



Avaliação da resposta IgE para o entendimento do papel de fungos do ar na alergia respiratória em crianças

Evaluation of IgE responses for a better understanding of the role of airborne fungi in respiratory allergy in children

Geusa Felipa de Barros Bezerra, PhD¹; Marcos Antonio Custódio Neto da Silva²; Ramon Moura dos Santos, MD¹; Denise Maria Costa Haidar, MD, MSc³; Walbert Edson Muniz Filho, MSc¹; Ivone Garros Rosa, PhD¹; Graça Maria de Castro Viana, MD, PhD¹; Luís Conrado Zaror, PhD⁴; Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, MD, PhD^{1,5}

RESUMO

Objetivos: Este estudo realizou-se na cidade de São Luís, Maranhão, com a finalidade de investigar possível relação entre alergia respiratória e elevação sérica de IgE total e IgE específica para fungos isolados de ambientes externos. **Métodos:** Fizeram parte deste estudo 98 crianças com diagnóstico clínico de asma e/ou rinite alérgica, com idades entre 4 e 12 anos, sendo 65 (66,3 %) do sexo masculino e 33 (33,7 %) do sexo feminino. Quantificaram-se no soro dessas crianças os níveis de IgE total e IgE específica para *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, pelo método de ELISA. **Resultados:** IgE total foi detectada em 95 crianças (96,9%); 73 (74,5%) apresentaram níveis detectáveis de IgE anti-*Aspergillus* spp e 85 (86,7 %) de IgE anti-*Penicillium* spp. Não houve significância estatística quando foram correlacionados níveis de IgE total, sexo e área de residência das crianças estudadas ($p = 0,88$). Na correlação entre IgE total e faixa etária verificou-se distribuição não normal dos dados, com destaque à faixa etária de 11 anos, onde os níveis de IgE total foram mais elevados (Teste de Shapiro $p < 0,05$). Não houve correlação entre IgE anti-*Aspergillus* e IgE anti-*Penicillium* com idade, sexo e área de residência. **Conclusão:** Anticorpos IgE contra os fungos estudados possivelmente fazem parte de uma polissensibilização, já que os fungos estão presentes em todas as áreas e durante todo o ano na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. Serão necessários mais estudos para o entendimento da alergia respiratória por fungos do ar em São Luís, Maranhão.

Descritores: Fungos, alergia, imunoglobulina E, meio ambiente.

ABSTRACT

Objectives: The present study was carried out in the city of São Luís, capital of the state of Maranhão, northeastern Brazil, with the aim of investigating a possible relationship between respiratory allergies and high serum levels of total IgE and specific IgE for fungi isolated in outdoor environments. **Methods:** The study included 98 children with a clinical diagnosis of asthma and/or allergic rhinitis, aged 4 to 12 years. Sixty-five (66.3%) were male and 33 (33.7%) female. Total IgE, *Aspergillus* spp-specific IgE, and *Penicillium* spp-specific IgE were quantified in the serum of the children using the ELISA method. **Results:** Total IgE was detected in 95 children (96.9%). Seventy-three (74.5%) showed detectable levels of *Aspergillus* spp-specific IgE, and 85 (86.7%), of *Penicillium* spp-specific IgE. There was no significant correlation between total IgE levels, sex, and area of residence among the children assessed ($p = 0.88$). When assessing the correlation between total IgE levels and age, data were found to have a non-normal distribution, especially in the 11-year old age group, where total IgE levels were higher than in the other ages (Shapiro test, $p < 0.05$). There was no significant correlation of *Aspergillus* spp- and *Penicillium* spp-specific IgE with age, gender, and area of residence. **Conclusion:** IgE antibodies against the fungi investigated are possibly a part of polysensitization, as these fungi are present in all areas and throughout the year in the city investigated. Further studies are necessary for a better understanding of the role played by fungal sensitization in respiratory allergy in São Luís, Maranhão.

Keywords: Fungi, allergy, immunoglobulin E, environment.

¹ Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brasil.

² Estudante de Medicina, UFMA, São Luís, MA, Brasil.

³ Hospital Universitário Materno-Infantil, São Luís, MA, Brasil.

⁴ Escuela de Tecnología Médica, Universidad Mayor de Temuco, Chile.

⁵ Bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA).

Correspondência para:

Geusa Felipa de Barros Bezerra

E-mail:

marcos_antonio456@hotmail.com

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Submetido em: 30/04/2014,
aceito em: 16/05/2015.

INTRODUÇÃO

Os fungos têm sido cada vez mais reconhecidos como importantes patógenos em sinusites e doenças das vias aéreas. Eles interagem com células epiteliais aumentando a produção de citocinas e expressão de *Toll-like receptors* (TLR) mRNA¹. A exposição a certos fungos pode causar doença humana com efeitos adversos para a saúde, através de três mecanismos específicos: a geração de uma resposta imune prejudicial, por exemplo, alergia ou pneumonite de hipersensibilidade; infecção direta pelo organismo; e efeitos tóxicos irritantes a partir de subprodutos do fungo. Para cada um destes mecanismos fisiopatológicos definidos, há doenças humanas relacionadas aos fungos documentadas de forma consistente, que se apresentam com evidência de doença clínica objetiva².

Considerando-se a existência de grande quantidade de fungos alergênicos e a elevada prevalência de alergia, existem poucos estudos determinando a relevância clínica da exposição a alérgenos de fungos³. A estrutura molecular dos alérgenos também desempenha um papel importante na resposta imunológica em pacientes alérgicos. Antígenos podem ter maior ou menor ligação com IgE, e estes podem ter papéis importantes como reagentes específicos ou como imunomoduladores⁴.

As doenças alérgicas representam uma grande ameaça à saúde dos seres humanos. A asma alérgica é uma doença respiratória induzida pela exposição a agentes ambientais que provocam a inflamação alérgica e obstrução transitória das vias aéreas inferiores, e que produz os sintomas característicos de tosse, chiado e dispneia. Antes do advento de modelos experimentais, a asma foi entendida como sendo causada, principalmente, pela degranulação de mastócitos e eosinófilos, desencadeada pela ligação de antígenos a imunoglobulina E (IgE). Estudos subsequentes em camundongos mostraram que células T têm papel central em causar obstrução das vias aéreas antígeno-dependente e inflamação alérgica através da secreção das interleucinas IL-4 e IL-13⁵.

A função da IgE na imunidade não está totalmente esclarecida. A associação de anticorpos com doenças alérgicas foi confirmada pela caracterização da imunoglobulina E (IgE). É comum encontrar IgE elevada também em parasitoses intestinais e cutâneas, imunodeficiências congênicas ou adquiridas, infecções virais e neoplasias⁶. A detecção de anticorpos específicos para fungos tem importância na avaliação da doença alérgica IgE mediada e micose broncopulmonar alérgica. Entretanto, os níveis de anticorpos para fungos não podem ser usados como marcador imunológico para definir dose, tempo e/ou local de exposição à inalação do antígeno fúngico em contexto não infeccioso².

O crescente interesse por micro-organismos alergênicos e a procura de novos indicadores ambientais vêm despertando interesse no estudo de fungos anemófilos no Brasil⁷. O presente estudo teve como objetivos extrair antígenos de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp isolados de ambiente externo da cidade de São Luis, Maranhão; detectar níveis de IgE total e IgE específica contra *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp no soro de crianças diagnosticadas clinicamente com asma e/ou rinite alérgica; correlacionar os níveis de IgE total com IgE específica para entendimento dos processos alérgicos respiratórios causados por fungos em crianças atópicas.

MÉTODOS

Área de pesquisa

A Ilha de São Luís, capital do Estado do Maranhão, Brasil, está localizada no centro do litoral maranhense, com latitude 2°20'00"LS a 2°45'00"LS, longitude 44°01'21" LnW a 44°24'54" LnW. Situa-se ao Norte do Estado, onde se limita com o Oceano Atlântico; ao Sul com o Estreito dos Mosquitos, que a separa do continente; a Leste com a Baía de São José, e a Oeste com a Baía de São Marcos⁸.

CASUÍSTICA

Para calcular o tamanho da amostra foi utilizado o programa Statcalc do *software* estatístico Epi-Info 3.4.2 (2007). Foram estudadas 98 crianças de ambos os sexos e faixa etária entre 4 e 12 anos, com diagnóstico clínico de alergia respiratória (asma e/ou rinite alérgica), acompanhadas periodicamente no Ambulatório de Alergia da Unidade Materno Infantil da Universidade Federal do Maranhão-UFMA. As crianças estudadas não realizaram testes cutâneos de hipersensibilidade imediata.

Os pacientes do grupo controle eram de ambos os sexos, da mesma faixa etária e os pais foram questionados sobre história de asma e/ou alergia respiratória na família e nas crianças, cuja resposta foi negativa.

Após adesão dos seus pais ou responsáveis ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram coletados 10 mL de sangue total por punção venosa.

Isolamento e identificação de fungos do ar

A coleta de fungos anemófilos foi realizada em cinco áreas: norte, sul, leste, oeste e centro da cidade de São Luís, Maranhão, Brasil, mensalmente de janeiro a dezembro de 2007, por exposição de placa contendo ágar Sabouraud e coleta espontânea dos esporos^{7,9}.

Preparo de alérgenos fúngicos

Colônias de *Aspergillus* e *Penicillium* foram transportadas para tubo contendo pérolas de vidro previamente esterilizados¹⁰, onde uma parte da massa fúngica e três partes de PBS foi agitada em vortex por cinco minutos, alternando em banho de gelo a cada minuto. A seguir centrifugou-se (Eppendorf 5402, USA) a 20.000 g por 45 minutos a 4 °C. Utilizou-se o sobrenadante depois de previamente quantificada proteína (BIO-200 BIOPLUS)¹¹⁻¹⁴.

Ensaio imunoenzimático - ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

IgE total foi detectada por método de ELISA, segundo as instruções do fabricante (Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda., Belo Horizonte-MG, Brasil). As densidades ópticas foram determinadas por espectrometria a 405 nm. Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE) conforme descrito por Alves et al.¹³ Valores de IE acima de 0,301 (IE ≥ 0,301) foram considerados positivos para IgE total, de acordo com dados da literatura e com a média dos valores obtidos no grupo estudado¹¹⁻¹⁴.

Níveis de IgE específica

Pools das espécies isoladas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram transformados em extrato bruto¹³, e serviram de antígenos sensibilizantes para as placas de ELISA. Placas de fundo plano (Costar®) foram sensibilizadas com 100 µL de uma solução de antígeno fúngico na concentração de 50 µg/mL e incubadas *overnight* em geladeira. As placas foram lavadas a seguir por três vezes com tampão PBS Tween 20, pH 7,2, seguida de 2 lavagens com PBS 1x; 100 µL de uma solução bloqueadora - PBS + soro fetal bovino a 10% (eBiosciences, USA) foi adicionada em todos os poços e incubada em estufa a 37 °C por uma hora. Decorrido o prazo, procedeu-se ao mesmo critério de lavagem, adicionando, a seguir, 100 µL da amostra em duplicata, na diluição 1:2 em PBS 1x. Foi realizada incubação a 37 °C por uma hora; lavagem e adição de 100 µL do anticorpo secundário (anti-IgE humana com peroxidase - SIGMA) na diluição 1:1000, por 1 hora a 37 °C. Foi realizada lavagem e adição de 100 µL do substrato TMB-3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (eBiosciences, USA) incubado por 15 minutos em câmara escura. A seguir, colocou-se 100 µL/poço da solução de parada H2SO4 2N. A leitura foi realizada em leitor automático de ELISA, com filtro de 450 nm (Biosystems, USA). Soros de 20 indivíduos sem história clínica de alergia respiratória serviram de controle negativo para os testes de ELISA, sendo dosados os níveis de IgE total, IgE anti-*Aspergillus* e IgE anti-*Penicillium*.

As densidades ópticas foram determinadas por espectrometria a 405 nm. Os índices de anticorpos foram expressos em Índice ELISA (IE)¹³ calculados pela expressão:

$$IE = \frac{DOI}{DO_{controle} + 3.8}$$

DOI = média da densidade óptica da amostra teste; DO_{controle} = média da densidade óptica de três amostras de soros de indivíduos com ausência de IgE específica (IE < 0,603 para IgE anti-*Aspergillus* spp, e IE < 0,466 para IgE anti-*Penicillium* spp) para os antígenos fúngicos de *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp; δ = desvio padrão das densidades ópticas das amostras de soros de indivíduos do grupo não alérgico.

Valores de IE acima de 0,603 (IE ≥ 0,603) foram considerados positivos para IgE anti-*Aspergillus* spp, e acima de 0,466 (IE ≥ 0,466) para IgE anti-*Penicillium* spp.

Aspecto ético

O protocolo do estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da UFMA sob nº 406/06.

RESULTADOS

Foram estudadas 98 crianças com idades entre 4 e 12 anos, de ambos os sexos, com sinais e sintomas de alergia respiratória (asma e/ou rinite alérgica), acompanhadas periodicamente no ambulatório de Alergia da Unidade Materno-Infantil, do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Das crianças estudadas, 65 (66,3%) eram do sexo masculino, e 33 (33,7%) do sexo feminino.

A pesquisa de IgE total revelou que 95 (96,9%) crianças apresentaram nível igual ou superior a IE 0,301, sendo 63 (64,3%) do sexo masculino e 32 (32,7%) do sexo feminino. A correlação entre níveis de IgE total e a área de residência das crianças estudadas (norte, sul, leste, oeste e centro) não apresentou significância estatística (p = 0,88). Analisou-se a correlação entre IgE total e a faixa etária das crianças e verificou-se uma distribuição não normal dos dados, com destaque à faixa etária de 11 anos, onde os níveis de IgE total foram mais elevados (Figura 1).

Níveis de IgE específica contra *Aspergillus* spp foram detectados em 73 (74,5%) crianças deste estudo, sendo 49 (67,1 %) do sexo masculino e 24 (32,9%) do

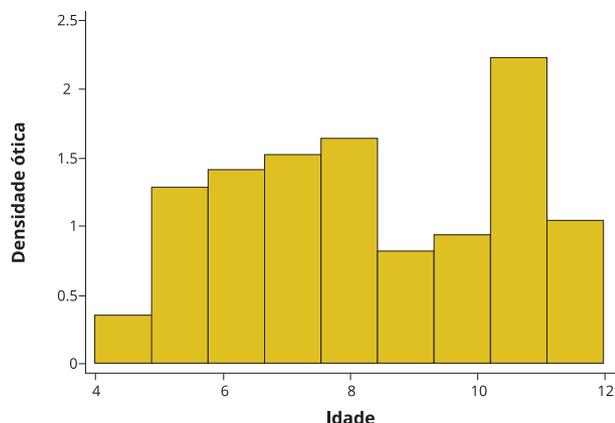


Figura 1 - Correlação entre faixa etária das crianças estudadas e a concentração de IgE total (densidade ótica), em São Luís, MA, Brasil, 2007
Teste de Shapiro ($p < 0,05$)

sexo feminino. A correlação entre níveis de IgE anti-*Aspergillus* e sexo não apresentou significância estatística ($p = 0,86$). Quanto à área de residência (norte, sul, leste, oeste e centro) correlacionada aos níveis de IgE anti-*Aspergillus*, não houve significância estatística ($p = 0,90$). A correlação entre níveis de IgE total e IgE anti-*Aspergillus* não mostrou significância estatística ($p = 0,19$; teste de Spearman), conforme Figura 2.

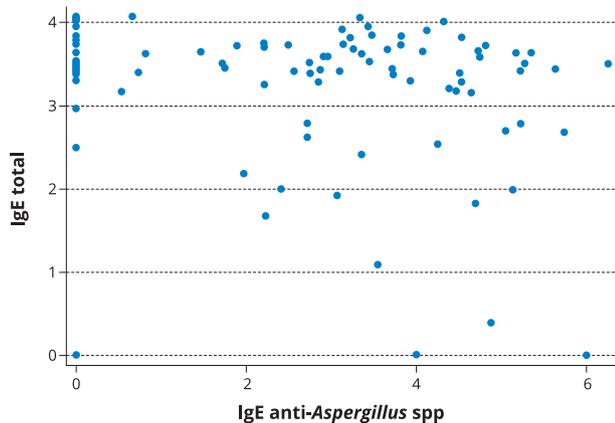


Figura 2 - Correlação entre concentração (densidade ótica) de IgE total e IgE anti-*Aspergillus* no soro de crianças em São Luís, MA, Brasil, 2007
Correlação de Spearman ($p = 0,19$)

Níveis de IgE anti-*Penicillium* foram detectados em 85 (86,7%) crianças deste estudo, sendo 55 (64,7%) do sexo masculino e 30 (35,3%) do sexo feminino. Investigou-se a correlação entre níveis de IgE anti-*Penicillium* e sexo e não houve significância estatística

($p = 0,39$), assim como a correlação entre níveis de IgE anti-*Penicillium* e procedência ($p = 0,13$). Investigou-se, também, a correlação entre níveis de IgE total e IgE anti-*Penicillium*. Evidenciou-se pela correlação de Spearman ($p = 0,15$) que nas crianças estudadas não houve significância estatística entre níveis de IgE total e níveis de IgE específica contra *Penicillium* (Figura 3).

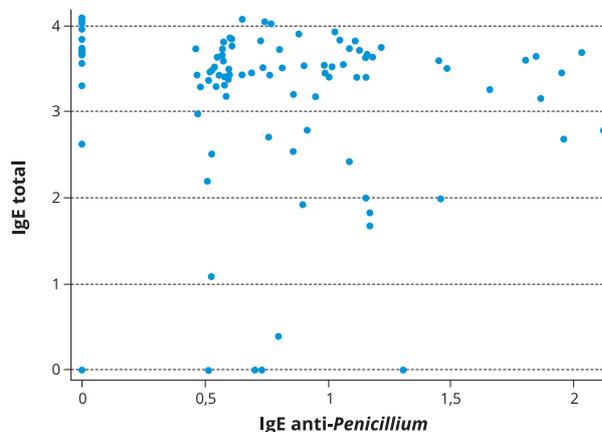


Figura 3 - Níveis de IgE total e IgE anti-*Penicillium*, em crianças atópicas de São Luís, MA, Brasil, 2007
Correlação de Spearman ($p = 0,15$)

DISCUSSÃO

O nível de IgE total no soro varia com a idade e tende a variar em consequência do contato com antígenos, fato comum também às outras classes de imunoglobulinas. Segundo Spalding et al.⁶, o nível de IgE é maior para os indivíduos do sexo masculino em qualquer faixa etária considerada. Nossos resultados corroboram estes autores, pois 64,3% foram do sexo masculino e 32,7% do sexo feminino. Em contrapartida, Baigergerova et al.¹⁴, no Canadá, notificaram que visitas a pronto-socorro por asma predominaram em mulheres (62,2%), e que mulheres apresentaram maior chance de ter internação hospitalar por asma que homens, com *odds ratio* de 1,64, 95% intervalo de confiança de 1,41 a 1,90.

Não se encontrou correlação entre a procedência dos indivíduos (norte, sul, centro, leste e oeste) e a positividade para IgE total ($p=0,781$). García Caballero et al.¹⁵, estudando 35 pacientes com alergia respiratória, com idades entre 3 e 16 anos, encontraram, pelo método de ELISA, IgE total elevada em 77,2%. No presente trabalho, detectou-se IgE total em 96,9%.

A quantificação dos níveis séricos de IgE específica é o mais importante método *in vitro* para o diagnóstico de hipersensibilidade mediada por IgE, contudo menos sensível que os testes cutâneos. O achado de IgE específica contra determinado antígeno indica sensibilização a este, porém, nem sempre significa doença¹⁰.

Os pacientes atópicos (aqueles com asma alérgica, rinite alérgica e dermatite atópica) geralmente têm anticorpos IgE contra fungos como parte da polissensibilização. Reações alérgicas a antígenos de fungos inalados são fatores reconhecidos na doença das vias aéreas inferiores, como a asma, mas os estudos atualmente disponíveis não provam que a exposição aos fungos transportados pelo ar em ambientes externos desempenhe um papel na rinite alérgica².

Os pacientes com suspeita de alergia a fungos devem ser avaliados por meio de testes cutâneos de hipersensibilidade imediata ou método para detecção de anticorpos IgE no sangue contra antígenos fúngicos adequados, como parte da avaliação clínica de potenciais alergias¹⁶.

No presente estudo, detectou-se presença de IgE específica contra *Aspergillus spp* em 73 (74,5%) crianças. Segundo Coop et al.¹⁷, o gênero *Aspergillus* pode invadir e se disseminar nos pulmões de asmáticos que estão recebendo altas doses de corticosteroides. Antígenos de *Aspergillus* têm sido estudados exaustivamente; seus esporos têm sido reconhecidos dentre os primeiros aeroalérgenos importantes nas doenças respiratórias bem como em diversas outras doenças³.

Knutsen et al.¹⁸ fizeram dosagens seriadas de reatividade IgE para antígenos purificados de *Aspergillus*, principalmente Asp f 3, e demonstraram que o aumento na reatividade IgE pode propiciar uma melhor distinção entre as fases de exacerbação e remissão das alergias respiratórias, em comparação com a reatividade IgE a extrato bruto de *Aspergillus*.

A avaliação quanto à área de residência (norte, sul, leste, oeste e centro) e níveis de IgE detectados contra *Aspergillus* não mostrou correlação significativa ($p = 0,90$). Considerando que o gênero *Aspergillus* foi o mais frequente nesta pesquisa e esteve presente em todas as áreas da cidade, provavelmente, os esporos deste fungo são sensibilizantes naturais das crianças deste estudo.

Dias e Gupta-Bhattacharya¹⁹, na Índia, encontraram reatividade de 10,8 a 54,8% ao teste cutâneo em indivíduos com história clínica de alergia respiratória, quando utilizaram extrato de *Aspergillus*. Hemmann e al.²⁰ em seus estudos com alérgeno recombinante de *Aspergillus fumigatus* Asp f 3 demonstraram similaridade deste alérgeno com outras duas proteínas de *Candida boidinii*. Estas proteínas foram produzidas como proteínas recombinantes em *Escherichia coli*. De

forma interessante, a ligação de IgE a Asp f 3 pode ser inibida com ambas as proteínas homólogas de *Candida*, sugerindo que esses alérgenos podem ser epítomos comuns ligantes para IgE.

No presente trabalho, não houve correlação significativa entre IgE total e IgE anti-*Aspergillus*, pelo teste de Sperman ($p = 0,19$). Ter níveis elevados de IgE total não depende, necessariamente, de anticorpos específicos contra *Aspergillus spp*.

O gênero *Penicillium* foi o segundo fungo mais isolado no ambiente externo dos pacientes estudados. 85 (86,7%) crianças apresentaram sensibilização a este fungo, sendo 55 (64,7%) do sexo masculino e 30 (35,3%) do feminino. Para Burge et al.²¹, este gênero fúngico pode ocorrer em ambientes externos, embora sua maior importância esteja relacionada a ambientes internos. Asma dos tipos imediata e retardada pode ser induzida em indivíduos sensibilizados com esporos de *Penicillium spp*²².

Em extrato de *Penicillium notatum* foram detectadas onze proteínas de 20 a 90 kDa que funcionam como epítomos ligantes para IgE. As mais importantes proteínas alergênicas foram de 68 e 64 kDa, que reagiram respectivamente com 56% e 46% das amostras de soro de 39 indivíduos²³.

Quanto aos níveis de IgE anti-*Penicillium*, não houve correlação significativa com a área de residência das crianças estudadas ($p=0,13$), embora este gênero tenha sido o segundo mais isolado em todos os ambientes livres da cidade. Este achado pode sugerir que a sensibilização por *Penicillium* não dependa da área onde as crianças moram.

Para Hemmann et al.²⁰, aproximadamente 10% da população possui anticorpos IgE para fungos inalantes e cerca de metade desses indivíduos está prevista para, em algum momento, ter sintomas alérgicos como consequência da exposição a alérgenos fúngicos. A aeromicrobiologia, nos últimos anos, tem mostrado a existência de numerosos esporos de fungos anemófilos classificados como bioaerossóis, e sua concentração varia dependendo das condições ambientais²⁴.

Os níveis de IgE total, por não apresentarem correlação significativa com os níveis de IgE anti-*Aspergillus spp* e anti-*Penicillium spp* detectados nas crianças estudadas, podem estar relacionados à polissensibilização a estes fungos, uma vez que estes estiveram presentes em todas as áreas e durante todo o ano na cidade de São Luís, Maranhão, Brasil. Essa polissensibilização tem impacto importante em relação aos sintomas de asma e/ou rinite alérgica, podendo desencadear exacerbação dos sintomas. São necessários mais estudos para o entendimento da alergia respiratória por fungos do ar nas crianças estudadas.

REFERÊNCIAS

1. Shin SH, Lee YH. Airborne fungi induce nasal polyp epithelial cell activation and toll-like receptor expression. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153(1):46-52.
2. Bush RK, Faaai MD, Portnoy JM, Saxon, AMD, Terr AI, Wood RA. Environmental and occupational respiratory disorders. Position paper. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(2):326-33.
3. Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal allergens. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8(2):161-79.
4. Kurup VP. Aspergillus antigens: which are important? *Med Mycol*. 2005;43(S189-/S196):189-96.
5. Corry DB, Kheradmand F. Toward a comprehensive understanding of allergic lung disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2009;120:33-48.
6. Spalding SM, Wald V, Bernd LAG. IgE sérica total em atópicos e não atópicos na cidade de Porto Alegre. *Rev Ass Med Brasil*. 2000;46:93-7.
7. Bernardi E, Nascimento JS. Airborne fungi at Laranjal beach, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. *Arq Inst Biol*. 2005;72(1):93-7.
8. Rios L. Estudos de geografia do Maranhão. 1a. ed. São Luís: Graphis, 2001. 106 p.
9. Menezes EA, Trindade ECR, Costa MM, Freire CCF, Cavalcante MS, Cunha FA. Airborne fungi isolated from Fortaleza city, State of Ceará, Brazil. *Rev Inst Med Trop*. 2004;46(3):133-7.
10. Onishi Y, Kuroda M, Yasueda H, Saito A, Sono-Koyama E, Tunasawa S, et al. Two-dimensional electrophoresis of Malassezia allergens for atopic dermatitis and isolation of Mal f 4 homologs with mitochondrial malate dehydrogenase. *Eur J Biochem*. 1999;261(1):148-54.
11. Kato H, Sugita T, Ishibashi Y, Nishikawa A. Detection and quantification of specific IgE antibodies against eight Malassezia Species in sera of patients with atopic dermatitis by using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol Immunol*. 2006;50(11):851-6.
12. Kato H, Sugita T, Ishibashi Y, Nishikawa A. Evaluation of the levels of specific IgE against Cryptococcus diffluens and Cryptococcus liquefaciens in patients with atopic dermatitis. *Microbiol Immunol*. 2007;51(10):945-50.
13. Alves R, Silva DAO, Fernandes JF, Almeida KC, Ynoue LH, Bernardes CT, et al. Humoral and cellular immune responses to Blomia tropicalis and concanavalin A-binding fractions in atopic patients. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41:773-81.
14. Baibergerova A, Thabane L, Akhtar-Danesh N, Levine M, Gafni A, Leeb K. Sex differences in hospital admissions from emergency departments in asthmatic adults: a population-based study. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006; 96(5):636-7.
15. García Caballero R, Nader O, Morfin Maciel B. Correlation between positive skin test to molds, total IgE and specific using ELISA and mold cultures from the environment of pediatric allergy patient. *Rev Allerg Mex*. 2001;48(5):137-40.
16. Godinho R, Lanza M, Godinho A, Rodrigues A, Assiz TML. Frequency of positive skin tests for airborne allergic agents. *Braz J Otorrinol*. 2003;69(6):824-8.
17. Coop C, England RW, Quinn JM. Allergic bronchopulmonary aspergillosis masquerading as invasive pulmonary aspergillosis. *Allergy Asthma Proc*. 2004;25(4):263-6.
18. Knutsen APPS, Hutcheson AP, Slavin RG, Kurup VP. IgE antibody to Aspergillus fumigatus recombinant allergens in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*. 2004, 59(2):198-203.
19. Dias S, Gupta-Bhattacharya S. Enumerating outdoor aeromycota in suburban west Bengal, Índia, with reference to respiratory allergy and meteorological factors. *Ann Agric Environ Med*. 2008;15(1):105-12.
20. Hemmann S, Blaser K, Cramer R. Allergens of Aspergillus fumigatus and Candida boidinii Share IgE-binding Epitopes. *Am J Resp Crit Care Med*. 1997;156:1956-97.
21. Burge HA, Hoyer ME, Solomon WR. Quality control factors for Alternaria allergens. *Mycotaxon*. 1989;44(1):55-63.
22. Licorish K, Novey HS, Kozak P, Fairshter RD, Wilson AF. Role of Alternaria and Penicillium spores in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1985;76(6):819-25.
23. Shen HD, Choo KB, Wang SR, Lin WL, Chang ZN, Han SH. Immunoblot analysis of components of Penicillium notatum recognized by human IgE antibodies. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88(5):802-7.
24. Kasprzyk I. Aeromycology - Main research fields of interest during the last 25 years. *Ann Agric Environ Med*. 2008;15:1-7.