

EXAMES PARA AVALIAR A SENSIBILIZAÇÃO AO *ASPERGILLUS FUMIGATUS* EM FIBROSE CÍSTICA

Tests to assess sensitization to *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis

Simone Santana Aguiar^{a*}, Neiva Damaceno^b, Wilma Carvalho Neves Forte^c

RESUMO

Objetivo: Avaliar os resultados dos exames utilizados para identificar a sensibilização IgE-mediada ao *Aspergillus fumigatus* em pacientes com fibrose cística.

Métodos: Estudo transversal descritivo com amostra de conveniência de 86 pacientes com fibrose cística, acompanhados em Serviço de Referência de Fibrose Cística de hospital universitário terciário. Realizaram-se exames para avaliar sensibilização ao *A. fumigatus* em pacientes com fibrose cística: IgE sérica total, contagem de eosinófilos sanguíneos, identificação do fungo por swab de orofaringe ou por cultura de escarro, IgE sérica específica e testes cutâneos de hipersensibilidade imediata. Foram comparados os resultados dos diferentes exames realizados.

Resultados: Em 33 (38,4%) pacientes com fibrose cística, com faixa etária de 1 a 33 anos (mediana de 8 anos), os resultados dos exames sobre sensibilização IgE mediada ao *A. fumigatus* foram: em 16 pacientes, aumento de IgE sérica específica (>0,35 kU/L); em 23, positividade aos testes cutâneos; e seis mostraram sensibilização a partir dos dois exames. Foram observados dois pacientes com eosinofilia (>1.000 eosinófilos/mm³) e sete com aumento de IgE sérica total (>1.000 UI/mL), sem que esses apresentassem positividade aos testes cutâneos ou aumento de IgE específica ao *A. fumigatus*. Em nenhum paciente foi isolado *A. fumigatus* no swab de orofaringe e/ou na cultura de escarro.

Conclusões: Concluímos que, entre os exames para avaliar a sensibilização ao *A. fumigatus* na fibrose cística, são necessários os teste cutâneos de hipersensibilidade imediata e a dosagem de IgE sérica específica ao *A. fumigatus*. A eosinofilia sérica e a cultura de secreções respiratórias não foram essenciais neste estudo.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*; Fibrose cística; Testes Cutâneos; IgE; Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA).

ABSTRACT

Objective: To evaluate the results of the tests used to identify the IgE mediated sensitization to *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis.

Methods: This is a cross-sectional descriptive study with a convenience sample of 86 patients diagnosed with cystic fibrosis in the Reference Service in Cystic Fibrosis at a tertiary teaching hospital. The following tests were performed to assess the sensitization to *A. fumigatus* in patients with cystic fibrosis: Total serum IgE, eosinophil count, fungus detection through oropharyngeal swab or sputum culture, serum-specific IgE, and immediate-type hypersensitivity (IgE) skin tests. We compared the results of the different tests performed.

Results: In 33 (38.4%) patients with cystic fibrosis, with ages ranging from 1 to 33 years (median of 8 years), the IgE-mediated *A. fumigatus* sensitization test results were: in 16 patients, there was an increase in serum-specific IgE (>0.35 kU/L); in 23, skin tests were positive; and six had sensitization in both tests. We observed two patients with eosinophilia (>1,000 eosinophils/mm³) and seven with increasing total serum IgE (>1,000 IU/mL), all of whom obtained negative results in skin tests and had no IgE increase specific to *A. fumigatus*. *A. fumigatus* was not detected in oropharyngeal swabs and/or sputum culture of any patients.

Conclusions: We conclude that, among the tests used to assess sensitization to *A. fumigatus* in cystic fibrosis patients, both serum-specific IgE and immediate-type hypersensitivity (IgE) skin tests are required. Serum eosinophilia and respiratory secretion culture were not essential in this study.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*; Cystic fibrosis; Skin tests; IgE; Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA).

*Autor correspondente. E-mail: moneaguiar@uol.com.br (S.S. Aguiar).

^aSector de Pneumologia do Departamento de Pediatria e Puericultura da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP, Brasil.

^bEquipe Multidisciplinar do Serviço de Referência de Tratamento de Fibrose Cística do Setor de Pneumologia do Departamento de Pediatria e Puericultura da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, SP, Brasil.

^cDepartamento de Ciências Patológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, SP, Brasil.

Recebido em 9 de junho de 2016; aprovado em 30 de outubro de 2016; disponível on-line em 03 de julho de 2017.

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença autossômica recessiva com diferentes fenótipos, sendo mais frequente na etnia branca. Afeta principalmente o sistema respiratório, o digestivo, as glândulas sudoríparas e o aparelho reprodutivo masculino. Na FC, há defeito na depuração mucociliar e na produção de muco brônquico, que é espesso e viscoso. A consequência é que as doenças pulmonares são as principais causas de morbimortalidade. A FC é uma doença crônica, com acentuada melhora do prognóstico nos últimos anos e aumento da sobrevida, especialmente pelo diagnóstico precoce por meio do teste de triagem após o nascimento e por melhor acompanhamento da doença pulmonar e da nutrição desses pacientes.¹⁻⁹

O *Aspergillus fumigatus* pode sensibilizar o paciente com FC, culminando com a doença de hipersensibilidade IgE-mediada, a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), de prevalência variável.^{10,11} Em indivíduos com FC, a ABPA apresenta manifestações clínicas muito semelhantes à exacerbação da própria FC, o que torna difícil o diagnóstico, sendo então necessários exames complementares. A prevalência de ABPA em FC é variável, sendo descrita entre 1 e 15%. A maior prevalência encontrada no levantamento da *European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis* (ERCF), em comparação à prevalência observada pelo *Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis* (ESCF), pode ser devida às diferenças étnicas e aos diferentes critérios diagnósticos utilizados, sendo o critério europeu mais abrangente do que o americano.^{11,12} O impacto que a ABPA causa no prognóstico do portador de FC faz com que seja necessária a busca dessa doença, a fim de que o diagnóstico e o tratamento sejam precoces, na tentativa de evitar um maior comprometimento pulmonar.

Os critérios de diagnóstico de ABPA em FC têm sido constantemente revisados. Atualmente, tais critérios estão baseados nas manifestações clínicas e em exames complementares: positividade do teste cutâneo de hipersensibilidade imediata ao *A. Fumigatus*, valores aumentados de IgE sérica total e de IgE e/ou IgG séricas específicas para *A. fumigatus*, eosinofilia sanguínea, *swab* de orofaringe ou cultura de escarro para pesquisa de *A. fumigatus*.^{11,12} Há indicação de que todos esses exames sejam solicitados semestralmente para todos os pacientes com FC, na tentativa de diagnosticar a ABPA. Entretanto, não há até o presente momento estudos sobre a necessidade de realização de todos esses exames para verificar se o paciente apresenta sensibilização ao *A. fumigatus*, que geram altos custos para os centros de atendimento a pacientes com FC. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os resultados dos exames realizados para identificar a sensibilização IgE-mediada ao *Aspergillus fumigatus* em pacientes com fibrose cística.

MÉTODO

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (Projeto 065/06). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelos pacientes e/ou responsáveis antes da realização de qualquer procedimento relacionado ao estudo.

Foi feito um estudo transversal descritivo durante seis meses, em 2013, com amostra de conveniência de pacientes com FC matriculados em ambulatório de Serviço de Referência de Tratamento de Fibrose Cística de hospital universitário terciário. Cada paciente foi submetido uma única vez a cada exame.

Foram avaliados 86 pacientes, com diagnóstico confirmado de FC por meio de duas dosagens de cloro no suor, utilizando o método padronizado de Gibson e Cooke:⁵ iontoforese quantitativa pela pilocarpina, com resultados acima de 60 mmol/L com massa de suor igual ou maior do que 0,075 g.

Os exames complementares e os valores para determinar a sensibilização ao *A. fumigatus* foram os utilizados como rotina até o presente momento:

1. Dosagem de IgE sérica total por método imunoenzimático (ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), considerada elevada quando >1.000 UI/mL.¹³
2. Dosagem de IgE sérica específica para *A. fumigatus*, realizado através de RAST por método imunofluoroenzimático *UniCAP 100* (*Pharmacia diagnostics*), considerando-se sensibilização quando valor $\geq 0,35$ kUA/L.¹⁴
3. Teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para *A. fumigatus* realizado no Setor de Alergia e Imunodeficiências, conforme padronizado: positivo quando ≥ 3 cm e controle histamina positivo ou \geq controle histamina positivo, com controle solução salina negativo. Utilizou-se extrato da *International Pharmaceutical Immunology S.A. - IPI*, Espanha.¹⁵
4. Contagem automatizada de eosinófilos sanguíneos, realizada no Serviço de Patologia Clínica, considerando-se eosinofilia >1.000 eosinófilos/mm³.
5. *Swab* de orofaringe e/ou cultura de escarro para a identificação de *A. fumigatus* realizados no Serviço de Patologia Clínica, através de coloração para fungo.¹⁶

RESULTADOS

Foram estudados 86 pacientes com FC, com faixa etária de 1 a 33 anos, com mediana de idade de 8 anos. A média de idade foi de $10,8 \pm 8,6$ anos (Tabela 1). Entre os pacientes estudados, 33 (38,4%) apresentaram aumento de IgE sérica específica para *A. fumigatus* por RAST ($\geq 0,35$ kU/L) e/ou positividade aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata, sendo que 16 apresentaram elevação de IgE sérica específica ($\geq 0,35$ kU/L) e 23 positividade aos testes cutâneos.

Oito pacientes não realizaram os testes cutâneos por dificuldade de comparecimento. Entre 33 pacientes, seis mostraram sensibilização em dois exames: IgE sérica e teste cutâneo (Tabela 2, Figuras 1 e 2).

Os demais exames mostraram: eosinofilia (>1.000 eosinófilos/mm³) em dois pacientes; IgE sérica total elevada (>1.000 UI/mL) em sete pacientes, sendo que os pacientes com eosinofilia foram diferentes dos com elevação de IgE sérica total. Nenhum paciente apresentou cultura ou *swab* positivo para *A. fumigatus*. Os pacientes com eosinofilia ou com aumento de IgE total não apresentavam positividade aos testes cutâneos específicos de sensibilização ao *A. fumigatus*, nem aumento da IgE sérica específica para *A. fumigatus*. Não foi observada ABPA em nenhum dos pacientes acompanhados.

DISCUSSÃO

Observou-se no presente estudo que 38,4% dos pacientes com FC apresentaram positividade aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata e/ou aumento da IgE sérica específica para *A. fumigatus*, sem que apresentassem alteração dos demais

Tabela 1 Distribuição dos portadores de Fibrose Cística segundo o sexo e a faixa etária.

Faixa etária (anos)	Sexo		Total n (%)
	Feminino n (%)	Masculino n (%)	
1 a 6	24 (28)	13 (15)	37 (43)
7 a 12	10 (12)	11 (13)	21 (24)
13 a 18	6 (7)	8 (9)	14 (16)
Acima de 18	8 (9)	6 (7)	14 (16)
Total	48 (56)	38 (46)	86 (100)

Tabela 2 Distribuição dos portadores de Fibrose Cística estudados, segundo os resultados de IgE sérica específica ao *Aspergillus fumigatus* determinada por RAST e dos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata ao *Aspergillus fumigatus*.

Resultados	Número de Pacientes	% dos Pacientes
Só RAST positivos	10	11,6
Só testes cutâneos positivos	17	19,8
RAST e testes cutâneos positivos	6	7,0
Total	33	38,4

exames (IgE sérica total, eosinofilia ou presença do fungo), não preenchendo os critérios para ABPA.

A hipersensibilidade IgE-mediada desenvolve-se gradualmente com o evoluir da idade e com a maior exposição ao alérgeno. Assim, em reações IgE-mediadas existe inicialmente uma sensibilização baixa ao alérgeno específico e, com o evoluir do tempo, a sensibilização pode aumentar até o desenvolvimento da doença. Esse fato é clássico para doenças IgE-mediadas bem conhecidas, como rinite alérgica, conjuntivite alérgica, asma alérgica, alergia alimentar e alergia ao látex IgE-mediada.¹⁷ Há inicialmente teste cutâneo positivo e IgE específica pouco aumentada. Continuando a exposição antigênica, há maior elevação da IgE específica, com valores $\geq 3,5$ kU/L, que indicam uma alta sensibilização. Mesmo nessa condição, pode não haver aumento da IgE total ou presença de eosinofilia. No início da sensibilização, o quadro clínico geralmente é discreto, fato especialmente conhecido para alergia ao látex. Continuando a exposição ao alérgeno, as manifestações clínicas se intensificam. A hipersensibilidade IgE-mediada ABPA parece seguir o mesmo padrão das demais reações IgE-mediadas: o paciente

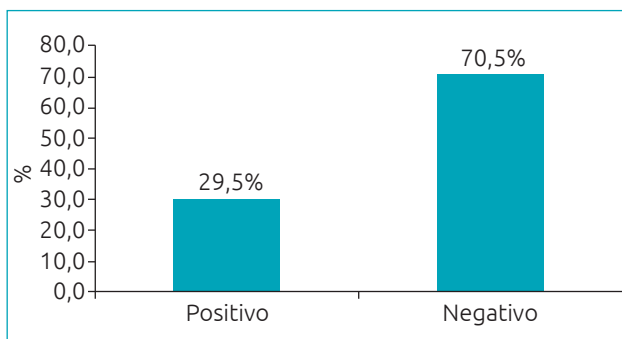


Figura 1 Resultados dos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata ao *Aspergillus fumigatus* entre os 78 pacientes estudados com Fibrose Cística (porcentual dos pacientes).

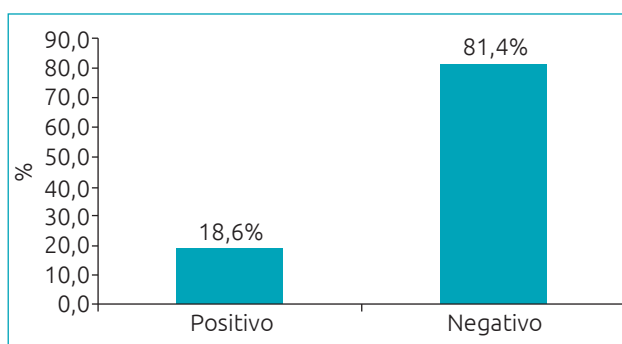


Figura 2 Positividade de sensibilização ao *Aspergillus fumigatus* por dosagem de IgE sérica específica determinada por RAST (valores $\geq 0,35$ kU/L) entre os 86 pacientes estudados com Fibrose Cística (porcentual dos pacientes).

inicialmente apresenta baixa sensibilização ($\geq 0,35$ kU/L) e, depois, com a persistência da exposição ao fungo, pode haver alteração dos demais exames e presença de quadro clínico.

A incidência de sensibilização observada no presente estudo está dentro dos valores referidos na literatura para pacientes com FC sensibilizados ao *A. fumigatus*, mas não portadores de ABPA: 42% positividade ao teste cutâneo e 54% IgE específica aumentada.¹⁸ A ABPA tem sido mais descrita em adolescentes e adultos com FC, como sugerem pesquisas que mostram mediana de idade de 14,7 e de 18 anos.^{19,20} No presente estudo, a mediana de idade foi de oito anos, sendo possível que esses pacientes ainda estejam em período de sensibilização ao *A. fumigatus* e que, com o evoluir da idade, possam desenvolver ABPA.

A presença de *A. fumigatus* nas vias aéreas inferiores recruta neutrófilos para os espaços alveolares, resultando na fagocitose de esporos ou liberação do conteúdo dos seus grânulos com morte direta do fungo. Em casos de asma alérgica não controlada, pesquisas mostraram que há alterações da atividade de neutrófilos, contribuindo para um padrão neutrofílico e para a piora do quadro alérgico.²¹ Os macrófagos alveolares também desempenham importante papel na defesa pulmonar contra *A. fumigatus*. A falta de eliminação do fungo nos pulmões resulta em doenças que se estendem desde respostas de hipersensibilidade (ABPA) até cavitação invasiva secundária à germinação dos esporos.²² Assim, para a ocorrência de ABPA é necessária uma sensibilização inicial ao fungo, seguida da permanência desse nos pulmões, como nas demais doenças IgE-mediadas.

No presente trabalho, a IgE sérica total e a contagem de eosinófilos no sangue periférico mostraram aumento em pequeno número de pacientes, além do fato de que nesses pacientes não houve aumento de IgE específica e/ou positividade do teste cutâneo. Sabe-se que a IgE sérica total e a eosinofilia podem estar aumentadas ou serem normais em doenças IgE-mediadas e que a IgE total pode estar alta mesmo em pessoas sem reações IgE-mediadas. A IgE sérica total resulta da soma de uma ou mais IgE séricas específicas.¹⁷ Assim, nas alergias respiratórias, a IgE sérica total pode resultar da soma das IgE séricas específicas aos aeroalérgenos mais frequentes: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*. A IgE sérica total pode ser normal mesmo em pacientes com sensibilização aos três ácaros, ou seja, pacientes apresentando IgE específica aumentada a cada um dos três ácaros mais frequentes das alergias respiratórias.¹⁷ O mesmo deve ocorrer com a sensibilização ao *A. fumigatus*: embora a IgE específica *in vivo* esteja aumentada, não há obrigatoriedade do aumento de IgE total. Em casos de ABPA, há maior sensibilização ao fungo, com maiores aumentos da IgE específica e consequente aumento da IgE sérica total.

O presente estudo não nos permite concluir qual dos exames seria melhor para verificar a sensibilização ao *A. fumigatus*: IgE específica *in vitro* ou *in vivo*. Acreditamos que ambos os exames se complementem. Uma pesquisa sobre sensibilização ao *A. fumigatus* em pacientes com FC mostrou uma concordância de 90% para os dois exames.²³ A literatura também refere a importância da dosagem de IgE sérica específica para *A. fumigatus* em FC.²⁴

A literatura descreve, ainda, que mesmo crianças de baixa faixa etária apresentam positividade ao teste cutâneo de hipersensibilidade imediata.¹⁵ Esse fato é importante sob o ponto de vista da imaturidade fisiológica da resposta inflamatória e imunológica adaptativa de crianças pequenas. Os testes cutâneos de hipersensibilidade imediata indicam a presença de IgE específica unida a mastócitos. Em um contato inicial com alérgeno, o hospedeiro ativa linfócitos T auxiliares tipo 2, que sintetizam IL-4 e IL-13, citocinas promotoras da diferenciação de linfócitos B em plasmócitos produtores de IgE específica. Essa IgE une-se a mastócitos contendo receptores de alta afinidade para IgE, tornando esses mastócitos sensibilizados.¹⁷ Ao ser adicionado o alérgeno no teste cutâneo, há união desse alérgeno à IgE específica unida a mastócitos, com consequente liberação de histamina do mastócito e formação de pápula, que dá positividade ao teste. Em estudos anteriores, foi observado que a partir de seis meses já há positividade aos testes cutâneos IgE-mediados.^{15,25} As pesquisas mostram aumento da IgE específica ao *A. fumigatus* com o progredir da doença pulmonar em FC.²⁶ É possível que esse fato venha a ocorrer com os pacientes do presente estudo.

No seguimento ambulatorial dos fibrocísticos, é feita coleta rotineira das secreções respiratórias. Provavelmente, o resultado do presente trabalho seja decorrente do curto período do estudo. Em estudos de prevalência de ABPA, são relatadas culturas negativas e é salientado o fato de que culturas positivas não têm valor de diagnóstico. Além disso, o *A. fumigatus* é frequentemente isolado nas vias aéreas inferiores de pacientes com FC com cultura negativa. A falta de efetividade mucociliar leva ao acúmulo de muco, rico em nutrientes para microrganismos, facilitando a proliferação e persistência de bactérias e fungos.²⁷⁻²⁹ Esses fatos podem explicar as culturas negativas observadas em todos os pacientes estudados.

Os resultados do presente trabalho mostram que os exames indicativos de sensibilização ao *A. fumigatus* são os testes cutâneos de hipersensibilidade imediata e o aumento da IgE sérica específica. Os exames sobre contagem de eosinófilos no sangue periférico, valores de IgE sérica total e culturas para *A. fumigatus*, além de onerosos e muitas vezes de difícil realização para os pacientes, podem não mostrar positividade para sensibilização ao *A. fumigatus*. As manifestações clínicas de FC

e de ABPA se sobrepõem. Infiltrados pulmonares, bronquiectasias e doença obstrutiva pulmonar na FC são manifestações comuns da doença pulmonar, resultantes de infecções repetitivas e crônicas, independentemente de haver ou não associação à ABPA. Suspeita-se de ABPA quando há uma piora clínica aguda ou subaguda, com exacerbações pulmonares não atribuídas a outra etiologia e/ou quando existem falhas nas tentativas de tratamento com antimicrobianos contra bactérias isoladas em culturas. Nessas condições, a indicação é que seja sempre analisada a possibilidade de concomitância com ABPA, diante dos critérios propostos na literatura.^{11,12,30,31}

A sobrevida de portadores de FC tem aumentado, como mostram os registros.³² Se os recursos financeiros destinados à saúde de tais pacientes puderem ser melhor direcionados, como diferentes centros têm proposto, com certeza estaremos contribuindo para uma melhor qualidade de vida de pacientes com FC.³³

Concluimos que, para avaliar a sensibilização ao *A. fumigatus* em pacientes com FC, são necessários os testes cutâneos de hipersensibilidade imediata e a dosagem de IgE sérica específica

ao *A. fumigatus*. A pesquisa de eosinofilia, de IgE sérica total e de swabs/culturas para *A. fumigatus* não foram essenciais para a procura de sensibilização ao *A. fumigatus* em pacientes jovens com FC. Vale lembrar as limitações da pesquisa, tendo em vista o número de pacientes e o período do estudo relativamente curto. Mesmo assim, verificou-se a importância dos testes cutâneos e das dosagens de IgE sérica específica ao *A. fumigatus* para avaliar a sensibilização nos fibrocísticos.

Nesse contexto, sugere-se que inicialmente sejam realizados os exames *in vitro* e *in vivo* para IgE específica ao *A. fumigatus* e, no caso do encontro de sensibilização, os demais exames seriam solicitados: IgE total, número de eosinófilos sanguíneos e pesquisa do fungo, obedecendo-se aos critérios de diagnóstico para ABPA em FC.

Financiamento

O estudo não recebeu financiamento.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- Salvatore D, Buzzetti R, Baldo E, Furnari ML, Lucidi V, Manunza D, et al. An overview of international literature from cystic fibrosis registries. Part 4: update 2011. *J Cyst Fibros*. 2012;11:480-93.
- Yen EH, Quinton H, Borowitz D. Better nutritional status in early childhood is associated with improved clinical outcomes and survival in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2013;162:530-35.
- Reis FJ, Damaceno N. Fibrose cística. *J Pediatr (Rio J)*. 1998;74 Suppl 1:76-94.
- O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009;373:1891-904.
- Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 1959;23:545-9.
- Sibley CD, Parkins MD, Rabin HR, Duan K, Norgaard JC, Surette MG. A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:15070-5.
- Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2003;9:486-91.
- Adde FV. Nutrição em fibrose cística: tão importante quanto o manejo da doença pulmonar. *Rev Paul Ped*. 2015;33:1-2.
- Hortencio TD, Nogueira RJ, Marson FA, Hessel G, Ribeiro JD, Ribeiro AF. Fatores que afetam o crescimento e estado nutricional de pacientes com fibrose cística com idade inferior a 10 anos e que não foram submetidos à triagem neonatal. *Rev Paul Ped*. 2015;33:3-11.
- Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 2011;20:156-74.
- Mastella G, Rainisio M, Harms HK, Hodson ME, Koch C, Navarro J, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2000;16:464-71.
- Agarwal R. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Chest*. 2009;135:805-26.
- Wittig HJ, Belloit J, De Fillipi I, Royal G. Age related serum immunoglobulin E levels in healthy subjects and in patients with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1980;66:305-13.
- Cots P, Pena JM, Botey J, Eserverri JL, Marin A, Ras R. Determination of total and specific IgE using UNICAP 100: comparative study with the CAP system. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1998;26:223-7.
- Forte WC, Carvalho Jr FF, Fernandes Filho WD, Shibata E, Henriques LS, Mastrotti RA, et al. Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata com o evoluir da idade. *J Pediatr (Rio J)*. 2001;77:112-8.
- Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Cultura de fungos. In: Barbosa I, Andriolo A, Ballarati CA, Galoro CA, Vieira LM, Shcolnik W, et al, editors. *Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Boas Práticas em Microbiologia Clínica*. Barueri: Manole; 2015. p. 87-96.

17. Forte WC. Reações IgE-mediadas. In: Forte WC, editor. *Imunologia do básico ao aplicado*. 3rd ed. São Paulo: Atheneu; 2015. p. 131-80.
18. Hutcheson PS, Knutsen AP, Rejent AJ, Slavin RG. A 12-year longitudinal study of *Aspergillus* sensitivity in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 1996;110:363-6.
19. Carneiro AC, Lemos AC, Arruda SM, Santana MA. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis in the state of Bahia, Brazil. *J Bras Pneumol*. 2008;34:900-6.
20. Geller DE, Kaplowitz H, Light MJ, Colin AA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: reported prevalence, regional distribution, and patient characteristics. Scientific Advisory Group, Investigators, and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. *Chest*. 1999; 116:639-46.
21. Mosca T, Menezes MC, Silva AV, Stirbulov R, Forte WC. Chemotactic and phagocytic activity of blood neutrophils in allergic asthma. *Immunol Invest*. 2015;44:509-20.
22. Chotirmall SH, Al-Alawi M, Mirkovic B, Lavelle G, Logan PM, Greene CM, et al. *Aspergillus* - Associated Airway Disease, Inflammation, and the Innate Immune Response. *Biomed Res Int*. 2013;2013:1-14.
23. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132:560-6.
24. Almeida MB, Bussamra MH, Rodrigues JC. ABPA diagnosis in cystic fibrosis patients: the clinical utility of IgE specific to recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens. *J Pediatr (Rio J)*. 2006;82:215-20.
25. Naspitz CK, Solé D, Jacob CA, Sarinho E, Soares FJ, Dantas V, et al. Sensitization to inhalant and food allergens in Brazilian atopic children by in vitro total and specific IgE assay. Allergy Project—PROAL. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:203-10.
26. Nicolai T, Arleth S, Spaeth A, Bertele-Harms RM, Harms HK. Correlation of IgE antibody titer to *Aspergillus fumigatus* with decreased lung function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1990;8:12-5.
27. Saiman L. Microbiology of early CF lung disease. *Paediatr Respir Rev*. 2004;5 Suppl A:S367-9.
28. Høiby N. Microbiology of lung infections in cystic fibrosis patients. *Acta Paediatr*. 1982;72:33-54.
29. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis—a review. *Med Mycol*. 2009;47:387-97.
30. Zander DS. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: an overview. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129:924-8.
31. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis—state of the art: Cystic fibrosis Foundation Consensus Conference. ABPA and Cystic Fibrosis. 2003;37 Suppl 3:225-64.
32. Mackenzie T, Gifford AH, Sabadosa KA, Quinton HB, Knapp EA, Goss CH, et al. Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the cystic fibrosis foundation patient registry. *Ann Intern Med*. 2014;161:233-41.
33. Schmitz TG, Goldbeck L. The effect of inpatient rehabilitation programmes on quality of life in patients with cystic fibrosis: a multi-center study. *Health Qual Life Outcomes*. 2006;4:8.