



## Valor da pesquisa de IgE específica aos alérgenos recombinantes rAsp f 1, 2, 3, 4 e 6 do *Aspergillus fumigatus* no diagnóstico da aspergilose broncopulmonar alérgica

### Value of determination of the specific IgE against recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens rAsp f 1, 2, 3, 4 e 6 in diagnosis of the allergic bronchopulmonary aspergillosis

Edilamara R. de Oliveira<sup>1</sup>, Pedro Giavina-Bianchi<sup>2</sup>,  
Jaime G. Doutreleau<sup>3</sup>, Alfeu T. França<sup>4</sup>, Jorge Kalil<sup>5</sup>

#### Resumo

**Objetivo:** A aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), doença de difícil diagnóstico, é prevalente em 6% a 28% dos asmáticos sensibilizados ao *Aspergillus fumigatus*. A inexistência de alérgenos padronizados dificulta a pesquisa de IgE específica para este fungo, um importante critério diagnóstico. O uso de alérgenos recombinantes vem sendo proposto para superar este problema. Os objetivos deste estudo são: 1 - Estabelecer o diagnóstico sorológico precoce de ABPA em um grupo de pacientes sensibilizados ao *A. fumigatus*; 2- Avaliar as diferenças clínicas, laboratoriais e radiográficas entre os pacientes asmáticos com ABPA e os pacientes asmáticos somente sensibilizados; 3- Avaliar se os testes sorológicos para pesquisa de IgE específica aos alérgenos recombinantes rAsp f 1, 2, 3, 4 e 6 do *A. fumigatus* poderiam auxiliar na detecção de sensibilização a este fungo e no diagnóstico de ABPA.

**Métodos:** O diagnóstico de aspergilose broncopulmonar alérgica foi investigado e a presença de IgE sérica para rAsp f 1, 2, 3, 4 e 6 foi pesquisada em 65 pacientes asmáticos com reatividade cutânea imediata para *Aspergillus fumigatus*. Para o diagnóstico da doença, foram utilizados critérios sorológicos clássicos associados à presença de bronquiectasias centrais.

**Resultados:** Dos 65 pacientes, 19 apresentaram IgE sérica para o mínimo de um recombinante. A doença foi diagnosticada em seis pacientes, sendo que um deles apresentou IgE sérica para todos os alérgenos testados, e outro, somente para f 3.

**Conclusões:** Na casuística estudada, a pesquisa de IgE sérica para os alérgenos rAsp f 1, 2, 3, 4 e 6 não auxiliou no diagnóstico de aspergilose broncopulmonar alérgica, nem na detecção de sensibilização ao fungo.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(2):99-104 aspergilose broncopulmonar, *Aspergillus fumigatus*, fungos.

#### Abstract

**Objective:** The diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) is difficult. The prevalence of this disease range from 6% to 28% among asthmatics sensitized to *Aspergillus fumigatus*. Standardized allergens are not available and making difficult the determination of specific IgE to fungus, an important diagnosis criteria. The use of recombinant allergens has been proposed to overcome this problem. The aim of this study is to verify if serum IgE against allergens rAsp f 1, 2, 3, 4 e 6 is helpful to the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis and to detect sensitization to this fungus.

**Methods:** The diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis was searched and the serum IgE against rAsp f 1, 2, 3, 4, 6 were determined in sixty-five asthmatics with immediate cutaneous reactivity to *Aspergillus fumigatus*. The diagnosis of ABPA was suspected by classical serological criteria.

**Results:** Nineteen of sixty-five patients had IgE against at least one recombinant. The disease was diagnosed in six patients and one had IgE against to all allergens tested and another had only to f 3.

**Conclusions:** The determination of specific IgE antibodies against allergens rAsp f 1, 2, 3, 4 e 6 in this group wasn't helpful to made diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis, neither to detect sensitization to fungus.

Rev. bras. alerg. imunopatol. 2005; 28(2):99-104 Bronchopulmonary aspergillosis, *Aspergillus fumigatus*, molds

1. Mestre em Medicina pela FMUSP, Médica Colaboradora da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP.
2. Doutor em Medicina pela FMUSP, Médico Supervisor do Ambulatório do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do HC da FMUSP.
3. Médico Especialista em Imunologia Clínica e Alergia pela FMUSP.
4. Professor Titular da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Medicina da UFRJ.
5. Professor Titular da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP, Coordenador do Instituto de Investigação em Imunologia.

Artigo submetido em 12.12.2004, aceito em 14.06.2005

#### Introdução

A aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) é uma doença complexa, que resulta de uma reação de hipersensibilidade aos alérgenos do fungo *Aspergillus fumigatus*, o qual de uma forma oportunista pode colonizar o pulmão de pacientes que sofrem de asma<sup>1</sup>. Na sua evolução clínica há períodos de remissão e de exacerbação, podendo ocorrer o aparecimento de bronquiectasias centrais e progressão para estágio terminal com a presença de fibrose pulmonar<sup>2</sup>. A doença pode ser dividida em duas categorias: ABPA-CB, quando as bronquiectasias estão presentes, e ABPA-S (sorológica), quando não são observadas bronquiectasias na

tomografia de alta resolução, mas os outros critérios sorológicos estão presentes. A ABPA-S é a fase inicial da doença, quando ainda não ocorreram danos detectáveis na parede brônquica ou parênquima pulmonar<sup>3</sup>. No Brasil, um estudo realizado no Rio de Janeiro, em 1997, encontrou uma prevalência de ABPA de 20% entre pacientes asmáticos sensibilizados ao fungo<sup>4</sup>. Não existem muitos dados no país sobre a doença, pelo desconhecimento desta e porque quando a hipótese diagnóstica é feita, dificilmente chega a ser confirmada.

O diagnóstico que avalia aspectos clínicos, laboratoriais, radiográficos e imunológicos deve ser buscado, pois o reconhecimento e tratamento precoces da ABPA podem prevenir a progressão da doença para fibrose pulmonar. Os critérios clínicos mais utilizados são os propostos por Rosenberg e col.<sup>5</sup>, os quais foram modificados por Greenberger e Patterson<sup>6</sup>. Estes são: 1- quadro clínico de asma; 2- bronquiectasias centrais; 3- IgE sérica total elevada ( $\geq 1000$  ng/ml); 4- reatividade cutânea imediata ao extrato alergênico do *A. fumigatus*; 5- anticorpos IgE e IgG séricos específicos para antígenos do *A. fumigatus*, elevados; 6- eosinofilia sanguínea ( $\geq 1000/\text{mm}^3$ ); 7- anticorpos precipitantes para *A. fumigatus*; 8- história de infiltrados pulmonares transitórios ou fixos ao RX de tórax. Além de apenas os critérios 2 e 5 terem uma especificidade maior para a ABPA, é muito difícil que todos os critérios estejam presentes ao mesmo tempo, pois na evolução natural da doença há flutuações nos níveis de anticorpos, na presença de eosinofilia e de infiltrados pulmonares, assim como durante o tratamento com droga antiinflamatória. Por vezes, anos de acompanhamento são necessários para a confirmação diagnóstica, que ocorre quando já existem lesões pulmonares irreversíveis.

Outra dificuldade é a obtenção de um extrato de *A. fumigatus*, purificado, padronizado e em quantidades satisfatórias, para que sejam realizados exames imunológicos confiáveis e reprodutíveis. Este fator associado à necessidade do preenchimento de uma série de critérios, fazem com que a ABPA seja uma doença de diagnóstico difícil e complexo, muitas vezes somente feito em sua fase tardia<sup>7</sup>. Para superar as dificuldades, que vão do conhecimento à produção de alérgenos do *A. fumigatus*, e visando uma simplificação e uniformização no diagnóstico da ABPA, um grande interesse tem sido direcionado para os alérgenos recombinantes. Estes alérgenos são produzidos utilizando-se técnicas de biologia molecular e o rastreamento das de bibliotecas de DNA complementar formadas sobre a superfície do fago filamentoso M13, que expressa o produto gênico sobre a sua superfície, é o método mais recente utilizado para a clonagem<sup>8</sup>.

Dentre os alérgenos recombinantes o Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4 e Asp f 6 vêm sendo testados em pacientes, avaliando-se tanto a resposta cutânea, como os níveis séricos de IgE específica. Alguns trabalhos têm demonstrado que dependendo de quais anticorpos contra estes alérgenos estiverem presentes, pode-se distinguir os pacientes com ABPA dos asmáticos apenas sensibilizados ao *A. fumigatus*<sup>9-11</sup>. Os alérgenos recombinantes do *A. fumigatus* pertencem a duas categorias funcionais: proteínas secretadas e proteínas citoplasmáticas, sendo que os alérgenos como Asp f 1, f 3 e f 5 pertenceriam a primeira categoria, e o Asp f 6, e possivelmente f 4 e f 2, a segunda. Assim, proteínas citoplasmáticas são improváveis de serem encontradas na forma livre como aeroalérgenos, explicando, em parte, a falta de IgE específica para estes alérgenos em pacientes asmáticos e sensibilizados ao *A. fumigatus*. Já, em contraste, nos pacientes com ABPA, em alguma fase da doença, ocorre o crescimento do fungo no pulmão e sua interação com o mecanismo de defesa celular local leva à exposição de suas proteínas citoplasmáticas, que irão induzir uma resposta imune específica<sup>12</sup>.

Portanto, existe a proposta de uma nova ferramenta diagnóstica, ou seja, a utilização de um painel de alérgenos recombinantes para detectar apenas sensibilização ao fungo (rAsp f 1, 3 e 5) ou o diagnóstico de ABPA (rAsp f 2, 4 e 6). Baseada em experimentos conduzidos nos EUA e Suíça, esta proposta necessita de uma avaliação mais ampla para sua aceitação universal. Até o momento, não há relatos de pesquisa da resposta IgE específica a estes alérgenos recombinantes no Brasil.

Os objetivos deste estudo são: 1- Estabelecer o diagnóstico sorológico precoce de ABPA em um grupo de pacientes sensibilizados ao *A. fumigatus*; 2- Avaliar as diferenças clínicas, laboratoriais e radiográficas entre os pacientes asmáticos com ABPA e os pacientes asmáticos somente sensibilizados; 3- Avaliar se os testes sorológicos para pesquisa de IgE específica aos alérgenos recombinantes rAsp f 1, 2, 3, 4 e 6 do *A. fumigatus* poderiam auxiliar na detecção de sensibilização a este fungo e no diagnóstico de ABPA.

## Casuística, material e métodos

Foi realizado um estudo observacional, prospectivo, de corte transversal em ambulatórios de asma, onde 65 pacientes com diagnóstico prévio de asma, e com teste cutâneo de leitura imediata para *Aspergillus fumigatus* positivo foram incluídos no trabalho. Os dados foram coletados entre março de 2001 e outubro de 2002.

O teste percutâneo de leitura imediata foi realizado pelo método de punção, utilizando-se extratos antigênicos dos aeroalérgenos mais comuns, extrato do *A. fumigatus* a 5% (Alk-Abellö<sup>®</sup>), dicloridrato de histamina a 1mg/ml como controle positivo e solução salina 0,9% como negativo. O resultado foi considerado positivo se a pápula formada tivesse diâmetro transversal maior ou igual a 3 mm e se não houvesse reação no local do controle negativo<sup>13</sup>. Nos pacientes que não apresentaram positividade no teste percutâneo, o teste intradérmico foi realizado utilizando-se o extrato antigênico do *A. fumigatus* a 1% (Alk-Abellö<sup>®</sup>) e dicloridrato de histamina a 0,01 mg/ml como controle positivo. O teste foi considerado positivo quando atingiu 2+ da escala de NORMAN (1983)<sup>14</sup>, que mede o eritema e pápula através do cálculo da média do maior diâmetro com o diâmetro ortogonal ao seu ponto médio. A escala de 2+ equivale a um eritema de 21-30mm e pápula de 5-10mm.

## Anamnese Clínica

Primeiramente os pacientes foram submetidos a uma anamnese clínica criteriosa. O diagnóstico de asma foi confirmado e a doença foi classificada em uma de suas categorias (intermitente, ou persistente leve, moderada ou grave) segundo os critérios do GINA 1997<sup>15</sup>. Os dados clínicos de relevância para o estudo foram: uso e dose de corticosteróide sistêmico e inalatório, frequência e intensidade dos sintomas de asma nos últimos doze meses. Foi considerado contínuo, o uso de corticosteróide v.o. por mais de dois meses consecutivos. Para a classificação não foram apenas considerados os dados clínicos ou funcionais, mas também a dose do corticosteróide inalatório usado.

## Exames Laboratoriais

Na mesma data da anamnese clínica era colhida amostra de sangue para contagem de eosinófilos, dosagem sérica de IgE e estudos sorológicos. A presença de um número igual ou maior a 350 células/mm<sup>3</sup> foi considerada eosinofilia<sup>16</sup>. A IgE total foi pesquisada através do método imuno-fluoroenzimático UniCAP<sup>®</sup> automatizado no aparelho UniCAP 100 (Pharmacia- diagnostics) e os resultados foram calculados em ng/ml (110 kU/l correspondem a 264 ng/ml). Além dos testes sanguíneos, os pacientes realizaram exame protoparasitológico de fezes, prova de função pul-

monar e estudos radiográficos (RX de tórax e tomografia computadorizada de alta resolução). As provas de função pulmonar (PPF) foram analisadas segundo os consensos nacionais e internacionais<sup>17,18</sup>.

### Exames Sorológicos

#### Pesquisa de Precipitinas para *Aspergillus fumigatus*

A pesquisa de precipitinas foi realizada utilizando-se o método de difusão em gel<sup>19</sup>. Foram utilizados três antígenos do *A. fumigatus*, sendo dois do laboratório Greer (USA) e um do laboratório de métodos especiais do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. Dissolveu-se 1 g de agarose (Sigma®, tipo I-A) em 1mg de citrato de sódio, aquecendo-se a 60 a 80°C. A agarose ainda quente foi colocada em lâminas de vidro, formando uma camada de 2,5 mm de espessura. Após resfriamento a 4°C, foram feitas cavidades no gel, de 7 e de 3 mm, para acomodar o soro e os antígenos, respectivamente, mantendo-se uma distância de 7 mm entre elas. Colocou-se 75 µl de soro e 25 µl de antígeno em suas respectivas cavidades. As lâminas foram conservadas em câmara úmida a temperatura ambiente por 72 horas. A leitura foi considerada positiva quando surgiram linhas de precipitação entre os orifícios. Anteriormente a sua utilização, os soros foram concentrados três vezes através da técnica de liofilização<sup>20</sup>.

#### Avaliação da IgE sérica específica para *Aspergillus fumigatus* (IgEm3) e da IgE sérica específica para alérgenos recombinantes do *Aspergillus fumigatus*-Asp f 1 (IgERm218), f 2 (IgERm219), f 3 (IgERm220), f 4 (IgERm221) e f 6 (IgERm222).

As IgE específicas foram pesquisadas através do método imunofluoroenzimático UniCAP® automatizado no aparelho UniCAP 100 (Pharmacia- diagnostics). Nesta técnica, o alérgeno de interesse (natural ou recombinante), acoplado covalentemente ao ImmunoCAP, reage com a IgE específica da amostra de soro do paciente. Após a lavagem das IgE não específicas, adicionam-se anticorpos contra a IgE marcados enzimaticamente, para a formação de complexos. Após incubação, a enzima anti-IgE não ligada é lavada, procedendo-se à incubação do complexo ligado com o substrato. Após a interrupção da reação, mede-se a fluorescência do eluído. Os resultados são dados em kUA/l, que são unidades específicas UniCAP®, onde o A representa os anticorpos alérgenos específicos. Para determinados intervalos de níveis há uma denominação correspondente em classes (0-VI).

#### Avaliação da IgG específica para *Aspergillus fumigatus* (IgGm3)

As IgG específicas foram pesquisadas através do método imunofluoroenzimático UniCAP® automatizado no aparelho UniCAP 100 (Pharmacia- diagnostics). A técnica é semelhante a descrita para a dosagem de IgE específica. Os resultados são dados em mgA/l, onde o A representa os anticorpos antígenos específicos, sendo que para uma diluição da amostra a 1:100 a amplitude de doseamento é de 2 a 200 mgA/l.

#### Diagnóstico de ABPA

De acordo com os critérios essenciais para o diagnóstico de ABPA propostos na literatura<sup>16,21</sup>, os seguintes achados foram valorizados no grupo de pacientes: 1- precipitinas positivas; 2- IgE total superior ou igual a 1000 ng/ml; 3- IgEm3 superior ou igual a classe 2; 4- IgGm3 superior a 70mgA/l; 5- bronquiectasias centrais. A presença de eosinofilia ao leucograma e infiltrado pulmonar aos exames

radiográficos não foram considerados critérios essenciais, mas se presentes reforçaram o diagnóstico.

Foram considerados os seguintes diagnósticos: 1. Diagnóstico sorológico de certeza: Presença dos quatro primeiros critérios; 2. Diagnóstico sorológico e radiológico de certeza: Presença do segundo e quinto critérios acompanhados de, no mínimo, um dos outros três critérios; 3. Diagnóstico excluído: Ausência dos cinco critérios; 4. Diagnóstico possível: Presença de algum dos cinco critérios.

#### Análise Estatística

Para comparar as diferenças entre os pacientes com diagnóstico confirmado e os pacientes com o diagnóstico excluído de ABPA, foi utilizado o teste bicaudal de Fisher. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

### Resultados

#### Características Gerais

A amostra estudada foi formada por 65 pacientes com diagnóstico de asma e sensibilizados ao *A. fumigatus* ao teste cutâneo de leitura imediata. Destes, 40 (61,53%) eram mulheres e 25 (38,46%) homens. A idade variou entre 12 e 81 anos (média 44,7 anos, desvio padrão 15,83). A maioria pertencia à raça caucasiana (50/65), e os demais à raça negra ou parda (14/65) e à amarela (1/65). Todos eram procedentes do estado de São Paulo, e exerciam atividades urbanas.

Quanto às características clínicas relevantes no grupo foi visto que 47 (72%) tiveram a asma classificada como grave persistente, 15 (23%) como moderada persistente, 1 (2%) como leve persistente e 2 (3%) como intermitente. Oito (12%) não faziam uso de corticosteróides, 43 (66%) faziam uso apenas na forma inalatória e 14 (22%) nas formas v.o. contínua e inalatória, concomitantemente.

#### Sensibilização ao *A. fumigatus*

Dos 65 pacientes que apresentaram reatividade ao teste cutâneo de leitura imediata, 38 (58%) foram positivos ao teste percutâneo e os 27 (42%) restantes que tiveram este teste negativo apresentaram positividade ao intradérmico. Do total, 26 (40%) apresentaram IgE sérica específica ao *A. fumigatus* (IgEm3) detectável com níveis variados do anticorpo.

#### Diagnóstico de ABPA

Entre os pacientes estudados, 17 (26,15%) não apresentaram qualquer dos critérios, sendo a ABPA excluída nestes casos. A presença de cada critério essencial, analisado individualmente, é apresentado na tabela 1. Após a soma, 26 pacientes apresentaram apenas um dos critérios, 15 apresentaram dois critérios e um paciente apresentou três, sendo que nestes 42 casos (64,6%) o diagnóstico de ABPA continuou sendo suspeito.

**Tabela 1-** Presença dos critérios essenciais de ABPA entre os pacientes sensibilizados

Exames	Pacientes estudados	
	n	%
Precipitinas	8	12
IgE sérica total ≥ 1 000ng/ml	43	66
IgEm3* ≥ classe 2	16	25
IgGm3§ ≥ 70mgA/l	2	3
Bronquiectasias centrais	11	17

\* IgE sérica específica para *A. fumigatus* ≥ 0,7 kUA/l;

§ IgG sérica específica para *A. fumigatus*

Nenhum paciente preencheu os critérios para o diagnóstico sorológico (ABPA-S). O diagnóstico foi confirmado em seis pacientes que apresentavam bronquiectasias centrais e critérios essenciais mínimos (tabela 2). Sendo as-

sim, 9,2% dos pacientes sensibilizados apresentaram ABPA.

Na tabela 3 estão os principais achados clínicos, funcionais e laboratoriais do subgrupo dos pacientes com diagnóstico confirmado de ABPA.

**Tabela 2** – Pacientes que preencheram os critérios mínimos para o diagnóstico de ABPA

Paciente	IgE Sérica total (ng/ml)	IgEm3* (kUA/l)	IgGm3 <sup>§</sup> (mgA/l)	Pp	BqC
Caso 1	6 400 (+)	43,2 (+)	96,3 (+)	+	+
Caso 2	1 061 (+)	0,61 (-)	25,6 (-)	+	+
Caso 3	2 820 (+)	2,81 (+)	13 (-)	-	+
Caso 4	1 380 (+)	0 (-)	8,42 (-)	+	+
Caso 5	1 608 (+)	1,36 (+)	9,05 (-)	+	+
Caso 6	2 520 (+)	1,25 (+)	14,8 (-)	-	+

(+) Presença do critério; (-) Ausência do critério; Pp: precipitinas; BqC: Bronquiectasias centrais

\* IgE sérica específica para *A. fumigatus* (UniCAP®- Pharmacia)

§ IgG sérica específica para *A. fumigatus* (UniCAP®- Pharmacia)

**Tabela 3** – Principais achados clínicos, funcionais e laboratoriais nos pacientes com diagnóstico confirmado de ABPA

Pacientes	Gravidade da asma	Corticost v.o.*	Eos/mm <sup>3</sup> <sup>¶</sup>	PPF	DV <sup>§</sup>	VEF1
Caso 1	grave	(-)	200	(-)	DVM	33%
Caso 2	grave	Prednisona (20mg/dia)	200	(-)	DVOsr	35%
Caso 3	grave	(-)	700	(-)	DVOcr	59%
Caso 4	grave	(-)	1000	(-)	DVOcr	76%
Caso 5	grave	(-)	200	(-)	DVOcr	49%
Caso 6	grave	(-)	300	<i>S. mansoni</i>	DVOsr	30%

\* corticóide via oral; (-) ausência; <sup>¶</sup> n° de eosinófilos no sangue periférico

<sup>§</sup> distúrbio ventilatório, tipo: DVM - distúrbio ventilatório misto; DVOcr - distúrbio ventilatório obstrutivo com reversibilidade; DVOsr - distúrbio ventilatório obstrutivo sem reversibilidade

### Comparação entre os grupos de pacientes com diagnóstico de ABPA e os asmáticos sensibilizados ao *A. fumigatus*

Quando comparados dados clínicos, entre os pacientes com e sem ABPA, como idade, distribuição por gênero, faixa etária do início da asma, sintomas de doenças atópicas associadas, gravidade da asma, uso de corticosteróide v.o. e afastamento do trabalho, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dados destes subgrupos. A maioria dos pacientes de ambos os subgrupos apresentava asma grave persistente e sintomas de rinite.

Quanto aos testes cutâneos leitura imediata para *A. fumigatus*, os pacientes com diagnóstico confirmado de ABPA tiveram tendência de maior positividade ao teste percutâneo, enquanto que o grupo com diagnóstico excluído, ao teste intradérmico. A positividade para outros aeroalérgenos comuns foi muito semelhante entre os subgrupos, com predominância para os dos ácaros, que ficou acima de 80% em ambos.

O grau de eosinofilia em sangue periférico foi dividido em ausente (n° de eosinófilos menor que 350 céls/mm<sup>3</sup>), moderado (entre 350 e 999) e elevado (maior ou igual a 1000). A maior parte dos pacientes, 66% do subgrupo com diagnóstico confirmado de ABPA e 53% dos com diagnóstico excluído, não apresentaram eosinofilia, sendo que a distribuição também foi semelhante entre os outros dois níveis.

Não houve casos de distúrbio restritivo, e o único caso de distúrbio misto encontrava-se no subgrupo dos pacientes com o diagnóstico de ABPA confirmado. Em 66% dos pacientes com ABPA, predominou o grau de obstrução grave, enquanto que em 69% do subgrupo dos sem ABPA, houve o predomínio do leve e moderado, mas a diferença não foi significativa.

### Comparação dos achados radiográficos

Na leitura da tomografia computadorizada de tórax de alta resolução (TCAR), o achado mais comum nas grandes vias aéreas, em ambos os subgrupos, foi o espessamento da parede brônquica, que estava presente em 100% dos pacientes com o diagnóstico confirmado de ABPA e em 72% dos pacientes com o diagnóstico excluído. Todos os pacientes com ABPA apresentavam bronquiectasias centrais. Dos 17 pacientes sem ABPA, apenas um paciente apresentava tomografia sem alterações. O único caso de presença de sinais de fibrose estava no subgrupo de ABPA. Os achados nas pequenas vias aéreas revelaram que dilatação bronquiolar estava presente somente nos pacientes com o diagnóstico de ABPA. A presença de nódulos centro-lobulares foi vista em 60% dos pacientes com ABPA e em apenas 12% dos pacientes sensibilizados, mas a diferença não foi significativa. Observou-se que, no subgrupo dos pacientes com diagnóstico confirmado de ABPA, as bronquiectasias centrais não foram vistas no RX de tórax de três (50%)

pacientes. Das alterações valorizadas ao RX, hiperinsuflação pulmonar e espessamento de paredes brônquicas foram comuns a ambos os grupos. Nódulos e opacificações irregulares foram observados somente nos pacientes com ABPA.

### **Avaliação da resposta IgE sérica específica aos alérgenos recombinantes rAsp f 1, 2, 3, 4 e 6 do *A. fumigatus***

Dezenove pacientes (29%) apresentaram IgE específica detectável para, no mínimo, um dos alérgenos recombinantes. Analisadas de forma individual, a IgERm219 (IgE para rAsp f 2) e IgERm220 (IgE para rAsp f 3) foram as mais frequentemente encontradas, em alguns casos de forma isolada. Desta forma, pôde-se avaliar a sensibilização do grupo a estes alérgenos avaliando-se apenas a presença destas duas IgE. A maioria dos pacientes que apresentaram níveis detectáveis destas IgE específicas para os alérgenos recombinantes, também apresentou para os antígenos naturais do *A. fumigatus* (IgEm3).

Quando foi analisado o grupo de pacientes com diagnóstico de ABPA observou-se que dos seis pacientes, apenas dois apresentaram IgE sérica específica para os alérgenos recombinantes. Um dos pacientes apresentou estas imunoglobulinas, em níveis variados (classe I a IV), para os cinco alérgenos pesquisados, enquanto o outro apresentou apenas para o rAsp f 3 (classe I). No grupo dos 17 pacientes, nos quais a ABPA foi excluída, não foi detectada IgE sérica específica para nenhum dos alérgenos recombinantes.

### **Discussão**

As dificuldades para diagnosticar a ABPA, que como sempre são destacadas na literatura, foram sentidas a cada etapa deste trabalho. Ao analisar-se a sensibilização dos pacientes percebeu-se que houve um grau de discrepância entre os testes cutâneos e a presença de IgE sérica específica para o *A. fumigatus* (IgEm3), visto que dos 65 pacientes com teste percutâneo ou intradérmico positivo, apenas 26 (40%) também apresentaram IgEm3, sendo o restante 60% discordante. Esta discrepância também é relatada na literatura<sup>4</sup>. Baixos títulos de IgE circulante para componentes alergênicos, que estão presentes em baixas concentrações no extrato alergênico utilizado, pode ser uma das explicações para a discrepância encontrada, entretanto, no presente trabalho, outros fatores devem ser lembrados como a utilização de extratos de fontes diferentes para uso nos testes *in vitro* e *in vivo* e o uso de extratos de fungos, os quais ainda não possuem padronização.

O diagnóstico de ABPA foi afastado em 17 (26%), e estabelecido em seis (9,2%) dos 65 pacientes sensibilizados ao *A. fumigatus*. Estudos de prevalência desta doença entre pacientes asmáticos sensibilizados mostram resultados variados de 6% a 28%<sup>4,16,22</sup>, o que pode ser creditado ao fato de não haver um exame individual para estabelecer o diagnóstico da ABPA. Não houve diferenças clínicas, laboratoriais e radiográficas estatisticamente significativas entre os pacientes com o diagnóstico confirmado de ABPA e os pacientes com o diagnóstico excluído, provavelmente devido ao pequeno N do subgrupo de pacientes com diagnóstico confirmado. A asma foi grave em todos os pacientes com a doença e em 76% dos pacientes sem a doença. Ao analisar-se o grau de obstrução, 66% dos pacientes com ABPA apresentaram obstrução grave, enquanto 69% dos pacientes sem ABPA apresentaram obstrução leve ou moderada.

É conhecida a vantagem do diagnóstico precoce e do tratamento adequado na evolução do paciente, evitando a instalação de lesões pulmonares irreversíveis<sup>23</sup>. Os fatos de não ter sido feito qualquer diagnóstico sorológico no pre-

sente estudo e de ter sido grande o número de pacientes que continuaram com suspeita da doença, refletem as dificuldades para se estabelecer o diagnóstico de ABPA.

Quando se analisou a presença de cada critério diagnóstico essencial na amostra (tabela 2) percebeu-se que a maioria, 43 (63%) pacientes, apresentavam IgE sérica total acima de 1 000 ng/ml. A elevação exagerada da IgE sérica aumenta a possibilidade de ABPA em um paciente asmático.

A positividade para a pesquisa de precipitinas nos pacientes com ABPA varia de 57,1% a 100%, conforme o trabalho analisado<sup>5,16,24</sup>. As precipitinas não são específicas para ABPA, estando presentes em aproximadamente 10% dos pacientes com asma e sem ABPA<sup>1</sup>. A técnica de imunodifusão em gel mostrou maior positividade, se comparada com a pesquisa de IgGm3, talvez porque um maior número de extratos tenha sido testado e porque possa estar refletindo a concentração dos soros após a liofilização (tabelas 1 e 2). Os únicos dois pacientes que apresentaram IgGm3 igual ou maior que 70 mgA/l também apresentaram precipitinas, sendo que um deles pertence ao subgrupo com ABPA.

Observou-se que a maioria dos pacientes com ABPA teve ausência de eosinofilia. Em relação à eosinofilia e aos exames sorológicos, estes podem estar negativos em fases de remissão da doença e durante o uso de corticosteróides. No presente estudo, foi possível fazer diagnóstico em um paciente dos 14 que estavam presentes na amostra e que usavam corticosteróide inalatório e v.o. contínuo. A maioria, nove pacientes (64,3%), ficou no grupo da suspeita diagnóstica.

Analisando-se a presença de bronquiectasias centrais, através da tomografia computadorizada de tórax de alta resolução, como um dos critérios diagnósticos essenciais, viu-se que estava presente em onze (17%) pacientes da amostra, sendo que em seis deles estabeleceu-se o diagnóstico de ABPA. Somente quatro exames de RX de tórax, de pacientes com alterações mais extensas, evidenciaram a presença de bronquiectasias. Há uma comprovação dos dados da literatura, uma vez que o RX de tórax não é considerado sensível ou específico para detecção de bronquiectasias numa fase mais precoce<sup>16,22</sup>. Deste modo, em pacientes com asma grave, clínica e funcional, e teste cutâneo positivo ao *A. fumigatus*, além da determinação sérica de IgE e IgG específicas e IgE total, está justificada a TCAR.

Concluída a análise das dificuldades diagnósticas encontradas, resta a análise da IgE sérica específica aos alérgenos recombinantes (IgEmR) rAsp f 1, 2, 3, 4 e 6 do *A. fumigatus*. Quando se analisou cada IgEmR, individualmente, no grupo dos 65 pacientes, a IgER219 (rAsp f 2) e IgER220 (rAsp f 3), foram detectadas em maior número de pacientes que as outras, sendo as porcentagens de 8% e 26%, respectivamente. Não há estudos comparando a positividade ao teste cutâneo, realizado com extrato de fonte natural do *A. fumigatus*, com os níveis de IgE sérica específica aos alérgenos recombinantes deste fungo. Ao repetir-se a análise individual da presença de cada IgER, porém no grupo dos 26 pacientes que além do teste cutâneo, também tiveram nível de IgEm3 detectável, a positividade aumentou. A IgER219 (rAsp f 2) estava presente em 19% dos pacientes e a IgER220 (rAsp f 3) em 54%, mantendo a maior positividade, enquanto a IgER218 (rAsp f 1) foi detectável em apenas 12%. A IgER219 e a IgER220 foram as únicas que apareceram de forma isolada. Como nenhum paciente dos 17 do subgrupo no qual o diagnóstico de ABPA foi afastado, apresentaram IgER detectável, foi difícil estabelecer um paralelo. Os níveis de IgE sérica específica para os alérgenos recombinantes ficaram abaixo do descrito na literatura, sendo que o rAsp f 1 não se comportou como um alérgeno principal<sup>12</sup>.

Analisando-se a presença de IgER no subgrupo dos pacientes com ABPA (tabela 4), apenas um paciente apresentou níveis detectáveis de IgER218 (rAsp f 1), 219 (rAsp f

2), 220 (rAsp f 3), 221 (rAsp f 4) e 223 (rAsp f 6), enquanto outro paciente apresentou somente IgER220 (rAsp f 3).

**Tabela 4** - IgE sérica específica para os alérgenos recombinantes do *A. fumigatus* nos pacientes com ABPA

Pacientes	IgERm* 218 rAsp f 1	IgERm 219 rAsp f 2	IgERm 220 rAsp f 3	IgERm 221 rAsp f 4	IgERm 222 rAsp f 6
<b>Caso 1</b>	D (11,1) <sup>§</sup>	D (22,9)	D (15,1)	D (0,42)	D (7,73)
<b>Caso 2</b>	I	I	D (0,53)	I	I
<b>Caso 3</b>	I	I	I	I	I
<b>Caso 4</b>	I	I	I	I	I
<b>Caso 5</b>	I	I	I	I	I
<b>Caso 6</b>	I	I	I	I	I

\* IgE sérica específica ao alérgeno recombinante

( )<sup>§</sup> nível sérico da IgE específica expresso em kUA/l (UniCAP®- Pharmacia)

D: Detectável; I: Indetectável

No presente trabalho, a pesquisa de IgE específica para os alérgenos recombinantes, que segundo CRAMERI e seus colaboradores, seria uma nova ferramenta, tanto para detecção de sensibilização como para o diagnóstico de ABPA, não se mostrou melhor que os testes que utilizam antígenos naturais do *A. fumigatus*. Observou-se que a pesquisa de IgE sérica específica aos alérgenos recombinantes rAsp f 2, 4 e 6 não se mostrou eficaz no diagnóstico na maioria dos pacientes em que a ABPA foi diagnosticada pelos critérios tradicionais. A falta de padronização dos alérgenos utilizados nos testes, dificultando a reprodutibilidade dos mesmos, não foi superada pelos alérgenos recombinantes em nosso estudo. Padronizar um extrato do *A. fumigatus* que facilite a detecção de sensibilização e melhore o diagnóstico da ABPA, tornando-o uniforme em todos os centros médicos, ainda continua um desafio.

## Referências

- Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. In: Patterson R, Grammer CL, Greenberger PA, editors. Allergic Diseases. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 1997; 555-77.
- Patterson R, Greenberger PA, Randin RC, Roberts M. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Staging as an Aid to Management. Ann Intern Med 1982; 96:286-91.
- Greenberger PA, Patterson R. Diagnosis and management of allergic bronchopulmonary aspergillosis. Ann Allergy 1986; 56:444-48.
- Serpa SF. Aspergilose broncopulmonar alérgica: prevalência e critérios diagnósticos em pacientes asmáticos sensíveis ao *Aspergillus fumigatus*. [Dissertação de mestrado] Rio de Janeiro; 1997.
- Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper JB, Roberts M, Harris KE. Clinical and Immunologic Criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. Ann Intern Med 1977; 86:405-14.
- Greenberger PA, Patterson R. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. J Lab Clin Med 1982; 99:288-93.
- Kurup VP, Kumar. Immunodiagnosis of aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1991; 4:439-56.
- Cramer R. Molecular cloning of *Aspergillus fumigatus* allergens and their role in allergic bronchopulmonary aspergillosis. Chem Immunol 2002; 81:73-93.
- Moser M, Cramer R, Brust E, Suter M, Menz G. Clinical aspects of allergic disease: Diagnostic value of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/A for skin testing and serology. J Allergy Clin Immunol 1993; 93:1-11.
- Banerjee B, Kurup VP, Phadnis S, Greenberger PA, Fink JN. Molecular cloning and expression of a recombinant *Aspergillus fumigatus* protein Asp f II with significant immunoglobulin E reactivity in allergic bronchopulmonary aspergillosis. J Lab Clin Med 1996; 127:253-62.
- Hemmann S, Menz G, Ismail C, Blaser K, Cramer R. Skin test reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in A fumigatus-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization. J Allergy Clin Immunol 1999; 104:601-07.
- Cramer R. Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: From the nucleotide sequences to clinical applications. Int Arch Allergy Immunol 1998; 115:99-114.
- Dreborg S, editor. Skin tests used in type I allergy testing. Position paper. Allergy 1989; 44 (10):22-30.
- Norman PS. In vivo methods of study of allergy: Skin and mucosal tests, techniques, and interpretation. In: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, editors. Allergy: principles and practice. 2<sup>nd</sup> ed. St Louis, Toronto: Mosby; 1983. Vol II. p.295-302.
- National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. "Workshop Report": Global strategy for asthma management and prevention. Maryland, USA; 1997.
- Schwartz JH, Greenberger PA. The prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma, determined by serologic and radiologic criteria in patients at risk. J Lab Clin Med 1991; 117:138-142.
- American Thoracic Society. Lung function testing: Selection of reference values and interpretative strategies. Am Rev Respir Dis 1991; 144:1202-18.
- Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. I Consenso brasileiro sobre Espirometria. J Pneumol 1996; 22:137-144.
- Longbottom JL, Pepys J. Pulmonary aspergillosis: diagnostic and immunological significance of antigens and C-substance in *Aspergillus fumigatus*. J Pathol Bact 1964; 88:141-51.
- McCarthy DS, Pepys J. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Clin Allergy 1971; 21:261-286.
- Varkey B. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Clinical perspectives. Immunol Allergy Clin North Am 1998; 18:479-501.
- Eaton T, Garrett J, Milne D, Frankel A, Wells AU. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in the asthma clinic: A prospective evaluation of CT in the diagnostic algorithm. Chest 2000; 118:66-72.
- Patterson R, Greenberger PA, Lee TM, Liotta JL, O'neill EA, Roberts M, Sommers H. Prolonged evaluation of patients with corticosteroid-dependent asthma stage of allergic bronchopulmonary aspergillosis. J Allergy Clin Immunol 1987; 80:663-68.
- Henderson AH, English MP, Vecht RJ. Pulmonary aspergillosis: A survey of its occurrence in patients with chronic lung disease and a discussion of the significance of diagnostic tests. Thorax 1968; 23:513-18.

Fonte financiadora: FAPESP

Correspondência:

Edilamara de Oliveira  
Rua Topázio, nº 50 1, ap 53  
04105-061 - São Paulo - SP  
Fone: 0XX-11-3275.4585  
e-mail: edilamara@uol.com.br