bronchial hyperresponsiveness (PC20 histamine < 16 mg/ml). According to the visual inspection of serial peak expiratory flow rates⁽¹¹⁾, four were classified as having occupational asthma (OA) and three as non-occupational asthma (NOA).

Immunoblotting

Specific antibodies (IgG, IgG4 and IgE) to *Penicillium glabrum* and *Chrysonilia sitophila* were searched by immunoblotting (AlaSTAT-AlaBlot System, DPC, Los Angeles, CA, USA).

Mould allergen extracts were obtained from lyophilized culture samples collected from industrial environment and kindly provided by Dr V San Romão⁽¹⁵⁾. They were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrotransferred to nitrocellulose membranes, which were cut into the strips provided in the AlaBLOT kits. A serum pool of four atopic patients with high specific IgE score (>17.5 IU/ml, Class 4 microplate AlaSTAT) to several moulds allergens was used as a positive control serum in production of AlaBLOT strips. For *Penicillium glabrum* a bronchoalveolar lavage pool with positive IgG in fluoro-enzymo-immuno assay⁽¹²⁾ was also used as a control.

AlaBLOT strips specific for each antigen were used to identify specific IgG antibodies in patients' sera. The assay was performed in AlaBLOT reaction trays on a rocker at room temperature as described in the package insert. Briefly, the different antigen strips were incubated with 500 µL of diluted patient serum (1:10) for 2 hours. The unbound serum was then removed by washing the membrane strips three times with 1 mL of wash solution for 5-10 min/wash. The specific antibodies bound to the strips were then probed by incubating them with 0.5 mL of enzyme-labelled anti-IgG Ab for 30 minutes. The unbound enzyme conjugate was further removed by washing the membrane strips three times with 1 ml wash solution for 5-10 min/wash. The recognized antigens were then visualized by addition of 0.5 mL substrate solution for 15 minutes. The colour development was stopped by washing membrane strips 3 times with 1 mL of distilled water for 5 min/wash. Finally, the membrane strips were air dried on paper towels and pasted on a white filter paper. Films were scanned with a HP (Scanjet 7400 C) scanner and analysed with the Quantiscan software (Biosoft,

Cambridge, UK). The image was pre-processed by rotation, cropping to remove background and re-calibration of grayscale. Also during pre-processing stage, the dye front was identified, the calibration line defined and the calibration factors provided by the manufacturer (DPC) introduced. After loading this image, the lane analysis was started. The Autopeak option was selected, the minimum height and width of peak parameters were given, 3 and 2 respectively, and finally the peaks and edges of all lane profiles identified. The Autopeak option operates on the background-subtracted profile, so a net area and net height for each peak were calculated. According to the calibration factors, the molecular weight (MW) of each peak was also automatically calculated in a range from 6 to 200 kDa.

Statistics

All data were analysed with the statistical package SPSS® for Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL). Simple descriptive analysis was predominantly used and, unless otherwise stated, data are reported as mean \pm SD and frequencies as n (%). Differences between band intensities of the two patients groups (hypersensitivity pneumonitis and asthma) were analysed using Mann-Whitney's U Test, while Fisher's exact test was used for comparison between band frequencies. Significance was accepted at 5%.

RESULTS

The group of workers we studied had a long history of exposure in the cork stoppers industry (18 ± 10 years) most of them in punching and/or sorting of bottle corks. Nine patients had a typical HP presentation, and four had occupational asthma. Clinical and functional characterization of the two patient groups is displayed on Table 1.

Specific antibodies to *Penicillium glabrum*

All tested sera from cork-exposed patients showed IgG reactivity to several components of *Penicillium glabrum* being clearly more intense in the group with HP (Fig 1, Table 2). A total of 11 components of *Penicillium glabrum* ranging in MWs from 12 to ≥ 100 kDa bound to IgG antibodies. There was a significant difference in the frequency of IgG-binding to 12-13.5 kDa and 33 kDa *P. glabrum* antigens between PH and asthmatic patients (only two of the seven asthmatics, but in all HP patients – Table 3). Moreover the 33 kDa was also reactive in the immunoblot of a control BALF pool (data not shown). Some of the higher molecular weight components reacted with all tested sera from both groups, such as the 48-52 kDa and the 88-92kDa antigens. The components of 37 and ≥ 100 kDa reacted with all HP sera and also with the majority of asthmatic patients (86%). The Quantiscan software also allowed the comparison of the relative band intensity of the IgG-binding *P. Glabrum* antigens recognized by both patient groups. The intensity of the IgG-binding was significantly higher in the PH group for 8 of the 11 antigens – Table 3.

Concerning IgG4 antibodies to *P. glabrum* all tested sera of HP patients showed specific binding for the different molecular weight components, from 14 to 92 kDa, with frequencies ranging from 33 to 78% of the cases.

The asthmatic group showed immunoblot reactivity to only four of the eight components (Table 4), with lower frequency and binding intensity, except for the 33 kDa antigen that

Table 1 – Clinical characteristics of the patients with hypersensitivity pneumonitis (n = 9) and asthma (n = 7).

	<i>Hypersensitivity Pneumonitis</i>	<i>Asthma</i>
Age (years)	34.4±11.1	45.4±10.6
Exposure (years)	19.4±11.7	17.1±8.4
FEV1%	75.5±16.8	84.4±25.4
FVC%	78.4±18.9	103.2±17.2
FEV1/FVC%	100.6±16.4	68.4±11.4
TLC%	80.4±12.3	114.1±8.9
DLCO%	76.1 ±21.0	n.d.
BHR	n.d.	5/5
Positive PEF	n.d.	4/7
Ground-glass	7/7	n.d.

FEV1% – % of predicted FEV1; FVC1% – % of predicted FVC; DLCO% – % of predicted Carbon Monoxide Diffusion Capacity; BHR – Bronchial Hyperresponsiveness (PC20 histamine < 16mg/dl); Positive PEF – work related changes in Peak Expiratory Flow records; Ground-glass- ground-glass attenuation in high resolution CT scans

was positive in 71% of cases (versus 33 % in HP patients). Although in our positive control sera we detected IgE-binding components for six different components no positive cases were found in our occupationally exposed patients (data not shown).

Specific antibodies to Chrysonilia sitophila

All tested sera from cork-exposed patients showed IgG reactivity to several components of *Chrysonilia sitophila* (Fig. 2, top; Table 5). A total of 13 components of *Chrysonilia sitophila* ranging in MWs from 12 to ≥100 kDa bound to IgG antibodies and, to most of them (11/13) there was a high frequency of positivity in both HP (from 67 to 100%) and asthma cases (from 57 to 100%) (Table 6). The 16 kDa component was only reactive with HP sera, and the 51-55 kDa antigen, also recognized by most (89%) of HP sera, but only by one of the asthmatic patients. There was a significant difference in the frequency of IgG-binding to 16 kDa and 51-55 kDa *C. sitophila* antigens between HP and asthmatic patients, and band intensity was significantly higher in HP for 9 of the 13 components (Table 6).

The frequencies of IgG4-binding to *Chrysonilia sitophila* were less than 15% for all components (Fig 2, bottom) except for the 12-14 kDa (29% of asthmatics) and 38-43 kDa (33% of HP). The IgG4-binding was of low intensity in all cases except for the case of HP with the higher IgG binding that also showed IgG4 reactivity to 4 of the 12 components reactive in the IgG immunoblot (Fig 2 – lane17).

No IgE-binding to *C. sitophila* was found in any of the cork-exposed patients we studied.

DISCUSSION

Suberosis is an immunological lung disease caused by repeated inhalation of airborne cork particles and spores of different moulds colonizing cork slabs during its industrial processing⁽²⁾. The major mould species isolated from the *Quercus suber* bark after harvest⁽¹⁵⁾ and from air samples in cork factories⁽²⁾ include *Penicillium glabrum* and *Chrysonilia sitophila*. The mechanisms involved in the

pathogenesis of Suberosis are probably similar to those of other related diseases involving the exposure to complex antigenic mixtures of plant and/or microbial origin like farmer's lung and summer type hypersensitivity pneumonitis^(18,19). The pathogenesis of this HP is possibly related to an initial immune complex-mediated lung injury followed by cell-mediated hypersensitivity interstitial damage⁽²⁰⁾. In fact, high titres of specific IgG to *Penicillium glabrum* in bronchoalveolar lavage as well as diffuse mononuclear cell infiltration with granuloma formation in histopathological samples are prominent features of Suberosis^(1,12). More recently, we could demonstrate by bronchoalveolar lavage studies that the alveolar inflammation mainly involves T-cells and an increase of CD8+ cytotoxic lymphocytes^(4,21).

The presence of high titres of antibodies to mould antigens is a useful evidence of exposure in the context of characteristic clinical, radiologic and functional findings. However, as in other HP forms, the diagnostic usefulness of antibody detection decreases, due to its presence in many exposed workers with no apparent lung disease. In the case of *Penicillium glabrum*, the seropositivity ranges from 7% of unaffected cork workers to 81% in HP forms and 27% in asthmatics^(1,2).

The finding of 'disease-specific' antigens only detected in sera of symptomatic subjects by precipitin reactions or immunoenzymatic assays is controversial^(5,8) and may be linked to the poor sensitivity of the immunochemical tests used⁽⁶⁾. In this setting, immunoblotting is an especially useful method to characterize qualitative and quantitative differences of antibodies produced against complex antigens^(22,23). It has been used to identify major antigenic components in several forms of HP, such as the glycoproteins from *Saccharopolyspora rectivirgula*^(5,24) and *Aspergillus umbrosus*⁽²⁵⁾ in farmer's lung, mannoproteins of *Trichosporon asahii*⁽²⁶⁾ in summer type hypersensitivity pneumonitis (SHP) and a 21 kDa protein from pigeon dropping extracts⁽²⁷⁾. More recently, in pigeon breeders' disease and SHP, the immunoblotting technique allowed the identification of antigen components that could induce the specific proliferation of peripheral blood mononuclear cells only in affected patients^(27,28).

Penicillium Glabrum

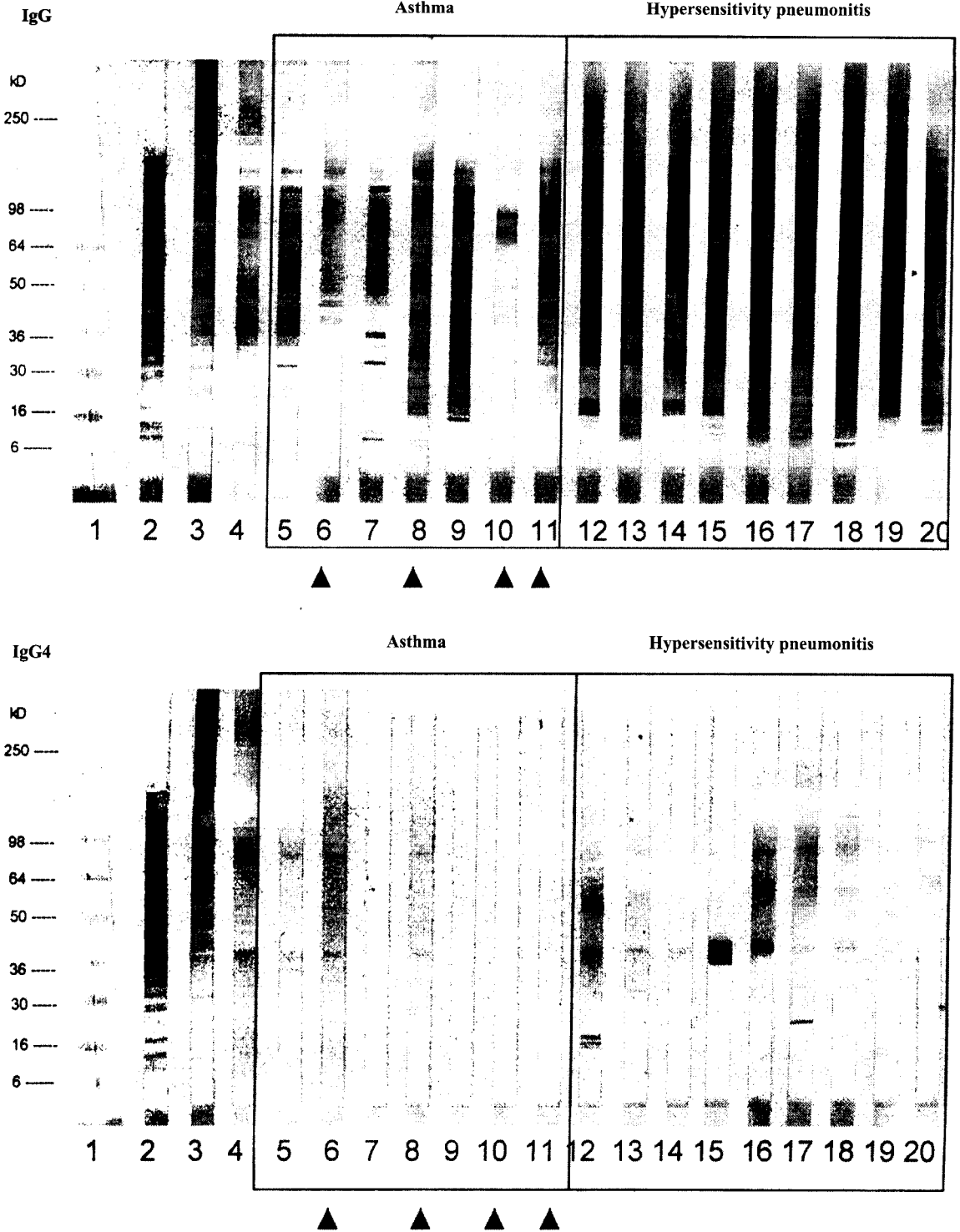


Fig 1 – IgG (top) and IgG4 bottom) Immunoblots of *Penicillium glabrum* with individual sera of asthma cases (lanes 5-11) and hypersensitivity pneumonitis (lanes 12-20). The molecular weight standard (lane 1), protein stain (lane 2) and carbohydrate stain (lane 3) profiles are also shown. On lane 4 there is a positive serum pool. Patients with occupational asthma are indicated by black triangles (▲)

Table 2 – *Penicillium glabrum*: intensity of IgG binding (mean area and height) to different molecular weight (kDa) components

Lanes	Asthma					Hypersensitivity pneumonitis										
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
≥100	602	277	352	719	618		812	1128	1550	1437	1077	1097	1231	2163	1450	1222
	108	44	55	123	103		106	178	231	241	181	184	214	329	190	171
88-92	487	109	302	345	253	387	530	567	1137	675	1190	580	1002	1097	424	1160
	85	25	43	54	67	70	73	85	91	91	106	86	118	105	88	181
80		111	224	196	321	459	351	365		402		386	442		568	
		19	62	44	58	74	65	77		84		79	114		83	
59	656				313		325		1051	785	400	415	472	549		
	58				69		57		1051	87	82	82	85	96	93	
48-52	365	60	65	763	689	38	444	804	568	782	876	444	555	350	939	430
	62	15	18	67	70	10	63	79	84	91	100	80	110	90	88	84
37	372	75		677	756	65	285	905	514	291	876	845	338	1095	1078	614
	50	21		78	78	7	64	85	71	61	97	83	90	97	96	73
33			249				311	274	427	396	317	382	1291	349	440	518
			62				51	70	62	65	82	80	210	90	90	70
25-30		42	90	167	592		497	1055	612	760	1147	1160	599	816	829	676
		7	35	44	113		84	173	88	133	179	175	103	105	171	91
20-24	272			516	484		439	397	154	296	371	544	330	775	1022	404
	68			81	106		67	49	33	38	67	68	59	84	169	55
14-17	32		61	185	166			266	248	309	577	630	238	675	567	480
	5		20	31	51			77	65	91	140	74	56	150	71	64
12-13.5			93	19				14	149	19	34	220	297	346	112	218
			37	7				22	33	9	12	36	74	84	35	61

Highlighted bands with an intensity: area (upper case) and height (lower case) by the *Quantiscan* software over 1 SD (pale grey) and 2 SD (dark grey) of the mean intensity of all bands in asthma cases

Table 3 – *Penicillium glabrum*: frequency¹ of IgG binding (%) to different molecular weight (kDa) components and respective band intensity (mean of band area and height as determined by the *Quantiscan* software). Note that the 12-13.5 kDa and the 33 kDa antigens reacted with IgG in only two asthmatics but in all hypersensitivity pneumonitis cases (the differences being significant: p=0.007 and p=0.035, respectively, Fisher's exact test)

	Hypersensitivity pneumonitis		Asthma	
	Frequency (%)	Area (height)	Frequency (%)	Area (height)
12 - 13.5	100	156 (41)	29	56 (22)
14 - 17	100	443* (87)**	71	102* (24)**
20-24	100	477 (69)	57	360 (71)
25-30	100	850* (135)**	71	278* (57)**
33	100	488 (91)**	29	280(57)**
37	100	728* (84)**	86	372* (50)**
48-52	100	639 (90)**	100	346 (44)**
59	67	612 (88)	43	431 (61)
80	56	433* (87)**	86	277* (54)**
88-92	100	1566* (190)**	100	329* (56)**
≥100	100	1373* (213)**	86	517* (83)**

¹Frequency of IgG binding was calculated by dividing the individual number of positive serum samples by the total number of cases. * and ** significantly different (p<005, Mann Whitney test)

Chrysonilia sitophila

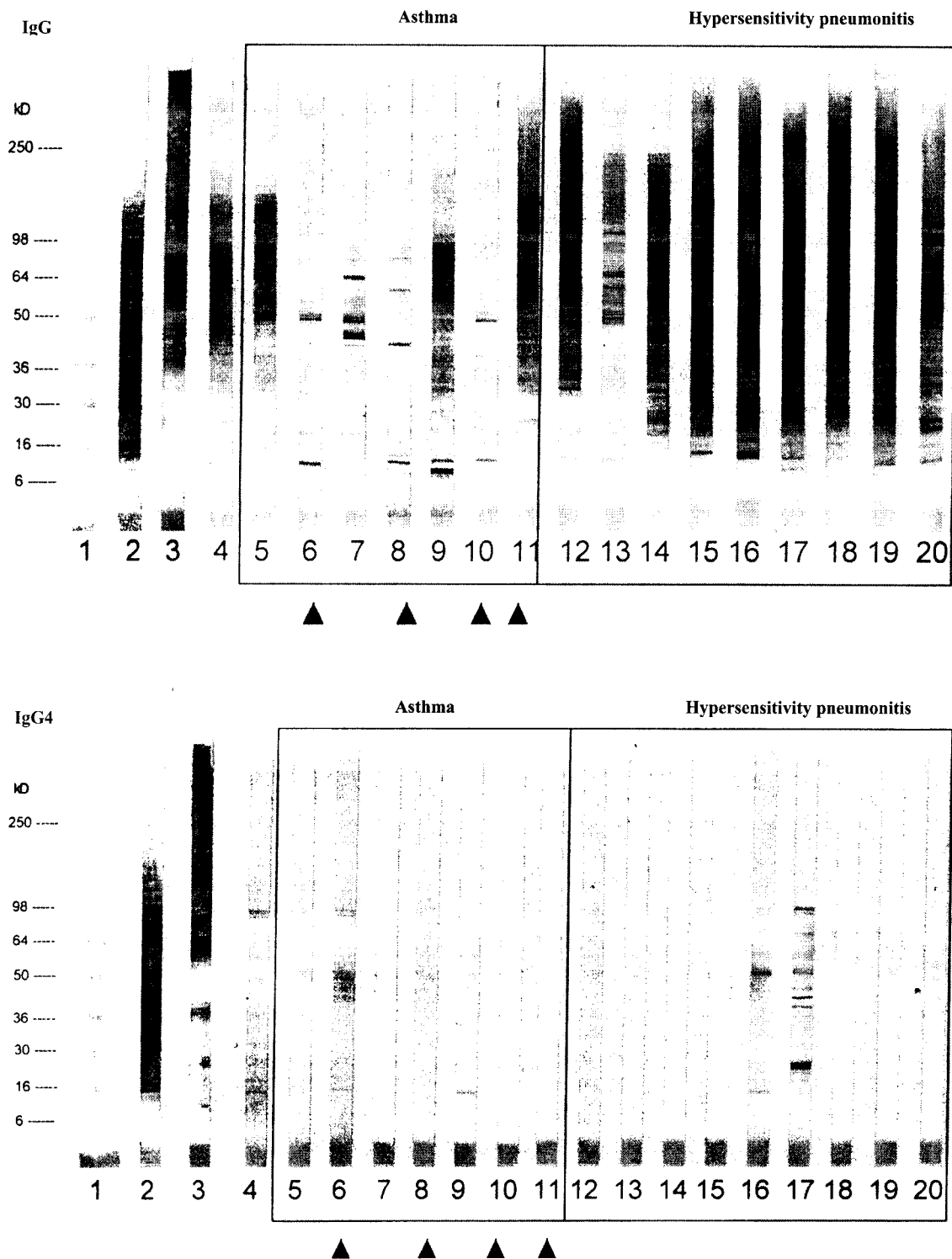


Fig 2 – IgG (top) and IgG4 (bottom) Immunoblots of *Chrysonilia sitophila* with individual sera of asthma cases (lanes 5-11) and hypersensitivity pneumonitis (lanes 12-20). The molecular weight standard (lane 1), protein stain (lane 2) and carbohydrate stain (lane 3) profiles are also shown. On lane 4 there is a positive serum pool. Patients with occupational asthma are indicated by black triangles (▲)

Table 4 – *Penicillium glabrum*: frequency of IgG4 binding (%) to different molecular weight (kDa) components

	<i>Hypersensitivity pneumonitis</i>	<i>Asthma</i>
	Frequency (%)	Frequency (%)
14-17	66,7	0
24	66,7	0
33	33,3	71,4
37	66,7	0
48-52	66,7	57,1
57-62	77,8	0
80	77,8	71,4
88-92	44,4	28,6

In our study we investigated the antigenicity of *Penicillium glabrum* and *Chrysonilia sitophila*, characterizing by immunoblotting the specificity of serum antibodies in 17 patients with respiratory symptoms associated with occupational exposure in the cork industry. In addition, after the scanning of individual lanes, the use of a specific software

(*Quantiscan*, Biosoft, UK) allowed the determination of each band height and area, and the identification of low intensity reactivity to particular components. With this method it is possible to decrease the subjectivity of immunoblotting interpretation⁽²³⁾ and quantitatively compare different antibody responses to discrete antigens.

Penicillium spp are universal saprophytes that produce abundant spores and can induce both allergic asthma⁽²⁹⁾, and occupational lung diseases^(2,30). *Penicillium glabrum* is plentiful in cork factories, where high numbers of airborne spores are detectable in air samples, mainly in cork storage and cutting sections⁽²⁾. In our study, using a sensitive method as immunoblotting, we could detect IgG reactivity to different components of *Penicillium glabrum* in all cases of both HP and asthma. Four of the eleven antigenic components reacted to more than 85% of tested sera in both groups. As expected, the intensity of IgG binding was significantly higher in HP. In addition, the 12-13.5 kDa and 33 kDa components were significantly associated with HP and may represent major antigens for these patients. Moreover, the 33 kDa was also recognized by our BALF pool control, a feature that usually characterizes major HP antigens^(27,28).

Table 5 – *Chrysonilia sitophila*: intensity of IgG binding (mean area and height) to different molecular weight (kDa) components

Lanes	Asthma								Hypersensitivity pneumonitis							
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
≥100		61		865	1242	35		4095	528	405	1717	2160	3317	2372	4933	3682
		11		136	74	7		238	78	62	245	291	279	405	426	359
91-94	24			683	283		462	732	212	721	1361		1328	767	645	
	7			93	59		72	129	51	129	151		154	116	142	
81-90	40	238		362	570	176		430	198	426		776			522	
	11	58		74	63	27		121	41	117		115			107	
70-77	69	172	27	703	432		473	1118	340	1204	1530	996	1037	1073	901	817
	16	34	6	91	66		66	193	60	214	254	112	133	132	121	118
59-62	129	184	58	1127	534	164	607	550	173	1640	1258	483	1473	1104	1570	1477
	31	54	13	95	51	31	106	79	38	140	116	122	140	128	126	129
51-55				255					185	477	800	857	1469	937	1079	478
				56					35	107	123	129	285	168	260	134
45-48	370	47	133	412	731	595	664	774	506	929	1330	1260	881	323	961	1172
	80	10	43	43	138	132	143	163	77	181	242	249	133	86	132	221
38-43	138	137		248		532	180	218	48	326	851	620	1184	394	767	508
	45	60		46		108	37	49	10	73	170	117	232	84	164	104
33		16	19	356	250		206	537	31	722	764	822	914	389	356	
		6	10	38	50		33	105	9	122	113	109	207	84	75	
25-30	24	24		358	230	95	245	700	71	735	842	2034	1869	1026	1431	1090
	8	7		51	36	10	45	184	7	199	203	367	375	78	222	187
18-24	29	20		223	112	40	100	174	25	658	635	1394	833	729	901	529
	11	5		42	22	7	22	27	6	98	145	172	106	117	109	118
16								20		57	96	269	110	67	165	102
								6		15	27	61	24	17	27	21
12-14	136	162	76	111	118		399	65	83	115	272	400	209	68	172	220
	56	61	22	27	28		143	19	32	18	69	71	44	14	25	31

Highlighted bands with an intensity: area (upper case) and height (lower case) by the *Quantiscan* software over 1 SD (pale grey) and 2 SD (dark grey) of the mean intensity of all bands in asthma cases

Table 6 – *Chrysonilia Sitophila*: frequency of IgG binding (%) to different molecular weight (kDa) components and respective band intensity (mean of band area and height as determined by the *Quantiscan* software). Note that the 16 kDa component was only present in hypersensitivity pneumonitis cases and the 51-55 kDa antigen was recognized by most hypersensitivity pneumonitis cases but in only one case with asthma (the differences being significant: $p=0.001$ and $p=0.035$, respectively, Fisher's exact test).

	Hypersensitivity pneumonitis		Asthma	
	Frequency (%)	Area (height)	Frequency (%)	Area (height)
12-14	100	178 (36)	86	167 (56)
16	89	111 (25)	0	0 (0)
18-24	100	653* (100)**	86	87* (18)**
25-30	100	1089* (202)**	86	163* (28)**
33	89	504* (91)**	71	169*(27)**
38-43	100	546 (91)	71	247 (59)
45-48	100	904* (165)**	100	422* (86)**
51-55	89	785 (155)	14	255 (56)
59-62	100	1081* (112)**	100	934* (55)**
70-77	100	1002*(149)**	86	313* (47)**
81-90	67	487 (103)**	71	277 (47)**
91-94	78	824 (124)**	57	363 (58)**
≥100	100	2579* (265)**	57	551* (57)**

IgG4 reactivity to *Penicillium glabrum* was more intense in HP suggesting that, like in *Aspergillus*-induced lung disorders, chronic antigen exposure in the cork industry may favour IgG4 production^(10,22). Surprisingly, in the asthmatic group although IgG4 reactivity was weaker (Fig 1, bottom), the frequency of reactivity to the 33 kDa component was higher (71% versus 33% in HP). Although we could not find a corresponding IgE response to this antigen, studies of different *Penicillium spp* allergic patients found IgE binding to components of 33 kDa^(31,32). The reason why our asthmatic patients, chronically exposed to high numbers of *Penicillium* spores, produce specific IgG4 but not IgE is difficult to explain, as IgE and IgG4 are both part of a Th2 response, primary regulated by IL-4⁽³³⁾. This may be another example of what has been proposed as a "modified Th2 response" in the context of high antigen exposure⁽³⁴⁾. In fact, a similar response has also been described in animal handlers that over the years develop specific IgG antibodies to urinary allergens without producing IgE⁽³⁵⁾.

Chrysonilia sitophila, another highly prevalent fungus in the cork industry^(2,15) has been linked to occupational asthma in the logging industry⁽¹³⁾. It has an enzymatic activity involved on the biodegradation of cellulose and lignin, main constituents of wood matrix^(36,37), that may have an important role in the maturing process of cork.

IgG binding to several antigens of *Chrysonilia sitophila* were present both in HP and asthma patients, but two components (16 kDa and 51-55 kDa) were particularly associated with the former. This may suggest that different microbial antigens may be involved in the hypersensitivity pneumonitis of cork workers. Similarly, in Farmer's Lung it has been shown that apart from *Sacharopolyspora rectivirgula* (the classic antigen of the disease) other moulds (like *Absidia corymbifera*) may also be implicated⁽³⁸⁾. Alternatively IgG binding of *Chrysonilia sitophila* may represent cross-reactivity with *Penicillium glabrum*, as has been suggested in the earlier studies of Ávila⁽³⁹⁾; cross inhibition of the

immunoblotting reactivity with these two moulds may clarify this hypothesis.

In conclusion, immunoblotting with detection of IgG, IgG4 and IgE was a suitable tool in the evaluation of the antigenicity of major cork moulds in Suberosis. HP shows intense IgG and IgG4 response to various *Penicillium glabrum* and *Chrysonilia sitophila* components, while asthmatics produce weaker IgG and IgG4 levels and no specific IgE to both moulds. Some antigens that seemed to be more characteristic for HP or asthmatics may deserve further purification and studies of mononuclear cell proliferation that may shed more light in the immunopathogenesis of Suberosis and help in the diagnosis of the disease.

REFERENCES

- Pimentel J, Ávila R. Respiratory disease in cork workers (Suberosis). *Thorax* 1973; **28**: 409-423
- Ávila R, Lacey J. The role of *Penicillium frequentans* in Suberosis (Respiratory disease in cork workers). *Clinical Allergy* 1974; **4**: 109-117
- Delgado L, Winck J, Palmares MC, et al. Specific IgG and IgA antibodies to *Penicillium frequentans* in Cork worker's hypersensitivity pneumonitis (Suberosis). Quantification in sera and bronchoalveolar lavage with the CAP System. *Allergy* 1997; **52** (37): 213
- Morais M, Winck JC, Delgado J, et al. Suberosis and Bird Fancier's disease: a comparative study of radiological, functional and bronchoalveolar lavage profiles y. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2003; in press.
- Mundt C, Becker WM, Schlaak M. Farmer's lung: Patients' IgG2 antibodies specifically recognize *Saccharopolyspora rectivirgula* proteins and carbohydrate structures. *J Allergy Clin Immunol* 1996; **98**: 441-450
- McSharry C, Anderson K, Boyd G. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clin Exp Allergy* 2000; **30**: 279-289
- Burrell R, Rylander R. A critical review of the role of precipitins in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 1981; **62**: 332-343

8. de Beer PM, Bouic PJ, Joubert JR. Identification of disease-associated antigen in Pigeon breeder's disease by western blotting. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; **91**: 343-347
9. Baldwin C, Todd A, Bourke SJ, Allen A, Calvert JE. IgG subclass responses to pigeon intestinal mucin are related to development of pigeon fancier's lung. *Clin Exp Allergy* 1998; **28**: 349-357
10. Chris Tomee JF, DuBois AE, G.H. K, et al. Specific IgG4 responses during chronic and transient antigen exposure in aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; **153**: 1952-1957
11. Winck JC, Delgado L, Vanzeller M, et al. Monitoring of peak expiratory flow rates in cork worker's occupational asthma. *J Asthma* 2001; **38**: 357-362
12. Delgado L, Winck J, Sapage J, et al. Antibodies to *Penicillium frequentans* in cork worker's respiratory disease (Suberosis). Application of the ImmunoCAP IgG RAST in sera and bronchoalveolar lavage (BALF) measurements. In: de Rojas F, ed. XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology. Madrid, 1995; 209-214.
13. Tarlo SM, Wai Y, Dolovich J, Summerbell R. Occupational asthma induced by *Chrysonilia sitophila* in the logging industry. *J Allergy Clin Immunol* 1996; **97**: 1409-1413
14. Cote J, Chan H, Brochu G, Chan-Yeung M. Occupational asthma caused by exposure to neurospora in a plywood factory worker. *Br J Ind Med* 1991; **48**: 279-282
15. Danesh P, Velez Caldas F, Figueiredo Marques J, San Romão M. Mycobiota in portuguese "normal" and "green" cork throughout the manufacturing process of stoppers. *J Appl Microbiol* 1997; **82**: 689-694
16. Gruber C, Buck D, Wahn U, Niggermann B. Is there a role for immunoblots in the diagnosis of latex allergy? Intermethod comparison of in vitro and in vivo IgE assays in spina bifida patients. *Allergy* 2000; **55**: 476-483
17. Lee S-K, Kim S-S, Nahm D-H, Park H-S. Hypersensitivity pneumonitis caused by fusarium napiforme in a home environment. *Allergy* 2000; **55**: 1190-1193
18. Cormier Y, Laviolette M. Farmer's Lung. *Sem Respir Med* 1993; **14**: 31-37
19. Ando M, Arima K, Yoneda R, Tamura M. Japanese Summer-type Hypersensitivity Pneumonitis. Geographic distribution, home environment, and clinical characteristics of 621 cases. *Am Rev Respir Dis* 1991; **144**: 765-769
20. McSharry C, Anderson K, Bourke SJ, Boyd G. Takes your breath away-the immunology of allergic alveolitis. *Clin Exp Allergy* 2002; **128**: 3-9
21. Delgado L, Ramos JP, Winck JC, Cuesta C, Fleming Torrinha JA. Cytotoxic lymphocytes in Hypersensitivity pneumonitis. *Clin Exp Allergy* 1993; **23** (suppl 1): Abstract
22. Trompelt J, Becker W-M, Schlaak M. Analysis of IgG subclass and IgE response in Allergic disease caused by *Aspergillus fumigatus* by immunoblotting techniques. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1994; **104**: 390-398
23. van Rens MTM, Vernooy-Jeras R, Merton-de Ridder M, van Velzen-Blad H, van den Bosch JMM. Detection of immunoglobulins G and A to *Aspergillus fumigatus* by immunoblot analysis for monitoring Aspergillus-induced lung diseases. *Eur Respir J* 1998; **11**: 1274-1280
24. Iranitalab M, Jarolim E, Rumpold H, et al. Characterization of *Mycropolyspora faeni* antigens by human antibodies and immunoblot analysis. *Allergy* 1989; **44**: 314-321
25. Kaukonen K, Pelliniemi LJ, Savoilanen J, Terho EO. Identification of the reactive subunits of *Aspergillus umbrosus* involved in the antigenic response in farmer's lung. *Clin Exp Allergy* 1996; **26**: 689-696
26. Mizobe T, Ando M, Yamasaki H, Onoue K, Misaki A. Purification and characterization of the serotype-specific polysaccharide antigen of *Trichosporon cutaneum* serotype II: a disease-related antigen of Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Clin Exp Allergy* 1995; **25**: 265-272
27. Hisauchi-Kojima K, Sumi Y, Miyashita Y, et al. Purification of the antigenic components of pigeon dropping extract, the responsible agent for cellular immunity in pigeon breeder's disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **103**: 1158-1165
28. Matsunaga Y, Usui Y, Yoshizawa Y. TA-19, a novel protein antigen of *Trichosporon asahii*, in summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; **167**: 991-8
29. Shen HD, Lin WL, Tsai JJ, Liaw SF, Han SH. Allergenic components in three different species of *Penicillium*: crossreactivity among major allergens. *Clin Exp Allergy* 1996; **26**: 441-451
30. Nakagawa-Yoshida K, Ando M, Etches RI, Dosman JA. Fatal cases of farmer's lung in a Canadian family. Probable new antigens, *Penicillium brevicompactum* and *P. olivicolor*. *Chest* 1997; **111**: 245-248
31. Shen H-D, Lin W-L, Tam MF, et al. Characterization of allergens from *Penicillium oxalicum* and *P. Notatum* by immunoblotting and N-terminal amino acid sequence analysis. *Clin Exp Allergy* 1999; **29**: 642-651
32. Shen H-D, Lin W-L, Liaw SF, Tam MF, Han S-H. Characterization of the 33-kilodalton major allergen of *Penicillium citrinum* by using MoAbs and N-terminal amino acid sequencing. *Clin Exp Allergy* 1997; **27**: 79-86
33. Zhang K, Mills FC, Saxon A. Switch circles from IL-4-directed epsilon class switching from human B lymphocytes: evidence for direct, sequential, and multiple step sequential switch from mu to epsilon Ig heavy chain gene. *J Immunol*. 1994; **152**: 3427-3435
34. Platts-Mills TA, Vaughan J, Squillace S. Sensitization, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 2001; **357**: 752-756
35. Platts-Mills TA, Longbottom J, Edwards J. Occupational asthma and rhinitis related to laboratory rats: serum IgG and IgE antibodies to the rat urinary allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1987; **79**: 505-515
36. Rodriguez J, Ferraz A, Nogueira RF, et al. Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. *Appl Biochem Biotechnol* 1997; **62**: 233-242
37. Centeno S, Calvo MA. Enzymatic activity of micro-organisms isolated from cork wine stoppers. *Microbios* 2001; **106**: 69-73
38. Reboux G, Piarroux R, Mauny F, et al. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **153**: 1534-1539
39. Ávila R. Suberosis as a model of the study of pulmonary granulomatosis due to organic dusts inhalation (*translated from portuguese*). PhD Thesis, Faculty of Medicine of Lisbon 1975

Discussão Geral

Várias partículas no ambiente ocupacional podem induzir doença respiratória¹⁵⁸. Normalmente as partículas de dimensões superiores a 10 µm são depositadas nas fossas nasais e faringe, enquanto que as partículas com menos de 5 µm podem penetrar nas vias aéreas periféricas. Dependendo de factores anatómicos, padrões de fluxo aéreo, modo de inalação e das suas características específicas (densidade, carga), cerca de 50% das partículas entre 1 e 5 µm ficam retidas na traqueia e brônquios e os outros 50% são retidos na área alveolar¹⁵⁸. Uma das principais doenças pulmonares causadas por inalação de alergénios são a Asma e a Pneumonite de Hipersensibilidade (PH), tendo havido nos últimos anos um reconhecimento crescente de múltiplos agentes etiológicos^{10,136}. Os esporos fúngicos são amplamente reconhecidos como fonte antigénica de doenças alérgicas brônquicas (asma) ou parenquimatosas (pneumonite de hipersensibilidade) de carácter ocupacional, podendo o seu tamanho ser determinante para o desenvolvimento de uma ou outra doença. Assim os pequenos esporos dos actinomicetos (aproximadamente 1-2 µm) originarão mais frequentemente uma resposta alveolar (alveolite), como o pulmão do fazendeiro, enquanto esporos de maiores dimensões determinam a ocorrência de uma resposta brônquica (asma)¹⁵⁸. Para além do tamanho do fungo, a suas características antigénicas e a atopia poderão determinar o tipo de reacção imunológica¹⁵⁹.

Portugal é o maior produtor mundial de cortiça, tendo a indústria da cortiça um peso significativo na economia nacional^{12,160}. Estima-se que existam 16.000 trabalhadores ligados a esta indústria, na maior parte trabalhando em unidades de pequenas dimensões (menos de 20 operários)¹⁶⁰. Durante o seu processamento industrial, nomeadamente na produção de rolhas, a cortiça adquire uma flora de microorganismos, fundamentalmente constituída por fungos. Nos anos 70, através dos trabalhos de Pimentel e Ávila, ficou demonstrado que a inalação de poeiras contendo esporos de *Penicillium glabrum* é a causa da patologia respiratória da indústria da cortiça^{27,29}, tendo sido descritos quadros clínicos de Asma, Bronquite e PH. De acordo com os estudos epidemiológicos publicados, estima-se que entre 9 e 19% dos trabalhadores da indústria da cortiça tenham Suberose^{8,9}.

Na presente dissertação, e a partir dos diversos trabalhos que desenvolvemos, procurámos contribuir para um melhor conhecimento da clínica e imunopatologia da doença respiratória dos trabalhadores de indústria da cortiça.

Pneumonite de Hipersensibilidade: da imunopatologia ao diagnóstico

Nos anos 90, demonstrámos que o estudo dos componentes celulares⁵² e acelulares⁷⁸ do líquido de lavagem broncoalveolar têm um importante impacto no diagnóstico da patologia respiratória nos trabalhadores da indústria da cortiça.

Na sequência destes dados, e colocando a hipótese de a Pneumonite de Hipersensibilidade da Suberose poder ter características particulares, comparámos, os padrões funcionais, radiológicos e do líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA) entre a Suberose e a Doença de Criador de Aves (DCA) **(trabalho 1)**.

Neste trabalho, foi possível demonstrar que existem marcadas diferenças entre a Suberose e a DCA. Assim, os doentes com DCA apresentavam mais formas agudas, de acordo com a exposição intensa e intermitente característica dos criadores de pombos¹⁷. Na Suberose, o tempo de exposição significativamente mais longo (que pode traduzir exposição prolongada de menor intensidade²⁹) poderá justificar o predomínio de formas sub-agudas ou crónicas. Tal como noutras séries, englobando formas de PH de variada etiologia e forma de apresentação, o padrão dominante na TAC-AR foi o tipo "vidro despolido"^{39,40,161}. Na Suberose este padrão correlacionou-se significativamente com a linfocitose do LLBA, de acordo com o encontrado a nível histológico noutras PH, em que o padrão em "vidro despolido" representa a infiltração mononuclear das paredes alveolares¹⁶². Por outro lado, a existência de uma correlação significativa da mastocitose alveolar com o padrão de fibrose na TAC-AR confirma resultados encontrados por nós noutros trabalhos⁹⁶ e o seu eventual papel na fibrogénese pulmonar⁹⁵.

O compromisso funcional respiratório é menos grave na Suberose havendo uma tendência para a redução da relação FEV1/FVC nos doentes com maior tempo de exposição, em tudo semelhante ao que ocorre nos doentes com Pulmão do fazendeiro¹³¹.

Em relação ao estudo do LLBA, a Suberose apresenta uma alveolite linfocítica intensa, com relação CD4/CD8 significativamente mais baixa do que a da DCA, e redução das células CD8+ com o afastamento do trabalho. As diferenças encontradas nos fenótipos linfocitários do LLBA entre a Suberose e a DCA podem dever-se à diferente natureza antigénica envolvida¹⁶³: proteínas aviárias *versus* fungos e poeiras de cortiça. Assim, a natureza particulada do antigénio poderá facilitar o transporte de metabolitos e hifas fúngicas e contribuir para uma diferente via de apresentação imunológica e persistência local do antigénio, comparativamente com os antigénios preferentemente solúveis das proteínas aviárias¹⁶³.

No sentido de uma melhor caracterização da antigenicidade dos principais fungos que contaminam a cortiça, avaliámos por *immunoblotting*, a presença de anticorpos específicos para o *Penicillium glabrum* e *Chrysonilia sitophila* (**trabalho 5**).

O *immunoblotting* tem sido largamente utilizado na investigação de alergias ocupacionais para a identificação de antigénios "major" e pode ter uma sensibilidade maior na análise de anticorpos específicos^{110,164}.

Neste trabalho, estudámos nove doentes com PH, todos sintomáticos, com uma intensa alveolite linfocítica CD8+ no LBA, padrão ventilatório restritivo ou defeito da difusão e/ou alterações do TAC de alta resolução. Comparativamente, estudámos também um grupo de sete doentes com asma brônquica, referindo agravamento com a exposição ocupacional (quatro dos quais com critérios de asma ocupacional, por registos seriados de débitos expiratórios).

Todas as amostras tinham reactividade da IgG para vários componentes do *Penicillium glabrum*, com uma maior intensidade no grupo com PH. Um total de 11 componentes antigénicos foram identificados no *Penicillium glabrum*, com pesos moleculares variando entre 12 a > 100 kDa. Alguns componentes, particularmente os de maior peso molecular, reagiram com mais de 85% das amostras estudadas de ambos os grupos (p.ex. os de 37, 48-52, 88-92 e > 100 kDa). Em contraste, os antigénios de 12-13.5 kDa e 33 kDa reagiram com a IgG de apenas dois asmáticos mas com todas as amostras da PH; o componente de 33 kDa reagiu também com um mistura de LLBA de dois casos de PH, utilizada como controlo. Todos os casos de PH tinham IgG4 para diferentes componentes, entre 14 e 92kDa, numa frequência entre os 33 e 78% dos casos. O grupo com asma revelou reactividade IgG4 apenas para quatro componentes, em menor intensidade e frequência, excepto para o componente de 33 kDa, positivo em 71% dos casos (versus 33% da PH).

Todas as amostras de doentes expostos na indústria da cortiça revelaram reactividade IgG para um total de 13 componentes da *Chrysonilia sitophila* (de 12 a > 100 kDa) e, para a maioria destes, numa frequência elevada, quer na PH (entre 67 a 100%) quer na asma (57 a 100%). Um componente, de 16 kDa, reagiu apenas com amostras de PH e o de 51-55 kDa, com a maioria das PH (89%) mas apenas num com asma.

Em nenhuma amostra se encontrou IgE específica para qualquer dos fungos.

Assim, em doentes expostos ocupacionalmente, é possível por este método demonstrar a existência de IgG específica para uma grande diversidade de componentes do *Penicillium glabrum* e da *Chrysonilia sitophila*, os fungos que mais frequentemente colonizam a cortiça durante o seu processamento industrial. A resposta IgG a alguns desses antigénios encontra-se predominantemente

nos doentes com PH, quer para a *Chrysonilia sitophila* (16kDa e 51-55kDa), quer para o *Penicillium glabrum* (12-13.5 e 33 kDa), sugerindo que estes poderão ser antigénios «major». A maioria dos doentes com asma apresentou IgG4 (mas não IgE) para um antigénio de 33 kDa do *Penicillium glabrum*. Curiosamente, em regiões onde a sensibilização alérgica, não ocupacional, ao *Penicillium* é frequente¹⁶⁵, os alérgenos «major» reconhecidos pela IgE sérica são geralmente proteínas serínicas de 30-34 kDa¹⁶⁶, com reactividade cruzada entre diversas espécies de *Penicillium*¹⁶⁷.

No futuro, a purificação destes antigénios que parecem mais característicos da pneumonite de hipersensibilidade da Suberose, e a sua utilização em estudos "in vitro" de proliferação de células mononucleares poderão ajudar na melhor caracterização da imunopatogénese e diagnóstico desta doença.

Asma Ocupacional dos Corticeiros: da imunopatologia ao diagnóstico

Nas referências iniciais da doença ocupacional dos corticeiros (Suberose), foram descritos quadros asmatiformes para além da clássica alveolite alérgica extrínseca²⁷, bem como, em doentes com formas de doença pulmonar intersticial, identificadas "respostas brônquicas" na provocação inalatória com extractos de *Penicillium frequentans*²⁹. A não padronização deste tipo de provas de provocação, assim como as respostas obtidas em doentes com alveolite alérgica extrínseca, não permitem à partida considerar esta forma de provocação como um método de escolha para diagnosticar formas de asma ocupacional na indústria da cortiça. A utilização do registo de débito expiratório máximo instantâneo (DEMI) tem sido considerado um dos métodos mais úteis de investigação da asma ocupacional^{153,168}, mas o seu papel no diagnóstico da asma ocupacional dos corticeiros nunca tinha sido avaliado.

No **trabalho 2**, englobando 17 trabalhadores, demonstrámos a existência de quadros típicos de asma ocupacional na indústria da cortiça. A interpretação visual do registo do DEMI para documentar asma ocupacional é considerada um dos métodos mais simples, sensíveis e específicos^{153,168}. No nosso trabalho, o registo gráfico do DEMI médio diário deu um número ligeiramente maior de resultados positivos, mas também um número maior de registos duvidosos, comparativamente com o gráfico de mínimo, máximo e média. Este último método parece-nos oferecer maior segurança na sua interpretação, o que está de acordo com as recomendações internacionais¹⁶⁸.

A análise quantitativa do DEMI, usando a variabilidade diária, mostrou uma baixa sensibilidade (apenas 3 casos positivos) mas permitiu classificar como positivo um dos casos com discordância de leitura do registo gráfico entre os três observadores. Este índice de variabilidade, que foi considerado positivo segundo Perrin e col.¹⁶⁹, i.e. se no período de trabalho havia um excesso de pelo menos três dias com variações significativas comparativamente ao período de afastamento, poderia dar maior

número de resultados positivos se aplicássemos critérios menos estritos, por exemplo a frequência relativa em cada período, como sugerido por Liss e col. e adoptado recentemente pela Sociedade Torácica Canadiana^{170,171}.

Quando analisámos, na nossa série, os doentes com asma ocupacional (n = 7) não encontramos diferenças significativas nem no tempo de exposição, nem na existência de atopia, em relação ao grupo com registo de DEMI negativo (n = 7). No entanto, em pelo menos alguns doentes, os nossos dados apontam para uma sensibilização alérgica: dois casos estavam sensibilizados a uma mistura de fungos (CAP RAST positivo para mistura contendo *P notatum*, *Cladosporium*, *A fumigatus*, *Alternaria alternata*) e um a ácaros de armazenamento (CAP RAST positivo simultaneamente para o *Acarus siro* e o *Tyrophagus putrescentiae*). De facto, tal como noutros contextos laborais¹⁷², estes ácaros poderão desempenhar algum papel na etiologia de alguns casos de asma ocupacional dos corticeiros.

No **trabalho 3** procurámos caracterizar a inflamação broncoalveolar da asma ocupacional associada à exposição a poeira da cortiça. Assim, encontramos um aumento significativo de eosinófilos no líquido de lavagem broncoalveolar, em doentes com um típico agravamento dos registos de DEMI com o trabalho. Estes achados são consistentes com outras observações na asma ocupacional, onde um aumento dos eosinófilos tem sido descrito quer no LLBA¹⁷³, quer no esputo induzido¹⁷⁴ e mucosa brônquica^{173,175}. Estudos do LLBA e biópsias brônquicas sugerem que a inflamação eosinofílica que se associa à asma ocupacional é semelhante à da asma atópica^{173,175}.

Uma vez que a LBA recolhe células inflamatórias, quer das vias aéreas quer das unidades alveolares, a origem exacta do número aumentado de eosinófilos que observámos nos nossos doentes é difícil de estabelecer. No entanto, sendo a mucosa brônquica considerada o principal terreno da inflamação na asma¹⁷⁶, dados recentes apontam igualmente para o envolvimento da parede alveolar e das pequenas vias aéreas^{177,178}.

Assim, a asma ocupacional dos corticeiros associa-se a inflamação eosinofílica pulmonar, tal como descrito noutras formas de asma ocupacional de diferente etiologia. Para além das diferenças no perfil celular do LLBA, não encontramos diferenças na hiperreactividade brônquica e na atopia quando comparámos estes doentes com outros corticeiros com asma, mas sem agravamento ocupacional.

A avaliação da inflamação das vias aéreas é muito importante na asma, pois reflecte directamente a doença, ao contrário da espirometria e hiperreactividade brônquica, que são marcadores indirectos da doença. A monitorização e investigação da inflamação das vias aéreas certamente se irão estabelecer na avaliação da asma ocupacional. Efectivamente, o seu papel na prática clínica está

agora a ser avaliado, demonstrando-se que os indivíduos com asma ocupacional têm maior número de eosinófilos quando em exposição do que quando afastados do trabalho e este achado poderá inclusivamente contribuir para um diagnóstico precoce, antes do desenvolvimento de sintomas ou de alterações da função respiratória¹⁷⁹.

A inalação de esporos fúngicos tem sido relacionada com o aparecimento de asma brônquica e hipersensibilidade mediada pela IgE^{180,181}. Os alergénios fúngicos estão também implicados como uma possível causa de asma ocupacional na indústria das madeiras^{137,159}. Para além do *Penicillium glabrum* – o principal fungo identificado nas descrições iniciais da Suberose – a *Chrysonilia sitophila* tem sido também isolada ao longo de todo o processo de manufactura da cortiça³² e, assim, tal como nas serrações em que se lida com madeiras humedecidas¹³⁷, ela poderia ser uma das causas de asma ocupacional na indústria da cortiça. Tanto mais que os esporos da *Chrysonilia sitophila* são de maiores dimensões que os do *Penicillium glabrum*¹⁸², o que poderia também suportar a hipótese de estarem na origem de doença pulmonar das vias aéreas, em contraste com a doença intersticial associada à inalação e sensibilização aos esporos mais pequenos do *Penicillium glabrum*.

No entanto, no **trabalho 4**, utilizando testes sensíveis (teste cutâneos "prick" e *immunoblotting*) para a detecção de anticorpos IgE específicos para a *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum* e o *Thricoderma longibrachiatum*, não encontramos, evidência de sensibilização alérgica nos doentes com asma ocupacional na indústria da cortiça. Apesar do número limitado de doentes que estudámos, estes resultados estão de acordo com resultados anteriores que não revelaram a presença de IgE para o *Penicillium glabrum* por outro método laboratorial¹⁰⁷, sugerindo que a alergia a fungos mediada pela IgE não é um factor etiológico na asma dos corticeiros. Apesar de alguns doentes apresentarem IgG4 específica para alguns antigénios fúngicos, a presença destes anticorpos não permitiu igualmente diferenciar as duas populações (AO e ANO) e estará possivelmente relacionada com uma longa exposição a esses antigénios.

O achado de dois casos de asma ocupacional com testes cutâneos positivos aos ácaros de armazenamento (*Acarus siro* e *Tirophagus putrescenciae*) sugere que esta sensibilização pode participar no desencadear de sintomas brônquicos nalguns destes doentes, como acontece aliás noutras formas de asma ocupacional^{172,183,184}. De facto, condições de humidade¹⁸⁵ nas fábricas de cortiça poderão favorecer o crescimento destes ácaros e facilitar a sensibilização destes trabalhadores, o que deverá ser avaliado em estudos mais alargados de indivíduos expostos. No entanto, estes dois doentes estavam também sensibilizados aos ácaros comuns do pó da casa (um ao *Dermatophagoides pteronyssinus* e outro ao *Dermatophagoides farinae*) pelo que alguma da resposta cutânea poderá ser devida a reactividade alérgica cruzada entre as diferentes espécies de ácaros^{185,186}. De facto, no

grupo controlo não exposto que estudámos neste trabalho, a sensibilização simultânea aos ácaros de armazenamento e domésticos foi também igualmente elevada (37%).

A etiologia da asma ocupacional dos corticeiros permanece incerta, mas há agora alguma evidência de que a sensibilização IgE não é um elemento determinante na maior parte dos doentes. Os mecanismos do recrutamento eosinofílico às vias aéreas em situações de asma ocupacional não-IgE mediada, tem sido atribuída à presença de linfócitos T activados com um padrão de produção de citocinas de tipo Th2^{174,187,188}. Um aumento ligeiro do número de linfócitos no LBA verifica-se na maior parte dos nossos doentes com asma ($17,0 \pm 13,1\%$), podendo estudos futuros mais detalhados desta população celular contribuir para esclarecer o seu envolvimento.

A ausência de sensibilização IgE para os fungos que colonizam longamente as placas de cortiça durante o seu processamento industrial, sugere a procura de outros agentes etiológicos. De facto, os efeitos biológicos da poeira de cortiça deverão ser investigados, tendo como exemplo a alergia ao cedro vermelho (haptenuização pelo ácido plicático)¹⁸⁷ e a asma à madeira de carvalho¹⁸⁹. Vários autores têm demonstrado um mecanismo IgE-dependente na asma à madeira de samba¹⁹⁰ e à madeira de *Antiaris*¹⁹¹. A suberina, um componente «major» da cortiça, é um biopolímero lipofílico cuja constituição química tem vindo a ser definida¹⁹² e deverá ser considerada em estudos futuros. Além disso, o crescimento microbiano na cortiça origina metabolitos voláteis com potenciais efeitos adversos no aparelho respiratório^{193,194}.

Embora os efeitos biológicos da inalação crónica das poeiras de cortiça não estejam ainda esclarecidos é possível que a ela se associe uma resposta inflamatória das vias aéreas. Esta hipótese, também apontada para outras formas de asma ocupacional¹⁹⁵, é suportada pelo longo tempo de exposição que observámos nestes doentes (cerca 20 anos, na nossa série), bem como alguns dados de investigações anteriores¹⁹⁶.

Em conclusão, os nossos **trabalhos (2 a 4)** revelaram que a asma ocupacional dos trabalhadores da indústria da cortiça, demonstrada por alterações do registo seriado dos débitos expiratórios (DEMI) em exposição, se associa a inflamação eosinofílica broncopulmonar. Apesar da exposição prolongada a numerosos esporos fúngicos na indústria da cortiça, que originam sensibilização imunológica, com produção de IgG4, nos indivíduos expostos, não encontramos, através de métodos sensíveis, evidência da sensibilização IgE a estes fungos. Como referimos, os trabalhadores da indústria da cortiça estão expostos a uma grande diversidade de substâncias com capacidade imunogénica, adjuvante e/ou irritativa, pelo que novos estudos para desvendar a etiologia da asma ocupacional dos corticeiros devem seguir essas hipóteses.

Diagnóstico da Patologia Respiratória na Indústria da Cortiça

O amplo espectro de apresentação clínica que a inalação de partículas de cortiça bolorenta pode condicionar e as dificuldades no diagnóstico subjacentes, levou-nos a propor, com base nos resultados obtidos, a caracterização das patologias respiratórias dominantes (Quadro V). De resto, esta dicotomia doença das vias aéreas/doença do interstício pulmonar, tem-se colocado em outros ambientes profissionais, como o dos fazendeiros e dos criadores de pombos.

QUADRO V: Características clínicas e diagnósticas da Asma ocupacional e Pneumonite de Hipersensibilidade dos corticeiros

Características	Asma Ocupacional	Pneumonite de Hipersensibilidade
Sintomas	Dispneia, tosse, sibilância	Dispneia, tosse, mialgias, emagrecimento
Início após exposição	Imediato e/ou após 4-6 horas	Gradual após 4-8 horas
Auscultação	Normal ou sibilos expiratórios	Crepitações inspiratórias bibasais
PFR	Obstrução, DLCO normal	Restrição, DLCO anormal
DEMI seriado	Positivo	Negativo
LLBA	Eosinófilos	Linfócitos, Neutrófilos
TAC-AR	Normal	Vidro despolido
Antígenos fúngicos	Não IgE-mediada	<i>Penicillium glabrum</i> (12-13,5 e 33 kDa) <i>Chrysonilia sitophila</i> (16 e 51-55 kDa)

O diagnóstico diferencial de dispneia e tosse num corticeiro deve incluir Asma e Pneumonite de Hipersensibilidade, pois os agentes inalados na indústria da cortiça são capazes de causar qualquer uma das doenças. Outros autores descreveram casos de Asma Ocupacional e Pneumonite de Hipersensibilidade induzidos pelo mesmo fungo (por ex: *Aspergillus fumigatus* na Espartose) o que não se verifica na Suberose¹⁹⁷.

No entanto, embora raramente, um mesmo doente pode apresentar características das duas doenças. Na indústria da cortiça também é possível encontrar casos de Pneumonite de Hipersensibilidade associados a oscilações significativas do DEMI seriado³⁷, confirmando, no ambiente ocupacional as descrições anteriores de reacções imediatas ("brônquicas") e tardias ("alveolares") durante a provocação específica no laboratório²⁸.

A combinação de Asma e Pneumonite de Hipersensibilidade foi descrita também em fazendeiros¹⁹⁸, indivíduos expostos a isocianatos^{5,199}, trabalhadores na indústria das madeiras²⁰⁰ e indivíduos expostos ao *Trichosporon asahi*²⁰¹. Estas observações podem estar relacionadas com a coexistência de inflamação das vias aéreas pois, casos com formas de PH típicas, revelam aumento da hiperreacti-

vidade brônquica^{85,86} e os achados ultraestruturais das vias aéreas destes doentes mostram lesões extensas do epitélio brônquico⁸⁵.

Assim, a nossa investigação permitiu confirmar que, para além da Pneumonite de Hipersensibilidade dos corticeiros (cuja expressão clínica, radiológica e imunológica é bem caracterizada e a permite incluir no grande grupo das doenças intersticiais de mediação imunológica) se identificam casos de verdadeira asma ocupacional cuja etiologia permanece em aberto.

Para melhor separar os conceitos, a designação de Suberose (descrita em 1947 para definir a "Pneumocomiose produzida pela cortiça" e em 1973 separada em vários quadros clínicos) deveria então reservar-se para a Pneumonite de Hipersensibilidade dos trabalhadores da Indústria da Cortiça, aliás a doença mais frequente e aquela em que se conhece(m) o(s) agente(s) etiológicos. Quanto aos casos de asma ocupacional, eles também deverão estar integrados no espectro clínico da patologia respiratória dos corticeiros apesar de, tal como noutros contextos laborais, a sua etiologia não estar completamente determinada.

Conclusão

A Asma Ocupacional é uma patologia cada vez mais prevalente, de etiologia muito variada, e muitas vezes mal reconhecida no ambiente laboral. Embora o diagnóstico seja relativamente fácil de estabelecer, requer o apoio de estudos laboratoriais com alguma complexidade e, nalguns casos, o diagnóstico diferencial com outras formas de patologia respiratória ocupacional, como a Pneumonite de Hipersensibilidade.

A identificação do(s) agente(s) causal(is) da Asma Ocupacional e dos mecanismos que lhe estão subjacentes, poderão contribuir para uma melhor compreensão da patogenia da Asma Brônquica, uma doença igualmente de prevalência crescente.

A Pneumonite de Hipersensibilidade é uma doença inflamatória subsequente à exposição antigénica por via inalatória, com perturbação da dinâmica celular e funcional do pulmão profundo. O estudo dos mecanismos imunopatogénicos e dos factores que contribuem para a evolução fibrosante desta doença poderão trazer informações importantes para compreender outras doenças do interstício pulmonar de etiologia desconhecida.

Apesar da importância diagnóstica dos antigénios "específicos da doença" ser questionável, a confirmação de uma predisposição genética, ligada ao MHC, nestas doenças de hipersensibilidade imunológica^{202,203}, aponta para uma relevância biológica da identificação dos epitopos imunodominantes. A sua caracterização, através da reactividade de anticorpos séricos ou do LLBA, tem aberto caminho para a investigação de peptídeos antigénicos reconhecidos pelos linfócitos T destes doentes e da resposta imunológica celular no pulmão²⁰³.

Embora o papel patogénico de múltiplos constituintes das partículas de cortiça esteja ainda aberto à investigação e o envolvimento de outros antígenos presentes no ambiente ocupacional da indústria da cortiça se possa colocar, o estudo da resposta imunológica e inflamatória do pulmão profundo, bem como a avaliação funcional pulmonar no ambiente profissional que realizámos, permitiram uma melhor definição do espectro clínico da Suberose. Compreender a imunopatogenia e melhorar o diagnóstico permitirá também estabelecer as melhores estratégias de evicção e higiene industrial, com a finalidade de reduzir a prevalência destas doenças pulmonares, potencialmente preveníveis.

Resumo/Summary/Résumé

RESUMO

Introdução

A Suberose é uma doença ocupacional dos trabalhadores da indústria de transformação da cortiça, associada à exposição repetida a poeiras de cortiça bolorenta, apresentando-se habitualmente como uma doença do interstício pulmonar (Pneumonite de Hipersensibilidade). Esta forma de Pneumonite de Hipersensibilidade caracteriza-se por uma reacção granulomatosa do interstício pulmonar e presença de precipitinas para o *Penicillium glabrum*. Para além desta, nas descrições iniciais da doença, nos anos 70, também foram referidos quadros de tipo asmático. Estas formas de asma brônquica, para além de tornarem a abordagem diagnóstica destes doentes complexa, nunca foram completamente caracterizadas.

Objectivos

1) Com o recurso a métodos de diagnóstico recentes, caracterizar o perfil imagiológico, funcional e do líquido de lavagem broncoalveolar (LLBA) da Pneumonite de Hipersensibilidade da Suberose, comparando-a com a forma clássica do Pulmão de Criadores de Aves.

2) Estudar doentes com sintomas de asma brônquica relacionados com a exposição na indústria da cortiça, avaliando os registos de DEMI seriados durante e após afastamento ocupacional e caracterizar a resposta inflamatória broncoalveolar neles presentes.

3) Nos doentes com o diagnóstico de asma ocupacional, investigar a presença de atopia e a possível sensibilização IgE à *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum*, e *Thricoderma longibrachiatum*, os fungos que mais frequentemente colonizam a cortiça durante o seu processamento industrial.

4) Em doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade identificar antigénios "major" do *Penicillium glabrum* e *Chrysonilia sitophila*, comparativamente a doentes expostos mas sem doença intersticial pulmonar.

Doentes e métodos

1) Estudámos 81 doentes com a Pneumonite de Hipersensibilidade da Suberose e 32 doentes com Pulmão de Criadores de Aves, comparando os parâmetros funcionais respiratórios, a radiografia simples e TAC torácica de alta resolução bem como o LLBA entre os dois grupos.

2) Estudámos 17 corticeiros com sintomas de asma brônquica, agravando no local de trabalho, através da realização de registo de débito expiratório máximo instantâneo (DEMI) seriado e análise dos perfis celulares do LLBA. De acordo com a inspecção visual do registo de DEMI, os doentes foram classificados como asma ocupacional e asma não ocupacional, comparando-se a inflamação broncoalveolar, atopia e a sensibilização a fungos entre os dois grupos.

3) Estudámos 10 corticeiros com sintomas de asma brônquica, tendo realizado testes cutâneos de tipo "prick" que incluíram uma bateria de alérgenos ambientais comuns (ácaros domésticos, pólenes, epitélios e ácaros de armazenamento) e extractos glicero-salinos de culturas fúngicas obtidas do ambiente industrial. Como grupo controlo, foram estudados 8 doentes com asma sem exposição na indústria da cortiça. Foram pesquisados anticorpos específicos IgE e IgG4 para os 3 tipos de fungos por *immunoblotting*.

4) Num grupo de 16 corticeiros (9 com Pneumonite de Hipersensibilidade e 7 com Asma) foi ainda avaliada a resposta IgG ao *Penicillium glabrum* e *Chrysonilia sitophila*, usando *immunoblotting* e uma análise quantitativa.

Resultados

1) Os doentes com Suberose apresentavam mais frequentemente formas subagudas ou crónicas de Pneumonite de Hipersensibilidade, sendo as alterações funcionais respiratórias mais frequentes e severas no Pulmão de Criadores de Aves. Na TAC torácica, o padrão em vidro despolido foi o mais comum nas duas formas de Pneumonite de Hipersensibilidade, enquanto a Suberose tinha mais frequentemente radiografias torácicas normais. Apesar da alveolite linfocítica de tipo CD8+ predominar em ambas doenças, a relação CD4/CD8 era significativamente mais elevada no Pulmão de Criadores de Aves.

2) Ocorreram registos de DEMI positivos em 7 casos (asma ocupacional), enquanto 7 registos de DEMI foram negativos (asma não ocupacional). Não houve diferenças na idade, função pulmonar (VEMS%, VR%), hiperreactividade brônquica, tempo de exposição e atopia entre os dois grupos de doentes. Contudo os doentes com asma ocupacional tinham maior eosinofilia do LLBA que os doentes com asma não ocupacional.

3) Testes cutâneos a alérgenos ambientais comuns estavam presentes em 2/10 doentes com exposição ocupacional e 4/8 do grupo controlo. Além disso, 2 dos doentes com asma ocupacional e 3 dos controlos tinham sensibilização a ácaros de armazenamento. Todos os doentes com asma ocupacional e asma não ocupacional tinham testes negativos aos fungos estudados. Os resultados do *immunoblotting* confirmaram a ausência de sensibilização IgE a estes fungos nos doentes com asma brônquica e exposição ocupacional, mesmo naqueles que mostraram alguma resposta no isotipo IgG4.

4) No que se refere à reactividade IgG para fungos, ela foi significativamente mais intensa nos doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade do que nos asmáticos e, enquanto para o *Penicillium glabrum*, todos os soros dos doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade reconheciam antígenos de peso molecular de 12-13.5 kDa e 33 kDa, isso só acontecia em apenas 2 asmáticos; já em relação à reactividade IgG para a *Chrysonilia sitophila*, o componente de 16 kDa só era reconhecido pelos doentes com Pneumonite de Hipersensibilidade.

Conclusões

A Pneumonite de Hipersensibilidade dos corticeiros tem uma forma de apresentação clínica, funcional, radiológica e do LLBA diferente do Pulmão de Criador de Aves, o que sugere que diferentes tipos de exposições antigénicas podem causar uma diferente dinâmica da resposta imunológica/inflamatória do pulmão.

É possível identificar Asma Ocupacional dos trabalhadores da indústria da cortiça, por oscilações significativas do DEMI, e esta, tal como outras formas de asma ocupacional, está associada a inflamação eosinofílica.

A atopia não parece caracterizar a asma brônquica dos corticeiros mas, nalguns casos, a sensibilização a ácaros de armazenamento pode estar implicada.

Apesar de neste ambiente ocupacional ocorrer exposição prolongada a esporos fúngicos, não encontramos sensibilização IgE aos três fungos mais prevalentes, quer por métodos *in vivo* quer *in vitro*.

A identificação de antígenos "major" na Pneumonite de Hipersensibilidade dos corticeiros (como aqueles identificados por *immunoblotting* no *Penicillium glabrum* e *Chrysonilia sitophila*) poderá auxiliar no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos.

SUMMARY

Introduction

Suberosis is an occupational lung disease of cork workers associated with repeated exposure to mouldy cork dust, usually presenting as an interstitial lung disorder (Hypersensitivity Pneumonitis). This form of Hypersensitivity Pneumonitis is characterized by interstitial granulomatous infiltration and by the presence of precipitins to *Penicillium glabrum*. Apart from this form, in the initial descriptions of the disease in the seventies, asthma-like syndromes were also reported. These forms of bronchial asthma, not only make the diagnostic approach of these patients complex, but are still not fully elucidated.

Aims

1) To characterize the radiological, functional and bronchoalveolar lavage (BAL) profiles of Suberosis Hypersensitivity Pneumonitis, in comparison with Bird Fancier's Disease, using recent diagnostic methods.

2) To investigate patients with cork work-related asthma, evaluating serial peak expiratory flow (PEF) rates at and away from work, and to characterize the bronchoalveolar inflammatory response.

3) In patients with the diagnosis of occupational asthma, to investigate the presence of atopy and IgE sensitization to *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum*, and *Thricoderma longibrachiatum*, which are the most predominant moulds colonizing cork during its industrial processing.

4) In patients with Hypersensitivity Pneumonitis to identify major antigens of *Penicillium glabrum* and *Chrysonolia sitophila* in comparison with exposed patients without interstitial lung disease.

Patients and methods

1) We studied 81 cork workers with Hypersensitivity Pneumonitis and 32 patients with bird fancier's disease comparing lung function parameters, chest x-ray, high-resolution computed tomography (HRCT) scan, and BAL profiles between both groups.

2) We studied 17 cork workers with asthma symptoms, which worsened at work, by serial PEF rates monitoring and bronchoalveolar fluid cellular profiles. After visual analysis of the PEF recordings, patients were classified as occupational and non-occupational asthma and compared for bronchoalveolar inflammation, atopy and mould sensitization.

3) In 10 cork workers with asthma symptoms, which worsened at work, skin "prick" tests were performed with a battery of common allergens (house dust mites, pollens, epithelia and storage mites) and with glycerol-saline extracts of isolated fungal cultures of moulds obtained in the industrial environment. As a control group we also studied 8 unexposed patients with asthma. Specific IgE and IgG4 antibodies for the three different moulds were also searched by immunoblotting.

4) In a group of 16 cork workers (9 with HP and 7 with asthma), we also studied, IgG, IgG4 response to *Penicillium glabrum* and *Chrysonolia sitophila*, using immunoblotting and a quantitative analysis.

Results

1) Patients with Suberosis had predominately subacute and chronic presentations of Hypersensitivity Pneumonitis and lung function impairment was more frequent and severe in Bird Fancier's Disease. Ground glass was the most frequent HRCT pattern in both forms of Hypersensitivity Pneumonitis, while chest x-rays were more frequently normal in Suberosis. Although BAL CD8+ lymphocytes predominated in both diseases, CD4/CD8 ratios were significantly higher in Bird Fancier's Disease.

2) Positive PEF monitoring occurred in 7 cases (occupational asthma), and in another 7 PEF records were negative (non-occupational asthma). There were no differences in age, lung function (FEV1%, RV %), bronchial hyperresponsiveness, years of exposure, and atopy between the two patients groups. However, patients with work-related asthma had higher BAL eosinophil counts than non-occupational asthma.

3) Positive skin "prick" tests to common allergens were present in 2/10 patients with occupational exposure and 4/8 of the control group. Moreover 2 patients with occupational asthma and 3 controls had sensitisation to storage mites; all patients with occupational asthma and non-occupational asthma had negative skin "prick" tests to fungi. Immunoblotting results confirmed the absence of IgE sensitisation to these moulds in patients with asthma and occupational exposure, even in patients that showed an antibody response with the IgG4 isotype.

4) Concerning IgG reactivity to moulds, it was significantly higher in Hypersensitivity Pneumonitis than in asthmatics; moreover, sera from all Hypersensitivity Pneumonitis patients (and only 2 asthmatics) recognized *Penicillium glabrum* antigens of molecular weight of 12-13.5kDa and 33kDa; the 16 kDa component of *Chrysonilia sitophila* was only recognized by Hypersensitivity Pneumonitis patients.

Conclusions

Cork worker's Hypersensitivity Pneumonitis has a different clinical, functional, radiological and BAL profile comparatively to Bird Fancier's Disease, suggesting that different antigenic exposures may result in a different dynamic of the lung immune/inflammatory response.

Cork worker's Occupational Asthma, demonstrated by work related changes in serial PEF recordings, is associated with eosinophilic lung inflammation as seen in other types of occupational asthma.

Atopy does not seem to characterize cork worker's asthma but, in some cases, sensitisation to storage mites may be implicated.

In spite of a long-standing exposure to mould spores in this occupational environment, we could not find evidence of IgE sensitisation to the three most prevalent fungi, by both *in vivo* and *in vitro* methods.

The identification of major antigens in cork worker's HP (like those identified by immunoblotting in *Penicillium glabrum* and *Chrysonilia sitophila*) may be helpful to develop new diagnostic tests.

RÉSUMÉ

Introduction

La Suberose est une maladie occupationnelle des travailleurs de l'industrie de transformation du liège, associée à une exposition répétée aux poussières du liège moisi, se présentant habituellement comme une maladie interstitielle pulmonaire (Pneumopathie d'hypersensibilité). Cette forme de Pneumopathie d'hypersensibilité se caractérise par une réaction granulomateuse interstitielle et par la présence de précipitines contre le *Penicillium glabrum*. Outre cette forme, dans les descriptions initiales de la maladie, l'on a aussi rapporté des formes du type d'asthme. Ces formes d'asthme bronchique, au-delà de rendre l'investigation diagnostique de ces malades complexe, n'ont jamais été complètement caractérisées.

Objectifs

1) Grâce au recours de méthodes diagnostiques plus récentes, caractériser le profil radiologique, fonctionnel et du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) de la Pneumopathie d'hypersensibilité de la Suberose, en la comparant à la forme classique de la Maladie des Éleveurs d'oiseaux.

2) Étudier des malades présentant des symptômes d'asthme bronchique se rapportant à une exposition dans l'industrie du liège, évaluant des mesures sériées du débit de pointe (DEMI) et caractériser la réponse inflammatoire bronchoalvéolaire.

3) Chez les malades avec asthme professionnel, rechercher la présence d'atopie et la possible sensibilisation IgE à la *Chrysonilia sitophila*, *Penicillium glabrum*, et *Thricoderma longibrachiatum*, les moisissures qui colonisent plus fréquemment le liège pendant son processus industriel.

4) Analyser le patron de sensibilisation IgG au *Penicillium glabrum* et *Chrysonilia sitophila* chez les malades ayant une Pneumopathie d'hypersensibilité, en comparaison aux malades exposés mais qui ne présentent pas de maladie interstitielle pulmonaire.

Malades et méthodes

1) Nous avons étudié 81 malades présentant une Pneumopathie d'hypersensibilité de la Suberose et 32 malades qui ont la Maladie des Éleveurs d'oiseaux, en comparant les paramètres fonctionnels respiratoires, la radiographie standard et la tomодensitométrie haute résolution, ainsi que le LLBA entre les deux groupes.

2) Nous avons étudié 17 travailleurs de l'industrie du liège présentant des symptômes d'asthme bronchique, aggravés sur le lieu du travail, par le biais du monitoring du DEMI et l'analyse des profils cellulaires du LLBA. D'accord avec l'inspection visuelle du registre de DEMI, les malades ont été classifiés comme asthme professionnel et asthme non professionnel, en comparant l'inflammation broncho-alvéolaire, l'atopie et la sensibilisation aux champignons entre les deux groupes.

3) Nous avons étudié 10 travailleurs de l'industrie du liège présentant des symptômes d'asthme bronchique, en réalisant des tests cutanés du type "prick" qui comportaient des allergènes communs du milieu ambiant (acariens domestiques, pollens, épithéliums et acariens de stockage) et des extraits glycéro-salins de cultures fongiques obtenus dans l'environnement industriel. Comme groupe contrôle on a étudié 8 malades atteints d'asthme sans exposition dans l'industrie du liège. On a recherché des anticorps spécifiques IgE et IgG4 pour les 3 types de champignons par *immunoblotting*.

4) Dans un groupe de 16 travailleurs de l'industrie du liège (9 avec PH et 7 avec asthme) on a aussi évalué, par *immunoblotting*, la réponse IgG au *Penicillium glabrum* et *Chrysonilia sitophila*.

Résultats

1) Les malades atteints de Suberose présentent plus fréquemment des formes sub-aiguës ou chroniques de Pneumopathie d'hypersensibilité, étant les anomalies fonctionnelles respiratoires les plus fréquentes et sévères dans la Maladie des Éleveurs d'oiseaux. Dans la tomодensitométrie haute résolution le patron en verre dépoli a été le plus commun dans les deux formes de Pneumopathie d'hypersensibilité, alors que la Suberose donnait plus fréquemment des radiographies thoraciques normales. Bien que l'alvéolite lymphocytaire de type CD8+ prédomine dans ces deux maladies, la relation CD4/CD8 a été significativement plus élevée dans la Maladie des Éleveurs d'oiseaux;

2) On a retrouvé des registres de DEMI positifs dans 7 cas (Asthme Professionnel), alors que 7 registres de DEMI ont été négatifs (Asthme Non Professionnel). Entre les deux groupes de malades il n'y a pas eu des différences d'âge, de fonction pulmonaire (VEMS%, VR%), d'hyper-réactivité bronchique,

de temps d'exposition et d'atopie. Cependant, les malades avec l'Asthme Professionnel avaient une plus grande éosinophilie du LLBA que les malades avec l'Asthme Non Professionnel.

3) Des tests cutanés à allergènes communs du milieu étaient présents chez 2/10 des malades avec exposition professionnelle et 4/8 dans le groupe contrôle. En outre, 2 des malades d'Asthme Professionnel et 3 des contrôles avaient une sensibilisation aux acariens de stockage. Tous les malades avec l'Asthme Professionnel et l'Asthme Non Professionnel avaient des tests négatifs aux moisissures étudiées. Les résultats de l'*immunoblotting* ont confirmé l'absence de sensibilisation IgE à ces champignons chez les malades avec de l'asthme bronchique et l'exposition occupationnelle, même chez ceux qui ont présenté une réponse dans l'isotype IgG4.

4) En ce qui concerne la réactivité IgG pour les champignons, elle a été significativement plus intense chez les malades avec une Pneumopathie d'hypersensibilité que chez les asthmatiques et, alors que pour les *Penicillium glabrum* tous les sérums des malades avec une Pneumopathie d'hypersensibilité ont reconnu les antigènes de poids moléculaire de 12-13.5 kDa et 33 kDa, cela ne se retrouve que chez 2 asthmatiques; en ce qui concerne la réactivité IgG pour la *Chrysonilia sitophila*, le composant de 16 kDa n'a été reconnu que par les malades avec une Pneumopathie d'hypersensibilité.

Conclusions

La Pneumopathie d'hypersensibilité des travailleurs de l'industrie du liège a une forme de présentation clinique, fonctionnelle, radiologique et du LLBA différente de la Maladie des Éleveurs d'oiseaux, ce qui suggère que de différentes expositions antigéniques puissent causer une dynamique de la réponse immunologique/inflammatoire du poumon.

L'asthme professionnel des travailleurs de l'industrie du liège, démontrée par des oscillations significatives du DEMI, est associée à l'inflammation pulmonaire éosinophilique, comme c'est le cas pour d'autres formes d'asthme professionnel.

L'atopie ne semble pas caractériser l'asthme bronchique des travailleurs de l'industrie du liège, mais dans quelques cas la sensibilisation aux acariens de stockage peut être impliquée.

Bien qu'il existe une exposition prolongée à des spores fongiques dans cette ambiance occupationnelle, on n'a pas rencontré de sensibilisation IgE pour les trois champignons plus prépondérants, soit par méthodes *in vivo* soit *in vitro*.

L'identification d'antigènes "major" dans les formes de PH des travailleurs de l'industrie du liège (tels que ceux identifiés par *immunoblotting* dans le *Penicillium glabrum* et la *Chrysonilia sitophila*) pourra jouer un rôle dans le développement de nouvelles méthodes diagnostiques.

Epílogo

Durante os últimos 4 anos voltámos a nossa atenção para a investigação da asma e pneumonite de hipersensibilidade dos trabalhadores da indústria da cortiça. Foi uma experiência enriquecedora, em que pudemos olhar para uma doença antiga com novas perspectivas, dada a ajuda de tantos colaboradores, sem os quais algum progresso conseguido nunca teria sido atingido. Este trabalho foi erguido com os percalços próprios de um edifício em construção mas, esperamos que este esforço incipiente possa contribuir para que outros continuem a desenhar o rico mapa da patologia respiratória dos corticeiros.

Bibliografia Geral

1. Schuyler M. Hypersensitivity Pneumonitis. In: Fishman AP EJ, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM, editor. *Pulmonary Diseases and Disorders*: MacGrawHill; 1997. p. 1085-97.
2. Ando M, Suga M, Kohogi H. A new look at hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5: 299-304.
3. Trentin L, Facco M, Semenzato G. Hypersensitivity Pneumonitis. In: Mapp C, editor. *Occupational Lung Disorders: European Respiratory Monograph*; 1999. p. 301-19.
4. Campbell JA. Acute symptoms following work with hay. *BMJ* 1932; 2: 1143-51.
5. Delgado L, Winck JC, Sapage JM, Lopes JA, Torres S, Fleming Torrinha JA. Patologia pulmonar ocupacional por isocianatos. Avaliação clínica e imunológica. *Arq SPPR* 1994; 11: 219-33.
6. Fink JN, Sosman AJ, Barboriak JJ, Schlueter DP, Holmes RA. Pigeon breeder's disease. A clinical study of a hypersensitivity pneumonitis. *Ann Intern Med* 1968; 68: 1205-19.
7. Suda T, Sato A, Ida M, Gemma H, Hayakawa H, Chida K. Hypersensitivity pneumonitis associated with home ultrasonic humidifiers. *Chest* 1995; 107: 711-7.
8. Carvalho A, Sá JM, Rodrigues FF, Seada J, Brito MC, Caminha JC, et al. Manifestações broncopulmonares em operários inalando poeiras de cortiça. *O Médico* 1986; 115: 311-8.
9. Ávila R, Lucas JMG, Araújo AT, Lacey J, Heitor MC, Mendes EM, et al. Estudo epidemiológico da doença respiratória dos operários da indústria da cortiça. *O Médico* 1973; 1146: 257.
10. <http://cismserveur.univ-lyon1.fr/germop/>.
11. Ando M, Konishi K, Yoneda R, Tamura M. Difference in the phenotypes of bronchoalveolar lavage lymphocytes in patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis, farmer's lung, ventilation pneumonitis, and bird fancier's lung: report of a nationwide epidemiologic study in Japan. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 1002-9.
12. Ramalho de Almeida A. A cortiça: do Sobreiro à sua Comercialização. Importância na Indústria Nacional. *Rev. Port. Pneumol* 1996; II.
13. Segorbe-Luís A. Estudo da repercussão respiratória em criadores de pombos. *Via Pneumológica* 1991; IV: 129-45.
14. Segorbe-Luís A. Repercussão Respiratória da Exposição a Pombos. Trabalho Complementar apresentado para provas de doutoramento à Faculdade de Medicina de Coimbra, 1991.
15. Sá H, Taveira N, Delgado L, João F. Doença de Criadores de Pombos. Estudo numa população de risco. *Arq. Soc. Port. Pat. Resp* 1987; IV: 37-42.
16. Reed C, Sosman A, Barbee R. Pigeon-breeders' lung. A newly observed interstitial pulmonary disease. *JAMA* 1965; 193: 261-5.
17. Calvert J, Baldwin C, Allen A, Todd A, Bourke S. Pigeon fanciers' lung: a complex disease? *Clinical and Experimental Allergy* 1999; 29: 166-75.
18. Ávila R. Suberose-História e Etiopatogenia. *Rev Port Pneumol* 1996; II: 11-21.
19. Vinte-e-Um-Mendes F. Comunicação às Reuniões Médicas de Portalegre. 1947.
20. Cancelli L. Uma forma especial de pneumoconiose: a suberose. *Boletim da Junta Nacional de Cortiça* 1955; 197: 122.
21. Horta J, Cancelli L. Suberose experimental. *Medicina Contemporânea* 1956; 74: 52.
22. Abreu I, Deguedre G. Contribuição para o estudo do grau de nocividade da atmosfera poeirenta de uma fábrica de cortiça. *Medicina Contemporânea* 1960; LXXVII: 91-102.
23. Cancelli L. Suberose: alterações pulmonares relacionadas com a inalação de poeiras de cortiça.: Faculdade de Medicina de Lisboa, 1959.
24. Cancelli L. Suberosis: a pneumoconiosis due to cork dust. *Ind. Med. And Surgery* 1963; 32: 436.
25. Ávila R, Villar T. Suberosis: Respiratory disease in cork workers. *Lancet* 1968; 1: 620.

26. Ávila R, Araújo A, Villar T. Doença pulmonar nos cortiçeiros. *Jornal do Médico* 1968; 66: 8.
27. Pimentel J, Ávila R. Respiratory disease in cork workers (Suberosis). *Thorax* 1973; 28: 409-23.
28. Ávila R. A Suberose como modelo de estudo das Granulomatoses Pulmonares devidas à inalação de poeiras orgânicas. In *Granulomatoses Pulmonares de Causa Inalatória- Experiência Pessoal*. Dissertação de Doutoramento à F.M. Lisboa 1975.
29. Ávila R, Lacey J. The role of *Penicillium frequentans* in Suberosis (Respiratory disease in cork workers). *Clinical Allergy* 1974; 4: 109-17.
30. Villar T, Ávila R. *Granulomatoses pulmonares de causa inalatória*. Lisboa; 1976.
31. Lacey J. The air spora of a portuguese cork factory. *Ann Occup Hyg* 1973; 16: 223.
32. Danesh P, Velez Caldas F, Figueiredo Marques J, San Romão M. Mycobiota in portuguese "normal" and "green" cork throughout the manufacturing process of stoppers. *J Appl Microbiol* 1997; 82: 689-94.
33. Santos M, Lopes R, Bragança M. Contribuição para a caracterização da microflora da cortiça desde o descortiçamento até à cura. *PEDIP-Missões de Produtividade* 1993; 668: 163-72.
34. Rodrigues J, Moreira da Silva J, Delgado L, Castel-Branco M. Pneumonites de Hipersensibilidade. *Rev Port Imunoalergol* 1992; 1: 34-9.
35. Winck J, Vanzeller M, Sapage J, Torres S, Delgado L. Formas agudas de Suberose: evolução clínica, funcional e do líquido de lavagem broncoalveolar. *Arq SPPR* 1998; IV: 507.
36. Lama M, Pérez-Padilla R. Airflow Obstruction and Airway Lesions in Hypersensitivity Pneumonitis. *Clinics in Chest Medicine* 1993; 14.
37. Winck J, Delgado J. Suberose: mais do que uma pneumonite de hipersensibilidade... *Rev Port Pneumol* 2000; VI: 195-204.
38. Gurney J. Hypersensitivity Pneumonitis. *Radiol Clinics North America* 1992; 30: 1219-30.
39. Hansell DM, Wells AU, Padley SP, Muller NL. Hypersensitivity pneumonitis: correlation of individual CT patterns with functional abnormalities. *Radiology* 1996; 199: 123-8.
40. Cormier Y, Brown M, Worthy S, Racine G, Muller NL. High-resolution computed tomographic characteristics in acute farmer's lung and in its follow-up. *Eur Respir J* 2000; 16: 56-60.
41. Vanzeller M, Sapage J, Bastos I, Pascoal I, Winck J, Delgado L. Imagiologia da Suberose. *Rev Port Pneumol* 1996; II: 47-54.
42. Delgado JL, Ramos JP, Winck JC, Rodrigues J, Fleming Torrinha JA. Heterogeneidade dos macrófagos alveolares em doenças pulmonares granulomatosas. Caracterização por citometria de fluxo. *Rev Port Imunol* 1996; 1: 15-43.
43. Delgado L, Ramos JP, Winck JC, Cuesta C, Fleming Torrinha JA. Cytotoxic lymphocytes in Hypersensitivity pneumonitis. *Clin Exp Allergy* 1993; 23 [suppl 1]: Abstract.
44. Yamasaki H, Ando M, Brazer W, Center DM, Cruikshank W. Polarized type 1 cytokine profile in bronchoalveolar lavage T cells of patients with hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol* 1999; 163: 3516-23.
45. Schuyler M, Gott K, Cherne A. Mediators of hypersensitivity pneumonitis. *J Lab Clin Med* 2000; 136: 29-38.
46. Bourke SJ, Dalphin JC, Boyd G, McSharry C, Baldwin C, Calvert JE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts. *Eur Respir J* 2001; 18: 81s-92s.
47. Solal-Celigny P, Lavolette M, Hebert J, Cormier Y. Immune reactions in the lungs of asymptomatic dairy farmers. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 964-7.
48. Cormier Y, Belanger J, Lavolette M. Persistent bronchoalveolar lymphocytosis in asymptomatic farmers. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 843-7.
49. Gariépy L, Cormier Y, Lavolette M, Tardif A. Predictive value of bronchoalveolar lavage cells and serum precipitins in asymptomatic dairy farmers. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1386-9.
50. Johnson MA, Nemeth A, Condez A, Clarke SW, Poulter LW. Cell-mediated immunity in pigeon breeders' lung: the effect of removal from antigen exposure. *Eur Respir J* 1989; 2: 445-50.
51. Cormier Y, Belanger J, LeBlanc P, Lavolette M. Bronchoalveolar lavage in farmers' lung disease: diagnostic and physiological significance. *Br J Ind Med* 1986; 43: 401-5.
52. Sapage J, Delgado L, Torres S, Vicente P, Winck J, Rodrigues P, et al. Suberose: contributo da lavagem Broncoalveolar no diagnóstico da patologia respiratória nos trabalhadores da Indústria da Cortiça. *Arq. Soc. Port. Pat. Respir* 1992; 9: 321-7.
53. Cormier Y, Belanger J, Tardif A, Leblanc P, Lavolette M. Relationships between radiographic change, pulmonary function, and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in farmer's lung disease. *Thorax* 1986; 41: 28-33.
54. Leblanc P, Belanger J, Lavolette M, Cormier Y. Relationship among antigen contact, alveolitis, and clinical status in farmer's lung disease. *Arch Intern Med* 1986; 146: 153-7.
55. Semenzato G, Trentin L, Zambello R, Agostini C, Cipriani A, Marcer G. Different types of cytotoxic lymphocytes recovered from the lungs of patients with hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137: 70-4.

56. Trentin L, Migone N, Zambello R, di Celle PF, Aina F, Feruglio C, et al. Mechanisms accounting for lymphocytic alveolitis in hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol* 1990; 145: 2147-54.
57. Morais M, Winck JC, Palmares MC, Fonseca JA, Fernandes B, Moura e Sa J, et al. Bronchoalveolar lavage cellular profile in cork workers' extrinsic allergic alveolitis. *Curr Pneumol* 2000; 4:11.
58. Costabel U. Bronchoalveolar lavage cell differentials and lymphocyte subsets in Hypersensitivity Pneumonitis. *Rev Port Pneumol* 2000; 6: 187-93.
59. Cormier Y, Belanger J, Leblanc P, Hébert J, Laviolette M. Lymphocyte subpopulations in Extrinsic Allergic Alveolitis. *Ann NYAc Sci* 1986; 465: 370-7.
60. Yoshizawa Y, Miyake S, Sumi Y, Hisauchi K, Sato T, Kurup VP. A follow-up study of pulmonary function tests, bronchoalveolar lavage cells, and humoral and cellular immunity in bird fancier's lung. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 122-9.
61. Morais M, Winck JC, Delgado J, Palmares MC, Fonseca JA, Moura e Sa J. Hypersensitivity Pneumonitis: clinical and bronchoalveolar lavage profiles in different occupational exposures. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: A747.
62. Semenzato G, Agostini C, Zambello R, Trentin L, Chilosi M, Pizzolo G, et al. Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis: phenotypic and functional analyses. *J Immunol* 1986; 137: 1164-72.
63. Keller RH, Swartz S, Schlueter DP, Bar-Sela S, Fink JN. Immunoregulation in hypersensitivity pneumonitis: phenotypic and functional studies of bronchoalveolar lavage lymphocytes. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 766-71.
64. Segorbe-Luis A. Contribuição para o estudo da Alveolite Subclínica do Criador de Aves. *Via Pneumológica* 1992: 51-60.
65. Cormier Y, Belanger J, Laviolette M. Prognostic significance of bronchoalveolar lymphocytosis in farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 692-5.
66. Drent M, van Velzen-Blad H, Diamant M, Wagenaar SS, Hoogsteden HC, van den Bosch JM. Bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis: effect of time elapsed since antigen exposure. *Eur Respir J* 1993; 6: 1276-81.
67. Reynolds SP, Jones KP, Edwards JH, Davies BH. Inhalation challenge in pigeon breeder's disease: BAL fluid changes after 6 hours. *Eur Respir J* 1993; 6: 467-76.
68. Yoshizawa Y, Miyashita Y, Inoue T, Sumi Y, Miyazaki Y, Sato T, et al. Sequential evaluation of clinical and immunological findings in hypersensitivity pneumonitis: serial subclass distribution of antibodies. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 73: 330-7.
69. Dakhama A, Israel-Assayag E, Cormier Y. Role of interleukin-2 in the development and persistence of lymphocytic alveolitis in farmer's lung. *Eur Respir J* 1998; 11: 1281-6.
70. Denis M, Bedard M, Laviolette M, Cormier Y. A study of monokine release and natural killer activity in the bronchoalveolar lavage of subjects with farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 934-9.
71. Denis M. Proinflammatory cytokines in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 164-9.
72. Sugiyama Y, Kasahara T, Mukaida N, Matsushima K, Kitamura S. Chemokines in bronchoalveolar lavage fluid in summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 1995; 8: 1084-90.
73. Takahashi T, Munakaia M, Ohtsuka Y, Satoh-Kamachi A, Sato R, Homma Y, et al. Serum KL-6 Concentrations in Dairy farmers. *Chest* 2000: 445-50.
74. Bjermer L, Engstrom-Laurent A, Lundgren R, Rosenhall L, Hallgren R. Hyaluronate and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid as markers of disease activity in farmer's lung. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987; 295: 803-6.
75. Larsson K, Eklund A, Malmberg P, Bjermer L, Lundgren R, Belin L. Hyaluronic acid (hyaluronan) in BAL fluid distinguishes farmers with allergic alveolitis from farmers with asymptomatic alveolitis. *Chest* 1992; 101: 109-14.
76. Cormier Y, Laviolette M, Cantin A, Tremblay GM, Begin R. Fibrogenic activities in bronchoalveolar lavage fluid of farmer's lung. *Chest* 1993; 104: 1038-42.
77. Lalancette M, Carrier G, Laviolette M, Ferland S, Rodrigue J, Begin R, et al. Farmer's lung. Long-term outcome and lack of predictive value of bronchoalveolar lavage fibrosing factors. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 216-21.
78. Delgado I, Winck J, Sapage J, Moura e Sá J, Flemming Torrinha J. O Hialuronano no lavado broncoalveolar, um marcador de activação dos fibroblastos, reflecte a intensidade da inflamação intersticial na Suberose. *Rev Port Pneumol* 1998; IV: 375-86.
79. Corrin B. *Pathology Of The Lungs*. 1st ed: Churchill Livingstone; 1999.
80. Kawanami O, Basset F, Barrios R, Lacroinque J, Ferrans V, Crystal R. Hypersensitivity pneumonitis in man. Light and electron-microscopic studies in 18 lung biopsies. *Am J Pathol* 1983; 110: 275-89.
81. Pesci A, Bertorelli G, Olivieri D. Mast cells in bronchoalveolar lavage fluid and in transbronchial biopsy specimens of patients with farmer's lung disease. *Chest* 1991; 100: 1197-202.

82. Costabel U, Teschler H, Guzman J. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP): the cytological and immunocytological profile of bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 1992; 5: 791-7.
83. Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, Sawada M, Inase N, Miyake S, et al. Inhalation provocation tests in chronic bird fancier's lung. *Chest* 2000; 118: 1382-9.
84. Winck J, Shiang T, Sapage J, Delgado L, Vanzeller M, Torres S. Suberose: Clínica e Fisiopatologia. *Rev Port Pneumol* 1996; 11: 41-6.
85. Monkare S. Clinical aspects of farmer's lung: airway reactivity, treatment and prognosis. *Eur J Respir Dis* 1984; 65: 29-43.
86. Torres da Costa J, Winck J, Sapage J, Melo I, Azevedo M, Delgado L. Bronchial hyperreactivity in the respiratory disease of cork workers. *Clin Exp Allergy* 1993; 23.
87. Winck JC, Sapage JM, Vanzeller M, Torres S, Delgado J. Work-related changes in peak expiratory flow in cork worker's respiratory disease (Suberosis). *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 848.
88. Costa A, Andrade C, Silva A, Melo I. Ergometria na avaliação da capacidade de trabalho em trabalhadores da indústria da cortiça. *Boletim da SPPR Out 1992-Jan 1993*; 17: 19.
89. Schwaiblmair M, Beinert T, Vogelmeier C, Fruhmann G. Cardiopulmonary exercise testing following hay exposure challenge in farmer's lung. *Eur Respir J* 1997; 10: 2360-5.
90. Klech H, Hutter C. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European Society of Pneumology Task Force on BAL. *Eur Respir J* 1990; 3: 937-74.
91. Drent M, Wagenaar S, Van Velzen-Blad H, Mulder P, Hoogsteden H, Van den Bosch J. Relationship between plasma cell levels and profile of bronchoalveolar lavage fluid in patients with subacute extrinsic allergic alveolitis. *Thorax* 1993; 48: 835-9.
92. Haslam P, Dewar A, Butchers P, Primett Z, Newman-Taylor A, Turner-Warwick M. Mast cells, atypical lymphocytes and neutrophils in bronchoalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 1987; 35-47.
93. Fournier E, Tonnel A, Gosset P, Wallaert B, Ameisen J, Voisin C. Early neutrophil alveolitis after antigen inhalation in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1985; 88: 563-6.
94. Laviolette M, Cormier Y, Loiseau A, Soler P, Leblanc P, Hance A. Bronchoalveolar Mast Cells in Normal Farmers and Subjects With Farmer's lung. *Am Rev Resp Dis* 1991; 144: 855-60.
95. Bjerner L, Engstrom-Laurent A, Lundgren R, Rosenhall L, Hallgren R. Bronchoalveolar mastocytosis in farmer's lung is related to the disease activity. *Arch Intern Med* 1988; 148: 1362-5.
96. Delgado L, Cuesta C, Winck J, Sapage J, Moura e Sá J, Torrinhá J. La suberosis: implicación de los mastocitos broncoalveolares en la génesis de la afectación intersticial. *Arch Bronconeumol* 1999; 35: 71-8.
97. Laflamme G, Israel-Assayag E, Cormier Y. Apoptosis of bronchoalveolar lavage lymphocytes in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2003; 21: 225-31.
98. Costabel U, Bross J, Ruhle K, Lühr G, Matthys H. La-like antigens on T-cells and their subpopulations in pulmonary sarcoidosis and in hypersensitivity pneumonitis. Analysis of bronchoalveolar lavage and blood lymphocytes. *Am Rev Resp Dis* 1985; 131: 337-42.
99. Leatherman J, Michael A, Schwartz B, Hoildal J. Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis. *Ann Intern Med* 1984; 100: 390-2.
100. Burrell R, Rylander R. A critical review of the role of precipitins in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 1981; 62: 332-43.
101. Banham S, McSharry C, Lynch P, Boyd G. Relationship between avian exposure, humoral immune response and pigeon breeder's disease among scottish pigeon fanciers. *Thorax* 1986; 41: 274-8.
102. Cormier Y, Belanger J. The fluctuant nature of precipitating antibodies in dairy farmers. *Thorax* 1989; 44: 469-73.
103. Siersted H, Hansen N. Precipitating antibodies against pigeon bloom antigen as a specific and sensitive measure of pigeon exposure. *Allergy* 1990; 293-7.
104. Khan Z, Richardson M, Warnock. Rapid enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the detection of IgG antibodies against *Microspora faeni* and *Thermoactinomyces vulgaris*. *Clin Allergy* 1984; 14: 295-305.
105. Simpson C, Shirodaria P, Simpson D. Comparison of immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of abnormal antibodies in pigeon breeder's disease. *J Clin Pathol* 1992; 45: 490-3.
106. Kaukonen K, Savolainen J, Viander M, Kotimaa M, Terho E. IgG and IgA subclass antibodies against *Aspergillus umbrosus* in farmer's lung disease. *Clin Exp Allergy* 1993; 23: 851-6.
107. Delgado L, Winck J, Sapage J, Torres S, Moura e Sá J, Fleming Torrinhá J. 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. *Rev Port Imunolergol* 1996; 4: 11-22.

108. Trompelt J, Becker W-M, Schlaak M. Analysis of IgG subclass and IgE response in Allergic disease caused by *Aspergillus fumigatus* by immunoblotting techniques. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1994; 104: 390-8.
109. van Rens MTM, Vernooy-Jeras R, Merton-de Ridder M, van Velzen-Blad H, van den Bosch JMM. Detection of immunoglobulins G and A to *Aspergillus fumigatus* by immunoblot analysis for monitoring *Aspergillus*-induced lung diseases. *Eur Respir J* 1998; 11: 1274-280.
110. Gruber C, Buck D, Wahn U, Niggemann B. Is there a role for immunoblots in the diagnosis of latex allergy? Intermethod comparison of in vitro and in vivo IgE assays in spina bifida patients. *Allergy* 2000; 55: 476-83.
111. Kaukonen K, Pelliniemi IJ, Savoianen J, Terho EO. Identification of the reactive subunits of *Aspergillus umbrus* involved in the antigenic response in farmer's lung. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 689-96.
112. Mizobe T, Ando M, Yamasaki H, Onoue K, Misaki A. Purification and characterization of the serotype-specific polysaccharide antigen of *Trichosporon cutaneum* serotype II: a disease-related antigen of Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 265-72.
113. Lacasse Y, Fraser R, Fournier M, Cormier Y. Diagnostic accuracy of transbronchial biopsy in acute farmer's lung disease. *Chest* 1997; 112: 1459-65.
114. Fink J. The use of bronchoprovocation in the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1979; 64 (Pt 2): 590-1.
115. Richerson HB, Bernstein IL, Fink JN, Hunninghake GW, Novey HS, Reed CE, et al. Guidelines for the clinical evaluation of hypersensitivity pneumonitis. Report of the Subcommittee on Hypersensitivity Pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 839-44.
116. American-Thoracic-Society. Respiratory Health Hazards in agriculture. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: S1-S76.
117. Lacasse Y, Selman M, Costabel U. Prospective Validation of simple diagnostic criteria for Hypersensitivity Pneumonitis: preliminary results of an international multicenter cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; C93.
118. Patel AM, Ryu JH, Reed CE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 661-70.
119. Craig T, Hershey J, Engler R, Davis W, Carpenter G, Salata K. Bird antigen persistence in the home environment after removal of the bird. *Ann Allergy* 1992; 69: 510-12.
120. Nuutinen J, Terho E, Husman K, Kotimaa M, Harkonen R, Nousiainen H. Protective value of powered dust respirator helmets for farmers with farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 934-9.
121. Kokkarinen J, Tukianem H, Terho E. Effect of corticosteroid treatment on the recovery of pulmonary function in farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 3-5.
122. Ramirez A, Sansores R, Chapela. Inhaled beclometasone versus oral prednisone. A clinical trial in patients with hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: A605.
123. Miyajima M, Suga M, Nakagawa K, Ito K, Ando M. Effects of erythromycin on experimental extrinsic allergic alveolitis. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 253-61.
124. Allen D, Williams G, Woolcock A. Bird breeder's Hypersensitivity Pneumonitis: progress studies of lung function after cessation of exposure to the provoking antigen. *Am Rev Respir Dis* 1976; 114: 555-66.
125. Bourke S, Banham S, Carter R, Lynch P, Boyd G. Longitudinal Course of Extrinsic Allergic Alveolitis in Pigeon Breeders. *Thorax* 1989; 44: 415-8.
126. Cormier Y, Belanger J. Long-term physiologic outcome after acute farmer's lung. *Chest* 1985; 87: 796-800.
127. Monkare S, Haathela T. Farmer's lung: a 5 year follow-up of eighty-six patients. *Clin Allergy* 1985; 17: 143-51.
128. Kokkarinen J, Tukiainen H, Terho E. Mortality due to farmer's lung in Finland. *Chest* 1994; 106: 509-12.
129. Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R, Sanchez M, Carrillo G, Pérez R, et al. Mortality in mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those with usual interstitial Pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 49-53.
130. Kokkarinen J, Tukiainen H, Terho E. Recovery of pulmonary function in farmer's lung. Five-year follow-up study. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 793-6.
131. Erkinjuntii-Pekkanen R, Kokkarinen J, Tukianen H, Pekkanen J, Husman K, Terho E. Long-term outcome of pulmonary function in farmer's lung: a 14 year follow-up with matched controls. *Eur Respir J* 1997; 10: 2046-50.
132. Pascoal I, Sapage J, Winck J, Vanzeller M, Torres S, Delgado L. Evolução da Função Pulmonar na Suberose. Seguimento de 5 anos. *Rev Port Pneumol* 1996; 11: 55-8.
133. Anonymous. Global strategy for Asthma: management and prevention. NHBII Workshop, 2002.

134. Alves J. Epidemiologia e etiologia da asma. *Rev Port Pneumol* 1997; 3: 107-18.
135. Bernstein I, Chan-Yeung M, Malo JH, Bernstein D. Asthma in the workplace. In: *Asthma in the workplace*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1999. p. 1-4.
136. Chan-Yeung M, Malo JH. Aetiological agents in occupational asthma. *Eur Respir J* 1994; 7: 346-71.
137. Tarlo SM, Wai Y, Dolovich J, Summerbell R. Occupational asthma induced by *Chrysomya sitophila* in the logging industry. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 1409-13.
138. Seaton A, Wales D. Clinical reactions to *Aspergillus niger* in a biotechnology plant: an eight year follow up. *Occup Environ Med* 1994; 51: 54-6.
139. Mihalas L. An approach to the diagnosis of occupational asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999; 83: 577-82.
140. Beckett W. The epidemiology of occupational asthma. *Eur Respir J* 1994; 7: 161-4.
141. Meredith S, Nordman H. Occupational asthma: measures of frequency from four countries. *Thorax* 1996; 51: 435-40.
142. Kogevinas M, Anto JM, Sunyer J, Tobias A, Kromhout H, Burney P. Occupational asthma in Europe and other industrialised areas: a population-based study. European Community Respiratory Health Survey Study Group. *Lancet* 1999; 353: 1750-4.
143. Johnson AR, Dimich-Ward HD, Manfreda J, Becklake MR, Ernst P, Sears MR, et al. Occupational asthma in adults in six canadian communities. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2058-62.
144. Tarlo S, Leung K, Broder I, Silverman F, Holness D. Asthmatic subjects symptomatically worse at work. Prevalence and characterization among a general asthma clinic population. *Chest* 2000; 118: 1309-14.
145. Hendrick D. The world wide problem of occupational asthma. *Clin Exp Allergy* 2001; 31: 1-4.
146. Duarte J, Tabora J, Gomes M, Mendes B, Santos A, Leitão MC, et al. Patologia respiratória em trabalhadores de silos de cereais. *Boletim HPV* 1992; 4: 235-49.
147. Torres da Costa J, Barros H, Macedo J, Ribeiro H, Mayan O, Pinto A. Prevalência de doença respiratória na indústria têxtil. Relação com os níveis de empoeiramento. *Acta Med Port* 1998; 11: 301-9.
148. Bernstein D. Allergic Reactions to workplace allergens. *JAMA* 1997; 278: 1907-13.
149. Mapp C, Saetta M, Maestrelli P, Fabbri L. Occupational Asthma. *Eur Respir Mon* 1999; 11: 255-85.
150. Banks D, Tarlo S. Important issues in occupational asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6: 37-42.
151. Mapp C, Saetta M, Maestrelli P, Di Stefano A, Chitano P, Boschetto P, et al. Mechanisms and pathology of occupational asthma. *Eur Respir J* 1994; 7: 544-54.
152. Cartier A. Occupational asthma: what have we learned? *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: S90-5.
153. Chan-Yeung M. Assessment of Asthma in the Workplace. *Chest* 1995; 108: 1084-117.
154. Bernstein DI, Cartier A, Côté J, Malo JH, Boulet LP, Wanner M, et al. Diisocyanate antigen-stimulated monocyte chemoattractant protein-1 synthesis has greater test efficiency than specific antibodies for the identification of diisocyanate asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 445-60.
155. Statement AC. Assessment of asthma in the workplace. *Chest* 1995; 108: 1084-117.
156. Vandenplas O, Malo J. Inhalation challenges with agents causing occupational asthma. *Eur Respir J* 1997; 10: 2612-29.
157. Lemière C, Gautrin D, Trudeau C, Ghezze H, Desjardins A, Cartier A, et al. Fever and leucocytosis accompanying asthmatic reactions due to occupational agents: frequency and associated factors. *Eur Respir J* 1996; 9: 517-23.
158. Salvaggio JE. Inhaled particles and respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 94: 304-9.
159. Cote J, Chan H, Brochu G, Chan-Yeung M. Occupational asthma caused by exposure to neurospora in a plywood factory worker. *Br J Ind Med* 1991; 48: 279-82.
160. Alvim Ferraz MC. Transformação da cortiça. Prevenção da Suberose. *Rev Port Pneumol* 1996; 2: 77-90.
161. Remy-Jardin M, Remy J, Wallaert B, Muller NL. Subacute and chronic bird breeder hypersensitivity pneumonitis: sequential evaluation with CT and correlation with lung function tests and bronchoalveolar lavage. *Radiology* 1993; 189: 1111-8.
162. Leung AN, Miller RR, Muller NL. Parenchymal opacification in chronic infiltrative lung diseases: CT-pathologic correlation. *Radiology* 1993; 188: 209-14.
163. McSharry C, Anderson K, Boyd G. A review of antigen diversity causing lung disease among pigeon breeders. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 279-89.
164. de Beer PM, Bouic PJ, Joubert JR. Identification of disease-associated antigen in Pigeon breeder's disease by western blotting. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 91: 343-7.
165. Shen H-D, Lin W-L, Tam M-F, Wang S-R, S-S T, Huang M-H, et al. Characterization of allergens from *Penicillium oxalicum* and *P. Notatum* by immunoblotting and N-terminal amino acid sequence analysis. *Clin Exp Allergy* 1999; 29: 642-51.

166. Shen HD, Lin WL, Liaw SF, Tam MF, Han SH. Characterization of the 33-kilodalton major allergen of *Penicillium citrinum* by using MoAbs and N-terminal aminoacid sequencing. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 79-86.
167. Shen HD, Lin WL, Tsai JJ, Liaw SF, Han SH. Allergenic components in three different species of *Penicillium*: crossreactivity among major allergens. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 441-51.
168. Moscato G, Godnic-Cvar J, Maestrelli P, Malo J-L, Burge PS, Coifman R. Statement on self-monitoring of peak expiratory flows in the investigation of occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 2095-103.
169. Perrin B, Lagier F, L'Archeveque J, Cartier A, Boulet L-P, Cote J, et al. Occupational asthma: validity of monitoring of peak expiratory flow rates and non-allergic bronchial responsiveness as compared to specific inhalation challenge. *Eur Respir J* 1992; 5: 40-8.
170. Liss GM, Tarlo SM. Peak expiratory flow rates in possible occupational asthma. *Chest* 1991; 63-9.
171. Tarlo SM, Boulet L-P, Cartier A. Canadian Thoracic Society Guidelines for Occupational Asthma. *Can Respir J* 1998; 5: 298-300.
172. Warren CP, Holford-Strevens V, Sinha RN. Sensitization in a grain handler to the storage mite *Lepidoglyphus destructor* (Schrank). *Ann Allergy* 1983; 50: 30-3.
173. Frew AJ, Chan H, Lam S, Chan-Yeung M. Bronchial inflammation in occupational asthma due to western red cedar. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 340-4.
174. Lemiére C, Chaboilliez S, Trudeau C, Taha R, Maghni K, Martin JG, et al. Characterization of airway inflammation after repeated exposures to occupational agents. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 1163-70.
175. Bentley AM, Durham SR, Kay AB. Comparison of the immunopathology of extrinsic, intrinsic and occupational asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1994; 4: 222-32.
176. Boulet LP, Boutet M, Lavoilette M, Dugas M, Milot J, Leblanc C, et al. Airway inflammation after removal from the causal agent in occupational asthma due to high and low molecular weight agents. *Eur Respir J* 1994; 7: 1567-75.
177. Kraft M, Djukanovic R, Wilson S, Holgate ST, Martin R. Alveolar Tissue Inflammation in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1505-10.
178. Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, et al. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 44-51.
179. Lemiére C. Non-invasive assessment of airway inflammation in occupational lung diseases. *Curr Op Allergy Clin Immunol* 2002; 2: 109-14.
180. Licorish K, Novey HS, Kozak P. Role of *Alternaria* and *Penicillium* spores in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 819.
181. Lehrer SB, Hughes JM, Altman LC. Relevance of basidiomycete allergy in the USA and Europe and its relationship to allergic respiratory symptoms. *Allergy* 1994; 49: 460-5.
182. Pitt JJ, Hocking AD. Primary keys and miscellaneous fungi and *Penicillium* and related genera. In: *Fungi and Food spoilage*. London: Chapman R Hall; 1997.
183. Blainey AD, Topping MD, Ollier S, Davies RJ. Allergic respiratory disease in grain workers: the role of storage mites. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 296-303.
184. Alvarez MJ, Castillo R, Rey A. Occupational asthma in a grain worker due to *Lepidoglyphus destructor*, assessed by bronchial provocation test and induced sputum. *Allergy* 1999; 54: 884-9.
185. Fernández-Caldas E. Mite species of allergologic importance in Europe. *Allergy* 1997; 52: 383-7.
186. Luczynska CM, Griffin P, Davies RJ, Topping MD. Prevalence of specific IgE to storage mites (*A siro*, *L destructor* and *T longior*) in an urban population and crossreactivity with house dust mite (*D pteronyssinus*). *Clin Exp Allergy* 1990; 20: 403-6.
187. Frew A, Chang JH, Chan H, Quirce S, Noertjojo K, Keown P, et al. Lymphocyte responses to plicatic acid-human serum albumin conjugate in occupational asthma caused by western red cedar. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101.
188. Bentley AM, Maestrelli P, Saetta M, Fabbri LM, Robinson DS, Bradley BL, et al. Activated lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89.
189. Malo J-L, Cartier A, Desjardins A, Weyer RV, Vandenplas O. Occupational asthma caused by oak wood dust. *Chest* 1995; 108: 856-8.
190. Quirce S, Hinojosa M, Marañón F, Ferrer A, Fernández-Caldas E, Sastre J. Identification of obeche wood (*Triplochiton scleroxylon*) allergens associated with occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 400-1.
191. Higuero NC, Zabala BB, Villamuza YG, Gómez CM, Moral de Gregorio A, Sanchez CS. Occupational asthma caused by IgE-mediated reactivity to *Antiaris* wood dust. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 2276.

192. Rocha SM, Goodfellow BJ, Delgadillo I, Neto CP, Gil AM. Enzymatic isolation and structural characterization of polymeric suberin of cork from *Quercus suber* L. *Int J Biol Macromol* 2001; 28: 107-19.
193. Eriksson KA, Sternberg NL, Levin JO. Terpene exposure and respiratory effects among sawmills workers. *Scand J Work Environ Health* 1996; 22: 182-90.
194. Rocha S, Delgadillo I, Ferrer Correia AJ. GC-MS study of volatiles of normal and microbiologically attacked cork from *Quercus suber* L. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 865-71.
195. Fabbri LM, Ciaccia A, Maestrelli P, Saeita M, Mapp CE. Pathophysiology. In: Bernstein IL, Chan-Yeung M, Malo JL, Bernstein DL, editors. *Asthma in the Workplace*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1999. p. 61-92.
196. Delgado L, Winck J, Sapage J, Torres S, Moura e Sa J, Fleming Torrinha JA. Antibodies to *Penicillium frequentans* in cork worker's respiratory disease (Suberosis). Application of the ImmunoCAP IgG RAST in sera and bronchoalveolar lavage (BALF) measurements. In: Basomba A, Hernandez M, de Rojas F, eds. *XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology*. Madrid, 1995: 209-14.
197. Hinojosa M. Stipatosis or hypersensitivity pneumonitis caused by esparto (*Stipa tenacissima*) fibers. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2001; 11: 67-72.
198. Karr R, Kohler P, Salvaggio J. Hypersensitivity Pneumonitis and extrinsic asthma. An unusual association. *Chest* 1978; 74: 98-102.
199. Mapp CE, Dal Vecchio L, Boschetto P, Fabbri LM. Combined asthma and alveolitis due to diphenylmethane diisocyanate (MDI) with demonstration of no crossed respiratory reactivity to toluene diisocyanate (TDI). *Ann Allergy* 1985; 54: 424-9.
200. Halpin DM, Graneek BJ, Turner-Warwick M, Newman Taylor AJ. Extrinsic allergic alveolitis and asthma in a sawmill worker: case report and review of the literature. *Occup Environ Med* 1994; 51: 160-4.
201. Hirakata Y, Katoh T, Ishii Y, Kitamura S, Sugiyama Y. *Trichosporon asahii*-induced asthma in a family with Japanese summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 335-8.
202. Camarena A, Juarez A, Mejia M, Estrada A, Carrillo G, Falfan R, et al. Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1528-33.
203. Hisauchi-Kojima K, Sumi Y, Miyashita Y, Miyake S, Toyoda H, Kurup VP, et al. Purification of the antigenic components of pigeon dropping extract, the responsible agent for cellular immunity in pigeon breeder's disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:1158-65.