ELAINE GAGETE MIRANDA DA SILVA

**Fungos anemófilos na cidade de Botucatu e sua correlação
com sensibilização em portadores de doenças alérgicas
respiratórias**

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica
da Faculdade de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Julio Croce

São Paulo
2004

A meus pais – Orlando e Lourdes Carolina – por tudo que representaram e
continuam representando para que eu chegasse até aqui

A meu marido – Benedito Carlos – e a minhas filhas – Verônica e Jéssica – por todo
apoio, carinho e estímulo

A meus pacientes, principalmente os que sofrem de asma grave, cujo sofrimento
representa o maior estímulo para que eu continue estudando

AGRADECIMENTOS

Àqueles que me impulsionaram na partida, apoiando-me em todos os momentos até à linha de chegada, meus sinceros agradecimentos:

- Meu orientador, Prof. Dr. Julio Croce, cujo exemplo de médico, pesquisador e ser humano marcam a todos que, como eu, têm a felicidade de usufruir de sua convivência;
- Dr. Luiz Vicente Rizzo, pesquisador e médico brilhante e que contribuiu de forma inquestionável para a conclusão desta tese;
- Prof. Dr. Edson Luiz Furtado, por tudo que me ensinou sobre fungos e por ter me disponibilizado seu laboratório de Micologia;
- Prof. Dr. Fábio F. Morato Castro, por todo o apoio e sugestões valiosas, sem os quais este trabalho nunca teria sido contemplado com o prêmio “Oswaldo Seabra” no XXIX Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia em 2002, em Natal – RN;
- Prof. Dr. Jorge Kalil, por suas preciosas críticas, sugestões e pelo apoio financeiro;
- Prof^a. Dra. Cristina Kokron por ter disponibilizado o Laboratório de Imunologia para as dosagens de IgE específica;
- Prof^a. Dra. Thais Helena A. Thomaz Queluz, responsável pela disciplina de Pneumologia da UNESP-Botucatu, pelo apoio na utilização das dependências do ambulatório de Pneumologia daquela instituição;
- Prof. Walderez Gambale, pelo empréstimo do aparelho Andersen, utilizado neste trabalho e pelas várias boas sugestões;

- Prof^ª. Dra. Lúdia Raquel de Carvalho, pelo trabalho estatístico;
- Departamento de Ciências Ambientais da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP–Botucatu, pelo fornecimento dos dados meteorológicos utilizados nesta pesquisa;
- Engenheiros Julio Eduardo Croce, Roberto Müeler e Daniel Müeler por terem produzido o caça-esporos FEC;
- Meus pais, pela revisão da Língua Portuguesa;
- Bibliotecária Valéria de Vilhena Lombardi, da Biblioteca Central da Faculdade de Medicina da USP pela revisão final;
- Todos os amigos e colegas da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina da USP, que nas várias reuniões e retiros colaboraram de forma inestimável com idéias, críticas e sugestões;
- Minhas auxiliares Ivone, Fabiana, Zenaide e, especialmente, a Adriana, pelo muito que me ajudaram em todas as fases deste trabalho;
- Laboratório Alk-Abelló, pela presteza na importação dos extratos utilizados;
- FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por ter auxiliado financeiramente esta pesquisa;

*“Atrás de cada linha de chegada, há uma de partida; atrás de cada triunfo, há
outro desafio” (Madre Tereza de Calcutá)*

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2004.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	001
2. OBJETIVOS.....	004
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	005
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	046
5. RESULTADOS.....	071
6. DISCUSSÃO.....	106
7. CONCLUSÕES.....	119
8. ANEXOS.....	121
9. REFERÊNCIAS.....	143

APÊNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

FEC	Aparelho coletor de esporos Furtado e Croce
UFC	Unidades formadoras de colônias

RESUMO

SILVA EGM. *Fungos anemófilos na cidade de Botucatu e sua correlação com sensibilização em portadores de doenças alérgicas respiratórias* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.159p.

Introdução: Fungos são alérgenos cuja importância nas doenças alérgicas respiratórias é subestimada por falta de extratos alergênicos adequados para diagnóstico, quer através de testes cutâneos, quer através de dosagem de IgE específica. Botucatu possui características próprias por se localizar numa “cuesta” e possuir vegetação variada que cobre grande parte da cidade. A partir das plantas os fungos ganham o ar através da esporulação podendo ser inalados e sensibilizar pacientes com alergias respiratórias. Este trabalho se propõe a estudar quais os fungos mais prevalentes em Botucatu e a taxa de sensibilização dos principais gêneros entre os portadores de asma e rinite procedentes dessa região.

Casística e Métodos: Foi desenvolvido um aparelho caça esporos para a captura dos mesmos em quatro pontos da cidade. Foram feitas cinco coletas/ponto/semana durante um ano para contagem e identificação das UFC (unidades formadoras de colônias). Foram selecionados pacientes de Botucatu e região com asma e rinite, nos quais se aplicou testes de puntura para os principais alérgenos, incluindo onze diferentes fungos. Foram também realizados testes intradérmicos com extratos de fungos nos pacientes cujo teste de puntura ao fungo em questão tenha sido negativo.

Resultados: Foram identificados 67 gêneros sendo os mais prevalentes: *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Levedura*, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Nigrospora*, *Monilia*, *Fusarium*, *Hyalodendrum*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Humicola*, *Alternaria*, *Trichoderma* e *Sphaerosporium*. Foram selecionados 207 pacientes dos quais 118 (57%) apresentaram pelo menos um teste positivo a fungo. O teste intradérmico foi responsável por 88% do diagnóstico de sensibilização. A dosagem de IgE específica mostrou baixa sensibilidade (4%). Os fungos mais sensibilizantes foram: *Aspergillus*, *Neurospora*, *Candida*, *Penicillium* e *Cladosporium*. Observou-se maior positividade a fungos no grupo de asma grave, sendo que *Aspergillus*, *Neurospora* e *Candida* foram mais prevalentes nesse grupo. Encontrou-se associação positiva entre pacientes com asma atendidos em Pronto-Socorros durante o ano estudado e o total de UFC nesse período.

Conclusões: Os fungos mais prevalentes no planeta são também encontrados em Botucatu, embora haja fungos característicos dessa região; a sensibilização a fungos é expressiva na população estudada e guarda relação com maior gravidade da asma; o teste intradérmico foi o melhor meio diagnóstico para sensibilização a fungos.

SUMMARY

SILVA EGM. *Airborne fungi and their correlation with sensitization in patients with respiratory allergic diseases from the town of Botucatu* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2004.159p.

Purpose: Fungi are allergens whose importance has been underestimated due to the absence of reliable extracts for the diagnosis of sensitization in vivo or in vitro. Botucatu has unique characteristics because of its location on a “cuesta” and its varied vegetation which cover a large area of the city. The fungi reach the air from the plants through sporulation and they can be inhaled and sensitize patients with allergic diseases. Here we studied the most prevalent fungi in the air of Botucatu and the rate of sensitization to the main fungi genus among patients with asthma and rhinitis.

Methods: We developed a spore trap to catch the spores from the air in four points in the city. Five collections were taken weekly during a whole year. Colony forming units (CFU) were counted and the fungi on Petri dishes were classified. Patients with asthma and rhinitis have been selected and submitted to prick tests with the main allergens including eleven different types of fungi. Intradermal tests with fungi extract were also performed in the patients whose prick test to these fungi had been negative.

Results: Sixty-seven genus of fungi have been identified and the more prevalent were: *Cladosporium*, *Epicoccum*, yeast, *Aspergillus*, *Helminthosporium*, *Nigrospora*, *Monilia*, *Fusarium*, *Hyalodendrum*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Humicola*, *Alternaria*, *Trichoderma* and *Sphaerosporium*. Two hundred and seven patients have been selected and 118 (57%) have been at least one positive test to fungus. Intradermal test made the diagnosis in 88% of all diagnostics of sensitization, whereas “in vitro” specific IgE had low sensibility (4%). The more sensitizer fungi were: *Aspergillus*, *Neurospora*, *Candida*, *Penicillium* and *Cladosporium*. There was a significant correlation between severe asthma and fungi sensitization and the fungi more prevalent in that group of patient were: *Aspergillus*, *Neurospora* and *Candida*. Moreover, there was a positive correlation between the number of asthmatic patients attended in Emergencies and the total of CFU in the study period.

Conclusion: We recognize in the air fungi specific to Botucatu although the most prevalent fungi are the same found in other places in the world; the fungi sensitization among patients with allergic respiratory diseases is meaningful and correlated with asthma severity; the intradermal test was the best mean to diagnose fungi sensitization.

INTRODUÇÃO

Fungos são seres eucariontes, cosmopolitas, que constituem um reino à parte, denominado ***Reino Fungi*** (Whittaker, 1969). São ubíquos, encontrados em praticamente todas as regiões do globo, por serem dotados de parede celular rígida que os protege de condições adversas como frio intenso ou seca prolongada. Reproduzem-se sexuada ou assexuadamente e disseminam-se no ambiente principalmente através de esporos. Uma vez no ar, esses esporos podem ser transportados por centenas de quilômetros. É de grande importância o fato de esses fungos anemófilos poderem ser inalados, causando, em certos indivíduos, doenças de hipersensibilidade como asma e rinite alérgica (Brunini et al., 1989).

A prevalência de alergia respiratória a fungos não é bem conhecida e é estimada em 20 a 30% dos indivíduos atópicos ou aproximadamente 6% da população geral (Horner et al., 1995). Há poucos trabalhos na literatura médica estudando essa questão e isso decorre principalmente da dificuldade em se obter extratos alergênicos de boa qualidade para fungos, já que testes cutâneos são o principal meio de se fazer esse diagnóstico. Também há muita divergência entre os pesquisadores sobre o real valor dos fungos como alérgenos respiratórios já que as taxas de sensibilização nos trabalhos publicados são muito díspares.

A sensibilização a fungos pode estar relacionada com o desenvolvimento e agravamento de asma (Nelson, 2000) e ao risco de aparecimento de doenças alérgicas em indivíduos atópicos (Katz et al., 1999), daí a importância em se saber quais os indivíduos sensibilizados numa certa população, principalmente entre asmáticos.

O estudo da prevalência das diversas espécies de fungo em certa região orienta o alergista na escolha dos extratos a serem testados. Para se pesquisar os fungos mais prevalentes pode-se utilizar vários tipos de aparelhos caça-esporos ou simplesmente deixar-se placas expostas com meios de cultura (método gravitacional).

Existe variação quanto à incidência entre as diferentes espécies de região para região, na dependência de fatores climáticos, de relevo, hidrográficos, do tipo de vegetação, de solo, de poluição ambiental, etc.

Prince e Meyer (1976) classificaram os fungos em três grandes grupos baseados na prevalência de isolamento dos mesmos nas diferentes regiões pesquisadas:

1. Dominantes universais: são os encontrados praticamente em todo local onde foram pesquisados. *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, etc fazem parte desse grupo.
2. Dominantes geográficos: são os que ocorrem numa região geográfica com certas características. São eles: *Rhizopus*, *Mucor*, *Stemphylium*, *Botrytis*, *Paecilomyces*, etc.
3. Dominantes locais: são mais esporádicos e característicos de certa região.

A cidade de Botucatu tem características próprias por situar-se numa *cuesta*, palavra de origem hispânica que se traduz por ladeira ou declive. Esse acidente geográfico situa o município numa altitude média de 800 metros em relação ao nível do mar. A vegetação nativa, representada por remanescentes de mata atlântica e cerrado (área de transição fitogeográfica), representa aproximadamente 10% da área total do município e as florestas de eucaliptos, utilizadas pela indústria madeireira, cerca de 3%, o que torna essa região um ecossistema propício para o crescimento de

várias espécies de fungos. Além disso, grandes regiões de pastagem e plantio de culturas como café, algodão, milho, abacaxi e citrus contribuem para a diversidade da vegetação, que é o habitat natural de várias espécies de fungos. Soma-se a isso as características peculiares de clima (subtropical úmido), que favorecem o aparecimento de várias espécies.

Não há descrição de trabalhos que estudem a cidade de Botucatu quanto à prevalência de fungos. Também não se dispõem de dados sobre a importância desses fungos como agentes sensibilizantes nessa região. O presente estudo visa preencher esta lacuna, contribuindo para um melhor entendimento da microbiota fúngica do município e seu impacto sobre as doenças alérgicas respiratórias.

OBJETIVOS

- 1) Estudar a microbiota fúngica na cidade de Botucatu, qualitativa e quantitativamente por um período de um ano;
- 2) Verificar a relação entre os principais gêneros sensibilizantes e seu potencial alergênico em pacientes com asma e rinite alérgica residentes em Botucatu e região.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A. OS FUNGOS NA NATUREZA

Os fungos são eucariontes que surgiram um pouco antes de plantas e animais na escala filogenética. São seres muito bem adaptados e encontram-se em praticamente todo o planeta, tendo sido descritos, inclusive, em regiões polares (Marshall, 1996).

A maioria dos fungos desempenha um papel benéfico à humanidade, secretando enzimas que decompõem matérias orgânicas, o que é vital na reciclagem de substâncias na natureza. Outros fungos contribuem para a produção de comidas e bebidas. Além disso, alguns metabólitos ativos secundários de certos fungos contribuem na área médica como antibióticos (exemplo: penicilina) e imunossupressores (exemplo: ciclosporina).

Alguns fungos são fitopatogênicos e têm um grande impacto na atividade econômica humana pelo fato de causarem grandes danos nas culturas agrícolas, olerícolas e florestais, além de perdas nos produtos armazenados.

Muitos fungos são também patogênicos para o ser humano, como descrito a seguir.

Das 1.500.000 espécies de fungos que se estima existir, cerca de 60.000 foram descritas, sendo a grande maioria terrestre, embora existam algumas espécies aquáticas (Margulis e Schwartz, 2001). Antigamente os fungos eram considerados um sub-reino do Reino *Plantae*. Entretanto, apesar de vários fungos conterem celulose em sua parede celular, a principal substância que forma essa estrutura é a quitina, que é também o principal constituinte do exoesqueleto de artrópodes. Além disso, fungos não fazem fotossíntese e retiram seus nutrientes de matéria orgânica viva ou morta (alimentação heterotrófica), através da liberação de enzimas que

digerem o substrato, resultando em substâncias que são utilizadas pelo fungo. Assim, os fungos diferem de plantas e animais no modo de nutrição, no padrão de desenvolvimento, de disseminação e de muitas outras características, sendo, portanto, classificados como um reino à parte.

Os fungos não apresentam estágio embrionário, desenvolvendo-se diretamente de células vegetativas ordinárias ou, mais comumente, de esporos que podem ser de origem mitótica ou meiótica. Os esporos germinam em hifas ou, no caso de leveduras, por brotamento, originando novos seres unicelulares. As hifas são tubos delgados que contêm vários núcleos, os quais podem ou não estar separados por septos. Tais septos não chegam a fechar completamente a circunferência transversal da hifa, de forma que as inclusões citoplasmáticas podem fluir de um lado a outro. O conjunto de hifas é chamado micélio e está relacionado com a função de absorção do fungo. As leveduras não formam micélio e permanecem como células únicas durante todo seu ciclo biológico.

Os esporos produzidos assexuadamente, através de mitose, são chamados de conídios. Derivam de hifas diferenciadas, as quais formam estruturas conhecidas como conidióforos. Estes, por sua vez, podem ser livres, estar contidos dentro de estruturas específicas, ou mesmo inexistirem.

A reprodução assexual de esporos é a mais comum entre os fungos, sendo que, em algumas espécies, a reprodução sexual raramente ocorre. As leveduras se reproduzem assexuadamente, por brotamento, e sua fase sexual pode ocorrer de forma ascógena.

Os esporos assim formados são, na sua maioria, dispersos pelo vento. Apesar do termo mais correto para esse fenômeno ser *anemocoria*, segundo o Dicionário de

Fitopatologia de Viegas (1979), a palavra *anemofilia* já está consagrada pelo uso, sendo amplamente utilizada na literatura médica. Por isto, adotou-se este termo no presente estudo.

Esporos assim transportados, em encontrando no hospedeiro (planta, animal ou homem) condições favoráveis de temperatura, umidade e nutrientes para seu desenvolvimento, germinam, iniciando um novo ciclo.

A classificação dos fungos baseia-se nas suas características morfológicas da fase reprodutiva. Os fungos que se reproduzem assexuadamente são conhecidos como anamórficos, mitospóricos, deuteromicetos ou, como eram antigamente denominados, fungos imperfeitos. Sabe-se atualmente que a grande maioria desses fungos é, na verdade, pertencente ao filo Ascomycota na fase sexual. Também as leveduras fazem parte deste filo.

A fase sexual dos fungos é denominada teleomórfica e as estruturas reprodutoras que a caracterizam são os gametângios. O filo Zygomycota forma esporos sexuais do tipo zigósporo; o filo Basidiomycota produz seus esporos em basídios e o filo Ascomycota forma esporos em ascas.

A reprodução sexual dos fungos processa-se de diferentes formas, sendo que a mais comum é através da conjugação de hifas complementares que se fundem. Essa fusão ocorre primeiramente em nível citoplasmático e posteriormente os núcleos haplóides se unem formando um zigoto diplóide. Este, imediatamente executa meiose e, assim, restabelece o estado haplóide (Margulis e Schwartz, 2001).

Os fungos são muito resistentes, podendo sobreviver por longos períodos em condições adversas. O crescimento vegetativo desses seres ocorre de forma mais eficaz entre 18-32 °C e, embora não esporulem abaixo de zero grau, podem

permanecer viáveis, em estado latente, em temperaturas como -45° a -55° C ou até menos. Temperaturas acima de 75°C geralmente são letais para fungos. Entretanto, existem alguns fungos termofílicos que não esporulam abaixo de 45°C (Salvagio e Aukrust, 1981).

Umidade, geralmente acima de 65%, é essencial para a maioria dos fungos crescer, embora muitas espécies possam sobreviver por tempo prolongado em condições de seca. A umidade afeta não somente o crescimento e frutificação dos fungos, mas também a liberação de esporos. A maioria dos ascosporos e basidiosporos é liberada através de um processo que requer água livre. Por isso há grande liberação em períodos que se seguem a chuvas, neblina e orvalho, e é por isso que esses esporos são mais prevalentes no período noturno (*Fusarium*, *Phoma*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*). Entretanto, há também esporos que não dependem de água para sua liberação, sendo diretamente liberados de suas fontes produtoras através do vento. Portanto, sua liberação aumenta com a velocidade do ar e umidade relativa baixa, o que acontece em tardes ensolaradas. *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Aspergillus* são exemplos desse grupo e, assim, são mais encontrados no período vespertino (Ingold, 1971).

Uma característica comum dos fungos é a enorme quantidade de esporos produzida pela maioria. Por exemplo, uma única colônia de 2,5 cm de diâmetro de *Penicillium* pode gerar até 400.000.000 de conídios. Entretanto, não mais do que alguns esporos de cada indivíduo irão ter sucesso em suas funções reprodutivas e, assim, não há um aumento marcante no sítio ocupado por esta espécie, embora possa haver variações de seu número de ano para ano (Ingold, 1971). Apesar de bastante variável, a concentração de esporos pode ser da ordem de mais de 1000 esporos/ m^3

de ar (Salvagio e Aukrust, 1981), podendo-se encontrar esporos em concentração de até 100.000 esporos/m³ de ar sem que esta seja uma condição anormal (D'Amato e Spieksma, 1995).

A intensidade luminosa também pode afetar algumas espécies, como alguns tipos de *Cladosporium*, que necessitam, para seu crescimento, de períodos de escuridão alternados com luz.

A vegetação local igualmente afeta em grande proporção o tipo de fungo de um determinado local. Por exemplo, enquanto certos basideomicotas abundam em florestas, regiões com predomínio de gramíneas e arbustos são fontes de vários deuteromicetos. Plantas são os substratos naturais da maioria dos fungos e ecossistemas ricos em vegetação são igualmente ricos em fungos.

As fontes externas de fungos são mais ou menos constantes de um ano para outro (Meyer et al., 1983), entretanto, considerando-se que a principal fonte de fungos é matéria orgânica vegetal, grandes alterações do ecossistema podem modificar a distribuição dos fungos numa certa região. Outras alterações atmosféricas, como efeito estufa, diminuição da camada de ozônio, etc., também podem alterar a concentração tanto de fungos, como de substrato. Da mesma forma, as modificações ambientais oriundas de controle microbiológico podem responder por alteração na composição dos fungos desse local, como é o caso do grupo utilizado para controle de pragas nas plantações (Burge, 2002).

A maioria dos fungos tem um padrão sazonal de esporulação, embora não exista uma “estação fúngica” bem definida, já que tais organismos são universais e dotados de grande capacidade adaptativa, o que permite seu isolamento na atmosfera durante o ano todo (Salvagio e Aukrust, 1981).

B. IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS NAS DOENÇAS ALÉRGICAS

RESPIRATÓRIAS

Há quase 200 anos James Bolton já sugeria que os esporos aéreos seriam responsáveis por muitas doenças respiratórias (Hyde, 1973). Em 1873, Charles Blackey^(*) descreveu sua própria reação asmática ao inalar mofo (*Penicillium*).

A importância de se estudar tais seres repousa no fato de que as doenças por fungo estão aumentando rapidamente, não só em indivíduos imunocomprometidos, mas também nos imunocompetentes, tornando-se um desafio para médicos e micologistas (Mitchell, 2000). Em se tratando de alergia a fungos, a importante revista “The Journal of Allergy and Clinical Immunology”, na sua edição de fevereiro de 2004, publicou vários artigos que revisam aspectos importantes deste tipo de patologia, além do editorial cujo nome fala por si mesmo: “Mold allergy: some progress made, more needed” (Alergia a fungos: algum progresso feito, muito por fazer). O autor finda o editorial com as seguintes palavras: “Apesar de ser desejável mais pesquisa em qualquer campo, existem poucas áreas na Alergia e Imunologia onde pacientes e médicos necessitem de forma tão urgente melhor entendimento...” (Frew, 2004).

* Blackley CH. Experimental researches on the causes and nature of catarrhus aestivus (hay fever or hay asthma). London, 1959. Dawson Publishing Co, p.57-8.

Existem basicamente três mecanismos através dos quais os fungos podem produzir doença (Terr, 2004). São eles:

- Infecção: podem ser localizadas ou sistêmicas, essas últimas ocorrendo principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Há também infecções sistêmicas não oportunistas que ocorrem em pacientes imunocompetentes e em certas regiões assumem caráter endêmico, como a paracoccidioidomicose, actinomicose, histoplasmose e outras (Terr, 2004).
- Toxicidade: Fungos produzem substâncias que podem ser tóxicas dependendo da dose e via de contaminação. As intoxicações alimentares por micotoxinas já são bem caracterizadas. Exemplos deste grupo são as aflotoxicoses, intoxicações por cogumelos venenosos, etc. As intoxicações respiratórias são de caráter mais controverso. Recentemente tem sido imputado aos fungos contaminantes de residências, escolas e ambientes de trabalho uma gama enorme de sintomas mal definidos (fadiga, náuseas, vômitos, sintomas semelhantes a resfriados e até depressão). Entretanto, não há ainda um consenso sobre o real papel que os fungos de interiores possam desempenhar na saúde de seus ocupantes (não se trata aqui de alergia – comentada mais abaixo – mas sim de inalação de produtos tóxicos que, através de mecanismos diretos de patogenicidade, poderiam causar doenças). O caso mais discutido atualmente é sobre o fungo *Stachybotrys atra* (também conhecido como *Stachybotrys chartarum* ou *Stachybotrys alternans*). A intoxicação pelas micotoxinas produzidas por este fungo foi associada à ocorrência de vários casos de hemorragia pulmonar em crianças, em

Cleveland, nos EUA, entre 1993 e 1994. Entretanto, estudos posteriores lançaram dúvidas sobre o real papel desse patógeno na etiopatogenia dos quadros citados. Em 1999, o CDC (Center for Disease Control and Prevention) concluiu que “a possível associação entre hemorragia pulmonar aguda... e exposição (ao fungo) não foi provada” (Terr, 2004). Outro mecanismo de patogenicidade de certos fungos pode ser explicado pela produção de toxinas que agem no epitélio ciliar respiratório levando à inibição dos batimentos ciliares. Isto já foi constatado nas infecções pelos fungos *Aspergillus fumigatus* e *Alternaria alternata* (Green et al., 2003).

- Alergia: Os fungos podem provocar fenômenos de hipersensibilidade levando ao aparecimento de doenças alérgicas como asma e rinite. Exposição a fungos ocorre primariamente em ambientes externos, mas eles penetram em interiores e colonizam materiais ali encontrados, resultando em exposição domiciliar ou ocupacional, desenvolvendo-se particularmente em umidificadores e sistemas de ventilação. Como são nutrientes para ácaros, a contaminação por fungos no interior de residências acaba também aumentando a população destes aracnídeos, o que contribui ainda mais para o aumento de alérgenos (Bush e Portnoy, 2001).

De todas as partículas biológicas suspensas na atmosfera, os fungos são as inaladas em maior escala. Vários esporos, que têm uma grande variação de tamanho (de 2 a 100 micra), podem alcançar a árvore respiratória, inclusive regiões inferiores. Encontrando aí condições propícias para seu desenvolvimento, os esporos germinam, liberando, assim, uma quantidade adicional de alérgenos. Apesar dos mecanismos de defesa do hospedeiro,

representados principalmente pelo transporte ciliar e pela resposta imune, os quais previnem essa colonização na grande maioria dos indivíduos normais, é possível que vários fungos causadores de doenças alérgicas escapem dessa defesa e comecem a colonizar o hospedeiro. Mesmo que não sejam capazes de causar infecção, podem suscitar uma resposta alérgica (D'Amato e Spieksma, 1995).

O termo alergia é geralmente empregado para o tipo I de hipersensibilidade, ou seja, aquela desencadeada pela interação entre anticorpos da classe IgE específicos para certos antígenos que são aqui chamados de alérgenos. Essa interação se dá na superfície de mastócitos ou basófilos e causa a degranulação destas células com a conseqüente liberação de substâncias vasoativas. A resposta alérgica pode se dar em duas fases: a imediata, que ocorre dentro de poucos minutos após a exposição antigênica e resulta da liberação de mediadores pré-formados, e a tardia que pode aparecer após 3 – 4 horas da exposição e resulta da infiltração celular que sucede a liberação desses mediadores. Este é o mecanismo básico de rinite e asma alérgicas e os fungos podem desencadear a formação de IgE específica induzindo este tipo de reação, tanto a imediata quanto a tardia (Horner et al., 1995). Além da hipersensibilidade tipo I os fungos podem induzir reação tipo III - na qual há complexos imunes circulantes - e tipo IV, onde a reação é mediada por células T antígeno específicas com liberação de citocinas (Horner et al., 1995). Apesar de não ser objetivo principal desta revisão, algumas patologias de há muito conhecidas, causadas por hipersensibilidade a

fungos, são aqui citadas como exemplos desses outros mecanismos (tipo III e IV):

a) Alveolite alérgica extrínseca (ou pneumonite de hipersensibilidade): é um exemplo de alteração pulmonar onde existe a participação tanto de hipersensibilidade tipo III quanto IV. Pode ser causada por antígenos fúngicos, entre outros, que, quando inalados, induzem a formação de complexos imunes com ativação da cascata do complemento. Segue-se uma intensa reação inflamatória linfocitária, com produção de vários tipos de linfocinas, principalmente IL-8, MIP –1 (alfa) (“macrophage inflammatory protein – alfa”) e RANTES. Células CD4+TH0 diferenciam-se em CD4+TH1 e passam a produzir interferon gama que tem participação na diferenciação de macrófagos os quais se tornam ativados. Por um mecanismo ainda não totalmente conhecido essas células sofrem transformação epitelióide assumindo o aspecto de células gigantes multinucleadas que formam granulomas. Macrófagos alveolares ativados expressam quantidade aumentada de TGF-beta, que tem participação na fibrose, que é o estágio final da pneumonite de hipersensibilidade. Vários fungos já foram identificados como causadores desse processo, principalmente em áreas rurais (“pulmão de fazendeiro”), em indústrias de beneficiamento da cana de açúcar (“bagaçose”), trabalhadores da indústria de madeira, etc. Além da exposição ocupacional, sabe-se que mesmo em ambientes domésticos onde indivíduos sejam expostos a excesso de umidade e mofo podem ocorrer casos de pneumonite de hipersensibilidade (Patel et al., 2001).

b) Aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA): é uma doença pulmonar decorrente da colonização das vias respiratórias pelo fungo *Aspergillus fumigatus* a qual acarreta resposta imune aos vários antígenos nele presentes. Ocorre em indivíduos imunocompetentes asmáticos e portadores de fibrose cística, ao contrário das micoses invasivas que são comuns nos imunodeprimidos. Apesar de o *A. fumigatus* ser o fungo mais conhecido como causador dessa desordem, vários outros fungos podem desencadear reações semelhantes, e a melhor denominação dessa patologia é, na verdade, micose broncopulmonar alérgica. São característicos os infiltrados pulmonares transitórios à radiografia pulmonar e que geralmente se acompanham de eosinofilia sangüínea e aumento da IgE sérica. Essas infiltrações inflamatórias pulmonares resultam em alterações fibróticas com o aparecimento de bronquiectasias tipicamente centrais. Clinicamente esses pacientes apresentam-se com asma de difícil controle. Os sintomas são didaticamente divididos em cinco estágios, entretanto, nem todos os pacientes seguem necessariamente um padrão progressivo. No estágio I (fase aguda) geralmente os pacientes preenchem os diagnósticos sorológicos e radiológicos da ABPA (abaixo). Nessa fase, tratamento com corticóide pode levar à remissão da doença (estágio II), a qual pode ser indefinida ou temporária. Neste caso, novos infiltrados e aumento dos anticorpos específicos ao fungo sinalizam que a doença está ressurgindo (estágio III). O estágio IV caracteriza-se por corticodependência sendo que, à tentativa de se retirar a medicação, os sintomas se exacerbam. A fase seguinte, estágio V, é a final, com fibrose pulmonar, bronquiectasias e declínio progressivo da

função pulmonar. Na ABPA os testes cutâneos dão frequentemente positivos para os fungos em questão. A IgE sérica total costuma alcançar níveis acima de 1000ng/ml e pesquisa de IgE ou IgG específicas geralmente são importantes para o diagnóstico (Greenberger, 2002). Vários alérgenos de *Aspergillus fumigatus* e de outros fungos implicados nesta doença têm sido caracterizados não só para se entender melhor sua patogenia, como também para melhorar as técnicas de diagnóstico (Horner et al., 1995). Do ponto de vista imunopatológico, apesar da ABPA não ser totalmente entendida, sabe-se que há reação de hipersensibilidade tipo I, mediada por IgE, e reação tipo III, mediada por IgG. É induzida resposta imune celular linfocitária com padrão Th2CD4+ e são produzidas interleucinas que aumentam a inflamação eosinofílica. Além disso, IL-10, mutações do gene CFTR (em pacientes com fibrose cística) e polimorfismo HLA-DR estão implicados na imunopatogenia da ABPA (Vlahakis e Aksamit, 2001).

c) Sinusite fúngica alérgica: é um tipo de afecção dos seios paranasais que deve ser considerada em pacientes com sinusite crônica que não respondem satisfatoriamente ao tratamento convencional com antibacterianos. Acomete pessoas atópicas, imunocompetentes, e se acompanha de polipose nasal e sinusal. Tem como característica a produção de um muco espesso, amarelado e malcheiroso conhecido por “mucina alérgica” que é uma mistura de células inflamatórias degeneradas, principalmente eosinófilos, e hifas esparsas que só são visualizadas em colorações especiais. Apesar de se diferenciar da sinusite fúngica invasiva que acomete indivíduos imunodeficientes e que geralmente tem caráter

fulminante, a sinusite fúngica alérgica pode ter um caráter invasivo e, quando não convenientemente tratada, avança em direção à órbita podendo atingir o cérebro. Vários fungos já foram descritos como causadores desse tipo de sinusite, destacando-se os gêneros *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Drechslera*, *Helminthosporium* e *Fusarium*. Seus antígenos desencadeiam reação tipo I e tipo III, o que ocasiona extensa reação inflamatória semelhante a ABPA (Marple, 2001; deShazo et al., 1997). Há na literatura médica descrição de casos onde as duas patologias ocorrem num mesmo paciente, o que levou os autores a sugerirem o termo “micose sinobrônquica alérgica” (Venarske e deShazo, 2002). Da mesma forma que na ABPA, os pacientes com sinusite fúngica alérgica apresentam altos títulos de IgE (geralmente acima de 1000 U/ml) e testes cutâneos positivos aos fungos em questão (Marple, 2001).

Participação dos fungos na asma e na rinite

Segundo Horner et al. (1995) a alergia a fungos, apesar de já estar bem documentada, é mais difícil de diagnosticar comparativamente a outros alérgenos e poucos pesquisadores têm focado a relação entre doenças alérgicas respiratórias induzidas por IgE e fungos.

Os principais fungos alergênicos são: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Helminthosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, *Trichothecium*, *Ulocladium*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Epicoccum* e *Stemphylium*. Os fungos mais importantes

como alérgenos encontrados em ambientes intradomiciliares são o *Penicillium* e o *Aspergillus*, enquanto que *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Fusarium*, etc. podem ser encontrados tanto externamente quanto intradomiciliarmente. (Kurup et al., 2000).

Entretanto, não apenas fungos mitospóricos podem se comportar como alérgenos; há evidências crescentes de que os basideomicotas também o são (Santilli et al., 1985; Hasnain et al., 1985; Helbling et al., 1998; Helbling et al., 1999; Croce et al., 2001; Chavasco et al., 1997).

No que diz respeito à rinite há trabalhos mostrando que pacientes portadores deste problema, principalmente os com doença crônica, apresentam mais sensibilização a fungos em relação a grupos controles (Stroud et al., 2001; Corey et al., 1997). Num outro estudo, os autores encontraram sensibilização ao fungo *Candida albicans* estatisticamente superior em pacientes portadores de rinite grave com polipose nasal (Asero e Bottazzi, 2000). Fadel et al. (1992) realizaram testes de nasoprovação em pacientes com rinite alérgica sensibilizados a fungos e encontraram mais positividade nesse grupo do que nos controles. Entretanto, outros pesquisadores obtiveram taxas inexpressivas de sensibilização a fungos em pacientes com rinite alérgica (Reijula et al., 2003; Wu et al., 1999). É possível que tais discrepâncias devam-se, em parte, a variações ambientais e, em parte, a diferenças metodológicas na avaliação do diagnóstico de hipersensibilidade a fungos. Como será comentado adiante, a maioria dos extratos alergênicos de fungos não é padronizada, o que acarreta variações nos resultados obtidos.

Com relação à asma, algumas pesquisas mostram associação positiva entre quantidade de esporos aéreos e crises de asma, sugerindo que os fungos têm

participação no desencadeamento dos sintomas nesta doença (Salvaggio et al., 1971; Hasnain et al., 1985; Peat et al., 1994; Rosas et al., 1998; Lewis et al., 2000; Rutherford et al., 2000; Dales et al., 2003). Alguns trabalhos analisaram separadamente possíveis fatores que pudessem ter influência sobre as crises de asma, como aumento de pólen e poluição ambiental, além da concentração de esporos no ar, e concluíram que esta última foi o item que mais se correlacionou com as crises em estudos estatísticos de análises de variância (Black et al., 2000; Lewis et al., 2000; Rutherford et al., 2000; Rosas et al., 1998; Targonski et al., 1995). Além disso, parece haver relação entre sensibilização a *Alternaria alternata* e risco de desenvolvimento de asma em crianças (Nelson et al., 1999; Halonen et al., 1997; Peat, et al., 1993).

Para se comprovar a relação causal entre asma e fungos, Licorish et al. (1985) realizaram testes de provocação com extratos e com esporos intactos de *Alternaria* e *Penicillium* em pacientes que se apresentavam fortemente sensibilizados a esses fungos. Observaram que uma resposta asmática imediata foi obtida tanto na provocação com extratos como na com esporos intactos, sendo que para vários pacientes mesmo quantidades pequenas de esporos – e que simulavam as encontradas em exposições naturais - foram suficientes para provocar broncoespasmo. Também observaram que reação tardia foi obtida quando a provocação foi realizada com esporos inteiros e concluíram que *Alternaria* e *Penicillium* são potentes imunopatógenos para indução de asma. Beaumont et al. (1985c) estudaram um grupo de pacientes fortemente sensibilizados a fungos e obtiveram também testes de broncoprovocação positivos aos fungos testados. Além disso, observaram que os

períodos de piora de sintomas asmáticos coincidiam com os picos de maior quantidade de esporos coletados nas residências desses pacientes.

Ward et al. (1999) demonstraram relação entre *Trichophyton sp* e asmáticos portadores de onicomicoses. Nesse estudo duplo cego placebo controlado os autores observaram que pacientes com micose de pele e/ou unhas sensibilizados àquele fungo, beneficiavam-se com tratamento com fluconazol obtendo melhora da reatividade brônquica específica ao fungo e melhora clínica da asma (avaliada em termos da redução da quantidade de medicamento utilizado para o controle da doença).

Kauffman et al. (1995), numa revisão sobre as possíveis causas de obstrução aérea por sensibilização a fungos, sugeriram que a mesma seja causada por dois tipos de mecanismos: o primeiro é uma reação asmática não complicada devido à exposição transitória a esporos de fungos, o que resulta numa resposta TH-2 com produção de IgE e inflamação eosinofílica; a segunda é mais complexa e causada pela colonização da superfície muco epitelial através de proteases produzidas pelo fungo, o que estimula uma resposta imune exagerada, com produção de todas as subclasses de anticorpos contra o microorganismo e um conseqüente infiltrado eosinofílico intenso nas vias aéreas. Isto explicaria a gravidade de certos quadros de asma com hipersensibilidade a fungos.

Demonstrou-se, também, que as células epiteliais das vias respiratórias interagem com proteases de fungos alergênicos, resultando na liberação de IL-6 e IL-8. Essas proteases podem causar alterações morfológicas nessas células, com a conseqüente descamação epitelial e morte celular (Tomee et al., 1997; Kauffman et al., 2000).

Além de serem agentes sensibilizantes que podem causar doenças respiratórias, os fungos estão relacionados a um pior prognóstico em pacientes com asma. Diversos trabalhos correlacionam a sensibilização a fungos com quadros mais graves (O'Hollaren et al., 1991; Delfino et al., 1997; Neukirch et al., 1999; Black et al., 2000; Zureik et al., 2002) e mostram que estes alérgenos estão mais relacionados com gravidade de asma do que outros, inclusive ácaros (Black et al., 2000; Ross et al., 2000). Em crianças, a sensibilização a *Alternaria* relaciona-se a maior queda do VEF1 em testes de broncoprovocação, comparativamente a outros aeroalérgenos, o que sugere que esse fungo tenha um papel importante na modulação da hiperreatividade brônquica (Nelson et al., 1999; Peat et al., 1993).

Ademais, aumento da mortalidade por asma também parece estar associado com sensibilização a fungos. Numa pesquisa, a taxa de morte por asma foi 2,16 vezes mais alta quando a taxa de esporos mostrou-se superior a 1000 esporos/m³ de ar (Targonski et al., 1995). Num outro estudo, a sensibilização a *Alternaria alternata* foi da ordem de 91% no grupo que teve episódios de asma com parada cardiorrespiratória (inclusive com dois óbitos) versus grupo controle (pacientes com asma sem referência de crises graves), cuja taxa de sensibilização foi de 31% (O'Hollaren et al., 1991).

Esse pior prognóstico com relação à asma faz com que a identificação dos pacientes sensibilizados a fungos seja de grande importância já que, diferentemente dos alérgenos intradomiciliares, os esporos são inalados também no ambiente externo sendo mais difícil seu controle. Assim, saber-se quando há mais esporos no ar e quais são os mais frequentes numa certa região passa a ter grande relevância para os

indivíduos com asma sensibilizados a fungos já que estes pacientes devem ser monitorados mais de perto nos períodos de maior concentração de esporos.

Dificuldades no diagnóstico de hipersensibilidade a fungos

Apesar de todas as evidências citadas, a importância dos fungos na etiopatogenia das doenças alérgicas respiratórias é frequentemente subestimada (D'Amato e Spieksma, 1995). Isto decorre da dificuldade em se padronizar extratos quer para testes cutâneos, quer para dosagens séricas de IgE específica. Tal dificuldade explica-se pelo fato de poucos fungos terem sido estudados com detalhes e a grande maioria aguarda melhor caracterização quanto a seus aspectos antigênicos. Além disso, há muita reatividade cruzada entre os vários antígenos fúngicos e até fungos da mesma espécie, quando crescem em culturas diferentes, podem apresentar perfis antigênicos diversos. Também são fatores importantes na padronização de extratos: o meio de cultura onde o fungo é cultivado, o uso de esporos e/ou micélio, as condições de armazenamento, a presença de preservativos e o processo de liofilização, fatores estes que podem resultar em extratos diferentes para uma mesma espécie de fungo (Hoffman et al., 1981; Menezes et al., 1995; Schwartz, 1995; Gupta et al., 1999; Kurup et al., 2000; Esch, 2004).

Poucos antígenos fúngicos já foram purificados e clonados, como alguns de *Aspergillus fumigatus* (Asp f 1, Asp f 2, Asp f 6, Asp f 12, etc.), *Alternaria alternata* (Alt a 1, Alt a 2, Alt a 3, etc.), *Cladosporium herbarum* (Cla h 1, Cla h 2, Cla h 3, etc.) e *Penicillium sp* (Pen ch 13, Pen c 3, etc.). A purificação de alérgenos fúngicos é importante para o desenvolvimento de um diagnóstico mais fidedigno, tanto pelo

uso de técnicas de laboratório, quanto para testes alérgicos (Bush e Portnoy, 2001; Kurup et al., 2002).

Sensibilização aos fungos anemófilos

Apesar de todas as dificuldades descritas para se obter extratos de qualidade, os testes cutâneos constituem-se ainda nos instrumentos mais utilizados no diagnóstico de sensibilização a fungos. Embora os testes de puntura sejam mais utilizados, os intradérmicos permitem a identificação de um maior número de pacientes clinicamente reativos, especialmente aqueles com baixa sensibilidade ao teste de puntura. Além disso, sensibilidade a extratos alergênicos de baixa potência pode ser mais bem avaliada por esse método. Entretanto, os testes de puntura são mais específicos que os intradérmicos e estes últimos podem dar mais reações sistêmicas. As reações tardias, comuns nos testes intradérmicos, caracterizam-se por eritema, enduração e edema que se desenvolvem progressivamente no local da reação imediata. Elas tornam-se aparentes após 1-2 horas da aplicação, atingindo um pico entre 6-8 horas e desaparecem após 24- 48 horas. O significado dessa resposta ainda não é totalmente compreendido. Charlesworth (1997), num trabalho de revisão sobre reação cutânea tardia, propõe que ela seja útil para compreender respostas tardias a alérgenos em sítios menos acessíveis como as vias respiratórias. Porém, para outros autores, esse tipo de reação parece não ter um valor aditivo ao diagnóstico de alergia clínica (Bernstein e Stromrs, 1995).

Indivíduos alérgicos a fungos freqüentemente mostram sensibilidade a mais de um deles, provavelmente devido à reatividade cruzada entre as diferentes proteínas

dos diversos fungos. Estudo com *Epicoccum nigrum* evidenciou que esse fungo tem sensibilidade cruzada com *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata* e *Penicillium citrinum* (Bisht et al., 2002). Estas observações estão de acordo com Gupta et al. (2002) que demonstraram haver reatividade cruzada entre *Curvularia lunata* e *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani* e *Cladosporium herbarum* e concluíram que entre os principais alérgenos fúngicos, as proteases, enolases e desidrogenases são as principais proteínas que dão reatividade cruzada. Hemmann et al. (1996) também demonstraram reatividade cruzada entre *Aspergillus fumigatus* e *Candida boidinii*.

A idade é um fator a ser considerado nos testes alérgicos, uma vez que nos extremos da vida a reatividade cutânea é menor. Niemeijer e De Monchy (1992) observaram que a reatividade à histamina alcança um pico aos 15 anos e, excetuando-se pólenes, a prevalência de sensibilidade a testes cutâneos diminui com a idade.

São poucos os trabalhos na literatura médica que estudam a sensibilização a fungos e sua importância nas doenças alérgicas respiratórias. Estima-se que 20-30% de indivíduos atópicos, ou até 6% da população geral esteja sensibilizada a fungos (Kurup et al., 2000). Entretanto, há muita variação quanto às taxas de sensibilização obtidas por diferentes pesquisadores. Isso decorre possivelmente de dois fatores: a diferença real de sensibilização que evidencia a maior ou menor exposição a certos fungos dependendo da área estudada e a diferença causada pela utilização de extratos não padronizados. Para exemplificar a primeira, a pesquisa de Croce, et al. (2001) e de Chavasco et al. (1997) são bem ilustrativas. Os fungos *Hemileia vastatrix* e *Pisolithus tinctorius*, que são contaminantes de café e eucalipto, respectivamente,

sensibilizaram mais os trabalhadores rurais que se ocupavam dessas culturas do que a população dos indivíduos residentes naquela área e que não trabalhavam com tais plantações. Entretanto, a segunda diferença citada não é decorrente de uma real disparidade entre as taxas de sensibilização e sim de diferenças entre extratos, o que dificulta a comparação entre os diversos trabalhos. Para citar um exemplo, D'Amato e Spieksma (1997) utilizaram em sua pesquisa três extratos de laboratórios diferentes para testar *Alternaria* e *Cladosporium*. Observaram diferenças significantes entre os extratos de um mesmo fungo na mesma população estudada.

Essa diferença metodológica dificulta a comparação entre as taxas de sensibilização entre os diversos autores e pode explicar em parte a grande diversidade observada.

Prince e Meyer (1976) acreditam que a incidência de alergia por fungos nos EUA é muito maior do que se acreditava previamente. Na experiência destes autores, 21% de pacientes na área central de Houston e 29% no Texas estavam sensibilizados a fungos. Altas taxas de sensibilização também foram observadas por outro grupo de pesquisadores americanos (Santilli et al., 1985) que testaram, através de teste intradérmico, um grupo de 200 pacientes com asma e/ou rinite com extratos de basideomicotas preparados pelos autores e obtiveram até 81% de positividade em asmáticos e até 36% em pacientes apenas com rinite. No Canadá, Tarlo et al. (1988) obtiveram até 57% de positividade numa pesquisa com 30 pacientes com asma e/ou rinite utilizando testes de puntura e diferentes extratos, quer comerciais quer preparados para a pesquisa. Nelson et al. (1999), num estudo multicêntrico envolvendo EUA e Canadá, testaram 1048 crianças asmáticas de 5 a 13 anos, através de testes de puntura, e encontraram até 37% de positividade aos fungos testados. Na

Finlândia e Suécia Malling et al. (1985) obtiveram 80% de positividade a pelo menos um fungo ao realizarem teste de puntura numa amostra de 130 pacientes adultos e crianças. Chew et al. (2000) testaram pacientes atópicos em Singapura e encontraram 82,7% de positividade (testes de puntura), com extratos preparados pelos autores.

Entretanto, pesquisadores em outras regiões do globo encontraram taxas de sensibilização menos expressivas, como Beaumont et al. (1985b), que estudaram pacientes asmáticos na Holanda através de testes intradérmicos com extratos comerciais e verificaram que apenas 4,6% deles eram positivos à bateria de fungos testada. Também na Europa, D'Amato e Spieksma (1997) estudaram a prevalência de sensibilização a *Alternaria* e *Cladosporium* (testes de puntura) num estudo envolvendo 20 centros europeus. No geral, 9,46% dos indivíduos eram sensibilizados a um ou outro fungo. Desses pacientes, 20% eram da Espanha. Porcentagens inferiores foram encontradas na Alemanha, Grécia e Áustria, e a menor porcentagem em Portugal (3%). Katz et al. (1999) realizaram em Israel testes de puntura em população geral entre 4-70 anos e encontraram 10,6% de positividade aos extratos fúngicos.

Os fungos que mais causaram sensibilização foram os mitospóricos destacando-se *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Curvularia* (Malling et al., 1985; Tarlo et al., 1988; Katz et al., 1999; Chew et al., 2000).

Também no Brasil, algumas pesquisas foram realizadas para se conhecer a prevalência de sensibilização a fungos. No geral, as taxas de sensibilização são expressivas, situando-se acima de 30% e são também os fungos mitospóricos que aparecem com maior frequência:

- Passarelli, em 1952, pesquisou através de testes intradérmicos, um grupo de pacientes com alergias respiratórias e obteve 69% de positividade aos fungos testados. Tais fungos, pela ordem de sensibilização, foram: *Fusarium*, *Rhizopus* e *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*, *Rhodotorula* e leveduras e *Trichoderma*.
- Mendes e Lacaz (1952) realizaram testes cutâneos intradérmicos em 72 pacientes com asma e/ou rinite, utilizando extratos preparados pelos autores. Encontraram 58,3% de testes positivos, sendo que os fungos testados apresentaram as seguintes taxas de positividade: *Rhizopus*: 41,7%, *Monilia*: 27,7%, *Penicillium*: 22,2%, *Cladosporium*: 22,2% e *Aspergillus*: 11,1%.
- Faria (1967b) testou 50 pacientes atópicos (história de asma e/ou rinite e testes positivos a ácaros), utilizando extratos comercializados de *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Pullularia*, por via intradérmica. Encontrou 32% de positividade e nos pacientes com testes positivos a distribuição, de acordo com os gêneros de fungos foi: *Cladosporium*: 56,25%, *Penicillium*: 87,5%, *Aspergillus*: 62,5% e *Pullularia*: 50%.
- Mohovic et al (1988) realizaram testes intradérmicos em 201 pacientes com um extrato polivalente obtido da mistura de 42 gêneros de fungos (extratos preparados pelos autores). Obtiveram 34,8% de positividade. Entretanto, ao retestar esses pacientes positivos utilizando os extratos separadamente, a positividade foi de 70,3%, e retestando com extratos polivalentes com menor número de fungos cada um, a positividade foi de 80% (esse último grupo também foi submetido aos 42 testes individuais, além dos extratos combinados em menor número).

- Pinto et al. (2003) estudaram trabalhadores da indústria citrícola do interior de São Paulo que têm contato com péletes de laranja os quais são altamente contaminados por fungos. Esses pacientes apresentavam 92% de sensibilização diagnosticada através de IgE sérica e 38% através de testes de puntura.

Há também trabalhos cujas taxas de sensibilização são menores, como:

- Lacaz et al. (1958) testaram pacientes classificados em quatro grupos, a saber: portadores de asma, de rinite, de ambas as doenças e de outras doenças alérgicas não respiratórias. Utilizaram extratos preparados dos seguintes fungos: *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium*. Obtiveram, de um modo geral, 5,04% de positividade no grupo dos portadores de alergias respiratórias e 3,97% no grupo de alergias não respiratórias. Observaram também que o grupo com asma teve maior positividade em relação aos demais: 7,28% nos casos de portadores apenas de asma e 5,75% nos com asma e rinite. Os pacientes que apresentaram apenas rinite tiveram 2,11% de positividade. *Rhizopus* foi o fungo mais sensibilizante (7,29%), seguido de *Aspergillus* (4,92%), *Mucor* (4,67%), *Cladosporium* (3,62%) e *Penicillium* (3,37%).
- Brunini e Correa (1967) testaram um grupo de pacientes com asma e/ou rinite através de testes intradérmicos com extrato de *Alternaria* preparado pelos autores e obtiveram 14,7% de positividade para asmáticos e 12,5% para portadores de rinite.

Alguns trabalhos brasileiros foram realizados para se pesquisar a incidência de sensibilização em populações gerais comparando-se com pacientes com asma e/ou rinite:

- Gambale et al. (1993) testaram trabalhadores de uma biblioteca onde se pesquisou os fungos mais prevalentes. Do total de 314 profissionais 6% apresentaram reações cutâneas fortemente positivas, sendo que mais de 60% desse grupo tinha sintomas alérgicos.
- Chavasco et al. (1997), estudaram o fungo *Pisolithus tinctorius* que é um basideomicota que contamina plantações de eucalipto. Os autores prepararam extratos desse fungo e fizeram testes cutâneos em trabalhadores de reflorestamento, em outros trabalhadores rurais e em estudantes, obtendo taxas significativamente aumentadas no primeiro grupo (28,20%; 6,40% e 3,78%, respectivamente). Do total de pacientes sensibilizados quase 83% apresentavam asma e/ou rinite.
- Croce, et al. (2001) testaram extratos de *Hemileia vastatrix* que é um fungo conhecido por “ferrugem do café” por atacar esse tipo de cultura. Esses autores obtiveram taxas de sensibilização significativamente elevadas entre pacientes atópicos residentes em áreas cafeicultoras (14,72%) em relação a não residentes (5,93%).

Nesses três últimos trabalhos nota-se que apesar de existir sensibilização a fungos entre pessoas sem doenças atópicas, ela é significativamente maior entre os portadores de asma e rinite. Observa-se também a importância de outros fungos que não são rotineiramente pesquisados nos pacientes com alergias respiratórias e que

podem se comportar como alérgenos, como os basideomicotas. Apesar disso, os fungos mitospóricos são os mais pesquisados e, ainda que existam pesquisas onde as taxas de sensibilização tenham sido baixas, a maioria delas aponta para a importância dos fungos como agentes sensibilizantes.

C- O ESTUDO DOS FUNGOS ANEMÓFILOS

Pelas razões expostas, o diagnóstico de sensibilização a fungos é de importância inquestionável para pacientes com asma e rinite. Entretanto, como a quantidade de fungos anemófilos é muito grande, mister se faz a pesquisa dos fungos mais prevalentes numa certa região para ter-se um painel de antígenos condizentes com a realidade do local em questão (Horner, et al., 1995). Esta seria uma condição ideal, porém, como já citado, não há extratos padronizados para a maioria dos fungos. Desta forma, a pesquisa de esporos anemófilos também poderia orientar quais os fungos cujos extratos precisam ser desenvolvidos prioritariamente.

Segundo Takahashi (1997), ao se fazer um estudo epidemiológico sobre fungos, é essencial observar-se o seguinte:

- I) O tipo de aparelho que se utiliza para se coletar tais fungos;
- II) O meio de cultura utilizado;
- III) A altura do local das coletas;
- IV) A necessidade de se coletar durante todo um ano para se relacionar o crescimento desses fungos às diferentes estações (fatores meteorológicos);
- V) O horário das coletas.

I) Coletores de esporos

A maioria das partículas alergênicas carregadas na atmosfera está entre 2-60 micra. Tanto as moléculas sensibilizadoras quanto seus carreadores formam unidades em aerossol, descritas como aeroalérgenos. As partículas suspensas respondem continuamente aos movimentos das correntes aéreas e, uma vez em movimento,

tendem a permanecer em cursos aproximadamente lineares. Entretanto, essas vias nas quais as partículas trafegam sofrem influência da gravidade, da interação com outras partículas da atmosfera e das mudanças de velocidade no meio gasoso. Tais forças fazem com que essas partículas se desviem da corrente aérea na qual trafegam. Além disso, esse desvio é grandemente influenciado pelo tamanho da partícula. Quanto maior seu tamanho, mais provável que sofra a ação da gravidade, da fricção com outras partículas e do impacto de superfícies interpostas nessas correntes e mais facilmente se desprenda das mesmas. Por isto, captadores por gravidade são seletivos para partículas de maior porte (Midleton et al, 1998). O método gravitacional ainda apresenta a desvantagem de não permitir a coleta em dias com chuva ou neve (Salvagio e Aukrust, 1981).

Os coletores volumétricos começaram a ser desenvolvidos por Pasteur, em 1887, mas foi só em 1945 que May desenvolveu um aparelho mais moderno e que se baseava no princípio de impactação em cascata (Ingold, 1971). Mais tarde, em 1952, Hirst aperfeiçoou esse captador de esporos e, posteriormente, o captador de Burkard foi desenvolvido, baseado no de Hirst (Southworth, 1974). Em 1958, Andersen utilizou também o princípio de cascata, mas acrescentou placas de Petri contendo ágar para cultura dos fungos captados (Ingold, 1971).

De acordo com Salvagio e Aukrust (1981) os aparelhos para coleta de esporos, além de mais precisos que o método gravitacional, permitem uma avaliação semiquantitativa.

Os captadores por rotação (como os modelos Rotorod, Rotobar e Rotoslide) são simples, portáteis e possuem eficiência em torno de 50-90%. Entretanto, também são

menos eficientes para esporos pequenos, os quais tendem a ser carregados na corrente aérea ao redor das hastes de rotação, devido à sua massa insuficiente.

O coletor de Burkard funciona aspirando certa quantidade de ar através de um orifício, com subsequente impactação dos esporos numa superfície adesiva. Ele é orientado pelo vento de forma que o orifício de entrada do ar sempre está direcionado para a corrente aérea. É útil para a captura de esporos grandes e pequenos, porém, podem ocorrer erros de avaliação da quantidade total de esporos se a velocidade do vento não for a mesma da sucção. Assim, quando o vento sopra em alta velocidade, partículas pequenas podem ser defletidas dando uma contagem falsamente reduzida. O contrário ocorre quando a velocidade do vento é muito baixa. Outra desvantagem de métodos que utilizam lâminas com adesivos para a captura de esporos é a dificuldade na identificação dos mesmos que, muitas vezes, são bastante semelhantes e podem, inclusive, ser confundidos com outras partículas em suspensão no ar.

Outros coletores, como o Andersen (Figura 1), combinam os métodos de sucção e impactação com placas de Petri com meios de cultura. Nesse tipo de coletor, várias placas são colocadas umas sobre as outras da base ao topo, e entre elas há uma separação formada por placas metálicas com poros, como se fossem peneiras, através dos quais passa o ar. Tais poros têm tamanhos decrescentes, de forma que os esporos maiores são depositados nas primeiras placas, enquanto que os menores vão passando para as placas inferiores até a última, dependendo de seu tamanho. Este coletor também pode dar resultados falsamente altos ou baixos, de acordo com a velocidade do vento, como já falado sobre o Burkard. Importa considerar que diferentemente deste último, que permanece em funcionamento por longos períodos,

o Andersen deve ser operado apenas por alguns minutos. Caso contrário, há crescimento excessivo de fungos nas placas o que dificulta sua identificação.

Desenho esquemático e fotografia do coletor de esporos Andersen

Figura 1. À esquerda observa-se um esquema ilustrativo das seis placas do aparelho Andersen sobre as quais se localizam peneiras com furos de diâmetros cada vez menores. O ar entra na porção superior, passa pelas placas e sai na parte inferior de forma que os esporos vão se depositando nessas placas de acordo com seu tamanho; à direita, fotografia do aparelho.

Fonte: <http://www.aeoliandust.com/users/syabuki/andersen.html>

Frenz et al. (1999) realizaram extensa revisão dos trabalhos publicados entre 1966 e 1996 em duas importantes revistas de Alergia (Annals of Allergy e Journal of Allergy) encontrando sessenta e uma pesquisas sobre prevalência de fungos e pólenes em diversas cidades dos EUA e do mundo. Segundo esses autores, os estudos realizados antes da década de 70 utilizavam o método gravitacional para coleta, e,

dada à limitação do mesmo, esses trabalhos têm de ser analisados com cautela. Após a data supracitada passou-se a utilizar preferencialmente instrumentos volumétricos para a captura de esporos

Segundo Southworth (1974) não há um único método ideal de coleta e os diferentes métodos podem ser utilizados dependendo do estudo a ser realizado. Essa autora utiliza o coletor de Burkard para coletas rotineiras, o coletor de Andersen quando quer identificar os fungos nas culturas e o Rotorod quando deseja fazer pesquisas em certos lugares onde esse coletor apresenta a vantagem da praticidade.

Frenz (1999) comparou o coletor de Burkard com o Rotorod chegando a conclusões semelhantes, ou seja, que ambos são instrumentos confiáveis e adequados para pesquisa de esporos, sendo que o primeiro destina-se preferentemente a partículas menores que 10 micra, enquanto que o segundo a esporos acima desse tamanho.

Questão importante a ser levantada ao se coletar esporos é a observação de que algumas espécies de fungos, muito comuns no solo, podem não ser capturadas no ar, levando-se a resultados falso negativos. Além disso, várias espécies não crescem nos meios de cultura e/ou condições de incubação habituais. Entretanto, as coletas de esporos são representativas, de uma forma geral, da ocorrência concentração de fungos em certa região (Burge, 2002).

II- Meios de cultura

A maioria dos trabalhos cita o meio de Sabouraud (Buck e Gambale, 1985; Faria, 1967(a); Fiorini et al., 1985; Gambale et al., 1981; Gambale et al., 1983; Lawande e Onyemelukwe, 1984), sendo que alguns acrescentam a tetraciclina a esse meio (Lima e Gadelha, 1983; Martinez et al., 1986; Moraes e Lima, 1986; Purchio et al., 1984). Outros adicionam sacarose (Requejo, 1975), glicose com cloranfenicol e estreptomicina (Urrutia et al., 1976), ou gentamicina (Vieira et al., 1989).

Gravessen (1972) usa o meio V8 - ágar, o qual é constituído de ágar enriquecido com suco vegetal contendo tomate, cenoura, aipo, beterraba, salsa, alface, agrião e espinafre.

Outros trabalhos utilizam ainda ágar com Rosa Bengala e estreptomicina (Agarwal et al., 1969; Bunnag et al., 1982; Khan et al., 1999); batata dextrose ágar (Barkai-Golan et al., 1977; Levetin e Horowitz, 1978); littman oxgell ágar (Collins-Williams et al., 1973), glicose ágar e celulose Czapek ágar com rosa bengala (Abdel-Hafez, 1984; Abdel-Hafez et al., 1986), malte ágar (Li e Hsu, 1997; Vicens e Fernández, 1984) e apenas ágar (Rosas et al., 1993).

Airaudi e Marchisio (1996) utilizaram o meio Dermasel - ágar contendo ciclohexamida e cloranfenicol. O ciclohexamida é um inibidor da síntese protéica do citosol que inibe o crescimento de vários tipos de fungos saprofíticos, principalmente os de crescimento rápido e que impedem o desenvolvimento de outros fungos que demoram mais para se desenvolver. Segundo o autor, esse meio não é bom para pesquisa quantitativa, mas sim quando se quer estudar a presença de certos tipos de fungos de crescimento mais lento.

Alguns trabalhos utilizam vários meios simultaneamente (Al-Suwaine et al., 1999; Iovannitti e Tiraboschi, 1985; Kwaasi et al., 1998; Pinheiro et al., 1966), sendo que Takahashi (1997) compara os meios DG18 (ágar com dicloran a 18%) e BDA (batata dextrose ágar) concluindo que o crescimento de fungos é significativamente maior naquele do que neste.

Ogunlana (1975) comparou os meios Sabouraud dextrose ágar com o malte ágar e concluiu que ambos são similares, exceto pelo fato de um fungo em especial - o *Pithomyces* - crescer melhor no malte ágar.

III- Altura das coletas

A maioria dos trabalhos que faz referência à altura da exposição das placas para a captura de esporos utiliza como critério o tamanho médio do indivíduo adulto (aproximadamente entre 1,5 a 2,0 metros que é onde estaria ocorrendo a inalação desses fungos) (Agarwal et al., 1969; Airaudi e Marchisio, 1996; Barkai-Golan et al., 1977; Buck e Gambale, 1985; Faria, 1967a; Fiorini et al., 1985; Gambale et al., 1983; Gambale et al., 1981; Lawande e Onyemelukwe, 1984; Li e Hsu, 1997; Pecher et al., 1988; Purchio et al., 1984; Rosas et al., 1993; Vieira et al., 1989). Entretanto, há trabalhos onde a captura ocorre em topos de edifícios (Collins-Williams et al., 1973; Abdel-Hafez et al., 1986; Abdel-Hafez, 1984; Murgia, 1984; Li e Kendrick, 1995).

IV- Horário das coletas

Gambale et al. (1983) encontraram, de um modo geral, a ocorrência de maior número de fungos às 15 horas. Explicam que o período entre 9 e 15 horas é o que apresenta maior quantidade de sol e que a iluminação é um fator positivo para a esporulação, sendo o período noturno o mais propício para o crescimento vegetativo. A dispersão de fungos aumenta com a elevação da temperatura, da velocidade do vento e da insolação horária e diminui com a pressão barométrica e umidade relativa. Como os autores fizeram coletas em diferentes horários, observaram que determinados fungos não foram afetados pela ação de alguns desses fatores em certos horários e sim quando a pesquisa foi feita num outro momento, o que sugere uma intrincada relação entre os vários fatores meteorológicos e o crescimento de um fungo em especial.

Purchio et al. (1984) observaram que o aumento da intensidade luminosa diminui a captura de fungos no ar, enquanto que o aumento da pressão atmosférica aumenta a referida captura.

Nussbaum (1991) encontrou esporos em maior quantidade ao meio dia e em menor número no decorrer da tarde, sendo que à noite, a população de esporos aumenta novamente.

Al-Subai (2002) observou que ao meio dia a quantidade de esporos aumenta e à meia noite e 6h00 da manhã há os menores índices de esporos no ar. Também verificou que quanto maior a velocidade do vento maior a quantidade de esporos.

D- IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ANEMÓFILOS

Diversas pesquisas em diferentes regiões do planeta foram realizadas para se identificar os fungos anemófilos (Abdel-Hafez, 1984; Agarwal et al. 1969; Airaudi e Marchisio, 1996; Al-Doory et al., 1980; Al-Doory et al., 1982; Al-Suwaine et al., 1999; Aller et al., 1971; Almodóvar, 1977; Barkai-Golan et al., 1977; Barnes et al., 2000; Beaumont et al., 1985a; Bunnag et al., 1982; Çolakoglu, 1996; Collins-Williams et al., 1973; Cosentino et al., 1990; D'Amato et al., 1984; D'Amato e Spieksma, 1995; Davies, 1969; Dupont et al., 1967; Goodman et al., 1966; Hariri et al., 1978; Iovannitti e Tiraboschi, 1985; Katial et al., 1997; Khan et al., 1999; Levetin e Horowitz, 1978; Li e Hsu, 1997; Licorish et al., 1985; Mangiaterra et al., 1993; Martinez et al., 1986; Moustafa e Kamel, 1976; Murgia, 1984; Nussbaum, 1991; Ogunlana, 1975; Özkaragöz, 1969; Phanichyakarn et al., 1974; Piontelli e Velasco, 1974; Rosas et al., 1993; Shadzi et al., 1993; Takahashi, 1997; Thakur, 1977; Torras et al., 1881; Urrutia et al. 1976; Venegas et al., 1968; Vicens e Fernández, 1984; Yossef e Nagib, 1966).

Os fungos mais prevalentes e que aparecem em todas as regiões estudadas são: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Epicoccum* e leveduras. Outros como *Stemphylium*, *Phoma*, *Drecheslera*, *Pullularia*, *Papularia*, *Geotrichum*, *Botrytis*, *Aureobasidium*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Monilia*, *Curvularia*, *Cephalosporium* e *Rhodotorula*, embora presentes na maioria dos trabalhos, aparecem numa proporção menor do que o grupo anteriormente descrito. Alguns fungos são citados mais esporadicamente e fazem parte da flora anemófila de uma região mais específica, como, por exemplo, é o caso dos fungos *Ustilago*, *Erysiphe*, *Ganoderma* e *Leptosphaeria* que aparecem de forma significativa

no Kuwait (Thakur, 1977), refletindo as condições peculiares de clima e relevo daquele país.

No Brasil, alguns pesquisadores estudaram os fungos anemófilos nas cidades abaixo relacionadas (Tabela 1-A, B e C e Tabela 2A e B). Nota-se que os fungos mais prevalentes são também os “dominantes universais”. Entretanto, há fungos mais prevalentes em algumas regiões, como *Neurospora* que chega a atingir quase 36% de frequência relativa na Amazônia e *Curvularia*, que foi encontrada em 68,3% em Belém do Pará.

Tabela 1 A – Frequências relativas de fungos anemófilos em algumas cidades brasileiras

Alecrim e Teixeira 1958 Recife - PE	Buck e Gambale 1985 Presidente Prudente - SP	Costa (Belém do Pará - PA) apud Lacaz e Mendes -1963	Faria- 1967b Belo Horizonte- MG	Fiorini et al. 1985 Alfenas - MG	Gambale et al.- 1977 Grande São Paulo - SP	Godoy-1976 Curitiba - PR
<i>Aspergillus</i> 25%	<i>Cladosporium</i> 74,3%	<i>Curvularia</i> 68,3%	<i>Cladosporium</i> 96,6%	<i>Cladosporium</i> 35,8%	<i>Cladosporium</i> 64,8%	<i>Aspergillus</i> 43,4%
<i>Penicillium</i> 17%	<i>Aspergillus</i> 55,8%	<i>Aspergillus</i> 63,8%	<i>Penicillium</i> 68,3%	<i>Penicillium</i> 16,7%	<i>Epicoccum</i> 51,7%	<i>Penicillium</i> 43,1%
<i>Fusarium</i> 8%	<i>Monascus</i> 44,2%	<i>Penicillium</i> 36,6%	<i>Aspergillus</i> 65,0%	<i>Alternaria</i> 9,1%	<i>Rhodotorula</i> 48,9%	<i>Cladosporium</i> 32,9%
<i>Curvularia</i> 7%	<i>Aureobasidium</i> 37,2%	<i>Mucor</i> 26,9%	Leveduras 41,6%	<i>Aspergillus</i> 7,8%	<i>Penicillium</i> 41,7%	<i>Neurospora</i> 29,1%
<i>Monilia</i> 6%	<i>Neurospora</i> 35,9%	<i>Cladosporium</i> 17,5%	<i>Pullularia</i> 30%	<i>Oospora</i> 5,4%	<i>Aspergillus</i> 23,3%	<i>Rhodotorula</i> 14,5%
<i>Rhodotorula</i> 3%	<i>Fusarium</i> 26,9%	<i>Trichoderma</i> 15%	<i>Rhodotorula</i> 26,6%	<i>Geotrichum</i> 2,7%	<i>Aureobasidium</i> 19,6%	<i>Cephalosporium</i> 11,4%
<i>Rhizopus</i> 3%	<i>Rhizopus</i> 26,9%	<i>Fusarium</i> 14,5%	<i>Phoma</i> 18,3%	<i>Pestalotia</i> 0,5%	<i>Phoma</i> 17,7%	<i>Alternaria</i> 10,9%
<i>Candida</i> 3%	<i>Trichoderma</i> 24,4%	<i>Hyalopus</i> 10,5%	<i>Curvularia</i> 15%	<i>Mucor</i> 0,5%	<i>Alternaria</i> 17%	<i>Rhizopus</i> 10,5%
<i>Paecilomyces</i> 2%	<i>Rhodotorula</i> 22,4%	<i>Paecilomyces</i> 10%	<i>Cephalosporium</i> 15%	<i>Paecilomyces</i> 0,5%	<i>Candida</i> 14,7%	<i>Aureobasidium</i> 7,3%
<i>Chalaropsis</i> 2% s	<i>Candida</i> 20,5%	<i>Streptomyces</i> 9,7%	<i>Fusarium</i> 13,3%	<i>Pullularia</i> 0,4%	<i>Fusarium</i> 14%	<i>Monascus</i> 6,4%
<i>Mortierella</i> 2%	<i>Penicillium</i> 17,9%	<i>Monilia</i> 9,2%	<i>Helminthosporium</i> 10%		<i>Trichoderma</i> 11,2%	<i>Candida</i> 5,4%
Leveduras 2%	<i>Mucor</i> 17,3%	<i>Rhodotorula</i> 7,8%	<i>Epicoccum</i> 10%		<i>Cephalosporium</i> 11%	<i>Nigrospora</i> 5,2%
<i>Geotrichum</i> 1%	<i>Alternaria</i> 16%	<i>Candida</i> 6,7%	<i>Paecilomyces</i> 8,3%		<i>Helminthosporium</i> 9,3%	<i>Botrytis</i> 5,0%
<i>Beauveria</i> 1%	<i>Epicoccum</i> 16%	<i>Helminthosporium</i> 6,5%	<i>Trichoderma</i> 6,6%		<i>Curvularia</i> 7,7%	<i>Fusarium</i> 5,0%
<i>Pullularia</i> 1%	<i>Phoma</i> 13,5%	<i>Sirodesmium</i> 5,5%	<i>Mucor</i> 6,6%		<i>Nigrospora</i> 7,5%	<i>Acrostalagmus</i> 4,7%
<i>Sepedonium</i> 1%	<i>Trichothecium</i> 10,2%	<i>Absidia</i> 5,0%	<i>Nigrospora</i> 6,6%		<i>Streptomyces</i> 7,2%	<i>Torula</i> 3,8%
<i>Thielaviopsis</i> 1%	<i>Curvularia</i> 10,2%	<i>Verticillium</i> 2,5%	<i>Rhizopus</i> 6,6%		<i>Peyronellaea</i> 4,7%	<i>Hormiscium</i> 3,5%
	<i>Cryptococcus</i> 10,2%	<i>Scopulariopsis</i> 1,7%	<i>Alternaria</i> 5,0%		<i>Neurospora</i> 4,4%	<i>Phoma</i> 3,3%
	<i>Trichosporium</i> 3,8%	<i>Aureobasidium</i> 0,8%	<i>Verticillium</i> 5,0%		<i>Paecilomyces</i> 3,3%	<i>Diplosporium</i> 3,1%
	<i>Fusidium</i> 3,8%	<i>Phoma</i> 0,5%	<i>Candida</i> 5,5%		<i>Pestalotia</i> 2,8%	<i>Geotrichum</i> 2,8%
	<i>Helminthosporium</i> 2,7%	<i>Actinomyces</i> 0,3%	Outros		Outros	<i>Helminthosporium</i> 2,8%
	Outros	Outros				Outros

NOTA: Autores de Alecrim e Teixeira a Godoy

Tabela 1 B - Frequências relativas de fungos anemófilos em algumas cidades brasileiras

Lacaz et al. 1958 São Paulo/ Santos	Lima et al. -1963 Rio de Janeiro - RJ	Lima e Gambale 1983 Recife - PE (coletas de 1974/1975)	Machado e Purchio 1980 Grande Recife-PE	Mendes e Lacaz 1952 São Paulo - SP	Mezzari et al. 2002 Porto Alegre-RS
<i>Penicillium</i> 83,7%/93%	<i>Penicillium</i> 20%	<i>Aspergillus</i> 91,6%/93,40%	<i>Aspergillus</i> 58,9%	<i>Cladosporium</i> 23,6%	<i>Ascosporos</i> 50,49%
<i>Cladosporium</i> 73,4%/87%	<i>Cladosporium</i> 15%	<i>Penicillium</i> 71,10%/68,10%	<i>Penicillium</i> 41,1%	<i>Penicillium</i> 17,2%	<i>Cladosporium</i> 17,86%
<i>Rhodotorula</i> 63,2%/80%	Leveduras 14%	<i>Cladosporium</i> 69,6%/69,30%	<i>Candida</i> 30,6%	<i>Rhodotorula</i> 6,4%	<i>Aspergillus/Penicillium</i> 15,03%
<i>Torulopsis</i> 20,4%/19%	<i>Aspergillus</i> 10%	<i>Candida</i> 58,33%/56,8%	<i>Cladosporium</i> 20,8%	<i>Aspergillus</i> 4,5%	Basidiosporos 3,84%
Leveduras brancas 20%/3,1%	<i>Rhodotorula</i> 10%	<i>Rhodotorula</i> 47,6%/51,7%	<i>Fusarium</i> 19,8%	<i>Monilia</i> 3,6%	Ferrugens 3,82%
Leveduras pretas 14%/7,9%	<i>Pullularia</i> 8%	<i>Phoma</i> 44,9%/44,0%	<i>Phoma</i> 19,4%	<i>Hormicium</i> 1,8%	<i>Helminthosporium</i> 2,49%
<i>Mucor</i> 12%/27%	<i>Fusarium</i> 5%	<i>Torulopsis</i> 43,7%/38,9%	<i>Curvularia</i> 18,9%	<i>Fusarium</i> 1,8%	<i>Botrytis</i> 1,22%
<i>Aspergillus</i> 10,2%/46%	<i>Monilia</i> 4%	<i>Cephalosporium</i> 39,5%/38,3%	<i>Monilia</i> 13,2%	<i>Candida</i> 0,9%	<i>Alternaria</i> 1,19%
<i>Candida</i> 10,2%/4,7%	<i>Cephalosporium</i> 4%	<i>Fusarium</i> 26,1%/19,3%	<i>Aureobasidium</i> 10,8%	<i>Cephalosporium</i> 0,9%	Carvão 0,90%
<i>Cephalosporium</i> 8,1%/1,5%	<i>Phoma</i> 3%	<i>Pestalotia</i> 19,0%/11,0%	<i>Rhizopus</i> 8,4%	<i>Rhizopus</i> 0,9%	<i>Curvularia</i> 0,87%
<i>Pullularia</i> 8,1%/6,3%	<i>Rhizopus</i> 1%	<i>Curvularia</i> 20,23%/12,7%	<i>Nigrospora</i> 8,2%	Fungos não identificados 21,1%	<i>Nigrospora</i> 0,61%
<i>Hormicium</i> 6,1%/6,3%	<i>Mucor</i> 1%	<i>Aureobasidium</i> 16,6%/8%	<i>Trichoderma</i> 7,7%		<i>Fusarium</i> 0,08%
<i>Neurospora</i> 4%/4,7%	Outros	<i>Monilia</i> 13,6%/11,6%	<i>Rhodotorula</i> 6,9%		Não identificados 1,59%
Outros		<i>Rhizopus</i> 14,2%/7,10%	<i>Cephalosporium</i> 6,4%		
		<i>Trichoderma</i> 13,0%/14,5%	<i>Geotrichum</i> 5,9%		
		<i>Paecilomyces</i> 11,3%-9,5%	<i>Pestalotia</i> 5,9%		
			<i>Helminthosporium</i> 5,8%		
			<i>Paecilomyces</i> 5,6%		
			Outros		

NOTA: Autores de Lacaz et al. a Mezzari et al.

Tabela 1 C - Frequências relativas de fungos anemófilos em algumas cidades brasileiras

Moraes e Lima- 1986 João Pessoa - PB	Passarelli 1952 Rio de Janeiro - RJ (obs.: não há referência de porcentagem)	Pecher et al 1988 Amazônia (fronteira Brasil - Colômbia)	Pinheiro et al. 1966 Piracicaba-SP	Purchio et al. 1984 Baixada Santista- SP	Vieira et al. 1989 Santa Rita PB
<i>Penicillium</i> 56%	Leveduras	<i>Mucor</i> 64,3%	<i>Penicillium</i> 62,3%	<i>Penicillium</i> 51,2%	<i>Fusarium</i> 42,85%
<i>Aspergillus niger</i> 54%	<i>Cladosporium</i>	<i>Candida</i> 54,8%	<i>Cladosporium</i> 50%	<i>Cladosporium</i> 58,8%	<i>Candida</i> 10,99%
<i>Aspergillus sp</i> 16%	<i>Rhodotorula</i>	<i>Rhodotorula</i> 38,1%	<i>Aspergillus</i> 43,7%	<i>Aspergillus</i> 23,7%	<i>Epicoccum</i> 5,49%
<i>Helminthosporium</i> 10%	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> 38,1%	<i>Candida</i> 31,2%	<i>Epicoccum</i> 23,6%	<i>Cladosporium</i> 5,49%
<i>Fusarium</i> 8%	<i>Aspergillus</i>	<i>Aureobasidium</i> 30,9%	<i>Neurospora</i> 21,1%	<i>Fusarium</i> 17,6%	<i>Cryptococcus</i> 5,49%
<i>Graphium</i> 6%	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizopus</i> 28,6%	<i>Rhizopus</i> 18,7%	<i>Aureobasidium</i> 15,5%	<i>Rhizopus</i> 5,49%
<i>Mucor</i> 4%		<i>Aspergillus</i> 28,6%	<i>Trichoderma</i> 12,5%	<i>Neurospora</i> 11,6%	<i>Penicillium</i> 4,39%
<i>Rhizopus</i> 2%		<i>Acremonium</i> 28,6%	<i>Rhodotorula</i> 12,5%	<i>Curvularia</i> 10,5%	<i>Aspergillus</i> 4,39%
<i>Trichothecium</i> 2%		<i>Trichoderma</i> 23,8%	<i>Torulopsis</i> 12,5%	<i>Rhizopus</i> 10,1%	<i>Rhodotorula</i> 2,20%
<i>Scopulariopsis</i> 2%		<i>Absidia</i> 21,4%	<i>Mucor</i> 6,2%	<i>Phoma</i> 8,5%	<i>Torulopsis</i> 2,20%
<i>Dospora</i> 2%		<i>Alternaria</i> 16,7%	<i>Trichosporon</i> 6,2%	<i>Alternaria</i> 7,0%	<i>Acremonium</i> 1,10%
<i>Curvularia</i> 2%		<i>Neurospora</i> 16,7%	<i>Pullularia</i> 6,2%	<i>Pestalotia</i> 6,2%	Outros
<i>Trichoderma</i> 2%		<i>Cladosporium</i> 14,3%	Não identificados 31,0%	<i>Helminthosporium</i> 6,2%	
<i>Phialophora</i> 2%		<i>Paecilomyces</i> 11,9%		<i>Cephalosporium</i> 5,8%	
<i>Epicoccum</i> 2%		<i>Curvularia</i> 9,5%		<i>Humicola</i> 4,3%	
<i>Cladosporium</i> 2%		<i>Streptomyces</i> 9,5%		<i>Trichoderma</i> 3,5%	
		<i>Gliocladium</i> 4,8%		<i>Nigrospora</i> 3,5%	
		<i>Geotrichum</i> 2,4%		<i>Scopulariopsis</i> 3,5%	
				<i>Geotrichum</i> 2,3%	
				Outros	

NOTA: Autores de Moraes e Lima a Vieira et al.

Tabela 2A – Comparação entre os principais fungos anemófilos, cuja frequência relativa foi maior que 10%, em algumas cidades do Brasil

GÊNEROS	GR	SP (1)	SP (2)	BH	RJ	BS	PI	PA
<i>Cladosporium</i>	20,8	64,8	23,6	96,6	15,0	58,8	50,0	17,8
<i>Epicoccum</i>	-	51,7	-	10,0	-	23,6	-	-
<i>Rhodotorula</i>	-	48,9	-	26,6	10,0	-	12,5	-
<i>Penicillium</i>	41,4	41,7	17,2	68,3	20,0	51,2	62,3	15,0
<i>Aspergillus</i>	58,9	23,3	-	65,0	10,0	23,7	43,7	15,0
<i>Aureobasidium</i>	10,8	19,9	-	-	-	15,5	-	-
<i>Phoma</i>	19,4	17,7	-	18,3	-	-	-	-
<i>Alternaria</i>	-	17,0	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i>	30,6	14,7	-	-	-	-	31,2	-
<i>Fusarium</i>	19,6	14,0	-	13,3	-	17,6	-	-
<i>Trichoderma</i>	-	11,2	-	-	-	-	-	-
<i>Cephalosporium</i>	-	11,0	-	15	-	-	-	-
<i>Curvularia</i>	18,9	-	-	15	-	10,5	-	-
<i>Helminthosporium</i>	-	-	-	10	-	-	-	-
<i>Mucor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paecilomyces</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Torulopsis</i>	-	-	-	-	-	-	12,5	-
<i>Rhizopus</i>	-	-	-	-	-	10,1	18,1	-
<i>Monilia</i>	13,2	-	-	-	-	-	21,6	-

NOTA: GR - Grande Recife (PE) - Machado e Purchio (1980)
 SP (1) - São Paulo (SP) - Gambale et al. (1977)
 SP (2) - São Paulo (SP) – Mendes e Lacaz (1952)
 BH - Belo Horizonte (MG) – Faria (1967a)
 RJ - Rio de Janeiro (RJ) - Lima et al. (1963)
 BS - Baixada Santista (SP) Purchio et al. (1984)
 PI – Piracicaba (SP) Pinheiro et al. (1966)
 PA - Porto Alegre (RS) Mezzari et al (2002)

Tabela 2B – Comparação entre os principais fungos anemófilos, cuja frequência relativa foi maior que 10%, em algumas cidades do Brasil

GÊNEROS	RE	PP	AL	JP	AM	SR	BP	CR
<i>Cladosporium</i>	-	74,3	35,8	-	14,3	-	17,5	32,9
<i>Epicoccum</i>		16	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula</i>	-	22,4	-	-	38,1	-	-	14,5
<i>Penicillium</i>	17	17,9	16,7	56	38,1	-	36,6	43,1
<i>Aspergillus</i>	25	55,8	-	54	28,6	-	63,8	43,4
<i>Aureobasidium</i>	-	37,2	-	-	30,9	-	-	-
<i>Phoma</i>	-	13,5	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria</i>	-	16	-	-	16,7	-	-	10,9
<i>Candida</i>	-	20,5	-	-	54,8	10,9	-	-
<i>Fusarium</i>	-	26,9	-	-	-	42,8	14,5	-
<i>Trichoderma</i>	-	24,4	-	-	23,8	-	15	-
<i>Cephalosporium</i>	-	-	-	-	-	-	-	11,4
<i>Curvularia</i>	-	10,2	-	-	-	-	68,3	-
<i>Helminthosporium</i>	-	-	-	10	-	-	-	-
<i>Mucor</i>	-	17,3	-	-	64,3	-	26,9	-
<i>Paecilomyces</i>	-	-	-	-	11,9	-	-	-
<i>Torulopsis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizopus</i>	-	26,9	-	-	28,6	-	-	10,5
<i>Monilia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Neurospora</i>	-	35,9	-	-	16,7	-	-	29,1

NOTA: RE – Recife (PE) – Alecrin e Teixeira (1958)

PP - Presidente Prudente – Buck e Gambale (1985)

JP - João Pessoa (PB) – Moraes e Lima (1986)

AM - Amazônia (AM) – Pecher et al. (1988)

SR - Santa Rita (PB) - Vieira et al (1989)

BP- Belém do Pará - Costa apud Lacaz e Mendes (1963)

CR – Curitiba (PR) – Godoy (1976)

CASUÍSTICA E MÉTODOS

I) Aspectos geográficos de Botucatu

Botucatu localiza-se na região Centro - Sul do Estado de São Paulo a 224,8 quilômetros da capital (Figura 2) e ocupa uma área de 1522 km². Faz limite com os municípios de Anhembi, Bofete, Pardinho, Itatinga, Avaré, Pratânia, São Manuel, Dois Córregos e Santa Maria da Serra.

O último levantamento do IBGE (julho 2003) aponta uma população de 113.711 habitantes (Botucatu site oficial, 2004).

Localização de Botucatu no estado de São Paulo

Figura 2. Botucatu situa-se na região Centro-Sul do Estado de São Paulo

O município é composto por três regiões distintas (Botucatu site oficial, 2001): Baixada, que abrange as terras situadas ao leste, norte e nordeste, com altitudes de 400 a 600 metros e que apresenta a maior hidrografia do município, sendo pouco habitada; Topo da Serra, com altitudes de 700 a 900 metros e com grande densidade de população;

e a Frente da Cuesta, que é uma região de transição. Esse desnível em relação à altitude provoca diferenças na temperatura, que é 2°C a 3°C mais elevada na Baixada, onde a temperatura média é de 21°C a 22°C. O clima é subtropical úmido, com invernos secos e verões quentes. No inverno, a temperatura dificilmente cai abaixo de 2° C, ficando, em média, 18 ° C e durante o verão, atinge em média 22° C. Os meses mais quentes são janeiro e fevereiro, com médias de 22,6 ° C, e os mais frios são junho e julho, com média de 6,7 ° C. Na maior parte do ano, principalmente à noite, sopra sobre a cidade uma brisa vinda da serra. As condições climáticas de Botucatu são, entretanto, muito heterogêneas, devido à diversidade de seu relevo, já que o município se localiza em parte na Depressão Periférica e parte no Planalto Ocidental, originando, assim, um considerável gradiente de altitude.

Botucatu está sob a ação de três massas de ar que atuam diretamente na região Centro-Sul do país:

- A Equatorial Continental
- A Tropical Atlântica
- A Polar Atlântica

A massa equatorial continental domina a região de outubro a março criando condições de elevadas evaporações e temperaturas altas. Nessa época, essas são condições propícias para se ter alto índice pluviométrico.

A média anual de chuvas é de 1547,25 mm. Os meses mais chuvosos são dezembro, com média de 234,8 mm e janeiro, com 237,42 mm, e os menos chuvosos são julho, com 43,47 mm e agosto, com 42,28 mm.

A massa polar atlântica ocorre nos meses de maio a meados de agosto, contribuindo para baixar as médias térmicas desses meses.

Os ventos são maiores nos meses de abril, outubro e dezembro e os meses onde se tem menos vento são fevereiro, maio e junho. As direções predominantes são: ESSE, SE e SES. As direções N, NEN e ONO são as de menores índices de ventos.

O Município encontra-se dentro da área de domínio da Mata Atlântica, em uma região considerada de transição fitogeográfica, com influências da Mata Pluvial da costa atlântica, da Mata Mista latifoliada com araucária do cerrado, do Chaco e do Pampa. Remanescentes dessa vegetação nativa - cerca de 10% - acham-se localizados em formações ribeirinhas (nascentes, matas ciliares, brejos), ou de alta declividade (encostas, grotões, “cuestas”, espigões), onde, por serem locais de difícil acesso, ainda não sofreram tanto a degradação ambiental.

Botucatu é drenada por duas bacias hidrográficas:

- Do RIO TIETÊ, ao norte.
- Do RIO PARDO, ao sul.

II) Descrição da casuística e métodos do trabalho

Para melhor compreensão das diferentes etapas da pesquisa a mesma foi dividida em cinco partes sendo que as três primeiras constituíram-se num pré-estudo que teve por objetivo o desenvolvimento da etapa de número quatro:

- 1- Elaboração e construção de um aparelho caça-esporos;**
- 2- Definição do meio de cultura, altura e horário das coletas;**
- 3- Comparação do caça-esporos FEC com o coletor Andersen e com o método gravitacional;**
- 4- Coleta e identificação dos fungos anemófilos;**
- 5- Pesquisa de sensibilização a fungos através de testes cutâneos e dosagem de IgE específica “in vitro”.**

1- ELABORAÇÃO E CONSTRUÇÃO DO CAÇA-ESPOROS

O equipamento foi construído com uma base horizontal para apoio do recipiente coletor e para sustentar uma haste cilíndrica vertical que permite a regulação da distância entre a aspiração e o recipiente coletor (Placa de Petri com meio de cultura). A aspiração é feita através de um micro ventilador com vazão de 6m³/hora (100 l/min) movido por motor elétrico de 12 v podendo ser utilizado tanto em ambiente com rede elétrica ou através de baterias (Figura 3). Para maiores detalhes técnicos vide Anexo A.

Esse caça-esporos recebeu o nome de Furtado & Croce (FEC) em homenagem aos professores Edson Luiz Furtado (*) e Julio Croce (**).

Caça-esporos Furtado & Croce (FEC)

Figura 3. Fotografia do caça-esporos FEC

* Professor Doutor do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP-Botucatu que idealizou o aparelho caça-esporos utilizado neste trabalho e orientou a coleta e identificação dos fungos anemófilos.

** Professor Doutor da Disciplina de Alergia e Imunopatologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de São Paulo-USP e que é orientador desta tese.

2- DEFINIÇÃO DO MEIO DE CULTURA, ALTURA E HORÁRIO DAS COLETAS

Existe na literatura médica uma grande diversidade dos meios de cultura utilizados para o cultivo de fungos. Neste estudo foram testados quatro tipos de meios de cultura para fungos: Batata dextrose ágar (BDA), Czapek sacarose nitrito ágar (CSA), Sabouraud-ágar (SBA) e Extrato de levedura-ágar (ELA) (Anexo B) com o intuito de se selecionar um para as etapas subsequentes. Tais meios foram escolhidos por serem os mais disponíveis no serviço e com os quais os pesquisadores tinham mais experiência.

Foram realizadas coletas em dois dias diferentes. Em cada dia foram testados os quatro meios, cada qual em duas alturas, a saber: nível do solo e 1,5 metros sendo que para cada dia foram coletadas dez placas/meio/altura. Utilizou-se o coletor FEC que foi mantido em funcionamento por 30 segundos/placa. Após as coletas, as placas foram imediatamente fechadas e seladas com fita adesiva e incubadas à temperatura ambiente por sete dias.

A seguir, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC) de cada placa. Não houve diferença estatística entre as médias dos diferentes meios utilizados (Tabela 3), nem entre as alturas de coleta (Tabela 4).

Tabela 3 – Média, desvio padrão e mediana de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) segundo quatro meios de cultura para fungos

MEIOS DE CULTURA	UFC (MÉDIAS $\pm$ DESV.PAD.)	UFC (MEDIANA)
BDA	7,7 $\pm$ 4,5	7,0
CZA	6,5 $\pm$ 5,0	5,0
SBA	7,2 $\pm$ 4,2	7,0
ELA	7,4 $\pm$ 6,0	3,5

NOTA: BDA: Batata dextrose ágar; CSA: Czapek ágar; SBA: Sabouraud-ágar e ELA: Extrato de levedura-ágar. A segunda coluna representa a média e desvio padrão e a terceira coluna a mediana das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) formadas nas placas após coleta de ar através do caça-esporos Furtado e Croce (FEC). Foram realizadas coletas em dois diferentes dias e para cada dia foram expostas 20 placas/meio. Não houve diferença significativa entre os quatro meios

Tabela 4 – Média, desvio padrão e mediana do total de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) segundo duas alturas para coleta de esporos

ALTURA	UFC (MÉDIAS $\pm$ DESV. PAD.)	UFC (MEDIANA)
1,5 metro	6,5 $\pm$ 4,0	6,0
Nível do solo	7,2 $\pm$ 6,4	6,0

NOTA: A segunda coluna representa a média e desvio padrão e a terceira a mediana das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) formadas nas placas após coleta de ar através do caça-esporos Furtado e Croce (FEC). Foram realizadas coletas em dois diferentes dias e para cada dia foram expostas 40 placas/altura (dez placas/meio/altura). Os meios de cultura foram os mesmos utilizados para o experimento anterior (vide Tabela 3). Não houve diferença significativa entre as duas alturas

Para as etapas subseqüentes do trabalho, escolheu-se o meio BDA pela praticidade no preparo e pelo menor índice de contaminação, o qual foi de 3%, 12%, 42% e 13% para os meios BDA, CZA, SBA e ELA, respectivamente. Optou-se pela coleta a 1,5 metros do solo por ser mais ergonômica e por simular a condição habitual de inalação de esporos em um adulto de estatura mediana.

Para o estudo quanto ao melhor horário a serem coletados os fungos, foram realizadas coletas com o aparelho FEC em dois dias diferentes, sendo que em cada dia coletaram-se quinze placas em dois horários: às 7h00 e às 17h00, utilizando-se o meio BDA. O coletor foi deixado em funcionamento por 30 segundos/placa. Logo após cada coleta, as placas foram fechadas e seladas com fita adesiva e incubadas à temperatura ambiente por sete dias. A seguir, as unidades formadoras de colônias (UFC) de cada placa foram contadas. Houve diferença estatisticamente significativa entre os dois horários pesquisados, sendo que às 17h00 observou-se um maior crescimento de colônias em relação às 7h00 (Tabela 5). Esta observação é compartilhada por diversos autores na literatura especializada (Gambale et al., 1983; Nussbaum, 1991; Al-Subai, 2002) e, assim, foi escolhido o horário vespertino para as próximas etapas.

Tabela 5 – Média, desvio padrão e mediana do total de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) segundo dois horários para coleta de esporos

HORÁRIO	UFC (MÉDIAS $\pm$ DESV. PAD.)	UFC (MEDIANA)
7h00	1,9 $\pm$ 1,8	1
17h00	11,3 $\pm$ 4,9(*)	11

(*) $p < 0,05$

NOTA: A segunda coluna representa a média e desvio padrão e a terceira a mediana das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) formadas nas placas após coleta de ar através do caça-esporos Furtado e Croce (FEC). Foram realizadas coletas em dois dias diferentes e para cada dia foram expostas 15 placas/horário. Foi utilizado o meio BDA (batata dextrose ágar) para essa análise. O horário das 17h00 apresentou maior taxa de captura de UFC em relação ao das 7h00

3- COMPARAÇÃO DO CAÇA-ESPOROS FEC COM O MÉTODO GRAVITACIONAL E COM O COLETOR ANDERSEN

Comparou-se a eficácia do FEC ao tradicional método gravitacional coletando-se em dois dias diferentes dez placas/dia/método.

Para se comparar a eficiência do FEC frente a coletores de esporos já consagrados pelo uso, utilizou-se o caça-esporos de Andersen (vide Figura 1) que foi o escolhido por ser um dos mais utilizados atualmente em pesquisas sobre microbiota ambiental. Também se levou em consideração a comparação do FEC com um aparelho que possibilitasse a cultura de esporos para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e não apenas a contagem de esporos, já que o FEC não se destina para esse fim.

Nesse estudo comparativo foram feitas coletas em dez dias diferentes (aproximadamente duas vezes/semana). Em cada dia foram feitas cinco coletas/aparelho, cada qual tendo sido posto para funcionar por trinta segundos/coleta. Ambos os aparelhos estavam posicionados a 1,5 metros do solo e separados entre si por aproximadamente 1 metro. Pela necessidade de se contar com uma tomada elétrica para a coleta com o Andersen, o ponto 3 foi escolhido para este estudo, já que nos demais não havia tal facilidade (vide item 4 - COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ANEMÓFILOS). Pelas características de cada aparelho, foi coletada uma placa do FEC para seis placas do Andersen.

Depois de coletadas, independentemente do método, as placas foram imediatamente fechadas e seladas com fita adesiva e incubadas em temperatura ambiente por uma semana. Posteriormente, foram analisadas quanto ao número total de

unidades formadoras de colônias (UFC) e foi feita a identificação dos fungos, utilizando-se lupa e microscópio óptico comum, através da análise das características morfológicas de cada fungo.

Para o cálculo da concentração das UFC (UFC/m³ de ar) levou-se em consideração a vazão de ambos os aparelhos que é de 100 litros/minuto (l/min) para o FEC e 28 litros/minuto para o Andersen.

Comparação com o método gravitacional

As médias de UFC obtidas nas coletas com o FEC foram significativamente maiores do que as obtidas através do método gravitacional (Figura 4), o que está de acordo com todos os estudos citados na literatura médica, que concluem ser o método gravitacional inadequado para esse tipo de pesquisa (Middleton et al, 1998; Salvagio e Aukrust, 1981; Frenz et al., 1999).

Comparação entre o aparelho FEC e o Método Gravitacional com relação às Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas em dois dias de coleta

* $p < 0,05$

Figura 4. As UFC foram obtidas através de coletas com o aparelho FEC e método gravitacional em dois dias diferentes, onde foram utilizadas dez placas/dia/método, por trinta segundos/placa, com o meio de cultura BDA (batata dextrose ágar). Houve diferença significativa entre os dois métodos de coleta para os dois dias.

Comparação com o coletor Andersen

Para essa comparação dois parâmetros foram considerados: os gêneros de fungos capturados por ambos os aparelhos e a concentração das UFC por metro cúbico de ar (UFC/m³).

Com relação ao primeiro item, a tabela 6 mostra que ambos os aparelhos capturaram aproximadamente os mesmos gêneros, principalmente com relação àqueles mais prevalentes (*Aspergillus*, Levedura, *Cladosporium*, *Fusarium*, etc.). Os fungos que aparecem esporadicamente foram capturados por um ou outro caça-esporos de forma aleatória (*Trichoderma*, *Helminthosporium*, *Monilia*). Note-se que a referida tabela apresenta de forma qualitativa os fungos capturados. Não foi feita análise estatística pela dificuldade de se comparar aparelhos que são estruturalmente diferentes.

Tabela 6 – Gêneros de fungos (em UFC) obtidos através dos aparelhos Andersen e FEC

FUNGOS	ANDERSEN UFC	FEC UFC
<i>Aspergillus</i>	30	20
<i>Levedura</i>	22	9
<i>Cladosporium</i>	208	40
<i>Fusarium</i>	156	28
<i>Verticillium</i>	2	1
<i>Trichoderma</i>	4	0
<i>Stemphylium</i>	1	0
<i>Helminthosporium</i>	0	4
<i>Alternaria</i>	1	2
<i>Hyalodendrum</i>	2	1
<i>Penicillium</i>	14	3
<i>Monilia</i>	3	0
<i>Neurospora</i>	14	7
<i>Epicoccum</i>	6	3
<i>Nigrospora</i>	2	5
<i>Phoma</i>	5	3
<i>Chaetomium</i>	0	3

NOTA: Foram realizadas dez coletas em dias diferentes com cinco repetições/dia sendo que cada aparelho permaneceu em funcionamento por 30 segundos/coleta. Computou-se o número total de UFC/gênero obtidas sendo que a identificação foi realizada pela observação das características morfológicas de cada fungo através de lupa e microscópio óptico comum. Pelas características de cada aparelho foram geradas trinta placas através do Andersen e cinco placas através do FEC para cada dia de coleta. Foi utilizado o meio BDA (batata dextrose ágar) para cultura dos fungos

Quanto à concentração, observa-se que o aparelho Andersen captura mais UFC/m³ de ar comparativamente ao FEC (Figura 5). Isto decorre do fato de aquele aparelho coletar em seis placas, enquanto este coleta em apenas uma, o que dificulta a comparação.

Comparação entre os aparelhos Andersen e FEC com relação às Unidades Formadoras de Colônia por metro cúbico de ar (UFC/ m³ de ar) em dez dias de coleta

* p<0,05

Figura 5. Cada aparelho foi deixado em funcionamento por 30 segundos/dia de coleta. Foram realizadas cinco repetições/dia de coleta e computou-se o número total de UFC obtidas. Pelas características de cada aparelho foram geradas 30 placas através do Andersen e 5 placas do FEC para cada dia de coleta. Foi calculado o parâmetro UFC/ m³ de ar a partir do conhecimento que o aparelho Andersen aspira 28 litros de ar/minuto e o aparelho FEC 100 litros/minuto. Foi utilizado o meio BDA (batata dextrose ágar) para este experimento. Em todos os dias p<0,05

Os aparelhos apresentaram associação positiva entre (figura 6). Assim, o aumento do número de placas coletadas pelo FEC vai tendendo a diminuir a diferença observada entre ambos. Desta forma, optou-se nas etapas posteriores deste trabalho, pela coleta de cinco placas consecutivas com o aparelho FEC para cada ponto de coleta. Como foram quatro os pontos estudados (vide item 4 - COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ANEMÓFILOS), foram obtidas vinte placas/semana para a análise do ar da cidade.

Correlação entre os aparelhos FEC e Andersen

Figura 6. Aparelhos FEC e Andersen apresentaram associação significativamente positiva entre si

4- COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ANEMÓFILOS

Traçou-se uma linha imaginária, no sentido NO-SE sobre o mapa da cidade de Botucatu onde quatro pontos de coleta foram alocados (Figura 7):

- 1- Jardim Itamarati - Casa do Estudante Universitário;
- 2- Avenida Vital Brasil, esquina com Rua Nossa Senhora Aparecida;
- 3- Rua Quintino Bocaiúva, esquina com Rua Amando de Barros;
- 4- Avenida E, esquina com Rua 11, no Conjunto Habitacional Antonio Delmanto.

Mapa de Botucatu

Figura 7. Mapa de Botucatu com os pontos de 1 a 4

Esses pontos foram escolhidos levando-se em consideração a direção predominante do vento. Em cada ponto foi efetuada a coleta de esporos através do coletor FEC, num total de cinco placas/ponto/dia de coleta. O captador de esporos foi colocado num suporte de 1,5 metros de altura (Figura 8) e as coletas iniciavam-se às 17h00.

Aparelho FEC em funcionamento

Figura 8. Aparelho FEC, sobre seu suporte, em funcionamento no Ponto 3

O meio de cultura utilizado foi o BDA (batata dextrose ágar). Cada placa foi deixada no aparelho por trinta segundos e, após, imediatamente fechada e selada com fita adesiva.

Ao final de sete dias de incubação em temperatura ambiente, as placas foram colocadas em câmara fria e escura e posteriormente analisadas quanto às UFC. A identificação dos fungos foi feita através de lupa e microscópio óptico comum, observando-se suas características morfológicas.

As coletas foram realizadas semanalmente por um ano, a partir de junho de 2001, e paralelamente a elas foram anotados a cada dia os fatores meteorológicos (temperatura máxima e mínima, velocidade do vento, índice pluviométrico e umidade relativa do ar) coletados em estação climática automática da Faculdade de Ciências Agronômicas-UNESP- Botucatu- (vide Anexo C). Esses dados foram posteriormente utilizados para se estudar a flutuação estacional dos principais gêneros encontrados e as influências dos diversos fatores meteorológicos sobre eles.

5- PESQUISA DE SENSIBILIZAÇÃO A FUNGOS ATRAVÉS DE TESTES CUTÂNEOS E DOSAGEM DE IgE ESPECÍFICA “IN VITRO”

Foram realizados testes cutâneos, conforme descrito por Middleton Jr. et al. (1998), em pacientes portadores de asma e/ou rinite provenientes do ambulatório de Pneumologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - UNESP - Botucatu e de uma clínica particular especializada em doenças alérgicas na cidade de Botucatu.

Resumidamente, os testes de puntura foram realizados colocando-se uma gota do extrato sobre a pele do paciente. Além do extrato, foram colocados controles positivo (histamina 1:10) e negativo (diluyente do extrato). A seguir, procedeu-se à puntura, utilizando-se um puntor descartável para cada extrato. Após aproximadamente 15 minutos foi feita a leitura marcando-se o tamanho da pápula com caneta dermatográfica e considerando-se positiva a reação com pápula cuja média aritmética dos dois maiores diâmetros tenha sido maior ou igual a 3 mm, descontado o tamanho da pápula do controle negativo.

O teste intradérmico foi feito utilizando-se 0,05ml de extrato, o qual foi injetado através de seringa descartável de 1ml e agulha tamanho 13 x 0,4mm, de forma a obter-se uma pápula. Foi utilizado o diluyente dos extratos como controle negativo. Após 20 minutos marcou-se a pápula formada com caneta dermatográfica e considerou-se positiva a reação com pápula cuja média aritmética dos dois maiores diâmetros tenha sido maior ou igual a 5 mm, descontado o tamanho da pápula do controle negativo. Todos os

pacientes foram orientados previamente a evitar drogas que pudessem ter interferência nos testes.

Para a avaliação desses pacientes procedeu-se a uma entrevista na qual foi aplicado um questionário baseado no estudo ISAAC (Beasley, 1998) (Anexo D). Também foi realizada revisão de prontuário médico para anotação de exames e outras observações importantes para o diagnóstico. Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão (abaixo) foram admitidos no estudo de forma consecutiva.

Critérios de inclusão:

- Pacientes portadores de asma e/ou rinite, moradores em Botucatu ou adjacências há pelo menos um ano. Os portadores de asma foram classificados, de acordo com o III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma (Jornal de Pneumologia, 2002), em intermitente e persistente leve, moderada e grave; os pacientes com rinite foram classificados em rinite intermitente e persistente, leve, moderada e grave, de acordo com o Consenso do ARIA (Bousquet, 2002);
- Idade: entre 12 e 70 anos;
- Aceitação por escrito em participar do projeto, o qual foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP - Botucatu e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP (Anexos E e F).

Crterios de excluso:

- Pacientes que receberam qualquer tipo de imunoterapia prvia;
- Pacientes com contra-indicaes realizao de testes cutneos;
- Grvidas.

Em cada paciente foi feito inicialmente o teste de punтура. Como havia uma grande quantidade de alrgenos a ser testada, utilizou-se o dorso dos pacientes. Aps a leitura, procedeu-se aos testes intradrmicos apenas para fungos cuja reao tenha sido negativa ao teste de punтура. Os testes intradrmicos foram aplicados nas regies volares dos antebraos.

Todos os extratos foram provenientes do Laboratrio ALKABELL, exceto o extrato de *Metarrhizium anisoplae* que foi fornecido pelo Laboratrio de Micologia do Instituto de Cincias Biomdicas da Universidade de So Paulo, e que foi utilizado apenas para teste de punтура.

A Tabela 7 mostra os extratos utilizados e suas concentraes.

Para testar-se a especificidade dos testes a fungos, avaliou-se um grupo controle de pacientes sem histria atual ou pregressa de asma e/ou rinite que seguiram os mesmos critrios de incluso e excluso j citados.

 medida que os testes intradrmicos foram sendo realizados, notou-se que alguns pacientes, e mesmo alguns controles, desenvolviam reaes cutneas tardias (com incio aps aproximadamente 6 horas e pico em torno de 24-36 horas) de forte intensidade, causando nesses indivduos desconforto que no fora previsto no termo de assentimento

à pesquisa. Assim, por razões éticas, passou-se a inibir tais reações com creme a 1% de dexametasona, que foi fornecido aos pacientes e aos controles para ser usado logo após a leitura durante 3-5 dias. Esse grupo inicial entrou na análise global dos testes e foi também analisado quanto às reações tardias.

Foi colhida amostra de sangue de todos os pacientes. A seguir, separou-se o soro dessas amostras e o mesmo foi guardado em freezer a -20°C para posterior análise. Foram selecionadas aleatoriamente 106 amostras de soros para dosagem de IgE específica “in vitro” através do método UniCAP da Pharmacia. Foram testados os seguintes fungos para todos os soros selecionados:

1- *Cladosporium herbarum*

2- *Alternaria alternata*

3- *Aspergillus fumigatus*

4- *Candida albicans*

5- *Mucor racemosus*

6- *Penicillium notatum*

7- *Fusarium moniliforme*

8- *Rhizopus nigricans*

Para se estudar a associação entre fungos anemófilos e a ocorrência de crises de asma de maior gravidade, foi levantado o total de atendimentos por asma realizados de junho de 2001 a maio de 2002 no Pronto Socorro Municipal de Botucatu e no Pronto Atendimento da Unimed de Botucatu.

Tabela 7 – Tipos e concentrações de extratos utilizados na pesquisa

TIPO DE EXTRATO	TESTE DE PUNTURA	TESTE INTRADÉRMICO
<i>Dermatophagoides</i> mistura (<i>D. pteronyssinus</i> + <i>D. farinae</i>)	100 B.U./ml	
<i>Thiophagus putrescens</i>	100 B.U./ml	
Gato (<i>Felis domesticus</i>)	100 B.U./ml	
Cão (<i>Canis familiaris</i>)	100 B.U./ml	
<i>Blatella germanica</i>	1% P/V	
<i>Periplaneta americana</i>	1% P/V	
<i>Triticum sativum</i>	100 B.U./ml	
<i>Zea mays</i>	5% P/V	
<i>Cynodum dactylum</i>	100 B.U./ml	
<i>Taraxacum officinale</i>	5% P/V	
<i>Artemisia vulgaris</i>	5% P/V	
<i>Helianthus annuus</i>	5% P/V	
<i>Chenopodium album</i>	100 B.U./ml	
<i>Plantago lanceolata</i>	100 B.U./ml	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5% P/V	1% P/V
<i>Penicillium notatum</i>	5% P/V	1% P/V
<i>Alternaria alternata</i>	100 B.U./ml	1 B.U./ml
<i>Cladosporium</i> mistura (<i>C.herbarum</i> + <i>C.fulvum</i>)	5% P/V	1% P/V
<i>Rhizopus nigricans</i>	5% P/V	1% P/V
<i>Chaetomium globosum</i>	5% P/V	1% P/V
<i>Mucor mucedo</i>	5% P/V	1% P/V
<i>Candida albicans</i>	5% P/V	1% P/V
<i>Neurospora sp</i>	5% P/V	1% P/V
<i>Fusarium moniliforme</i>	5% P/V	1% P/V
<i>Metarrhizium anisoplae</i>	1% P/V	

NOTA: Extratos alergênicos com suas respectivas concentrações usados para os testes de puntura e os testes intradérmicos (apenas para fungos, exceto para o fungo *Metarrhizium anisoplae*). P/V: Peso/Volume; BU: “Biologic Unit”

III) Análise estatística

Foram apresentados gráficos com distribuições de frequências de diversas variáveis de interesse. Para a comparação de proporções de resultados de testes realizados nos mesmos pacientes, foi utilizado o Teste de Mc Nemar. Para comparações de proporções em tabelas de distribuições multinomiais foi utilizado o teste de Goodman. Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para estudo de correlação entre a presença de fungos e pacientes apresentando crises de asma e para a correlação entre os dois caça-esporos.

Para comparação do número de ocorrências de UFC nos pontos de coleta, foi utilizada a análise de variância, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5%.

As análises foram feitas através dos programas computacionais SAS versão 6.12.

RESULTADOS

1- COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ANEMÓFILOS

Durante o período de junho/2001 a maio/2002 foram realizadas 51 coletas nos quatro pontos estudados totalizando 204 exposições. Foram contadas 11398 UFC, isolando-se 67 gêneros diferentes (Tabela 8). Para se avaliar quantitativamente tais gêneros, foi verificada sua frequência absoluta e calculada a relativa. A primeira refere-se ao número de vezes que o fungo foi identificado nas diversas exposições (não se considerou o total de colônias/placa e sim se o fungo estava ou não presente); a segunda é calculada multiplicando-se a frequência absoluta por 100 e dividindo-se o resultado pelo total de exposições (Lacaz et al., 1958). Esse critério é mais aceito uma vez que o número total de UFC numa placa reflete a captura de esporos num momento único. Se o aparelho, num certo instante, capturasse centenas de esporos de certo fungo, os quais poderiam gerar centenas de UFC na placa, e nos instantes subsequentes da pesquisa esse fungo não aparecesse novamente, poder-se-ia ter a falsa conclusão que ele fosse muito frequente na região pesquisada. Ao contrário, um outro fungo que aparecesse de forma constante ao longo das diversas coletas, porém, que não tivesse sido capturado tão expressivamente, poderia, no cômputo final, aparecer como menos frequentemente isolado do que o primeiro, caso não se levasse em consideração o conceito de frequência absoluta.

A Tabela 9 mostra os fungos que foram isolados numa frequência superior a 10%. Esse valor é utilizado na maioria das pesquisas para indicar frequência mais expressiva (Machado e Purchio, 1980; Gambale et al., 1977; Mendes e Lacaz, 1952; Purchio et al., 1984).

Tabela 8 – Frequências absoluta (FA) e relativa (FR) de fungos anemófilos isolados entre junho/2001 a maio/2002 na cidade de Botucatu

FUNGOS	FA	FR	FUNGOS	FA	FR
<i>Alternaria</i>	35	17,16	<i>Monilia</i>	50	24,51
<i>Ascomiceto imaturo</i>	19	9,31	<i>Neurospora</i>	12	5,88
<i>Chaetomium</i>	12	5,88	<i>Nigrospora</i>	71	34,8
<i>Asteromyces</i>	3	1,47	<i>Oidiodendrum</i>	1	0,49
<i>Aspergillus</i>	74	36,27	<i>Paecilomyces</i>	3	1,47
<i>Aureobasidium</i>	3	1,47	<i>Papularia</i>	8	3,92
<i>Bispora</i>	1	0,49	<i>Papulospora</i>	3	1,47
<i>Blastomyces</i>	2	0,98	<i>Penicillium</i>	45	22,06
<i>Botrytis</i>	1	0,49	<i>Periconia</i>	8	3,92
<i>Calonectria</i>	1	0,49	<i>Pestalotia</i>	16	7,84
<i>Cephalosporium</i>	10	4,9	<i>Pestalotia funerea</i>	1	0,49
<i>Chaetopsis</i>	1	0,49	<i>Phialophora</i>	1	0,49
<i>Chaetophoma</i>	1	0,49	<i>Phoma</i>	20	9,8
<i>Chrysosporium</i>	1	0,4	<i>Phomopsis</i>	5	2,45
<i>Cladosporium</i>	171	83,82	Picnídeo s/ identificação	1	0,49
<i>Colletotrichum</i>	5	2,45	<i>Pithomyces</i>	9	4,41
<i>Colônia s/ identificação</i>	108	52,94	<i>Pucciniopsis</i>	1	0,49
<i>Curvularia</i>	37	18,38	<i>Rhinotrichum</i>	4	1,96
<i>Cylindrocladium</i>	2	0,98	<i>Rhizopus</i>	9	4,41
<i>Dendrophoma</i>	1	0,49	<i>Rhizoctonia</i>	3	1,47
<i>Dothiorella</i>	1	0,49	<i>Scytalidium</i>	11	5,39
<i>Epicoccum</i>	115	56,37	<i>Septoria</i>	1	0,49
<i>Fusarium</i>	48	23,53	<i>Sphaeropsis</i>	9	4,41
<i>Geotrichum</i>	10	4,9	<i>Sphaerosporium</i>	25	12,26
<i>Gliocladium</i>	6	2,94	<i>Sporobolomyces</i>	1	0,49
<i>Helminthosporium</i>	74	36,27	<i>Steganosporium</i>	1	0,49
<i>Hendersonia</i>	1	0,49	<i>Stemphylium</i>	8	3,92
<i>Humicola</i>	36	17,65	<i>Streptomyces (bactéria)</i>	1	0,49
<i>Hyalodendrum</i>	46	22,55	<i>Strumella</i>	1	0,49
<i>Hymenella</i>	2	0,98	<i>Torula</i>	2	0,98
<i>Lacellina</i>	2	0,98	<i>Trichocladium</i>	1	0,49
<i>Leptographium</i>	1	0,49	<i>Trichoderma</i>	34	16,67
<i>Levedura</i>	101	49,51	<i>Trichothecium</i>	1	0,49
<i>Memnoniella</i>	1	0,49	<i>Ulocladium</i>	1	0,49
<i>Metarrhizium</i>	3	1,47	<i>Verticillium</i>	9	4,42

NOTA: Fungos obtidos a partir da coleta de ar com o caça-esporos FEC em 204 exposições entre junho/2001 a maio/2002 na cidade de Botucatu. Em cada semana foram feitas quatro coletas (em quatro diferentes pontos da cidade) sendo que em cada uma delas foram realizadas cinco exposições de 30 segundos cada. Assim, foram obtidas 20 placas/semana, as quais foram seladas, incubadas em temperatura ambiente por uma semana e analisadas quanto ao total de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os fungos que cresceram em cada placa foram identificados através de suas características morfológicas utilizando-se lupa e microscópio óptico comum. A frequência absoluta (FA) refere-se ao número de vezes que o fungo foi identificado nas diversas exposições (aqui não se considerou o total de colônias/placa e sim se o fungo estava ou não presente); a frequência relativa (FR) foi calculada multiplicando-se por 100 a frequência absoluta e dividindo-se o resultado pelo número total de exposições

Tabela 9 - Frequências absoluta (FA) e relativa (FR) de fungos anemófilos isolados entre junho/2001 a maio/2002 na cidade de Botucatu cuja frequência de identificação foi superior a 10%

FUNGO	FA	FR (%)
<i>Cladosporium</i>	171	83,82
<i>Epicoccum</i>	115	56,37
Levedura	101	49,51
<i>Aspergillus</i>	74	36,27
<i>Helminthosporium</i>	74	36,27
<i>Nigrospora</i>	71	34,8
<i>Monilia</i>	50	24,51
<i>Fusarium</i>	48	23,53
<i>Hyalodendrum</i>	46	22,55
<i>Penicillium</i>	45	22,06
<i>Curvularia</i>	37	18,38
<i>Humicola</i>	36	17,65
<i>Alternaria</i>	35	17,16
<i>Trichoderma</i>	34	16,67
<i>Sphaerosporium</i>	25	12,26

NOTA: Fungos obtidos a partir da coleta de ar com o caça-esporos FEC em 204 exposições entre junho/2001 a maio/2002 na cidade de Botucatu. Em cada semana foram feitas quatro coletas (em quatro diferentes pontos da cidade) sendo que em cada uma delas foram realizadas cinco exposições de 30 segundos cada. Assim, foram obtidas 20 placas/semana, as quais foram seladas, incubadas em temperatura ambiente por uma semana e analisadas quanto ao total de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os fungos que cresceram em cada placa foram identificados através de suas características morfológicas utilizando-se lupa e microscópio óptico comum. A frequência absoluta (FA) refere-se ao número de vezes que o fungo foi identificado nas diversas exposições (aqui não se considerou o total de colônias/placa e sim se o fungo estava ou não presente); a frequência relativa (FR) foi calculada multiplicando-se por 100 a frequência absoluta e dividindo-se o resultado pelo número total de exposições. O valor da FR acima de 10% é usualmente indicativo de frequência mais expressiva

Observando-se a distribuição dos fungos ao longo do ano verifica-se que a partir de maio há um aumento na concentração de esporos no ar, sendo que os valores mais altos (acima de 400 UFC/m³ de ar) foram observados neste período. Até setembro, aproximadamente, a concentração de esporos mantém-se, no geral, acima de 200 UFC/m³ de ar e a partir daí vai declinando até atingir seus menores valores (entre 100 a 150 UFC/m³) entre novembro e janeiro, embora picos esporádicos tenham sido observados neste período. A partir de fevereiro a concentração vai novamente subindo de forma gradual (Figura 9). A figura 10 mostra a distribuição mensal das UFC/m³ de ar do total de fungos capturados e a figura 11, a distribuição de acordo com as estações do ano.

As Figuras de 12 a 18 mostram a distribuição mensal de alguns dos gêneros mais freqüentes aqui encontrados e que são descritos como importantes sensibilizantes em doenças alérgicas.

Distribuição semanal da concentração total de unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³ de ar) de fungos anemófilos, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

Figura 9. Observação: Utilizado coletor modelo FEC

Distribuição mensal da concentração total de unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³ de ar) de fungos anemófilos, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

Figura 10. Observação: Utilizado coletor modelo FEC. As UFC de cada coleta foram somadas para se obter o valor mensal

Distribuição da concentração total de unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³ de ar) de fungos anemófilos, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002, de acordo com as estações do ano

Figura 11. Observação: Utilizado coletor modelo FEC. As UFC de cada coleta foram somadas para se obter o valor correspondente à cada estação.

Distribuição mensal da concentração de unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³ de ar) do gênero *Cladosporium*, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

Figura 12. Observação: Utilizado coletor modelo FEC. As UFC de cada coleta foram somadas para se obter o valor mensal

Distribuição mensal da concentração de unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³ de ar) do gênero *Aspergillus*, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

Figura 13. Observação: Utilizado coletor modelo FEC. As UFC de cada coleta foram somadas para se obter o valor mensal

Distribuição mensal da concentração de unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³ de ar) de leveduras, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

Figura 14. Observação: Utilizado coletor modelo FEC. As UFC de cada coleta foram somadas para se obter o valor mensal

Distribuição mensal da concentração de unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³ de ar) do gênero *Penicillium*, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

Figura 15. Observação: Utilizado coletor modelo FEC. As UFC de cada coleta foram somadas para se obter o valor mensal

Distribuição mensal da concentração de unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³ de ar) do gênero *Fusarium*, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

Figura 16. Observação: Utilizado coletor modelo FEC. As UFC de cada coleta foram somadas para se obter o valor mensal

Distribuição mensal da concentração de unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³ de ar) do gênero *Curvularia*, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

Figura 17. Observação: Utilizado coletor modelo FEC. As UFC de cada coleta foram somadas para se obter o valor mensal

Distribuição mensal da concentração de unidades formadoras de colônias por metro cúbico de ar (UFC/m³ de ar) do gênero *Alternaria*, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

Figura 18. Observação: Utilizado coletor modelo FEC. As UFC de cada coleta foram somadas para se obter o valor mensal

2- ESTUDO DOS FATORES METEOROLÓGICOS SOBRE OS FUNGOS ENCONTRADOS

Com relação aos fatores meteorológicos (*), ao se correlacionar cada coleta com as variáveis meteorológicas (temperatura máxima e mínima, precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e velocidade do vento) do dia da mesma, não se observou associação entre nenhuma delas e o total de fungos encontrados. Entretanto, considerando-se a média mensal dessas variáveis meteorológicas e a soma das UFC/m³ de ar de fungos de cada mês, observou-se que a precipitação pluviométrica, a umidade relativa do ar e a velocidade do vento apresentaram associação negativa com o total de fungos encontrados (Figuras 19 e 20), enquanto que a temperatura média não apresentou influência significativa sobre esse total. Com relação aos diferentes gêneros, e considerando-se a associação coleta a coleta, a maioria também não se associou quer positiva, quer negativamente aos citados parâmetros meteorológicos, exceto *Cladosporium* que mostrou associação negativa com velocidade do vento e com umidade relativa do ar; *Epicoccum*, que apresentou associação positiva com velocidade do vento; *Hyalodendrum*, que mostrou associação positiva com umidade relativa do ar e *Trichoderma*, que se associou positivamente à temperatura mínima (Tabela 10).

* Vide anexo C

Associação entre total mensal de UFC/m³ de ar e precipitação pluviométrica, considerando-se as médias mensais dessa variável meteorológica, na cidade de Botucatu, no período de junho/2001 a maio/2002

Figura 19. “PREC. PLUV.”: precipitação pluviométrica

Associação entre total mensal de UFC/m³ de ar, umidade relativa do ar e velocidade do vento, considerando-se as médias mensais dessas variáveis meteorológicas, na cidade de Botucatu, no período de junho/2001 a maio/2002

Figura 20. “UMIDADE REL.”: umidade relativa do ar; “VEL. VENTO”: velocidade do vento

TABELA 10 - Gêneros de fungos que se associaram de forma significativa às diversas variáveis meteorológicas, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

GÊNEROS DE FUNGOS	VELOCIDADE DO VENTO	PRECIPITAÇÃO PLUVIOMÉTRICA	UMIDADE RELATIVA DO AR	TEMPERATURA MÁXIMA	TEMPERATURA MÍNIMA
<i>Cladosporium</i>	-0.4527 (*)	-	-0.3883 (*)	-	-
<i>Epicoccum</i>	0.4660 (*)	-	-	-	-
<i>Hyalodendrum</i>	-	-	0.2954 (*)	-	-
<i>Trichoderma</i>	-	-	-	-	0.3293 (*)

* Coeficiente de correlação de Pearson com nível de significância de 5%

Nota: Foram computadas as UFC coletadas semanalmente. Estas foram correlacionadas com cada variável meteorológica considerando-se seu valor no dia da referida coleta

Levando-se em conta as médias das variáveis meteorológicas e o total de fungos em cada mês, observou-se um comportamento semelhante do *Cladosporium* em relação ao total de UFC, sendo que as leveduras apresentaram comportamento inverso, ou seja, tiveram uma associação positiva com precipitação pluviométrica, velocidade do ar e umidade relativa.

3- COMPARAÇÃO ENTRE OS QUATRO PONTOS DE COLETA

O total de fungos capturados no Ponto 3 ficou abaixo dos demais pontos, como mostra a figura 21.

Comparação entre os quatro pontos de coleta quanto às UFC/m³ de ar, na cidade de Botucatu, de junho de 2001 a maio de 2002

* $p < 0,05$

Figura 21. Computou-se o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) obtidas a partir da coleta semanal em quatro pontos da cidade que foram escolhidos de acordo com a direção predominante do vento. Foram feitas cinco repetições/ponto num total de 51 exposições/ponto. Utilizou-se o caça-esporos modelo FEC que foi mantido em funcionamento por 30 segundos. As placas foram seladas logo após a coleta, ficando incubadas por uma semana em temperatura ambiente. Após, contou-se as UFC. O meio de cultura utilizado foi o BDA (batata dextrose ágar). A concentração (UFC/m³ de ar) foi calculada a partir do fluxo do aparelho FEC que é de 100 litros/minuto. O Ponto 3 capturou menos esporos que os demais, os quais foram semelhantes entre si

4- PESQUISA DE SENSIBILIZAÇÃO A FUNGOS ATRAVÉS DE TESTES CUTÂNEOS

Foram selecionados 207 pacientes e 19 controles. Do total de pacientes, 83 foram do sexo masculino e 124 do feminino (Figura 22).

Distribuição dos pacientes de acordo com o gênero

Figura 22. Total de pacientes: 207 (MASC: pacientes de sexo masculino – 83; FEM: pacientes de sexo feminino – 124)

Quanto aos controles, 13 foram do sexo feminino e 6 do masculino.

Com relação à idade, os pacientes estavam assim distribuídos: 64 (30,9%) tinham entre 12 e 25 anos; 75 (36,2%) entre 26 e 40 anos; 47 (22,7%) entre 41 e 55 anos e 21 (10,1%) de 56-70 anos. Os controles distribuíram-se da seguinte forma: 7 (36,8%) entre 12 e 25 anos; 8 (42,2%) entre 26 e 40 anos; 3 (15,8%) entre 41 e 55 anos e 1 (5,3%) de 55-70 anos.

Do total de pacientes, 18 apresentaram apenas asma, 86 apenas rinite e 103 eram portadores de ambas as doenças (Figura 23). Os controles foram voluntários sem asma e/ou rinite e sem antecedentes pessoais e/ou familiares para essas doenças.

Distribuição dos pacientes de acordo com diagnósticos

Figura 23. Total de pacientes (Pac.): 207

Dos 207 pacientes, 121 eram portadores de asma, isoladamente ou em associação com rinite. Desses pacientes, 26 apresentavam asma intermitente; 17 asma persistente leve; 48 asma persistente moderada e 30 asma persistente grave (Figura 24).

Dos 207 pacientes, 189 eram portadores de rinite assim distribuídos: rinite intermitente: 8; rinite persistente leve: 31; rinite persistente moderada e grave: 150 (Figura 25).

Distribuição dos pacientes com asma de acordo com a gravidade

Figura 24. Total de pacientes com asma: 121 (INTERM.: pacientes com asma intermitente - 26; PERS. LEVE: pacientes com asma persistente leve - 17; PERS. MOD.: pacientes com asma persistente moderada - 48; PERS. GRAVE: pacientes com asma persistente grave: 30)

Distribuição dos pacientes com rinite de acordo com a gravidade

Figura 25. Total de pacientes com rinite: 189 (INTERM.: pacientes portadores de rinite intermitente - 8; PERS. LEVE: pacientes portadores de rinite persistente leve - 31; PERS. MOD./GRAVE: pacientes portadores de rinite persistente moderada e grave - 150)

Quanto à positividade geral dos testes cutâneos, 174 dos 207 pacientes apresentaram pelo menos um teste positivo (puntura ou intradérmico), ou seja, 84% de positividade. Todos os controles tiveram testes imediatos negativos (puntura e intradérmicos), exceto um dos controles que apresentou teste positivo a ácaro (3,0 mm de diâmetro).

Considerando-se apenas a positividade a fungos, observou-se que 118 dos 207 pacientes (57%) apresentaram pelo menos um teste positivo a fungos, ou por puntura ou através de teste intradérmico (Figura 26).

Positividade dos testes cutâneos a fungos

Figura 26. Pacientes com pelo menos um teste positivo a fungos (intradérmico ou punção): 118 pacientes de um total de 207 (57%)

Dos 118 pacientes com testes positivos a fungos, 88% (104 pacientes) tiveram o diagnóstico de sensibilização a esses alérgenos através do teste intradérmico (Figura 27). Vinte e três pacientes desse grupo (19,5%) não apresentaram nenhum outro teste positivo a nenhum outro alérgeno testado e tiveram apenas testes intradérmicos positivos. Desse grupo, 10 pacientes eram portadores de asma, sendo que destes, 6 tiveram diagnóstico de asma moderada e 2 de asma grave.

Positividade a fungos através de teste de puntura ou teste intradérmico

Figura 27. Total de pacientes com sensibilização a fungos: 118 pacientes. Pacientes com pelo menos um teste de puntura positivo a fungos: 14 pacientes (12%); pacientes cujo diagnóstico de sensibilização a fungos foi firmado exclusivamente através de testes intradérmicos: 104 pacientes (88%)

A maioria dos pacientes apresentou positividade para mais de um fungo, como mostra a Tabela 11.

Considerando-se os pacientes que apresentaram testes positivos a fungos, observou-se que a maioria (54,2%) apresentou positividade para *Aspergillus*, seguida de perto pelo fungo *Neurospora* (48,3%). A seguir, os fungos *Candida*, *Penicillium*, e *Cladosporium* com 44%, 38,1% e 30%, respectivamente. A seguir, os demais fungos, conforme mostra a Tabela 12.

Tabela 11 – Testes positivos a fungos/ paciente

TESTES POSITIVOS PARA FUNGOS/PACIENTE	Nº DE PACIENTES (N=118)	PORCENTAGEM (%)
01	40	33,9
02	33	28
03	11	9,3
04 OU MAIS	34	28,8

NOTA: Considerou-se testes de puntura e testes intradérmicos para essa análise. O “N” de 118 refere-se aos pacientes sensibilizados a pelo menos um fungo

Tabela 12 – Positividade aos diversos fungos testados

TIPO DE FUNGO	Nº DE PACIENTES COM TESTE POSITIVO (N=118)	PORCENTAGEM (%)
<i>Aspergillus</i>	64	54,2
<i>Neurospora</i>	57	48,3
<i>Candida</i>	52	44,0
<i>Penicillium</i>	45	38,1
<i>Cladosporium</i>	33	30,0
<i>Mucor</i>	31	26,3
<i>Chaetomium</i>	27	22,9
<i>Rhizopus</i>	16	13,6
<i>Fusarium</i>	16	13,6
<i>Alternaria</i>	12	10,2
<i>Metarrhizium</i>	4	3,4

NOTA: Considerou-se testes de puntura e testes intradérmicos para essa análise.
O “N” de 118 refere-se aos pacientes sensibilizados a pelo menos um fungo

Analisando-se positividade a fungos e grupo etário não foi observada diferença estatisticamente significativa entre esses parâmetros.

A maioria dos fungos testados foi identificada no ar de Botucatu numa frequência acima de 10% (*Aspergillus*, *Candida* (levedura), *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Alternaria*), apesar de não haver correspondência exata entre os mais frequentes do ar e os mais sensibilizantes. O fungo *Neurospora*, que apresentou taxas significativas de sensibilização, não foi encontrado no ar numa frequência alta.

Dos 207 pacientes testados, 151 apresentaram positividade a testes de puntura, distribuídos de acordo com a tabela 13.

Tabela 13 – Positividade geral aos testes de puntura

ALÉRGENOS TESTADOS (TESTE DE PUNTURA)	Nº DE PACIENTES COM TESTES POSITIVOS	PORCENTAGEM (N=151) (%)	PORCENTAGEM (N=207) (%)
Ácaros	143	94,7	69,1
Barata	45	29,8	21,7
Cão	24	15,9	11,6
Gato	24	15,9	11,6
Pólen	17	11,3	8,21
Fungos	14	9,3	6,8

NOTA: Dos 207 pacientes testados, 151 apresentaram testes de puntura positivos distribuídos de acordo com a tabela acima

Analisando-se a associação entre positividade a testes a fungos e gravidade de asma, observou-se que testes a fungos são estatisticamente mais positivos no grupo de asma grave do que nos demais tipos (Tabela 14). Essa associação não foi observada entre os portadores de rinite nem entre os diversos tipos de asma e outros alérgenos.

Tabela 14 – Positividade aos testes a fungos x gravidade de asma

TIPO DE ASMA	Nº DE PACIENTES	TESTE A FUNGO POSITIVO (%)	TESTE A FUNGO NEGATIVO (%)
Intermitente	26	42,3	57,7
Persistente leve	17	47,0	53,0
Persistente moderada	48	66,7	33,3
Persistente grave	30	86,7	13,3 (*)

NOTA: Houve diferença significativa entre o grupo de asmáticos graves que apresentou testes positivos a fungos e o que não apresentou positividade.

* $P < 0,05$

Quanto aos fungos associados à asma grave observou-se que *Aspergillus*, *Neurospora* e *Candida* foram significativamente mais positivos que os demais (Tabela 15).

Tabela 15 – Associação entre asma grave e positividade a fungos pelo teste cutâneo (puntura e intradérmico)

FUNGOS TESTADOS	PACIENTES ASMÁTICOS GRAVES COM TESTES POSITIVOS (PUNTURA OU ID)
<i>Aspergillus</i>	18 (*)
<i>Neurospora</i>	14(*)
<i>Candida</i>	13(*)
<i>Penicillium</i>	10
<i>Cladosporium</i>	7
<i>Chaetomium</i>	6
<i>Mucor</i>	8
<i>Fusarium</i>	5
<i>Rhizopus</i>	5
<i>Alternaria</i>	3
<i>Metarrhizium</i> (apenas teste de puntura)	2

NOTA: Total de pacientes com asma grave: 30

* $p < 0,05$

Não se observou associação entre gravidade da asma e quantidade de fungos positivos aos testes (Tabela16).

Tabela 16 – Associação entre número de testes a fungos positivos/paciente e asma grave

NÚMERO DE TESTES POSITIVOS A FUNGOS/PACIENTE	ASMA INTERMITENTE (NÚMERO DE PACIENTES)	ASMA PERSISTENTE LEVE (NÚMERO DE PACIENTES)	ASMA PERSISTENTE MODERADA (NÚMERO DE PACIENTES)	ASMA PERSISTENTE GRAVE (NÚMERO DE PACIENTES)
1	4	3	14	8
2	1	3	6	6
3	2	0	4	3
4	4	2	7	9

NOTA: Total de pacientes com asma grave: 30

Foi realizada análise dos primeiros 34 pacientes onde se observou resposta cutânea tardia (com início após 4-6 horas e resolução em aproximadamente 24 horas). Dos 34 pacientes, 28 (82,4%) tiveram esse tipo de resposta, sendo que duas pacientes tiveram reação intensa que chegou à necrose (portadoras de asma grave e asma moderada, respectivamente). As demais reações foram de intensidade moderada, com enduração dolorosa, eritematosa, acima de 5 mm em relação ao controle. O fungo que mais ocasionou reações tardias foi *Candida* (25 pacientes – 73,5%), seguido por *Aspergillus* (6 pacientes-17,6%), *Neurospora* e *Penicillium* (4 pacientes cada um – 11,8%), *Mucor* (3 pacientes – 8,8%), *Alternaria* (2 pacientes – 5,9%) e *Chaetomium* e *Fusarium* (1 paciente cada – 3,0%). Os fungos *Rhizopus* e *Cladosporium* não desencadearam respostas cutâneas tardias nos pacientes estudados. Dos 19 controles, 5 foram observados quanto à resposta tardia, sendo que os demais receberam orientação para inibi-la. Desses 5, 3 apresentaram resposta tardia ao fungo *Candida*, porém com característica diferente dos pacientes. Nesses

controles a resposta foi mais tardia, com início após 48 horas. Em dois desses pacientes foi observada adenite axilar homolateral. Não se observou, nesse grupo de 34 pacientes, relação entre asma grave e resposta tardia. Tal relação também não foi observada entre os portadores de rinite.

Encontrou-se, ainda, associação positiva entre total de pacientes com asma atendidos em Pronto-Socorros durante o ano estudado e o total de UFC nesse mesmo período (Figura 28). Essa associação não foi observada para nenhum fungo em particular.

Associação entre total de UFC e número de pacientes atendidos por crise de asma entre junho/2001 a maio de 2002 na cidade de Botucatu

Figura 28. Gráfico mostrando associação positiva entre a concentração total de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e pacientes atendidos por crises de asma no período estudado. Para se computar o número de crises levantou-se os atendimentos por asma em cada mês durante o ano estudado nos dois Prontos-Socorros da cidade (Municipal e Unimed)

5- PESQUISA “IN VITRO” DE IgE ESPECÍFICA A FUNGOS

Foram realizadas 848 análises (106 pacientes com oito fungos testados) que se mostraram positivas em apenas 4%, sendo que a grande maioria foi classe I ou II e apenas uma das análises apresentou IgE específica classe III (para *Alternaria*). Para maiores informações sobre a padronização da pesquisa de IgE específica “in vitro” vide Anexo G.

Foram analisados os seguintes parâmetros:

- 1- Sensibilidade: proporção de pacientes sensibilizados a certo fungo (de acordo com o teste cutâneo) e com IgE positiva para esse fungo em relação ao total de pacientes sensibilizados a esse fungo (Tabela 17);
- 2- Especificidade: proporção de pacientes não sensibilizados a certo fungo com IgE negativa em relação ao grupo de pacientes não alérgicos (Tabela 18);
- 3- Valor preditivo positivo: proporção de pacientes sensibilizados e com IgE positiva em relação a todos os pacientes com IgE positiva (Tabela 19);
- 4- Valor preditivo negativo: proporção de pacientes não sensibilizados e com IgE negativa em relação a todos os pacientes com IgE negativa (Tabela 20).

Tabela 17 – Sensibilidade da pesquisa de IgE específica “in vitro”(Unicap®) aos fungos testados em relação ao teste cutâneo

	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mucor</i>	<i>Candida</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizopus</i>
teste pos e IgE pos	3	0	5	2	6	1	2	0
teste positivo	30	24	43	20	37	10	10	14
Sensibilidade (%)	10	0	11,6	10	16,2	10	20	0

NOTA: Sensibilidade é a proporção de pacientes sensibilizados a certo fungo (de acordo com o teste cutâneo) e com IgE positiva para esse fungo em relação ao total de pacientes sensibilizados a esse fungo. “Pos”: positivo(a). Foram analisadas 106 amostras colhidas dos pacientes pesquisados

Tabela 18 - Especificidade da pesquisa de IgE específica “in vitro” (Unicap®) aos fungos testados em relação ao teste cutâneo

	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mucor</i>	<i>Candida</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizopus</i>
teste neg e IgE neg	75	81	61	85	67	93	95	88
teste negativo	76	82	63	86	69	96	96	92
Especificidade (%)	98,7	98,8	96,8	98,8	97,1	96,9	99,0	95,7

NOTA: Especificidade: proporção de pacientes não sensibilizados a certo fungo com IgE negativa em relação ao grupo de pacientes não alérgicos. “Neg”: negativo(a). Foram analisadas 106 amostras colhidas dos pacientes pesquisados

Tabela 19 – Valor Preditivo Positivo da pesquisa de IgE específica “in vitro” (Unicap®) aos fungos testados em relação ao teste cutâneo

	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mucor</i>	<i>Candida</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizopus</i>
teste pos e IgE pos	3	0	5	2	6	1	2	0
IgE positiva	4	1	6	3	8	4	3	4
VPP (%)	75	0	83,3	66,7	75	25	66,7	0

NOTA: Valor preditivo positivo: proporção de pacientes sensibilizados e com IgE positiva em relação a todos os pacientes com IgE positiva. “Pos”: positivo (a); “VPP”: valor preditivo positivo. Foram analisadas 106 amostras colhidas dos pacientes pesquisados

Tabela 20 – Valor Preditivo Negativo da pesquisa de IgE específica “in vitro” (Unicap®) aos fungos testados em relação ao teste cutâneo

	<i>Penicillium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Mucor</i>	<i>Candida</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Rhizopus</i>
teste neg e IgE neg	75	81	61	85	67	93	95	88
IgE negativa	102	105	100	103	98	102	103	102
VPN	73,52	77,1	61	82,5	68,4	91,2	92,2	86,3

NOTA: Valor preditivo negativo: proporção de pacientes não sensibilizados e com IgE negativa em relação a todos os pacientes com IgE negativa. “Neg”: negativo (a); “VPN”: valor preditivo negativo. Foram analisadas 106 amostras colhidas dos pacientes pesquisados

DISCUSSÃO

O presente trabalho, ao estudar os fungos anemófilos da cidade de Botucatu e sua correlação com sensibilização em portadores de asma e rinite, vem ao encontro da necessidade de se entender um pouco mais o impacto desses seres na saúde dos indivíduos. No que diz respeito às doenças alérgicas, certamente há uma grande lacuna entre o real papel que os fungos desempenham na asma e na rinite e o que se consegue de fato diagnosticar. Considerando-se a enorme biodiversidade que existe em nosso país, fungos são, sem dúvida, parte importante da microbiota anemófila e, como ficou demonstrado nas etapas anteriores deste estudo, o diagnóstico de sensibilização alérgica é difícil, quer porque não há extratos da grande maioria dos fungos existentes na biosfera, quer porque apenas pequena minoria dos extratos existentes é padronizada, quer porque os testes de puntura são pouco sensíveis e os intradérmicos são mais difíceis de ser realizados na clínica do dia-a-dia. Mesmo com todas essas dificuldades, é importante ter-se uma noção dos principais fungos existentes no ar em certo local e como eles se comportam durante as várias estações do ano para orientar o alergista na escolha de seus extratos e nos cuidados a ser dispensados aos pacientes sensibilizados. Ademais, este trabalho suscita outras questões que deverão ser estudadas no futuro para se avançar no entendimento de como esses alérgenos influenciam a saúde de indivíduos atópicos ou não. Abaixo, discute-se tais questões e os principais aspectos abordados neste estudo:

A- O aparelho FEC

Para se estudar quais os fungos mais prevalentes no ar de Botucatu foi desenvolvido um aparelho caça-esporos denominado FEC (Furtado e Croce). Diversos autores têm ressaltado a importância em se coletar fungos anemófilos através de aparelhos que capturem os esporos de forma ativa, e não passivamente como é o método gravitacional (Middleton et al., 1998; Salvagio e Aukrust, 1981; Frenz, 1999; Southworth, 1974).

A avaliação dos fungos anemófilos através do coletor FEC mostrou-se significativamente superior ao método gravitacional.

A comparação com o coletor Andersen mostrou que, se comparado de maneira absoluta, o FEC é menos eficaz. Porém, isto decorre do fato de aquele aparelho coletar seis placas simultaneamente, enquanto que o FEC coleta apenas uma.

Outra limitação do FEC é o escape de fluxo, por se tratar de um sistema aberto, diferentemente do Andersen. Além disso, como esse fluxo é maior naquele aparelho em relação a este, é possível que a carga de esporos na placa subjacente seja muito grande, o que dificulta o crescimento das colônias que precisam competir pelo substrato. Isto explicaria a diferença encontrada entre os dois aparelhos quanto à concentração de esporos no ar, parâmetro este que foi inferior no FEC em relação ao Andersen. Futuramente o FEC poderá ser aperfeiçoado diminuindo-se sua vazão e/ou mudando-se o desenho do aparelho para impedir que o ar escape pelas laterais. Entretanto, existe correlação positiva entre os dois caça-esporos, ou seja, quanto mais se aumentam as placas a serem coletadas pelo FEC, menor o erro entre os dois coletores. Assim, optou-se neste estudo pela coleta de cinco placas em cada ponto, ou seja, vinte placas/semana. Qualitativamente os dois aparelhos se assemelham,

capturando aproximadamente os mesmos tipos de esporos. Outra característica do FEC é sua praticidade, pois é mais portátil que o Andersen por ser mais leve e mais fácil de manejar, podendo ser ligado à bateria do carro, o que facilita seu uso em pesquisas de campo. Além disso, a maior vantagem do aparelho FEC em relação ao Andersen é o custo que chega a ser sessenta vezes menor daquele em relação a este.

B- Coleta de fungos anemófilos

a. Meio de cultura

É bastante diversificada a literatura específica com relação aos meios de cultura. Vários autores utilizam diferentes meios obtendo resultados semelhantes (Al-Suwaine et al., 1999; Iovannitti e Tiraboschi, 1985; Kwaasi et al., 1998; Pinheiro et al., 1966). Também no presente estudo não houve diferença entre os meios utilizados na avaliação prévia que foi realizada antes de se começar a coleta anual dos fungos anemófilos. Como Barkai-Golan et al. (1977) e Levetin e Horowitz (1978), optou-se aqui pelo meio batata dextrose ágar pela comodidade no preparo, já que ele é industrializado, apresentado na forma de pó e pode ser preparado instantaneamente. Além disso, foi o meio que apresentou menor índice de contaminação.

b. Altura das coletas

Vários autores têm preferido a utilização de coletas a um nível do solo que se assemelhe à inalação de esporos num indivíduo de estatura mediana, isto é, a 1,5 metros aproximadamente (Agarwal et al., 1969; Airaudi e Marchisio, 1996; Barkai-Golan et al., 1977; Buck e Gambale, 1985; Faria, 1967; Fiorini et al., 1985; Gambale

et al., 1981; Gambale, et al., 1983; Lawande e Onyemelukwe, 1984; Li e Hsu, 1997; Pecher et al., 1988; Purchio et al., 1984; Rosas, 1993; Vieira et al., 1989).

Apesar de não se ter encontrado neste estudo diferença significativa entre as duas alturas estudadas (nível do solo e 1,5 metros de altura), optou-se aqui por seguir a tendência de se coletar a 1,5 metros do solo, levando-se em consideração que essa altura é mais ergonômica.

c. Horário das coletas

De um modo geral há um consenso na literatura sobre o assunto, que o período da manhã é o menos indicado para se coletar fungos anemófilos. Gambale et al. (1983) encontraram quantidades de esporos significativamente maiores às 15h00 em relação às 9h00; Nussbaum (1991) e Al-Subai (2002) demonstraram que ao meio dia a esporulação é máxima, diminuindo gradativamente durante a tarde e atingindo o mínimo à noite e início da manhã.

Nesses trabalhos a explicação para tal fenômeno baseia-se principalmente no grau de insolação, que afeta a esporulação dos fungos. Assim, quanto maior a intensidade luminosa, maior a esporulação. Entretanto, essa observação não está de acordo com Purchio e Gambale (1984), que encontraram o oposto.

Na etapa inicial deste trabalho, ao se comparar dois horários de coleta, notou-se aumento acentuado da captura no horário vespertino (às 17h00), o que está de acordo com a maioria dos autores.

C- Identificação dos fungos anemófilos

Praticamente todos os trabalhos da literatura médica nacional e internacional concordam com Prince e Meyer (1976) e citam os fungos chamados “dominantes universais”, ou seja, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, etc. (Abdel-Hafez, 1984; Al-Suwaine et al., 1999; Iovanniti e Tiraboschi, 1985; Mangiaterra et al., 1993; Collins-Williams et al., 1973; Piontelli e Velasco, 1974; Urrutia et al., 1976; Dupont et al., 1967; Al-Doory et al., 1980; Goodman et al., 1965; Levetin e Horowitz, 1978; Nussbaum, 1991; Licorish et al., 1985; Barnes et al., 2000; Youssef e Nagib, 1966; Aller et al., 1970; Torras et al., 1881; D’Amato e Spieksma, 1995; Beaumont et al., 1985a; Agarwal et al., 1969; Shadzi et al., 1992; Hariri et al., 1978; Barkai-Golan et al., 1977; Airaudi e Marchisio, 1996; Cosentino et al., 1990; Murgia, 1984; Takahashi, 1997; Davies, 1969; Moustafa e Kamel, 1976; Khan et al., 1999; Martinez et al., 1986; Venegas et al., 1968; Rosas et al., 1993; Ogunlana, 1975; Requejo, 1975; Almodóvar, 1977; Bunnag et al., 1982; Phanichyakarn et al., 1974; Özkaragöz, 1969; Çolakoglu, 1996; Li e Hsu, 1995).

No Brasil, até a década de 70, aproximadamente, acreditava-se que o gênero *Alternaria* não fosse importante, pois praticamente não era isolado. Entretanto, é provável que essa falta de isolamento se devesse a problemas técnicos na coleta, uma vez que vários trabalhos após esse período passaram a isolar tal fungo. Além da *Alternaria*, os fungos dominantes universais são também os mais prevalentes aqui no nosso meio (Machado e Purchio, 1980; Gambale et al., 1977; Mendes e Lacaz, 1952; Faria, 1967; Lima et al., 1963; Purchio et al., 1984; Pinheiro et al., 1966; Mezzari et al., 2002; Alecrin e Teixeira, 1958; Buck e Gambale, 1985; Moraes e Lima, 1986; Pecher et al., 1988; Vieira et al., 1989; Lacaz e Mendes, 1963).

Em Botucatu, os fungos mais prevalentes seguiram o padrão encontrado pela maioria dos autores, isto é, os fungos mais frequentemente isolados foram os dominantes universais. Nota-se, nesta pesquisa, que o gênero *Cladosporium* foi o mais prevalente, tendo sido encontrado em praticamente todas as coletas durante todo o ano. Apenas Faria (1967) em Belo Horizonte obteve uma frequência assim tão alta. Esse fungo teve picos de incidência nos meses de abril, junho a agosto e, menos intensamente, em outubro. O gênero *Epicoccum*, segundo lugar em frequência, também foi encontrado com alta incidência por Gambale et al. (1977) em São Paulo e, menos intensamente, por Faria (1967), em Belo Horizonte; Purchio et al. (1984), na Baixada Santista e Buck e Gambale (1985), em Presidente Prudente.

O gênero *Aspergillus*, seguindo a tendência de todas as pesquisas já citadas, também foi altamente prevalente na cidade de Botucatu, com picos em março-abril e setembro.

O comportamento das leveduras diferiu da maioria dos fungos anemófilos aqui descritos, uma vez que seu pico de incidência foi no verão.

O gênero *Penicillium* mostrou-se mais prevalente na primavera (mês de novembro).

Os demais fungos, de maneira geral, predominaram no outono-inverno. Esse padrão sazonal está de acordo com Passarelli (1952), que estudou os fungos da cidade do Rio de Janeiro encontrando maior incidência no inverno e início da primavera. Gambale et al. (1977) em São Paulo e Purchio et al. (1984) na Baixada Santista obtiveram resultados semelhantes. Entretanto, Mezzari et al. (2002), ao contrário da maioria dos autores brasileiros e do atual estudo, encontraram maior incidência de fungos no verão. Isso provavelmente se deve ao fato de esses autores

terem estudado o sul do país, que possui temperaturas mais amenas no verão e mais baixas no inverno, em relação ao sudeste do país.

Os fungos *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Neurospora* e *Phoma*, que também foram muito prevalentes em Botucatu, são citados pela maioria dos pesquisadores nacionais mencionados acima, constituindo-se nos chamados “dominantes geográficos”.

Os gêneros *Sphaerosporium*, *Humicola* e *Hyalodendrum* foram encontrados na cidade de Botucatu numa frequência superior a 10% de isolamento. Nenhum desses fungos foi citado na literatura específica nacional em índices de isolamentos semelhantes, o que os torna “dominantes locais” na classificação de Prince e Meyer (1976).

Com relação aos quatro pontos de coleta, nota-se neste trabalho que o ponto de coleta correspondente ao centro da cidade apresentou menor índice de captura de esporos em relação aos demais pontos. É provável que nesse local a menor disponibilidade de matéria orgânica explique a menor incidência de fungos. Sendo Botucatu uma cidade de médio porte, os outros três pontos de coleta, que se localizam em áreas periféricas, ficam próximos já aos limites da cidade, perto de pastos, plantações de eucalipto e mata nativa (cerrado), que são os reservatórios mais abundantes dos principais fungos anemófilos. Esse achado está de acordo com Buck e Gambale (1985) que, em Presidente Prudente (SP), também encontraram menos fungos nas áreas urbanas mais densamente povoadas. É possível, ainda, que os prédios localizados nas vizinhanças do Ponto 3 tenham contribuído para barrar correntes aéreas, o que diminui a captura de esporos anemófilos.

D- Influência de fatores meteorológicos na incidência de fungos anemófilos

Neste estudo, foi feita análise quer correlacionando-se os fatores meteorológicos do dia da coleta com os fungos capturados naquele dia, quer a média mensal desses fatores com a soma dos fungos capturados no mês em questão. Na primeira análise não houve nenhuma associação com o total de UFC e temperatura máxima ou mínima, umidade relativa do ar e índice pluviométrico, exceto para alguns fungos onde uma ou outra variável se associou e, mesmo assim, com baixo índice de correlação. Ao se analisar as médias observou-se que o índice pluviométrico, a umidade relativa do ar e a velocidade do vento se associaram de forma inversa com a incidência de fungos. É possível que tais fatores, ao serem analisados pela média, reflitam interações mais complexas que não aparecem no dia-a-dia. A associação negativa entre índice pluviométrico e umidade relativa do ar também foi observada por Gambale et al. (1977), em São Paulo (SP); Bunnag et al. (1982) em Bangkok, Tailândia e Lawande e Onyemelukwe (1984), na Nigéria. Entretanto, vários autores encontraram resultados opostos, como Machado e Purchio (1980), no Grande Recife (PE); Beaumont et al. (1985a), na Holanda; Çolakoglu (1996), na Turquia e Moustafa e Kamel (1976) no Kuwait.

No presente estudo, o principal fator encontrado para explicar o aumento de incidência de esporos totais no outono-inverno foi a baixa umidade pela falta de chuvas que, na região do cerrado, é a grande determinante da umidade atmosférica. Apenas leveduras e *Penicillium* fugiram a essa regra.

Vários trabalhos têm citado a temperatura como um fator importante na dispersão de fungos anemófilos (Bartzokas, 1975; Beaumont et al., 1985a; Li e Kendrick, 1995; Moustafa e Kamel 1976; Ogunlana, 1974; Gambale et al., 1983;

Purchio et al., 1984). Em Botucatu não houve associação entre temperatura média e incidência de fungos, exceto para o gênero *Trichoderma*, que apresentou associação positiva ao se considerar a média mensal desse fator meteorológico.

Diferentemente do que foi encontrado por vários autores (Lawande e Onyemelukwe, 1984; Li e Kendrick, 1995; Gambale et al., 1983; Buck e Gambale, 1985), a velocidade do vento associou-se, em Botucatu, negativamente à dispersão dos fungos anemófilos, exceto para as leveduras. Isso se deve, provavelmente, ao fato de essa ser uma cidade serrana onde a velocidade do vento no verão chega a médias de 100-120 km/dia, muito acima da média de 18-20 km/dia citada por Gambale et al. (1983) e que apresentou associação positiva com incidência de fungos na cidade de São Paulo. É possível que em altas velocidades do vento a captura de esporos fique prejudicada.

E- Pesquisa de sensibilização a fungos

A população estudada no presente trabalho revelou alto grau de sensibilização (84% de positividade a pelo menos um extrato testado), o que confirma a importância dos alérgenos em geral em pacientes portadores de asma e/ou rinite.

Com relação à sensibilização a fungos, Kurup et al. (2000) estimam que a prevalência de alergia respiratória a esses alérgenos seja da ordem de 20-30% entre indivíduos atópicos, ou até 6% da população em geral. Entretanto, há citação na literatura médica de taxas de sensibilização a fungos tão baixas quanto 4,6% (Beaumont et al., 1985b), até resultados tão expressivos quanto cerca de 80% de positividade (Santilli et al., 1985; Malling et al., 1995). Também no Brasil, apesar de haver poucos trabalhos sobre sensibilização a fungos, Gambale et al. (1993)

encontraram 86% de positividade em trabalhadores de bibliotecas da Universidade de São Paulo, e Mohovic et al. (1988) obtiveram até 80% de positividade em pacientes com asma e/ou rinite utilizando extratos polivalentes.

Na presente casuística, a sensibilização a fungos foi da ordem de 57%, o que é uma taxa bastante expressiva. Ressalte-se o fato de 23 pacientes que apresentaram todos os testes de punção negativos terem tido positividade aos fungos no teste intradérmico. Esse grupo teria sido diagnosticado como tendo asma e/ou rinite intrínsecas ou não alérgicas, caso o teste intradérmico não tivesse sido realizado.

O teste cutâneo intradérmico foi o que melhor se prestou ao diagnóstico de sensibilização a fungos, o que está de acordo com Bernstein e Stromrs (1995), que admitem que o teste intradérmico seja mais sensível, porém afirmam que o de punção é mais específico. Para se excluir reações falso positivas com os extratos aqui empregados foi testado um grupo de dezenove voluntários sem asma e/ou rinite, constatando-se que todos tiveram testes negativos a fungos. Ainda que o grupo controle seja pequeno, os próprios pacientes que tiveram testes negativos a fungos podem funcionar como controles. Assim, o mais provável é que a taxa aqui observada não seja grande por falta de especificidade do teste, e sim porque, de fato, os fungos representam importantes alérgenos para pacientes com doenças alérgicas respiratórias e o diagnóstico dessa sensibilização deve ser feito preferencialmente pelo teste intradérmico.

Na presente casuística, quase 70% dos pacientes que apresentaram sensibilização a fungos tiveram testes positivos a mais de um fungo testado. É provável que isto se deva à reatividade cruzada, frequente entre os fungos (Kurup et al., 2000; Bisht et al., 2002; Hemmann et al.; 1996).

Quanto aos diferentes fungos que originaram testes positivos, o *Aspergillus* ficou neste estudo em primeiro lugar, seguido de perto por *Neurospora*. Não há referência na literatura médica sobre reatividade cruzada para esse último fungo, nem trabalhos que tenham encontrado uma taxa assim significativa de sensibilização a ele. O presente estudo sugere que esse seja um alérgeno importante para pacientes sensibilizados e que estudos adicionais devem ser realizados para se entender melhor sua participação nas doenças alérgicas respiratórias. Quanto aos demais fungos, diversos trabalhos citam sua positividade em maior ou menor grau em pacientes sensibilizados (Beaumont et al., 1985b; Tarlo et al., 1988; Malling et al., 1995; D'amato e Spieksma, 1995).

No Brasil, Faria (1967) encontrou 87,5% de positividade a *Penicillium*, seguida por 62,5% a *Aspergillus*, 56,25% a *Cladosporium* e 50% a *Pullularia*. Lacaz et al. (1958) encontraram, por ordem decrescente de importância, em pacientes com asma e rinite, positividade aos seguintes fungos: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Penicillium*. Mendes e Lacaz (1952) encontraram, nessa ordem: *Rhizopus*, *Monilia*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*; Passareli (1952) obteve: *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*, *Cladosporium* e *Aspergillus*, Leveduras e *Rhodotorula* e *Trichoderma*.

Mohovic et al. (1988) testaram 42 extratos diferentes, obtendo maior índice de positividade por *Candida*, seguido de *Aureobasidium*, *Phialophora*, *Penicillium*, *Curvularia*, etc.

Os testes cutâneos mostraram-se, nessa casuística, mais sensíveis que a pesquisa “in vitro” de IgE específica. Isso pode ser explicado pelo fato de esse anticorpo se fixar a mastócito e ser diagnosticado em nível cutâneo através do teste. É provável

que a IgE circulante esteja em menor concentração e, portanto, seja mais dificilmente diagnosticada pelas provas laboratoriais.

Uma importante observação do presente estudo é a associação positiva entre positividade a fungos e gravidade da asma. *Aspergillus*, *Candida* e *Neurospora* foram os que mais se associaram a asma grave. Tal associação não foi observada para nenhum outro alérgeno estudado. Cabe aqui a pergunta de como e porque os fungos se associam à asma grave. Uma possível explicação seria que esses pacientes utilizam mais corticóides, quer via oral, quer por via inalatória e talvez esse medicamento diminua os mecanismos de defesa da mucosa brônquica permitindo, assim, maior colonização e maior sensibilização.

Gravidade da asma e sensibilização a fungos e também foi indiretamente sugerida ao se verificar que na época onde houve maior índice de UFC, ocorreu também maior procura de pacientes asmáticos por atendimentos de urgência. Embora outros fatores também possam agir nessa época do ano para explicar o aumento de incidência de crises de asma, é provável que o aumento dos fungos anemófilos represente um fator adicional.

Esses achados estão em conformidade com diversos autores que concordam que sensibilização a fungos está associada a um pior prognóstico da asma (Salvaggio et al., 1971; Hasnain et al., 1985; O'Hollaren et al., 1991; Peat et al., 1994; Targonski e Ramekrishnan, 1995; Rosas, et al, 1998; Neukirch et al., 1999; Black et al., 2000; Lewis et al., 2000; Ross et al., 2000; Zureik et al., 2002; Dales et al., 2003).

Quanto aos testes tardios, o estudo dos mesmos foge aos propósitos do presente trabalho. Entretanto, a análise dos primeiros casos onde a reação cutânea tardia foi observada aponta no sentido de que há diferença entre pacientes e controles e que as

reações devem ser diferentes dependendo do tempo transcorrido entre a colocação do antígeno e a observação. Além disso, apesar de não ter havido diferença entre os tipos de asma e rinite e testes cutâneos tardios, provavelmente pelo pequeno tamanho da amostra, as reações mais graves ocorreram em pacientes com asma de maior gravidade. Estudos posteriores devem ser realizados para se entender o real significado desse tipo de reação.

CONCLUSÕES

1- Estudo da microbiota fúngica:

- a. Botucatu é semelhante ao restante do país e do mundo com relação aos fungos conhecidos como “dominantes universais”, porém, alguns fungos (“dominantes locais”) são ali mais prevalentes do que em qualquer outro local descrito na literatura médica;
- b. Botucatu tem certas características meteorológicas que favorecem o aumento de fungos no outono-inverno;
- c. O aparelho caça-esporos FEC, desenvolvido para a pesquisa, mostrou-se uma opção eficaz e mais conveniente sob o ponto de vista econômico.

2- Relação entre os principais gêneros sensibilizantes e seu potencial alergênico em pacientes com asma e rinite alérgica:

- a. A sensibilização a fungos é expressiva na população estudada;
- b. O teste intradérmico, aliado a um extrato de boa qualidade, permite o diagnóstico de forma mais sensível que o teste de punção e do que a dosagem de IgE específica “in vitro”;
- c. Um grupo significativo de pacientes com testes intradérmicos positivos a fungos (aproximadamente 19,5%) não apresentou positividade a nenhum teste de punção e nem à dosagem de IgE específica “in vitro”;
- d. Não houve correlação entre os fungos mais prevalentes no ar e os que resultaram em maior taxa de sensibilização;

- e. O gênero *Neurospora* mostrou-se fortemente sensibilizante, o que não está descrito até hoje na literatura específica;
- f. É possível que a elevação dos níveis de esporos no período de outono-inverno, ao lado de outros fatores, tenha importância no aumento de crises de asma nessa época do ano;
- g. A sensibilização a fungos, na população estudada, mostrou associação positiva com gravidade da asma.

ANEXOS

ANEXO A 1 E 2 : DESENHO TÉCNICO DO APARELHO FEC

- 1- Planta, elevação e lateral
- 2- Planta e elevação

ANEXO B - MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

- 1- Batata dextrose ágar (BDA): Adquirido do laboratório Merck® e preparado na concentração de 39g/l.
- 2- Czapeck solution Agar (CZA): Adquirido do laboratório Defco® e preparado na concentração de 49g/l.
- 3- Saburaud Agar (SBA): Preparado nas seguintes proporções:
 - a. Pepitona -15 gramas
 - b. Glicerol - 3ml
 - c. Dextrose – 20 gramas
 - d. Agar – 20 gramas
 - e. Água destilada – 1000ml
- 4- Extrato de levedura ágar (ELA): Preparado nas seguintes proporções:
 - a. Extrato de levedura – 5 gramas
 - b. Peptona – 3 gramas
 - c. Glicose – 10 gramas
 - d. Ágar – 15 gramas
 - e. Água destilada – 1000 ml

A todos esses meios foi acrescido 1% de oxitetraciclina para se evitar contaminação bacteriana.

ANEXO C - DADOS METEOROLÓGICOS (Fornecidos pelo Departamento de Ciências Ambientais da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP – Botucatu)

DATA	°C TempMin	°C TempMax	mm PrecPluvi al	% UmidRelat	km/dia VelVento2	DirVento2
1/1/2001	17,8	27,8	0	78,1	161,3	E
2/1/2001	17,4	29,2	0	68,8	139,6	E
3/1/2001	18,6	29,2	0	71,8	114,6	S
4/1/2001	18,4	29,4	1,7	77,3	63,8	S
5/1/2001	19,2	30,2	0	77,9	69,6	E
6/1/2001	21	30,4	0	75,1	56,4	***
7/1/2001	21	32,2	0,7	67,2	77,6	E
8/1/2001	22,4	31	0	73,1	117,8	E
9/1/2001	19,6	29,4	5,5	73,8	115,5	W
10/1/2001	19,8	26,8	0,5	80,1	126,9	W
11/1/2001	19,2	25	0	80,9	107,6	W
12/1/2001	19,8	27,8	70	81,8	133,3	S
13/1/2001	16,6	28,8	37	84,4	97,8	E
14/1/2001	18,4	28,6	0	77,1	82,8	E
15/1/2001	19,8	29,4	0	74	119,4	S
16/1/2001	20,3	30	0	67	56,3	E
17/1/2001	21,8	31,6	0	67,8	69,9	E
18/1/2001	21,8	32	0,2	70,5	103,3	E
19/1/2001	19,6	31	6,7	70	102,3	E
20/1/2001	19,6	29,4	0	75,6	107,7	E
21/1/2001	20,2	28,4	1,2	80,9	113,9	E
22/1/2001	19,8	29,8	0	76,6	110,1	S
23/1/2001	20	29,8	0	84,5	60,5	E
24/1/2001	21	28	43,5	86,2	44,3	S
25/1/2001	19,6	29,6	53,7	86,7	53,1	E
26/1/2001	19	28	0	88,2	73,1	W
27/1/2001	21,2	30,6	10,5	81,2	84,5	W
28/1/2001	19,6	31,2	83,5	82,3	128,2	N
29/1/2001	19,2	29	0	82	113,6	W
30/1/2001	20,4	27,8	7,5	82	65	E
31/1/2001	20,8	30	0	84	116	W
1/2/2001	20	30	15,2	80,7	103,8	W
2/2/2001	20,8	29,6	5,7	83,4	119,8	W
3/2/2001	21,8	31,4	5,2	77,2	97,2	S
4/2/2001	20,2	31,6	62	83,3	64,4	S
5/2/2001	20,2	30,4	19,7	85,2	93,3	E
6/2/2001	20,6	28,4	0,6	88,5	145,7	W
7/2/2001	20,4	27,4	14,7	90,4	65,9	W
8/2/2001	21,2	30,4	69	84,3	76,5	E
9/2/2001	20,6	23	7,7	95,2	88,4	E
10/2/2001	18,8	23,6	10,2	94,1	70,1	W
11/2/2001	20	29	0,2	83,4	100,1	E
12/2/2001	20,6	30	10,2	87,5	88,2	N
13/2/2001	20,2	26,4	1,7	88,7	54,4	N
14/2/2001	20	25,6	16,2	91,5	168,2	N
15/2/2001	19	28	0	83,7	149,8	W

16/2/2001	19,4	28,4	32,5	88,1	106,2	N
17/2/2001	20	28,6	5,2	88,2	75	E
18/2/2001	19,4	28,4	0	82	67	S
19/2/2001	20,4	31	0	72,3	76,3	E
20/2/2001	22,2	30,2	0	80,1	153,5	E
21/2/2001	20,4	30,2	0	74,5	100,4	S
22/2/2001	21,4	28,4	0	80	66,2	S
23/2/2001	22,2	31,4	2,2	77,5	99,9	E
24/2/2001	19,2	30,6	0	72,4	96,4	N
25/2/2001	20,8	31	0	75,9	95,8	S
26/2/2001	21	31	0	72,9	136,9	E
27/2/2001	19,8	30	0	75	162,5	E
28/2/2001	18,8	30	0	73,7	148,5	E
1/3/2001	18	30,4	0	76	90	E
2/3/2001	19,4	31	0	74,5	84,4	E
3/3/2001	19	30,4	13	75,4	84,5	N
4/3/2001	18	30	0	73,2	81,4	S
5/3/2001	21	29	0,2	78,9	56,3	N
6/3/2001	18,8	28,8	0	80,7	104,9	N
7/3/2001	21	25,6	10,7	85,4	57,3	W
8/3/2001	20	32	22,5	90,9	60,6	N
9/3/2001	19,6	25,4	31,7	90,1	92,6	N
10/3/2001	18,4	26,8	31,5	89,7	46,7	N
11/3/2001	19,4	27,6	3	82,9	116,4	E
12/3/2001	17,8	28	0,5	79,7	95,3	E
13/3/2001	19,8	28,8	2,7	78,9	87,3	E
14/3/2001	20,4	30,2	0	73,8	81	E
15/3/2001	21,6	31	0	69,6	77	E
16/3/2001	22,8	30	0	73,6	76,2	E
17/3/2001	21,8	31	23	79,4	83,3	E
18/3/2001	18,4	28	0	77,2	99,9	E
19/3/2001	19,3	28,6	0	73,9	110,5	W
20/3/2001	20,2	29	4,2	78,4	70,7	E
21/3/2001	19	29,6	0	80,3	54,4	S
22/3/2001	21,2	31	0	67,5	69,4	E
23/3/2001	21,4	31,4	3,2	68	74,3	S
24/3/2001	21,8	32	3,2	73,1	104,5	E
25/3/2001	20,4	31,6	0	71,5	61,2	E
26/3/2001	19	30,6	0,2	77,3	98,9	W
27/3/2001	19,2	29,6	0	76,5	78,3	W
28/3/2001	19,4	27	6,5	89	71,5	E
29/3/2001	17	27	0,5	82,6	113,8	E
30/3/2001	18,4	28,2	0	79,5	131,1	E
31/3/2001	18,6	28,8	0	77	73,9	E
1/4/2001	18,6	29,6	16	78,6	85,9	N
2/4/2001	17,8	26	0	86,7	55,1	W
3/4/2001	18,4	27,4	0	80,9	113,8	E
4/4/2001	17,6	28,2	0	74,5	127	E
5/4/2001	18,2	28,8	0,5	79,8	53,9	E
6/4/2001	20,4	30,4	0	75,4	106,6	N
7/4/2001	20,4	28,6	0	76	155,6	S
8/4/2001	20	29	0	77,8	105	E
9/4/2001	19,4	28,2	1,7	83	45,9	S

10/4/2001	21	29,4	0	80	81,3	W
11/4/2001	20	31,6	0	74	80,4	E
12/4/2001	19,4	28	0	75	170,2	S
13/4/2001	16,4	25,6	0	70	165,1	E
14/4/2001	15,8	27	0	73	120,3	E
15/4/2001	17	27,8	0	75	120,8	S
16/4/2001	18,6	27	0	67	165,5	S
17/4/2001	16,8	27	0	71	112	S
18/4/2001	16,8	27,4	0	74	71,4	E
19/4/2001	16,8	29,2	0	66,9	83,3	E
20/4/2001	17,8	30,2	0	55,6	82	W
21/4/2001	18,2	30,6	3,7	71,1	110,9	***
22/4/2001	17,2	21,6	2,5	92	21,8	W
23/4/2001	18,8	29,4	0,5	77,4	89,8	S
24/4/2001	20,6	30	0	75	103,8	N
25/4/2001	19,6	30	0	76	89,4	E
26/4/2001	18,8	29,8	0	64	69,2	E
27/4/2001	18	30,4	0	57	46,2	E
28/4/2001	19,4	30,2	0	57	70,7	E
29/4/2001	19,4	29,4	0	63	147,3	E
30/4/2001	18,2	28,2	0	74	97,6	E
1/5/2001	17,8	29,2	0	67	58,1	E
2/5/2001	19	30,4	0	64	88,6	E
3/5/2001	20	30,6	0	61	97,2	S
4/5/2001	18,8	27	0,3	77,9	22	E
5/5/2001	10	20,8	0	57	97,3	S
6/5/2001	10,4	22	0	68	104	S
7/5/2001	12	22	0	75	133,2	E
8/5/2001	13,2	22,8	0	78	72,8	E
9/5/2001	12,2	26	0	74	33,3	N
10/5/2001	16,2	28,4	0	66	142,9	E
11/5/2001	19,4	23	13,5	88,5	17,9	S
12/5/2001	16	24	24,5	87	41,7	E
13/5/2001	16	20,4	0	88	104,6	N
14/5/2001	13,4	18,4	0	82	182,8	E
15/5/2001	12	18,6	2,5	84	108,4	S
16/5/2001	13,6	16,2	19	94	49,7	W
17/5/2001	13,8	19,9	0,5	80	230,9	W
18/5/2001	12,5	21	0	69	50,1	E
19/5/2001	11	21,4	0	76	150,7	E
20/5/2001	12,6	23	0	76	93,2	E
21/5/2001	14	23,9	0	73	70,6	E
22/5/2001	15,2	17,9	1,3	84	56,5	S
23/5/2001	12,2	21,4	0	84,4	130,5	S
24/5/2001	15	22,4	0	81	187,5	E
25/5/2001	14,2	21,6	0	85,6	110,3	S
26/5/2001	14,8	21,6	12,5	80,7	84,7	E
27/5/2001	16,6	19,8	15,5	95	34,7	E
28/5/2001	15,2	22,4	0	92	87,7	W
29/5/2001	17	26,2	1,4	80	91,2	W
30/5/2001	16	27	0	74	28,7	S
31/5/2001	16,2	25,8	0	75	73,4	E
1/6/2001	12,5	26	0	70	7,2	E

2/6/2001	17	26,6	0	68	7	S
3/6/2001	17,4	26,2	0	69	7,2	E
4/6/2001	17,4	22,8	0	80	6,9	S
5/6/2001	17,8	21,6	0	74	7,1	S
6/6/2001	12,6	21,6	0	69	7,3	W
7/6/2001	11,8	26,6	0	84	6,7	S
8/6/2001	16,6	21,2	0,3	87	8,5	E
9/6/2001	17	26	9	81	8,6	S
10/6/2001	14,8	24	0	78	7,5	N
11/6/2001	15,6	23,4	0	80	10,8	E
12/6/2001	14,8	23	0	76	9,9	E
13/6/2001	14,4	24,8	0	74	6,4	E
14/6/2001	14,8	26	0	66	6,3	E
15/6/2001	16	26,6	0	60	6,3	E
16/6/2001	16,4	27,6	0	54	7,3	N
17/6/2001	17,8	23,6	0,5	76	6,7	W
18/6/2001	12,6	13,2	15,2	93	6,5	S
19/6/2001	10,8	17	0	89	6,4	E
20/6/2001	11	12	0,7	83	9,1	W
21/6/2001	4	14,8	0	64	6,5	S
22/6/2001	6,8	15,4	0	78	7,3	E
23/6/2001	7	22,8	0	71	6,4	S
24/6/2001	8,8	22,4	0	82	7	E
25/6/2001	11	26,6	0	69	7	E
26/6/2001	16,2	26,6	31,2	86	9,8	W
27/6/2001	5	17	0	74	6,9	W
28/6/2001	11	16,6	0	81	10,3	S
29/6/2001	10,4	19,2	0	80	9	E
30/6/2001	11,6	23,2	0	73	7	E
1/7/2001	12,8	24,8	0	65	7	E
2/7/2001	13,8	26,2	0	65	6,5	S
3/7/2001	14,2	26,6	0	65	6,4	S
4/7/2001	13,8	26,4	0	60	7	N
5/7/2001	10,4	27,4	0	62	6,6	S
6/7/2001	10,8	23,4	0	77	10,3	S
7/7/2001	13	23,6	0	70	9	E
8/7/2001	12,2	24,4	0	67	7,2	E
9/7/2001	15	25	0	66	6,5	E
10/7/2001	14,8	25,6	0	63	6,8	E
11/7/2001	15,2	26	6,2	67	9,9	W
12/7/2001	13,8	17	0	87	8,8	E
13/7/2001	8,4	18,6	0	76	11,3	S
14/7/2001	9,4	22,2	0	75	9,3	E
15/7/2001	12,8	23,8	0	78	6,9	E
16/7/2001	12,6	26,2	0	65	7,9	S
17/7/2001	12,2	26,4	0	53	6,7	N
18/7/2001	12,4	28	0	51	9,7	W
19/7/2001	14,8	25,4	0	73	7,8	S
20/7/2001	13,4	28,8	0	55	11,2	W
21/7/2001	18	28,8	13,5	57	10,9	W
22/7/2001	15,4	19,2	0	86	10,2	S
23/7/2001	11,4	17,4	0	82	12,8	E
24/7/2001	11,2	23	0	82	8,4	E

25/7/2001	13,8	24,6	6	80	7,5	S
26/7/2001	17,2	22,6	1,2	79	8,8	N
27/7/2001	16	20,6	19,2	90	8,9	W
28/7/2001	8	13,6	0	85	8,9	S
29/7/2001	5	19,2	0	71	11,5	S
30/7/2001	11	24,8	0	73	7,6	E
31/7/2001	13,6	26,2	0	70	7,5	E
1/8/2001	14	26,4	0	61	8,1	E
2/8/2001	13	26,2	0	56	7,7	E
3/8/2001	14,6	25,8	0	63	7,8	E
4/8/2001	16	27,2	0	61	7,8	E
5/8/2001	11,6	27	0	59	7,7	S
6/8/2001	13,2	26,6	0	68	8,1	E
7/8/2001	13,8	27	0	63	7,2	S
8/8/2001	16,8	23,2	0	64	7,9	E
9/8/2001	12,4	24,4	0	71	7,6	S
10/8/2001	10,2	24,4	0	68	8,4	S
11/8/2001	13,2	24,6	0	79	10,8	E
12/8/2001	13,6	25	0	75	10,4	E
13/8/2001	13,4	25,2	0	70	8,2	E
14/8/2001	13	25	0	62	7,8	E
15/8/2001	13	25,4	0	66	7,8	E
16/8/2001	13,8	25,6	0	66	8	S
17/8/2001	13,4	25	0	63	8,4	S
18/8/2001	27	12,6	0	60	7,5	E
19/8/2001	15,2	27,6	0	62	7	W
20/8/2001	16,6	27,4	0	70	7,6	E
21/8/2001	14,4	26,8	8,3	80	7,4	E
22/8/2001	12,8	21,8	2	90	7,5	E
23/8/2001	12	18	10,5	95	6,7	E
24/8/2001	14	20,8	2,7	92	7,7	S
25/8/2001	14,8	27	5	74	7,7	N
26/8/2001	14,8	25	0	78	9,5	N
27/8/2001	17	25,1	12,5	77	8,4	E
28/8/2001	16	26,8	12,8	85	9,2	E
29/8/2001	15,6	26,4	0	88	7,4	E
30/8/2001	16	28,4	0	72	8,3	N
31/8/2001	17,8	29,4	0	66	6,5	N
1/9/2001	17,6	30,4	0	62	73,6	E
2/9/2001	18	29,6	0	65	72,3	E
3/9/2001	17,2	30	0	64	72,8	E
4/9/2001	18	31,4	0	61	118,2	W
5/9/2001	16	26,4	0	79	220,1	E
6/9/2001	16,6	24,6	0	81	244,8	E
7/9/2001	14,2	25	0	77	120,6	E
8/9/2001	13	29,6	0	71	92	E
9/9/2001	17,4	28	0	64	77,4	E
10/9/2001	17,8	32,6	0	59	82,6	N
11/9/2001	16,8	22,6	0	83	213,9	E
12/9/2001	10,8	23,4	0	69	184	E
13/9/2001	12,2	29,4	13,3	73	80,3	S
14/9/2001	17,8	20	52,5	98	82,7	S
15/9/2001	16,8	24,4	0	75	144,6	W

16/9/2001	11,8	20,8	0	58	169,6	W
17/9/2001	7,8	18,6	0	70	215	S
18/9/2001	9	20,4	0	75	190,4	E
19/9/2001	10,4	24,6	0	66	145,9	E
20/9/2001	12,2	24,2	0,3	70	173,2	E
21/9/2001	14,8	24,8	3,3	72	108,1	E
22/9/2001	15	21,8	2,3	87	132,7	E
23/9/2001	14,8	25,6	0	80	114,5	S
24/9/2001	15,8	29,2	2,3	70	90,8	E
25/9/2001	17,4	25,2	13	89	168,5	E
26/9/2001	18,2	26,2	0	82	138,1	W
27/9/2001	16,4	21,4	0,5	88	168,4	E
28/9/2001	15,4	27,6	0	81	163,4	E
29/9/2001	16	25,8	0	82	184	E
30/9/2001	15,8	28,4	0	79	190,2	E
1/10/2001	18,2	26,6	17,8	85	252,7	N
2/10/2001	18	24	0,3	90	245,1	N
3/10/2001	13,6	24,6	0	74	221,3	N
4/10/2001	14,6	28,4	0	56	159,1	W
5/10/2001	18,4	29,4	0	55	182	S
6/10/2001	14,8	27	0	71	146,7	E
7/10/2001	14,6	25,8	12	78	206,6	E
8/10/2001	15	18,8	21,3	97	68	E
9/10/2001	17,1	24,4	0,5	92	40,4	E
#####	18	27	1	85	79,1	W
#####	18,4	28,6	12,7	81	93,6	S
#####	16,8	28,6	0	77	137,9	S
#####	16,6	28	0	78	96	S
#####	16	25,8	0	76	87,5	S
#####	17,4	28,6	0	65	128,1	S
#####	15	28	0	77	132,9	E
#####	14,8	28	48,5	83	70,1	S
#####	16	27,8	0	79	125,2	N
#####	17,8	26	16	88	109	E
#####	16,4	26,2	0	83	55,3	S
#####	16	27	8,8	87	80,6	E
#####	15,2	26,2	0	82	148	W
#####	13,8	28,2	0	60	107	S
#####	14	26,4	0	71	169	S
#####	13,8	27,8	0	72	153	E
#####	14,4	28,4	0	66	124	S
#####	14,6	29,2	0	58	106	S
#####	16,2	31,2	0	62	80,5	E
#####	18,6	32,2	0	57	86,7	E
#####	19,8	32,6	3,8	65	100,3	E
#####	20	32,2	0	66	128,2	S
1/11/2001	15,8	29,6	0	79	177,7	E
2/11/2001	16	27,8	0	80	170,8	S
3/11/2001	14,4	21,6	5	82	115,6	S
4/11/2001	13,8	20,3	1	92	72,1	E
5/11/2001	14,2	28	0	72	78,4	S
6/11/2001	16,8	30,6	0	61	86,3	E
7/11/2001	19,4	32,4	0	52	106,8	E

8/11/2001	21	33	0	64	150,4	S
9/11/2001	17,8	33	0	77	189,3	E
#####	18	31,4	0	71	152,6	E
#####	20,6	29,5	14,5	89	109,6	W
#####	17,4	23	5,2	96	99,5	W
#####	17,8	25,8	4	91	79,3	E
#####	17,2	28,2	9,2	87	158	E
#####	18,8	24,6	0,5	92	111,4	W
#####	18,8	27	0	86	161,1	E
#####	18	26	7,8	90	189	E
#####	16,6	28	0	83	122,6	E
#####	17,4	30,6	0	78	112,7	E
#####	18,2	30,4	0	80	114	E
#####	18,8	30,4	0	77	94,8	E
#####	20	29,4	0	76	139,6	W
#####	18,8	30,6	2	81	103,6	E
#####	19	31	0	75	105,8	N
#####	21,8	32	0	71	184	N
#####	19,1	32	0	74	130,3	E
#####	19,2	32,4	0	75	134	E
#####	20,8	29,2	67,5	88	82,4	E
#####	17,4	29,4	0	85	90	E
#####	18,4	25,2	1	89	208,4	N
1/12/2001	16,6	24	0	62	210,4	W
2/12/2001	14	26,8	0	62	148	S
3/12/2001	15	28,8	0	69	160,5	***
4/12/2001	18,8	29,2	0	76	141,4	N
5/12/2001	17,6	29,2	8,7	83	193	***
6/12/2001	19	24,2	19	96	132	N
7/12/2001	19,6	28	7	89	108,3	N
8/12/2001	20	28,8	24,8	90	62,5	N
9/12/2001	18,2	27,8	12,5	93	51,8	N
#####	18,2	28,8	0	83	101,4	E
#####	19,8	27,4	1	86	105,9	E
#####	19,2	25,2	3,5	89	36,4	S
#####	19,4	23,8	54	96	129,4	N
#####	18,2	21,6	26,5	98	110,1	N
#####	18,6	25,2	10	96	54,7	E
#####	18	27,4	0,5	89	92,9	E
#####	20	30	0	73	180,9	W
#####	19	30,4	0	65	134,2	W
#####	18,4	32	0	65	72,8	E
#####	21	31,4	0	79	67,4	N
#####	20	27	9	95	87,4	N
#####	19,4	25,6	13,7	96	230,6	N
#####	18,8	24,6	3,2	94	186,7	W
#####	15	22,4	0	81	278	***
#####	14	25	0	78	201,3	E
#####	16	26,4	0	81	185	S
#####	17	28,2	0	82	108,7	E
#####	18,6	27	22	87	76	E
#####	17,2	22,6	4,7	97	70,1	S
#####	18,4	27,4	0	83	102	E

#####	17,6	28,4	1,2	77	49,5	E
1/1/2002	21	26	10,2	89	49,5	E
2/1/2002	18,8	29,4	0	78	76,1	N
3/1/2002	19	29,4	0	72	78,5	W
4/1/2002	19	30,4	0	74	90,6	E
5/1/2002	18,6	31	0	79	126,5	E
6/1/2002	19,6	31	74,2	76	103,7	E
7/1/2002	19	24	1	96	100,4	N
8/1/2002	19,4	28,6	20	87	46,1	N
9/1/2002	17	24,2	0,7	88	111,3	E
10/1/2002	18,4	26,2	0	80	137,5	S
11/1/2002	19,4	25	17	85	125,4	S
12/1/2002	18	22,6	74,5	98	146,5	E
13/1/2002	18,6	23,6	12,7	98	71,5	S
14/1/2002	19,6	26	5	96	101,7	N
15/1/2002	18	25,4	6,2	92	126,4	W
16/1/2002	16	22,8	0	83	170,5	S
17/1/2002	14,2	25	0	73	206,7	E
18/1/2002	14,4	24,4	0	80	198,1	S
19/1/2002	16	25,6	2,2	80	229,3	E
20/1/2002	17,4	28,6	0,5	93	137,6	E
21/1/2002	19,8	30	0	80	62,3	S
22/1/2002	20,4	30,6	12	79	57,8	S
23/1/2002	18,4	28	5	84	102,3	E
24/1/2002	19	30	1,5	86	89,4	S
25/1/2002	19,4	29,2	13,7	93	67,5	E
26/1/2002	19	30,4	1	83	109,1	S
27/1/2002	20	30,6	0,2	81	138,2	W
28/1/2002	20,4	29,8	1	84	163,5	E
29/1/2002	20,2	28,6	0	83	134,8	W
30/1/2002	21	28,6	1,7	87	89,2	W
31/1/2002	21	30,4	11	88	65,4	E
1/2/2002	21,6	28,2	8	96	105,4	W
2/2/2002	19,6	28	2	93	156,9	W
3/2/2002	16	25,6	0	78	206,2	E
4/2/2002	15	26	0	74	110,2	E
5/2/2002	15,8	28,6	0	72	79,4	E
6/2/2002	17,4	29,6	59	73	75,3	E
7/2/2002	17,4	22	7,5	96	23,9	S
8/2/2002	18,8	26,6	1,3	92	63,8	N
9/2/2002	19,4	24,2	6,8	92	64	W
10/2/2002	17,8	29,8	0	83	50,3	W
11/2/2002	18,8	30,6	0	76	72,5	W
12/2/2002	19,8	30,2	0	79	98,7	E
13/2/2002	19,6	30	2,8	82	93,7	E
14/2/2002	18,8	23	5	94	30,3	W
15/2/2002	18,8	28,4	9	88	67,7	N
16/2/2002	19,4	26,6	14,5	90	105	S
17/2/2002	18,8	27,6	0	83	197,5	S
18/2/2002	17,6	26,4	0	76	223,1	E
19/2/2002	17,2	27,6	0	79	183	S
20/2/2002	18	23	22,5	93	99,4	E
21/2/2002	18,8	24,6	36,8	96	218,7	N

22/2/2002	20	26,4	12	94	146,1	N
23/2/2002	20,4	27,8	0,2	83	105,2	W
24/2/2002	17,6	28,2	0	78	150,3	S
25/2/2002	17,4	27	0	80	186,2	S
26/2/2002	17,4	27,5	3	86	80,7	E
27/2/2002	20	22,6	2,8	95	40,5	N
28/2/2002	17,8	30,8	16,3	95	68,8	E
1/3/2002	17,8	30,8	0	78	40,8	E
2/3/2002	19,8	27,6	3	90	81,2	S
3/3/2002	19	29,6	1,3	33	80	E
4/3/2002	18,6	29,8	0	82	70,7	S
5/3/2002	19,4	30,4	0	73	62,6	N
6/3/2002	20,4	31	0	73	66,3	E
7/3/2002	20,6	31,6	0	74	77,3	E
8/3/2002	20,2	31,2	26	82	56,4	E
9/3/2002	20,6	32	0	72	79,8	E
10/3/2002	23	32	0	74	82,6	E
11/3/2002	20,6	31,4	0	73	44,6	S
12/3/2002	21,4	31,5	0	69	67,9	N
13/3/2002	22,6	32	0	72	71,3	E
14/3/2002	21,8	29,6	8,8	81	57,7	S
15/3/2002	19,2	29	2,8	84	59,6	E
16/3/2002	20,4	31	0	78	58,2	E
17/3/2002	20,4	30	0,3	79	85,9	S
18/3/2002	21	31	0	80	82,3	N
19/3/2002	21,2	30,8	0	84	120,7	E
20/3/2002	21,4	32	13,7	86	267,3	W
21/3/2002	20	26	0	85	176,5	S
22/3/2002	17,4	28	0	78	96,5	SE
23/3/2002	18	29	16,5	82	96,3	S
24/3/2002	20	22,4	37,8	99	98,3	N
25/3/2002	20	28,2	0	86	89,5	W
26/3/2002	19,8	29,2	0	80	82,2	E
27/3/2002	18,8	30,6	39,8	86	61,1	E
28/3/2002	19	29,2	0	82	87,5	S
29/3/2002	20,4	30,6	0	77	77,6	E
30/3/2002	21	29,6	0	66	62,1	N
31/3/2002	19	30,8	0	65	71,5	S
1/4/2002	19,6	31,2	0	67	64,9	S
2/4/2002	20	31	0	67	88,2	N
3/4/2002	20,2	29,6	1,3	85	118,7	E
4/4/2002	19	28,8	0	79	111,4	E
5/4/2002	18,2	28	0	80	111,9	S
6/4/2002	17,6	28,2	1	82	93,9	E
7/4/2002	17,8	29	0,5	85	118,8	E
8/4/2002	17,8	27,6	0	82	120	E
9/4/2002	17	27,4	0	78	93,2	E
10/4/2002	17,2	28,4	0	78	66,8	E
11/4/2002	18,4	30	0	74	35,5	E
12/4/2002	19	31	0	69	77,7	S
13/4/2002	19,2	28,6	0	83	158,9	E
14/4/2002	19	29	0	81	129,2	E
15/4/2002	19,2	30	0	79	87,2	E

16/4/2002	19,8	30,2	0	72	35,5	E
17/4/2002	20,4	31	0	68	53,1	N
18/4/2002	20	31,6	0	74	111,3	E
19/4/2002	20	29,8	0	79	97,6	E
20/4/2002	18,6	30	0	68	87,1	N
21/4/2002	19	28,4	0	78	163,1	E
22/4/2002	19,2	28,8	0	79	126,2	S
23/4/2002	18	29,2	0	71	40,5	E
24/4/2002	19	30	0	65	38,4	E
25/4/2002	18,8	30,4	0	59	43,4	S
26/4/2002	19,8	31,2	0	57	45,2	E
27/4/2002	18,4	29,6	0	74	162,8	S
28/4/2002	17	28,6	0	79	74,4	E
29/4/2002	17,6	29,4	0	73	92,6	S
30/4/2002	20	28,8	0	75	94,6	W
1/5/2002	18	27,2	0	82	74,3	S
2/5/2002	16,8	27,8	8,2	75	48,7	S
3/5/2002	17	26,6	4,5	87	49	S
4/5/2002	18,4	25,8	0	88	76,2	E
5/5/2002	17,6	26,4	8,7	84	110,7	E
6/5/2002	16,8	26	0	86	57,3	S
7/5/2002	17,6	26,4	0	82	46,5	E
8/5/2002	16	26,4	7,5	86	81,8	E
9/5/2002	15,6	24,4	0	86	83,3	S
10/5/2002	16	25,6	0	81	122,4	S
11/5/2002	17,4	27,4	0	81	84	E
12/5/2002	17,2	27,2	0	74	59,9	E
13/5/2002	17,2	27,6	0	65	61,9	E
14/5/2002	16,8	28	0	70	40,9	E
15/5/2002	17	28,6	0	63	96,2	N
16/5/2002	18,4	23,4	0,2	73	119,1	W
17/5/2002	15,8	26,6	0	85	29,1	S
18/5/2002	16,6	26	24	91	75,7	S
19/5/2002	15,6	19	10,7	96	36,2	E
20/5/2002	16	20,4	21,5	97	96,7	E
21/5/2002	15	19	17,2	96	136,6	W
22/5/2002	14	19,6	0	88	228,9	S
23/5/2002	13,8	20,8	0	78	230,3	E
24/5/2002	13,4	20,2	0	56	172	E
25/5/2002	11,8	21	0	78	141,7	E
26/5/2002	11,6	22,2	0	74	79,3	E
27/5/2002	11,2	23,6	0	71	72	W
28/5/2002	12,4	24	0	67	69,8	E
29/5/2002	14	23,4	0	69	69,2	E
30/5/2002	14	24,4	0	72	55,4	S
31/5/2002	15,6	22,2	1,2	86	75,3	E
1/6/2002	13,8	24	0	78	140,3	S
2/6/2002	15,6	25,4	0	78	62,7	E
3/6/2002	15,6	25,4	0	69	77,2	N
4/6/2002	15,4	26	0	71	69,9	S
5/6/2002	16	26,6	0	70	72,9	E
6/6/2002	15,8	26,4	0	71	76,3	N
7/6/2002	15,6	26,8	0	65	112,6	N

8/6/2002	16	27,4	0	59	64,8	N
9/6/2002	14,2	27,2	0	68	77,2	E
10/6/2002	16,4	27,4	0	74	131,1	W
11/6/2002	17,2	26,8	0	79	65	E
12/6/2002	17	27,4	0	71	89,8	N
13/6/2002	17,2	27,6	0	67	68,4	E
14/6/2002	16,8	28,2	0	72	135,2	S
15/6/2002	15	22,6	0	86	185,6	E
16/6/2002	14,6	25	0	80	112	E
17/6/2002	15	25	0	75	74,3	E
18/6/2002	15,2	26	0	57	88,1	N
19/6/2002	16	26,6	0	68	111,6	S
20/6/2002	15,8	25,4	0	74	72,5	E
21/6/2002	14,2	26	0	65	76,4	S
22/6/2002	13,8	22	0	86	218,2	***
23/6/2002	10,8	21,4	0	82	143	E
24/6/2002	13	24,2	0	80	108,6	E
25/6/2002	12,2	21,6	0	84	130	E
26/6/2002	10,6	22	0	76	122,9	S
27/6/2002	12,4	24	0	77	104,8	E
28/6/2002	14,6	26,2	0	65	52,5	S
29/6/2002	14,8	26	0	60	57,3	S
30/6/2002	14,8	27,2	0	61	108,2	W
1/7/2002	15,6	27,2	0	66	146,6	E
2/7/2002	15	23,6	0	77	169,8	S
3/7/2002	14,6	25	0	76	112,2	E
4/7/2002	15	24,6	0	75	83,4	E
5/7/2002	15,4	25	0	74	55,1	S
6/7/2002	15,2	24,6	0	72	86,5	S
7/7/2002	12	19,8	0,2	83	91,8	W
8/7/2002	7	18	0	75	67,9	N
9/7/2002	7,6	19	0	77	138,8	E
10/7/2002	9,6	20,6	3,5	75	81,5	S
11/7/2002	11,6	14,8	3,8	96	77,2	E
12/7/2002	12,4	19,4	0	93	34	S
13/7/2002	11,6	18	0	85	79,5	S
14/7/2002	8,8	19,8	0	75	79,4	S
15/7/2002	9	22,2	0	61	75,5	S
16/7/2002	10	23,4	0	67	85	E
17/7/2002	10	21,6	0	58	239,7	E
18/7/2002	10,6	21	0	78	74,5	E
19/7/2002	10	22,8	0	76	128,2	E
20/7/2002	13,8	25,2	0	73	86,9	S
21/7/2002	16,2	19,4	10,5	83	82,8	E
22/7/2002	14,4	16,8	2,7	97	205,8	W
23/7/2002	13,2	23,8	0	82	74,5	E
24/7/2002	13,4	26,4	0	69	95,1	E
25/7/2002	15,8	29	0	56	85,6	E
26/7/2002	15,6	26,6	0	63	91,4	S
27/7/2002	13,2	27,8	0	67	165,4	E
28/7/2002	14	25	0	70	82,8	E
29/7/2002	10,4	21,2	0	63	108,4	S
30/7/2002	11,6	27,2	0	68	150,5	E

31/7/2002	18,4	20,2	20	81	81,5	W
-----------	------	------	----	----	------	---

ANEXO D - QUESTIONÁRIO SOBRE PROBLEMAS RESPIRATÓRIOS

Nome:

Sexo:

Nº pesquisa:

Cons. ()

UNESP: ()

Nº no serviço:

Idade:

Procedência:

Telefone:

1- Você fuma?

() Sim. Quantos cigarros por dia? _____ cigarros por dia, há _____ anos.

() Não

2- Você já fumou alguma vez

() Nunca () Sim, _____ cig/dia há _____ anos () Sim, mas parei há mais de 10 anos

3- Você costuma dividir diariamente, o mesmo ambiente fechado com pessoas fumando?

() Sim, no trabalho () Sim, em casa () Não

4- Você já teve períodos ou episódios de tosse ou catarro durante 3 semanas ou mais a cada ano?

() Sim () Não

5- Você sente ocasionalmente chiados ou assobios no seu peito fora os resfriados?

() Sim () Não

6- Alguma vez você já teve uma crise de chiado no peito que o/a fez ficar com falta de ar?

() Sim () Não

7- Alguma vez o médico já disse que você tem (deu o diagnóstico de) asma ou bronquite asmática?

() Sim () Não

8- Nos últimos seis meses você sentiu coceira no nariz, espirros seguidos, nariz entupido ou nariz escorrendo, fora os resfriados?

() Sim () Não

9- Caso tenha respondido sim na pergunta anterior, este problema nasal costuma vir acompanhado de lacrimejamento e coceira nos olhos?

() Sim () Não

10- Alguma vez o médico já disse que você tem (deu o diagnóstico de) rinite alérgica?

☐ Sim ☐ Não

11- Você costuma ter muitos resfriados?

☐ Sim, cerca de _____ por ano ☐ Não, menos de 3 por ano

12- Você teve algum sintoma de sinusite (dor de cabeça e catarro do nariz escuro) nos últimos doze meses?

☐ Sim ☐ Não

13- Alguém na sua família tem alergia tipo bronquite asmática, rinite ou conjuntivite alérgica?

☐ Sim ☐ Não

14- Há quanto tempo você mora nessa cidade?

☐ < 1 ano
☐ entre 1 e 5 anos
☐ há mais de 5 anos

15- Caso você tenha respondido sim nas perguntas 5, 6,7,8,9,10 ou 12, você sente mais os sintomas

☐ Em casa ☐ No trabalho ☐ Não faz diferença

ANEXO E - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____ ,
 _____ ,

declaro que fui devidamente esclarecido e concordo em participar do trabalho " ESTUDO DOS FUNGOS ANEMÓFILOS DA CIDADE DE BOTUCATU E SUA CORRELAÇÃO COM SENSIBILIZAÇÃO EM PORTADORES DE DOENÇAS ALÉRGICAS RESPIRATÓRIAS " Estou ciente que me submeterei a testes alérgicos , que são de dois tipos:

1- Prick teste: coloca-se uma gota da substância a ser testada - no caso, os extratos de ácaros, pelos de animais, barata e pólen e os controles positivo e negativo- sobre a pele do antebraço. Esses controles são substâncias que sabidamente dão (no caso do controle positivo), ou não dão (no caso do negativo) alergia, pois, assim, compara-se o extrato com essas substâncias para ver o quanto positivo ou negativo o teste será. Com uma lanceta estéril, será feito um "prick" (um pequeno furinho na pele sobre a gota do extrato para que este penetre na pessoa que está sendo testada. Isso é bastante superficial e não chega nem a sangrar). Após 15 minutos, será feita a leitura e será considerado positivo o extrato que causar uma pápula, ou seja, uma "bolinha" na pele a qual será comparada com o tamanho que a "bolinha" do controle positivo causar. Essa "bolinha " fica vermelha e coça e desaparece completamente após aproximadamente 20 minutos.

2- Teste intradérmico: injeta-se aproximadamente 0,1 ml de extrato alergênico, no caso os extratos dos fungos, e o controle negativo. Aguarda-se 15 minutos e faz-se a leitura. Se positivo, observar-se-á no local uma pápula (bolinha) avermelhada e que

dará um pouco de coceira e que desaparece em 2-3 horas, mas, que poderá persistir por até 24-48 horas. É importante avisar a médica no caso dessa bolinha durar mais que 1 dia, ou se aparecer uma bolinha nova após 1 dia. A médica colocará seu telefone à disposição para esses contatos.

Além do teste, será colhido sangue (+/- 5ml) para se fazer testes no laboratório. O desconforto é mínimo , relacionado apenas à dor do prick teste , e da coleta de sangue . O risco também é mínimo, já que as reações decorrentes de testes alérgicos são extremamente raras. Essas reações podem ser as seguintes: alergia na pele (coceira e vermelhidão), crise (leve) de asma e rinite. Por precaução, a pessoa deve permanecer no serviço por uma hora após o teste. Estou ciente que o Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP - tem total condição de me socorrer caso essas raras reações venham a ocorrer e que serei assistido(a) por médico especialista em Alergia durante todo o tempo que estiver no Serviço. Sei, ainda, que não terei um benefício imediato com a realização desse teste, mas que estarei contribuindo para que se conheça melhor as causas de certas doenças alérgicas respiratórias e, com isso, sua prevenção.

Também estou ciente que a qualquer momento poderei mudar de opinião, procurar os membros da equipe para outros esclarecimentos ou o Chefe do Departamento de Clínica Médica, tudo sem prejuízo ao meu atendimento nesse hospital.

Botucatu. ____de____ de 2001.

Nome: _____

R.G.: _____

Nome da pesquisadora: Elaine Gagete Miranda da Silva

CRM: 50.628 R.G.: 11.672.642

ANEXO F - APROVAÇÃO DAS COMISSÕES DE ÉTICA DAS FACULDADES
DE MEDICINA UNESP- BOTUCATU E USP- SÃO PAULO

unesp

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/n° - Botucatu - S.P.
CEP: 13.618-970 - Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.com.br
e-mail Presidência: mjbvanna@uol.com.br

Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de outubro de 2.001

Of. 339/2001-CEP
MJBV/asc

Prezada Senhora,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Estudo dos fungos anemófilos da cidade de Botucatu e sua correlação com sensibilização em portadores de doenças alérgicas respiratórias"**, de autoria de Elaine Gaget Miranda da Silva, orientada pelo Prof. Júlio Croce e co-orientação de Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer **favorável**, aprovado em reunião de 01/10/2001.

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Thais Helena Abrahão Thomaz Queluz
Departamento de Clínica Médica
da Faculdade de Medicina de Botucatu

CAPPesq, 11 de Outubro de 2001.

PROF. DR. JORGE KALIL FILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

de acordo
J. Kalil

*A Pneumologia Clínica
para conhecimento.*

Depto. de Clínica Médica - FMUSP.
17 / 10 / 2001

ELIANA COSTA PONTE
Secretária do Depto. de Ensino - Nível III

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 3671

SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA**Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa****APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10.10.01, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 692/01, intitulado: "**Estudo dos fungos anemófilos de Botucatu e sua correlação com sensibilização em portadores de doenças alérgicas respiratórias**", do Departamento de Clínica Médica, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Julio Croce

Pesquisador Executante: Sra. Elaine Gagete Miranda da Silva

ANEXO G

Interpretação do exame IgE “in vitro” dosada pelo sistema Unicap – Pharmacia:

CLASSE	IgE ESPECÍFICA (KU_A/L)	NÍVEL DE REATIVIDADE
0 (ZERO)	<0,35	INDETECTÁVEL
I	0,35-0,69	BAIXO
II	0,70-3,49	MODERADO
III	3,50-17,49	ALTO
IV	17,50-49,99	MUITO ALTO
V	50-100	MUITO ALTO
VI	>100	MUITO ALTO

Fonte: <http://www.us.diagnostics.com>

REFERÊNCIAS

- Abdel-Hafez SII. Survey of airborne fungus spores at Taif, Saudi Arabia. *Mycopathologia*. 1984;88:39-44.
- Abdel-Hafez SII, Shoreit AAM, Abdel-Hafez AII, E-Maghraby OMO. Mycoflora and mycotoxin-producing fungi of air-dust particles from Egypt. *Mycopathologia*. 1986;93:25-32.
- Agarwal MK, Shivpuri DN, Mukerji KG. Studies on the allergenic fungal spores of the Delhi, India, metropolitan area. *J Allergy*. 1969;44:193-203.
- Airaudi D, Marchisio VF. Fungal biodiversity in the air of Turin. *Mycopathologia*. 1996;136:95-102.
- Al-Doory Y, Domson JF, Howard WA, Sly RM. Airborne fungi and pollens of the Washington, D.C. metropolitan area. *Ann Allergy*. 1980;45:360-7.
- Al-Doory Y, Domson JF, Best J. Further studies of the airborne fungi and pollens of the Washington, D.C. metropolitan area. *Ann Allergy*. 1982;49:265-9.
- Al-Subai AAT. Air-borne fungi at Doha, Qatar. *Aerobiologia*. 2002;18:175-83.
- Al-Suwaine AS, Bahkali AH, Hasnain SM. Seasonal incidence of airborne fungal allergens in Riyadh, Saudi Arabia. *Mycopathologia*. 1999;145:15-22.
- Alecrim I, Teixeira H. Fungos anemófilos da cidade do Recife - Pernambuco - Brasil. *An Fac Med Univ Recife*. 1958;18:269-74.
- Aller B, Rey M, Martínez A. Estudio de la incidencia de los hongos en el aire de Leon durante un año. *Rev Clin Esp*. 1971;121:457-60.

Almodóvar CL. Epidemiologia de hongos atmosféricos em Puerto Rico - Parte 1. *Bol Asoc Méd P Rico*. 1977;69:25-8.

Asero R, Bottazzi G. Hypersensitivity to molds in patients with nasal polyposis: A clinical study. *Journal Allergy Clin Immunol*. 2000;105:186-8.

Barkai-Golan R, Frank M, Kantor M, Karadavid R, Toshner D. Atmospheric fungi in the desert town of Arad and in the coastal plain of Israel. *Ann Allergy*. 1977;38:270-4.

Barnes C, Schreiber K, Pacheco F, Landuyt J, Hu F, Portnoy J. Comparisons of outdoor allergenic particles and allergen levels. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000;84:47-54.

Beasley R, Keil U, von Mutius E, Pearce N. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet*. 1998;35:1225-32.

Beaumont F, Kaufmfman HF, Van Der Mark, TH, Sluiter HJ, De Vries K. Volumetric aerobiological survey of conidial fungi in the North-East Netherlands. I. Seasonal patterns and the influence of meteorological variables. *Allergy*. 1985a;40:173-180.

Beaumont F, Kaufmfman HF, Van Der Mark TH, Sluiter HJ, De Vries K. Volumetric aerobiological survey of conidial fungi in the North-East Netherlands. II Comparison. of aerobiological data and skin tests with mold extract in an asthmatic population. *Allergy*. 1985b;40:181-6.

Beaumont F, Kauffman HF, Sluiter HJ, De Vries K. Sequential sampling of fungal air spores inside and outside the homes of mould-sensitive, asthmatic patients: a search for a relationship to obstructive reactions. *Ann Allergy*. 1985c;55:740-46.

Bernstein A, Stromrs WW. Practice parameters for allergy diagnostic testing. *Ann Allergy Asthma Immunology*. 1995;75:553-625.

- Bisht V, Singh BP, Arora N, Gaur SN, Sridhara S. Antigenic and allergenic cross-reactivity of *Epicoccum nigrum* with other fungi. *American College Allergy Asthma Immunol.* 2002;89:285-91.
- Black PN, Udy AA, Brodie SM. Sensitivity to fungal allergens is a risk factor life-threatening asthma. *Eur J Allergy Clin Immunol.* 2000;55:501-4.
- Brunini JL, Correa CLH. Isolamento de fungos do gênero *Alternaria* na cidade de São Paulo (Brasil). *O Hospital.* 1967;71:227-9.
- Brunini JL, Guedes Filho D, Almeida SMVC. Fungos e hipersensibilidade: aspectos gerais. *Rev Brás Alergia Immunopatol.* 1989;12:40-6.
- Botucatu site oficial [online], 2001 [citado 30 mar 2001]. Disponível em: <http://www.botucatu.sp.gov.br>.
- Botucatu site oficial [online], 2004 [citado 19 ago 2004]. Disponível em: <http://www.botucatu.sp.gov.br>.
- Bousquet JC, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA): In collaboration with the World Health Organization. *Eur J Allergy Clin Immunol.* 2002;57:841-55.
- Buck N, Gambale V. Microbiota fúngica anemófila da cidade de Presidente Prudente, estado de São Paulo, Brasil. *Rev Microbiol.* 1985;16:9-14.
- Bunnag C, Dhorranintra B, Plangpatanapanichya A. A comparative study of the incidence of indoor and outdoor mold spores in Bangkok, Thailand. *Ann Allergy.* 1982;48:333-9.
- Burge HP. An update on pollen and fungal spore aerobiology. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:544-52.

- Bush RK, Portnoy JM. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;107:S430-42.
- Charlesworth EN. The role of basophils and mast cells in acute and late reactions in the skin. *Allergy*. 1997;52:31-43.
- Chavasco JK, Gambale W, Siqueira AM, Fiorine JE, Croce MPC, Mendes JR LG, Nascimento LC. Evaluation of the allergenicity of spore and mycelia extracts of *Pisolithus tinctorius*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1997;39:245-52.
- Chew FT, Lim SH, Shang HS, Siti Dahlia MD, Goh DY, Lee BW, Tan HTW, Tan TK. Evaluation of the allergenicity of tropical pollen and airborne spores in Singapore. *Allergy*. 2000;55:340-7.
- Çolakoglu G. Fungal spore concentrations in the atmosphere at the Anatolia quarter of Istanbul, Turkey. *J Basic Microbiol*. 1996;36:155-62.
- Collins-Williams C, Kuo HK, Garey DN, Davidson S, Collins-Williams D, Fischer JB. Atmospheric mold counts in Toronto, Canada, 1971. *Ann Allergy*. 1973;31:69-71.
- III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma. *J Pneumol*. 2002;28(sup11).
- Corey J, Kaiseruddin S, Gungor A. Prevalence of mold-specific immunoglobulins in a Midwestern allergy practice. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;117:516-20.
- Cosentino S, Pisano PL, Fadda ME, Palmas F. Pollen and mold allergy: aerobiologic survey in the atmosphere of Cagliari, Italy (1986-1988). *Ann Allergy*. 1990;65:393-9.
- Croce MA, Manso ERC, Gambale W, Takayama L, Andrade CEO, Pinto JHP, Castro FFM, Croce J. Sensitization to fungus *Hemileia vastatrix* coffee leaf rust. *Allergy*. 2001;56:684-87.

- Dales RE, Cakmak S, Judek S, Dann T, Coates F, Brook JR, Burnett RT. The role of fungal spores in thunderstorm asthma. *Chest*. 2003;123:745-50.
- D'Amato G, Stanziola AA, Cocco G, Melillo G. Mold Allergy: a three year investigation (1980-1982) of the airborne fungal spores in Naples, Italy. *Ann Allergy*. 1984;52:363-7.
- D'Amato G, Spieksma FTHM. Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe. *Allergy*. 1995;50:870-7.
- Davies RR. Spore concentrations in the atmosphere at Ahmadi, a New Town in Kuwait. *J Gen Microbiol*. 1969;55:425-32.
- Delfino RJ, Zeiger RS, Seltzer JM, Street DH, Matteucci RM, Anderson PR, Koutrakis P. The effect of outdoor fungal spore concentrations on daily asthma severity. *Environ Health Perspect*. 1997;105:622-35.
- DeShazo RD, Chapin K, Swain RE. Current concepts: fungal sinusitis. *New Engl J Med*. 1997;337:254-59.
- Dupont EM, Field RC, Leathers CR, Northey WT, Tempe and Albuquerque NM. A survey of the airborne fungi in the Albuquerque, New Mexico, metropolitan area. *J Allergy*. 1967;39:238-44.
- Esch, RE. Manufacturing and standardizing fungal allergen products. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:210-15.
- Fadel R, David B, Paris S, Guesdon JL. *Alternaria* spore and mycelium sensitivity in allergic patients: in vivo and in vitro studies. *Ann Allergy*. 1992;69:329-35.

- Faria A. Estudo preliminar sobre a flora micótica anemófila de Belo Horizonte, Minas Gerais. I – Frequência dos gêneros de fungos de interesse alérgico. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1967a;9:43-5.
- Faria A. Estudo preliminar sobre a flora micótica anemófila de Belo Horizonte, Minas Gerais. II – Sensibilidade cutânea aos 4 gêneros mais comuns em pacientes com alergia respiratória. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1967b;9:208-12.
- Fiorini JE, Do Lago VBG, Borges JB, Silva AC. Incidência de fungos anemófilos em Alfenas, Minas Gerais. *Rev Esc Farm Odont Alfenas*. 1985;8:59-70.
- Frenz DA, Murray LW, Boire AA. A summary of the atmospheric surveys published in the United States allergy literature, 1966-1996. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999;82:543-7.
- Frenz DA. Comparing pollen and spore counts collected with the Rotorod Sampler and Burkard spore trap. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1999;83:341-9.
- Frew, AJ. Mold allergy: Some progress made, more needed. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:216-18.
- Godoy, FG. Contribuição ao estudo da flora micótica anemófila em Curitiba [Tese de Livre Docência]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 1976.
- Gambale W, Croce J, Costa-Manso E, Sales M. Library fungi at the University of São Paulo and their relationship with respiratory allergy. *J Invest Alergol Immunol*. 1993;3:45-50.
- Gambale W, Purchio A, Croce J. Flora fúngica anemófila da grande São Paulo. *Rev Microbiol*. 1977;8:74-9.

- Gambale W, Purchio A, Paula CR. Periodicidade diária de fungos anemófilos na cidade de São Paulo, Brasil. *Rev Microbiol.* 1981;12:177-81.
- Gambale W, Purchio A, Paula CR. Influência de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos na cidade de São Paulo, Brasil. *Rev Microbiol.* 1983;14:204-14.
- Goodman DH, Northey WT, Leathers CR, Savage TH. A study of airborne fungi in the Phoenix, Arizona, metropolitan area. *J Allergy.* 1966;38:56-62.
- Gravesen S. Identification and quantitation of indoor airborne micro-fungi during 12 months from 44 Danish homes. *Acta Allergol.* 1972;27:337-54.
- Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:685-92.
- Gupta R, Singh BP, Sridhara S, Gaur SN, Chaudhary VK, Arora N. Allergens of *Curvularia lunata* during cultivation in different media. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:857-62.
- Gupta R, Sing BP, Sridhara S, Gaur SN, Kumar R, Chaudhary VK, Arora N. Allergenic cross-reactivity of *Curvularia lunata* with other airborne fungal species. *Allergy.* 2002;57:636-40.
- Halonen M, Stern DA, Wright AL, Taussig LM, Martinez FD. *Alternaria* as major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:1356-61.
- Hariri AR, Ghahary A, Naderinasab M, Kimberlin C. Airborne fungal spores in Ahwaz, Iran. *Ann Allergy.* 1978;40:349-52.
- Hasnain SM, Wilson JD, Newhook FJ. Fungi and disease: fungal allergy and respiratory disease. *N Z Med J.* 1985;8:342-6.

- Helbling A, Gayer F, Pichler WJ, Brander KA. Mushroom (Basidiomycete) allergy: Diagnosis established by skin test and nasal challenge. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;102:853-58.
- Helbling A, Gayer F, Brander KA. Respiratory allergy to mushroom spores: not well recognized, but relevant. *Am Coll Allergy Asthma Immunol*. 1999;83:17-9.
- Hemmann S, Blaser K, Cramer R. Cross-reactivity between fungal allergens: *Aspergillus fumigatus* and *Candida boidinii*: P452. *Allergy*. 1996;51:138.
- Hoffman DR, Kozak PP, Gillman SA, Cummings LH, Gallup J. Isolation of spore specific allergens from *Alternaria*. *Ann Allergy*. 1981;46:310-15.
- Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal allergens. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8:161-79.
- Hyde HA. Atmospheric polens and spores in relation to allergy. *Clin Allergy*. 1973;2:153-79.
- Ingold CT. *Fungal spores. Their liberation and dispersal*. Oxford: Oxford University Press; 1971.
- Iovanniti C, Tiraboschi IN. Hongos anemófilos de la ciudad de La Plata y preparación de sus antígenos. *Rev Argent Micol*. 1985;8:12-6.
- Katyal RK, Zhang Y, Jones RH. Atmospheric mold spore counts in relation to meteorological parameters. *Int J Biometeorol*. 1997;41:17-22.
- Katz Y, Verleger H, Barr J, Rachmiel M, Kiviti S, Kuttin ES. Indoor survey of moulds and prevalence of mould atopy in Israel. *Clin Exp Allergy*. 1999;29:186-92.
- Kauffman HF, Tomee JFC, Van Der Werf TS, Monchy JGR, Köeter GK. Review of fungus-induced asthmatic reactions. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:2109-15.

- Kauffman HF, Tome JFC, Van De Riet MA, Timmerman AJB, Borger P. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:1185-93.
- Khan ZU, Khan MAY, Chandy R, Sharma PN. Aspergillus and other moulds in the air of Kuwait. *Mycopathologia.* 1999;146:25-32.
- Kurup VP, Shen HD, Banani B. Respiratory fungal allergy. *Microbes Infect.* 2000;2:1101-10.
- Kurup VP, Shen HD, Vijay H. Immunobiology of fungal allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;129:181-8.
- Kwaasi AAA, Parhar RS, Al-Mohanna FAA, Harfi HA, Collison, KS, Al-Sedairy ST. Aeroallergens and viable microbes in sandstorm dust: Potential triggers of allergic and nonallergic respiratory ailments *Eur J Allergy Clin Immunol.* 1998;53:255-65.
- Lacaz CS, Mendes E, Pinto RJR, Cardoso T, Luchetti LCH. Fungos anemófilos nas cidades de São Paulo e Santos (Brasil). *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo.* 1958;13:187-93.
- Lacaz CS, Mendes E. Flora micótica anemófila nos trópicos. *Folia Clin Biol.* 1963;32:105-14.
- Lawande RV, Onyemelukwe GC. Airborne fungi during Harmattan in Zaria, Nigeria. *Ann Allergy.* 1984;52:47-9.
- Levetin E, Horowitz L. A one-year survey of the airborne molds of Tulsa, Oklahoma. I. Outdoor survey. *Ann Allergy.* 1978;41:21-4.
- Lewis SA, Corden JM, Foster GE, Newlands M. Combined effects of aerobiological pollutants, chemical pollutants and meteorological conditions on asthma admissions and

- A (amp) E attendances in Derbyshire UK, 1993(ndash)96. *Clin Exp Allergy*. 2000;30:1724-32.
- Li CS, Hsu LY. Airbone fungus allergen in association with residential characteristics in atopic and control children in a subtropical region. *Arch Environ Health*. 1997;52:72-9.
- Li DW, Kendrick B. A year-round study on functional relationships fungi with meteorological factors. *Int J Biometeorol*. 1995;39:74-80.
- 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;76:819-25.
- Lima JA, Gadelha W. Contaminação de hongos del aire atmosférico em la cidade de Recife (Pernambuco-Brasil). *Rev Latinoam Microbiol*. 1983;25:243-51.
- Lima AO, Seabra O, França AT, Cukier J. Incidência de fungos na atmosfera de algumas cidades brasileiras. *O Hospital*. 1963;63:93-102.
- Machado GMR, Purchio A. Fungos anemófilos do Grande Recife. *Rev Bras Alerg Immunop*. 1980;2:69-81.
- Malling HJ, Agrell B, Croner S, Dreborg S, Foucard T, Kjellman M, Koivikko A, Roth A, Weeke B. Diagnosis and immunotherapy of mould allergy. *Allergy*. 1985;40:108-14.
- Mangianterra M, Alonso JM, Medina E, Cerbera L. Micoflora anemófila de la ciudad de resistência (Chaco). *Bol Inst Patol Reg*. 1992/93;15/16:8-13.
- Marshall, WA. Biological particles over Antarctica. *Nature*. 1996;383:680.
- Margulis L, Schwartz KV. *Cinco reinos: um guia ilustrado dos filós da vida na Terra*. Tradução de Cecília Bueno e Lena Glise. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

- Marple BF. Allergic fungal rhinosinusitis; current theories and management strategies. *Laryngoscope*. 2001;111:1006-19.
- Martinez RL, Sánchez DR, Huerta JG, Esquenaze A, Alvarez MT. Variación estacional de hongos productores de alergia em el sur de la ciudad de México. *Allergol Immunopathol*. 1986;14:43-8.
- Mendes E, Lacaz CS. Fungos anemófilos da cidade de São Paulo. *Rev Paul Med*. 1952;41:270-1.
- Menezes EA, Gambale V, Macedo MS, Abdalla DSP, Paula CR, Croce J. Biochemical antigenic and allergenic characterization of crude extracts of *Drechslera (Helmintosporium) monoceras*. *Mycopathologia*. 1995; 131: 75-81.
- Meyer GH, Prince HE, Raymer WJ. Airborne fungi – a resurvey. *Ann Allergy*. 1983;51:26-9.
- Mezzari A, Perin C, Santos Jr. SA, Bend LA. Airborne fungi in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2002;44:269-72.
- Middleton Jr. E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW. *Allergy – principles & practice*. 5th ed. St. Louis. Mosby; 1998.
- Mitchell TG. Overview of basic medical mycology. *Otolaryngol Clin North Am*. 2000;33:237-49.
- Mohovic J, Gambale W, Croce J. Cutaneous positivity in patients with respiratory allergies to 42 allergenic extracts of airborne fungi isolated in São Paulo, Brazil. *Allergol Immunopathol*. 1988;16:397-402.
- Moraes VMA, Lima EO. Incidência de fungos anemófilos no centro de Ciências e Saúde, Campus Universitário – João Pessoa. *Ciência Cultura Saúde*. 1986;8:24-6.

- Moustafa AF, Kamel SM. A study of fungal spore populations in the atmosphere of Kuwait. *Mycopathologia*. 1976;59:29-35.
- Murgia M. One year's survey of airspora in Siena (Central Italy). *Allergol Immunopathol*. 1984;12:403-5.
- Nelson H, Szeffler SJ, Jacobs J, Huss K, Shapiro G, Stemberg AL. The relationships among environmental allergen sensitization, allergen exposure, pulmonary function, and bronchial hyperresponsiveness in the Childhood Asthma Management Program. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:775-85.
- Nelson H. The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:S628-32.
- Neukirch C, Henry C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Is sensitization to *Alternaria alternata* a risk factor for severe asthma?: A population-based study. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;103:709-11.
- Niemeijer NR, De Monchy JGR. Age-dependency of sensitization to aero-allergens in asthmatics. *Allergy*. 1992;47:431-5.
- Nussbaum F. Variation in the airborne fungal spore population of the Tuscarawas Valey II. *Mycopathologia*. 1991;116:181-98.
- O'Hollaren MT, Yunginger JW, Offord KP, Somers MJ, O'Connell EJ, Ballard DJ, Sachs MI. Exposure to an aeroallergen as a possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma. *New Engl J Med*. 1991;324:359-63.
- Ogunlana EO. Fungal air spora at Ibadan, Nigeria. *Appl Microbiol*. 1975;29:458-63.
- Özkaragöz K. A study of airborne fungi in the Ankara area of Turkey in 1966. *Acta Allergol*. 1969;24:147-56.

- Passarelli, N. Com que frequência encontra asmáticos sensíveis a fungos do ar e quais os resultados obtidos com a hipossensibilização? *O Hospital*. 1952;61:175-7.
- Patel AM, Ryu JH, Rees CE. Hypersensitivity pneumonitis: Current concepts and future questions. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:661-70.
- Peat JK, Tovey E, Mellis CM, Leeder SR, Woolcok AJ. Importance of house dust mite and *Alternaria* allergens in childhood asthma: an epidemiological study in two climatic regions of Australia. *Clin Exp Allergy*. 1993;23:812-20.
- Peat JK, Van Den Berg RH, Green WF, Mellis CM, Leeder SR, Woolcock AJ. Changing prevalence of asthma in Australian children. *B M J*. 1994;308:1591-6.
- Pecher SA, Castro GB, Borrás MRL. Inquérito sobre fungos anemófilos na fronteira Brasil-Colômbia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1988;21:63-6.
- Phanichyakarn P, Dhanamitta S, Kraikitpanich T, Rungnirundornku LD. Atmospheric pollens and molds survey in Bangkok. *J Med Ass Thai*. 1974;57:11-3.
- Pinheiro LFL, Neder RN, Azevedo JL. Flora micótica e bacteriana do ar na cidade de Piracicaba. *O Hospital (Rio de Janeiro)*. 1966;69:627-33.
- Pinto RJC, Croce J, Kalil J, Giannini MJM, Costa PI, Gambale W. Fungos em péletes de laranja e alergia respiratória em trabalhadores da indústria citrícola. *Rev Brás Alergia Imunopatol*. 2003;26:152-8.
- Piontelli E, Velasco M. Flora anemófila del aire en Valparaiso, Chile. *Rev Méd Chile*. 1974;102:104-8.
- Prince HE, Meyer GH. An up-to-date look at mold allergy. *Ann Allergy*. 1976;37:18-25.
- Purchio A, Gambale W, Paula CR. Airborne fungi of Baixada Santista, State of São Paulo, Brazil. *Rev Microbiol*. 1984;15:258-65.

- Reijula K, Leino M, Mussalo-Rauhamaa H, Nikulin M, Lwniua H, Mikkola J, Elg P, Kari O, Makinen-Kiljunen S, Haahtela T. IgE-mediated allergy to fungal allergens in Finland with special reference to *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Ann Allergy Asthma Immunology*. 2003;91:280-7.
- Requejo VH. Microflora atmosférica de la ciudad de Trujillo (Peru). III – Generos aislados durante el año de 1971. *Mycopathologia*. 1975;56:15-20.
- Rosas I, Calderon C, Ulloa M, Lacey J. Abundance of airborne *Penicillium* CFU in relation to urbanization in Mexico City. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59:2648-52.
- Rosas I, McCartney HA, Payne RW, Calderón C, Lacey J, Chapela R, Ruiz-Velazco S. Analysis of relationships between environmental factors (aeroallergens, air pollution, and weather) and asthma emergency admissions to a hospital in Mexico City. *Allergy*. 1998;53:394-401.
- Ross MA, Curtis L, Scheff PA, Hryhorczuk DO, Ramakrishnan V, Wadden RA, Persky VW. Association of asthma symptoms and severity with indoor bioaerosols. *Eur J Allergy Clin Immunol*. 2000;55:705-11.
- Rutherford S, Simpson R, Williams G, Mitchel LC, McCall B. Relationships between environmental factors and lung function of asthmatic subjects in South East Queensland, Australia. *J Occup Environ Med*. 2000;42:882-91.
- Salvaggio J, Seabury J, Schoenhardt EAV. Relationship between Charity Hospital asthma admission rates, semiquanitative pollen and fungal spore counts, and total particulate aerometric sampling data. *J Allergy Clin Immunol*. 1971;48:96-114.
- Salvaggio J, Aukrust L. Mold-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1981;68:327-46.

Santilli JJR, Rockwell WJ, Collins RP. The significance of the spores of the Basidiomycetes (mushrooms and their allies) in bronchial asthma and allergic rhinitis. *Ann Allergy*. 1985;55:469-71.

Schwartz HJ. Problems with skin testing in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 1995;75:533-5.

Shadzi S, Zahraee MH, Chadegnanipour M. Incidence of airborne fungi in Isfahan, Iran. *Mycoses*. 1993;36:69-73.

Southworth D. Introduction to the biology of airborne fungal spores. *Ann Allergy*. 1974;32:1-21.

Stroud RH, Calhoun KH, Wright ST, Kennedy KL. Prevalence of hypersensitivity to specific fungal allergens as determined by intradermal dilutional testing. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;125:491-4.

Takahashi T. Airborne fungal colony-forming units in outdoor and indoor. Environments in Yokohama, Japan. *Mycopathologia*. 1997;139:23-33.

Targonski PV, Persky VW, Ramekrishnan V. Effect of environmental molds on risk of death from asthma during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95:955-61.

Tarlo SM, Fradkin A, Tobin RS. Skin testing with extracts of fungal species derived from the homes of allergy clinic patients in Toronto, Canada. *Clin Allergy*. 1988;18:45-52.

Terr, AI. Are indoor molds causing a new disease? *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113:221-26.

Thakur SB. Occurrence of spores of thermophilic fungi in the air at Bombay. *Mycologia*. 1977;69:197-9.

- Tomee JFC, Wierenga TJ, Hiemstra PS, Kauffman HF. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Infect Dis.* 1997;176:300-3.
- Torras MA, Artigas JG, Fernandez GS. Air-borne fungi in the air of Barcelona (Spain). IV. The genus *Cladosporium*. *Mycopathologia.* 1981;74:19-24.
- Urrutia GJ, Orellana M, Muñoz J, Carrasco CE, Troncoso A. Estudio aeromicológico en el área occidental de Santiago. *Rev Med Chile.* 1976;104:213-5.
- Venegas CM, Cueva VJ, Juárez X. Hongos atmosféricos de la ciudad de La Piedad. Michoacán. *Alergia.* 1968;16:18-26.
- Vernarske DL, deShazo RD. Sinobronchial allergic mycosis: The SAM syndrome. *Cardiopul Crit Care J.* 2002;12:1670-76.
- Vicens MJP, Fernández GS. Contribution towards the study of the Madrid air mycoflora, I. Station diversity and seasonal variation. *Allergol Immunopathol.* 1984;12:193-8.
- Viegas AP. *Dicionário de Fitopatologia e Micologia.* Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas; 1979.
- Vieira LA, Belfort Jr. RB, Fischman OF, Scarpi M. Estudo da flora fúngica da conjuntiva normal, da cana-de-açúcar e de anemófilos da região canavieira de Santa Rita – Paraíba (Brasil). *Arq Bras Oftalmol.* 1989;52:63-7.
- Vlahakis NE, Aksamit TR. Diagnosis and treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mayo Clin Proc.* 2001;76:930-38.
- Ward Jr. WG, Woodfolk JA, Hayden ML, Jackson S, Platts-Mills TAE. Treatment of late-onset asthma with fluconazole. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104:541-46.
- Whittaker RH. New concepts of kingdoms of organisms. *Science.* 1969;163:150 – 60.

Wu LYF, Steidle GM, Meador M, Fosso CK, McDowell LJ, Shin RB, Holbreich M. Effect of tree and grass pollens and fungal spores on spring allergic rhinitis: a comparative study. *Am Coll Allergy Asthma Immunol*. 1999;83:137-43.

Youssef AY, Nagib ME. Studies on the atmospheric fungal floral in Cairo. *Ann Allergy*. 1966;24:349-52.

Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Sensitization to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *B M J*. 2002;325:411-20.

APÊNDICE

Resultados parciais desta tese foram enviados ao XXIX Congresso Brasileiro de Alergia e Imunopatologia e o trabalho foi agraciado com o prêmio “Oswaldo Seabra” e publicado na Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia, volume 26(3), 2003.