



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina.

**NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD POR
EXPOSICIÓN A HONGOS Y AVES:
COMPARACIÓN DE MECANISMOS
INMUNOLÓGICOS E INFLAMATORIOS.**

Tesis Doctoral

Presentado por:

Mònica Sánchez Ortiz

Directores:

Dr. Xavier Muñoz i Gall

Dra. M^a Jesús Cruz Carmona.

Tutor

Dr. Ferran Morell i Brotad

Barcelona 2018



Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina.

TESIS DOCTORAL

**NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD POR EXPOSICIÓN A HONGOS Y
AVES: MECANISMOS INMUNOLÓGICOS E INFLAMATORIOS**

Tesis presentada por Mònica Sánchez Ortiz para acceder al grado de Doctor.

Programa de Doctorado en Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Directores Tesis:

Dr. Xavier Muñoz i Gall.

Dra. M^aJesús Cruz Carmona.

Tutor Tesis:

Dr. Ferran Morell i Brotad.

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Universitat Autònoma de Barcelona.

Barcelona, agosto 2018.



Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina.

Ferran Morell i Brotad, profesor emérito de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD POR EXPOSICIÓN A HONGOS Y AVES: COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS E INFLAMATORIOS",

Presentada por Mònica Sánchez Ortiz e inscrita en el Departamento de Medicina de la UAB y dirigida por mi, para optar al grado de Doctor, representa una gran aportación al tema y reúne méritos suficientes para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Barcelona el 10 de agosto de 2018.

Dr. Ferran Morell i Brotad.



Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina.

Xavier Muñoz i Gall, Profesor Asociado de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD POR EXPOSICIÓN A HONGOS Y AVES: COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS E INFLAMATORIOS",

Presentada por Mònica Sánchez Ortiz e inscrita en el Departamento de Medicina de la UAB y dirigida por mi, para optar al grado de Doctor, representa una gran aportación al tema y reúne méritos suficientes para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Barcelona el 10 de agosto de 2018.

Dr. Xavier Muñoz i Gall.



Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Medicina.

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina.

M^aJesús Cruz Carmona, Doctora en Biología de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada "NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD POR EXPOSICIÓN A HONGOS Y AVES: COMPARACIÓN DE LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS E INFLAMATORIOS",

Presentada por Mònica Sánchez Ortiz e inscrita en el Departamento de Medicina de la UAB y dirigida por mi, para optar al grado de Doctor, representa una gran aportación al tema y reúne méritos suficientes para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Y, para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Barcelona el 10 de agosto de 2018.

Dra. M^aJesús Cruz Carmona

AGRADEDIMIENTOS

A la Dra. M^a Jesús Cruz y el Dr. X. Muñoz, directores de esta tesis, por enseñarme el mundo de la investigación experimental y haberme brindado la oportunidad de ampliar mi conocimiento en la faceta científica. Agradecer especialmente al Dr. X. Muñoz su comprensión, paciencia, dedicación y apoyo, sobretodo en las fases finales de la tesis en que los nervios y estrés, combinados con el cansancio del día a día en urgencias, se hacían muy presentes: GRACIAS.

Al Equipo de Recerca (Dani, Marta, Sara, Lola, Susi), por enseñarme paso a paso las técnicas de laboratorio y cómo trabajar con animales de experimentación, sin sus enseñanzas no habría podido realizar la tesis.

A la Dra. M^a. A. Montero por el interés mostrado en el proyecto desde el principio y por prestarse a colaborar pese a la distancia.

Al Servicio de Neumología y de Urgencias, porqué de todo se aprende (de lo bueno y de lo malo) y cada día te descubren algo nuevo. Gracias por la experiencia.

A mis amigos porqué siempre están ahí, sin necesidad de decir nada. Especial agradecimiento a: Alba y Rákel, porqué llevamos más tiempo juntas que separadas, porqué no hace falta hablar para decirnos las cosas y por compartir penas y alegrías: gracias por vuestro apoyo incondicional. A Will y Sara, por todos los momentos y por no dejar que el estrés me venza, siempre dispuestos a una quedada de desahogo: gracias. A Marinilla por compartir largas horas de conversación diversa, pese a que veces cueste vernos sé que siempre estás ahí. A mis niñas "Sanitas" por todo lo vivido y lo que nos queda por vivir, por la conexión que tenemos desde el inicio y por el apoyo: gracias de corazón. Por último y, no por eso menos importante, a Estela, Noe y Eli pese a conocernos desde hace poco, parece que sea de toda la vida y no habéis dudado en ningún momento en prestaros para un desahogo, unas risas o lo que se tercié.

A mis Pichones, por haberme dado la oportunidad de recuperar algo perdido y muy importante para mi; especialmente a mi prima Ana porqué la distancia no importa cuando hay cariño, apoyo y comprensión: nos vemos por Madrid y el pueblo.

Por último, a mi familia: mis padres (Pilar y Eladio) y mi hermano (Dani) porqué cada uno a su manera me ha hecho mirar hacia delante y avanzar. Sigamos haciéndolo juntos.

ABREVIATURAS	1
ABSTRACT	3
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. DEFINICIÓN	7
1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA	8
1.2.1. <i>Microorganismos</i>	18
1.2.2. <i>Proteínas animales</i>	20
1.2.3. <i>Agentes inorgánicos</i>	20
1.3. FORMAS CLÍNICAS	21
1.4. FISIOPATOLOGÍA	24
1.4.1. <i>Estudios clínicos</i>	24
1.4.2. <i>Estudios experimentales</i>	28
1.5. DIAGNÓSTICO	32
1.5.1. <i>Criterios diagnósticos</i>	32
1.5.2. <i>Técnicas diagnósticas</i>	38
1.6. TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO	53
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
2.1. HIPÓTESIS	57
2.2. OBJETIVOS	57
3. Material Y Métodos	58
3.1. ESTUDIO 1. RENTABILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL ESPECÍFICA.	58
3.1.1. <i>Protocolo diagnóstico</i>	58
3.1.2. <i>Confirmación Diagnóstica</i>	59
3.1.3. <i>Preparación extracto antigénico para la prueba de provocación bronquial específica</i>	59
3.1.4. <i>Prueba de provocación bronquial específica</i>	59
3.1.5. <i>Pruebas de función pulmonar</i>	61
3.1.6. <i>Análisis Estadístico</i>	61
3.2. ESTUDIO 2. MODELO ANIMAL DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD AGUDA Y CRÓNICA.	62
3.2.1. <i>Solución antigénica</i>	62
3.2.2. <i>Animales De Experimentación Y Grupos de estudio</i>	62
3.2.3. <i>Modelo murino de neumonitis por hipersensibilidad aguda y crónica</i>	63
3.2.4. <i>Medida de la función pulmonar: Capacidad pulmonar total (TLC)</i>	64
3.2.5. <i>Anticuerpos IgG específicos</i>	65
3.2.6. <i>Lavado broncoalveolar: recuento celular</i>	65
3.2.7. <i>lavado broncoalveolar: citocinas y quimiocinas</i>	66
3.2.8. <i>Análisis histopatológico</i>	67

3.2.9. Análisis de datos	67
4. RESULTADOS	68
4.1. ESTUDIO 1. RENTABILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL ESPECÍFICA.	68
4.2. ESTUDIO 2. MODELO ANIMAL DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD AGUDA Y CRÓNICA.	74
4.2.1. Medición de la función pulmonar: capacidad pulmonar total.	74
4.2.2. Inmunoglobulina G específica sérica	75
4.2.3. Lavado broncoalveolar: recuento celular	76
4.2.4. Lavado broncoalveolar: citocinas	77
4.2.5. Análisis histopatológico	79
5. DISCUSIÓN	81
6. CONCLUSIONES	88
7. LÍNEAS DE FUTURO	89
8. BIBLIOGRAFÍA	90
9. ANEXOS	107
9.1. BECAS	107
9.2. ARTÍCULOS PUBLICADOS	107

ABREVIATURAS

A

AEC: Aire exhalado condensado

B

BFL: Bird's fancier lung

BPQ: Biopsia pulmonar quirúrgica

BQ: bronquiectasias

BTB: Biopsia transbronquial

E

EI: Espudo inducido

EPG: Enfermedad del pulmón del granjero

EPID: Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

F

FeNO: Fracción espiratoria de óxido nítrico

FPI: Fibrosis pulmonar idiopática

FVC: Capacidad vital forzada

I

IgE: Inmunoglobulina E

IgG: Inmunoglobulina G

INF γ : Interferón γ

IL: Interleuquina o interleucina

L

LBA: Lavado Broncoalveolar

M

MA: Macrófagos alveolares

N

NH: Neumonitis por hipersensibilidad

NINE: Neumonía intersticial no específica

NIU: Neumonía intersticial usual.

NK: Natural killer

NO: Neumonía organizada

Ns: No significativo

P

PCA: Pulmón del Cuidador de Aves

PDA: Pigeon dropping extracts (extracto de excrementos de paloma)

PPBE: Prueba de Provocación Bronquial Específica

PS: suero de paloma

T

TC: Tomografía computerizada

TCAR: Tomografía computerizada de alta resolución

TLC: Total lung capacity (capacidad pulmonar total)

TLCO: Test de transferencia del monóxido de carbono

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TLR: Toll-like receptor

ABSTRACT

Hypersensitivity pneumonitis (HP) is a term encompassing a heterogeneous group of diseases resulting from an inflammatory pulmonary reaction of immunological cause, whose mechanisms are not well known, in response to a wide variety of antigens that can provoke varying degrees of inflammation and destructuring of the lung parenchyma. The prevalence and incidence of HP depend on factors such as geographic conditions or intensity of inhalation, estimated to be around 15% of diffuse interstitial lung disease. A great number of antigenic sources have been described as etiologic agents, being the Bird fancier's lung (BFL) one of the most frequently HP in our setting.

Regarding diagnosis, currently there are no validated criteria, so the diagnosis is based on different aspects such as a high clinical suspicion, the demonstration of a responsible antigen or radiological findings.

It is a potentially serious entity since it can evolve to pulmonary fibrosis and chronic respiratory failure, with mortality at 5 years of up to 27-29% of patients. Currently, HP's treatment consists in a different immunosuppressive strategies and, when HP progresses, pulmonary transplantation if there are no contraindications.

In this context, with lack of a gold standard test for the diagnosis of HP and doubts about the immunopathogenesis of HP, in this thesis show two studies conducted with the objective of establishing the diagnostic yield of specific inhalation challenge (SIC) in HP and the creation of two animal models of HP (acute and chronic) to analyze the different physiopathological mechanisms depending on the form of presentation of the disease and determine if the different forms of HP presentation may correspond to different stages of the same disease.

For establish the diagnostic yield of SIC, a retrospective study was performed with all patients with suspected HP who underwent the inhalation challenge in our center (Hospital Vall d'Hebron) between 1995 and 2010; according to the application of the protocol, a total of 113 subjects are included. Information on pulmonary function, laboratory data, imaging tests, suspected causal agent and SIC result was obtained. The SIC had a sensitivity and specificity of 72.7% and

84% respectively when the etiological agent was not taken into account; these results improved if only SIC for avian and fungi agents were analyzed, with a sensitivity and specificity of 85.1% and 86.2% respectively. It was observed that only 8% of the patients presented severe transient reactions, without requiring hospital admission.

On the other hand, to analyze the different pathophysiological mechanisms involved in HP, an experimental study was carried out with the creation of murine models for avian HP: one acute and one chronic model. It analysed of pulmonary function, IgG, bronchoalveolar lavage cellularity (BAL), cytokines / chemokines present in BAL and lung histology. A most decrease in the TLC was observed in the chronic HP group, without observing recovery with time. The IgG were detected in both groups, the concentration was higher in the chronic group. The number of total cells in BAL was higher in the chronic HP group; in this group, higher values of neutrophils and lymphocytes were observed in comparison with acute HP group; in the acute HP group were observed eosinophils. The analyzed cytokines were observed in both groups, with the exception of IFN γ that was not detected and IL-4 that was only detected in the acute group, 24h after the last nasal instillation. The histological study showed changes compatible with HP in the acute and chronic groups.

In conclusion, the SIC is a useful tool in the diagnosis of HP and it is also safe. Neutrophils and the TH17 response have an important role in the development of the disease and that there is possibly an evolution from TH1 (acute HP) to TH2 (chronic HP) due the persistence of antigenic exposure. This fact would strengthen the hypothesis that the different forms of HP presentation may correspond to different stages of the same disease.

RESUMEN

Neumonitis por hipersensibilidad (NH) es un término que abarca un grupo heterogéneo de enfermedades resultantes de una reacción inflamatoria pulmonar de causa inmunológica, cuyos mecanismos no son bien conocidos, en respuesta a una amplia variedad de antígenos que pueden provocar diversos grados de inflamación y desestructuración del parénquima pulmonar.

La prevalencia e incidencia de la NH dependen de factores tales como las condiciones geográficas o la intensidad de la inhalación; se estima que la NH representa alrededor del 15% de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas (EPID).

Respecto al diagnóstico, actualmente no existen unos criterios validados, por lo que el diagnóstico se basa en diferentes aspectos como una alta sospecha clínica, la demostración de un antígeno responsable o los hallazgos radiológicos.

La NH es una entidad potencialmente grave, con una mortalidad a los 5 años de hasta 27-29% de los pacientes. Des del punto de vista farmacológico en la actualidad se usan diferentes estrategias inmunosupresoras y, cuando la NH progresa, el trasplante pulmonar si no existen contraindicaciones.

Así, en este contexto de ausencia de una prueba de referencia para el diagnóstico de la NH por un lado y de dudas sobre la inmunopatogenia de la NH por otro, en la presente tesis se muestran los dos estudios realizados con el objetivo de establecer la rentabilidad de la prueba de provocación bronquial específica (PPBE) en el diagnóstico de la NH y el diseño de dos modelos animales de NH (agudo y crónico) con el fin de analizar los diferentes mecanismos fisiopatológicos en función de la forma de presentación y poder determinar si se trata de diferentes estadios de la enfermedad.

Para poder analizar la rentabilidad de la PPBE, se realizó un estudio retrospectivo con todos aquellos pacientes con sospecha de NH a los que se realizó la prueba de provocación en nuestro centro (Hospital Vall d'Hebron) entre 1995 y 2010; tras la aplicación del protocolo, se incluyeron un total de 113 sujetos. Se analizaron datos de función pulmonar, de laboratorio, de imagen, del agente causal

sospechado y del resultado de la PPBE. Se determinó que la PPBE presentaba una sensibilidad y especificidad del 72.7% y 84% respectivamente cuando no se tenía en cuenta el agente etiológico; estos resultados mejoraban si se analizaban únicamente las PPBE a aves y hongos, siendo respectivamente del 85.1% y 86.2%. Se observó que únicamente el 8% de los pacientes presentaron reacciones graves transitorias, sin requerir ingreso hospitalario.

Por otro lado, con el fin de analizar los diferentes mecanismos fisiopatológicos implicados en la NH, se realizó un estudio experimental con el diseño de dos modelos murinos para NH aviar: un modelo agudo y otro crónico. Se realizó análisis de la función pulmonar, las IgG en suero, la celularidad del lavado broncoalveolar (LBA), las citoquinas/quimiocinas presentes en el LBA y la histología pulmonar. Se observó una disminución de la TLC más marcada en el grupo de NH crónica, sin observar recuperación con el tiempo. Las IgG se detectaron en ambos grupos, siendo su concentración mayor en el grupo crónico. El número de células totales en el LBA fue más elevado en el grupo NH crónica; en este grupo se observó valores más altos de neutrófilos y linfocitos que en el grupo de NH aguda; en la NH aguda se observaron eosinófilos no presentes en el grupo crónico. Las citoquinas analizadas se observaron en ambos grupos, a excepción del IFN γ que no se detectó y la IL-4 que únicamente se detectó en el grupo agudo, 24h después de la última instilación nasal. El estudio histológico mostró cambios compatibles con NH tanto en el grupo agudo como crónico.

En conclusión, la PPBE no sólo es una herramienta útil en el diagnóstico de las NH sino que también es segura. Los neutrófilos y la respuesta TH17 tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad y posiblemente, haya una evolución de TH1 (NH aguda) a TH2 (NH crónica) ante la persistencia de la exposición antigénica. Este hecho reforzaría la hipótesis de que las diferentes formas de presentación pueden ser estadios evolutivos de la enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN

La Neumonitis por hipersensibilidad (NH), también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es un término que abarca un grupo heterogéneo de enfermedades resultantes de una reacción inflamatoria pulmonar de causa inmunológica en respuesta a una amplia variedad de antígenos que pueden provocar diversos grados de inflamación y desestructuración del parénquima pulmonar¹. Se ha descrito un gran número de fuentes antigénicas como agentes etiológicos, pudiéndose dividir en grandes rasgos en: antígenos aviáres, microorganismos y agentes químicos. Aunque el conocimiento progresivo de la ubicuidad de dichos antígenos en el medio ambiente y la mejoría en los métodos diagnósticos hacen posible un incremento del diagnóstico de las NH tanto en el marco doméstico como ocupacional² su diagnóstico en la actualidad continúa siendo complejo. Posiblemente esta complejidad diagnóstica se deba principalmente a tres factores:

1) A la amplia variedad de presentaciones de esta entidad, que hace que en ocasiones dificulte la sospecha clínica y en consecuencia el diagnóstico. La variedad de síntomas hace que se pueda confundir esta enfermedad con otras enfermedades intersticiales como por ejemplo la fibrosis pulmonar idiopática. Además el desconocimiento de la latencia entre la exposición y el inicio de la clínica hace difícil relacionar dicha exposición a un agente causal con la clínica y por tanto, dificulta la sospecha diagnóstica de NH.

2) Otro factor importante que influye en la complejidad diagnóstica es la ausencia de una prueba diagnóstica de referencia ("*gold standard*"). El diagnóstico depende de un conjunto de factores como son, además de la sospecha diagnóstica, los hallazgos radiológicos en la tomografía computerizada de alta resolución (TCAR), la presencia de linfocitosis en el lavado broncoalveolar (LBA), los hallazgos inmunológicos en suero y los histológicos³. Todos estos hallazgos pueden ser inespecíficos y en ocasiones, similares a otras patologías^{4,5}.

3) Por último el desconocimiento de la fisiopatología de esta entidad dificulta no sólo el diagnóstico sino también el tratamiento. Se han descrito diferentes mecanismos como responsables de la enfermedad. Una de las primeras hipótesis fue que se tratara de una reacción de hipersensibilidad mediada por un complejo inmune tipo III; otros estudios sugirieron la implicación de la vía TH1, de la vía TH2 y, más recientemente, se ha postulado la implicación de la respuesta TH17. Algunos autores también han sugerido que la inmunopatogenia de esta entidad podría explicarse por la acción de diferentes vías inmunológicas, dependiendo de la presentación diferente de la enfermedad.

En la presente tesis se estudia el valor diagnóstico de la prueba de provocación bronquial específica (PPBE) frente al antígeno que se sospecha causal de la entidad y, mediante dos modelos murinos de neumonitis por hipersensibilidad a aves, se analizan los diferentes mecanismos implicados en la NH, tanto aguda como crónica.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA

La prevalencia e incidencia de la NH en la actualidad no se conocen con exactitud por lo que existen gran diversidad de datos según los estudios poblacionales realizados. Esta diversidad de datos se debe probablemente a que la prevalencia e incidencia dependen de factores tales como las condiciones geográficas, la intensidad de la inhalación o a factores propios del huésped^{6,7}. Hay registros europeos de población que informan que la incidencia de NH se encuentra entre 1.5 a 12%^{2,8-10} y otros estiman que la incidencia oscila entre el 18-30% de las enfermedades pulmonares intersticiales difusas¹¹⁻¹³.

La NH parece que presenta mayor incidencia/prevalencia dentro de ciertos grupos ocupacionales/*hobbies* debido a las exposiciones específicas. Así el primer caso descrito de NH fue en 1932 por Campbell¹⁴ que reportó el caso de un granjero que presentó una reacción pulmonar inflamatoria tras exposición a heno enmohecido y se denominó "*Farmer's lung disease*" (enfermedad del pulmón del

granjero, EPG) pero no fue hasta 1962 cuando Pepys et al¹⁵ acuñó el término hipersensibilidad asociado a esta enfermedad describiendo la presencia de una inmunoglobulina G (IgG) específica contra el hongo que colonizaba el heno.

Otra forma de esta enfermedad es la producida por proteínas aviares, el pulmón del cuidador de aves (PCA o su acrónimo en inglés BFL). Descrita por primera vez en 1965 por Reed et al¹⁶, es una de las más frecuentes en nuestro medio¹⁷.

Actualmente se conocen multitud de agentes causales de NH que pueden clasificarse en microorganismos, proteínas animales y agentes inorgánicos^{2,18-19} (tabla 1).

TABLA 1. Materiales y antígenos causantes de neumonitis por hipersensibilidad.

SUSTANCIA	FUENTE	ENFERMEDAD
MICROORGANISMOS		
Hongos/mohos		
<i>Absidia corymbifera</i>	Heno, paja, material vegetal. Humidificadores contaminados.	Pulmón del granjero. Pulmón del humidificador
<i>Acremonium strictum</i>	Serrín, madera mohosa	Pulmón del carpintero
<i>Alternaria alternata</i>	Humidificadores contaminados. Madera, polvo.	Pulmón del humidificador. Pulmón del carpintero.
<i>Aspergillus clavatus</i>	Cebada contaminada	Pulmón trabajador de la malta.
<i>Aspergillus flavus</i>	Heno, paja, plantas mohosas.	Pulmón del granjero
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Heno, compost, setas, malta, tabaco, flores en macetas, invernaderos, paredes/yeso contaminados, muebles tapizados, excrementosa ves, agua contaminada,	NH de interior, PCA, Pulmón del Granjero, Pulmón del compost; Pulmón del productor de setas; Pulmón del trabajador de malta; Pulmón del cultivador de tabaco; Pulmón del trabajador

	corteza alcornoque, vapor agua planchar, cítricos mohosos, astillas madera, salami, pozos.	de estuco; suberosis; Pulmón del panadero; <i>chacinero's lung</i> (polvo seco embutido); espartosis; Pulmón del planchador/a; Pulmon del clasificador residuos; Pulmón del fruticultor.
<i>Aspergillus niger</i>	Hongos ubicuos, casas contaminadas. Humidificadores.	NH de interior. Pulmón del humidificador.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Moho habitaciones.	NH de interior.
<i>Aspergillus oryzae (enzima)</i>	Productos de horneado.	Alveolitis fúngica.
<i>Aspergillus umbrosus</i>	Heno, paja, plantas mohosas	Pulmón del granjero
<i>Aspergillus versicolor</i>	Casas contaminadas	NH de interior.
<i>Aureobasidium spp.</i>	Agua sauna contaminada, polvo secuoya, ventilación doméstica y sistemas de frío, agua plancha vapor, flores maceta invernadero.	Pulmón del usuario de sauna, Pulmón del humidificador, NH de fuente inerior, Pulmón del planchador/a.
<i>Botrytis cinerea</i>	Moho uvas	Pulmón del viticultor
<i>Cephalosporium spp</i>	Sótano contaminado, humidificador contaminado, flores macetas, invernadero.	Pulmón del humidificador, <i>Summer type pneumonitis</i> .
<i>Cladosporium</i>	Moho techo	Alveolitis del moho, NH doméstica, <i>hot-tube lung</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Casas contaminadas	<i>Summer type pneumonitis</i> .
<i>Cryptococcus albidusand</i>	Casas contaminadas	<i>Summer type pneumonitis</i> .
<i>Cryptostroma corticale</i>	Troncos arce contaminados, flores	Pulmón del carpintero, Pulmón del cultivador orquídeas.
<i>Epicoccum nigrum</i>	Moho hogar y lugar de trabajo.	NH de interior.
<i>Eurotium amstelodami</i>	Humidificadores, heno	Pulmón del humidificador,

		Pulmón del agricultor
<i>Exophiala jeanselmei</i>	Moho baños vapor	Pulmón del trabajador sauna.
<i>Fusarium spp.</i>	Moho hogar y trabajo, moho plantas/suelo, instrumentos de viento contaminados	NH de interior.
<i>Fusarium culmorum</i>	Nebulizadores ultrasónicos.	NH de interior
<i>Fusarium solani</i>	Cebollas y patatas	NH del clasificador de cebolla y patata.
<i>Graphium spp</i>	Polvo secuoya, serrín	Secuoyosis, Pulmón del carpintero.
<i>Monocillium</i>	Turba	Pulverizador de turba
<i>Mucor spp</i>	Madera mohosa, humidificadores, serrín	Pulmón del cortador maderal, Pulmón del carpintero, Pulmón del trabajador corcho, Pulmón del humidificador.
<i>Mucor stolonifer</i>	Vainas de paprika (pimentón) mohosas	Pulmón del cortador de paprika
<i>Paecilomyces variottii</i>	Madera descompuesta, moho en madera quemada, moho trabajo/hogar	Pulmón del carpintero, alveolitis de viruta de madera, NH de interior.
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Heno, paja, plantas mohosas, moho en uñas/piel, astillas de madera mohosa.	Pulmón del agricultor, Pulmón del podólogo.
<i>Penicillium camemberti</i>	Queso mohoso	Pulmón del limpiador de queso.
<i>Penicillium casei</i>	Queso mohoso, revestimiento blanco sobre salami, humidificadores.	Pulmón del limpiador de queso, Pulmón del productor salami, Pulmón del humidificador.
<i>Penicillium chrysogenicum</i>	Moho hogar/lugar trabajo.	NH de interior
<i>Penicillium citreonigrum</i>	Turba	Pulverizador de turba
<i>Penicillium cyclopium</i>	Moho hogar/lugar trabajo.	NH de interior
<i>Penicillium expansum</i>	Moho hogar/lugar trabajo.	NH de interior
<i>Penicillium frequentans</i>	Corcho enmohecido,	Pulmón del trabajador corcho,

	revestimiento blanco salami, moldes en apartamentos, agua contaminada	Pulmón del productor salami, <i>summer type pneumonitis</i> .
<i>Penicillium glabrum</i>	Corcho enmohecido	Pulmón del trabajador corcho
<i>Penicillium glaucum</i>	Queso mohoso	Pulmón del limpiador de queso.
<i>Penicillium roqueforti</i>	Queso mohoso	Pulmón del limpiador de queso.
<i>Penicillium verrucosum</i>	Queso mohoso	Pulmón del limpiador de queso.
<i>Penicillium spp</i>	Sótano contaminado, corcho mohoso, moho frutas/verduras.	Pulmón del sótano, suberosis, Pulmón del trabajador de la cebolla, Pulmón del trabajador de la patata, Pulmón del fruticultor.
<i>Peziza domicilliana</i>	Moho hogar/lugar trabajo.	NH de interior
<i>Phoma spp</i>	Moho boquilla instrumentos de viento	
Fitasa (enzima <i>Aspergillus</i> o <i>Trichoderma</i>)	Fitasa en los piensos	NH por fitasa
<i>Poria megalospora</i>	Moho hogar/lugar trabajo.	NH de interior
<i>Rhizopus spp</i>	Madera mohosa, serrín	Pulmón del carpintero, Pulmón de leña
<i>Serpula lacrymans</i>	Madera mohosa.	NH de interior
<i>Sphaeropsidales</i>	AA contaminado	Pulmón del humidificador
<i>Sporobolomyces</i>	Heno, paja	Pulmón del granjero
<i>Sporothrix shenckii</i>	Madera enmohecida, piel animales (sporotricosis)	NH por hongos, Pulmón del humidificador.
<i>Stachybotrys chartarum</i>	Moho casas	NH de interior
<i>Trichoderma coningii</i>	Madera mohosa, plantas, suelo, piel animal (sporotricosis)	Pulmón del carpintero
<i>Trichoderma viride</i>	Humidificadores ultrasónicos, plantas,	Pulmón del humidificador, NH de interior, Alveolitis de la

	jardines, maderas, papel, frutas	viruta de madera, Pulmón del granjero
<i>Ustilago esculenta</i>	Cereal humedecido	NH por hongos, Pulmón del granjero
<i>Wallemia sebi</i>	Heno, paja, plantas	NH por hongos, Pulmón del granjero
Levaduras		
<i>Candida spp</i>	Humidificadores, heno, casas contaminadas, cándida intestino humano, piscinas, boquilla saxofón, hongos uñas	Pulmón del humidificador, Pulmón del agricultor, alveilitis de los pies, alveolitis por cándida.
<i>Geotrichum candidum</i>	Moho en la leche	NH de interior
<i>Rhodotorula rubra</i>	Humidificadores, heno, casas contaminadas	Pulmón del humidificador, NH de interior
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levaduras (panadería, vino)	Pulmón del agricultor, alveolitis polvo de levadura
<i>Saccharomonospora viridis</i>	Hierbas secas, hojas	Pulmón de techo de paja
<i>Saccharospora rectivirgula (M. Faeni)</i>	Heno mohoso, compost, champiñones	Pulmón del granjero, Pulmón del productor de setas.
<i>Torulopsis glabrata</i>	Uñas / piel	Pulmón del podólogo
<i>Trichosporon cutaneum</i>	Casas contaminadas	<i>Summer type pneumonitis</i>
Bacterias		
<i>Acinetobacter spp (iwolffii)</i>	Agua contaminada, líquido de máquina contaminada.	Pulmón del operador de maquinaria
<i>Achromobacter</i>	Humidificadores	Pulmón del humidificador
<i>Alcaligenes</i>	AA contaminado, plantas de tratamiento de aguas residuales	Pulmón del humidificador
<i>Bacillus sp / Bacillus subtilis (subtilisin)</i>	Detergentes, agentes limpieza biológicos.	NH de los trabajadores de detergente
<i>Cryptococcus albidus</i>	Casas contaminadas	<i>Summer type alveolitis</i>
Endotoxina de aerosoles y fuentes de agua de piscinas	Agua contaminada	Pulmón del trabajador de piscinas

<i>Erwinia herbicola</i>	Heno, paja, liquen, plantas enmohecidas	Pulmón del granjero
<i>Klebsiella oxytoca</i>		
<i>Lichtheimia corymbifera</i>		
Micobacteria no tuberculosa (<i>M. immunogenum</i> , <i>M. avium complex</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i>).	Líquidos máquinas contaminados, fluidos de corte, aceites de corte, instrumentos viento, agua contaminada	<i>Hot-tube lung</i> ; alveolitis del hidromasaje, Pulmón del operador máquinas, alveolitis instrumento de viento.
<i>Ochrobacter</i>	Líquidos máquinas contaminados	Pulmón del operador máquinas
<i>Phoma spp.</i>	Instrumentos viento, cortinas ducha mohosas	Alveolitis instrumentos viento, NH de interior.
<i>Pseudomonas spp</i> (<i>fluorescens</i> , <i>aeruginosa</i>)	Líquidos máquinas contaminados, fuentes y humidificadores de interior.	Pulmón del operador máquinas, NH de interior.
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	Agua contaminada planchas vapor	Alveolitis plancha vapor.
<i>Stenotrophomonas spp</i>	Fuentes de interior, humidificadores e instrumentos viento	Alveolitis de interior, alveolitis instrumento viento
<i>Staphylococcus spp.</i>	Agua contaminada	Alveolitis del pulverizador
<i>Streptomyces olivaceus</i>	Techos de paja enmohecidos	Enfermedad techo paja
<i>Streptomyces thermohygroscopicus</i>	Heno, paja	Pulmón del granjero
<i>Thermoactinomyces candidus</i>	Humidificadores	Pulmón del humidificador
<i>Thermoactinomyces dichotomicus</i>	Heno, paja, plantas mohosas, humificadores	Pulmón del granjero
<i>Thermoactinomyces sacchari</i>	Caña azúcar mohosa, heno, paja, plantas mohosas, techo paja	Bagassosis, Pulmón del granjero, enfermedad del techo de paja.
<i>Thermoactinomyces viridis</i>	Humidificadores	Pulmón del humidificador.
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Heno mohoso, caña de	Pulmón del granjero,

	azúcar, compost, hongos, agua contaminada, techo de paja	bagassosis, Pulmón del compost, Pulmón del techo paja, Pulmón del humidificador
<i>Thermophile actinomycetes</i>	Polvo esparto	Espartosis
<i>Ulocladium botrytis</i>	Instrumentos vientos	Alveolitis instrumentos vientos
Mohos/bacterias		
Mohos/bacterias	Saxofones, trombón	NH instrumentos viento
Amebas		
Amebas	Humidificadores y sistemas AA contaminados	Pulmón del humidificador, Pulmón de la fuente de nebulización
Nematodos	Humidificadores y sistemas AA contaminados	Pulmón del humidificador, Pulmón de la fuente de nebulización
Ácaros		
<i>Acarus siro</i>	Queso	
PROTEÍNAS / ENZIMAS		
Proteínas animales		
Polvo piel animal	Pieles animales	Pulmón del peletero
Argan-productos derivados	Cosméticos, ácidos grasos fitosterol	
Excremento aviar, suero, plumas	Canarios, periquitos, palomas, loros...	PCA.
Plumas aviares	Edredones, almohadas, camas, sofás	Pulmón del edredón de plumas (<i>Feather duvet lung</i>)
Murciélagos	Contacto con murciélagos	
Carmín (de <i>Coccus cactus</i>)	Alimentos y cosméticos	Alveolitis del carmín
Leche de vaca	Leche de vaca	Síndrome Heiner
Alimento para peces	Pulga de agua, carne, larva mosquitos	Alveolitis de harina de pescado
Comida de pescado	Pienso	Alveolitis de harina de pescado
Páncreas de cerdo	Alimentación animal	
Proteínas de la pituitaria	Polvo hipofisiario	Rape de hipófisis

Protozoos	AA contaminados	Pulmón del humidificador
Ratas/ratones: orina, suero, pieles	Ratas / ratón	NH por proteínas rata/ratón
Caracol mar, ostra, proteína concha mejillón	Polvo concha	NH por polvo concha
Proteínas gusano seda	Polvo de las larvas y capullo del gusano seda	Pulmón del gusano de seda
Gorgojos (maíz, trigo)(insectos)(<i>Sitophilus spp</i>)	Grano o harina contaminada	Pulmón del gorgojo del maíz
Proteínas vegetales		
Alginato	Algas marinas	
Cathecine	Polvo té verde	
Polvo esparto	Esparto	Espartosis, Pulmón del yesero
Harina grano (trigo, centeno, avena, maíz)	Polvo harina	Alveolitis polvo harina
Malta	Industria procesamiento alimentos	
Legumbres (soja)	Polvo harina soja (legumbres)	Alveolitis de la soja
Pimentón	Polvo de pimentón	Pulmón de los cuarteadores de pimentón (paprika)
Fitasa	Alimentación animal, aditivo alimentación ganado	
Piretro	Insecticida a base de plantas	
Espinacas	Espinacas en polvo	
Chufa	Bebida hochata (España)	Alveolitis de la chufa
Madera	Partículas de madera	Alveolitis fibra de madera
Champiñones comestibles		
Setas (Shiitake, bunashimeji, pleurotus, phiotita, shimeji, agaricus)	Setas (Shiitake, bunashimeji, pleurotus, phiotita, shimeji, agaricus)	Setas (Shiitake, bunashimeji, pleurotus, phiotita, shimeji, agaricus)
Lyophyllum		

AGENTES INORGÁNICOS		
Productos químicos		
Ácido anhídrido (<i>Pyromellitic & trimellitic anhydrides</i>)	Espumas poliuretano, pinturas aerosol, colas, adhesivos, colchones, partes automóviles, zapatos, imitación cuero...	Alveolitis del Ácido anhídrido
Metacrilato	Materiales dentales, laca, resina, colas	Alveolitis metacrilato
Sulfato de cobre	Sulfato de cobre, mezcla de burdeos	Pulverizador viñado
Tricloroetileno	Agentes desengrasantes, de limpieza, desincrustantes	Alveolitis química
Ftalato de dimetilo, estileno	Disolventes industriales, plastificantes	
HFC-134a (<i>Tetrafluoroethane</i>)	Líquido refrigerante en dispositivos de depilación láser	Pulmón del esteticien
Isocianatos	Espumas poliuretano, pinturas aerosol, colas, adhesivos, colchones, partes automóviles, zapatos, imitación cuero...	NH por isocianato.
<i>Tetrachlorophthalic</i> y ácido hexahidroftálico	Endurecedor resinas epoxi	Alveolitis del Ácido anhídrido
<i>Sodium diazobenzene sulfate</i>	Reactivo de laboratorio, cromatografía	Alveolitis química
<i>Triglycidyl isocyanurate</i>	Pinturas en polvo, polvo de piliéster	Pulmón del pintor
Agentes farmacéuticos		
Penicilinas, cefalosporinas	Industria farmacéutica	
Metrotexato, α -interferón, lenalidomida, pravastatina, venlafaxina, temozolónida	Agentes inmunomoduladores, agentes reductores del	NH inducida por drogas

	colesterol, antidepresivos, antineoplásicos, alquilantes	
Metales		
Cobalto	Aleaciones de metales duros	
Zinc (tungsteno y aleaciones)	Vapores de zinc	Alveolitis del zinc
Circonio	Circonio	Alveolitis del circonio
Berilio	Baterías, computadoras, neones	NH por berilio

1.2.1. MICROORGANISMOS

Se han descrito como causantes de NH bacterias (bacterias y micobacterias), hongos y amebas.

Bacterias: Los actinomicetos termófilos (*Thermophilic actinomycetes*) son bacterias filamentosas que se asocian con frecuencia con la causa más conocida de NH (EPG). Esta bacteria se encuentra ubicuamente en el ambiente, especialmente en áreas húmedas con temperaturas de entre 50-55°C, lo que les permite secretar enzimas que conducen al crecimiento de moho en diversas plantas como el heno²⁰. También colonizan con frecuencia tuberías de ventilación o sistemas de humidificación, que proporcionan las condiciones ideales para su proliferación²⁰⁻²² (figura 1).

Las micobacterias atípicas también se han descrito como inductores de NH. Una de las NH más frecuentes por micobacterias es la “*metalworking fluids HP*” que se debe a la contaminación de los circuitos de fluidos que se utilizan para enfriar las máquinas de fresado de metales a nivel industrial.

Se han descrito otras bacterias que también pueden causar NH como *Achromobacter* sp., *Bacillus subtilis*, *Klebsiella oxytoca* o *Pseudomonas* spp.



FIGURA 1. *Bacillus subtilis*

Hongos: Muchas especies de hongos se han asociado como productores de NH. Los más frecuentes, *Aspergillus* sp (figura 2) y *Penicillium* sp, se han descrito como agentes causales de varias formas de esta enfermedad como el pulmón del granjero, la espartosis o la suberosis entre otras^{17,23}. Otras especies descritas son *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum* o *Mucor* spp.

Amebas: Las amebas son protozoos caracterizados por su forma cambiante y por su movimiento ameboide a base de pseudópodos. Las especies de este género viven libres en el agua o en la tierra. En la literatura se encuentran pocos trabajos en los que se describen estos microorganismos como posibles causantes de NH, sin existir datos que lo confirmen. Los trabajos que proponen las amebas como posibles agentes son de los años 70 y todos en el marco de agua contaminada (aires, humidificadores)²⁴⁻²⁶.

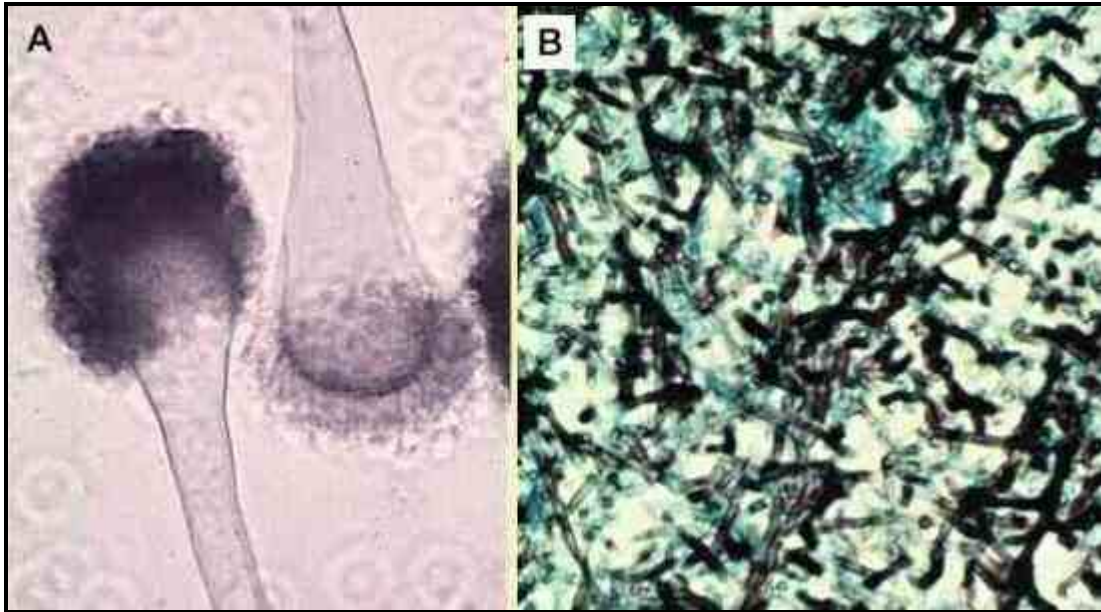


FIGURA 2. *Aspergillus fumigatus*. (A) Esporas típicas del hongo en muestra de laboratorio. (B) Sección microscópica del tejido pulmonar, teñida para mostrar hifas de *A. fumigatus* en un alveolo.

1.2.2. PROTEÍNAS ANIMALES

Las más descritas y frecuentes son las aviarias, causantes del PCA; éstas son proteínas de alto peso molecular contenidas en suero, excrementos y en el *bloom* (polvo que recubre las plumas) (figura 3).

1.2.3. AGENTES INORGÁNICOS

Generalmente usados en la industria tales como isocianatos, utilizados en la producción de polímeros de poliuretano y posteriormente en la fabricación de adhesivos, pinturas y pegamentos, o las resinas epoxi²⁷⁻²⁸ (figura 4).



FIGURA 3. Palomar.



FIGURA 4. Diferentes presentaciones de isocianatos.

1.3. FORMAS CLÍNICAS

Históricamente la NH se había clasificado en tres formas clínicas: aguda, subaguda y crónica. La forma aguda se describía como aquella que se presentaba a las pocas horas de una inhalación intensa (2-9h) en forma de malestar general, astenia, fatiga, mialgias, fiebre, disnea, opresión torácica y tos

seca, con desaparición de los síntomas a las 24-48h tras el cese de la exposición. La forma subaguda era aquella que se presentaba tras una exposición menos intensa pero continua al antígeno (semanas, meses) con febrícula, anorexia, pérdida de peso, tos con expectoración mucosa y disnea. Por último, se consideraba una forma crónica de NH causada como consecuencia de una exposición antigénica poco intensa pero mantenida en el tiempo o bien como evolución de una forma aguda/subaguda (episodios recurrentes de NH aguda o subaguda no diagnosticadas). La presentación clínica de esta forma suele ser insidioso con intolerancia progresiva al esfuerzo, disnea, tos seca y pérdida ponderal. La diferencia en estos casos con una fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es compleja¹.

Esta clasificación clásica progresivamente se ha ido abandonando dado que la distinción entre las diferentes formas a veces no es posible y a la duda **de que se trate de diferentes estadios de la enfermedad y no de diferentes formas de presentación**. Por este motivo, recientemente han aparecido nuevas propuestas para clasificar la enfermedad. Una de estas propuestas es la descrita por Lacasse et al²⁹ que divide la enfermedad en clusters: cluster 1 compuesto por pacientes con síntomas sistémicos recurrentes y estudio radiológico normal y cluster 2 compuesto por pacientes con mayor afectación orgánica (acropaquias, hipoxemia) y alteración en las exploraciones complementarias (trastorno restrictivo en las pruebas de función respiratoria, fibrosis en el TCAR) (tabla 2).

Otra clasificación de nueva aparición es la realizada por Vasacova et al³⁰ donde consideran únicamente una forma aguda y crónica a partir de hallazgos clínicos, radiológicos y anatomo-patológicos (tabla 3).

TABLA 2. Clasificación de la NH. Clusters (adaptado de Lacasse et al²⁹)

	CLUSTER 1	CLUSTER 2
SÍNTOMAS	Recurrentes	Persistentes
EXPLORACIONES	Normales	Alteradas
PRONÓSTICO	Favorable	Desfavorable

TABLA 3. Nueva clasificación de NH. Modificada de Vasacova et al³⁰.

	CLÍNICA	PATRÓN RADIOLÓGICO TCAR	PATRÓN HISTOLÓGICO
NH Aguda Duración de los síntomas <6 meses	Reversible. Síntomas relacionados con la exposición al agente causal pueden resolverse completamente después de la evitación antigénica.	Patrón micronodular centrilobular difuso y opacidades en vidrio deslustrado de predominio en lóbulos superiores y medios; nódulos centrolobulares mal definidos; patrón en mosaico, atrapamiento aéreo o, raramente, consolidación.	NH inflamatoria (celular): infiltrado linfoplasmocítico/mononuclear (macrófagos); infiltrado linfocítico centrado en vía aérea/peribronquiolar; granulomas poco formados; células gigantes multinucleadas; NINE-celular like.
NH Crónica Duración de los síntomas ≥6 meses	Potencialmente reversible. Riesgo de progresión.	Fibrosis de predominio en lóbulos superiores y medios, fibrosis peribroncovascular, panalización, mosaico, atrapamiento aéreo, nódulos centrolobulares y relativa preservación de bases.	NH fibrótica: NIU-like; NINE- fibrótica like; fibrosis centrada en vía aérea; inclasificable; signos de NH inflamatoria pueden presentarse sobre una base fibrótica.

NH: neumonitis por hipersensibilidad; TCAR: tomografía computerizada de alta resolución; NINE: neumonía intersticial no específica; NIU: neumonía intersticial usual.

1.4. FISIOPATOLOGÍA

La fisiopatología de la NH actualmente no se conoce con exactitud. En este sentido, se han descrito diferentes mecanismos inmunopatológicos como posibles causantes de la enfermedad mediante estudios clínicos y experimentales.

1.4.1. ESTUDIOS CLÍNICOS

Pepys et al¹⁵ describieron por primera vez en 1962 la reacción inflamatoria de la NH como consecuencia a la presencia de precipitinas circulantes frente a antígenos causales de la enfermedad, en los pacientes previamente sensibilizados. Esto sugería la posibilidad de un mecanismo de hipersensibilidad tipo III con depósitos de inmunocomplejos en las paredes alveolares. Sin embargo, la ausencia de hallazgos compatibles con vasculitis y de infiltrado inflamatorio neutrofílico^{15,31-32} así como la ausencia de IgG específicas en pacientes con NH³³ hizo que se cuestionara dicho mecanismo como causante de la enfermedad. Posteriormente se postuló la posibilidad de que la inmunidad celular tuviera un rol importante en la fisiopatología de esta entidad mediante una reacción de hipersensibilidad tipo IV; a favor de dicho mecanismo se encuentra el hallazgo de un infiltrado inflamatorio mononuclear (linfocitos T y macrófagos) alveolar e intersticial y granulomas no necrotizantes en el estudio anatómico-patológico pulmonar³⁴⁻³⁶ (figura 5).

Dada la similitud de la clínica que presentaban algunos pacientes con NH tras la exposición al antígeno con el asma, en los que se observaba una reacción rápida a la exposición con broncoconstricción, Pforte et al³⁷ estudiaron el rol que podía tener la inmunoglobulina E (IgE) en la inmunopatogénesis de la NH. Si bien encontraron que pacientes con NH presentaban receptores para la IgE en los macrófagos alveolares (MA) no se pudo demostrar si se trataba de un epifenómeno o de un mecanismo fisiopatológico en si de la enfermedad.

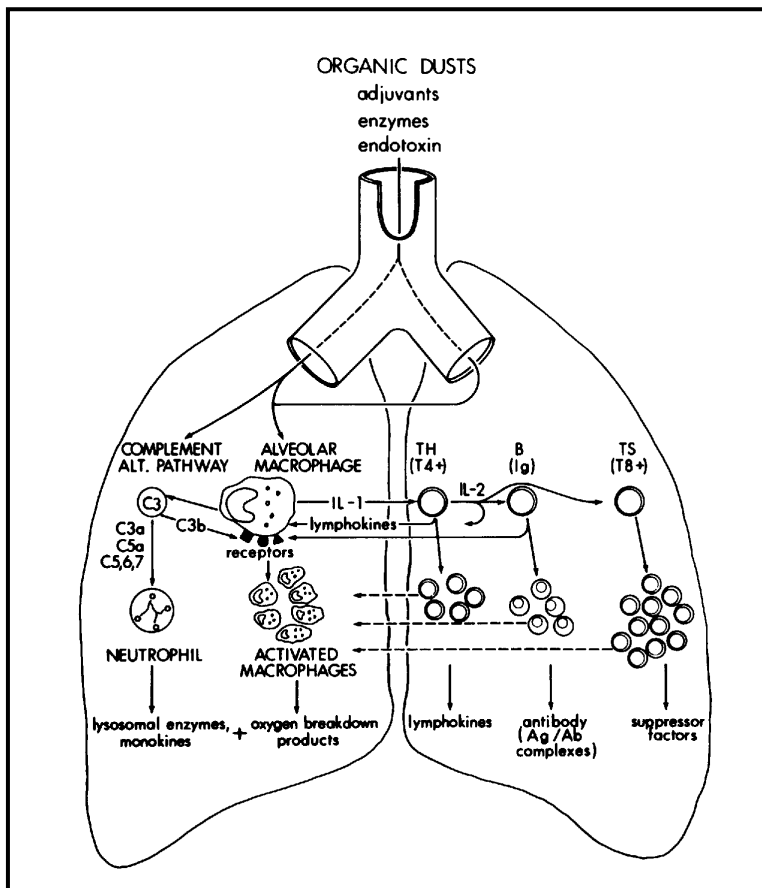


FIGURA 5. Hipótesis de mecanismo NH tipo inmunidad retardada IV. Modificada de Salvaggio et al³¹.

También se ha implicado como mecanismo productor de NH la vía TH1 mediada principalmente por la interleuquina (IL)-12, la cual se produce por el macrófago activado, aunque existen otras interleuquinas implicadas como la IL-8 o el factor de necrosis tumoral α (TNF α)³⁸⁻⁴⁰. Diferentes estudios han analizado la influencia de esta vía en la patogénesis de la enfermedad, dando como resultado la interacción de múltiples factores:

1) Se ha estudiado la implicación de los MA (TH1) en la fisiopatología de la NH observándose que existen diferentes subpoblaciones de MA y según la que predomine favorece la producción o no de la enfermedad^{32,41-43}. Más concretamente Chelen et al⁴¹ observaron que la presencia de NH se relacionaba con una molécula de superficie de los macrófagos llamada B7. En el mismo

sentido Dakhama et al⁴² observaron la misma relación con la conclusión que una sobreexpresión de B7 favorecía el desarrollo de NH.

2) Se han implicado diferentes citoquinas de la vía TH1 en la NH. Los linfocitos TH1 producirían interferón γ (INF γ) que activaría los macrófagos y favorecería la diferenciación de células T citotóxicas. Diversos estudios de biopsias pulmonares de pacientes con NH han identificado la activación de quimiocinas CXCL9 y CXCL10, las cuales activan el ligando de INF γ y CXCR3, receptores de quimiocinas TH1 lo que apoyaría la hipótesis de una respuesta TH1 como responsable de la patogénesis de esta enfermedad⁴⁴⁻⁴⁵.

3) Así como hay estudios que relacionan la presencia de algunas interleuquinas/receptores con el desarrollo de NH, también los hay que evidencian que la disminución de algunas de las citadas moléculas tendrían un efecto protector; así Dai et al⁴⁶ observaron que la presencia de receptores TNF α solubles era menor en personas sanas que en pacientes con NH.

La respuesta TH2 también se ha propuesto como mecanismo fisiopatológico de la enfermedad. En este sentido, se ha descrito el hallazgo de quimiocinas TH2 (TARC) y sus receptores (CXCR3 y CCR4) en muestras histológicas de pacientes con PCA crónica^{45,47}. La evidencia de fibrocitos circulantes en pacientes con NH respecto a sujetos sanos, a través de CXCR4/CXCL12⁴⁸ también apoyaría la implicación del mecanismo TH2 en esta enfermedad.

La tercera vía implicada en la NH es la TH17. Esta vía se ha relacionado con la gravedad de la enfermedad, dado que la IL-17 promueve la inflamación y el consecuente desarrollo de fibrosis⁴⁹⁻⁵¹. Selman M et al^{44,49} observaron una sobreexpresión del receptor de IL-17 en pacientes con NH, además propusieron que el incremento de células TH17 podía promover el depósito de colágeno pulmonar en respuesta a una exposición crónica al antígeno causal. Lacasse et al⁵⁰ también relacionaron las células TH17, a través de sus citoquinas, con la presencia de una mayor inflamación (figura 6).

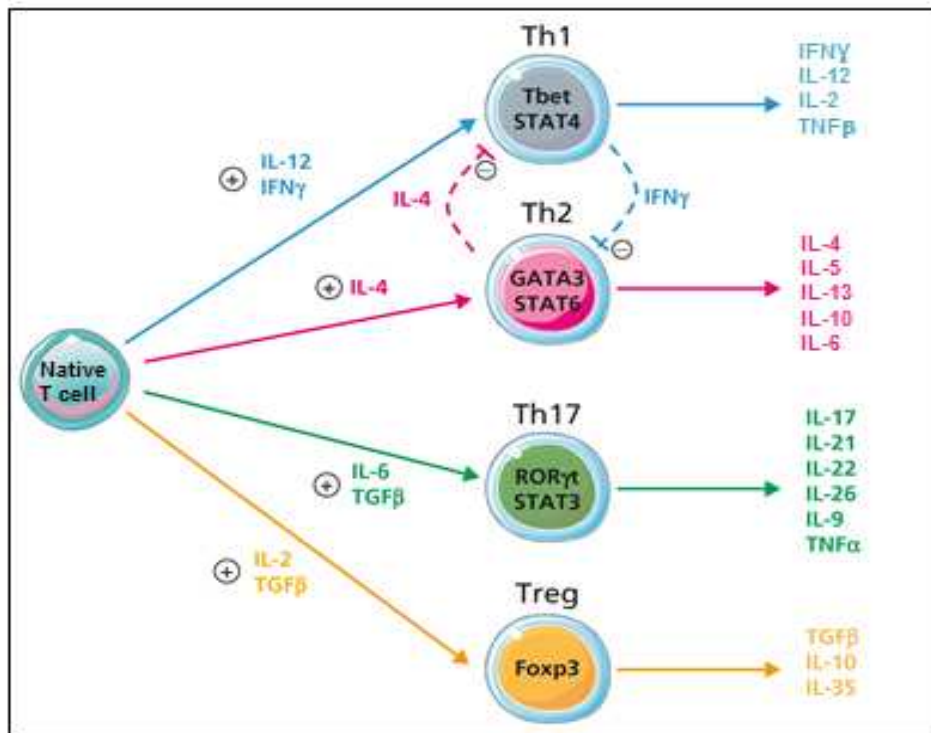


FIGURA 6. Esquema de diferenciación de las células T, principales factores de transcripción y citoquinas.

Otros estudios, han identificado células *natural killer* (NK) en el LBA de pacientes con NH, las cuales secretan IL-4 e IFNγ que serían responsables de modular el balance TH1/TH2⁵².

Finalmente, algunos autores han sugerido que la inmunopatogenia de esta entidad podría explicarse por la acción de diferentes vías inmunológicas dependiendo de las diferentes formas de presentación de la enfermedad^{47,49,51,53}. En este sentido se ha sugerido que la NH aguda podría estar mediada por inmunocomplejos, la NH subaguda por un mecanismo TH1 y la crónica por un mecanismo TH2⁴⁹. Así mismo, también se ha sugerido que la susceptibilidad individual a desarrollar la enfermedad puede depender de factores genéticos. Diferentes polimorfismos genéticos del complejo HLA han sido asociados con el desarrollo de la NH⁵⁰⁻⁵¹. Polimorfismos en el inhibidor tisular de la metaloproteína 3 han demostrado conferir resistencia al desarrollo de NH⁵⁴⁻⁵⁵.

1.4.2. ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Los principales estudios experimentales con modelos animales dirigidos a estudiar la inmunopatogénesis de la NH son modelos agudos y como agente causal la mayoría utilizan la *S. rectivirgula*. Muchos de estos estudios muestran hallazgos parecidos a los estudios clínicos y, por tanto, se puede asumir que son extrapolables (tabla 4).

TABLA 4. Resumen estudios experimentales de NH

TIPO NH	CEPA MURINA*	AGENTE	MÉTODO ¹	CONCLUSIONES	ESTUDIO (REF.)
NH aguda	C57Bl/6	<i>S. rectivirgula</i>	Instilación intranasal, 3 días/semana durante 3 semanas.	Células T implicadas en la patogénesis de la NH	56, 57, 58
NH aguda	C57Bl/6	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Instilación intranasal, 3 días/semana durante 3 semanas.	Células T implicadas en la patogénesis de la NH	59
NH aguda	C57Bl/6	<i>S. rectivirgula</i>	Instilación intranasal, 3 días/semana durante 3 semanas.	TH1 implicada en la NH. La IL-12 (TH1) estimula producción de IFN γ que favorece la NH.	60
NH aguda	C57Bl/6	<i>S. rectivirgula</i>	Instilación intranasal, 3 días/semana durante 3 semanas.	TH1 = HP sensibles y TH2 = HP resistentes.	61 ^Δ , 62 [■]
NH aguda	C57Bl/6j	<i>S. rectivirgula</i> , endotoxina,	Instilación intranasal, 3 días/semana durante 3	Micobacterias y endotoxinas de éstas	63

		MWF con y sin endotoxina, MI, MWF con MI, MWF con MI + endotoxina, MFW usado.	semanas.	que contaminan el MWF producen NH.	
NH aguda	C57Bl/6	<i>S. reactiva</i>	Instilación orofaríngea, 3 días/semana durante 3 semanas.	TH17 implicada en la NH (cronicidad)	64
NH aguda	C57Bl/6 (transgénicos)	<i>Bacillus subtilis</i>	Instilación orofaríngea, 3 días/semana durante 4 semanas.	IL-17 protege contra la NH	65, 66
NH aguda	C57Bl/6 (transgénicos)	<i>S. reactiva</i>	Instilación intranasal, 3 días/semana durante 3 semanas.	Disminución IL-17A disminuye gravedad NH.	67
NH aguda	C57Bl/6 (transgénicos)	<i>S. reactiva</i>	Instilación intranasal, 3 días/semana durante 3 semanas.	T-bet regula IFN γ e IL-17; protector NH por inhibición IL-17	68
NH aguda	C57Bl/6	MAI	2 protocolos: a) instilación intranasal 2 días/semana durante 1 semana. b) instilación intranasal 3 días/semana durante 3 semanas.	TLR9-MyD88 de las células dendríticas contribuye en la patogénesis de la NH.	69
NH aguda	BALB/c (transgénicos)	<i>Stachybotrys chartarum</i> (SC)	Inyección intraperitoneal los días -14 y -7; instilación intranasal los días -5 y -3; instilación intratraqueal día 0; necropsia día 2 y 5.	SC es un potencial causante de NH que depende de las citoquinas TH1. TLR9 necesario para la respuesta granulomatosa.	70

NH aguda	C57Bl/6	<i>S. rectivirgula</i>	Instilación intranasal, 3 días/semana durante 3 semanas.	TLR2 rol importante en la patogénesis NH. Posible cooperación entre TLR2 y TLR9 en el desarrollo NH.	71
NH aguda	C57Bl/6 (transgénicos)	<i>S. rectivirgula</i>	Instilación intranasal, 3 días/semana durante 3 semanas.	Importancia células dendríticas en la patogénesis NH	72 [¶] , 73 [¶]
NH crónica	C57Bl/6 (transgénicos)	<i>S. rectivirgula</i>	Instilación intranasal, 3 días/semana durante 12 semanas.	IL-17 esencial para el desarrollo de inflamación y fibrosis.	74
NH crónica	C57Bl/6	Extracto de paloma (PDE)	Inyección intraperitoneal de PDE en los días -3 y -1; instilación intranasal, 3 días/semana durante 6-12 semanas.	Balance TH1/TH2 hacia TH2 es importante para establecer fibrosis en un modelo de NH crónica.	75

*En los estudios comparativos utilizan DBA/2 y, en alguno aislado, BALB/c y A/J. ¹Todos los estudios instilan entre 20-50µg de solución. ⁴Diferencias en la estabilidad del mRNA de la IL-4 hace que haya sensibilidad o resistencia al desarrollo de NH. [¶]Sobreexpresión GATA3 (factor transcripción TH2) protege contra el desarrollo de NH [¶] Expresión de CD34 por las células dendríticas es esencial para la respuesta específica de las células T al antígeno. [¶] Expresión de CD103 por las células dendríticas es crucial para la regulación de la respuesta inflamatoria TH17 en NH. ABREVIATURAS: REF=Referencia; NH=Neumonitis por Hipersensibilidad; MWF= MetalWorking Fluid; MI = Mycobacterium immunogenes; MAI = Mycobacterium avium; TLR= toll-like receptor; PDE acrónimo en inglés de "pigeon dropping extracts".

La mayoría de los estudios experimentales analizan la implicación de las vías TH1, TH2 y TH17 a través del análisis de citoquinas y otros factores como los TLR (acrónimo inglés de *toll like receptors*). En este sentido, hay estudios que sugieren la implicación de la TH1 en la NH dado que se ha observado que la cepa murina C57Bl/6, con expresión de citoquinas de la vía TH1, es más propensa a desarrollar NH (“NH sensible”) en comparación a otras cepas que expresan factores de la TH2 como la DBA2 (“NH resistentes”)⁶⁰. Otros estudios sugieren que la diferente regulación de algunas moléculas puede favorecer un balance hacia TH1 o TH2; así Butler et al⁶¹ observaron que la IL-4 (TH2) está regulada de forma diferente en las cepas sensibles a desarrollar NH y en las resistentes. Matsuno et al⁶² evidenciaron que la sobreexpresión del factor de transcripción GATA3 (TH2) actuaba como factor protector contra la NH. Por el contrario, Ben-Sasson et al⁷⁶ observaron que la IL-1 (TH2) activa la diferenciación de los CD4 a TH17 produciendo un aumento de IL-17 y de la consecuente inflamación. Por último, los estudios experimentales más recientes se basan en analizar la importancia de la respuesta TH17 en la NH^{64,67,74}. Algunos estudios han observado que el aumento de IL-17A produce activación y expansión de neutrófilos y fibrosis en la histología de las muestras; otros estudios evidencian la ausencia de NH con la inhibición de dicha interleucina^{64,74}. También se ha estudiado el efecto de algunos TLR⁶⁹⁻⁷¹ como por ejemplo el TLR6, cuya inhibición produce una disminución de IL-17A y por tanto de la gravedad de la enfermedad⁶⁷.

En general, la implicación de células T independientemente de la vía, se ha observado en prácticamente todos los estudios⁵⁷⁻⁵⁹. Más concretamente Israel-Assayag et al⁵⁸ observaron que al inhibir la activación de las células T mediante inhibición del CTLA4 disminuía la inflamación pulmonar en el grupo NH.

Ante el desconocimiento de la fisiopatología exacta de la NH, los modelos animales podrían ser esenciales para el estudio de los diferentes mecanismos implicados en la enfermedad, pero la mayoría de estos modelos utilizados en el estudio de la enfermedad se basan en la NH aguda y utilizan como agente causal la *S. rectivirgula*. Dado que en nuestro medio una de las NH más frecuentes es el PCA y en la literatura únicamente existe un modelo animal de PCA crónico, uno

de los objetivos de la presente tesis fue diseñar dos modelos animales de PCA, uno agudo y otro crónico, para analizar las vías implicadas en la inmunopatogenia de la enfermedad y **evaluar, tal como ya se ha postulado en el apartado de formas clínicas, si realmente existen diferentes formas de presentación o se trata de diferentes estadios de la enfermedad.**

1.5. DIAGNÓSTICO

1.5.1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Actualmente no existen unos criterios diagnósticos de NH validados, por lo que el diagnóstico se basa en diferentes aspectos: una alta sospecha clínica donde una anamnesis exhaustiva es esencial, demostración de un antígeno responsable mediante un historia exposicional detallada y/o la positividad de las inmunoglobulinas en suero del paciente y por último en una combinación de técnicas citológicas, radiológicas, histológicas y de función pulmonar.

Diferentes autores han propuesto tablas o algoritmos para facilitar el diagnóstico de esta entidad, aunque no están incluidos dentro de ninguna guía por la falta de estandarización/validez. Unos de los primeros criterios diagnósticos de NH fueron los propuestos por Schuyler and Cormier⁷⁷ en 1997. Estos autores describieron una serie de criterios mayores y menores, estableciendo que para el diagnóstico de NH era preciso presentar al menos 4 criterios mayores y 2 menores (tabla 5).

En el año 2004, Selman et al¹ realizaron una descripción de una serie de criterios diagnósticos haciendo una diferenciación según la forma clínica de presentación (tabla 6).

Más recientemente, presentado en un consenso internacional, Varsakova et al³⁰ (2017) propusieron un algoritmo diagnóstico basado en el uso de técnicas inmunológicas y radiológicas así como la realización de la PPBE si bien ésta no está incluida en el algoritmo. La realización de la PPBE la recomiendan en aquellos pacientes en los que el estudio anatómico-patológico (AP) no es factible o bien cuando éste no es diagnóstico y para la confirmación del agente etiológico (figura 7).

Finalmente, en el año 2018 J. Morisset et al⁷⁸ desarrollaron un algoritmo diagnóstico para NH crónica basado en el consenso de expertos, utilizando el método Delphi modificado (figura 8).

TABLA 5. Criterios diagnósticos NH de Schuyler and Cormier⁷⁷.

CRITERIOS MAYORES
<ol style="list-style-type: none"> 1. Síntomas compatibles con NH 2. Evidencia de exposición antigénica apropiada a través historia clínica y/o detección precipitinas específicas en suero y/o lavado broncoalveolar. 3. Hallazgos compatibles con NH en radiología simple tórax o TCAR torácico. 4. Linfocitosis en LBA. 5. Cambios histológicos compatibles con NH. 6. Prueba inhalación específica positiva (reproducción sintomatología y alteraciones laboratorio tras exposición, ambiental o en laboratorio, al antígeno sospechoso).
CRITERIOS MENORES
<ol style="list-style-type: none"> 1. Crepitantes bibasales 2. Disminución capacidad de transferencia del CO. 3. Hipoxemia arterial, al menos tras ejercicio.

Abreviaturas: NH: neumonitis por hipersensibilidad; TCAR: tomografía computerizada de alta resolución; LBA: lavado broncoalveolar; CO: monóxido de carbono.

TABLA 6. Criterios diagnósticos de NH por formas clínicas de Selman et al¹.

CRITERIOS NH AGUDA
<ol style="list-style-type: none"> 1. Evidencia de exposición, documentada por historia clínica y anticuerpos específicos (cuando existe disponibilidad de test). 2. Síndrome pseudogripal. 3. Incremento de linfocitos y neutrófilos en LBA. 4. Parcial pero significativa mejoría tras apartar al paciente de la exposición ambiental sospechosa y empeoramiento de los síntomas tras la re-exposición.
CRITERIOS NH SUBAGUDA
<ol style="list-style-type: none"> 1. Evidencia de exposición con una relación causa-efecto y determinación de precipitinas positivas frente al antígeno causal. 2. Linfocitosis en el LBA (generalmente > 50%). 3. Patrón micronodular difuso con atrapamiento aéreo y vidrio deslustrado en el TCAR.
CRITERIOS NH CRÓNICA (asociados a los criterios de NH subaguda)
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prueba de inalación específica (ambiental o en laboratorio) al antígeno sospechoso. 2. Biopsia pulmonar.

Independientemente de estos criterios diagnósticos, Lacasse et al¹² en un estudio multicéntrico en el año 2003 analizaron la significancia estadística de una serie de síntomas y signos clínicos, valores de laboratorio, estudio funcional y radiológico en pacientes con NH comparado con sujetos sanos, con el fin de encontrar una serie de predictores (tabla 7) que permitieran calcular la probabilidad de presentar NH (tabla 8).

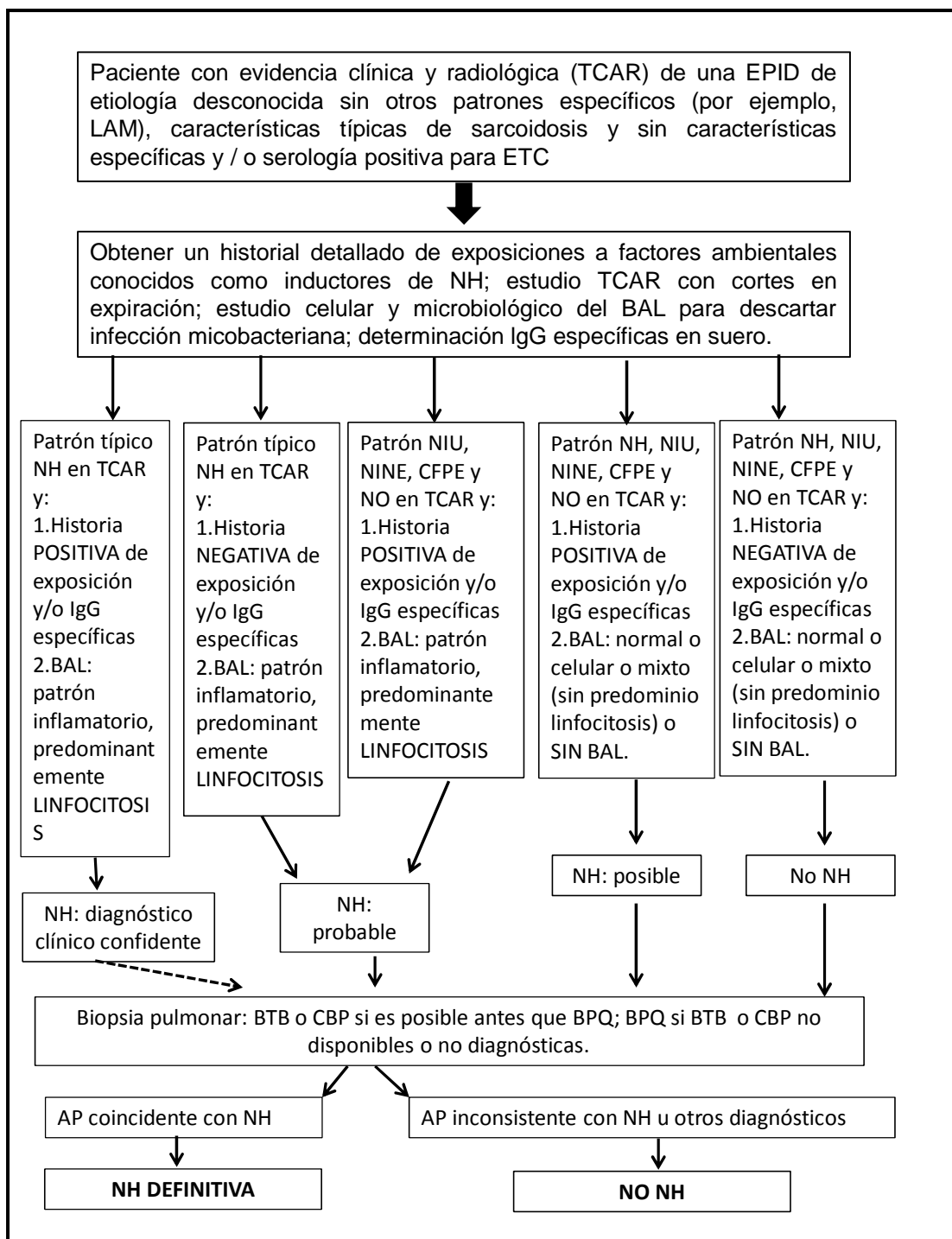


FIGURA 7. Algoritmo diagnóstico para Neumonitis por Hipersensibilidad. Modificado de Vasakova et al³⁰. Abreviaturas: TCAR: Tomografía computerizada de alta resolución; EPID: enfermedad pulmonar intersticial difusa; LAM: linfangioleiomiomatosis; ETC: enfermedad del tejido conectivo; NH: neumonitis por hipersensibilidad; BAL: lavado broncoalveolar; IgG: inmunoglobulina G; NIU: neumonía intersticial usual; NINE: neumonía intersticial no específica; CFPE: complejo fibrosis pulmonar-enfisema; NO: neumonía organizada; BTB: biopsia transbronquial; CBP: criobiopsia pulmonar; BPQ: biopsia pulmonar quirúrgica; AP: anatomía patológica.

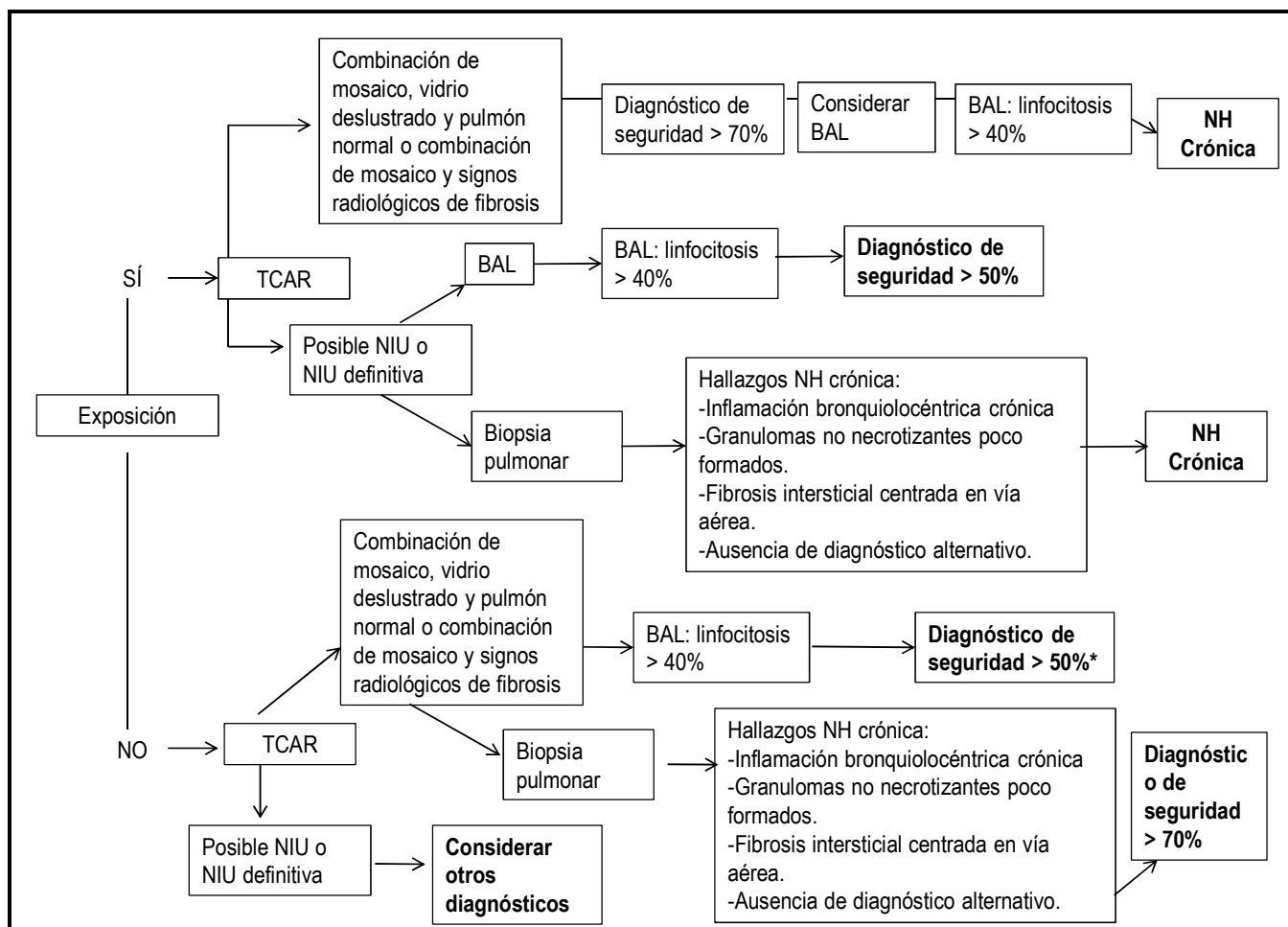


FIGURA 8. Algoritmo diagnóstico para NH crónica. Modificado de Morisset et al⁷⁸. Abreviaturas: TCAR: tomografía computerizada de alta resolución; BAL: lavado broncoalveolar; NH: neumonitis por hipersensibilidad; NIU: neumonía intersticial usual.

TABLA 7. Predictores clínicos significativos de NH de Lacasse et al¹².

VARIABLES	OR	IC 95%
1. Exposición a agente causal conocido	38.8	11.6-129.6
2. Presencia de precipitinas séricas específicas.	5.3	2.7-10.4
3. Episodios recurrentes de síntomas	3.3	1.5-7.5
4. Crepitantes inspiratorios	4.5	1.8-11.7
5. Síntomas tras 4-8h de la exposición.	7.2	1.8-28.6
6. Pérdida ponderal.	2.0	1.8-28.6

TABLA 8. Probabilidad de presentar NH utilizando los predictores de Lacasse et al¹².

				Crepitantes, %			
				+		-	
				Precipitinas séricas		Precipitinas séricas	
Exposición antígeno conocido	Episodios sintomáticos recurrentes	Síntomas a las 4-8h post-exposición	Pérdida de peso	+	-	+	-
+	+	+	+	98	92	93	72
+	+	+	-	97	85	87	56
+	+	-	+	90	62	66	57
+	+	-	-	81	45	49	15
+	-	+	+	95	78	81	44
+	-	+	-	90	64	68	28
+	-	-	+	73	33	37	10
+	-	-	-	57	20	22	5
-	+	+	+	62	23	26	6
-	+	+	-	45	13	15	3
-	+	-	+	18	4	5	1
-	+	-	-	10	2	2	0
-	-	+	+	33	8	10	2
-	-	+	-	20	4	5	1
-	-	-	+	6	1	1	0
-	-	-	-	3	1	1	0

* Los símbolos "+" indica presencia y "-" ausencia. Los números la probabilidad de presentar NH en %.

1.5.2. TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

a) Inmunológicas (IgG)

La determinación de IgG específicas, con técnicas cualitativas (precipitinas, inmunolectroforesis) o cuantitativas (ELISA) (figura 9), InmunoCap, Immulite), se considera un marcador de exposición y sensibilización, no un método diagnóstico *per se*⁷⁹. En este sentido, existen trabajos en los que se ha demostrado positividad de IgG específicas en pacientes expuestos pero sanos⁸⁰⁻⁸¹ y, por el contrario, la presencia de IgG negativas tampoco descarta el diagnóstico de NH dado que hasta en un 10-15% de los casos las IgG pueden resultar negativas a los antígenos testados⁸¹⁻⁸². Esta técnica se ve influenciada por diferentes factores limitantes:

- 1) La falta de preparaciones antigénicas validadas para la mayoría de los agentes causales de NH⁸³. La gran diversidad de antígenos causales de la enfermedad dificulta validar paneles antigénicos completos⁷, además de la reactividad antigénica cruzada existente entre diferentes hongos y especies de aves⁸³.
- 2) Como sugieren algunos trabajos, la determinación de IgG depende del tiempo transcurrido desde la última exposición⁸⁴, así Braun et al⁸⁵ por ejemplo observaron que en la enfermedad del pulmón del granjero las IgG específicas al agente causal se determinaban en un 75-100% de los casos durante un episodio agudo pero sólo en un 50% a los 2 años de dicho episodio. Dada la relación con el tiempo, en las NH crónicas se pueden observar falsos negativos de esta técnica⁴⁹.
- 3) los factores genéticos también influyen en dicha determinación dado que hay sujetos enfermos que nunca presentaron datos de sensibilización (IgG negativas) y otros en cambio, como se ha mencionado, presentaron IgG específicas positivas pero no neumonitis por hipersensibilidad⁸⁰⁻⁸¹.
- 4) por último se ve limitada por la técnica en sí, dado que los resultados difieren considerablemente según la técnica utilizada de detección (cualitativa o cuantitativa)⁸³.

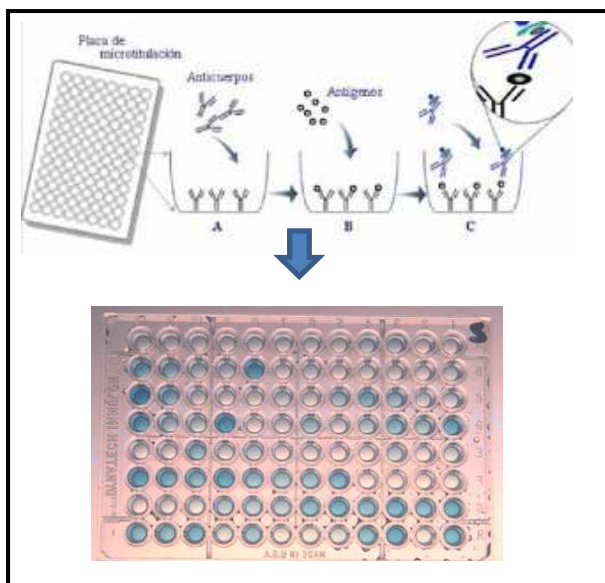


FIGURA 9. Técnica de ELISA directo.

b) Radiológicas

El estudio radiológico convencional (Radiografía simple) puede ser de utilidad en la evaluación de la NH, pero no existen hallazgos específicos y, además, pacientes con NH pueden presentar una radiografía normal^{49,86}. Aun así, hay hallazgos sugestivos de NH como puede ser un patrón micronodular, opacidades reticulares o un patrón reticular (figura 10). En cambio, la tomografía computarizada (TC) y la TCAR proporcionan una mejor calidad y una estimación más precisa del patrón, la extensión, y la distribución de la enfermedad⁴⁹.

Los hallazgos característicos en la TCAR se pueden dividir según la forma clínica. Característicamente en la NH aguda se encuentran infiltrados pulmonares parcheados y difusos en vidrio deslustrado. En las formas subagudas es frecuente evidenciar infiltrado nodulillar (pequeños nódulos centrolobulillares mal definidos <5mm de diámetro) o reticulonodulillar acompañados de vidrio deslustrado; además los cortes espiratorios pueden mostrar patrón en mosaico sugestivo de afectación de pequeña vía aérea; estas imágenes de atrapamiento aéreo se visualizan mejor al final de la espiración. Las zonas de menor atenuación que persisten en los cortes espiratorios son sugestivas de inflamación y obstrucción

bronquiolar⁴⁹. Otros hallazgos menos usuales descritos son el engrosamiento de la pared bronquiolar y bronquiectasias.

La NH crónica se caracteriza por un infiltrado reticular periférico, distorsión de la arquitectura pulmonar, bronquiectasias de tracción y panalización; cambios preferentemente localizados en lóbulos superiores. Se han descrito también otros patrones radiológicos en la NH como son el de NIU, NINE, NO^{30,87-88} o el complejo fibrosis pulmonar-EPOC más frecuente en pacientes con EPG⁴⁹ (figura 11). Dichos hallazgos compatibles con EPOC (zonas enfisematosas) se habían descrito inicialmente en pacientes fumadores y con EPG⁸⁹, pero posteriormente Morell et al¹⁷ presentaron una serie de 86 pacientes con PCA en los que en el 17% de los casos se evidenciaba enfisema en el TC sin factores de riesgo añadidos. Como se ha mencionado, los hallazgos en el TC/TCAR no son específicos, por lo que en ocasiones es difícil distinguir radiológicamente una NH crónica de una FPI o una NINE. En este sentido, se ha propuesto que áreas con disminución de la atenuación, nódulos centrolobulillares y una ausencia o menor afectación de los lóbulos inferiores son las características que mejor pueden ayudar a diferenciar una NH de otras entidades^{49,90}.



FIGURA 10. Radiografía simple de tórax que muestra infiltrado intersticial reticulonodular bilateral en paciente con Pulmón del Cuidador de Aves.

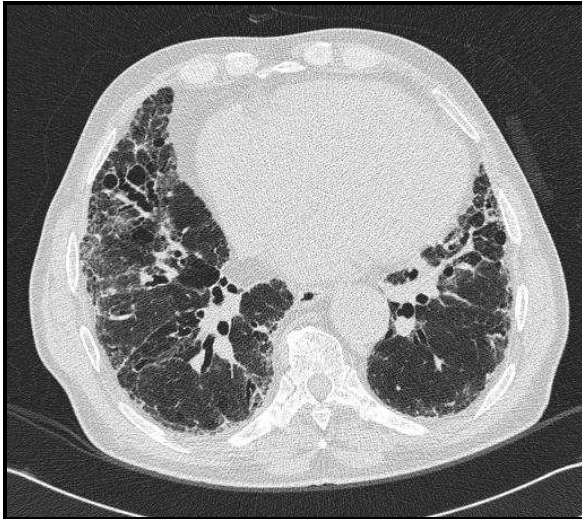


FIGURA 11. TCAR que muestra patrón reticular peribroncovascular y periférico subpleural con bronquiectasias de tracción en paciente con NH.

c) Función pulmonar

Las alteraciones objetivadas en los estudios de función pulmonar no son específicas de NH, pero pueden ayudar a evaluar la gravedad de la enfermedad tanto al diagnóstico como en el seguimiento⁴⁹. Característicamente se observa un trastorno ventilatorio restrictivo con disminución de la capacidad vital forzada (FVC) y la capacidad pulmonar total (TLC, acrónimo en inglés de *total lung capacity*) (figura 12). Dado que la NH también puede afectar la pequeña vía aérea, en algunos pacientes se observa un patrón mixto con disminución de mesoflujos además de la alteración de la FVC. También se ha descrito una disminución de la relación FEV1/FVC, que traduce una obstrucción al flujo aéreo; dicha alteración es más frecuente en la EPG pero no exclusiva⁹¹. Otra alteración funcional que se objetiva de forma precoz es la disminución del test de transferencia del CO (TLCO). Estas alteraciones en las pruebas de función respiratorias se han correlacionado con el pronóstico de la enfermedad, aunque se ha observado que algunos pacientes con una función respiratoria leve pueden desarrollar fibrosis y tener peor pronóstico que otros con peor funcionalismo⁴⁹.

Además de las alteraciones descritas a nivel de pruebas de función respiratoria también se observa en estos pacientes la presencia de hipoxemia en reposo que empeora durante el ejercicio, si bien pacientes con enfermedad leve/moderada pueden permanecer normoxémicos en reposo presentando sólo desaturación al esfuerzo⁴⁹.

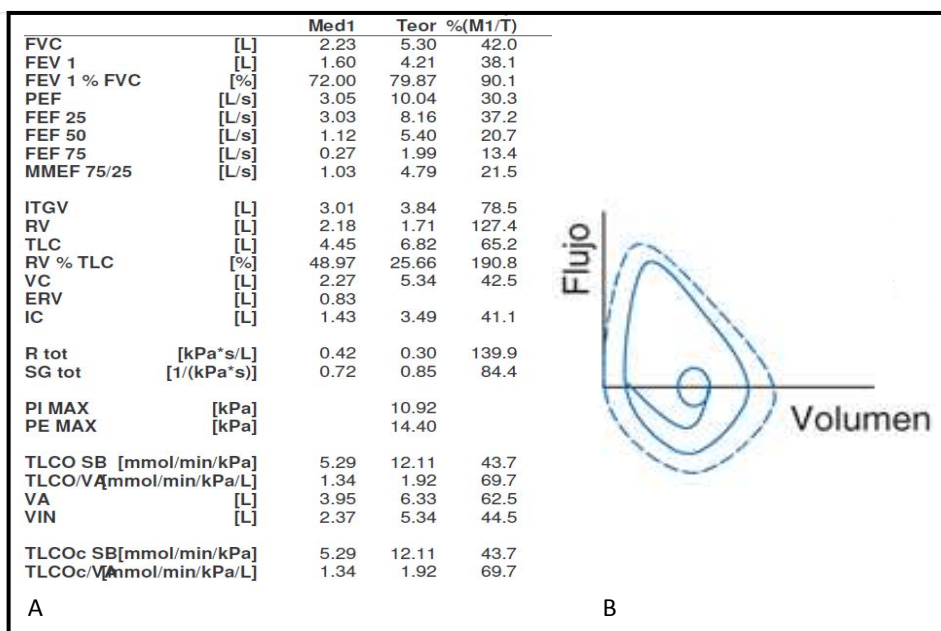


FIGURA 12. Pruebas de función respiratoria (PFR). A. Resultados de una PFR que muestra un trastorno ventilatorio restrictivo grave. B. Curva flujo/volumen correspondiente a un trastorno restrictivo.

d) Citológicas (Lavado broncoalveolar, esputo inducido)

Reynolds et al⁹² fue el primero en describir la técnica del LBA en 1974 como medio para estudiar la presencia de células inflamatorias en el tracto respiratorio inferior tanto de sujetos sanos como de sujetos con diferentes tipos de enfermedades intersticiales, principalmente FPI y NH. Posteriormente, se han publicado diferentes estudios en los que se analizan las células inflamatorias halladas en LBA de pacientes con NH (figura 13), con el objetivo de relacionar estas células con el diagnóstico de la enfermedad y/o con la gravedad de la misma^{32,40}. En este sentido, se ha postulado que el predominio de linfocitos en el

LBA es sugestivo de enfermedades granulomatosas, siendo característico de sarcoidosis y NH un recuento mayor del 25% aunque no específico, dado que se ha descrito en otras entidades como la beriliosis o la toxicidad por fármacos⁹³. Un porcentaje de linfocitos superior al 60% se considera prácticamente diagnóstico de NH⁹⁴. A medida que la enfermedad avanza hacia la fibrosis se reduce la cifra de linfocitos en el LBA, aunque la mayor parte de las NH crónicas siguen presentando un porcentaje de linfocitos superior al 20%^{17,95-96}. Además de los linfocitos, en la NH también se ha estudiado la relación CD4/CD8 y, aunque ésta suele ser <2, no se recomienda su uso para el diagnóstico de NH dado que varía según la exposición y el estado de la enfermedad, por lo que una relación normal o elevada no excluye el diagnóstico de NH^{51,96}.

Si bien la linfocitosis es el hallazgo predominante en pacientes con NH, también se ha descrito la existencia de otras células en el LBA. Hay trabajos que relacionan el hallazgo de otras células en el LBA con el tiempo tras exposición al antígeno, con el tipo de neumonitis (aguda o crónica) o con el tiempo de realización del LBA desde la última exposición^{32,97}. Así, el hallazgo de neutrofilia en ausencia de infección, se ha relacionado con el grado de extensión de la fibrosis^{93,98-100}. También hay estudios que sugieren que un porcentaje elevado de neutrófilos en el LBA en el momento del diagnóstico se relaciona con un peor pronóstico/mayor gravedad de la enfermedad¹⁰⁰. En este sentido Bogaert et al⁴⁰ realizaron una revisión comparativa entre el asma grave y la NH crónica en la que concluyeron que ambas enfermedades presentaban similitudes fisiopatológicas incluyendo la presencia de neutrófilos en las citadas etapas de las 2 entidades con presencia de remodelado fibrótico.

Por otro lado, no sólo en trabajos clínicos se relaciona la presencia de neutrófilos con gravedad/fibrosis de NH sino que también los trabajos experimentales con modelos murinos han objetivado dicha relación; así en 2011 Abdelsamed et al⁶⁸ realizaron un estudio usando un modelo murino de NH aguda a *S.rectivirgula* en el que relacionaron la gravedad de la NH no sólo con la presencia de neutrófilos, sino más concretamente con la presencia del factor de transcripción Tbet contenido en los neutrófilos.

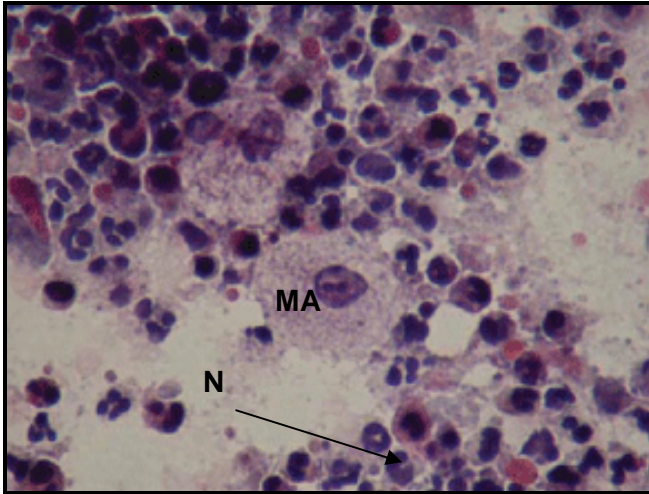


FIGURA 13. Imagen LBA, tinción Papanicolau. ABREVIATURAS: MA= macrófagos alveolares. N=neutrófilos.

Además de los neutrófilos también se ha descrito la presencia de eosinófilos en pacientes con NH. Ishiguro et al¹⁰¹ relacionaron la presencia de eosinofilia con la realización precoz del LBA tras la exposición (dentro de la primera semana post-exposición). Otros autores también han descrito la presencia de eosinófilos en LBA (o muestras histológicas) siempre en fase aguda de la enfermedad¹⁰²⁻¹⁰³. Pese a que la presencia de eosinófilos está descrita en la NH, si ésta es mayor al 25% se considera altamente sugestiva de neumonía eosinófila y no de NH^{93,104-106}. De igual forma, algunos trabajos han descrito también la presencia de otras células como los mastocitos, relacionándolos con la extensión y velocidad del proceso fibrótico, o las células plasmáticas acompañadas de macrófagos espumosos (*foamy*), relacionadas con mayor componente de alveolitis³².

Así pues, los hallazgos en el LBA de los pacientes con sospecha de NH, pueden ser útiles para apoyar el diagnóstico¹⁰⁷, si bien el empleo de esta técnica no está extendido, siendo de rutina en la mayoría de centros europeos pero su uso es controvertido en EEUU.

Además del LBA, existen otras técnicas menos invasivas para el estudio de inflamación pulmonar como el análisis del esputo inducido (EI). Éste ha demostrado ser útil para el diagnóstico y seguimiento del asma y la EPOC¹⁰⁸⁻¹⁰⁹,

en cambio en la patología intersticial pulmonar su utilidad es más dudosa¹¹⁰. Existen pocos estudios que evalúen la utilidad del EI en el diagnóstico de NH, aunque éstos han demostrado un incremento en el número de células totales con aumento del número de linfocitos en comparación con sujetos sanos¹¹¹⁻¹¹². Recientemente Villar et al¹¹³ analizaron el perfil inflamatorio en dos grupos de pacientes con NH secundaria a diferentes antígenos y observaron un perfil inflamatorio basal similar aunque tras la realización de la PPBE se evidencia un aumento de neutrófilos y citoquinas proinflamatorias en aquellos pacientes con NH fúngica y de eosinófilos y citoquinas TH2 en los pacientes con NH aviar. Estos resultados hacen que los autores sugieran que pueden existir diferentes mecanismos inflamatorios dependiendo del antígeno causal.

e) Aire exhalado condensado y Fracción exhalada de óxido nítrico

El análisis de aire exhalado condensado (AEC) y la medición de la fracción espiratoria o exhalada de óxido nítrico (FeNO) son dos técnicas no invasivas utilizadas para el estudio de inflamación de la vía aérea.

Así, el pH en el AEC se ha demostrado útil en la evaluación de la inflamación de la vía aérea en pacientes con asma de difícil control en los que se observa valores de pH en AEC disminuidos¹¹⁴; en pacientes con EPOC, bronquiectasias (BQ) y/o fibrosis quística se ha observado disminución del pH en contexto de infecciones¹¹⁵. Recientemente nuestro grupo ha evaluado la utilidad del estudio de pH en AEC en pacientes con NH en relación a la PPBE, demostrando un descenso del pH post-PPBE en pacientes expuestos a antígenos fúngicos no pudiendo demostrar variación en los niveles de pH en pacientes con PCA. Ante estos hallazgos, al igual que ocurre con el esputo inducido, se postula la posibilidad de un mecanismo fisiopatológico diferente en relación al agente causal de la NH¹¹⁶.

El estudio de la FeNO traduce la presencia de inflamación eosinófila de la vía aérea y se ha demostrado útil en el estudio del asma en los que los valores de FeNO se encuentran aumentados¹¹⁷ y en enfermedades como la EPOC, BQ y

discinesia ciliar primaria donde están disminuidos¹¹⁸⁻¹¹⁹. En relación a la EPID existen trabajos con resultados discordantes. Por un lado, Guileminault et al¹²⁰ observaron que los valores de FeNO en una cohorte de pacientes con NH estaban aumentados respecto a pacientes con otras EPID. En cambio, nuestro grupo no evidenció diferencias en los niveles basales de FeNO entre pacientes con NH y con otro diagnóstico ni tampoco en relación a la PPBE en aquellos pacientes en que ésta resultó positiva¹²¹.

f) *Histológicas (biopsia transbronquial (BTB), criobiopsia y biopsia pulmonar quirúrgica)*

El estudio histológico mediante la biopsia pulmonar es el método que facilita el diagnóstico de certeza, especialmente en la NH crónica³⁰. Existen diferentes técnicas para la obtención de muestras histológicas pulmonares: BTB, criobiopsia y Biopsia pulmonar quirúrgica (BPQ).

La rentabilidad de la BTB en el diagnóstico de las EPID en general es baja, centrándose especialmente en enfermedades granulomatosas como la sarcoidosis o la NH¹³. La baja efectividad se debe a la irregularidad y heterogenicidad de la afectación pulmonar en la EPID unido al pequeño tamaño de la muestra histológica. Además, la propia técnica de la BTB condiciona que la preservación de la estructura del tejido se vea afectada. Así, según algunos estudios, la rentabilidad diagnóstica de la BTB en las EPID puede llegar a ser como mucho del 30%¹²²⁻¹²³.

En los últimos años la criobiopsia se ha convertido en una técnica consolidada y fiable dado su alto rendimiento en el diagnóstico de las EPID³. En 2009, Babiak et al¹²⁴ describieron por primera vez la potencial utilidad de la criobiopsia en el estudio de las enfermedades intersticiales, encontrando que la información obtenida de las muestras histológicas conseguidas a través de criosonda proporcionaba un diagnóstico definitivo en un número significativo de casos. Actualmente la criobiopsia se considera una alternativa a la BTB dado que proporciona una muestra histológica de mayor tamaño y mayor preservación de la

estructura, que condiciona un rendimiento diagnóstico superior sin un aumento de complicaciones¹²⁵⁻¹²⁸. Aunque el rendimiento diagnóstico de la criobiopsia es comparable a la BPQ, los metaanálisis de datos disponibles sobre el rendimiento diagnóstico de la criobiopsia se limitan a unos pocos centros³⁰. Por este motivo la biopsia quirúrgica se sigue considerando el método de mayor rendimiento diagnóstico pese a que se reserva para aquellos casos en los que no es posible un diagnóstico tras la realización de las técnicas mencionadas previamente y, siempre y cuando, la BPQ no esté contraindicada^{3,13,30}. La BPQ es un método invasivo y que presenta una mortalidad post-operatoria en torno al 3.6% según datos de un metaanálisis¹²⁹. Los pacientes con mayor deterioro de la función pulmonar (FVC < 55% y TLCO <30%), ventilación mecánica o en tratamiento inmunosupresor presentan mayor riesgo de complicaciones. El rendimiento diagnóstico de la BPQ no está influenciado por la técnica realizada (videotoracoscopia, biopsia abierta)¹³⁰.

Tras la obtención de la muestra se realiza el estudio histopatológico que pese a que no es patognomónico presenta alteraciones características de NH que pueden ayudar, como se ha mencionado, al diagnóstico definitivo. El hallazgo de un infiltrado mononuclear difuso, de predominio neutrofílico en fases iniciales (primeras 48h post-exposición) y posteriormente linfocitario es característico¹³¹. Así inicialmente se observa una afectación alveolar, implicando intersticio, paredes alveolares y bronquiolo¹³²⁻¹³⁴. El hallazgo de granulomas no epitelioides es característico aunque infrecuente y puede desaparecer con el cese de la exposición¹³⁵. Progresivamente se instaura una fibrosis colágena, afectando espacio alveolar e intersticio pulmonar, siendo característica la obliteración de las paredes de los bronquios terminales¹⁰³ (figura 14).

La diferenciación del patrón histológico puede tener implicaciones tanto diagnósticas como pronósticas¹⁰⁰. En este sentido, algunos estudios relacionan la existencia de una NINE celular con una mayor supervivencia y una NINE fibrótica con una mayor progresión de la enfermedad y por tanto con un peor pronóstico¹³⁶.

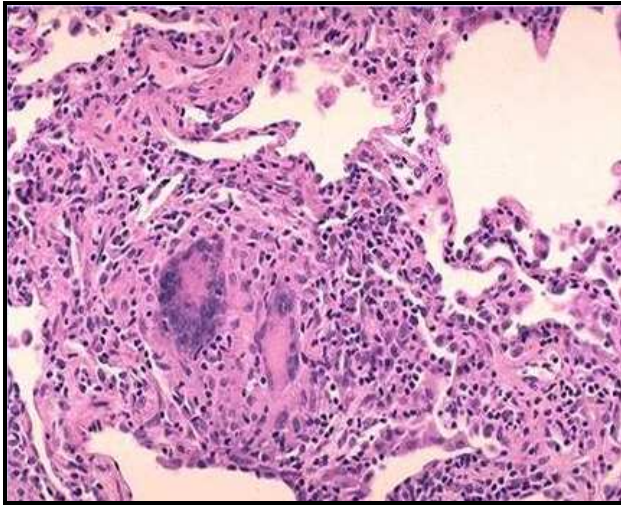


FIGURA 14. Imagen histológica de biopsia pulmonar de paciente con NH, en la que se objetiva pequeños granulomas no necrotizantes.

g) Prueba de provocación bronquial específica

El diagnóstico de NH según la mayoría de guías y artículos de revisión debe realizarse mediante criterios clínicos, radiológicos y de laboratorio^{50,77,81}, aunque teniendo en cuenta la base inmunológica de esta enfermedad el empleo de técnicas como la PPBE deberían también ser incluidas, aún más teniendo en cuenta que los hallazgos histológicos típicos de NH (infiltrado linfocítico, bronquiolitis y granulomas no epitelioides) se observan en < 30% de los pacientes⁵². Sin embargo la PPBE actualmente carece de estandarización. Sólo cinco estudios hasta la fecha, todos en el marco del pulmón del cuidador de aves, han intentado establecer el rendimiento de la prueba^{17,137-139} (tabla 9).

El primer trabajo en el que se intentó determinar el rendimiento de la prueba de provocación bronquial en el diagnóstico de la NH data de 1980; Hendrick et al¹³⁷ realizaron un estudio con 29 casos en los que la sospecha diagnóstica era de PCA, realizando una prueba de provocación con 2 tipos de fuentes aviares nebulizados con mascarilla mediante un nebulizador: suero aviar (diluciones 1/100, 1/5) y extractos de excrementos; la nebulización duraba entre 5-30min. También realizaron exposición natural en algunos casos. Las nebulizaciones se repetían hasta obtener un test positivo o hasta máxima dosis (dilución 1/5). Los

criterios de positividad que establecieron fueron: aumento de temperatura mayor a 37.2°C, incremento de neutrófilos en sangre periférica mayor de 2500/mm³, descenso de FVC mayor del 15% y descenso TLCO mayor al 15%. Los autores reportaron una sensibilidad del 45-85% y una especificidad del 95%.

En el contexto de la NH por antígenos aviares, Ramirez-Venegas et al¹³⁸ estudiaron 17 pacientes con NH crónica y 17 pacientes con otro tipo de enfermedad intersticial, a los que se realizaba nebulización de suero aviar en un espacio abierto mediante un nebulizador tipo jet; se nebulizaba 5mL de suero durante unos 10 minutos. La positividad de la prueba se consideró si se daba alguno de los siguientes hallazgos: descenso FVC mayor del 16%, descenso de la PaO₂ mayor de 3mmHg, un descenso mayor del 3% en la saturación de oxígeno y/o un aumento mayor de 0.5°C en la temperatura corporal. Tras realización del test y con los citados criterios de positividad objetivaron una sensibilidad de 82-86% y una especificidad de 76-100%.

Posteriormente Ohtani et al¹³⁹ realizó un estudio con 11 sujetos con PCA crónico y 6 sujetos sanos, donde consideró positividad del test si se cumplían 3 o más de los siguientes criterios: incremento de las alteraciones radiológicas, incremento en P(A-a)O₂ mayor de 10mmHg y/o descenso de la TLCO mayor del 20%, un incremento mayor del 30% de los leucocitos en sangre periférica, incremento PCR mayor de 1mg/dL, incremento temperatura corporal mayor de 1°C y/o síntomas sistémicos y aparición de síntomas respiratorios. Tras análisis del estudio se observó positividad del test en los 11 sujetos con PCA y negatividad del test en el resto.

La serie más larga hasta la fecha es un estudio de Morell et al¹⁷ en la que se estudió 59 pacientes con PCA, 30 cuidadores de aves sanos y 20 pacientes con otro tipo de enfermedad intersticial. Los sujetos realizaban inhalación de 2mL del suero aviar (dilución 1/100) y se consideró un test positivo si se objetivaba alguna de las siguientes respuestas: 1) descenso de la FVC > 15% o de la TLCO > 20%, 2) descenso de la FVC 15-10% junto con alguno de los siguientes criterios: incremento de leucocitos en sangre periférica mayor o igual al 20%, descenso de la saturación mayor del 3%, cambios radiológicos significativos, incremento en la

temperatura corporal de 0.5°C o mayor, sintomatología (tos, disnea, etc) o 3) descenso de la FVC <10% junto con 3 o más de los criterios anteriores. La sensibilidad y especificidad encontradas fueron respectivamente del 92 y 100%.

TABLA 9. Resumen de los estudios que han intentado establecer el rendimiento de la PPBE.
Adaptado de Muñoz X et al⁸⁰

AUTORES	GRUPOS ESTUDIO	RESULTADO
Hendrick et al¹³⁷	29 casos con sospecha NH aviar.	Sensibilidad del 45-85% Especificidad del 95%.
Ramírez-Venegas et al¹³⁸	17 pacientes con NH aviar crónica. 17 pacientes con otras EPI.	Sensibilidad del 82-86%. Especificidad del 76-100%.
Ohtani et al¹³⁹	11 pacientes con PCA 6 sujetos sanos	PPBE positiva en los 11 pacientes con PCA. PPBE negativa en los 6 sujetos sanos.
Morell et al¹⁷	59 pacientes con PCA. 30 cuidadores de aves sanos. 20 pacientes con otro tipo de EPID.	Sensibilidad del 92%. Especificidad del 100%.
Ishizuka et al¹⁴⁰	28 pacientes con PCA	Sensibilidad del 79%. Especificidad del 95%.

Más recientemente Ishizuka et al¹⁴⁰ estudió a 28 pacientes con PCA a los que se nebulizaba 2 mL de PDA (*pigeon dropping extracts / extracto de excrementos de paloma*) durante 10 minutos. Para considerar la PPBE positiva tenían que presentar 2 o más de los siguientes criterios: incremento de las alteraciones radiológicas, incremento de la P(A-a)O₂ mayor de 10mmHg y/o descenso de la TLCO mayor del 20%, descenso de la FVC >15%, incremento de los leucocitos en sangre periférica >30%, incremento de la PCR mayor de 1mg/dL, incremento de la temperatura corporal >1°C y/o síntomas sistémicos y desarrollo de síntomas respiratorios. El análisis de los datos obtenidos halló una sensibilidad del 79% y una especificidad del 95% (tabla 10).

Así, pese a que los valores obtenidos en general de sensibilidad y especificidad en estos estudios fueron entre 80% y 100%, el pequeño número de pacientes evaluados, que todos los estudios fueron en el marco de PCA y que la manera de realizar e interpretar la prueba difiere entre los estudios pueden ser las razones por la que esta herramienta diagnóstica no se use más ampliamente. Otros factores limitantes para la realización de la prueba son la ausencia de antígenos estandarizados para realizar el test, la ausencia de diagnóstico etiológico pre-PPBE por lo que no se puede disponer de antígeno para realizar la prueba, la falta de datos de seguridad de la prueba y la reticencia de algunos autores en realizar la prueba dado que opinan que la prueba en si misma puede sensibilizar al paciente y causar la enfermedad¹⁴¹.

En este marco de dudas sobre la PPBE el otro objetivo de la presente tesis ha sido evaluar si la PPBE puede ser la prueba diagnóstica de referencia de la NH. En este sentido, se realizó un análisis de la rentabilidad de la prueba para el diagnóstico de NH, así como del perfil de seguridad de la misma.

TABLA 10. Criterios de positividad para la PPBE. Adaptado de Muñoz X et al⁸⁰.

AUTORES	CRITERIOS
Hendrick et al¹³⁷	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aumento de temperatura mayor a 37.2°C 2. Incremento de neutrófilos en sangre periférica mayor de 2500/mm³. 3. Descenso de FVC mayor del 15% 4. Descenso TLCO mayor al 15%.
Ramírez-Venegas et al¹³⁸	<ol style="list-style-type: none"> 1. Descenso FVC mayor del 16% 2. Descenso de la PaO₂ mayor de 3mmHg. 3. Descenso mayor del 3% en la saturación de oxígeno. 4. Aumento mayor de 0.5°C en la temperatura corporal.
Ohtani et al¹³⁹	<ol style="list-style-type: none"> 1. Incremento de las alteraciones radiológicas. 2. Incremento en P(A-a)O₂ mayor de 10mmHg. 3. Descenso de la TLCO mayor del 20%. 4. Alteraciones laboratorio: incremento mayor del 30% de los leucocitos en sangre periférica, incremento PCR mayor de 1mg/dL. 5. Incremento temperatura corporal mayor de 1°C y/o síntomas sistémicos. 6. Síntomas respiratorios.
Morell et al¹⁷	<ol style="list-style-type: none"> 1. Descenso de la FVC > 15% o de la TLCO > 20%. 2. Descenso de la FVC entre el 15-10% junto con alguno de los siguientes criterios: incremento de leucocitos en sangre periférica mayor o igual al 20%, descenso de la saturación mayor del 3%, cambios radiológicos significativos, incremento en la temperatura corporal de 0.5°C o mayor, sintomatología (tos, disnea, etc).

	3. Descenso de la FVC <10% junto con 3 o más de los criterios anteriores.
Ishizuka et al¹⁴⁰	<ol style="list-style-type: none"> 1. Incremento de las alteraciones radiológicas. 2. Incremento de la P(A-a)O₂ mayor de 10mmHg y/o descenso de la TLCO mayor del 20%. 3. Descenso de la FVC>15%. 4. Alteraciones laboratorio: incremento de los leucocitos en sangre periférica >30%, incremento de la PCR mayor de 1mg/dL. 5. Incremento de la temperatura corporal >1°C y/o síntomas sistémicos. 6. Síntomas respiratorios.

1.6. TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO

La evitación de la fuente antigénica es fundamental en el tratamiento de la NH, si bien se considera efectivo en ocasiones se ve dificultada por la imposibilidad de detección de la causa o, en los casos de exposición laboral, por negación del trabajador a abandonar el puesto de trabajo y/o la dificultad para su reubicación. En estos casos, sistemas de protección, ventilación adecuada y limpieza pueden minimizar la exposición y por tanto el daño alveolar.

Des del punto de vista farmacológico no hay reportados ensayos clínicos aleatorizados y controlados sobre el tratamiento de la NH crónica y, únicamente un estudio de 1992 de Kokkarinen et al¹⁴² valoró la efectividad del tratamiento corticoideo en la fase aguda de la EPG. Así ante la ausencia de una guía terapéutica, el tratamiento actual se basa en datos observacionales y opinión de expertos¹⁴³. El tratamiento principal actualmente es el uso de corticoides sistémicos diarios, recomendándose la mínima dosis posible y durante el menor

tiempo posible, generalmente iniciando a dosis de 0.5mg/Kg y reduciendo progresivamente. En la forma aguda la corticoterapia produce una mejoría de la función pulmonar más rápida (comparado con placebo)¹⁴² y en la forma crónica enlentece el empeoramiento funcional, pudiendo tener una efectividad similar a la evitación antigénica⁸.

Otros fármacos usados en el tratamiento de la NH son los agentes inmunosupresores y los antifibróticos. Si bien tampoco existen estudios randomizados que evalúen su eficacia, en algunos centros es habitual el uso de inmunosupresores como el micofenolato (MMF) o la azatioprina (AZA)¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Morisset et al¹⁴⁸ observaron una mejoría del intercambio gaseoso y una reducción de la dosis de prednisona en pacientes con NH crónicas tratados con AZA o MMF.

Por último, en aquellos pacientes con una NH crónica fibrótica progresiva, se podría considerar el uso de antifibróticos como el nintedanib o la pirfenidona. Como se ha mencionado, ante la ausencia de guías terapéuticas para el tratamiento de la NH, recientemente Salisbury et al¹⁴³ proponen una estrategia de tratamiento para la NH fibrótica basándose en la presencia o ausencia de hallazgos inflamatorios y en la respuesta al tratamiento inicial (tabla 11).

Finalmente en aquellos casos en los que existe progresión de la enfermedad a pesar de la evitación antigénica y el tratamiento farmacológico debe plantearse el trasplante pulmonar como opción terapéutica de forma precoz³⁰.

En relación al pronóstico, la NH es una entidad potencialmente grave ya que puede evolucionar a fibrosis pulmonar con insuficiencia respiratoria crónica, hipertensión pulmonar y *cor pulmonale*¹⁴¹. Aunque el pronóstico depende de la forma de presentación de la enfermedad, en general la NH presenta una mortalidad a los 5 años de hasta el 27-29% de los pacientes^{1,10,145,149-151}.

Diferentes observaciones han relacionado el pronóstico de la enfermedad con diversos factores. Así Lima et al¹⁵⁰ observaron que la mortalidad de la NH se relacionaba con factores como la edad avanzada, el sexo masculino, la relación FVC/FEV1, los hallazgos en la TCAR y la desaturación al esfuerzo, siendo éste

último el mejor predictor de mal pronóstico¹⁵⁰. Otros estudios han relacionado un peor pronóstico dependiendo de los hallazgos en TCAR y de los hallazgos histológicos, siendo la presencia de fibrosis el hallazgo histológico de peor pronóstico¹⁵²⁻¹⁵³. Un estudio reciente no sólo ha relacionado con la supervivencia la presencia de fibrosis sino también la identificación o no del antígeno causal. En este sentido se observó que la peor supervivencia se daba en aquellos pacientes con fibrosis y sin identificación del antígeno causal (supervivencia media 4.88 años)¹⁵³.

TABLA 11. Estrategias de tratamiento para la NH. Adaptado de Salisbury et al¹⁴³.

Presencia de hallazgos inflamatorios[■]
<p>- Retirada antígeno causal.</p> <p>-Considerar inmunosupresión. La conducta expectante se puede realizar si enfermedad estable o leve o bien si el antígeno ha sido retirado.</p> <p>-Tratamiento sugerido:</p> <p>*corticoides (0.5-1mg/Kg/d prednisona) ± fármaco citotóxico[▲].</p> <p>*reducir corticoides a <20mg/d cuando se consiga una función pulmonar en meseta (suponiendo una mejoría inicial).</p> <p>-Adaptar el tratamiento de mantenimiento según la clínica:</p> <p>*mejoría inicial con posterior estabilidad de la función pulmonar: considerar retirada progresiva fármacos Vs mantenimiento con fármaco citotóxico.</p> <p>*enfermedad estable pero sin mejoría con la inmunosupresión: considerar retirada progresiva fármacos; si deterioro función pulmonar considerar reintroducirlas.</p> <p>*enfermedad progresiva pese al tratamiento: considerar retirada progresiva de inmunosupresión.</p>
Ausencia de hallazgos inflamatorios[■]
<p>-Retirada antígeno causal.</p> <p>-Conducta expectante si enfermedad estable o leve o bien si el antígeno ha sido retirado. Inmunosupresión tras evaluar los riesgos/beneficio del tratamiento.</p> <p>-Si se decide tratamiento inmunosupresor, realizar protocolo de tratamiento descrito en apartado anterior teniendo en cuenta que en pacientes con fibrosis avanzada y sin signos de inflamación se recomienda limitar el tratamiento con corticoesteroides a 3 meses y retirar si no se observa mejoría. Añadir fármaco citotóxico tiene pocos beneficios y puede producir efectos adversos.</p> <p>-Adaptar el tratamiento de mantenimiento según la clínica:</p>

***mejoría inicial con posterior estabilidad de la función pulmonar: considerar retirada progresiva fármacos Vs mantenimiento con bajas dosis de fármaco citotóxico.**
***si deterioro de la función pulmonar considerar reintroducir la inmunosupresión.**
***enfermedad estable o progresiva: considerar retirada progresiva de inmunosupresión.**

Otros Tratamientos

-Rehabilitación pulmonar.
-Trasplante pulmonar.
-Valoración y tratamiento de comorbilidades.
-Valoración y tratamiento de infecciones y otras complicaciones.

■ *Hallazgos inflamatorios: presencia de vidrio esmerilado en TCAR, linfocitosis en el LBA o presencia en el estudio anatómo-patológico pulmonar de neumonía intersticial celular o inflamación granulomatosa.*

△ *Considerar profilaxis para *Pneumocystis jirovecii* si doble inmunosupresión.*

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La NH es una enfermedad de base inmunológica, cuyos mecanismos no son bien conocidos. En este contexto, en que un proceso de sensibilización parece esencial, la PPBE podría ser una herramienta útil en el diagnóstico de NH; además dado el desconocimiento actual sobre los mecanismos exactos, los modelos animales podrían contribuir al estudio de esta entidad y establecer si en realidad las formas clínicas de presentación son estadios diferentes de la misma enfermedad.

2.1. HIPÓTESIS

1. La PPBE podría ser la prueba de referencia para el diagnóstico de NH.
2. Las formas clínicas de presentación de la NH son en realidad estadios evolutivos de la enfermedad.

2.2. OBJETIVOS

1. **Objetivo principal:**

Estudio de las vías inmunológicas implicadas mediante un estudio clínico y otro experimental.

2. **Objetivos secundarios:**

2.1. Establecer la rentabilidad y seguridad de la prueba de provocación bronquial específica (PPBE) en el diagnóstico de las NH.

2.2. Diseñar dos modelos animales del pulmón del cuidador de aves: un modelo agudo y otro crónico para poder: a) Realizar un análisis comparativo de la función pulmonar y de las IgG específicas en suero. b) Obtener la diferenciación celular del LBA, tanto de ratones con NH aguda como con NH crónica, y analizar las diferencias. c) Cuantificar citoquinas de las vías inmunológicas TH1, TH2 y TH17 y realizar análisis comparativo entre ambos modelos. d) Realizar estudio histológico de ambos modelos de NH.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIO 1. RENTABILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL ESPECÍFICA.

Para el estudio de rentabilidad diagnóstica de la PPBE se incluyó a todos los pacientes mayores de 18 años, con sospecha de NH, a los que se les había realizado una PPBE entre junio de 1995 y diciembre de 2010 en nuestro centro. Algunos de estos pacientes fueron atendidos inicialmente en otros hospitales y posteriormente remitidos a nuestro centro para completar estudio diagnóstico. Posteriormente se aplicó el protocolo descrito y se realizó el análisis tal y como se describe a continuación.

3.1.1. PROTOCOLO DIAGNÓSTICO

En todos los pacientes se analizaron datos de historia clínica y examen físico, así como los resultados de las siguientes exploraciones complementarias: análisis de laboratorio con recuento completo de células sanguíneas, velocidad de sedimentación glomerular, gammaglobulinas, inmunoglobulinas G y E, niveles de calcio, calcio en orina de 24h, niveles en plasma de la enzima convertidora de angiotensina y de lactato deshidrogenasa, determinación sérica de inmunoglobulina G específica, radiografía de tórax, TC torácica, test de función pulmonar incluyendo espirometría, volúmenes estáticos y test de transferencia del CO (TLCO), tests cutáneos de hipersensibilidad inmediata y retardada, broncoscopia con lavado broncoalveolar y/o biopsia transbronquial y PPBE. En algunos casos en los que el diagnóstico definitivo no se pudo realizar tras las citadas exploraciones, se realizó biopsia pulmonar quirúrgica tras evaluación individualizada de la indicación¹⁷.

3.1.2. CONFIRMACIÓN DIAGNÓSTICA

El diagnóstico definitivo de NH se estableció a partir de la revisión de la historia clínica por parte de dos neumólogos expertos en patología pulmonar intersticial difusa. La revisión de la historia clínica se realizó de forma independiente por ambos expertos sin conocer el resultado de la prueba de provocación y evaluando no sólo los datos del paciente en el momento de realización de la prueba sino también su evolución clínica hasta la actualidad. El diagnóstico de NH fue realizado por ambos expertos siguiendo la misma pauta diagnóstica¹⁵⁴ basada en los criterios propuestos por Schuyler and Cormier⁷⁷.

3.1.3. PREPARACIÓN EXTRACTO ANTIGÉNICO PARA LA PRUEBA DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL ESPECÍFICA

Se usaron extractos Comerciales (Bial-Aristegui, Bilbao, Spain) de *Penicillium frequentans*, *Aspergillus fumigatus* and *Mucor mucedo* para el estudio fúngico¹⁵⁴. El suero aviar se preparó en nuestro laboratorio. Se obtuvo suero sanguíneo aviar de diferentes aves y se centrifugó; la concentración de proteínas séricas se midió mediante ensayo de ácido bicinconínico (BCA; Pierce Chemicals, Rockford, IL, USA). Los extractos para realización de PPBE a isocianatos y esparto se prepararon como se describió previamente^{27,154}. La PPBE a *metalworking fluid*, prótesis dentales e interferón se realizó con el material facilitado por el paciente para simular las condiciones laborales en la habitación de provocación.

3.1.4. PRUEBA DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL ESPECÍFICA

La PPBE se realizó en el hospital después de obtener el consentimiento por escrito del paciente. En pacientes que recibían tratamiento antiinflamatorio (corticosteroides), se suspendió al menos 8 días antes de la prueba. Se requirió que los pacientes tuvieran una capacidad vital forzada de referencia (FVC) >50%

y TLCO $\geq 40\%$ del valor de referencia para poder realizar la prueba. La prueba se realizó de forma ambulatoria.

En 81 pacientes, la PPBE se realizó mediante la nebulización de un extracto del agente causal sospechoso utilizando un nebulizador De Vilbiss 646 (De Vilbiss CO, Somerset, PA, EE. UU.) de 1995 a 2001 o un dosímetro Mefar MB3 (Mefar, Ele H2O; Medicali, Brescia, Italia) de 2001 a 2010, que nebulizaba la solución durante el primer segundo de cada inspiración. Se solicitó a los pacientes que inhalaran 2 ml del antígeno sospechoso a una dilución de 1: 100mg/mL. Se registró la FVC, el volumen espiratorio forzado en el 1 s, la TLCO y la temperatura del paciente al inicio del estudio, 20 minutos después de la prueba de inhalación y cada hora después de la prueba durante las siguientes 8h y a las 24h. El recuento de células sanguíneas, la radiografía de tórax y la medición de saturación de O₂ se realizaron antes y 8 horas después de la inhalación. En todos los casos, se realizó la PPBE con una solución de placebo (solución salina) 1 día antes de la prueba con el antígeno sospechado. Ninguno de los pacientes respondió positivamente a la solución placebo.

La prueba se consideró positiva cuando se objetivaba cualquiera de las siguientes respuestas: 1) disminución de FVC $>15\%$ o disminución de TLCO $>20\%$ en comparación con los valores basales. 2) 10% a 15% de disminución de FVC junto con al menos uno de los siguientes cinco criterios con respecto al estado clínico y los valores analíticos de referencia: aumento de leucocitos en sangre periférica del 20%; Disminución de la saturación de O₂ del 3%; cambios radiológicos significativos; aumento en la temperatura corporal de más de 0.5°C; o síntomas clínicos evidentes (por ejemplo, tos o disnea). 3) disminución de FVC $<10\%$ pero con evidencia de tres o más de los criterios clínicos o analíticos mencionados anteriormente. Cuando la prueba resultó negativa, se realizó inhalación de una nueva dilución de antígeno de 1:10 (0.1 mg/ mL) al día siguiente siguiendo el mismo procedimiento.

En 32 pacientes, los antígenos utilizados no eran solubles (isocianatos, polvo de madera, humidificadores, edredones, etc.) y la PPBE se realizó exponiendo directamente al paciente al agente causal sospechoso en una cámara de

provocación. En esta situación si la PPBE resultaba negativa, el tiempo de exposición se incrementaba en días sucesivos, hasta una exposición máxima de 2h por día. La respuesta clínica y funcional y los criterios para establecer positividad fueron los mencionados anteriormente.

3.1.5. PRUEBAS DE FUNCIÓN PULMONAR

La prueba de función pulmonar se llevó a cabo en un sistema MasterLab (MasterLab, Jaeger, Alemania) de acuerdo con las directrices de la European Respiratory Society. Los valores de referencia usados en la espirometría forzada fueron los propuestos para la población mediterránea. Para el estudio de difusión, se usó la capacidad de difusión pulmonar de monóxido de carbono con respiración única. Los valores teóricos fueron aquellos propuestos por la European Respiratory Society. A partir de 2006 se usaron las guías conjuntas de European Respiratory Society / American Thoracic Society.

3.1.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La prueba de Mann-Whitney y la prueba de chi-cuadrado se aplicaron para comparar variables continuas y nominales, respectivamente, con un nivel de significancia de 0.05. La consistencia de la PPBE se estimó evaluando la sensibilidad y especificidad, los valores predictivos positivos y negativos, y la razón de verosimilitud de un valor positivo y negativo con intervalos de confianza del 95% utilizando el método Wilson. Las curvas ROC se construyeron para determinar los valores límite que mejor diferencian entre tener la enfermedad o no. Todos los análisis se realizaron con SPSS, versión 17 (Chicago, IL, EE. UU.) y SAS versión 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EE. UU.).

3.2. ESTUDIO 2. MODELO ANIMAL DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD AGUDA Y CRÓNICA.

Para el segundo estudio, se diseñaron dos modelos animales uno para neumonitis por hipersensibilidad aguda y otro para NH crónica, siguiendo la siguiente metodología.

3.2.1. SOLUCIÓN ANTIGÉNICA

Se usó suero de paloma comercial (Rockland Immunochemicals Inc. Limerick, Ireland) que contiene 15.500 µg/ml de proteínas. Con este suero, se prepararon alícuotas con una concentración de 200 µg proteína / ml.

3.2.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y GRUPOS DE ESTUDIO

Para cada uno de los grupos de NH, se usaron ratones macho de la cepa C57/Bl6 (>20g, 3 semanas de edad) de los laboratorios Harlan (Horst; The Netherlands). Los ratones se depositaron en jaulas con un filtro superior y se sometieron a ciclos de luz/oscuridad de 12h; recibieron agua ligeramente acidulada y pienso (Teklad 2014, Harlan Laboratories, Indianápolis, IN) *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético para Experimentación Animal del Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Los diferentes grupos murinos fueron: AC/SAL y CR/SAL, para los grupos control, y AC/PS y CR/PS para los grupos tratados; la primera abreviación hace referencia a modelo agudo (AC) o crónico (CR) y la segunda al agente administrado vía intranasal: suero salino (SAL) o suero de paloma (PS). Se formó un grupo para cada período de tiempo: 24h, 1 semana y 2 semanas, formado cada uno por 6-8 ratones (figura 15).

3.2.3. MODELO MURINO DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD AGUDA Y CRÓNICA

En los días -3 y -1, se inmunizaron y estimularon los ratones mediante dos inyecciones intraperitoneales de 100µl de suero de paloma comercial (200 µg proteína / ml) o placebo (suero salino (NaCl) al 0.9%). El primer día, bajo anestesia con isofluorano (Forane, Abbott Laboratories, Madrid, Spain), se realizó instilaciones intranasales con 40µl de suero de paloma (200 µg proteína / ml) o placebo (suero salino (NaCl) al 0.9%) (exposición). La instilación intranasal se llevó a cabo 3 días a la semana durante 3 o 12 semanas, dependiendo de si se trataba del modelo agudo o crónico de neumonitis por hipersensibilidad. Los ratones se sacrificaron a las 24h, a la semana y a las 2 semanas de la última exposición.

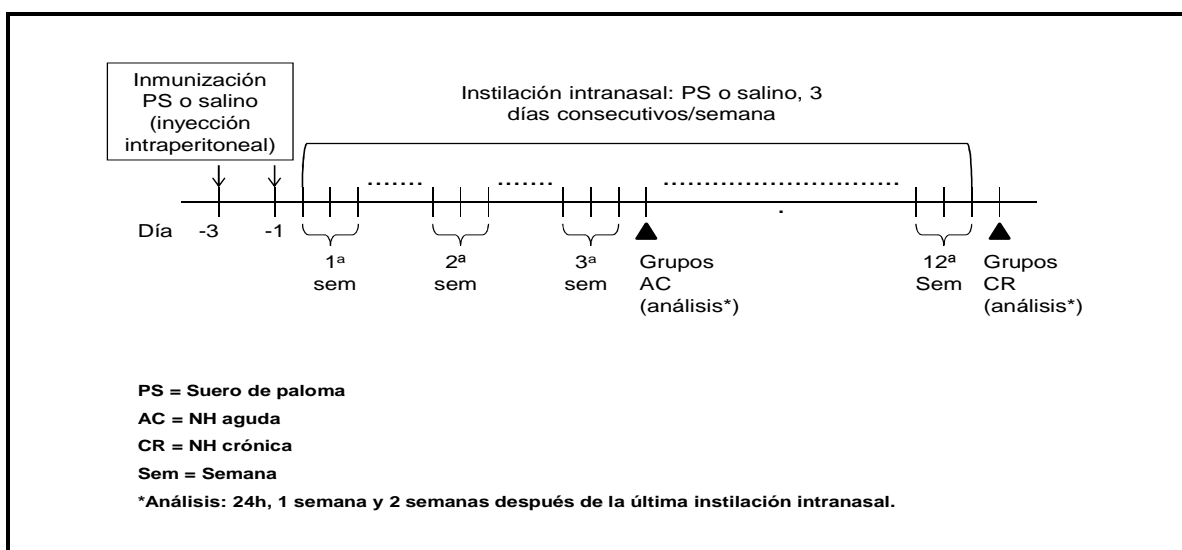


FIGURA 15. Diagrama esquemático del protocolo experimental y grupos experimentales. Se crearon 4 grupos experimentales. Protocolos para la inmunización por inyección intraperitoneal con suero de paloma (PS) o solución salina (SAL) y posterior exposición a PS o SAL por instilación intranasal 3 días a la semana durante 3 semanas (modelo agudo) y 12 semanas (modelo crónico). Los ratones se sacrificaron 24 h, 1 semana y 2 semanas después de la última instilación intranasal de PS o SAL.

3.2.4. MEDIDA DE LA FUNCIÓN PULMONAR: CAPACIDAD PULMONAR TOTAL (TLC)

La función pulmonar se midió en cada grupo 24h, 1 semana y 2 semanas después de la última instilación intranasal usando una técnica de oscilación forzada (FOT) mediante un sistema Flexivent (SCIREQ Scientific Respiratory Products Inc., Montreal, Canada) (figura 16). Los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital (70 mg/kg) (Nembutal, Abbot Laboratories). Tras la anestesia, se realizó traqueotomía y se conectaron a un ventilador controlado por un ordenador. La medida de la TLC se llevó a cabo mediante un protocolo estándar que consistía en una insuflación pulmonar profunda a una presión en torno a 30cmH₂O seguida de una apnea de unos segundos de duración.



FIGURA 16. Imagen Flexivent SCIREQ (Scientific Respiratory Products Inc., Montreal, Canada)

3.2.5. ANTICUERPOS IGG ESPECÍFICOS

Después de la medición de la TLC, se extrajo sangre mediante punción cardíaca. Se obtuvieron muestras de suero y se almacenaron a -80°C para posteriores análisis. Se midió la IgG específica para suero de paloma mediante un método ELISA. Se incubaron los pocillos de placas de microtitulación de alta unión (Costar®, Corning NY) con 1.3 µg de proteína PS / pocillo en Na₂CO₃ 0,2 M / NaHCO₃, pH 9,6, a 4°C durante la noche. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato 0,1 M, pH 7,5 / Tween 20 al 0,005%) y se bloquearon con solución salina tamponada con fosfato / albúmina de suero bovino al 1% durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron tres veces entre los diferentes pasos; los ensayos de IgG específicos se realizaron por duplicado mediante la incubación de las muestras de suero a una dilución adecuada durante 1 hora a 37°C. Se añadió una solución de IgG antimurina marcada con peroxidasa (Lote N° A90-116P-31, Bethyl Laboratories Inc., EE.UU.) diluida a 1: 15000 y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. La reacción se desarrolló con 3,3', 5,5'-tetrametil-bencidina (Sigma Chemicals), 3% de H₂O₂ durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, se detuvo con H₂SO₄ 2 M, y se midió la densidad óptica a 450nm con un lector de microplacas (lector de microplacas Thermo / LabSystems Multiskan EX, Artisan Technology Group, Champaign, EE. UU.).

3.2.6. LAVADO BRONCOALVEOLAR: RECUENTO CELULAR

Tras la obtención de muestras sanguíneas, se realizó el lavado broncoalveolar. Se realizó el lavado pulmonar 3 veces con 0.7 ml de suero salino (0.9% NaCl) y posteriormente con líquido de preservación. Se realizó recuento de células totales utilizando un hemocitómetro (figura 17) y el LBA se centrifugó (1000 g, 10 minutos). El sobrenadante se congeló (-80°C) para posteriores análisis. Para realizar el recuento diferencial de células, se centrifugaron 250 ml de células resuspendidas (100 000 células/ml; 1400 g, 6 minutos) (Cytospin 3, Shandon,

Thermo Scientific, Cheshire, United Kingdom) sobre portaobjetos, se secaron al aire y se tiñeron [May-Grünwald, 5 min (QCA; Tarragona, Spain) y Giemsa, 15 min (Merck, Darmstadt, Germany)]. Se realizó el recuento del número de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos sobre 500 células para cada muestra.

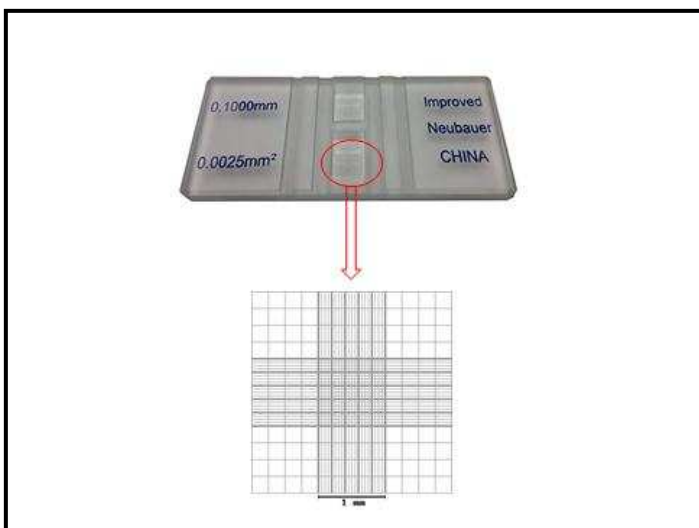


FIGURA 17. Hemocitómetro

3.2.7. LAVADO BRONCOALVEOLAR: CITOCINAS Y QUIMIOCINAS

Se midieron los niveles de interferon-gamma (IFN γ) e interleuquina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17A en la primera fracción de LBA no diluido mediante un panel magnético para citoquinas murinas según las instrucciones del fabricante (Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Group I 7-plex Assay, Bio-Rad Laboratories S.A.; Madrid, Spain). Los límites de detección fueron (pg/ml) 2.62, 3.3, 7.53, 2.02, 1.66, 4.74 and 3.14 para IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17A, respectivamente.

3.2.8. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Después del LBA, se instiló el pulmón derecho con formaldehído 3.7-4.0% hasta que se consideró que todos los lóbulos estaban completamente inflados por inspección visual. La instilación siempre fue realizada por la misma persona y en condiciones homogéneas. Las secciones se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones delgadas y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las secciones fueron evaluadas de forma ciega bajo microscopio óptico por un patólogo experimentado. El pulmón izquierdo se congeló directamente en nitrógeno líquido preservado para futuros estudios.

3.2.9. ANÁLISIS DE DATOS

Todos los datos se presentan como media + error estándar de la media (SEM) y se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney (Graphpad Prism 4.01, Graphpad Software Inc, San Diego, EE. UU.). Un nivel de $p < 0.05$ se consideró significativo.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO 1. RENTABILIDAD DIAGNÓSTICA DE LA PRUEBA DE PROVOCACIÓN BRONQUIAL ESPECÍFICA.

De los 136 pacientes originales con sospecha de neumonitis por hipersensibilidad referidos para realización de PPBE, 23 fueron excluidos. La prueba no se realizó en cuatro pacientes debido a una TLCO < 40%, y en los otros 19 no se disponía de datos clínicos. Entre los 113 sujetos que se sometieron a la prueba, la PPBE fue positiva para los agentes evaluados en 68 pacientes, 64 de los cuales fueron diagnosticados de neumonitis por hipersensibilidad (grupo 1). En los cuatro pacientes restantes (grupo 2) el resultado de la PPBE se consideró falso positivo, y se les diagnosticó de bronquiolitis, neumonía organizada criptogénica debido a la exposición a orto-fenilendiamina, sarcoidosis y hem siderosis pulmonar idiopática. En el grupo con PPBE negativa (n=45), 24 pacientes recibieron un diagnóstico de neumonitis por hipersensibilidad y se consideraron falsos negativos (grupo 3), y 21 pacientes fueron diagnosticados con otras enfermedades respiratorias: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (n=5), fibrosis pulmonar idiopática (n=4), bronquiectasia (n=4), bronquiolitis (n=3), silicosis (n=1), poliangeitis microscópica (n=1), sarcoidosis (n=1), neumonía intersticial inespecífica (n=1) y asma (n=1) (grupo 4) (figura 1). Ninguno de los pacientes en el grupo 4 presentó síntomas o deterioro de la función pulmonar durante la prueba (figura 18).

Los datos demográficos y las características clínicas de la serie total y los pacientes del grupo 1 y del grupo 3 se muestran en la tabla 12. La edad de los pacientes y el porcentaje de no fumadores fueron significativamente más altos en el grupo 3 que en el grupo 1 ($p=0.004$ y $p=0.003$, respectivamente). En el grupo 3, el 58.3% de la neumonitis por hipersensibilidad no fueron causadas por proteínas aviares o fúngicas, mientras que en el grupo 1 sólo el 11% de los casos no fueron causados por estos agentes ($p<0.001$). Los agentes etiológicos no fúngicos/ no aviares de estas neumonitis fueron isocianatos (n=3); esparto (n=2); madera (n=2), *metalworking fluid* (n=1), prótesis dental (n=1) e interferón (n=1). En 11 pacientes no se encontró el antígeno causal. En estos 11 pacientes, se realizó

PPBE a varios antígenos sospechosos, pero no se registraron resultados positivos.

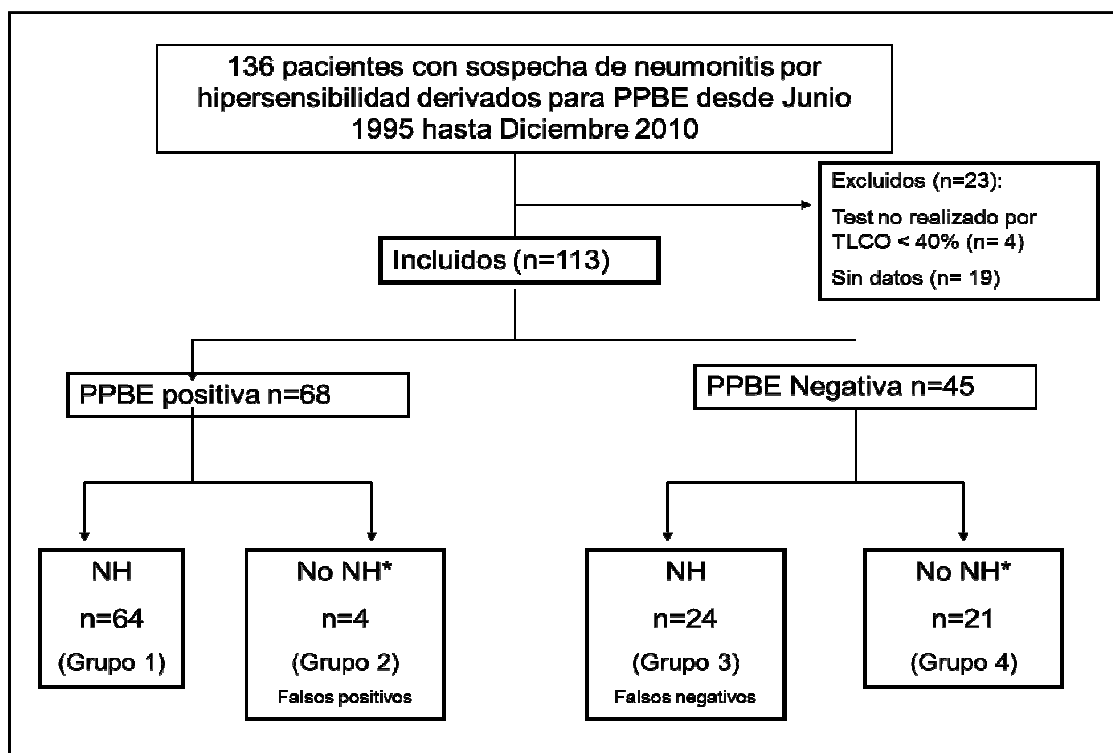


FIGURA 18. Diagrama de flujo de la población a estudio. PPBE=prueba de provocación bronquial específica. DLco= test de transferencia del monóxido de carbono. NH= neumonitis por hipersensibilidad. *Diagnósticos en el texto.

TABLA 12. Datos demográficos y características clínicas de los sujetos del estudio.

	Total (n = 113)	Grupo 1 (n = 64)	Grupo 3 (n = 24)
Edad*, años	52 (14.8)	50 (14.6)**	59.5 (13.8)**
Sexo, Varón (%)	49 (43.4%)	28 (43.8%)	10 (41.7%)
Tiempo exposición hasta la PPBE*, meses	170 (168)	171 (167)	159.6 (179)

Tiempo con síntomas antes de la PPBE*, meses	37.2 (45.5)	42.5 (52.5)	22.82 (19.2)
Tabaco: n (%)		***	***
Fumador	19 (18.1%)	13 (22%)	2 (9.1%)
No fumador	56 (53.3%)	24 (40.7%)	18 (81.8%)
Exfumador	30 (28.6%)	22 (37.3%)	2 (9.1%)
% Linfocitos en LBA*	22.4 (21.3)	25 (23.7)	24 (18.9)
FVC previa a la PPBE, %*	79.3 (16.6)	78.75 (18.2)	75.7 (13.8)
FEV1 previa a la PPBE, %*	86.4 (18.2)	83.60 (18.0)	88 (18.8)
FEV1/FVC% before SIC*	81.3 (13.8)	81.6 (8.8)	82.2 (19.0)
TLC previa a la PPBE, %*	86.9 (16.6)	86.4 (19.1)	85.7 (12.0)
TlCO previa a la PPBE, %*	71.3 (21.7)	70 (23.4)	71.2 (18.9)
TC tórax: n (%)			
Normal	10 (9.6%)	6 (10%)	2 (9.1%)
Nodulillar	15 (14.4%)	11 (18.3%)	1 (4.5%)
Reticular	5 (4.8%)	3 (5%)	2 (9.14.7%)
NIU	19 (18.3%)	9 (15%)	7 (31.8%)
Vidrio deslustrado	39 (37.5%)	24 (40%)	10 (45.5%)
Emfisema	6 (5.8%)	2 (3.3%)	0
	10 (9.6%)	5 (8.3%)	0

Bronquiectasias			
Ag PPBE: n (%)			
Proteínas aviares	65 (57.5%)	34 (53.1%)	17 (70.8%)
Hongos	30 (26.5%)	23 (35.9%)	4 (16.7%)
Otros	18 (15.9%)	7 (10.9%)	3 (12.5%)
Diagnóstico Final: ^F			
NH aviar	43 (38.1%)	34 (53.1%)	9 (37.5%)
NH por hongos	24 (21.2%)	23 (35.9%)	1 (4.2%)
NH por otros Ag	21 (18.6%)	7 (10.9%)	14 (58.3%)
No NH	25 (22.1%)		

*Media (SD); ** $p=0.004$; *** $p=0.003$; ^F $p<0.001$; PPBE: Prueba de provocación bronquial específica; LBA: Lavado broncoalveolar; NIU: Neumonía intersticial Usual; FVC: capacidad vital forzada; FEV1: volumen espiratorio forzado en el 1º Segundo; TLC: capacidad pulmonar total; TLCO: test de transferencia del monóxido de carbono; Ag: antígeno; NH: neumonitis por hipersensibilidad.

La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de la PPBE de acuerdo con los criterios establecidos de positividad (FVC, TLCO y temperatura) se muestran en la tabla 13, con un intervalo de confianza del 95%. La sensibilidad y el valor predictivo negativo de la prueba fueron mayores en aquellos pacientes con neumonitis por hipersensibilidad causada por proteínas aviares o fúngicas. Las curvas ROC (figura 19) muestran las diferencias más relevantes en FVC, TLCO y temperatura antes y después de la PPBE para predecir positividad de la prueba. Usando la curva ROC, encontramos que una disminución de FVC de más del 10% mostraba la mejor sensibilidad (45.5%, IC 95% 35.5-55.8) y la especificidad (88%, IC 95% 70-95.8) para el diagnóstico de neumonitis por hipersensibilidad. Para TLCO, una disminución post-PPBE superior al 15% dio como resultado una sensibilidad del 45.5% (IC 95% 35.5-55.8) y especificidad del 76% (IC 95% 56.6-88.5). En cuanto a la temperatura, un

aumento superior a 0.5°C después de la prueba daba una sensibilidad de 37.5% (IC 95% 28.1-47.9) y especificidad de 72% (IC del 95%: 52,4 a 85,7).

TABLA 13. Rendimiento diagnóstico de la PPBE.

	Todas las PPBE n =113 Prevalencia 78%	PPBE a proteínas aviares y fúngicas n =95 Prevalencia 73%
Sujetos	113	95
Prevalencia	78	73
Sensibilidad (%)	72.7 (62.6 – 80.9)	85.1 (74.7-91.7)
Especificidad (%)	84.0 (65.3 – 93.6)	86.2 (69.4-94.5)
VPP (%)	94.0 (85.8 – 97.7)	93.4 (84.3-97.4)
VPN (%)	46.6 (32.9 – 60.9)	71.4 (54.9-83.7)
LR+	4.6 (1.8 - 11.3)	5.32 (2.15 - 13.13)
LR-	0.3 (0.23 - 0.5)	0.18 (0.10 to 0.32)

Los datos se presentan con intervalos de confianza del 95%. VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo. LR +: relación de verosimilitud positiva; LR-: relación de verosimilitud negativa.

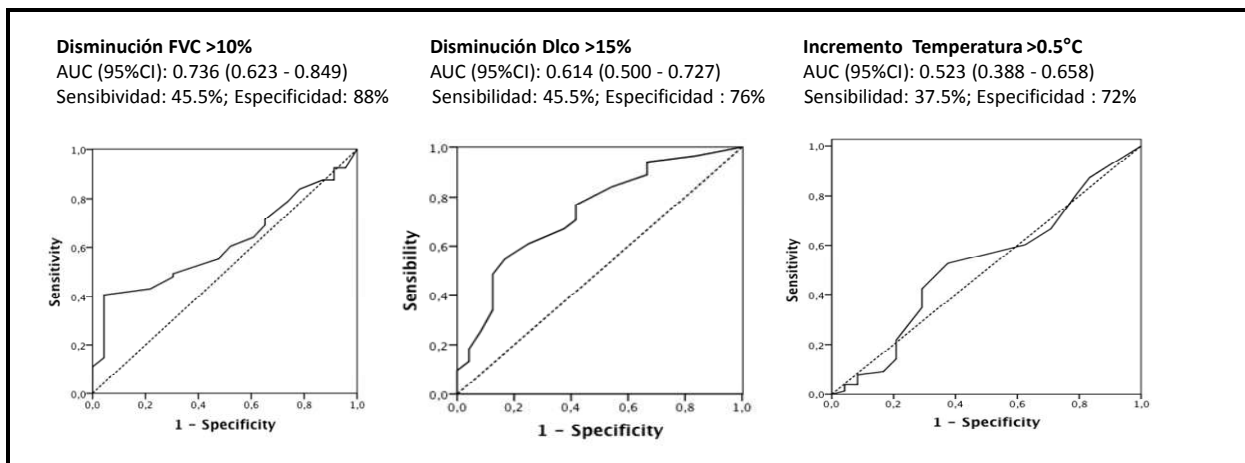


FIGURA 19. Curvas ROC construidas para determinar las diferencias más relevantes en la capacidad vital forzada (CVF), la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO), y temperatura antes y después de la prueba de provocación bronquial específica para predecir neumonitis por hipersensibilidad. AUC: área bajo la curva.

Nueve pacientes (8%) experimentaron reacciones graves relacionadas con la PPBE. Estos incluyen síntomas gripales en todos los casos, con fiebre de hasta 40°C en un paciente, hipoxemia con una disminución de 10mmHg de la presión parcial arterial de oxígeno (pO₂) en otro paciente, y el desarrollo de nuevos cambios radiológicos en otro. Todas estas reacciones graves fueron transitorias, y sólo los tres pacientes mencionados requirieron administración de corticosteroides orales. Ninguno requirió ingreso hospitalario. En comparación con los pacientes que no presentaron reacciones graves, estos nueve pacientes eran más jóvenes (edad media ± DE 39.56±13.07 versus 53.29±14.48 años; p=0.009) y TLCO pre-PPBE mayor (94.28±17.44% versus 69.67±21.17% del valor teórico; p=0.005). No hubo diferencias significativas en las demás variables analizadas.

4.2. ESTUDIO 2. MODELO ANIMAL DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD AGUDA Y CRÓNICA.

4.2.1. MEDICIÓN DE LA FUNCIÓN PULMONAR: CAPACIDAD PULMONAR TOTAL.

La capacidad pulmonar total se muestra en la figura 20. En el grupo AC / PS se observó una caída en la TLC una semana después de la última instilación intranasal ($p < 0,01$) en comparación con los valores obtenidos 24 h después de la última instilación intranasal. Esta caída se recupera progresivamente dos semanas después de la instilación intranasal ($p < 0,01$). En el grupo CR / PS, la disminución en la TLC es más marcada y constante en comparación con los valores obtenidos en el grupo AC / PS 24 h después de la última instilación intranasal ($p < 0,001$). En este grupo, los valores de TLC no se recuperan 1 semana o 2 semanas después de la última instilación intranasal ($p = ns$).

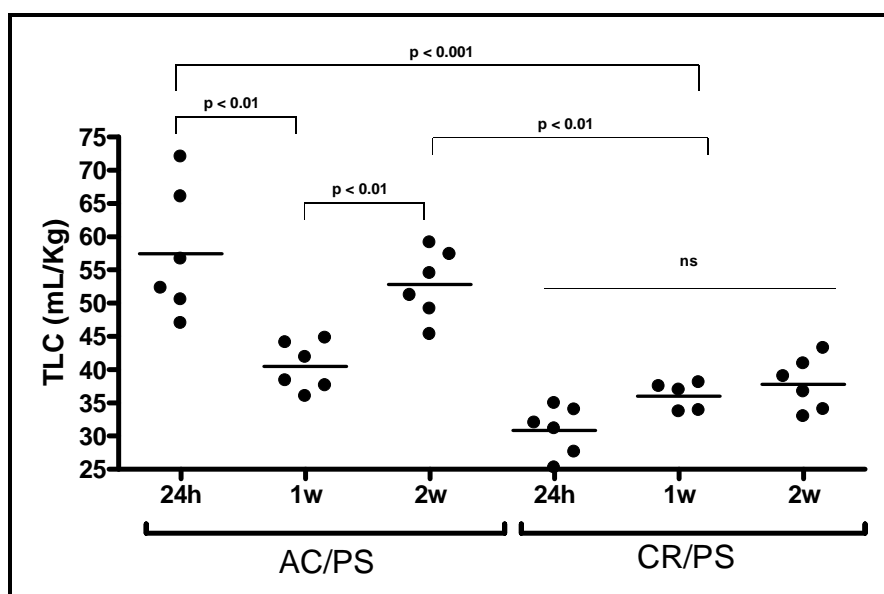


FIGURA 20. Capacidad pulmonar total (TLC) expresada como área bajo la curva (AUC) 24 h, 1 semana y 2 semanas después de la última instilación intranasal. Los grupos experimentales fueron AC / PS y CR / PS y consistieron en 5-8 ratones por grupo. La primera abreviatura se refiere al modelo agudo (AC) o crónico (CR) y el segundo al agente administrado por instilación intranasal: suero de paloma (PS).

4.2.2. INMUNOGLOBULINA G ESPECÍFICA SÉRICA

La figura 21 muestra los niveles de IgG específica en los diferentes momentos evaluados. Los grupos AC / PS y CR / PS mostraron altos niveles de IgG específica en suero, 24 h, 1 semana y 2 semanas después de la última instilación intranasal en comparación con los grupos de control (AC / SAL y CR / SAL) ($p < 0.0001$). Además, los niveles de IgG específica fueron significativamente mayores en los grupos CR / PS en comparación con los grupos AC / PS en los diferentes puntos temporales ($p = 0.003$, 0.006 y 0.004 a las 24 h, 1 semana y 2 semanas después de la última instilación intranasal, respectivamente).

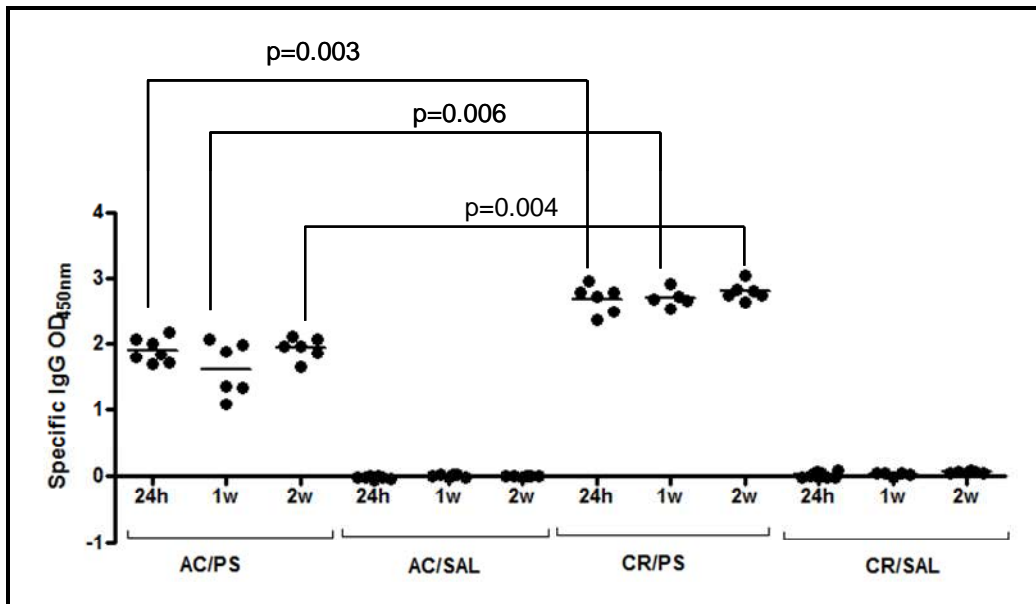


FIGURA 21. Niveles específicos de IgG en suero de ratones 24 h, 1 semana y 2 semanas después de la última instilación intranasal. Los grupos experimentales son los mismos que en la Figura 20. Los grupos AC / PS y CR / PS mostraron altos niveles de IgG específica en suero, 24 h, 1 semana y 2 semanas después de la última instilación intranasal en comparación con los grupos control (AC / SAL y CR / SAL) ($p < 0,0001$).

4.2.3. LAVADO BRONCOALVEOLAR: RECUESTO CELULAR

El número de células totales en líquido de LBA mostró aumentos significativos en los grupos AC / PS y CR / PS en comparación con los respectivos grupos de control AC / SAL y CR / SAL ($p < 0.01$), excepto para los grupos CR / PS y CR / SAL 2 semanas después de la instilación intranasal ($p = 0.2$). Además, el número de células totales fue mayor en los grupos CR / PS en comparación con los grupos AC / PS en los diferentes momentos (figura 22 A).

En los grupos CR / PS, se observó un aumento en el número de neutrófilos en comparación con el grupo control (CR / SAL) ($p < 0.01$). Estos neutrófilos mostraron una tendencia hacia una disminución 1 semana y 2 semanas después de la instilación intranasal. Como ocurre en el número total de células, el número de neutrófilos fue mayor en los grupos CR / PS en comparación con los grupos AC / PS (figura 22 B).

Se observó un aumento en el número de eosinófilos en el grupo AC / PS en comparación con el grupo control (AC / SAL) 24 h y 1 semana después de la instilación intranasal ($p < 0.0001$). Estos eosinófilos mostraron una tendencia hacia una disminución 2 semanas después de la instilación intranasal. No se observaron eosinófilos en los grupos CR / PS (figura 22 C).

Por último, en los grupos AC / PS y CR / PS se observó un aumento en el número de linfocitos en comparación con los grupos control (AC / SAL y CR / SAL) ($p < 0.05$). Este aumento fue mucho más pronunciado en el grupo CR / PS, especialmente 24 h después de la última instilación intranasal (figura 22 D).

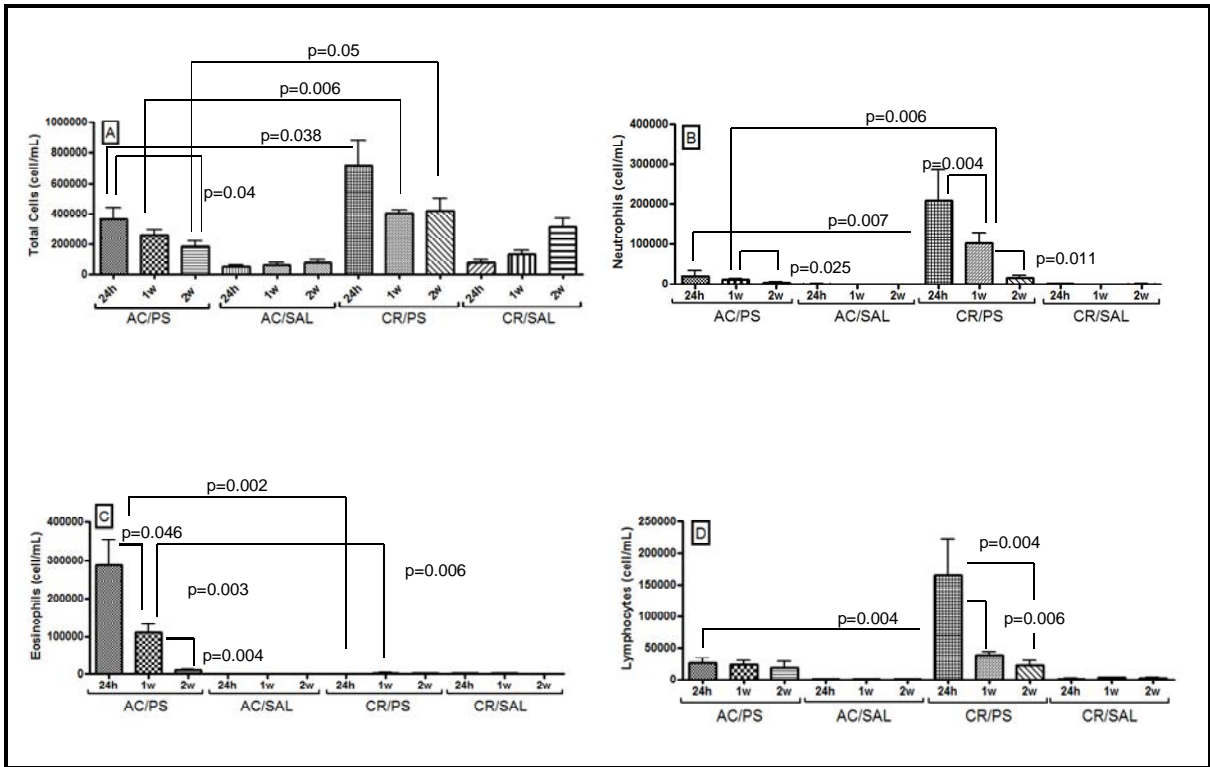


FIGURA 22. La población celular en el LBA se obtuvo 24 horas, 1 semana y 2 semanas después de la última instilación intranasal. Los grupos experimentales son los mismos que en la Figura 20. Células totales (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C) y linfocitos (D).

4.2.4. LAVADO BRONCOALVEOLAR: CITOCINAS

Los niveles de citocinas IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 A e IL-2 se detectaron en el LBA y se muestran en la Figura 23. La IL-4 sólo se detectó en el grupo AC / PS 24 h después de la última instilación intranasal y el IFN γ no fue detectado (datos no mostrados).

En los grupos AC / PS y CR / PS, los niveles de IL5 fueron significativamente mayores 24 horas y 1 semana después de la instilación intranasal en comparación con el grupo control ($p < 0.01$). Esta citosina tiende a disminuir 2 semanas después de la última instilación intranasal en el grupo AC / PS ($p < 0.01$) pero no en el grupo CR / PS (figura 24 A).

La IL-10 estaba por debajo del límite de detección en los grupos de control (AC / SAL y CR / SAL). En el grupo AC / PS esta citoquina no se detectó 24 h después de la última instilación intranasal, pero hubo un aumento 1 y 2 semanas después de la última instilación intranasal. En el grupo CR / PS, este aumento fue más notable (figura 24 B).

Hubo una tendencia a un aumento en los niveles de IL-13 en el grupo CR / PS. Este aumento fue más notable 2 semanas después de la última instilación intranasal en comparación con el grupo CR / SAL ($p < 0.01$) (figura 24 C).

La IL-17A se detectó principalmente en el grupo CR / PS que muestra un aumento en comparación con el grupo control ($p < 0.001$) (figura 24 D).

Finalmente, en el grupo AC / PS hubo un aumento en los niveles de la IL-2 una y dos semanas después de la última instilación intranasal ($p < 0.01$) aunque este aumento también se observó en el grupo AC / SAL al mismo tiempo ($p < 0.01$). Los niveles de esta citocina tienden a disminuir en los grupos crónicos.

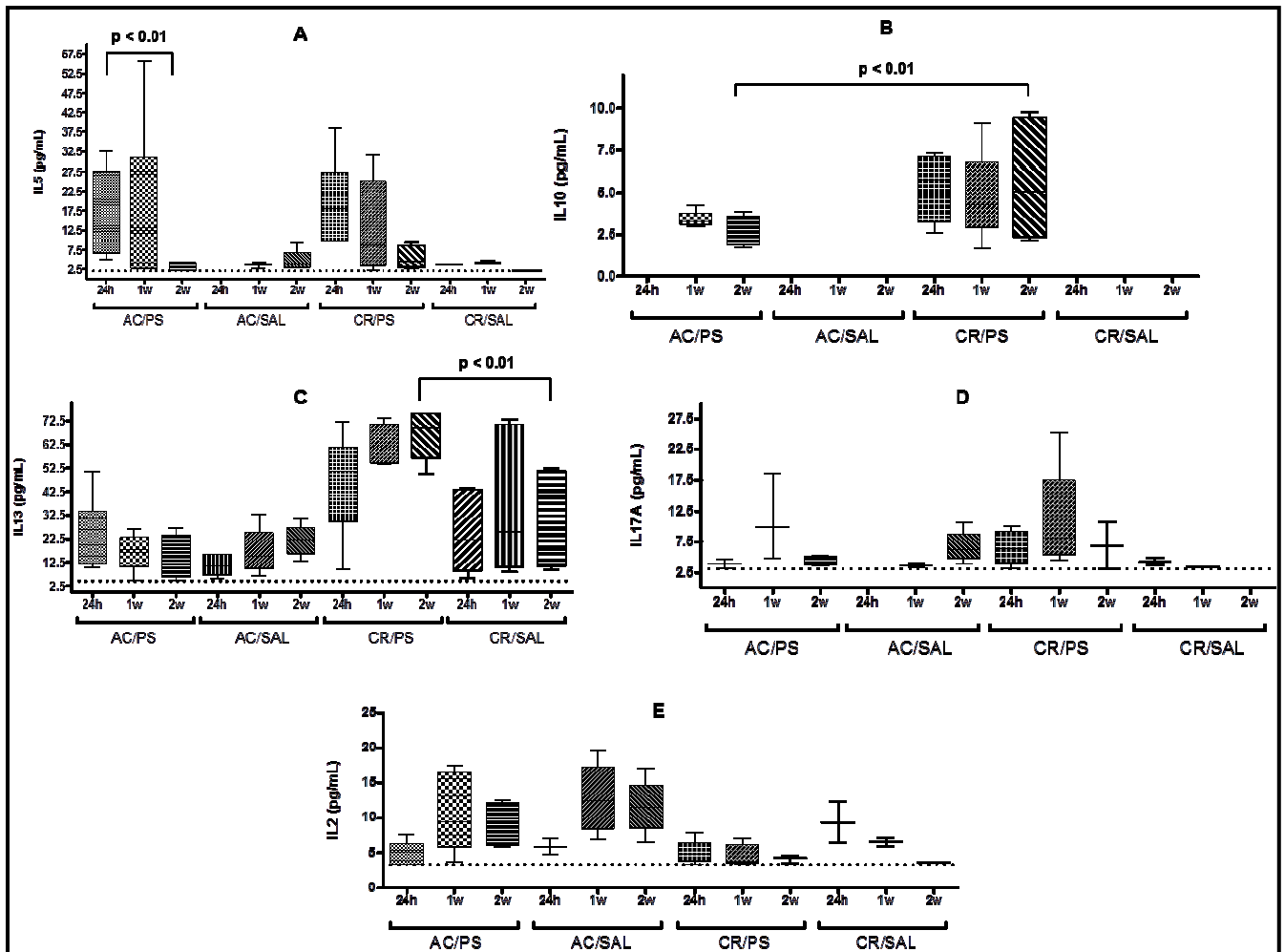


FIGURA 24. Los niveles de interleuquinas-2 (IL-2), IL-5, IL-10, IL-13 e IL-17A en LBA se obtuvieron 24 h, 1 semana y 2 semanas después de la última instilación intranasal. Los grupos experimentales son los mismos que en la Figura 20.

4.2.5. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

El estudio histopatológico de los grupos control (AC / SAL y CR / SAL) muestra cambios poco relevantes (figura 25 A y E). Las secciones de los grupos AC / PS muestran una inflamación predominante perivascular y peribronquiolar que incluye neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas, con edema centrolobulillar e inflamación subpleural. Se observan bajos números de macrófagos alveolares. La neumonitis intersticial mixta parcheada también se observa, sin fibrosis obvia. El

grado de inflamación disminuye con el tiempo después de la última inhalación (figura 25 B, C y D).

En los grupos CR / PS los cambios fueron mayores (figura 25 F, G y H). Se observó una inflamación parcial irregular debajo de la serosa y el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT). También se observó hiperplasia e inflamación mixta que incluyen linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos que rodean los vasos centrolobulillares y los bronquiolos, junto con el edema perivascular y peribronquiolar. El intersticio también muestra una leve inflamación mixta. Se identifican abundantes macrófagos alveolares pero sin formación de granulomas ni fibrosis obvia. Los cambios persistieron con el tiempo a pesar de que no hubo exposición, pero después de 2 semanas de la última inhalación no se observó la presencia de neutrófilos en las muestras histológicas. No se observó fibrosis o depósito de colágeno.

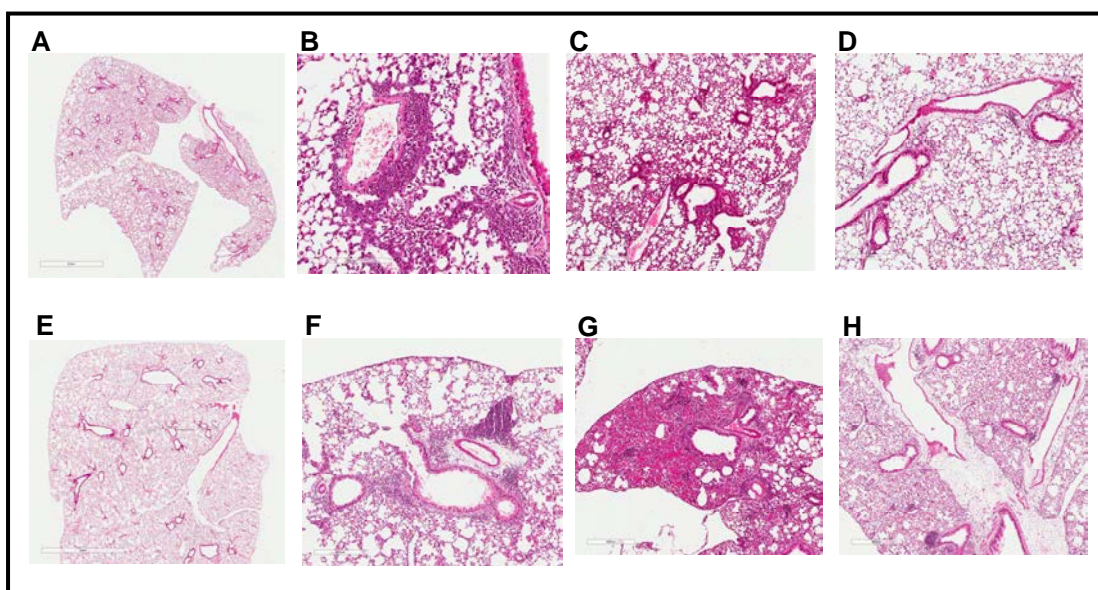


FIGURA 25. Histología pulmonar. Imágenes representativas de secciones pulmonares histológicas teñidas con hematoxilina-eosina. Los grupos experimentales en esta figura están representados con secciones de grupos de control (A y E) y grupos agudos (AC) y Crónicos (CR) evaluados 24 h (B y F), 1 semana (C y G) y 2 semanas (D y H) después de la última instilación intranasal.

5. DISCUSIÓN

Los resultados del primer estudio de la presente tesis demuestran que la PPBE puede ser una herramienta útil y segura para el diagnóstico de NH con un valor predictivo positivo del 94% y un valor predictivo negativo de 46.6% cuando se analizan el conjunto de pruebas y del 74,4% cuando se analizan exclusivamente las pruebas realizadas con antígenos aviares o fúngicos. Se trata del primer estudio que, con un amplio número de efectivos, evalúa la rentabilidad de la prueba en el contexto de la práctica clínica habitual e independientemente del agente causal de NH.

Si bien desde la década de los 60 se ha utilizado la PPBE para el diagnóstico de las NH, no fue hasta 1980 cuando Hendrick et al¹³⁷ estudiando 29 pacientes con sospecha de NH producida por agentes aviares intentaron averiguar la rentabilidad de esta prueba en el diagnóstico de esta entidad. Dichos autores hallaron una sensibilidad entre el 48-85% con una especificidad del 95%. También en el contexto de las NH causadas por antígenos aviares, Ramírez-Venegas et al¹³⁸, al estudiar 17 pacientes con NH crónica y 17 pacientes con otra enfermedad intersticial pulmonar hallaron una sensibilidad y especificidad del 82-86% y 76-100% respectivamente, mientras que Ohtani et al¹³⁹ no hallaba falsos negativos al estudiar 11 pacientes con PCA y 6 sujetos control. Finalmente, la mayor serie hasta ahora, también realizada en pacientes con PCA, muestra una sensibilidad y especificidad del 92% y 100% respectivamente al estudiar 59 pacientes con NH, 30 cuidadores de aves sanos y 20 pacientes con otras enfermedades difusas intersticiales¹⁷.

Uno de los resultados más destacados de este primer estudio de la tesis ha sido el elevado número de falsos negativos observados. Efectivamente, en 24 pacientes con NH, la PPBE fue negativa. Dos aspectos son los que podrían explicar esta observación. En primer lugar, es importante mencionar que el presente estudio está basado en la práctica clínica habitual, a diferencia de los trabajos anteriormente comentados¹³⁷⁻¹³⁹, en los que la protocolización del estudio obviamente puede condicionar los resultados. En segundo lugar, y probablemente más determinante, es el hecho que en este estudio se incluye todo tipo de NH, independientemente del agente causal. En este sentido nuestro grupo tiene

amplia experiencia en la realización de la PPBE cuando los agentes causales son proteínas aviarias¹⁷ u hongos^{23,154-155}, siendo más escasa, cuando los agentes causantes de NH no son los habituales. Este hecho queda demostrado cuando al analizar exclusivamente los pacientes con NH causada por aves u hongos el número de falsos negativos es sólo de 10 y la sensibilidad de la prueba asciende hasta un 85%. Finalmente, hay un alto porcentaje de pacientes con neumonía intersticial usual en el grupo de falsos negativos (31.8%). Estos pacientes con fibrosis crónica tienden a tener menos infiltrados de células inflamatorias, lo que indica quizás que la prueba puede no ser útil para este subgrupo⁹⁵. No sabemos el efecto que la edad y el hábito tabáquico pueden tener sobre la positividad o la negatividad de la PPBE.

Uno de los principales problemas en la implantación definitiva de la PPBE en el diagnóstico de la NH puede que se deba a que no existe una metodología bien definida de como realizarla. Este hecho, es el que probablemente también ha condicionado la diferencia entre falsos negativos observada en este primer estudio en función del agente con el que se realiza la PPBE. Efectivamente, 3 métodos se han propuesto para la realización de la PPBE. Algunos autores sostienen que la exposición natural en el lugar de trabajo o en el hogar es una forma razonable de provocar síntomas o deterioro de los parámetros funcionales en casos poco claros de NH⁸¹. Cuando sea posible, puede ser recomendable tratar de reproducir las condiciones ambientales o de trabajo en una cámara de provocación. Este método no se ha utilizado ampliamente¹⁵⁶⁻¹⁵⁷ y aunque no identifica concluyentemente el agente causal, sus ventajas son que puede ser más fácil de estandarizar y también puede ser más seguro, ya que está supervisado en todo momento por el personal sanitario y las condiciones de exposición pueden ser controladas. El tercer método consiste en utilizar extracto del agente causal sospechado aerosolizado. Este método es probablemente el más utilizado ya que es uno de los primeros descritos¹⁵⁸. De hecho, cuando el agente causal son proteínas aviarias u hongos, nuestro grupo realiza la PPBE siguiendo estas indicaciones con algunos cambios en relación a las otras series¹³⁷⁻¹³⁹. Es importante comentar que la forma de realizar la PPBE por nuestro grupo está encaminada a intentar realizar un diagnóstico correcto sometiendo al

paciente a los mínimos riesgos posibles. En este sentido, el nivel de exposición al antígeno es probablemente menor que en los otros grupos. Por ejemplo, la máxima exposición en los estudios de Otani et al¹³⁹ era de 680 ug proteínas, mientras que en nuestro grupo, la dosis máxima es de 200 ug proteínas. Esto condiciona que se produzcan menos síntomas respiratorios y sistémicos y que las posibles alteraciones de la función pulmonar sean rápidamente reversibles.

Relacionado con esta última observación, otro aspecto crítico es cómo evaluar la positividad de la PPBE. Mientras que Hendrick et al¹³⁷ y Otani et al¹³⁹ consideraban básicamente el test como positivo si aparecían síntomas y signos gripales (*influenza-like*), otros grupos dan más importancia a los datos objetivos que a los aspectos clínicos. En este sentido, mientras que Ramirez-Venegas¹³⁸, consideran la prueba positiva cuando observan un descenso de la FVC > 16% o un descenso de la PaO₂ > 3 mmHg o un descenso de la Saturación de O₂ > 3% o un aumento de la temperatura corporal > 0.5°C, nuestro grupo le da más valor a los estudios de función pulmonar^{17,79}. Aplicando el criterio de positividad cuando se constata un descenso del FVC > 15%, o un descenso de la TLCO > 20% o un descenso de la FVC entre un 10-15% conjuntamente con un aumento de la temperatura corporal > 0.5°C se obtiene una buena sensibilidad y especificidad sobretodo cuando la prueba se realiza con antígenos aviares o fúngicos. Al testar separadamente descensos de la FVC, de la TLCO o incrementos en la temperatura corporal, se obtienen buenas especificidades pero bajas sensibilidades. Es por este motivo, que creemos que la valoración conjunta de estos parámetros ofrece la mejor rentabilidad de la prueba.

Otro aspecto importante a tener en cuenta para recomendar la realización de la PPBE en el diagnóstico de las NH, al menos utilizando un método de baja exposición antigénica como el que describimos, es el escaso número de efectos adversos observados. Efectivamente, tan sólo 9 pacientes presentaron efectos adversos que fueron transitorios y que sólo en tres pacientes fue necesario administrar corticoides orales. El hecho de que estos efectos adversos se observaran en pacientes con menor edad y niveles más altos de TLCO, debería motivar a que se tomarán mayores precauciones (disminuir la dosis de antígeno inhalado, ingresar al paciente, etc.) en este grupo de población. El hecho de que

las complicaciones se presenten en individuos con TLCO prácticamente normal, podría estar en relación que estos individuos fueran más sensibles a notar cambios clínicos que aquellos en los que la TLCO ya está disminuida y pueden presentar más síntomas de base. Es importante mencionar que nuestro grupo sólo contraindica la realización de la PPBE cuando la FVC o la TLCO son inferiores al 50% y 40% respectivamente del valor teórico⁷⁹. Finalmente, algunos autores piensan que la PPBE no debería realizarse en ninguna circunstancia dado que la PPBE por sí misma podría sensibilizar al paciente y causar la enfermedad¹⁴¹. Esta posibilidad no ha sido observada en ninguno de los pacientes sometidos a la PPBE en los que finalmente se estableció un diagnóstico diferente a NH. Tampoco se ha observado en otros estudios en los que se ha realizado la PPBE en pacientes sanos controles^{17,137-138}.

La principal limitación de este estudio es que se trata de un estudio retrospectivo. Efectivamente, aunque los pacientes fueron estudiados siguiendo el mismo protocolo, la PPBE fue realizada con fines diagnósticos y no en el contexto de un estudio diseñado para conocer su rentabilidad. Probablemente este hecho queda compensado al establecerse el diagnóstico definitivo de la enfermedad en el momento actual por dos observadores independientes que tuvieron en cuenta, además de los criterios diagnósticos propuestos, la evolución que han experimentado estos pacientes desde que se les practicó la PPBE^{12,77}. Este hecho prácticamente asegura el diagnóstico y probablemente permite establecer la utilidad de la PPBE en la práctica clínica real.

Respecto al segundo estudio de la tesis, se diseñó un modelo murino agudo y crónico de PCA que muestra una patología que imita los casos humanos de NH aguda y crónica. La exposición repetida al antígeno PS en nuestro modelo dio como resultado una marcada infiltración de células inflamatorias, a expensas de neutrófilos y eosinófilos, y se observó además de una evolución de una respuesta de tipo TH1 en el modelo agudo a una respuesta de tipo TH2 en el modelo crónico, una importante participación en la patogenia de la enfermedad la respuesta TH17.

El desarrollo de NH aguda o crónica depende de la inmunidad mediada por células que implica la activación de fagocitos, linfocitos T específicos y la liberación de diversas citoquinas por ambos tipos de células en respuesta a un antígeno⁵⁰. Sin embargo, los mecanismos exactos y la evolución de estos eventos de respuesta inmune en la NH aguda y crónica aún no están claros. En este sentido, se ha observado que el desarrollo de fibrosis en la NH crónica se debe a un cambio de una respuesta de tipo TH1 a una respuesta más profibrótica de tipo TH2. Varios estudios que usan modelos animales de NH han sugerido que la NH aguda está mediada por una respuesta inmune TH1^{56,159} y que una polarización inmune hacia TH2 juega un papel importante en el desarrollo de fibrosis en la NH crónica⁷⁵.

En nuestro estudio, la exposición aguda y crónica al antígeno PS produce una inflamación neutrofílica y linfocítica en el LBA y este patrón inflamatorio también se observa en el análisis histopatológico. La principal diferencia entre las exposiciones a corto y largo plazo fue que esta inflamación es más marcada en el modelo crónico. La inflamación neutrofílica probablemente esté asociada con los niveles aumentados de IL-17A que se observan en este modelo. De hecho, la IL-17 desempeña varias funciones al contribuir a la patología pulmonar durante la fase crónica de la NH. Esta citoquina es un fuerte inductor del reclutamiento de neutrófilos, y existe una correlación positiva entre los neutrófilos del pulmón y la fibrosis pulmonar en pacientes con NH¹⁶⁰. Algunos estudios han demostrado un papel esencial de IL-17 en la inmunopatología de la NH⁶⁴. Investigaciones recientes han demostrado que la exposición de las vías respiratorias a antígenos en individuos sensibilizados causa la liberación de IL-17, que orquesta la inflamación de las vías respiratorias al inducir la expresión de varios mediadores proinflamatorios tales como citocinas, quimioquinas y moléculas de adhesión, que a su vez conducen al reclutamiento y activación de neutrófilos y eosinófilos¹⁶¹. Los resultados del presente estudio están en línea con los reportados por Simonian et al⁷⁴ que observaron un papel importante del reclutamiento de IL-17 y neutrófilos para el desarrollo de inflamación pulmonar y fibrosis en un modelo murino de NH inducido por la inhalación repetida de *S. rectivigula*. Los autores sugieren que las células T CD4+ que expresan IL-17A son importantes para la inmunidad de la

mucosa que promueve el reclutamiento de otros tipos de células, aunque el mecanismo exacto del desarrollo de la fibrosis aún se desconoce.

Por otro lado, en el modelo agudo observamos un aumento en la cantidad de eosinófilos que disminuyen 2 semanas después de la exposición. Aunque la linfocitosis es el hallazgo predominante en pacientes con NH, se sabe que el perfil celular del LBA puede estar relacionado con el tiempo transcurrido entre la última exposición al antígeno y la obtención del lavado³². En este sentido, cuando el LBA se obtiene poco después de la provocación (dentro de la primera semana), se observa un aumento en el número relativo de eosinófilos. Drent et al³², en treinta pacientes con NH que tenían un LBA 2-7 días después de su última exposición al antígeno causante, observaron números absolutos incrementados de linfocitos, eosinófilos y mastocitos. Los autores discuten si la presencia de esta inflamación eosinofílica mediada por células T CD4+ activadas, especialmente por la IL-5 producida por subpoblaciones de células T CD4+, puede estar implicada en la mediación del reclutamiento eosinofílico en las vías respiratorias. En la misma línea, Ishiguro et al¹⁰¹ describieron el caso de una mujer de 22 años a quien se le diagnosticó NH con infiltración de eosinófilos, causada por HFC134a (eliminación del vello corporal mediante un láser de diodo con 1,1, 1,2-tetrafluoroetano). Este caso revela no sólo un predominio linfocítico de la NH sino también una eosinofilia moderada en el LBA. Paralelo a los hallazgos celulares en el LBA, en el presente estudio se observó un aumento de IL-5 en el modelo agudo 24 horas después de la última exposición. La IL-5 es la principal citocina hematopoyética que regula la producción y supervivencia de eosinófilos, que coincide con los hallazgos en el LBA.

Los resultados obtenidos en este estudio, basado en la determinación de citoquinas y no en el estudio de poblaciones celulares, parecen evidenciar una evolución desde una respuesta TH1 en el modelo agudo a una respuesta TH2 en el modelo crónico. Efectivamente, la disminución en los niveles de IL-2 en el modelo crónico apoya este hecho. La IL-12 es importante para regular muchas respuestas TH1¹⁶². Puede ser producido por células T, macrófagos / monocitos y neutrófilos y es importante tanto para la inducción como para el mantenimiento de las respuestas TH1. Además, se observa un aumento en los niveles de IL-13 en el

modelo crónico. Es bien sabido que la IL-13, una citoquina TH2, favorece el proceso fibrótico al inducir la proliferación de fibroblastos y la producción de colágeno¹⁶³. Otro factor que apunta hacia un cambio en la respuesta de tipo TH2 en el modelo crónico es el aumento en los niveles de IL-10. Un predominio de la IL-10 favorece un desarrollo de TH2. La IL-10 es una citocina antiinflamatoria importante que puede inhibir la producción de muchas citoquinas proinflamatorias, incluido el IFN γ , una citocina TH1 que predispondría al desarrollo de una respuesta de tipo TH2¹⁶⁴. Además, este cambio en la respuesta inmune también se vería reforzado por la presencia de abundantes macrófagos alveolares en el análisis histopatológico del modelo crónico.

Existen pocos estudios realizados en modelos animales que midan la función pulmonar en ratones¹⁶⁵. Los resultados del presente estudio muestran que los animales expuestos a PS tienen una disminución en la TLC, que puede ser reversible en el caso de exposición aguda, pero que es irreversible con exposiciones más prolongadas al antígeno. Este hecho puede estar relacionado con una mayor inflamación pulmonar y una evolución hacia un proceso fibrótico. En este sentido, Andrews et al¹⁶⁵ postulan que la fase de fibrosis no es la única responsable de la afectación de los parámetros pulmonares en la NH, sino que el reclutamiento de células inflamatorias también debe contribuir a reducir la TLC.

6. CONCLUSIONES

A partir de los dos estudios realizados en la presente tesis, podemos concluir:

1. La PPBE puede ser una herramienta muy útil en el diagnóstico de las NH, ya que un resultado positivo es prácticamente diagnóstico de enfermedad, con una buena sensibilidad.
2. La PPBE es una prueba segura, con pocos efectos adversos.
3. En modelos animales de NH tras exponer de forma persistente al antígeno parece existir una evolución de respuesta TH1 a TH2, hecho que apoyaría la teoría de que se tratase de diferentes estadios de la enfermedad y no de diferentes formas clínicas de presentación.
4. La respuesta TH17 parece esencial en la génesis de la enfermedad.

7. LÍNEAS DE FUTURO

Dado los buenos resultados obtenidos en el estudio de la PPBE, se tienen que centrar los esfuerzos en intentar generalizar la realización de la prueba y que más centros la incorporen en su arsenal diagnóstico. También se tendrían que realizar más estudios para estandarizar mejor el test cuando el antígeno causal no es aviar ni fúngico.

Por otro lado, a partir de estos modelos animales y, después de comprobar que somos capaces de reproducir la enfermedad, los futuros estudios se tienen que centrar en:

- 1) estudios de poblaciones celulares y no de citoquinas, para establecer mejor las causalidades de la enfermedad.
- 2) Modelos con animales “*knockout*” para establecer los auténticos mecanismos fisiopatológicos implicados.
- 3) Diseñar modelos con inhibición farmacológica de las vías para intentar encontrar dianas terapéuticas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Selman M. Hypersensitivity Pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. *Clinics in Chest medicine* 2004; 25:531-47.
2. Hanak V, Golbin JM, Ryu JH. Causes and presenting features in 85 consecutive patients with hypersensitivity pneumonitis. *Mayo Clinic proceedings* 2007; 82: 812-6.
3. Morell F, Villar A, Ojanguren I, Muñoz X, Cruz MJ. Hypersensitivity pneumonitis Challenges in diagnosis and management, avoiding surgical lung biopsy. *Seminars in Respiratory and Critical care Medicine* 2016; 37:395-405.
4. Chiba S, Tsuchiya K, Akashi T et al. Chronic hypersensitivity pneumonitis with a usual interstitial pneumonia-like pattern: correlation between histopathologic and clinical findings. *Chest* 2016; 149:1473-81.
5. Johanson KA, Elicker BM, Vittinghoff E et al. A diagnostic model for chronic hypersensitivity pneumonitis. *Thorax* 2016; 71:951-4.
6. Patel AM, Ryu JH, Reed CE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J. Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 661-669.
7. Fenoglio CM, Reboux G, Sudre B, Mercier M, Roussel S, Cordier JF, Piarroux R, Dalphin JC. Diagnostic Value of serum precipitins to mould antigens in active hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2007; 29:706-712.
8. Girard M, Lacasse Y, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy* 2009; 64:322-34.
9. Chandra D, Cherian SV. Hypersensitivity Pneumonitis. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPerals Publishing; 2018 Jan-2018 Apr 29. PMID: 29763093.
10. Spagnolo P, Rossi G, Cavazza A, Bonifazi M, Paladini I, Bonella F, Sverzellati N, Costabel U. Hypersensitivity pneumonitis: a comprehensive review. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2015;25(4):237-50.

- 11.** Fernandez Perez ER, Swigris JJ, Forssen AV et al. Identifying an inciting antigen is associated with improved survival in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2013; 144:1644-51.
- 12.** Lacasse Y, Selman M, Costabel U et al. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2003; 168:952-8.
- 13.** Morell F, Reyes L, Domenech G, De Gracia J, Majo J, Ferrer J. Diagnoses and diagnostic procedures in 500 consecutive patients with clinical suspicion of interstitial lung disease. *Arch Bronconeumol* 2008; 44:185-91.
- 14.** Campbell J. Acute symptoms following work with hay. *BMJ* 1932; 2:1143.
- 15.** Pepys J, Riddell R, Citron KM. Precipitins against extracts of hay and moulds in the serum of patients with farmer's lung, aspergillosis, asthma and sarcoidosis. *Thorax* 1962; 366-74.
- 16.** Reed CE, Barbee RA. Pigeon-breeder's lung: a newly observed interstitial pulmonary disease. *JAMA* 1965; 193:261-5.
- 17.** Morell F, Roger A, Reyes L, Cruz MJ, Murio C, Muñoz X. Bird fancier's lung: a series of 86 patients. *Medicine (Baltimore)* 2008; 87:110-30.
- 18.** Hendrick DJ, Beckett WS, Churg A. Occupational disorders of lung.
- 19.** Baxi SN, Portnoy JM, Larenas-Linnemann D, Phipatanakul W. Environmental Allergens Workgroup. Exposure and health effects of fungi on humans. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2016; 4:936-404.
- 20.** Nordgren TM, Bailey KL. Pulmonary health effects of agriculture. *Curr Opin Pilm Med* 2016; 22:144-9.
- 21.** Cano-Jimenez E, Acuna A, Botana MI et al. Farmer's lung disease. A Review. *Arch Bronconeumol* 2016; 52:321-8.
- 22.** Utsugi H, Usui Y, Nishihara F, Kanazawa M, Nagata M. Mycobacterium gordonae-induced humidifier lung. *BCM Pulm Med* 2015 Sep30; 15:108.

- 23.** Morell F, Roger A, Cruz MJ, Muñoz X, Rodrigo MJ. Suberosis: clinical study and new etiologic agents in a series of eight patients. *Chest* 2003; 124:1145-52.
- 24.** Hoschek R. Kurzdauernde Gesundheitsstörungen durch Luftbefeuchter in graphischen Betrieben (*Short-term health disorders by humidifiers in graphic companies*). *Zentralbl. Arbeitsmed. Arbeitsschutz* 2 (1972) 35-38.
- 25.** M.R.C. Symposium: Humidifier fever. *Thorax* 32 (1977) 653-663.7.
- 26.** A. Van Assendelft, K.-O. Forsen, Helena Keskinen and Karl Alanko. Humidifier-associated extrinsic allergic alveolitis. *Scand J Work Environ Health* 1979;5(1):35-41.
- 27.** Uranga A, Sanchez-Ortiz M, Morell F, Cruz MJ, Muñoz X. Hypersensitivity pneumonitis due to isocyanates: lung function, clinical and radiological characteristics. *Arch. Bronconeumol* 2013; 49:169-72.
- 28.** Grammer LC, Shaughnessy MA, Lowenthal M, Yarnold PR. Risk factors for immunologically mediated respiratory disease from hexahydrophthalic anhydride. *J Occup Med* 1994; 36:642-6.
- 29.** Lacasse Y, Selman M, Costabel U et al. Classification of hypersensitivity pneumonitis a hypothesis. *International archives of allergy and immunology* 2009; 149:161-6.
- 30.** Vasakova M MF, Walsh S, Leslie K, Raghu G. Hypersensitivity pneumonitis: Perspectives in diagnosis and management. *Am Jour of Respir and Crit Care Medicine* 2017; 196:680-89.
- 31.** Salvaggio JE, de Shazo RD. Pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1986; 89(3): 190S-193S.
- 32.** Drent M, Wagenaar S, van Velzen-Blad H, Mulder PG, Hoogsteden HC, van den Bosch JM. Relationship between plasma cell levels and profile of bronchoalveolar lavage fluid in patients with subacute extrinsic allergic alveolitis. *Thorax* 1993; 48:835-839.

- 33.** Sennekamp J, Niese D, Stroehmann I, Rittner C. Pigeon breeder's lung lacking detectable antibodies. *Clin Allergy* 1978; 8:305-10.
- 34.** Moore VL, Fink JN, Barboriak JJ, Ruff LL, Schlueter DP. Immunologic events in pigeon breeder's disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1974; 53:319-28.
- 35.** Morell F, Jeanneret A, Aiache JM, Molina C. Leukocyte migration inhibition in farmer's lung. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1982; 69:405-9.
- 36.** Jordan N, Fink MD. Clinical Features of Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest*. 1986 Mar;89(3 Suppl):193S-195S.
- 37.** Pforte A, Schild U, Breyer G, Häussinger K, Ziegler-Heitbrock HW. A role for IgE in extrinsic allergic alveolitis? *Clin Investig* 1992 Mar-Apr; 70(3-4):277-82.
- 38.** C. McSharry C, Anderson K, Bourke SJ, Boyd G. Takes your breath away-the immunology of allergic alveolitis. *Clin Exp Immunol* 2002; 128:3-9.
- 39.** Woda Bruce. Hypersensitivity pneumonitis, an immunopathology review. *Arch Pathol Lab Med* 2008, 132: 204-205.
- 40.** Bogaert P, Tournoy KG, Naessens T, Grooten J. Where asthma and hypersensitivity pneumonitis meet and differ. *Am J Pathol* 2009;174(1):3-13.
- 41.** Chelen CJ, Fang Y, Freeman GJ et al. Human alveolar macrophages present antigen ineffectively due to defective expression of B7 costimulatory cell surface molecules. *J Clin Invest* 1995; 95:1415-21.
- 42.** Dakhama A, Israël-Assayag E, Cormier Y. Altered immunosuppressive activity of alveolar macrophages in farmer's lung disease. *Eur Respir J* 1996; 9:1456-62.
- 43.** Israël-Assayag E, Dakhama A, Lavigne S, Laviolette M, Cormier Y. Expression of costimulatory molecules on alveolar macrophages in hypersensitivity pneumonitis. *AM J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1830-34.
- 44.** Selman M, Pardo A, Barrera L et al. Gene Expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *American Journal or respiratory and critical care medicine* 2006;173:188-98.

- 45.** Kishi M, Miyazaki Y, Jinta T, Furusawa H, Ohtani Y, Inase N, Yoshizawa Y. Pathogenesis of cBFL in common with IFP? Correlation of IP-10/TARC ratio with histological patterns. *Thorax* 2008;63:810-816.
- 46.** Dai H, Guzman J, Chen B, Costabel U. Production of soluble tumor necrosis factor receptors and tumor necrosis factor- α by alveolar macrophages in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. *Chest* 2005; 127:251-256.
- 47.** Barrera L, Mendoza F, Zuniga J et al. Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitive pneumonitis. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2008; 177:44-55.
- 48.** García de Alba C, Buendia-Roldan I, Salgado A et al. Fibrocytes contribute to inflammation and fibrosis in chronic hypersensitivity pneumonitis through paracrine effects. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2015; 191:427-36.
- 49.** Selman M, Buendía-Roldán I. Immunopathology, diagnosis and management of Hypersensitivity Pneumonitis. *Semin Respir Crit Care Med* 2012;33:543-554.
- 50.** Lacasse Y, Girard M, Cormier Y. Recent advances in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2012; 142:208-17.
- 51.** Selman M, Pardo A, King TE Jr. Hypersensitivity pneumonitis: insights in diagnosis and pathobiology. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2012; 186:314-24.
- 52.** Nadel Ma. *Textbook of respiratory medicine*. 5thEd. 2010.
- 53.** Patel AM, Ryu JH, Reed CE. Hypersensitivity pneumonitis: current concepts and future questions. *J. Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 661-669.
- 54.** Hill MR, Briggs L, Montano MM et al. Promoter variants in tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) protect against susceptibility in pigeon breeder's disease. *Thorax* 2004; 59:586-90.
- 55.** Janssen R, Kruit A, Grutters JC, Ruven HJ, Van Moorsel CM, Van den Bosch JM. TIMP-3 promoter gene polymorphisms in BFL. *Thorax* 2005; 60:974.

- 56.** Denis M, Cormier Y, Laviolette M. Murine hypersensitivity pneumonitis: a study of cellular infiltrates and cytokine production and its modulation by cyclosporin A. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992 Jan;6(1):68-74.
- 57.** Denis M, Cormier Y, Laviolette M, Ghadirian E. T cells in hypersensitivity pneumonitis: effects of in vivo depletion of T cells in a mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6:183-9.
- 58.** Israël-Assayag E, Fournier M, Cormier Y. Blockade of T cell costimulation by CTLA4-Ig inhibits lung inflammation in murine hypersensitivity pneumonitis. *The Journal of immunology* 1999; 163:6794-99.
- 59.** Takizawa H, Ohta K, Horiuchi T et al. Hypersensitivity pneumonitis in athymic nude mice. Additional evidence of T cell dependency. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:479-84.
- 60.** Gunnar Gudmundsson, Martha M. Monick, and Gary W. Hunninghake. IL-12 Modulates Expression of Hypersensitivity Pneumonitis. *J Immunol* 1998; 161:991-999.
- 61.** Butler NS, Monick M, Yarovinsky T, Powers L, Hunninghake G. Altered IL-4 mRNA stability correlates with TH1 and TH2 bias and susceptibility to hypersensitivity pneumonitis in two inbred strains of mice. *J Immunol* 2002; 169:3700-09.
- 62.** Yosuke Matsuno, Yukio Ishii, Keigyou Yoh, Yuko Morishima et al. Overexpression of GATA-3 Protects against the Development of Hypersensitivity Pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:1015-1025.
- 63.** Thorne P, Adamcakova-Dodd A, Kelly KM, O'Neill M, Duchaine C. Metalworking Fluid with Mycobacteria and Endotoxin Induces Hypersensitivity Pneumonitis in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:759-68.
- 64.** Joshi AD, Fong DJ, Oak SR, Trujillo G, Flaherty KR, Martinez FJ, Hogaboam CM. IL-17-mediated immunopathogenesis in experimental Hypersensitivity Pneumonitis. *Am J Respir Crit care Med.* 2009; 179:705-16.

- 65.** Simonian P, Roark C et al. IL-17A-expressing T cells are essential for bacterial clearance in a murine model of hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol* 2009; 182(10):6540-49.
- 66.** Simonian P, Roark C, Born W, O'Brien R, Fontenot A. $\gamma\delta$ T cells and TH17 cytokines in hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *Transl Res* 2009; 154(5):222-27.
- 67.** Fong DJ, Hogaboam CM, Matsuno Y, Akira S, Uematsu S, Joshi AD. Toll-like receptor 6 drives IL-17A expression during experimental HP. *Immunol* 2010; 130:125-36.
- 68.** Hossam Aly Abdelsamed, Meena Desai, Stephanie C Nance and Elizabeth A Fitzpatrick. T-bet controls severity of hypersensitivity Pneumonitis. *Journal of Inflammation* 2011; 8:15.
- 69.** H. Daito, T. Kikuchi, T. Sakakibara, K. Gomi et al. Mycobacterial hypersensitivity pneumonitis requires TLR9–MyD88 in lung CD11b+ CD11c+ cells. *Eur Respir J* 2011; 38: 688–701.
- 70.** Urvashi Bhan, Michael J. Newstead, vXianying Zeng, Megan N. Ballinger, Louis R. Standiford, Theodore J. Standiford. *Stachybotrys chartarum*-Induced Hypersensitivity Pneumonitis Is TLR9 Dependent. *The American Journal of Pathology* 2011; 179(6): 2779-87.
- 71.** Kelly Andrews, Hossam Abdelsamed, Ae-Kyung Yi, Mark A. Miller, Elizabeth A. Fitzpatrick. TLR2 Regulates Neutrophil Recruitment and Cytokine Production with Minor Contributions from TLR9 during Hypersensitivity Pneumonitis. *PloS one* 2013; 8(8):e73143.
- 72.** Marie-Ren e Blanchet, Jami L. Bennett, Matthew J. Gold et al. CD34 Is Required for Dendritic Cell Trafficking and Pathology in Murine Hypersensitivity Pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184:687-98.
- 73.** Emilie Bernatchez, Anick Langlois, Julyanne Brassard, Nicolas Flamand, David Marsolais, Marie-Ren e Blanchet. Hypersensitivity pneumonitis onset and

severity is regulated by CD103 dendritic cell expression. PLoS One 2017; 12(6):e0179678.

74. Simonian PL, Roark CL, Wehrmann F, Lanham AK, Diaz del Valle F, Born WK, O'Brien RL, Fontenot AP. Th-17-Polarized immune response in a murine model of HP and lung Fibrosis. *J Immunol* 2009;182:657-65.

75. Mitaka K, Miyazaki Y, Yasui M, Furuie M, Miyake S, Inase N, Yoshizawa Y. Th2-biased immune responses are important in a murine model of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 54: 264-74.

76. Shlomo Z. Ben-Sasson, Jane Hu-Li, Juan Quiel, Stephane Cauchetaux, Maya Ratner, Ilana Shapira, Charles A. Dinarello, William E. Paul. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *PNAS* 2009; 106(17): 7119-7124.

77. Schuyler M, Cormier Y. The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1997; 111:534-6.

78. Morisset J, Johansson K, Jones K, Wolters P, Collard H, Walsh S, Ley B and the HP Delphi Collaborators. Identification of diagnostic criteria for chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am J Resp and Crit Care Med* 2018; 197(8):1036-44.

79. Muñoz X, Morell F, Cruz MJ. The Use of specific inhalation challenge in hypersensitivity pneumonitis. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2013; 13:151-8.

80. Selman M. Hypersensitivity pneumonitis. In: Schwarz MI, King TE, eds. *Interstitial Lung Disease*. Shelton, People's Medical Publishing House, 2011; pp. 597–635.

81. Costabel U, Bonella F, Guzman J. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *Clinics in chest medicine* 2012; 33:151-63.

82. Cormier Y, Belanger J. The fluctuant nature of precipitating antibodies in dairy farmers. *Thorax* 1989; 44:469-73.

- 83.** Quirce S, Vandenplas O, Campo P et al. Occupational hypersensitivity pneumonitis: an EAACI position paper. *Allergy* 2016; 71:765-79.
- 84.** McSharry C, Dye GM, Ismail T, Anderson K, Spiers EM, Boyd G. Quantifying serum antibody in bird fancier's lung hypersensitivity pneumonitis. *BMC pulmonary medicine* 2006; 6:16.
- 85.** Braun SR, DoPico GA, Tsiatis A et al. Farmer's lung disease: long-term clinical and physiologic outcome. *The American Review of respiratory disease* 1979; 119:185-91.
- 86.** Remy-Jardin M, Remy J, Wallaert B, Muller NL. Subacute and chronic bird breeder hypersensitivity pneumonitis: sequential evaluation with CT and correlation with lung function tests and bronchoalveolar lavage. *Radiology* 1993; 189:111-8.
- 87.** Raghu G, Collard HR, Egan JJ et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2011; 183:788-824.
- 88.** Brett Nelicker KDJ, Travis S, Henry and Harold R. Collard Multidisciplinary approach to hypersensitivity pneumonitis. *Thorac imaging* 2016; 31:92-102.
- 89.** Cormier Y, Brown M, Worthy S, Racine G, Muller NL. High-resolution computed tomographic characteristics in acute farmer's lung and in its follow-up. *The European respiratory journal* 2000; 16:56-60.
- 90.** Silva CI, Müller NL, Lynch DA, et al. Chronic hypersensitivity pneumonitis: differentiation from idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia by using thin-section CT. *Radiology* 2008;246(1):288–297.
- 91.** Selman M, Vargas MH. Airway involvement in hypersensitivity pneumonitis. *Current opinion in pulmonary medicine* 1998; 4:9-15.
- 92.** Reynolds HY, Newball HH. Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage. *J Lab Clin Med* 1974; 84:559-73.

- 93.** Spagnolo P, Luppi F, Rossi G, Richeldi L. To BAL or not to BAL: is this a problem in diagnosing IPF? *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2009; 180:379-80.
- 94.** Semenzato G, Bjermer L, Costabel U, Haslam PL, Olivieri D. Clinical guidelines and indications bronchoalveolar lavage (BAL): extrinsic allergic alveolitis. *Eur Respir J* 1990; 3(8):945-961.
- 95.** Ohtani Y, Saiki S, Kitaichi M et al. Chronic bird fancier's lung: histopathological and clinical correlation. An application of the 2002 ATS/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax* 2005; 60:665-71.
- 96.** Caillaud DM, Vergnon JM, Madroszyk A et al. Bronchoalveolar lavage in hypersensitivity pneumonitis: a series of 139 patients. *Inflammation and allergy drug targets* 2012; 11:15-9.
- 97.** Kletch HH, Pohl WW. Use of bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Pulmonary and critical care medicine*, Bone, RC, (ed), Mosby, St. Louis, Port M. Chapter 2, 1997; 1.
- 98.** Costabel U, Guzman J. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung disease. *Current opinion in pulmonary medicine* 2001; 7:255-61.
- 99.** Bradley B, Branley HM, Egan JJ et al. Interstitial lung disease guideline: the British Thoracic Society in collaboration with the Thoracic Society of Australia and New Zealand and the Irish Thoracic Society. *Thorax* 2008; 63 Suppl 5:v1-58.
- 100.** Miyazaki Y, Tateishi T, Akashi T et al. Clinical predictors and histologic appearance of acute exacerbations in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2008; 134:1265-1270.
- 101.** Ishiguro T1, Yasui M, Nakade Y, Kimura H, Katayama N, Kasahara K, Fujimura M. Extrinsic allergic alveolitis with eosinophil infiltration induced by 1,1,1,2-tetrafluoroethane (HFC-134a): a case report. *Intern Med.* 2007;46(17):1455-7.
- 102.** Grunes D, Beasley MB. Hypersensitivity pneumonitis: a review and update of histological findings. *J Clin Pathol* 2013; 0:1-8.

- 103.** Ghose T, Landrigan P, Killeen R and Dill J. Immunopathological studies in patients with farmer's lung. *Clinical Allergy* 1974; 4:119-129.
- 104.** Meyer KC, Raghu G, Baughman RP et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2012; 185:1004-14.
- 105.** Plans Bolivar C, Morell Brotad F, Morera Prat J et al. Chronic eosinophilic pneumonia: report of eight cases (author's transl). *Medicina Clínica* 1981; 77:8-17.
- 106.** Morell F, Bravo C, Ferrer F, Mayordomo C. Chronic eosinophilic pneumonia (CEP). *Anales de Medicina interna* 1992; 9 Spec N°:98-102.
- 107.** American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2000; 161:646-64.
- 108.** Alvarez MJ, Uribe P, Echegoyen A, Almudevar E, Olaguibel JM, Urbiola E. Eosinophils in induced sputum versus nitric oxide in exhaled air: clinical utility in bronchial asthma. *Anales del sistema sanitario de Navarra* 2009; 32:217-25.
- 109.** Sozanska E, Barczyk A, Biedron-Machura M, Pierzchala W. Usefulness of induced sputum in the diagnosis of selected chronic inflammatory airway diseases. *Pneumologia I alergologia polska* 2009; 77:349-56.
- 110.** Fireman E, Lerman Y. Induced sputum in interstitial lung diseases. *Current opinion in pulmonary medicine* 2006; 12:318-22.
- 111.** D'Ippolito R, Chetta A, Foresi A et al. Induced sputum and bronchoalveolar lavage from patients with hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory medicine* 2004; 98:977-83.
- 112.** Mroz RM, Chyczewska E, Korniluk M, Stasiak-Barmuta A, Ossolinska M. Comparison of cellular composition of induced sputum, bronchial washings and bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis and COPD. *Pneumologia I alergologia polska* 2002; 70:468-77.

- 113.** Sanchez-Vidaurre S, Cruz MJ, Gomez-Olles S, Morell F, Muñoz X. Sputum inflammatory profile before and after specific inhalation challenge in individuals with suspected occupational asthma. *PloS One* 2013; 13; 8:e78304.
- 114.** Bikov A, Galffy G, Thamasi L et al. Exhaled breath condensate pH decreases during exercise-induced bronchoconstriction. *Respirology* 2014; 19:563-9.
- 115.** Liang Y, Yeligar SM, Brown LA. Exhaled breath condensate: a promising source for biomarkers of lung disease. *The Scuebtufuc World Journal* 2012; 2012:217518.
- 116.** Ojanguren I, Cruz MJ, Villar A, Sanchez-Ortiz M, Morell F, Muñoz X. Changes in pH in exhaled breath condensate after specific bronchial challenge test in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis: a prospective study. *BMC pulmonary medicine* 2015; 15:109.
- 117.** Saito J, Gibeon D, Macedo P, Menzies-Gow A, Bhavsar PK, Chung KF. Domiciliary diurnal variation of exhaled nitric oxide fraction for asthma control. *The European respiratory journal* 2014; 43:474-84.
- 118.** Kersul AL, Iglesias A, Rios A et al. Molecular mechanisms of inflammation during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Bronconeumol* 2011; 47:176-83.
- 119.** Bazeghi N, Gerds TA, Budtz-Jorgensen E, Hove J, Vestbo J. Exhaled nitric oxide measure using multiple flows in clinically relevant subgroups of COPD. *Respiratory medicine* 2011; 105:1338-44.
- 120.** Guilleminault L, Saint-Hilaire A, Favelle O et al. Can exhaled nitric oxide differentiate causes of pulmonary fibrosis? *Respiratory medicine* 2013; 107:1789-96.
- 121.** Ojanguren I, Cruz MJ, Villar A, Barrecheguren M, Morell F, Muñoz X. Utility of exhaled nitric oxide fraction for diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Lung* 2016; 194:75-80.
- 122.** Polletti V, Patelli M, Poggi S, Bertanti T, Spiga L, Ferracini R. Transbronchial lung biopsy and bronchoalveolar lavage in diagnosis of diffuse infiltrative lung

disease. *Respiration; international review of thoracic diseases* 1988; 54 Suppl 1:66-72.

123. Casoni GL, Curioli C, Chhajed PN et al. The value of transbronchial lung biopsy using jumbo forceps via rigid bronchoscope in diffuse lung disease. *Monaldi archives for chest disease (Monaldi per le malattie del torace)* 2008; 69:59-64.

124. Babiak A, Hetzel J, Krishna G et al. Transbronchial cryobiopsy: a new tool for lung biopsies. *Respiration; international review of thoracic diseases* 2009; 78:203-8.

125. Kropski JA, Pritchett JM, Mason WR et al. Bronchoscopic cryobiopsy for the diagnosis of diffuse parenchymal lung disease. *PLoS One* 2013; 8:e78674.

126. Azcuna H PIJ, Aburto M et al. Cryobiopsy in the diagnosis of interstitial lung diseases. *Chest* 2014; 254A.

127. Pajares V, Puzo C, Castillo D et al. Diagnostic yield of transbronchial cryobiopsy in interstitial lung disease: a randomized trial. *Respirology* 2014; 19:900-6.

128. Mikolash TA, Porter JC. Transbronchial cryobiopsy in the diagnosis of interstitial lung disease: a cool new approach. *Respirology* 2014; 19:623-4.

129. Han Q, Luo Q, Xie JX et al. Diagnostic yield and postoperative mortality associated with surgical lung biopsy for evaluation of interstitial lung disease. A systemic review and meta-analysis. *The journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2015; 149:1394-401 e1.

130. Blackhall V, Asif M, Renieri A et al. The role of surgical lung biopsy in the management of interstitial lung disease: experience from a single institution in the UK. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 2013; 17:253-7.

131. Takemura T, Akashi T, Ohtani Y, Inase N, Yoshizawa Y. Pathology of hypersensitivity pneumonitis. *Current opinion in pulmonary medicine* 2008; 14:440-54.

- 132.** Barrowcliff DF, Arblaster PG. Farmer's lung: a study of an early acute fatal case. *Thorax* 1968; 23:490-500.
- 133.** Myers JL. Hypersensitivity pneumonitis: the role of lung biopsy in diagnosis and management. *Modern Pathology* 2012; 25:S58-67.
- 134.** Hariri L, Mino-Kenudson M, Shea B et al. Distinct histopathology of acute onset or abrupt exacerbation of hypersensitivity pneumonitis. *Human Pathology* 2012; 43:660-68.
- 135.** Seal RME, Hapke EJ, Thomas GO et al. The pathology of the acute and chronic stages of farmer's lung. *Thorax* 1968; 23:469-89.
- 136.** Wang P, Jones KD, Urisman A et al. Pathological findings and prognosis in a large prospective cohort of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2017 Sep;152(3):502-509.
- 137.** Hendrick DJ, Marshall R, Faux JA, et al. Positive "alveolar" response to antigen inhalation provocation test: their validity and recognition. *Thorax* 1980; 35: 415–427.
- 138.** Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Perez-Padilla R, et al. Utility of a provocation test for diagnosis of chronic pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 862–869.
- 139.** Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, et al. Inhalation provocation test in chronic bird fancier's lung. *Chest* 2000; 118:1382–1389.
- 140.** Ishizuka M, Miyazaki Y, Tateishi T, Tsutsui T, Tsuchiya K, Inase N. Validation of inhalation provocation test in chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis and new prediction score. *Annals of the American Thoracic Society* 2015; 12:167-73.
- 141.** Richerson HB, Bernstein IL, Fink JN et al. Guidelines for the clinical evaluation of hypersensitivity pneumonitis. Report of the subcommittee on hypersensitivity pneumonitis. *The journal of allergy and clinical immunology* 1989; 84:839-44.

- 142.** Kokkarinen JI, Tukiainen Ho, Terho EO. Effect of corticosteroid treatment on the recovery of pulmonary function in farmer's lung. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145(1):3-5.
- 143.** Salisbury ML, Myers JL, Belloli EA, Kazerooni EA, Martinez FJ, Flaherty KR. Diagnosis and treatment of fibrotic hypersensitivity pneumonitis. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2017; 196(6):690-98.
- 144.** Perez-Padilla R, Salas J, Chapela R et al. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeder's lung compared with those usual interstitial pneumonia. *The American review of respiratory disease* 1993; 148:49-53.
- 145.** Vourlekis JS, Schwartz MI, Cherniack RM et al. The effect of pulmonary fibrosis on survival in patients with hypersensitivity pneumonitis. *The American journal of medicine* 2004; 116:662-8.
- 146.** Mooney JJ, Elicker BM, Urbania TH et al. Radiographic fibrosis score predicts survival in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2013; 144:586-92.
- 147.** Okamoto T, Miyazaki Y, Ogura T et al. Nationwide epidemiological survey of chronic hypersensitivity pneumonitis in Japan. *Respiratory investigation* 2013; 51:191-9.
- 148.** Morisset J, Johansson KA, Vittinghoff E, Aravena C, Elicker BM, Jones KD, Fell CD, Manganas H, Dubé BP, Wolters PJ et al. Use of mycophenolate mofetil or azathioprine for the management of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2017; 151:619-625.
- 149.** Adegunsoye A, Streck ME. Therapeutic Approach to Adult Fibrotic Lung Diseases. *Chest*. 2016;150(6):1371-1386.
- 150.** Lima MS, Coletta EN, Ferreira RG, Jasinowodolinski D, Arakaki JS, Rodrigues SC, Rocha NA, Pereira CA. Subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis: Histopathological patterns and survival. *Respiratory Medicine* 2009; 103: 508-515.

- 151.** Sahin H, Brown KK, Curran-Everett D, Hale V, Cool CD, Vourlekis JS, Lynch DA. Chronic hypersensitivity pneumonitis: CT features comparison with pathologic evidence of fibrosis and survival. *Radiology* 2007; 244:591-598.
- 152.** Miguel Gaxiola, Ivette Buendía-Roldán, Mayra Mejía, Guillermo Carrillo, Andrea Estrada, Mary Carmen Navarro, Jorge Rojas-Serrano, Moisés Selman. Morphologic diversity of chronic pigeon breeder's disease: Clinical features and survival. *Respiratory Medicine* 2011; 105: 608-614.
- 153.** Evans R. Fernández Pérez, MD, FCCP; Jeffrey J. Swigris, DO, FCCP; Anna V. Forssén, MS; Olga Tourin , MD; Joshua J. Solomon , MD, FCCP; Tristan J. Huie , MD, FCCP; Amy L. Olson , MD , MSPH; and Kevin K. Brown , MD, FCCP. Identifying an Inciting Antigen Is Associated With Improved Survival in Patients With Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest* 2013; 144(5):1644–1651.
- 154.** Cruz MJ, Morell F, Roger A, et al. Hypersensitivity pneumonitis in construction plasterers (espartosis): study of 20 patients. *Med Clin (Barc)* 2003; 120: 578–583.
- 155.** Morell F, Cruz MJ, Gomez FP, et al. Chaciner's lung – hypersensitivity pneumonitis due to dry sausage dust. *Scand J Work Environ Health* 2011; 37: 349–356.
- 156.** Sogo A, Morell F, Muñoz X. Hypersensitivity pneumonitis associated with the use of a steam iron. *Arch Bronconeumol* 2009; 45: 258–259.
- 157.** Baur X. Hypersensitivity pneumonitis (extrinsic allergic alveolitis) induced by isocyanates. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1004–1010.
- 158.** Williams JV. Inhalation and skin tests with extracts of hay and fungi in patients with farmer's lung. *Thorax* 1963;18: 182–196.
- 159.** Denis M, Cormier Y, Fournier M, Tardif J, Laviolette M. Tumor necrosis factor plays an essential role in determining hypersensitivity pneumonitis in a mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991 Nov;5(5):477-83.
- 160.** Pardo A. Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1698-1704.

- 161.** Besnard AG, Togbe D, Couillin I, Tan Z, Guo Zheng S, Erard F, Le Bert M, Quesniaux V, Bernhard Ryffel B. Inflammasome–IL-1–Th17 response in allergic lung inflammation. *J Mol Cell Biol* 2012; 4: 3–10.
- 162.** Kennedy, M. K., K. S. Picha, K. D. Shanebeck, D. M. Anerson, and K. H. Grabstein. 1994. Interleukin-12 regulates proliferation of Th1, but not Th2 or Th0 clones. *Eur. J. Immunol.* 24:2271.
- 163.** Zhu Z, Homer RJ, Wang Z, Chen Q, Geba GP, Wang J, Zhang Y, Elias JA. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest.* 1999 Mar;103(6):779-88.
- 164.** de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennet, C. G. Figdor, and J. E. de Vries. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174:1209–1220.
- 165.** Andrews K, Ghosh MC, Schwingshackl A, Rapalo G, Luellen C, Waters CM, Fitzpatrick EA. Chronic hypersensitivity pneumonitis caused by *Saccharopolyspora rectivirgula* is not associated with a switch to a Th2 response. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016 Mar 1;310(5):L393-402.

9. ANEXOS

9.1. BECAS

- Becas obtenidas por el estudio “Neumonitis por hipersensibilidad por exposición a hongos y aves: comparación de los mecanismos inmunológicos e inflamatorios”:

*FUCAP 2012-2015. IP: Dr. X. Muñoz Gall.

*SEPAR (EPID-futuro) 2012-2015. IP: Dra. A. Villar Gómez.

9.2. ARTÍCULOS PUBLICADOS

1. M. Sanchez-Ortiz, M.J. Cruz, M. Viladrich, F. Morell, X. Muñoz. Cryptogenic organizing pneumonia due to ortho-phenylenediamine. Respiratory Medicine CME 2011; 4 (issue 4): 164-165.

2. Uranga A, Sánchez-Ortiz M, Morell F, Cruz MJ, Muñoz X. Neumonitis por hipersensibilidad a isocianatos. características clínico-radiológicas y de función pulmonar. Arch. Bronconeumol, 2013;49(4):169-172.

3. Xavier Muñoz, Mónica Sánchez-Ortiz, Ferran Torres, Ana Villar, Ferran Morell and María-Jesús Cruz. Diagnostic yield of specific inhalation challenge in hypersensitivity pneumonitis. Eur Respir J 2014 44:1658-1665.

4. Muñoz X , Sanchez-Ortíz M, Ojanguren I, Cruz MJ. Specific inhalation challenge in the differential diagnosis of usual interstitial pneumonia. Eur Respir Rev. 2015 Sep;24(137):542-4.

5. Ojanguren I, Cruz MJ, Villar A, Sánchez-Ortiz M, Morell F, Muñoz X. changes in ph in exhaled breath condensate after specific bronchial challenge test in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis: a prospective study. BMC Pulmonary Medicine (2015) 15:109.

6. Olga Meca, María-Jesús Cruz, Mónica Sánchez-Ortiz, Francisco-Javier González-Barcala, Iñigo Ojanguren, Xavier Munoz. Do Low Molecular Weight Agents Cause More Severe Asthma than High Molecular Weight Agents? PLoS ONE 11(6): e0156141



Case Report

Cryptogenic organizing pneumonia due to ortho-phenylenediamine

M. Sanchez-Ortiz^a, M.J. Cruz^{a,b,*}, M. Viladrich^a, F. Morell^{a,b}, X. Muñoz^{a,b,c}^a Pulmonology Service, Medicine Department, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain^b CIBER Diseases Respiratorias (Ciberes), Spain^c Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2011

Accepted 11 April 2011

Keywords:

Amine

Occupational disease

ELISA

Pulmonary infiltrates

ABSTRACT

Cryptogenic organizing pneumonia (COP) is a rare, potentially serious respiratory disease which may be idiopathic or secondary to other conditions. Exceptionally, cases of COP of occupational origin have been reported. We present the case of a laboratory researcher who developed COP after prolonged exposure to ortho-phenylenediamine. The diagnosis was made after a specific inhalation challenge (SIC). After clinical and radiological resolution, the patient has avoided the causal agent and remains asymptomatic.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cryptogenic organizing pneumonia (COP) is characterized by the presence of intraalveolar granulation tissue, comprising a mixture of myofibroblasts and connective tissue. It is frequently idiopathic, although cases of COP of occupational origin have been described, such as the Ardystil Syndrome following inhalation of Acramin FWN,¹ exposure to benzalkonium in cleaners,² exposure to spices,³ or in textile factory workers exposed to environmental fungal spores.⁴ This study describes the first case of COP secondary to ortho-phenylenediamine in a laboratory researcher.

2. Educational aims

- Occupation should be considered when diagnosis of a respiratory condition remains unclear after regular evaluation.
- The possibility to perform a specific inhalation challenge test in a respiratory non-infectious disease should be considered in order to get an accurate diagnosis.
- Cryptogenic organizing pneumonia diagnosis should be considered in patients presenting fever and pulmonary infiltrates after exposure to ortho-phenylenediamine or to other amine compounds.

3. Case report

The patient described is a twenty-nine-year-old woman who had worked in a biochemistry and molecular biology laboratory for eight years and for the last three years she had performed protocols requiring the developing of immunoassays. The process used ortho-phenylenediamine in powder form, which she diluted and heated at 37 °C. After this, the reactants remained on microtitration plates on the laboratory table until they evaporated totally and were removed once a month. The patient worked without any breathing protection.

Six months after taking on these duties, she presented episodes of coughing, fever (38.5 °C), muco-purulent expectoration and dyspnea. X-ray studies revealed pulmonary infiltrates in several lobes. In the last 2.5 years the patient presented ten episodes of this kind. Initially the episodes were recorded as pneumonia, but the patient was referred to our center in order to rule out a possible occupational origin.

On admission, the patient was asymptomatic and was not currently working. Physical examination was normal; blood analysis including leukocytes count IgG, IgA, IgM, IgE and IgG subclass values were within normal ranges. Specific IgG for *Aspergillus* and *Penicillium* were negative. Vaccine response study (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*) revealed normal antibody production. Pulmonary function study results were FVC 3.81 L (89%), FEV1 2.81 L (82%), FEV1%FVC ratio 73%, TLC 6.24 L (115%), RV 2.43 L (158%), TLC0 7.3 (84%), TLC0/VA 1.37 (75%) with a negative bronchodilation test. Chest computerized tomography (CT) was normal.

With the suspicion of pulmonary pathology associated with ortho-phenylenediamine, we performed a specific inhalation

* Corresponding author. Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron, 119, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 274 6157; fax: +34 93 274 6083.

E-mail address: mjacruz@ir.vhebron.net (M.J. Cruz).

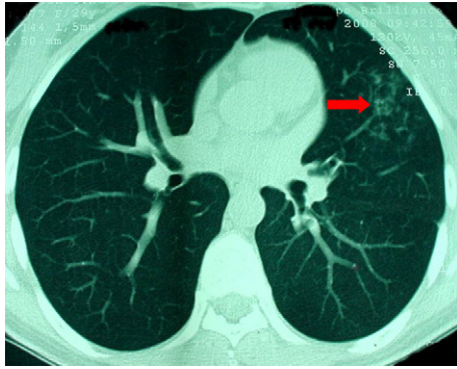


Fig. 1. Chest CT. Incipient pulmonary infiltrate in the left upper lobe after the specific inhalation challenge.

challenge (SIC) in which the patient processed the immunoassay samples in a specific inhalation chamber for 30 min. Temperature, FVC, FEV1 and TLCO were measured 30 min after exposure and subsequently each hour for 8 h. Four hours after exposure, fever (38 °C) was recorded, as were non-significant reductions of TLCO and FVC. Chest CT performed 6 h after exposure revealed an alveolar infiltrate in the left upper lobe (Fig. 1). A bronchoalveolar lavage (BAL) collected after 24 h showed 74% macrophages, 8% lymphocytes and 18% polymorphonuclears. BAL culture was negative. No longer exposed to the agent, the patient has remained asymptomatic for 1.5 years and has not presented any new acute episodes.

4. Discussion

We present the first report of COP due to ortho-phenylenediamine confirmed by the appearance of a pulmonary infiltrate with neutrophilia after a SIC.

As there was no obvious cause for the patient's repeat infections, and knowing that low molecular weight agents have been associated with the development of hypersensitivity pneumonitis (HP), we performed an SIC to investigate their possible involvement. During the test the patient presented clinical symptoms similar to those of the previous episodes; CT revealed a pulmonary infiltrate, though no significant changes in FVC and DlcO were observed. These findings, together with the presence of neutrophilia revealed in the BAL, suggested that the patient had COP rather than HP. The rapid clinical and radiological resolution after the administration of

corticosteroids and the absence of any new episodes after discontinuing the exposure to the causal agent lend support to this diagnosis. Although definitive diagnosis of COP is performed by pathology study, it has been suggested that a correct diagnosis can be made without the need for a lung biopsy.⁵

Ortho-phenylenediamine is a low molecular weight chemical compound with an amine group used, among its multiple applications, as a reactant in enzyme immunoassays. Exceptionally, cases of COP have been reported in patients exposed to amines. The first description was the Ardystil syndrome secondary to the inhalation of Acramin FWN (diethylenetriamine and adipic acid).¹ In that first report, histology studies were used for diagnosis, but later descriptions performed diagnosis without the need for pathology studies.⁶ Finally, Di Stefano et al.² reported a case of COP of a patient accidentally exposed to benzalkonium chloride, a quaternary amine. The patient presented a marked neutrophilia with 54% neutrophils and only 10% lymphocytes in the BAL.

In conclusion, given the wide use of ortho-phenylenediamine in different laboratory processes, physicians should bear in mind that this compound is a possible cause of COP.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author's contribution

Drs Morell and Muñoz X: Diagnosis of the patient.

Drs Viladrich M and Cruz MJ: Laboratory diagnostic text procedures.

Dr Sánchez-Ortiz M: Diagnostic clinical test.

References

- Romero S, Hernández L, Gil J, Aranda I, Martín C, Sánchez-Payá J. Organizing pneumonia in textile printing workers: a clinical description. *Eur Respir J* 1998;**11**:265–71.
- Di Stefano F, Verna N, Di Giampaolo L, Boscolo P, Di Gioacchino M. Cavitating BOOP associated with Myeloperoxidase deficiency in a floor cleaner with incidental heavy exposure to benzalkonium compounds. *J Occup Health* 2003;**45**:182–4.
- Alleman T, Darcey DJ. Case report: bronchiolitis obliterans organizing pneumonia in a spice process technician. *J Occup Environ Med* March 2002;**44**(3).
- Ph Camus, Nemery B. A novel cause for bronchiolitis obliterans organizing pneumonia: exposure to paint aerosols in textile workshops. *Eur Respir J* 1998;**11**:259–62.
- Johkoh T, Müller NL, Cartier Y, Kavanagh PV, Akira M, Ichikado K, et al. Idiopathic interstitial pneumonias: diagnostic accuracy of thin-section CT in 129 patients. *Radiology* 1999;**211**:555–60.
- Ould F, Abdesslam T, Nemery B. Five-year follow-up of algerian victims of the "Ardystil Syndrome". *Eur Respir J* 1999;**13**:940–1.



Nota clínica

Neumonitis por hipersensibilidad a isocianatos. Características clínico-radiológicas y de función pulmonar

Ane Uranga^a, Mónica Sánchez-Ortiz^{b,c}, Ferran Morell^{b,c}, Maria-Jesus Cruz^{b,c,*} y Xavier Muñoz^{b,c,d}

^a Servicio de Neumología, Hospital Galdakao-Usansolo, Galdakao, Bizkaia, España

^b Servicio de Neumología, Departament de Medicina, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

^c CIBER Enfermedades Respiratorias (Ciberes), España

^d Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 6 de junio de 2012

Aceptado el 30 de agosto de 2012

On-line el 22 de octubre de 2012

Palabras clave:

Provocación bronquial específica

Exposición ocupacional

Bajo peso molecular

R E S U M E N

El objetivo del presente trabajo fue describir las características clínico-radiológicas y de función pulmonar de la neumonitis por hipersensibilidad por exposición a isocianatos (NHI). Se estudiaron todos los pacientes con diagnóstico de NHI ($n = 5$) durante los años 1995-2010. En todos ellos se realizó TC torácica y estudio de función pulmonar completo. El diagnóstico se realizó mediante prueba de provocación bronquial específica (PPBE) positiva. Se observó un predominio de varones y una variabilidad de patrones en las alteraciones radiológicas. La PPBE fue positiva por descenso de la FVC o de la DLCO en todos los casos excepto en un paciente, en que se estableció por criterios clínicos. Tan solo en un paciente se constató una IgG positiva a isocianatos. La presentación radiológica de la NHI puede ser distinta de las NH más frecuentes, en nuestro estudio y cursan con menor afectación en la PPBE.

© 2012 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Hypersensitivity Pneumonitis Due to Isocyanates: Lung Function, Clinical and Radiological Characteristics

A B S T R A C T

The objective of this present study was to describe the clinical-radiological and lung function characteristics of hypersensitivity pneumonitis due to exposure to isocyanates (HPI). Included for study were all those patients diagnosed with HPI ($n = 5$) from 1995-2010. In all cases, chest CT and complete lung function studies were done. The diagnosis was made with positive specific bronchial provocation tests (BPT). A predominance of males and pattern variability in the radiological alterations were observed. The BPT was positive due to a decline in FVC or DLCO in all cases except in one patient in whom the diagnosis was established with clinical criteria. Positive IgG to isocyanates was confirmed in only one patient. The radiological presentation of HPI may be different from the more common HP in our setting and run their course with less clinical affection on the BPT.

© 2012 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Keywords:

Specific bronchial provocation

Occupational exposure

Low molecular weight

Introducción

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) forma parte de las enfermedades intersticiales difusas de causa conocida¹. En la actualidad se conocen más de 50 antígenos capaces de inducir NH, y la mayoría de ellos son agentes orgánicos de alto peso molecular. De forma excepcional, agentes inorgánicos de bajo peso molecular

han sido también implicados en la génesis de las NH, siendo los isocianatos el ejemplo más característico².

Los isocianatos son agentes químicos capaces de polimerizar sustancias en forma flexible o rígida, y de ahí su extensa aplicabilidad en la industria para fabricar barnices, plásticos, material de aislamiento, tapicería de automóviles, lacas, insecticidas, etc. Aislamiento causal más frecuentemente identificado en el asma ocupacional³. También se han identificado, aunque de forma excepcional, como causa de afectación del parénquima pulmonar. Aunque se desconoce la patogenia, la presencia de síntomas sistémicos, linfocitosis en el lavado broncoalveolar y elevación sanguínea de la IgG específica ha sugerido que el responsable de esta

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mj.cruz@vhir.org (M.-J. Cruz).

Tabla 1
Características clínicas, radiológicas y de función pulmonar de los pacientes

Paciente	1	2	3	4	5
Edad/Sexo	51/Varón	44/Varón	55/Varón	33/Varón	29/Varón
Profesión	Automoción	Industria gráfica	Industria embarnizados	Pintor	Pintor
Hábito tabáquico	Exfumador, 19 paq./año	No	Fumador, 45 paq./año	Fumador, 22 paq./año	No
Tiempo desde la exposición hasta los síntomas (meses)	324	-	18	1	2
Tiempo desde los síntomas hasta el diagnóstico (meses)	60	-	6	5	5
Síntomas	Fiebre, disnea, náuseas, vómitos	Disnea, tos, rinorrea	Disnea de esfuerzo, tos, expectoración	Fiebre, tos, disnea, mialgias	Fiebre, tos, disnea, dolor torácico
TC	Patrón micronodular bilateral. Enfisema paraseptal biapical	Patrón reticular periférico	Patrón reticular. Áreas en vidrio deslustrado y otras de aspecto nodular periférico. Enfisema biapical	Aumento de la densidad basal posterior derecha	Sin alteraciones
Función pulmonar	FVC 3,85 (74%) FEV1 3,29 (83%) FEV1% 85% TLC 5,22 (74%) TLco 7,46 (67%) Kco 1,39 (79%) PC ₂₀ > 16 mg/ml	FVC 4,39 (67%) FEV1 3,58 (73%) FEV1% 81% TLC 5,78 (68%) TLco 7,41 (54%) Kco 1,28 (74%) PC ₂₀ > 16 mg/ml	FVC 2,29 (58%) FEV1 1,87 (65%) FEV1% 81% TLC 3,12 (54%) TLco 3,19 (38%) Kco 1,04 (58%) PC ₂₀ > 16 mg/ml	FVC 4,62 (91%) FEV1 3,98 (100%) FEV1% 86% TLC 5,26 (79%) TLco 7,38 (64,7%) Kco 1,31 (68%) PC ₂₀ > 16 mg/ml	FVC 5,04 (104%) FEV1 4,23 (108%) FEV1% 83% TLC 4,88 (78%) TLco 8,66 (76%) Kco 1,45 (73%) PC ₂₀ > 16 mg/ml

patología puede ser un mecanismo similar a las NH causadas por agentes orgánicos^{4,5}.

En el presente estudio describimos 5 casos de NH por isocianatos (NHI) en los que los pacientes desarrollaron NH enfermedad en relación con la exposición a isocianatos en su lugar de trabajo, tratándose de la serie más larga descrita en nuestro país.

Casos clínicos

Estudio retrospectivo de casos y controles en el que se estudiaron todos los pacientes diagnosticados de NHI durante los años 1995-2010, que fueron remitidos a una unidad de patología respiratoria ocupacional de un hospital de tercer nivel para la confirmación diagnóstica mediante prueba de provocación bronquial específica (PPBE) (n = 5). A prueba de la historia clínica se analizaron, las características clínicas, incluyendo la exploración física, las determinaciones analíticas, la tomografía computarizada (TC) torácica y los estudios de función pulmonar, que incluían espirometría, volúmenes pulmonares estáticos, test de transferencia del CO, prueba de metacolina y resultados de una fibrobroncoscopia en uno de los pacientes.

Las pruebas de función pulmonar se realizaron según las guías de la Sociedad Respiratoria Europea (ERS) mediante un equipo MasterLab (MasterLab, Jaegger, Alemania)^{6,7}. Los valores de referencia usados para la espirometría forzada fueron los propuestos para la población mediterránea⁸. Los volúmenes pulmonares se midieron mediante pletismografía, mientras que para la difusión del monóxido de carbono se utilizó el método de respiración única. En ambos casos los valores teóricos usados fueron los propuestos por la ERS^{6,7}. La prueba de provocación bronquial inespecífica con metacolina se realizó con el método descrito por Chai et al.⁹. La prueba se consideró negativa si la PC₂₀ FEV1 era mayor de 16 mg/ml según los criterios ATS¹⁰.

Los pacientes fueron expuestos a diisocianato de tolueno (TDI) de forma controlada en una cabina de provocación tal como previamente ha sido descrito¹¹, controlando los niveles ambientales de isocianatos no superaran en ningún momento los 20 ppb mediante un equipo MDA 7100 (MDA® Scientific, Inc., Glenview, Illinois, EE. UU.). Los pacientes fueron expuestos inicialmente a placebo durante 15 min y posteriormente, en días sucesivos, a tiempos

crecientes hasta un máximo de 2 h. En todos los pacientes se midieron la temperatura, FEV1, FVC y DLCO tras 20 min de la exposición y cada hora durante las 8 h siguientes. La prueba se consideró positiva si se constataba un descenso > 15% de la FVC y/o un descenso > 20% de la DLCO o un descenso de la FVC entre un 10-15% junto con un aumento de la temperatura > 0,5 °C. Eventualmente, la prueba podía también considerarse positiva si se observaba un mínimo de 3 de los siguientes criterios clínicos sin que se detectaran cambios en los estudios de función pulmonar: temperatura > 37 °C, leucocitosis, y/o artroalgias¹². Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado por escrito para la realización de la PPBE.

Las características clínicas, radiológicas y de función pulmonar de los pacientes se muestran en la tabla 1. Las determinaciones de inmunoglobulinas mediante técnica de ELISA fueron negativas excepto en el paciente número 2, que presentaba una IgG positiva a isocianatos. La PPBE fue positiva en todos los casos siempre por criterio de la densidad de la FVC o de la DLCO excepto en el paciente número 2, en el que la positividad se estableció por criterios clínicos (tabla 2). Se realizó una fibrobroncoscopia en 4 pacientes, aunque solo fue posible obtener datos de esta del paciente número 2. La presencia de linfocitos en el lavado broncoalveolar de dicho paciente fue del 39%, y una muestra anatomopatológica obtenida mediante biopsia transbronquial mostró fibrosis colágena madura, áreas en panal con macrófagos dentro de los espacios aéreos y moderado componente inflamatorio de localización centrolobulillar, células plasmáticas, histiocitos y algunos eosinófilos.

Discusión

En el presente estudio se describen cinco casos de una causa poco común de NH como es la NHI. Todos los pacientes incluidos en el presente trabajo eran varones, hecho ya reflejado anteriormente en la literatura^{4,5}. Este predominio de varones de la NHI contrasta con los datos generales epidemiológicos de NH, en los que se establece un ligero predominio de mujeres en esta enfermedad^{13,14}. Probablemente, lo que determina que exista un predominio de NHI en varones no es el sexo en sí, sino condicionantes que afectan en general a todos los tipos de NH, como por ejemplo la diferente exposición antigénica en función de diferentes regiones

Tabla 2
Resultados de la prueba de provocación bronquial específica

Paciente	1	2	3 ^a	4	5
↓ FVC	11%	5%	6%	20%	11%
↓ TLco	24%	22%	14%	17%	30%
↑ Temperatura	0,3° C	0,5° C	0,5° C	0,3° C	1° C
Tiempo de exposición	10 min	10 min	120 min	30 min	60 min
Concentración ambiental isocianatos (ppb)	9-16	10-16	9-15	8-17	10-17

^a Positividad establecida por criterios clínicos: disnea, tos, artromialgias y temperatura de 37,2 °C.

geográficas, influenciada esta además por factores climáticos, culturales, socioeconómicos y —como sería en nuestro caso— factores ocupacionales. En este sentido, es importante remarcar que tanto en la serie de Lacasse et al.¹³ como en la de Hanak et al.¹⁴ el principal agente etiológico fue la exposición a aves, y que el porcentaje de mujeres en este tipo de NH es de hasta el 75%¹². Así mismo, en ocupaciones donde predominan las mujeres, como es el caso de la producción de embutidos, el porcentaje de mujeres con NH es también superior a la de hombres¹⁵, mientras que en el caso de la industria del corcho, donde trabajan indistintamente hombres y mujeres, la prevalencia de suberosis en ambos sexos es similar¹⁶; lo mismo ocurre con la exposición al esparto, mucho más frecuente en ocupaciones realizadas por hombres, en la que apenas hay mujeres afectadas¹⁷.

Más interesante resulta la variabilidad de patrones radiológicos observada en los pacientes con NHI. De hecho, el patrón reticulo-nodular es el patrón más característico de presentación de las NH, y por ejemplo está presente, conjuntamente o no con otros patrones, en la casi totalidad de los pacientes de la serie de Hanak et al.¹⁴. Así mismo, en el estudio de Lacasse et al.¹³ se observó la presencia de vidrio esmerilado y/o opacidades centrolobulillares en el TC de alta resolución en 183 de los 199 pacientes con NH. Esta variabilidad de patrones radiológicos observada en los pacientes con NHI, tanto en la presente serie como en otras de la literatura^{4,18}, es de difícil interpretación, pero podría deberse a la propia naturaleza del agente causal. En general se admite que para que los isocianatos induzcan NH, la exposición debe ser a dosis elevadas¹⁹, como así lo estaban los pacientes aquí reportados. En este contexto de exposición a dosis elevadas los isocianatos pueden resultar muy dañinos para la estructura pulmonar, pudiendo existir una afectación paralela a la NH que pudiera condicionar esta variabilidad de patrones radiológicos. Esta hipótesis podría estar avalada por el hecho de que en el 75% de los pacientes estudiados por Baur⁴ en los que se realizó fibrobroncoscopia se constataban signos difusos de bronquitis y un elevado porcentaje de neutrófilos en el lavado broncoalveolar, que en algunos casos llegaba hasta el 62%. Esta elevada proporción de neutrófilos también fue hallada por Vandenplas et al.⁵, con cifras medias de alrededor del 32%.

El hallazgo de anticuerpos IgG específicos en la mayoría de los casos publicados^{4,18} ha hecho que estos autores sugirieran que la fisiopatología de la NHI no tendría por qué diferir de la de otras NH. En este sentido, en estos trabajos se ha sugerido que un mecanismo de hipersensibilidad tipo III podría ser el responsable de esta patología, aunque en la actualidad existen dudas sobre si realmente este es el mecanismo responsable o si se trata de un mecanismo de hipersensibilidad tipo IV mediado por células T. Efectivamente, se ha sugerido que en los casos de clínica aguda o subaguda podría estar implicado un mecanismo TH1, mientras que en los casos en los que la evolución es hacia fibrosis pulmonar el mecanismo TH2 podría ser el responsable de la patología, indicando el hallazgo de los anticuerpos IgG específicos un hecho que señalaría de nuevo a una patología²⁰. En este sentido, nuestros resultados podrían estar de acuerdo con esta segunda hipótesis al observar que tan solo un paciente presentaba IgG específica a isocianatos y teniendo además en cuenta la variabilidad radiológica observada.

En conclusión, aunque la NHI es una entidad muy poco frecuente, es importante tenerla en cuenta en el diagnóstico diferencial en los individuos expuestos a inhalación de isocianatos que presentan patología respiratoria. Es importante tener también en cuenta que la presentación radiológica que puede ser distinta de las NH más frecuentes en nuestro medio y que puede ser frecuente la ausencia de anticuerpos IgG específicos. La PPBE específica es útil para el diagnóstico de esta entidad.

Financiación

Estudio financiado por una Beca Fis PI1001577 (Instituto de Salud Carlos III, Madrid), la Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP) y la Sociedad Española de Patología Respiratoria (SEPAR).

Bibliografía

- Newman-Taylor A. Extrinsic allergic alveolitis. En: Brewis RAL, Gibson GJ, Geddes DM, editores. *Respiratory Medicine*. London, UK: Bailliere Tindall; 1990. p. 1104.
- Alvarez A, Bofill JM, Bravo C, Cruz MJ, Culebras M, De Gracia J, et al. Alveolitis alérgica extrínseca. En: Morell F, editor. *Pneumológica. Pautas, exploraciones complementarias y datos en medicina respiratoria*. 9.ª ed. Barcelona, España: Ergon; 2012.
- Orriols R, Costa R, Albanell M, Alberti C, Castejon J, Monso E, et al., Malaltia Ocupacional Respiratòria (MOR) Group. Reported occupational respiratory diseases in Catalonia. *Occup Environ Med*. 2006;63:255–60.
- Baur X. Hypersensitivity pneumonitis (extrinsic allergic alveolitis) induced by isocyanates. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95:1004–10.
- Vandenplas O, Malo J, Dugas M, Cartier A, Desjardins A, Lévesque J, et al. Hypersensitivity pneumonitis-like reaction among workers exposed to piperonyl methane diisocyanate (MDI). *Am J Respir Crit Care Med*. 1993;147:338–46.
- Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pederson OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal, Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J*. 1993;6 Suppl. 16:5–40.
- Cotes JE, Chinn DJ, Quanjer PH, Roca J, Yernault JC. Standardization of the measurement of transfer factor (diffusing capacity). Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal, Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J*. 1993;6 Suppl. 16:41–52.
- Roca J, Sanchis J, Augusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodríguez-Roisín R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1986;22:217–24.
- Chai H, Farr RS, Froehlich LA, Mathison DA, MacLean JA, Rosenthal RR, et al. Standardization of bronchial inhalation challenge procedures. *J Allergy Clin Immunol*. 1975;53:323–7.
- American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing: 1999. *Am J Crit Care Med*. 2000;161:309–29.
- Pepys J, Hutchcroft BJ. Bronchial provocation tests in etiologic diagnosis and analysis of asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1975;112:829–59.
- Morell F, Roger A, Reyes L, Cruz MJ, Murio C, Muñoz X. Bird fancier's lung: a series of 86 patients. *Medicine*. 2008;87:110–30.
- Lacasse Y, Selman M, Costabel U, Dalphin JC, Ando M, Morell F, et al., HP Study Group. Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:952–8.
- Hanak V, Golbin JM, Ryu JH. Causes and presenting features in 85 consecutive patients with hypersensitivity pneumonitis. *Mayo Clin Proc*. 2007;82:812–6.
- Morell F, Cruz MJ, Gómez FP, Rodríguez-Jerez F, Xaubet A, Muñoz X. Chacinerero's lung: hypersensitivity pneumonitis due to dry sausage dust. *Scand J Work Environ Health*. 2011;37:349–56.
- Morell F, Roger A, Cruz MJ, Muñoz X, Rodrigo MJ. Suberosis. Clinical study and new etiologic agents in a series of eight patients. *Chest*. 2003;124:1145–52.

17. Cruz MJ, Morell F, Roger A, Muñoz X, Rodrigo MJ. Neumonitis por hipersensibilidad en los yeseros de la construcción (espartosis): estudio de 20 casos. *Med Clin (Barcelona)*. 2003;120:578-83.
18. Sumi Y, Kyi M, Miyazaki Y, Ohtani Y, Miyake S, Yoshizawa Y. Cytokine mRNA expression in isocyanate-induced hypersensitivity pneumonitis. *Respiration*. 2003;70:284-91.
19. Vandenplas O, Malo JL, Saetta M, Mapp CE, Fabbri LM. Occupational asthma and extrinsic alveolitis due to isocyanates: current status and perspectives. *Br J Ind Med*. 1993;50:213-28.
20. Barrera L, Mendoza F, Zúñiga J, Estrada A, Zamora AC, Melendro EI, et al. Functional diversity of T-cell subpopulations in subacute and chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:44-55.



Diagnostic yield of specific inhalation challenge in hypersensitivity pneumonitis

Xavier Muñoz^{1,2,3}, Mónica Sánchez-Ortiz^{1,2}, Ferran Torres⁴, Ana Villar^{1,2}, Ferran Morell^{1,2} and María-Jesús Cruz^{1,2}

Affiliations:

¹Pulmonology Service, Medicine Dept, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

²CIBER Enfermedades Respiratorias (Ciberes), Spain.

³Dept of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁴Biostatistics and Data Management Platform, IDIBAPS, Hospital Clinic, Biostatistics Unit, School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Correspondence:

Xavier Muñoz, Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron, 119, 08035 Barcelona, Spain.

E-mail: xmunoz@vhebron.net

ABSTRACT Reliable methods are needed to diagnose hypersensitivity pneumonitis. The aim of the study was to establish the diagnostic yield of specific inhalation challenge (SIC) in patients with hypersensitivity pneumonitis.

All patients with suspected hypersensitivity pneumonitis in whom SIC was performed (n=113) were included. SIC was considered positive when patients showed a decrease of >15% in forced vital capacity (FVC) or >20% in diffusing capacity of the lung for carbon dioxide, or a decrease of 10% to 15% in FVC accompanied by a temperature increase of 0.5°C within 24 h of inhalation of the antigen.

SIC was positive to the agents tested in 68 patients: 64 received a diagnosis of hypersensitivity pneumonitis and SIC results were considered false-positive in the remaining four patients. In the SIC-negative group (n=45), 24 patients received a diagnosis of hypersensitivity pneumonitis and SIC results were considered false-negative, and 21 patients were diagnosed with other respiratory diseases. The sensitivity and specificity of the test were 72.7% and 84%, respectively. Having hypersensitivity pneumonitis caused by an antigen other than birds or fungi predicted a false-negative result (p=0.001).

In hypersensitivity pneumonitis, positive SIC testing virtually confirms the diagnosis, whereas negative testing does not rule it out, especially when the antigenic sources are not birds or fungi.



@ERSpublications

Specific inhalation challenge can be very useful for establishing the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis <http://ow.ly/zxszi>

Received: March 31 2014 | Accepted after revision: June 29 2014 | First published online: Aug 19 2014

Support statement: This study was supported by FIS PI1001577 (Instituto de Salud Carlos III), Sociedad Española de Patología Respiratoria (SEPAR, Spanish Society of Respiratory Disease), and Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP, Catalan Pulmonology Foundation). M.J. Cruz is a researcher supported by the Miguel Servet programme from Instituto de Salud Carlos III (CP12/03101). The funders had no role in the study design, data collection or analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflict of interest: None declared.

Copyright ©ERS 2014

Introduction

Hypersensitivity pneumonitis is a disease with heterogeneous causes, resulting from an inflammatory pulmonary reaction of immunological origin in response to a wide variety of antigens that can provoke varying degrees of inflammation and destructuring of the lung parenchyma [1]. Currently, most authors agree that the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis should be based on the criteria proposed by SCHUYLER and CORMIER [2]. The development and clinical presentation of hypersensitivity pneumonitis are influenced by several factors [3–6]. Genetic susceptibility may explain why one individual develops the disease, another individual with exactly the same exposure is only sensitised but remains healthy, and yet another will not even become sensitised [3, 4]. In this context, in which a process of sensitisation seems essential, the specific inhalation challenge (SIC) could be a tool for diagnosing this condition [5], especially bearing in mind the immunological and histopathological response elicited in affected patients [6].

Nevertheless, SIC currently lacks standardisation. Only four studies to date, all in the framework of bird fancier's lung, have attempted to establish the performance of the test [7–10]. The sensitivity and specificity values obtained in these studies were between 80% and 100%, but the small number of patients tested and, in particular, the fact that the manner of performing and interpreting the test substantially differed between studies may be the reasons why this diagnostic tool is not more widely used.

The aim of this study was to evaluate the performance of SIC for diagnosing hypersensitivity pneumonitis due to a variety of causal agents in a large number of patients with this condition.

Materials and methods

Study population

This was a retrospective, cross-sectional study including all patients older than 18 years with suspected hypersensitivity pneumonitis who underwent SIC in our centre (Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain) between June 1995 and December 2010. Some of these patients had been initially seen at other hospitals and were later referred to our centre to complete the diagnostic study.

Diagnostic protocol

In all patients, we analysed data from the clinical history and physical examination, as well as the results from the following additional tests: laboratory analyses with complete blood count, erythrocyte sedimentation rate, gammaglobulin, total G and E immunoglobulins, calcium level, 24-h urinary calcium, plasma angiotensin-converting enzyme and lactate dehydrogenase levels, as well as specific serum immunoglobulin G antibody determinations, chest radiograph, chest computed tomography, pulmonary function testing including spirometry, static lung volumes, and carbon monoxide diffusing capacity (DLCO), immediate and delayed hypersensitivity skin testing, bronchofibroscopy with bronchoalveolar lavage and/or transbronchial biopsy, and SIC. In the few cases in which a definite diagnosis could not be reached once these tests had been carried out, surgical lung biopsy was performed after individualised assessment of the indication [10].

Diagnostic confirmation

The definite diagnosis of hypersensitivity pneumonitis was established based on independent review of the patients' medical records by two pulmonologists with extensive experience in diffuse interstitial lung disease who were unaware of the SIC results. In addition to evaluation of the data at the time when SIC was performed, the two experts also assessed the patients' clinical follow-up data up to the time of writing. The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis was established by the two specialists according to the same diagnostic protocol [10] based on the proposed criteria of SCHUYLER and CORMIER [2].

Antigen extract preparation for specific inhalation challenge

Commercialised extracts (Bial-Aristegui, Bilbao, Spain) from *Penicillium frequentans*, *Aspergillus fumigatus* and *Mucor mucedo* were used to study fungi [11]. The avian sera were prepared in our laboratory. Blood for avian serum extracts was collected from several birds and centrifuged; the serum protein concentration was measured by bicinchoninic acid assay (Pierce Chemicals, Rockford, IL, USA). The extracts for SIC to isocyanates and esparto were prepared as previously described [11, 12]. The SIC to metalworking fluid, dental prostheses and interferon were performed with the material provided by the patient to simulate the working conditions in a challenge room.

Specific inhalation challenge

SIC was performed in the hospital setting after obtaining the patient's written consent. In patients receiving anti-inflammatory medication (corticosteroids), the medication was discontinued at least 8 days before SIC was carried out. Patients were required to have a baseline forced vital capacity (FVC) >50% and

$DLCO \geq 40\%$ of the reference value [13] to be considered for SIC testing. The test was performed on an outpatient basis.

In 81 patients, SIC consisted of nebulisation of an extract of the suspected causal agent using a De Vilbiss 646 nebuliser (De Vilbiss CO, Somerset, PA, USA) from 1995 to 2001 or a Mefar MB3 dosimeter (Mefar, Ele H₂O; Medicali, Brescia, Italy) from 2001 to 2010, which release the solution during the first second of each inspiration. Patients were requested to inhale 2 mL of the suspected antigen at a dilution of 1:100 (0.01 mg·mL⁻¹) [10, 13]. FVC, forced expiratory volume in 1 s, $DLCO$, and the patient's temperature were recorded at baseline, 20 min after inhalation challenge, every hour thereafter for the next 8 h and at 24 h. Blood cell count, chest radiograph and O₂ saturation measurement were performed before and 8 h after inhalation. In all cases, SIC with a placebo solution (saline) was carried out 1 day before testing with the suspected antigen. None of the patients responded positively to the placebo solution.

The test was considered positive when any of the following responses was elicited [10, 13]. 1) FVC decrease of >15% or $DLCO$ decrease of >20% as compared to baseline values. 2) 10% to 15% FVC decrease plus at least one of the following five criteria with respect to clinical status and baseline analytical values: white blood cell increase of 20%; O₂ saturation decrease of 3%; significant radiological changes; rise in body temperature of more than 0.5°C; or evident clinical symptoms (e.g. cough or dyspnoea). 3) FVC decrease <10% but with evidence of three or more of the previously mentioned clinical or analytical criteria. When the test proved negative, inhalation of a new antigen dilution of 1:10 (0.1 mg·mL⁻¹) was performed the next day following the same procedure.

In 32 patients, the antigens used were not soluble (isocyanates, wood dust, humidifiers, duvets, etc.), and the SIC was conducted by directly exposing the patient to the suspected causal agent in a challenge chamber [12, 14, 15]. When the previous result was negative, the exposure time was increased on successive days, up to a maximum exposure of 2 h per day. The clinical and functional response and the criteria to establish positivity were those mentioned above.

Pulmonary function testing

Pulmonary function testing was carried out on a MasterLab system (MasterLab, Jaeger, Germany) according to the guidelines of the European Respiratory Society [16, 17]. The forced spirometry reference values were those proposed for the Mediterranean population [18]. For the diffusion study, the single-breath diffusing capacity of the lung for carbon monoxide was used. The theoretical values were those proposed by the European Respiratory Society [17]. Starting in 2006, the European Respiratory Society/American Thoracic Society joint guidelines were used [19, 20].

Statistical analysis

The Mann–Whitney test and chi-squared test were applied to compare continuous and nominal variables, respectively, with a two-sided significance level of 0.05. The consistency of SIC was estimated by evaluating the sensitivity and specificity [21] of the method, the positive and negative predictive values [22], and the likelihood ratio of a positive and negative value [23] with 95% confidence intervals using the Wilson method [24]. Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed to determine the cut-off values that best differentiated between having the disease or not [25]. All analyses were done with SPSS, version 17 (Chicago, IL, USA) and SAS version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Of the original 136 patients with suspected hypersensitivity pneumonitis referred for SIC, 23 were excluded. The test was not performed in four patients due to a $DLCO < 40\%$, and in the other 19 no clinical data were available. Among the 113 subjects undergoing the test, SIC was positive to the agents tested in 68 patients, 64 of whom were diagnosed with hypersensitivity pneumonitis (group 1). The SIC was considered to yield false-positive results in the four remaining patients (group 2), who were diagnosed with smoking-related bronchiolitis, cryptogenic organising pneumonia due ortho-phenylenediamine exposure [26], sarcoidosis and idiopathic pulmonary haemosiderosis. In the SIC-negative group (n=45), 24 patients received a diagnosis of hypersensitivity pneumonitis and SIC results were considered false-negative (group 3), and 21 patients were diagnosed with other respiratory diseases: chronic obstructive pulmonary disease (n=5), idiopathic pulmonary fibrosis (n=4), bronchiectasis (n=4), bronchiolitis (n=3), silicosis (n=1), microscopic polyangiitis (n=1), sarcoidosis (n=1), nonspecific interstitial pneumonia (n=1), and asthma (n=1) (group 4) (fig. 1). None of the patients in group 4 presented symptoms or impaired lung function during SIC.

Demographic data and clinical characteristics of the total series and the group 1 and group 3 patients are summarised in table 1. Patient age and percentage of nonsmokers were significantly higher in group 3 than

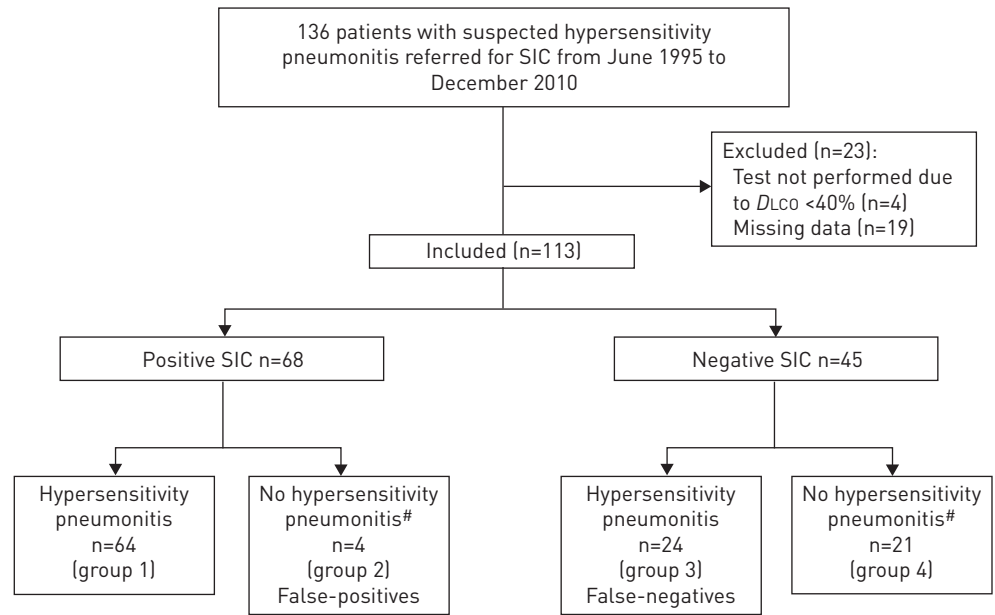


FIGURE 1 Flow chart of patient enrolment. SIC: specific inhalation challenge; *DLCO*: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide. #: see diagnostics in text.

in group 1 ($p=0.004$ and $p=0.003$, respectively). In group 3, 58.3% of the hypersensitivity pneumonitis cases were not caused by avian or fungal proteins, whereas in group 1 only 11% of cases were not caused by these agents ($p<0.001$). The non-avian non-fungal agents causing these cases were isocyanates ($n=3$); esparto ($n=2$); wood ($n=2$) metalworking fluid ($n=1$), dental prosthesis ($n=1$) and interferon ($n=1$). In 11 patients, the causal antigen was not found. In these 11 patients, SIC was performed to several suspected antigens, but no positive results were recorded.

The sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of SIC according to the established criteria for positive status (FVC, *DLCO* and temperature) are shown in table 2, with 95% confidence intervals. The sensitivity and negative predictive value of the test were higher when only patients with hypersensitivity pneumonitis caused by avian or fungal proteins were assessed (table 2). The ROC curves in figure 2 show the most relevant differences in FVC, *DLCO* and temperature alone before and after SIC for predicting positive SIC status. Using the ROC curve, we found that a more than 10% FVC decrease achieved the most satisfactory sensitivity (45.5%, 95% CI 35.5–55.8) and specificity (88%, 95% CI 70–95.8) for the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. For *DLCO*, a post-SIC decrease greater than 15% resulted in a sensitivity of 45.5% (95% CI 35.5–55.8) and specificity of 76% (95% CI 56.6–88.5). Regarding temperature, an increase higher than 0.5°C after SIC achieved a sensitivity of 37.5% (95% CI 28.1–47.9) and specificity of 72% (95% CI 52.4–85.7).

Nine patients (8%) experienced severe reactions related to SIC testing. These included influenza-like symptoms in all cases, with fever up to 40°C in one patient, hypoxaemia with an arterial oxygen tension (P_{aO_2}) decrease of 10 mmHg in another patient, and the development of new radiological changes in another. All these severe reactions were transient, and only the three patients mentioned required administration of oral corticosteroids. None required hospital admission. As compared to patients who did not present severe reactions, these nine patients were younger (mean \pm SD age 39.56 ± 13.07 versus 53.29 ± 14.48 years; $p=0.009$) and pre-SIC *DLCO* was higher ($94.28 \pm 17.44\%$ versus $69.67 \pm 21.17\%$ of theoretical value; $p=0.005$). There were no significant differences in the remaining variables analysed.

Discussion

The results of this study show that SIC could be useful as a tool for diagnosing hypersensitivity pneumonitis, with a positive predictive value of 94% and negative predictive value of 46.6% when considering the overall tests performed, and negative predictive value of 74.4% when including only tests performed with avian or fungal antigens. Of note, the likelihood ratios for positive and negative values, which are independent of the high prevalence observed in our sample, were >5 and <2 , respectively. This is clearly an indication of the high utility of the combined diagnostic test to differentiate between patients testing positive and negative [23]. To our knowledge, this is the first study assessing the diagnostic yield of

TABLE 1 Demographic data and clinical characteristics of the study subjects

	Total	Group 1	Group 3
Subjects	113	64	24
Age years	52 ± 14.8	50 ± 14.6 ^{##}	59.5 ± 13.8 ^{##}
Male	49 (43.4)	28 (43.8)	10 (41.7)
Exposure time (months) before SIC	170 ± 168	171 ± 167	159.6 ± 179
Duration of symptoms (months) before SIC	37.2 ± 45.5	42.5 ± 52.5	22.82 ± 19.2
Time (months) since last exposure	10.6 ± 31.8	12.3 ± 38.9	4.2 ± 7.8
Smoking habit		^{††}	^{††}
Smoker	19 (18.1)	13 (22)	2 (9.1)
Nonsmoker	56 (53.3)	24 (40.7)	18 (81.8)
Ex-smoker	30 (28.6)	22 (37.3)	2 (9.1)
Lymphocytes in BAL %	22.4 ± 21.3	25 ± 23.7	24 ± 18.9
FVC before SIC %	79.3 ± 16.6	78.75 ± 18.2	75.7 ± 13.8
FEV₁ before SIC %	86.4 ± 18.2	83.60 ± 18.0	88 ± 18.8
FEV₁/FVC before SIC %	81.3 ± 13.8	81.6 ± 8.8	82.2 ± 19.0
TLC before SIC %	86.9 ± 16.6	86.4 ± 19.1	85.7 ± 12.0
DLco before SIC %	71.3 ± 21.7	70 ± 23.4	71.2 ± 18.9
Chest CT			
Normal	10 (9.6)	6 (10)	2 (9.1)
Nodular	15 (14.4)	11 (18.3)	1 (4.5)
Reticular	5 (4.8)	3 (5)	2 (9.14.7)
UIP	19 (18.3)	9 (15)	7 (31.8)
Ground glass	39 (37.5)	24 (40)	10 (45.5)
Emphysema	6 (5.8)	2 (3.3)	0
Bronchiectasis	10 (9.6)	5 (8.3)	0
Antigen SIC			
Avian proteins	65 (57.5)	34 (53.1)	17 (70.8)
Fungi	30 (26.5)	23 (35.9)	4 (16.7)
Others	18 (15.9)	7 (10.9)	3 (12.5)
Final clinical diagnosis***			
HP due to avian proteins	43 (38.1)	34 (53.1)	9 (37.5)
HP due to fungi	24 (21.2)	23 (35.9)	1 (4.2)
HP due to other antigens	21 (18.6)	7 (10.9)	14 (58.3)
No HP	25 (22.1)		

Data are presented as n, n (%), or mean ± SD. SIC: specific inhalation challenge; BAL: bronchoalveolar lavage; FVC: forced vital capacity; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; TLC: total lung capacity; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; CT: computed tomography; UIP: usual interstitial pneumonia; HP: hypersensitivity pneumonitis. ^{##}: p=0.004; ^{††}: p=0.003, group 1 versus group 3; ^{***}: p<0.001.

SIC in a clinical practice setting in a large number of cases and with no restrictions on the agents causing hypersensitivity pneumonitis.

Although SIC has been used for the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis since the 1960s, it was not until 1980 that HENDRICK *et al.* [7] attempted to determine the performance of this test in a study including 29 cases of suspected hypersensitivity pneumonitis due to avian antigens. The authors reported a sensitivity of 48% to 85% and a specificity of 95%. Also in the context of hypersensitivity pneumonitis due to avian antigens, RAMÍREZ-VEGAS *et al.* [8] studied 17 patients with chronic hypersensitivity pneumonitis and 17 patients with other interstitial lung diseases and reported a sensitivity of 82% to 86% and specificity of 76% to 100%, whereas OHTANI *et al.* [9] found no false results in a study of 11 patients with bird fancier's lung and six control subjects. The largest study to date, also conducted in patients with bird fancier's lung, showed a sensitivity and specificity of 92% and 100%, respectively, in 59 patients with hypersensitivity pneumonitis, 30 healthy pigeon keepers, and 20 patients with other diffuse interstitial lung diseases [10].

One noteworthy finding in the present study was the elevated number of false-negative test results. In 24 patients with hypersensitivity pneumonitis, SIC results were negative. The first reason for this may be related to the fact that our study was based on regular clinical practice, whereas in the ones mentioned above [7–9], the study protocol may have had an effect on the results. In this sense, it may not have been completely appropriate to include as false-negative cases the 11 patients in whom the causal agent was not found. It may have been that the antigen used for SIC was simply not the one causing the disease. Second,

TABLE 2 Diagnostic performance of specific inhalation challenge (SIC)

	All SIC	SIC to avian proteins and fungi
Subjects n	113	95
Prevalence %	78	73
Sensitivity %	72.7 (62.6–80.9)	85.1 (74.7–91.7)
Specificity %	84.0 (65.3–93.6)	86.2 (69.4–94.5)
PPV %	94.0 (85.8–97.7)	93.4 (84.3–97.4)
NPV %	46.6 (32.9–60.9)	71.4 (54.9–83.7)
LR+ %	4.6 (1.8–11.3)	5.32 (2.15–13.13)
LR- %	0.3 (0.23–0.5)	0.18 (0.10–0.32)

Data are presented with 95% confidence intervals. PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value. LR+: positive likelihood ratio; LR-: negative likelihood ratio.

and likely the determinant factor, is that all types of hypersensitivity pneumonitis were included, regardless of the causal agent. As would be expected, our group has considerable experience in performing SIC with avian proteins [10] and fungi [11, 27, 28], but much more limited practice with the less common causal agents of hypersensitivity pneumonitis. This was illustrated when only patients with hypersensitivity pneumonitis caused by exposure to birds or fungi were analysed: there were only 10 false-negative results and the sensitivity of the test rose to 85%. Finally, there are a high percentage of patients with usual interstitial pneumonia in the false-negative group (31.8%). These chronic fibrotic patients tend to have lower inflammatory cell infiltrates, indicating perhaps that the test may not be useful for this subgroup [29]. We do not know the effect that age and smoking habit can have on the positivity or negativity of the SIC.

One of the main problems for definite implementation of SIC in the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis stems from the lack of a well-defined method for carrying out the test. This may also have contributed to the differences in false-negative rates. Three methods have been proposed for SIC. First, some authors hold that natural workplace or home exposure is a reasonable way to provoke symptoms or manifest deterioration of functional parameters in uncertain cases of hypersensitivity pneumonitis [4]. Secondly, it may be useful to try to reproduce the working or environmental conditions in a challenge chamber. This method has not been widely used [14, 30], and although it does not conclusively identify the causal agent, it may be easier to standardise and possibly safer. The third method consists of using an aerosolised extract material of the suspected causal agent. This may be the most commonly used method, with one of the first descriptions published by WILLIAMS [31] in 1963. It is the method we apply when the suspected agents are avian proteins or fungi [7–9]. It is important to mention that the SIC method used by our group is focussed on achieving the correct diagnosis while submitting the patient to the least possible

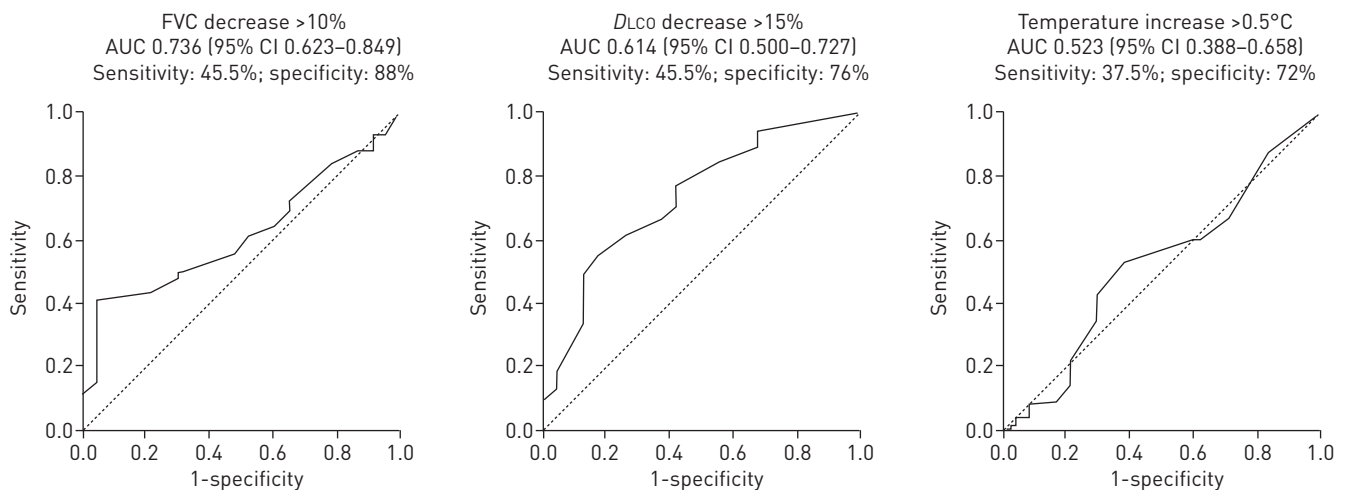


FIGURE 2 Receiver operating characteristic curves constructed to determine the most relevant differences in forced vital capacity (FVC), diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DL_{CO}), and temperature before and after specific inhalation challenge for predicting hypersensitivity pneumonitis. AUC: area under the curve.

risk. Thus, the level of antigen exposure is probably lower than that used by other groups. For example, maximum exposure in the studies of OTANI *et al.* [9] was 680 µg of protein, whereas our group uses a maximum dose of 200 µg protein. The rationale is that fewer respiratory and systemic symptoms will be produced, and that possible pulmonary function abnormalities will be rapidly reversible.

Related with this last observation, another critical aspect is how to establish a positive outcome in SIC. Whereas HENDRICK *et al.* [7] and OTANI *et al.* [9] basically considered the test positive when symptoms and signs consistent with an influenza-like illness developed, other groups place more importance on objective measures than on clinical aspects. RAMÍREZ-VENEGAS *et al.* [8] considered the test positive when a decrease >16% in FVC, >3 mmHg in P_{aO_2} , >3% in arterial oxygen saturation, or a body temperature increase >0.5°C occurred. Our group, however, has assigned greater value to pulmonary function studies [10, 13]. When the criterion of >0.5°C body temperature increase is combined with an FVC decrease >15%, DLCO decrease >20%, or FVC between 10% and 15%, the test shows good sensitivity, particularly in the study of avian or fungal antigens. When these parameters were tested separately, specificities were good, but sensitivities were low. For this reason, we believe that combined assessment of these parameters provides the best diagnostic yield.

Another important aspect when recommending SIC in the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis is the small number of associated adverse effects. Only nine patients experienced such effects, which were transient in all cases, and only three patients required oral corticosteroid administration. These secondary effects occurred in younger patients with higher baseline DLCO levels, an observation that should alert to the need for special precautions (*e.g.* decrease the dose of inhaled antigen and hospitalise the patient) in this patient group. The fact that complications presented in individuals with a nearly normal DLCO may be because these patients are more prone to note clinical changes than those in whom DLCO is already decreased and baseline symptoms may be present. It is important to mention that in our protocol, SIC is only contraindicated when the FVC and DLCO are less than 50% and 40%, respectively, of the theoretical value [13]. Some authors believe that SIC should not be performed under any circumstances because the test itself may sensitise the patient and cause illness [32]. This has not been observed in any patients undergoing SIC in whom a diagnosis other than hypersensitivity pneumonitis was ultimately established. Nor has it been observed in other studies in which healthy control subjects underwent SIC [7, 8, 10].

This study has the limitations of a retrospective design. Although all patients were studied according to the same protocol, SIC was performed for diagnostic purposes and not in the context of a study designed to determine its performance. This limitation may have been compensated by the fact that the definite diagnosis of the disease was established at the time of the study by two independent observers who took into consideration the patients' follow-up data in addition to the proposed diagnostic criteria for hypersensitivity pneumonitis [2, 33]. This fact practically assures the diagnosis and likely enables establishment of the usefulness of the test in actual clinical practice. Another possible limitation is the fact that the data for sensitivity and specificity were calculated in the context of diagnosis of hypersensitivity pneumonitis, and not in the context of the differential diagnosis of interstitial lung diseases. Future studies should be designed to determine the sensitivity and specificity of SIC for the differential diagnosis of interstitial lung diseases.

In conclusion, the results of the present study show that SIC could be useful in the diagnosis process of hypersensitivity pneumonitis. In fact, a positive result is practically diagnostic for this disease, with good sensitivity. It has also proven to be a safe test, with few adverse effects. Nonetheless, efforts should be made to standardise the way in which SIC is performed, particularly when the suspected causal agent is not avian or fungal proteins, and the interpretation of the results.

References

- Selman M. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. *Clin Chest Med* 2004; 25: 531–547.
- Schuyler M, Cormier Y. The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1997; 111: 534–536.
- Selman M. Hypersensitivity pneumonitis. In: Schwarz MI, King TE, eds. *Interstitial Lung Disease*. Shelton, People's Medical Publishing House, 2011; pp. 597–635.
- Costabel U, Bonella F, Guzman J. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *Clin Chest Med* 2012; 33: 151–163.
- Lacasse Y, Girard M, Cormier Y. Recent advances in hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 2012; 142: 208–217.
- Selman M, Pardo A, King TE Jr. Hypersensitivity pneumonitis. Insights in diagnosis and pathobiology. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186: 314–324.
- Hendrick DJ, Marshall R, Faux JA, *et al.* Positive "alveolar" response to antigen inhalation provocation test: their validity and recognition. *Thorax* 1980; 35: 415–427.
- Ramírez-Venegas A, Sansores RH, Pérez-Padilla R, *et al.* Utility of a provocation test for diagnosis of chronic pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 862–869.
- Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, *et al.* Inhalation provocation test in chronic bird fancier's lung. *Chest* 2000; 118: 1382–1389.
- Morell F, Roger A, Reyes L, *et al.* Bird fancier's lung. A series of 86 patients. *Medicine (Baltimore)* 2008; 87: 110–130.

- 11 Cruz MJ, Morell F, Roger A, *et al.* Hypersensitivity pneumonitis in construction plasterers (espartosis): study of 20 patients. *Med Clin (Barc)* 2003; 120: 578–583.
- 12 Uranga A, Sánchez-Ortiz M, Morell F, *et al.* Hypersensitivity pneumonitis due to isocyanates: lung function, clinical and radiological characteristics. *Arch Bronconeumol* 2013; 49: 169–172.
- 13 Muñoz X, Morell F, Cruz MJ. The use of specific inhalation challenge in hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2013; 13: 151–158.
- 14 Sogo A, Morell F, Muñoz X. Hypersensitivity pneumonitis associated with the use of a steam iron. *Arch Bronconeumol* 2009; 45: 258–259.
- 15 Toribio R, Cruz MJ, Morell F, *et al.* Hypersensitivity pneumonitis related to medium-density fiberboard. *Arch Bronconeumol* 2012; 48: 29–31.
- 16 Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, *et al.* Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal, Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; 6: 5–40.
- 17 Cotes JE, Chinn DJ, Quanjer PH, *et al.* Standardization of the measurement of transfer factor (diffusing capacity). Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal, Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J* 1993; 6: 41–52.
- 18 Roca J, Sanchis J, Augusti-Vidal A, *et al.* Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; 22: 217–224.
- 19 Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, *et al.* ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319–338.
- 20 MacIntyre N, Crapo RO, Viegi G, *et al.* Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J* 2005; 26: 720–735.
- 21 Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ* 1994; 308: 1552.
- 22 Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 2: Predictive values. *BMJ* 1994; 309: 102.
- 23 Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: Likelihood ratios. *BMJ* 2004; 329: 168–169.
- 24 Wilson EB. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *J Am Stat Assoc* 1927; 22: 209–212.
- 25 Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ* 1994; 309: 188.
- 26 Sanchez-Ortiz M, Cruz MJ, Viladrich M, *et al.* Cryptogenic organizing pneumonia due to ortho-phenylenediamine. *Respir Med CME* 2011; 4: 164–165.
- 27 Morell F, Roger A, Cruz MJ, *et al.* Suberosis. Clinical study and new etiologic agents in a series of eight patients. *Chest* 2003; 124: 1145–1152.
- 28 Morell F, Cruz MJ, Gomez FP, *et al.* Chacineró's lung – hypersensitivity pneumonitis due to dry sausage dust. *Scand J Work Environ Health* 2011; 37: 349–356.
- 29 Ohtani Y, Saiki S, Kitaichi M, *et al.* Chronic bird fancier's lung: histopathological and clinical correlation. An application of the 2002 ATS/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax* 2005; 60: 665–671.
- 30 Baur X. Hypersensitivity pneumonitis (extrinsic allergic alveolitis) induced by isocyanates. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 1004–1010.
- 31 Williams JV. Inhalation and skin tests with extracts of hay and fungi in patients with farmer's lung. *Thorax* 1963; 18: 182–196.
- 32 Richerson HB, Bernstein IL, Fink JN, *et al.* Guidelines for the clinical evaluation of hypersensitivity pneumonitis. Report of the Subcommittee on Hypersensitivity Pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 839–844.
- 33 Lacasse Y, Selman M, Costabel U, *et al.* Clinical diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 952–958.



Inhalation challenge in the differential diagnosis of usual interstitial pneumonia



CrossMark

To the Editor:

Establishing when a patient with usual interstitial pneumonia (UIP) is truly idiopathic is fundamental. In this sense, the paper recently published by WUYTS *et al.* [1], is an excellent review of the various diseases that may present with a histopathology consistent with UIP.

The authors stress the importance of distinguishing between idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and chronic hypersensitivity pneumonitis in the differential diagnosis, especially in view of the fact that immunosuppressant treatment is suitable for patients with hypersensitivity pneumonitis, but is clearly contraindicated in patients with IPF [2]. Furthermore, the authors note that these diagnoses can easily be confused; indeed, MORELL *et al.* [3] recently found that up to 43% of patients diagnosed with IPF are actually misdiagnosed chronic hypersensitivity pneumonitis. As WUYTS *et al.* [1] state: "The diagnosis of hypersensitivity pneumonitis requires proven or suspected exposure associated with exposure-related symptoms; proof of sensitisation (*e.g.* demonstration of serum precipitins or lymphocytosis in the BAL fluid); and compatible chest radiography/HRCT abnormalities (with or without restrictive ventilatory/gas exchange defects) [4]. However, serum precipitating antibodies to a variety of common causative antigens have low sensitivity and specificity, and are helpful when positive but not if negative. Chronic hypersensitivity pneumonitis may represent a diagnostic dilemma, particularly when a detailed clinical history does not reveal a temporal relationship between symptom onset and antigen exposure". It is in this context that a specific inhalation challenge (SIC) may be particularly useful in the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis, and also in order to differentiate it from IPF.

Indeed, of the 20 patients with hypersensitivity pneumonitis previously diagnosed as IPF reported by MORELL *et al.* [3], SIC was essential in establishing differentiation in nine cases, although in eight of them precipitins were also positive. In the remaining 11 patients, the final diagnosis was made by combining exposure history, precipitins, lymphocytosis in bronchoalveolar lavage (BAL) and/or alterations in surgical lung biopsy showing a pattern consistent with chronic hypersensitivity pneumonitis. In this regard, our group has recently reported that, in patients with suspected hypersensitivity pneumonitis caused by exposure to avian proteins or fungi, SIC has a sensitivity of 85% and a specificity of 86%, with a positive predictive value ranging from 84% to 97% and a negative predictive value from 55% to 84% [5].

Few centres use SIC for the diagnosis of hypersensitivity pneumonitis. In acute and subacute forms it is probably not essential for establishing a correct diagnosis, but in chronic forms, in which the differential diagnosis with IPF is crucial, it may well be helpful. In this context, in which the pathology is consistent with UIP, most authors agree that assessment of precipitins or of the presence of lymphocytosis in BAL are the most objective methods for determining whether or not the patient has hypersensitivity pneumonitis. However, it should be borne in mind that up to 60% of healthy subjects exposed to fungi may have positive precipitins [4] and up to 50% of those exposed to birds as well [6]. However, between 10 and 15% of patients do not develop serum precipitins, so a negative finding does not rule out the presence of the disease [7]. In mould-induced hypersensitivity pneumonitis, the negative predictive values of serum antibodies were found to range from 81% to 88% and the positive predictive values from 71% to 75% [8], while in bird fancier's lung the negative predictive value ranged from 30% to 81% and the positive predictive value from 49% to 67% [9]. As for the presence of lymphocytosis in BAL, it has been proposed that BAL lymphocyte counts above 30% discriminate chronic hypersensitivity pneumonitis with a UIP pattern on high-resolution computed tomography from IPF [10]. However, not only does a figure below 30% not rule out the diagnosis, but some authors suggest that the cut-off point for suspecting the diagnosis should be lowered to 20% [9, 11]. It is also important to note that BAL lymphocyte counts may be lower in chronic fibrotic forms and may gradually decrease with cessation of exposure [4, 12]. Therefore, the need for improved diagnostic methods is clear.

Table 1 shows the unpublished data from a recent study by our group evaluating the utility of SIC for diagnosing hypersensitivity pneumonitis [6]. Significantly, 29 patients with positive SIC who were diagnosed with hypersensitivity pneumonitis had a BAL lymphocyte count below 20%. Similar data have also been observed by OHTANI *et al.* [11]. In 18 patients in this group (positive SIC and positive for hypersensitivity pneumonitis) precipitins were negative. Table 1 also shows the combination of positive

TABLE 1 Specific IgG and percentage of lymphocytes in BAL in patients with suspected HP in whom a SIC was performed

	Group 1 (HP ⁺ , SIC ⁺)	Group 2 (HP ⁻ , SIC ⁺)	Group 3 (HP ⁺ , SIC ⁻)	Group 4 (HP ⁻ , SIC ⁻)
Subjects	64	4	24	21
Antigen				
Moulds	23	2	4	3
Avian	34	2	17	13
Others	7	0	3	5
Specific IgG				
Positive	39	2	11	9
Negative	18	2	8	7
Not done	7	0	5	5
Lymphocytes in BAL %				
<20	29	3	8	9
20–30	5	0	5	3
>30	14	1	4	0
Not done	16	0	7	9
Specific IgG⁺ and % lymphocytes in BAL				
<20	23	1	6	5
20–30	5	0	1	1
>30	12	1	3	0
Specific IgG⁻ and % lymphocytes in BAL				
<20	4	2	2	4
20–30	0	0	1	1
>30	2	0	1	0

Data are presented as n, unless otherwise stated. Data correspond to the study population in [5]. BAL: bronchoalveolar lavage; HP: hypersensitivity pneumonitis; SIC: specific inhalation challenge.

specific IgGs and BAL lymphocyte count. Only six patients with negative IgG and BAL lymphocyte count below 20% were diagnosed with hypersensitivity pneumonitis. Four of them had a positive SIC and two were negative. We believe that these data stress the usefulness of SIC in the differential diagnosis of chronic hypersensitivity pneumonitis and IPF.

As our group recently demonstrated, SIC in the context of hypersensitivity pneumonitis is a safe procedure with few side-effects and does not generate sensitisation [5]. The infrequency of its use is probably due to a lack of standardisation at the methodological level (*i.e.* with regard to the preparation of extracts, the form and quantity of inhalation), and the interpretation of results.

We hope that the different scientific societies will take steps to standardise and disseminate this technique. In our view, it has a vital role to play in the evaluation of chronic interstitial pneumonias, given that as many as 50% of cases diagnosed as IPF may be chronic hypersensitivity pneumonitis which has gone unnoticed.



@ERSpublications

Specific inhalation challenge is useful for the differential diagnosis of usual interstitial pneumonia <http://ow.ly/PX1q9>

Xavier Muñoz^{1,2,3}, Monica Sanchez-Ortiz^{1,2}, Inigo Ojanguren¹ and María Jesús Cruz^{1,2}

¹Servei de Pneumologia, Hospital General Vall d'Hebron, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ²CIBER Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. ³Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Correspondence: Xavier Muñoz, Servei de Pneumologia, Hospital General Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron, 119, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: xmunoz@vhebron.net

Received: Jan 14 2015 | Accepted: Jan 25 2015

Support statement: M.J. Cruz is a researcher supported by the Miguel Servet programme from Instituto de Salud Carlos III (CP12/03101).

Conflict of interest: None declared.

Provenance: Submitted article, peer reviewed.

References

- 1 Wuyts WA, Cavazza A, Rossi G, *et al.* Differential diagnosis of usual interstitial pneumonia: when is it truly idiopathic? *Eur Respir Rev* 2014; 23: 308–319.
- 2 Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network, Raghu G, Anstrom KJ, *et al.* Prednisone, azathioprine, and *N*-acetylcysteine for pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2012; 366: 1968–1977.
- 3 Morell F, Villar A, Montero MA, *et al.* Chronic hypersensitivity pneumonitis in patients diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective case-cohort study. *Lancet Respir Med* 2013; 1: 685–694.
- 4 Costabel U, Bonella F, Guzman J. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *Clin Chest Med* 2012; 33: 151–163.
- 5 Muñoz X, Sánchez-Ortiz M, Torres F, *et al.* Diagnostic yield of specific inhalation challenge in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2014; 1658–1665.
- 6 Rodrigo MJ, Benavent MI, Cruz MJ, *et al.* Detection of specific antibodies to pigeon serum and bloom antigens by enzyme linked immunosorbent assay in pigeon breeder's disease. *Occup Environ Med* 2000; 57: 159–164.
- 7 Cormier Y, Bélanger J. The fluctuant nature of precipitating antibodies in dairy farmers. *Thorax* 1989; 44: 469–473.
- 8 Fenoglio CM, Reboux G, Sudre B, *et al.* Diagnostic value of serum precipitins to mould antigens in active hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir J* 2007; 29: 706–712.
- 9 Morell F, Roger A, Reyes L, *et al.* Bird fancier's lung: a series of 86 patients. *Medicine* 2008; 87: 110–130.
- 10 Ohshimo S, Bonella F, Cui A, *et al.* Significance of bronchoalveolar lavage for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179: 1043–1047.
- 11 Ohtani Y, Saiki S, Kitaichi M, *et al.* Chronic bird fancier's lung; histopathological and clinical correlation. An application of the 2002 ATS/ERS consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Thorax* 2005; 60: 665–671.
- 12 Costabel U, Bross KJ, Marxen J, *et al.* T-lymphocytosis in bronchoalveolar lavage fluid of hypersensitivity pneumonitis. Changes in profile of T-cell subsets during the course of disease. *Chest* 1984; 85: 514–522.

Eur Respir Rev 2015; 24: 542–544 | DOI: 10.1183/16000617.00000415 | Copyright ©ERS 2015.
ERR articles are open access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Licence 4.0.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Changes in PH in exhaled breath condensate after specific bronchial challenge test in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis: a prospective study

I. Ojanguren¹, M J Cruz^{1,2}, A. Villar¹, M. Sanchez-Ortiz¹, F. Morell^{1,2} and X. Munoz^{1,2,3,4*}

Abstract

Background: The aim of this study was to investigate the influence of the specific inhalation challenge (SIC) on changes of pH values in exhaled breath condensate (EBC) in patients with hypersensitivity pneumonitis (HP).

Methods: A prospective study of 85 patients with suspected HP, of whom 63 were diagnosed with HP due to exposure to avian or fungal antigens. In all cases, EBC samples were collected before and after completion of the SIC and pH values were determined.

Results: Taken as a whole, patients with HP did not present changes in EBC pH after SIC. However, considering only patients with exposure to molds, those diagnosed with HP had a significantly more acid pH post-SIC than those with another diagnosis ($p = 0.011$). This fact is not observed in patients exposed to bird's antigens. A ROC curve showed that a reduction in EBC pH of 0.3 units or more after SIC in patients diagnosed with HP due to exposure to molds had a sensitivity of 30 % (CI: 12.8 to 54.3 %) and a specificity of 100 % (CI: 65.5 to 100 %).

Conclusion: EBC pH may be useful in interpreting SIC results in patients with HP, especially in those patients exposed to molds. Further studies are now required to test the validity of these proposals.

Keywords: Inflammation, Pulmonary fibrosis, Environmental exposure

Background

Hypersensitivity pneumonitis (HP) is a complex syndrome of variable intensity and clinical history, caused by an immune-mediated inflammation of the lung parenchyma due to the continued inhalation of a wide range of antigens [1]. The increased recognition of exposure to environmental antigens and improvements in the diagnostic tools available have allowed the identification of a variety of environmental and occupational settings that can cause this disease.

HP is difficult to diagnose because of the wide spectrum of clinical variants and the absence of a "gold standard" diagnostic test. In general it is diagnosed on

the basis of clinical criteria, among which Schuyler and Cormier's criteria are the most frequently used [2]. As HP is an immunologically mediated disease, some authors have suggested that the specific inhalation challenge (SIC) could be a useful diagnostic tool [3]. Although the SIC can demonstrate a direct link between exposure to an antigen and impaired lung function in the patient [4, 5], its use in the diagnosis of the HP is limited by the lack of standardization of both the inhalation protocols and the criteria required to define a positive response [6, 7]. Thus, while some authors prioritize the symptoms, others prioritize falls in forced expiratory volume (FVC) and diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DLCO) to establish positivity [3].

In view of the inflammatory nature of most respiratory diseases, the use of non-invasive methods to study lung function for diagnosing or monitoring these pathologies is

* Correspondence: xmuno@vhebron.net

¹Servicio de Neumología, Departamento de Medicina, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Catalonia, Spain

²CIBER Enfermedades Respiratorias (Ciberes), Barcelona, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

becoming increasingly common [8]. The study of induced sputum cellularity or of biomarkers in exhaled breath or exhaled breath condensate has proven useful in the evaluation of certain respiratory pathologies [9, 10]. However, the experience with these techniques in patients with HP is limited. Some studies using induced sputum have reported an increase in the total cell count and the lymphocyte count in patients with HP compared to the healthy population [11–13]. Also using induced sputum, our group recently demonstrated that bronchial inflammation is present in patients with HP, and is mainly evidenced by increases in neutrophils that worsen following exposure to the offending antigen during SIC [14]. However, other non-invasive methods for studying pulmonary inflammation have not been analyzed to date in patients with this disease.

The aim of this study was to investigate the influence of SIC on changes of pH values in exhaled breath condensate (EBC) in patients with hypersensitivity pneumonitis (HP).

Methods

Study population

This prospective, cross-sectional study included all patients older than 18 years, referred to our hospital with suspected HP between 2005 and 2013 and who underwent a SIC (Fig. 1). The study was approved by the local Ethics Committee and all subjects gave informed consent prior to participation (Hospital Vall d'Hebron Ethics Committee approval PS09/01486).

Diagnostic protocol

Prior to the administration of the SIC, a thorough clinical history was performed along with additional tests: blood count, immunoglobulin G specific for birds and fungi [4, 15], blood calcium levels, angiotensin converting enzyme, lactate dehydrogenase, chest X-ray, high resolution computed tomography, pulmonary function tests including spirometry, static lung volumes and carbon monoxide transfer test, immediate and delayed hypersensitivity skin testing, bronchoscopy with bronchoalveolar

lavage and/or transbronchial biopsy and/or criobiopsy. In all cases the diagnosis was made using Schuyler and Cormier's criteria [2]. None of the patients were taking steroid therapy.

Lung function studies

All patients underwent forced spirometry, static lung volume study by plethysmography, and determination of the diffusing capacity of the lung for carbon monoxide (DLCO) using the single breath-hold method. These studies were performed on a MasterLab system (MasterLab, Jaeger, Germany) following the joint recommendations of the European Respiratory Society and American Thoracic Society [16] and the Spanish Respiratory Society [17].

Determination of specific IgG antibodies

Specific IgG to avian sera (pigeon, parrot and parakeet), *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium frequentans* and *Mucor mucedo* were measured by an ELISA technique based on the method previously described [4, 18]. Wells of high binding microtiter plates (Costar, Cambridge, MA, USA) were coated with 2 µg protein/well in 0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer (pH 9.6) at 4 °C overnight. The wells were then washed three times with washing buffer (0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.5 containing 0.005 % Tween 20) and blocked with 1 % bovine serum albumin in phosphate buffered saline for 1 h at 37 °C. The specific IgG assays were performed in duplicate by incubating the serum samples at an appropriate dilution for 2 h at 37 °C, and wells were washed four times between each step. A solution of horseradish peroxidase-labeled anti-human IgG monoclonal antibody (clone MH16-1ME, 0.5 mg/mL) diluted at 1:1000 was added to each well and plates were incubated for 2 h at 37 °C. The reaction was developed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma Chemicals), 3 % H₂O₂ for 20 min at room temperature in the dark and stopped with 2 M H₂SO₄. Optical density at 450 nm was measured with a microplate reader (Titertek Multiskan Plus MKII). Results were expressed as absorbance units at 450 nm ($A_{450 \text{ nm}}$). Values above the mean plus two

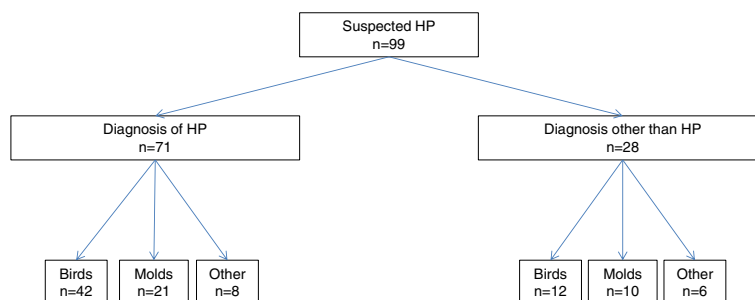


Fig. 1 Study sample and agents tested

standard deviations of the results obtained in a control population of 30 healthy individuals previously studied in our laboratory were deemed positive.

Bronchoscopy techniques: bronchoalveolar lavage (BAL) and transbronchial biopsy (TBB)

Bronchoalveolar lavage was performed according to the recommendations of the European Respiratory Society [19]. The TBB procedure used has been described by other authors [20].

Antigen extract preparation for specific inhalation challenge

Commercialized extracts (Bial-Aristegui, Bilbao, Spain) from *Penicillium frequentans*, *Aspergillus fumigatus* and *Mucor mucedo* were used to study fungi [18]. The avian sera and pigeon bloom extracts were prepared in our laboratory, as previously described [3, 18].

Specific inhalation challenge

Informed consent was obtained from all patients prior to performance of SIC. A de Vilbiss 646 nebulizer and Mefar MB3 dosimeter were used, which release the antigenic solution during the first second of each inhalation. The technique consisted of inhaling 2 mL of solution at a 1/100 (0.01 mg/mL) dilution. The patients' FVC, forced expiratory volume in one second (FEV1), DLCO and temperature were assessed at baseline, at 20 min following exposure, and every hour thereafter for the next eight hours. The SIC was considered positive according to previously published criteria [3, 18]. In patients testing negative on SIC, exposure was repeated 24 h later, at an antigen dilution of 1/10 (0.1 mg/mL). In all cases a baseline test was performed with placebo solution the day before inhalation of the putative causal agent.

EBC collection

EBC was collected during tidal breathing with a commercially available condenser (EcoScreen; Jaeger, Würzburg, Germany), as described elsewhere [9]. Smokers were advised not to smoke during the 48 h prior to the completion of SIC. Each EBC sample was divided into 500- μ L aliquots in two to four plastic tubes. Other aliquots were used to measure the pH before and after deaeration. Baseline EBC pH was recorded 24 h before the SIC and post-SIC EBC pH was recorded 24 h after the last antigenic exposure.

Measurement of pH in EBC

pH was measured in one of the aliquots immediately after EBC collection and after deaeration with helium (350 mL/min for 10 min), using a calibrated pH meter (Model GLP 21; Crison Instruments SA; Barcelona, Spain) with an accuracy of 0.01 pH, and a probe for

small volumes (Crison 50 28; Crison Instruments SA). The probe was calibrated daily with standard pH 7.02 and 4.00 buffers [21].

Statistical analysis

The Mann–Whitney test and chi-square test were applied to compare continuous and nominal variables, respectively, with a two-sided significance level of 0.05. The consistency of EBC was estimated by evaluating the sensitivity (SE) and specificity (SP) [22] of the method, the positive (PPV) and negative (NPV) predictive values, and the likelihood ratio of a positive (LR+) and negative (LR-) value with 95 % confidence intervals (95 % CI) using the Wilson method [23]. Receiver-operating characteristic (ROC) curves were constructed to determine the cut-off values that best differentiated between having the disease or not [24]. All analyses were done with SPSS, version 17 (Chicago, IL, USA) and, SAS version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

A total of 99 patients were studied. Fourteen patients were excluded because the agents suspected of producing HP were neither birds nor molds (Fig. 1). Of the 85 patients studied, 63 were diagnosed with chronic HP, 42 of whom had been exposed to avian proteins and 21 to fungal agents. Of these 63 patients, 52 had a positive SIC. Out of the 52 patients with a positive SIC, 33 were exposed to bird antigens and 19 to molds [3, 18]. After SIC, 20 patients presented a decrease of DLCO >20 %, 15 a decrease of FVC between 10 and 15 % plus an increase >0.5 °C in body temperature, 11 a decrease >15 % in FVC plus a decrease >20 % in DLCO, and finally 6 patients presented a decrease of FVC% >15 %.

Twenty-two patients received diagnoses other than HP, and in all of them the SIC was negative: five were diagnosed with nonspecific interstitial pneumonia, five with sarcoidosis, eight with bronchiectasis, two with non-classifiable pulmonary fibrosis and two with idiopathic pulmonary fibrosis. Of these 22 patients, 12 were exposed to bird's antigens and ten to fungi.

The clinical characteristics of the study population are presented in Table 1. No significant differences in baseline characteristics were observed according to diagnosis (HP or non-HP) or exposure to bird's antigens or molds.

EBC pH values before and after the SIC are displayed in Fig. 2. The mean reduction in EBC pH after SIC in patients with HP was 0.02 in those exposed to bird's antigens and 0.15 in those exposed to molds; it was not statistically significant in either case (p values 0.903 and 0.634 respectively, Table 2). However, considering only patients with exposure to molds, those diagnosed with HP had a significantly more acid pH post-SIC than those with another diagnosis ($p = 0.011$) (Fig. 2). In fact, in

Table 1 Demographic data and clinical characteristics of the study subjects

	HP		<i>p</i>	Non-HP		<i>p</i>
	<i>n</i> = 63			<i>n</i> = 22		
	Birds	Molds		Birds	Molds	
	<i>n</i> = 42	<i>n</i> = 21		<i>n</i> = 12	<i>n</i> = 10	
Age, mean (SD), years	57 (11.9)	59 (17.91)	0.789	59 (9,42)	58.33 (14.6)	0.892
Sex, M/F	13/29	8/13	0.8	6/6	5/4	0.449
Smoking (%)						
Smoker	12.8	10.5		11.1	7	
Non-smoker	61.5	52.6		55.6	57	
Ex-smoker	25.6	36.8		33.3	36	
Crackles, <i>n</i> (%)	22/35 (62,9)	9/14 (64,3)	0,37	6/8(75)	6/8(75)	0,7
Clubbing, <i>n</i> (%)	5/35 (14,3)	0/14 (0)	0,3	2/8(25)	1/8 (12,5)	0,5

general, post SIC pH was significantly lower in patients diagnosed with HP than in patients with a different diagnosis ($p = 0.010$).

The sensitivity, specificity and positive and negative predictive values of EBC pH according to the established

diagnosis of HP are shown in Table 3. An ROC curve showed that a reduction of EBC pH of 0.3 units or more after SIC had a sensitivity of 25 % (CI: 15.9 to 38.7 %) and a specificity of 81.8 % (CI: 58.9 to 94 %) for the diagnosis of HP in the total study population. Analysing only

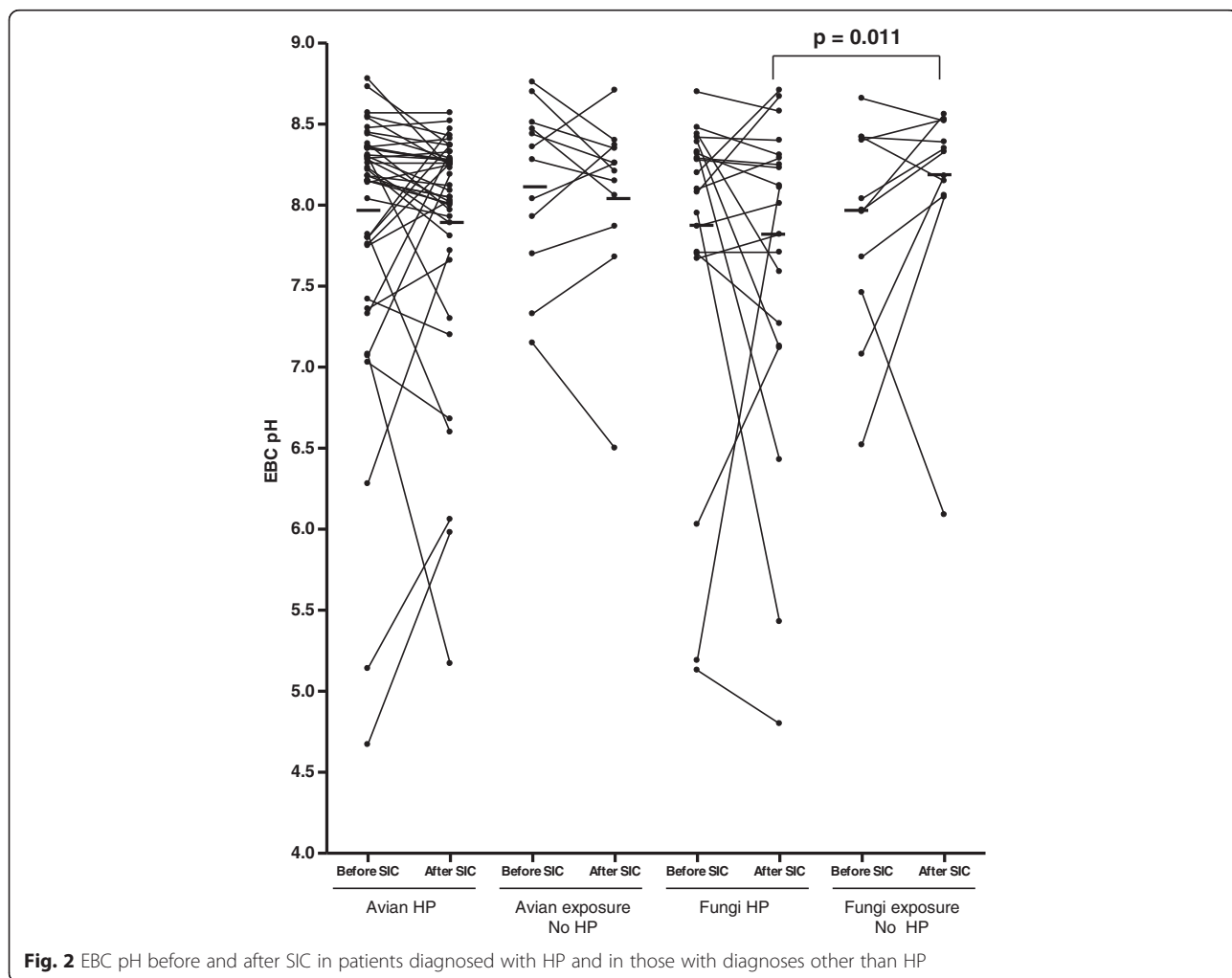


Fig. 2 EBC pH before and after SIC in patients diagnosed with HP and in those with diagnoses other than HP

Table 2 Immunological, functional pulmonary data, and results from BAL and EBC of the study subjects

	HP			Non-HP		
	<u>n = 63</u>		<i>p</i>	<u>n = 22</u>		<i>p</i>
	Birds <u>n = 42</u>	Molds <u>n = 21</u>		Birds <u>n = 12</u>	Molds <u>n = 10</u>	
Avian IgG, + / -	22/15	————	-	5/3	————	-
Fungal IgG, + / -	————	11/7	-	————	2/6	-
FVC %, mean (SD)	74.6 (14.3)	75.53 (12.46)	0.881	75.6 (17.0)	77.33 (12.17)	0.776
DLCO %, mean (SD)	59.5 (17.6)	63.47 (20.33)	0.465	60.3 (15.0)	64.44 (15.89)	0.351
Bronchoscopy (n)	35	17	-	9	9	-
Transbronchial biopsy (n)*	25	13	-	3	7	-
Criobiopsy (n)*	4	0	-	2	1	-
Bronquial biopsy (n)*	0	0	-	1	0	-
Surgical biopsy(n)*	5	0	-	0	0	-
BAL (n)	35	17	-	9	9	-
BAL lymphocytes* %	19.8 (21)	22.41 (17.91)	0.663	20.33 (20.43)	16.1 (11.95)	0.685
SIC, +/-	33/9	19/2	-	0/12	0/10	-
EBC pH before SIC	7.9(0.86)**	7.78(1.03)***	0.624	8.14(0.52)	7.92(0.67)	0.245
EBC pH after SIC	7.88(0.74)**	7.63(1.02)***	0.270	8.07(0.56)	8.31 (0.19)	0.273

IgG, immunoglobulin G; FVC, forced vital capacity; DLCO: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; BAL, bronchoalveolar lavage; *Number of patients in whom the test result was consistent with HP; ***p* = 0.90; ****p* = 0.634

patients diagnosed with HP due to exposure to fungal antigens, a fall in EBC pH of 0.3 or greater showed a sensitivity of 30 % (CI: 12.8 to 54.3 %) and a specificity of 100 % (CI: 65.5 to 100 %) (Fig. 3). In the group of patients diagnosed with HP due to exposure to avian proteins, a fall in EBC pH of 0.3 or higher showed a sensitivity of 23.8 % (CI: 12.6 to 39.8 %) and a specificity of 66.6 % (35.4 to 88.7 %).

Table 3 Exhaled breath condensate diagnostic yield

	All <u>n = 85</u>	Birds <u>n = 54</u>	Molds <u>n = 31</u>
Sensitivity	25.8	23.8	30
% (CI)	(15.9-38.7)	(12.6-39.8)	(12.8-54.3)
Specificity	81.8	66.6	100
% (CI)	(58.9-94.0)	(35.4-88.7)	(65.5-100)
PPV	80	71.4	100
	(55.7-93.3)	(42.0-90.4)	(51.7-100)
NPV	20	0.2	41.6
	(6.6-44.2)	(0.09-36.1)	(22.8-63.0)
PLR	1.42	0.71	—
	(0.53-3.79)	(0.27-1.87)	
NLR	0.9	1.14	0.7
	(0.77-1.07)	(0.89-1.46)	(0.52-0.93)

Data are expressed as % (95 % CI); PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; PLR, positive likelihood ratio; NLR, negative likelihood ratio

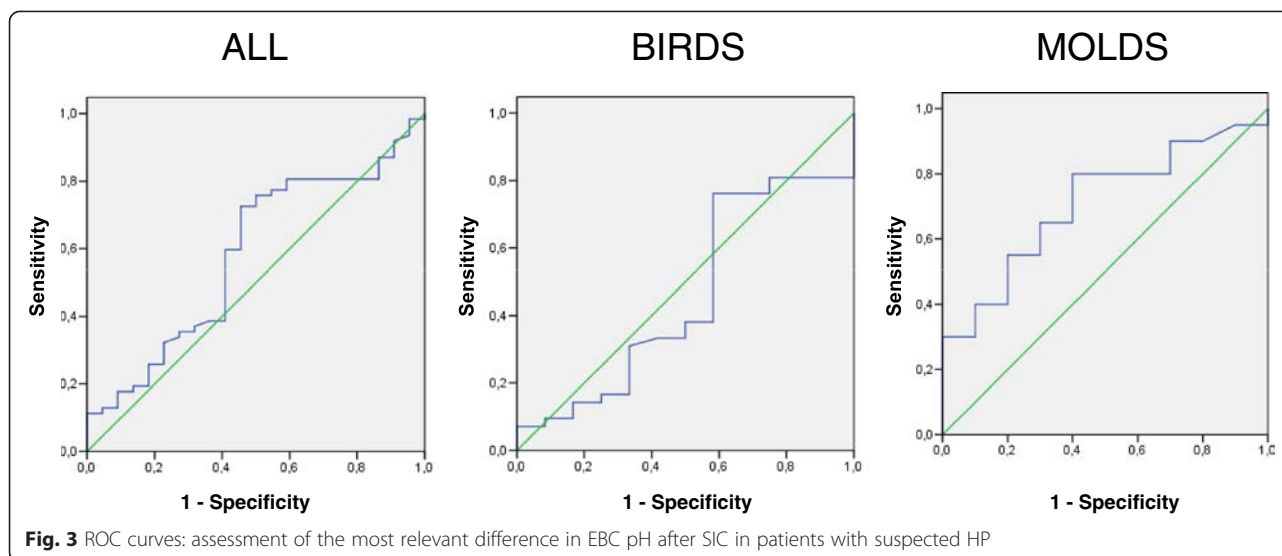
No correlation was observed between the EBC pH before SIC and baseline FVC, DLCO or BAL lymphocytes. Additionally, no correlation was observed between the acidification of pH after SIC and fall in FVC, DLCO or temperature increase.

Considering the false negatives of the SIC, in the group of patients diagnosed of HP due to molds (*n* = 2) one patient experienced a drop in EBC pH > 0.3. In the group of patients diagnosed of HP due to avian proteins (*n* = 9), two patients experienced a drop in EBC pH > 0.3.

Discussion

The present study demonstrates that a drop in EBC pH of 0.3 or higher after SIC has a sensitivity of 30 % (CI: 12.8 to 54.3 %) and a specificity of 100 % (CI: 65.5–100 %) for diagnosis of HP due to exposure to molds. In the case of HP due to bird proteins, a fall in EBC pH of 0.3 or more after SIC had a sensitivity of 23.8 % (CI: 12.6 to 39.8 %) and a specificity of 66.6 % (35.4 to 88.7 %). This study is the first to analyse the diagnostic performance of the EBC pH in the context of antigen exposure through SIC, in patients with HP due to exposure to bird's antigens or to molds.

These results may be helpful for establishing a firm diagnosis of HP. In acute forms of the condition the clinical criteria currently in use are sufficient [2], but establishing a firm diagnosis in chronic or subacute forms is much more difficult. It has recently been shown that up to 50 % of cases of idiopathic pulmonary fibrosis may



be evolving forms of HP that have not been properly diagnosed [25] and it is in this context where the SIC may be most useful [26].

The SIC has been used to diagnose since the 1960s, but there is still no consensus regarding the variables on which the test's interpretation should be based. This situation may influence its sensitivity and specificity. In a study with 29 patients basically using clinical criteria such as the onset of symptoms and signs mimicking influenza, Hendrick et al. [5] reported a sensitivity of up to 85 % and a specificity of 95 %. Also basing positivity on clinical symptoms, Ohtani et al. [7] found no false results in a study of 11 patients with bird fancier's lung. However, other authors using criteria based on falls in the values obtained in lung function tests reported sensitivities ranging from 82 to 92 % and specificities between 76 and 100 % [4, 6].

Establishing a positive diagnosis from the appearance of symptoms during the test necessitates a high level of exposure to the antigen, a requirement which may of course have a negative effect on the test's safety. The use of criteria based on lung function studies to determine diagnosis may allow lower levels of antigen exposure. For example, maximum exposure in Ohtani et al.'s [7] study was 680 μg of avian protein, whereas Morell et al. [4] used a maximum dose of 200 μg of protein. However, this lower antigen exposure during SIC may yield false negatives: evaluating 113 patients, of whom 88 were diagnosed with HP due to different agents, Muñoz et al [26] recently found a sensitivity of 73 % and a specificity of 84 %, and 24 patients finally diagnosed with HP had negative SIC. The results of this study allow us to hypothesize that the measurement of EBC pH during SIC may reduce the number of false negatives and thus improve the test's diagnostic accuracy. In this regard, three patients in the

present study diagnosed with HP but with a negative SIC, experienced a decline of EBC pH greater than 0.3 units after the SIC.

EBC pH measurement is a recently introduced tool which may be useful in assessing various respiratory diseases [27]. Several studies have shown that pH values may fall in non-controlled asthma [28] or in the context of respiratory infections in patients with bronchiectasis, COPD or cystic fibrosis [29]. However there is less experience in the context of interstitial diseases: higher levels have been found in individuals with pulmonary fibrosis [30], and lower levels in patients with asbestosis [31]. EBC pH is the result of a balance between various buffer systems and the production and release of acids and bases in the airways [32]. In healthy individuals, EBC is determined to a significant extent by the NH_4 , HCO_3 and CO_2 produced during breathing [33], with the most acidic pH being found in the alveolar lumen in the proximal airway. Inflammatory processes trigger a range of mechanisms which produce acidification of these more proximal airways as a possible innate defense mechanism [34]. These mechanisms are basically the production and excretion of superoxide ions and protons by the respiratory epithelial cells, the inhibition of glutaminase activity in epithelial cells, and finally the recruitment of macrophages and neutrophils whose lysis in the context of inflammation raises the acidity level of the environment [35, 36]. In fact the acidification produced by neutrophil recruitment may well explain some of the findings of the present study. In this sense, previous studies have shown that EBC pH values are decreased during asthma exacerbations but they are not related with spirometric values [37]. Furthermore Kostikas et al [38] demonstrated that EBC pH levels are negatively correlated with the number of eosinophils in sputum and positive correlated with neutrophilic airway inflammation.

Although the presence of lymphocytic inflammation in the alveoli is characteristic in HP, in the bronchi it has been shown that there may be neutrophilic inflammation, especially in cases in which molds are the causative agent [12, 14]. Our group has also recently confirmed that individuals with HP present significantly increased levels of neutrophils in induced sputum following the challenge with fungal agents [14]; this may explain the decrease in pH found in the present study after the challenge test in patients with HP caused by molds. Taken together, these findings also allow us to hypothesize that the mechanism of action of the HP may differ depending on the causative agent.

This study has a number of limitations, some of them deriving from factors that may have influenced the pH values recorded. The most important of these factors is smoking: lower levels of pH in EBC have been reported in healthy individuals exposed to tobacco smoke than in non-exposed subjects [39, 40]. In our study, however, this is unlikely to have been a determinant, as we did not find significant differences in smoking habits in our four study groups. Another limitation is the small number of patients ultimately included. Future studies are needed, with larger numbers of patients, to confirm the sensitivity and specificity of EBC pH for the diagnosis of HP. Moreover, the environmental exposure to specific antigens before SIC is difficult to demonstrate, especially in patients exposed to molds. If experimental exposure to antigen can change pH of EBC, natural exposition can also influence it, so we can not rule out that this environmental exposure might influence the results. Finally, another possible limitation is the fact that EBC was recorded 24 h after the antigen challenge, which may have affected pH levels observed. As yet, the variability of EBC pH after SIC has not been assessed either in occupational asthma or in HP [41]. In any case, the decision to record EBC after 24 h was based on the protocol established by different groups in the context of occupational asthma, in which markers of inflammation are analysed using noninvasive methods in order to help establish the positivity of SIC [42].

Conclusions

In conclusion, the results of this study suggest that the use of EBC pH may be helpful in the interpretation of SIC in patients with HP. Furthermore, its clinical assessment in the context of this test is relatively straightforward, since it is non-invasive, easy to perform, reproducible and cost-effective. The results of this study also suggest that the use of EBC pH after SIC can reduce the test's false negative rates. Further studies are now required, with larger numbers of patients, to test the validity of these proposals.

Abbreviations

CI: Confidence intervals; DLCO: Diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; EBC: Exhaled breath condensate; FEV1: Forced expiratory volume in one second; FVC: Forced vital capacity; HP: Hypersensitivity pneumonitis; LR: Likelihood ratio of a negative value; LR: Likelihood ratio of a positive value; NPV: Negative; PPV: Positive; ROC: Receiver-operating characteristic; SE: Sensitivity; SIC: Specific inhalation challenge; SP: Specificity.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

XM had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. IO: contributed to data collection, analysis and interpretation of data, drafting the manuscript for important intellectual content, and reading and approving the final manuscript. XM, FM, MJC and AV: contributed to study conception and design, analysis and interpretation of data, drafting the manuscript for important intellectual content, and reading and approving the final manuscript. MJC and MS-O: contributed to laboratory analysis and interpretation of data and reading and approving the final manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by FIS PI13/01076 (Instituto de Salud Carlos III) and Sociedad Española de Patología Respiratoria (SEPAR, Spanish Society of Respiratory Disease). MJC is a researcher supported by the Miguel Servet programme of the Instituto de Salud Carlos III (CP12/03101). The funding bodies had no role in the study design, data collection or analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author details

¹Servicio de Neumología, Departamento de Medicina, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Catalonia, Spain. ²CIBER Enfermedades Respiratorias (Ciberes), Barcelona, Spain. ³Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Barcelona, Catalonia, Spain. ⁴Servei de Neumologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron, 119, 08035 Barcelona, Spain.

Received: 11 December 2014 Accepted: 10 September 2015

Published online: 30 September 2015

References

- Fink JN, Ortega HG, Reynolds HY, Cormier YF, Fan LL, Franks TJ, et al. Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(7):792–8.
- Schuyler M, Cormier Y. The diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest*. 1997;111:534–6.
- Munoz X, Morell F, Cruz MJ. The use of specific inhalation challenge in hypersensitivity pneumonitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013;13(2):151–8.
- Morell F, Roger A, Reyes L, Cruz MJ, Murio C, Muñoz X. Bird fancier's lung. A series of 86 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2008;87:110–30.
- Hendrick DJ, Marshall R, Faux JA, Krall JM. Positive "alveolar" response to antigen inhalation provocation tests: their validity and recognition. *Thorax*. 1980;35:415–27.
- Ramirez-Venegas A, Sansores RH, Perez-Padilla R, Carrillo G, Selman M. Utility of a provocation test for diagnosis of chronic pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:862–9.
- Ohtani Y, Kojima K, Sumi Y, Sawada M, Inase N, Miyake S, et al. Inhalation provocation tests in chronic bird fancier's lung. *Chest*. 2000;118:1382–9.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest*. 2006;130(5):1541–6.
- Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005;26(3):523–48.
- Petsky HL, Cates CJ, Lasserson TJ, Li AM, Turner C, Kynaston JA, et al. A systematic review and meta-analysis: tailoring asthma treatment on eosinophilic markers (exhaled nitric oxide or sputum eosinophils). *Thorax*. 2012;67(3):199–208.
- Sobiecka M, Kus J, Demkow U, Filewska M, Jozwik A, Radwan-Rohrenscheff P, et al. Induced sputum in patients with interstitial lung disease: a non-invasive

- surrogate for certain parameters in bronchoalveolar lavage fluid. *J Physiol Pharmacol*. 2008;6:645–57.
12. D'Ipollito R, Chetta A, Foresi A, Marangio E, Castagnaro A, Merlini A, et al. Induced sputum and bronchoalveolar lavage from patients with hypersensitivity pneumonitis. *Respir Med*. 2004;98(10):977–83.
 13. Mroz RM, Chyczewska E, Korniluk M, Stasiak-Barmuta A, Ossolinska M. Comparison of cellular composition of induced sputum, bronchial washings and bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis and COPD. *Pneumonol Alergol Pol*. 2002;70(9–10):468–77.
 14. Villar A, Muñoz X, Sanchez-Vidaurre S, Gómez-Ollés S, Morell F, Cruz MJ. Bronchial inflammation in hypersensitivity pneumonitis after antigen-specific inhalation challenge. *Respirology*. 2014;19(6):891–9.
 15. Morell F. Idiopathic pulmonary fibrosis: importance of accurate diagnosis and treatment. *Arch Bronconeumol*. 2013;49(8):319–20.
 16. Miller MR, Crapo R, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, et al. General considerations for lung function testing. *Eur Respir J*. 2005;26:153–61.
 17. García-Río F, Calle M, Burgos F, Casan P, Del Campo F, Galdiz JB, et al. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). Spirometry. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch Bronconeumol*. 2013;49(9):388–401.
 18. Morell F, Roger A, Cruz MJ, Muñoz X, Rodrigo MJ. Suberosis: Clinical Study and new etiologic agents in a series of eight patients. *Chest*. 2003;124:1145–52.
 19. Klech H, Pohl W. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group. *Eur Respir J*. 1989;2:561–85.
 20. Anders GT, Johnson JE, Bush BA, Matthews JL. Transbronchial biopsy without fluoroscopy. A seven-year perspective. *Chest*. 1988;94:557–60.
 21. Hunt JF, Fang K, Malik R, et al. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(3 Pt 1):694–9.
 22. Deeks JJ, Altman DG. Diagnostic tests 4: Likelihood ratios. *BMJ*. 2004;17;329(7458):168–9.
 23. Wilson EB. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *J Am Stat Assoc*. 1927;22:209–12.
 24. Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *BMJ*. 1994;309(6948):188.
 25. Morell F, Villar A, Montero MÁ, Muñoz X, Colby TV, Pipvath S, et al. Chronic hypersensitivity pneumonitis in patients diagnosed with idiopathic pulmonary fibrosis: a prospective case-cohort study. *Lancet Respir Med*. 2013;1(9):685–94.
 26. Muñoz X, Sánchez-Ortiz M, Torres F, Villar A, Morell F, Cruz MJ. Diagnostic yield of specific inhalation challenge in hypersensitivity pneumonitis. *Eur Resp J*. 2014;44(6):1658–65.
 27. Corradi M, Gergelova P, Mutti A. Use of exhaled breath condensate to investigate occupational lung diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(2):93–8.
 28. Bikov A, Galfy G, Tamasi L, Bartusek D, Antus B, Losonczy G, et al. Exhaled breath condensate pH decreases during exercise-induced bronchoconstriction. *Respirology*. 2014;19(4):563–9.
 29. Liang Y, Yeligar SM, Brown LA. Exhaled breath condensate: a promising source for biomarkers of lung disease. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:217518.
 30. Chow S, Thomas PS, Malouf M, Yates DH. Exhaled breath condensate (EBC) biomarkers in pulmonary fibrosis. *J Breath Res*. 2012;6(1):016004.
 31. Chow S, Campbell C, Sandrini A, Thomas PS, Johnson AR, Yates DH. Exhaled breath condensate biomarkers in asbestos-related lung disorders. *Respir Med*. 2009;103(8):1091–7.
 32. Vaughan J, Ngamtrakulpanit L, Pajewski TN, Turner R, Nguyen TA, Smith A, et al. Exhaled breath condensate pH is a robust and reproducible assay of airway acidity. *Eur Respir J*. 2003;22(6):889–94.
 33. Gaston B, Hunt JF. Measurement of exhaled breath condensate pH: Implications for pathophysiology and monitoring of inflammatory airway diseases. In: Montuschi P. *New perspectives in monitoring lung inflammation*. CRC Press; 2005. p. 73–84.
 34. Gaston B, Hunt JF. Measurement of exhaled breath condensate pH: implications for pathophysiology and monitoring of inflammatory airway diseases. Analysis of exhaled breath condensate: methodological issues. In: Montuschi P, editor. *New perspectives in monitoring lung inflammation. Analysis of exhaled breath condensate*. London: CRC Press; 2005. p. 73–80.
 35. Thomas RA, Green RH, Brightling CE, Birring SS, Parker D, Wardlaw AJ, et al. The influence of age on induced sputum differential cell counts in normal subjects. *Chest*. 2004;126(6):1811–4.
 36. Montuschi P. Analysis of exhaled breath condensate: methodological issues. In: Montuschi P, editor. *New perspectives in monitoring lung inflammation. Analysis of exhaled breath condensate*. London: CRC Press; 2005. p. 11–3.
 37. Caffarelli C, Dascola CP, Peroni D, Ricò S, Stringari G, Varini M, et al. Airway acidification in childhood asthma exacerbations. *Allergy Asthma Proc*. 2014;35:e51–6.
 38. Kostikas K, Papatheodorou G, Ganas K, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. pH in expired breath condensate of patients with inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1364–70.
 39. Kostikas K, Minas M, Nikolaou E, Papaioannou AI, Liakos P, Gougoura S, et al. Secondhand smoke exposure induces acutely airway acidification and oxidative stress. *Respir Med*. 2013;107(2):172–9.
 40. Garey KW, Neuhauser MM, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Chest*. 2004;125(1):22–6.
 41. Antus B, Barta I, Kullmann T, Lazar Z, Valyon M, Horvath I, et al. Assessment of exhaled breath condensate pH in exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease: A longitudinal study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(12):1492–7.
 42. Vandenplas O, Suojalehto H, Aasen TB, Baur X, Burge PS, de Blay F, et al. Specific inhalation challenge in the diagnosis of occupational asthma: consensus statement. *Eur Respir J*. 2014;43(6):1573–87.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



RESEARCH ARTICLE

Do Low Molecular Weight Agents Cause More Severe Asthma than High Molecular Weight Agents?

Olga Meca¹, María-Jesús Cruz^{2,3*}, Mónica Sánchez-Ortiz^{2,3}, Francisco-Javier González-Barcala⁴, Iñigo Ojanguren^{2,3}, Xavier Munoz^{2,3,5}

1 Servicio de Neumología, Hospital General Universitario Morales Messeguer, Murcia, Spain, **2** Servicio de Neumología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain, **3** Centro de Investigación en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Barcelona, Spain, **4** Respiratory Department, Clinic University Hospital, Santiago de Compostela, Spain, **5** Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Catalonia, Spain

* mj.cruz@vhir.org



OPEN ACCESS

Citation: Meca O, Cruz M-J, Sánchez-Ortiz M, González-Barcala F-J, Ojanguren I, Munoz X (2016) Do Low Molecular Weight Agents Cause More Severe Asthma than High Molecular Weight Agents? PLoS ONE 11(6): e0156141. doi:10.1371/journal.pone.0156141

Editor: Jane Hoppin, North Carolina State University, UNITED STATES

Received: December 24, 2015

Accepted: May 9, 2016

Published: June 9, 2016

Copyright: © 2016 Meca et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: MJC is a researcher supported by the Miguel Servet programme from Instituto de Salud Carlos III (CP12/03101). The funders had no role in the study design, the data collection or analysis, the decision to publish, or the preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Introduction

The aim of this study was to analyse whether patients with occupational asthma (OA) caused by low molecular weight (LMW) agents differed from patients with OA caused by high molecular weight (HMW) with regard to risk factors, asthma presentation and severity, and response to various diagnostic tests.

Methods

Seventy-eight patients with OA diagnosed by positive specific inhalation challenge (SIC) were included. Anthropometric characteristics, atopic status, occupation, latency periods, asthma severity according to the Global Initiative for Asthma (GINA) control classification, lung function tests and SIC results were analysed.

Results

OA was induced by an HMW agent in 23 patients (29%) and by an LMW agent in 55 (71%). A logistic regression analysis confirmed that patients with OA caused by LMW agents had a significantly higher risk of severity according to the GINA classification after adjusting for potential confounders (OR = 3.579, 95% CI 1.136–11.280; $p = 0.029$). During the SIC, most patients with OA caused by HMW agents presented an early reaction (82%), while in patients with OA caused by LMW agents the response was mainly late (73%) ($p = 0.0001$). Similarly, patients with OA caused by LMW agents experienced a greater degree of bronchial hyperresponsiveness, measured as the difference in the methacholine dose-response ratio (DRR) before and after SIC (1.77, range 0–16), compared with patients with OA caused by HMW agents (0.87, range 0–72), ($p = 0.024$).

Conclusions

OA caused by LMW agents may be more severe than that caused by HMW agents. The severity of the condition may be determined by the different mechanisms of action of these agents.

Introduction

The term "work-related asthma" encompasses both occupational asthma (OA) and work-exacerbated asthma (WEA) [1]. OA is characterized by variable airflow limitation and/or hyperresponsiveness and/or inflammation due to causes and conditions attributable to a particular occupational environment and not to stimuli encountered outside the workplace [2], while WEA is defined as the aggravation of pre-existing or coincident (adult new-onset) asthma due to workplace environmental exposure [3]. OA is subdivided into immunological or non-immunological forms, with the reactive airway dysfunction syndrome (RADS) being the most characteristic example of the latter presentation [4]. A recent evidence-based review of the literature identified 372 causative agents of immunological asthma and 184 different causes of irritant or non-immunological OA [5].

Immunological OA, caused by workplace sensitizers, is characterized by the appearance of work-related asthma symptoms after a latency period. The causative agent may be either a high or a low molecular weight agent (HMW and LMW, respectively). HMW agents are protein-derived antigens and are generally considered to cause sensitization through an IgE-mediated mechanism and so allergy skin-prick test and measurements of allergen-specific antibodies can aid diagnosis [6]. Although specific IgE antibodies have also been detected in OA induced by some LMW agents [7], and several studies have suggested that immunologic mechanisms are involved in LMW-related OA [8–9], the exact mechanisms have not yet been fully characterized. In fact, the few studies carried out to date have demonstrated variable patterns of response to HMW and LMW agents; in the main, HMW agents seem to induce early or dual asthmatic reactions, while LMW agents produce delayed reactions [10–11].

It is not known whether differences in the pathogenesis of immunological OA also lead to differences in clinical presentation. Early studies in the 1990s suggested that the natural history of the onset of OA varies according to the sensitizing agent, and that factors such as age, gender, atopy, rhinitis, and smoking habit might influence the development of the condition [10]. However, recent studies suggest that the intensity of exposure may affect the risk of development of symptoms and sensitization more than host markers or the type of agent [12]. Whether or not the severity of asthma is related to the type of causal agent is also unclear.

The objective of this study was to analyse the differences in relation to possible risk factors, asthma presentation and severity, and response to various diagnostic tests in patients with OA caused by either HMW or LMW agents.

Patients and Methods

Type of study

Retrospective study using data from medical charts, conducted at an OA referral centre. The local Ethics Committee approved the study (Hospital Vall d'Hebron Ethics Committee approval PR(AG)26/2006). All subjects were contacted specifically to be included in this study and they signed informed consent documents for participation.

Subjects

All subjects ($n = 78$) with final diagnosis of OA after a positive specific inhalation challenge (SIC) between January 2008 and December 2013 were included. Medical charts of all subjects were reviewed by the authors. Demographic data such as sex, age, smoking habit, atopy, dermatitis, rhinitis, conjunctivitis, type of employment, agents, exposures, time between start of exposure and start of symptoms, time between start of symptoms and diagnosis, time subjects were away from work until diagnosis, treatment, and severity of asthma according to the Global Initiative for Asthma (GINA) control classification [13] at diagnosis were recorded. Asthma severity was defined in accordance with GINA classification, on the basis of the intensity of treatment required to achieve good control of the condition. Asthma which was well controlled with low intensity treatment such as low-dose inhaled corticosteroids (IC), leukotriene modifiers or chromones was defined as mild. Asthma requiring high intensity treatment to maintain good control, or in which good control was not achieved despite high intensity treatment, was defined as severe. Blood analysis results, including eosinophil count and total IgE, spirometry, methacholine and SIC were assessed.

Atopy and smoking status

Patients were considered atopic if they had at least one positive prick test to any common environmental allergen. Non-smokers were patients who had never smoked and ex-smokers were those who had not smoked for at least six months. The number of pack-years was calculated.

Spirometry and methacholine challenge

Spirometry was performed with a Datospir 200 (Sibel, Barcelona) instrument, following the European Respiratory Society (ERS) and American Thoracic Society (ATS) guidelines [14]. The reference values used were those proposed for the Mediterranean population [15]. Bronchial challenge with methacholine was performed in accordance with Spanish guidelines [16]. Briefly, a Mefar MB3 (Mefar, Ele H₂O, Medicalli, Brescia, Italy) dosimeter was used, and increasing concentrations of methacholine (from 0.03 mg/ml to 16 mg/ml) were inhaled at three-minute intervals until FEV₁ had fallen by 20% compared with its baseline value or until the subject had inhaled the maximum concentration of methacholine. The provocative concentration of methacholine causing a 20% drop in FEV₁ was designated as PC₂₀ and expressed in mg/ml. The methacholine challenge was considered negative if the PC₂₀ was higher than 16 mg/ml. In all patients, the methacholine dose-response ratio (DRR) was calculated as the percentage fall in FEV₁ at the last concentration, divided by the total concentration administered.

Specific Inhalation challenge

SIC was carried out according to the guidelines proposed by our group [17]. Briefly, subjects were examined on five consecutive days. Inhaled corticosteroids were withheld 48 hours before SIC. On the first day (control day), full medical and occupational histories were collected, and skin-prick tests with a battery of common allergens, radiography study, pulmonary function testing and methacholine challenge were performed. On day 2, a first placebo inhalation challenge was performed. On days 3 and 4, subjects underwent SIC with the suspected workplace agent. On day 5, pulmonary function test and methacholine challenge were repeated. Changes in lung function were monitored in each patient by measuring FEV₁ every 10 minutes during the first hour after exposure and then every hour until 15 hours after inhalation. Response was considered positive when FEV₁ fell more than 20% compared with the baseline value in the absence of any change to placebo. Asthma response was defined as early when the fall in FEV₁

occurred within 1 h of the last inhalation of the sensitizing agent, and as late when the fall in FEV1 was observed between 2–8 h following the challenge. Finally, a combination of an early and late response was defined as a “dual asthma response”.

Statistical analysis

The characteristics of the subjects are expressed as the median and range unless otherwise stated. A one-sample Kolmogorov-Smirnov test, calculated to assess normality, showed non-normal distribution of the parameters studied. Between-group differences were analysed by the Mann-Whitney test and within-group differences by the Wilcoxon signed rank test. Differences were considered significant at a p value of ≤ 0.05 . Multivariate logistic regression was used to analyse the independent association between asthma severity and the type of agent involved. All variables that were related to the quantities of interest and/or factors previously reported in the literature were considered as potential confounders. Results were reported using odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI). SPSS release 17.0 for Windows (SPSS; Chicago, IL) and GraphPad InStat4 (GraphPad Software Inc; San Diego, CA) were used for the statistical analyses.

Results

Of the 78 patients with final diagnosis of OA, 23 responded to HMW agents and 55 to LMW agents. The various sensitizing agents responsible for OA are shown in [Table 1](#). In the group sensitized to HMW agents, flour was the more prevalent (48% of cases). For LMW agents, isocyanates and persulfates were the most prevalent (36% and 24% of cases respectively). Subjects’ demographic data are summarized in [Table 2](#). Although the percentage of patients with

Table 1. Sensitizing agents responsible for OA in the study population.

HMW Agents		LMW Agents	
n = 23		n = 55	
Flour	11	Isocyanates	20
Iroko	2	Persulfate salts	13
Cork dust	2	Welding fumes	3
Ipe	1	Zinc	2
Wood dust mixture	1	Chromium	2
<i>Plantago ovata</i>	3	Nickel	1
<i>Boletus edulis</i>	1	Colistin	1
Mouse proteins	1	Piperacillin	1
Latex	1	Captopril	1
		Aescina amorfa	1
		Cleaning products	2
		Amines	2
		Cutting fluids	1
		Surfactants	1
		Polyethylene	1
		Epoxyresins	1
		Cyanoacrylate	1
		Rosin	1

Ipe is a hardwood from the Brazilian rainforests

doi:10.1371/journal.pone.0156141.t001

Table 2. Demographic characteristics of the study population.

	HMW (23)	LMW (55)	p
Age, yrs	40 (23–61)	40 (19–59)	0.86
Sex, male; n (%)	17 (74)	28 (51)	0.06
Smoking habit, n (%)			0.70
- Non smoker	13 (57)	(51)	
- Smoker	6 (26)	17 (31)	
- Ex-smoker	4 (17)	10 (18)	
Atopy, n (%)	9 (39)	17 (31)	0.50
Dermatitis, n (%)	7 (34)	12 (22)	0.42
Rhinitis, n (%)	20 (87)	33 (60)	0.02
Conjunctivitis, n (%)	12 (52)	15 (27)	0.04
Total IgE, kU/L	88 (9–709)	71 (6–797)	0.41
% blood eosinophils	4 (1–7)	3 (0–12)	0.61
FVC, % predicted	88 (55–118)	88 (71–127)	0.86
FEV1, % predicted	90 (53–118)	88 (64–131)	0.82
FEV1%	78 (65–93)	78 (58–95)	0.77
Methacholine test			0.64
Positive test, n (%)	17 (74)	38 (69)	
PC ₂₀ mg/ml	2.8 (0.05–16)	2.2 (0.25–14.6)	
Methacholine DRR	5.5 (0–466.67)	2.87 (0.05–92)	0.29

Data are presented as median (range), unless otherwise stated. FVC: Forced Vital Capacity; FEV₁: forced expiratory volume in one-second; HMW: high-molecular-weight; LMW: low-molecular-weight; PC₂₀: concentration of methacholine inducing a 20% fall in FEV₁; DRR, dose/response ratio; ≠ Only patients with PC₂₀ ≤ 16 mg/mL

doi:10.1371/journal.pone.0156141.t002

atopy was similar in the two groups, patients with OA caused by HMW more frequently presented rhinitis and conjunctivitis than patients with OA caused by LMW.

Table 3 presents data on the occupational exposure of patients, severity of asthma and the treatment they were receiving at the time of diagnosis. Patients with OA caused by LMW agents seemed to have more severe asthma than those with OA caused by HMW agents and a greater use of long-acting beta-antagonists (LABA), probably related to the greater severity. No differences were seen between the groups in other variables. A logistic regression analysis confirms that patients with OA caused by LMW agents had a significantly higher risk of asthma severity according to the GINA classification after adjusting for potential confounders (OR = 7.16, 95% CI: 1.13–15.20; p = 0.036) (Table 4).

Finally, Table 5 shows the results in the SIC, suggesting that HMW agents typically induced an early reaction, whereas LMW typically induced a delayed reaction (p = 0.0001). In patients with OA caused by HMW agents SIC was positive with a shorter exposure time (p = 0.025) and these patients required more rescue medication during the SIC (p = 0.003) than those with OA caused by LMW agents. However, patients with OA caused by LMW agents presented a greater degree of bronchial hyperresponsiveness after the SIC, measured as the difference in the values of methacholine DRR (p = 0.024). No differences were found in the fall in FEV₁, regardless of the type of response (early, late or dual) or type of agent. Considering the population as a whole, patients requiring treatment with IC alone had a greater decrease in FEV₁ after SIC than those taking IC + LABA; median (range): 27.5 (16.61) and 21 (15–48), respectively, p = 0.005. These differences are not observed when the population is divided into LMW and HMW groups.

Table 3. Data on occupational exposure, asthma severity and treatment received by patients at the time of diagnosis.

	HMW (23)	LMW (55)	p
Occupation starting age, yrs	23 (14–52)	22 (15–21)	0.97
Duration of exposure, months	122 (22–528)	115 (5–840)	0.88
Latency between starting work and symptoms, months	38 (2–516)	68 (0–468)	0.45
Latency between symptoms and diagnosis, months	59 (2–360)	48 (1–504)	0.58
Latency between last exposure and SIC, months	0 (0–23)	0 (0–15)	0.56
Asthma severity, n (%)			0.02
Intermittent or mild persistent	17 (74)	25 (46)	
Moderate or severe persistent	6 (26)	30 (54)	
IC dose, mcg/day*	200 (0–800)	200 (0–800)	0.35
n (%)	14 (61)	32 (58)	0.96
IC + LABA, n (%)	6 (26)	30 (54)	0.02
Antileukotrienes, n (%)	3 (13)	9 (16)	0.71
Antihistamines, n (%)	5 (22)	4 (7)	0.07
Emergency visits**	1 (0–10)	2 (0–15)	0.44
Hospitalizations**	0 (0–2)	0 (0–2)	0.65

Data are presented as median (range), unless otherwise stated. HMW—High molecular weight agents; LMW—Low molecular weight agents; LABA: Long-acting beta-agonists; IC—inhaled corticosteroids; SIC—Specific inhalation challenge.

* Equivalent dose budesonide

** Number of visits per patient in the last 10 years

doi:10.1371/journal.pone.0156141.t003

Discussion

To our knowledge, this is the first study to show that OA produced by LMW agents may be more severe than that produced by HMW agents. In fact, few studies have assessed the severity of OA at the time of diagnosis, even though it is acknowledged that OA in general may be a particularly severe form of the disease, for three main reasons: 1) the asthma persists in all patients with OA who remain in contact with the causal agent and worsens in 50% in spite of treatment; likewise, it may persist in 50% of patients even though they avoid exposure, and

Table 4. Logistic regression analysis with patients exposed to HMW agents as independent variable comparing patients with intermittent or mild asthma and those with moderate or severe asthma.

	OR	95% CI	p
Agent (LMW)	7.16	1.13–15.20	0.036
Smoking status			
Never	1		
Former	2.70	0.80–9.21	0.11
Current	1.48	0.40–5.44	0.52
Rhinitis	3.72	0.80–17.40	0.094
Age of onset of occupation (years)	1.04	0.98–1.10	0.27
PC20	1.02	0.91–1.14	0.70
Duration of exposure	0.95	0.87–1.04	0.25
Latency between starting work and symptoms	1.01	0.99–1.07	0.75

LMW—Low molecular weight agents; OR—Odds Ratio; CI—Confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0156141.t004

Table 5. Results of specific inhalation challenge.

	HMW n = 23	LMW n = 55	p
Type of reaction, n (%)			0.0001
Early	19 (82)	11 (20)	
Late	2 (9)	40 (73)	
Dual	2 (9)	4 (7)	
% fall in FEV1			0.09
Early	27 (20–50)	29 (21–47)	
Late	19 (15–30)	21.5 (15–50)	
Dual	43 (25–61)	28 (25–42)	
Methacholine test 24h after exposure, n	14	37	
Positive test, n (%)	10 (71)	30 (81)	0.46
PC₂₀, mg/mL ≠	2.5 (0.1–7.3)	2.51 (0.3–16)	0.28
PC₂₀ decrease ≥2 fold, n (%)≠	4 (40)	11 (37)	0.69
DRR methacholine 24 h after exposure, n	14	37	
DRR	3.81 (0–144)	6.15 (0–80)	0.79
DRR increase ≥2 fold, n (%)	4 (28)	14 (38)	0.19
Difference in DRR (pre-post SIC)	0.87 (0–72)	1.77 (0–16)	0.02
Time of exposure SIC, min	7 (1–60)	15 (1–120)	0.02
Use of medication during SIC, Yes / No	6 / 17	2 / 53	0.003
FEV1 decrease during SIC			
No treatment	23 (18–61)	21 (15–42)	0.10
IC treatment	28 (22–61)	25.5 (16–50)	0.23
IC + LABA treatment	28.5 (25–50)	25 (15–50)	0.21

Data are presented as median (range), unless otherwise stated. HMW—High molecular weight agents; LMW—Low molecular weight agents; DRR—Dose Response ratio; IC—Inhaled corticosteroids; SIC—Specific inhalation challenge; ≠ Only patients with PC₂₀ ≤ 16 mg/mL; Early asthmatic response: defined when the fall in FEV1 occurred within 1 h of the last inhalation of the sensitizing agent; Late asthmatic response: defined when the fall in FEV1 was observed between 2–8 h following the challenge; Dual asthmatic response: defined as the combination of an early and late asthmatic response.

doi:10.1371/journal.pone.0156141.t005

may worsen in 10–40% [18–21]; 2) there have been reports of patients who died after developing acute asthma after occupational exposure to agents to which they were sensitized [22–23]; and 3) patients with OA and WEA consume ten times more medical resources than patients with non-work-related asthma [24]. Other reasons that may explain why OA may be more severe than non-OA are the difficulty of diagnosis, the difficulty of management, generally higher levels of exposure (peaks) in the workplace than in other environments, co-exposures to irritants, and so on.

Interestingly, in the Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma (EGEA study) of patients with severe asthma, Le Moual et al [25] found that up to 30% may be exposed to OA-causing agents and that the condition may be more severe in those who are exposed simultaneously to both HMW and LMW agents. The recent observation that persistent occupational exposure to asthmagens (either HMW or LMW) is associated with uncontrolled adult-onset asthma [26] or more severe forms of the disease [25, 27] supports this hypothesis. Furthermore, a longer latency between onset of symptoms and diagnosis of OA carries a worse prognosis for persistence and severity of asthma, whether or not exposure to the causative agent is avoided [28–29]. However, in our study it does not seem that either the

total exposure time, or the latency between onset of symptoms and diagnosis were associated with the greater severity recorded in LMW-related asthma. In fact, in agreement with Dufour et al [11], we did not find any differences in the latency period before the onset of symptoms or in the duration of exposure between HMW and LMW agents. In this regard, several authors have pointed out that the length of time necessary for sensitization may depend, among other factors such as genetics or the concentration of inhaled agents [30], upon the nature of each agent rather than on the molecular weight of the agent alone. In this sense, in contrast to the results found in our study, Descatha et al [31], comparing the characteristics of patients with OA to HMW and LMW agents, found that the severity of the disease at the time of diagnosis does not appear to be influenced by the molecular weight of the causal agent.

In the present study, we did not find any association that might explain why OA is more severe when caused by LMW agents. A plausible hypothesis is that agents with different mechanisms of action may trigger different responses in terms of both inflammation and bronchial hyperresponsiveness, thus altering the degree of severity. In line with other authors [10–11, 17] we found that in the context of the challenge test, HMW agents tend to present an early airway response, while in the case of LMW the response is usually late, although early reactions can occur with LMW agents and late reactions with HMW agents. It is generally accepted that HMW agents cause asthma through an IgE-mediated mechanism, that is, via a Th2 response, and generate a clearly eosinophilic airway inflammation; they are also associated with a higher proportion of patients with rhinitis and conjunctivitis [6], as we observed in the present study. In this regard, Malo et al [32] found that the prevalence of symptoms did not differ for HMW and LMW agents, although rhinitis was more intense for HMW than for LMW. Likewise, it is recognized that eosinophilic asthma generally responds well to treatment with IC [13].

The situation is the reverse in the case of patients with OA caused by LMW agents. In fact, the pathogenesis of OA caused by LMW agents remains largely unclear. The data available suggest that the T-cell subsets and cytokine profiles involved in LMW-induced OA may differ from those operating in atopic asthma. Although some of them induce IgE-mediated responses [6], most induce asthma through a non-IgE related mechanism [33] in which non adaptative immune responses might play a role [34]. The possible role of non-immunological mechanisms such as epithelial injury, remodeling of the airway wall, oxidative stress or neurogenic inflammation are under debate [35]. This means that although the inflammation is eosinophilic in some patients, in many others it is neutrophilic or mixed, and in these cases the response to IC treatment is lower [35], these patients may require more treatment and their condition may therefore be classified as more severe [13].

Finally, another interesting result of this study is the observation that individuals with OA caused by LMW agents present greater bronchial hyperresponsiveness 24 hours after the SIC. In this sense, Vandenplas et al [36] demonstrated that SIC to LMW agents is the principal risk factor for the occurrence of asthmatic reactions requiring administration of short-acting beta agonists with or without oral or intravenous corticosteroids. We cannot rule out the possibility that different intrinsic mechanisms may be at work in the pathogenesis of OA caused by HMW or LMW agents. The IgE-mediated response characteristic of HMW agents causes a histamine release which in turn leads to a fall in FEV1 and also, since it is an isolated exposure, a return to baseline levels within a short period of time, which may mean that the degree of bronchial hyperresponsiveness remains unchanged. In OA caused by LMW agents, on the other hand, in addition to possible inflammatory mechanisms, the bronchial hyperresponsiveness may depend on a neuroimmune interaction involving both mast cell activation and the transient receptor potential ankyrin (TRPA)1-dependent stimulation of sensory neurons [37].

Without doubt, the main limitation of this study is its retrospective nature. We do not have objective measures of the degree of asthma control in our patients and so we cannot be sure

that the classification of asthma severity at the time of diagnosis was correct. However, the data (including the treatment required by patients) were recorded at the time the SIC was conducted. It is essential that asthma is controlled before performing SIC, because otherwise the results may be misinterpreted and false positives may be obtained [17]. Prior to the SIC, asthma control is usually established by checking that there are no clinical changes or changes in pulmonary function after administration of a placebo [38]. None of our patients presented any such alterations and all underwent the SIC, so it can probably be assumed that their disease was controlled and that the severity was correctly classified. Another limitation is the small number of participants. We can not rule out the possibility that other variables might have reached statistically significant values with a larger number of observations. Finally, some authors have suggested that the outcome of OA varies according to geographical location [29]. This study was conducted in a European country, in which IC are widely used in the treatment of asthma—a practice which may alter the natural history of the disease [39].

In conclusion, this study demonstrates that OA caused by LMW agents may be more severe than that caused by HMW agents. However, the characteristics of the study do not allow us to draw any conclusions about the prognosis of the disease, especially since no differences were found in the baseline lung function, emergency visits or hospitalizations between patients with OA exposed to HMW or LMW agents. The confirmation that most LMW agents induce a delayed response and HMW agents an early response in the SIC, and the differences in the degree of bronchial hyperresponsiveness after the challenge, suggest that the two types of agent have different mechanisms of action. Equally, the absence of any variables associated with the increased severity caused by LMW agents in the present study suggests that these different mechanisms of action are also responsible for the severity of OA. Future studies with larger study populations are necessary to confirm these findings.

Acknowledgments

MJC is a researcher supported by the Miguel Servet programme from Instituto de Salud Carlos III (CP12/03101). The funders had no role in the study design, the data collection or analysis, the decision to publish, or the preparation of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: XM FJGB MJC. Performed the experiments: XM OM IO MSO. Analyzed the data: XM OM IO MSO. Contributed reagents/materials/analysis tools: XM OM IO MJC. Wrote the paper: OM MJC MSO FJGB IO XM. Drafting the manuscript for important intellectual content: OM MJC MSO FJGB IO XM.

References

1. Baur X, Sigsgaard T, Aasen TB, Burge PS, Heederik D, Henneberger P, et al on behalf of the ERS task Force on the Management of Work-Related-Asthma. Guidelines for the management of work-related asthma. *Eur Respir J* 2012; 39:529–45. doi: [10.1183/09031936.00096111](https://doi.org/10.1183/09031936.00096111) PMID: [22379148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22379148/)
2. Bernstein IL, Bernstein DI, Chan-Yeung M, Malo JL. Definitions and classification of asthma in the workplace. In: Malo JL, Chan-Yeung M and Bernstein DI, editors. *Asthma in the workplace*. Fourth Edition. Boca Raton; CRC Press; 2013, pp 1–5.
3. Tarlo SM, Balmes J, Balkisson R, Beach J, Beckett W, Bernstein D, et al. ACCP consensus statement; diagnosis and management of work-related asthma. *Chest* 2008; 134:1S–41S. doi: [10.1378/chest.08-0201](https://doi.org/10.1378/chest.08-0201) PMID: [18779187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18779187/)
4. Brooks SM, Weiss MA, Bernstein IL. Reactive airways dysfunction syndrome (RADS). Persistent asthma syndrome after high level irritant exposures. *Chest* 1985; 88:376–84. PMID: [4028848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4028848/)
5. Baur X. A compendium of causative agents of occupational asthma. *J Occup Med Toxicol* 2013; 8:15. doi: [10.1186/1745-6673-8-15](https://doi.org/10.1186/1745-6673-8-15) PMID: [23706060](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23706060/)

6. Maestrelli P, Boschetto P, Fabbri LM, Mapp CE. Mechanisms of occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:531–42. doi: [10.1016/j.jaci.2009.01.057](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.01.057) PMID: [19281901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19281901/)
7. Mapp CE, Boschetto P, Maestrelli P, Fabbri LM. Occupational asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:280–305. PMID: [15860754](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15860754/)
8. Jones MG, Nielsen J, Wekch J, Harris J, Welinder H, Bensryd I, et al. Association of HLA-DQ5 and HLA-DR1 with sensitization to organic acid anhydrides. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:812–16. PMID: [15144476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15144476/)
9. Bernstein DI, Kashon M, Lummus ZL, Johnson VJ, Fluharty K, Gautrin D, et al. CTNNA3 (α -catenin) gene variants are associated with diisocyanate asthma, a replication study in a Caucasian worker population. *Toxicol Sci* 2013; 131:242–6. doi: [10.1093/toxsci/kfs272](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs272) PMID: [22977168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22977168/)
10. Malo JL, Ghezze H, D'Aquino C, L'Archeveque J, Cartier A, Chan-Yeung M. Natural history of occupational asthma: relevance of type of agent and other factors in the rate of development of symptoms in affected subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90:937–944. PMID: [1460199](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1460199/)
11. Dufour MH, Lemi re C, Prince P, Boulet LP. Comparative airway response to high-versus low-molecular weight agents in occupational asthma. *Eur Respir J* 2009; 33:734–739. doi: [10.1183/09031936.00120407](https://doi.org/10.1183/09031936.00120407) PMID: [19129274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19129274/)
12. Vandeplass O. Occupational asthma: etiologies and risk factors. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011; 3:157–167. doi: [10.4168/aaair.2011.3.3.157](https://doi.org/10.4168/aaair.2011.3.3.157) PMID: [21738881](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21738881/)
13. Global Initiative for Asthma (GINA). Global strategy for asthma management and prevention 2010, Available from <http://www.ginasthma.com>.
14. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al; ATS/ERS Task Force. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26(2):319–38. PMID: [16055882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16055882/)
15. Roca J, Sanchis J, Agusti-Vidal A, Segarra F, Navajas D, Rodriguez-Roisin R, et al. Spirometric reference values from a Mediterranean population. *Bull Eur Physiopathol Respir* 1986; 22:217–2. PMID: [3730638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3730638/)
16. Perpi n -Tordera M, Garc a R o F,  lvarez Gutierrez FJ, Cisneros Serrano C, CompteTorrero L, Entrenas Costa LM, et al; Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). Guidelines for the study of nonspecific bronchial hyperresponsiveness in asthma. Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR). *Arch Bronconeumol*. 2013; 49(10):432–46. doi: [10.1016/j.arbres.2013.05.001](https://doi.org/10.1016/j.arbres.2013.05.001) PMID: [23896599](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23896599/)
17. Cruz MJ, Mu oz X. The current diagnostic role of the specific occupational laboratory challenge test. *Curr Opin Allergy Immunol* 2012; 12:119–25.
18. Cote J, Kennedy S, Chan-Yeung M. Outcome of patients with cedar asthma with continuous exposure. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:373–6. PMID: [1689129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1689129/)
19. Paggiaro PL, Loi AM, Rossi O, Ferrante B, Pardi F, Roselli MG, et al. Follow-up study of patients with respiratory disease due to toluene diisocyanate (TDI). *Clin Allergy* 1984; 14:463–9. PMID: [6091946](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6091946/)
20. Chan-Yeung M. Immunologic and nonimmunologic mechanisms in asthma due to western red cedar (*Thuja* sp.). *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70:32–7. PMID: [6177724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6177724/)
21. Malo JL, Ghezze H, L'Archev que J, Lagier F, Perrin B, Cartier A. Is the clinical history a satisfactory means of diagnosing occupational asthma?. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:528–32. PMID: [2001062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2001062/)
22. Ortega HG, Kreiss K, Schill DP, Weissman DN. Fatal asthma from powdering shark cartilage and review of fatal occupational asthma literature. *Am J Ind Med* 2002; 42:50–4. PMID: [12111690](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12111690/)
23. Chester DA, Hanna EA, Pickelman BG, Rosenman KD. Asthma death after spraying polyurethane truck bedliner. *Am J Ind Med* 2005; 48:78–84. PMID: [15940723](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15940723/)
24. Lemi re C, Boulet LP, Chaboillez S, Forget A, Chiry S, Villeneuve H, et al. Work-exacerbated asthma and occupational asthma: do they really differ?. *J Allergy Clin Immunol*. 2013; 131:704–10. doi: [10.1016/j.jaci.2012.08.024](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.08.024) PMID: [23058644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23058644/)
25. Le Moual N, Siroux V, Pin I, Kauffmann F, Kennedy SM; Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma. Asthma severity and exposure to occupational asthrogens. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:440–5. PMID: [15961697](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15961697/)
26. Le Moual N, Carsin AE, Siroux V, Radon K, Norback D, Tor n K, et al. Occupational exposures and uncontrolled adult-onset asthma in the European Community Respiratory Health Survey II. *Eur Respir J* 2014; 43:374–86. doi: [10.1183/09031936.00034913](https://doi.org/10.1183/09031936.00034913) PMID: [23949964](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23949964/)
27. Malo JL. Asthma may be more severe if it is work-related. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:406–7. PMID: [16081550](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16081550/)
28. Vandeplass O, Dressel H, Wilken D, Jamart J, Heederik D, Maestrelli P, et al. Management of occupational asthma: cessation or reduction of exposure? A systematic review of available evidence. *Eur Respir J* 2011; 38:804–11. doi: [10.1183/09031936.00177510](https://doi.org/10.1183/09031936.00177510) PMID: [21436354](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21436354/)

29. Rachiotis G, Savani R, Brant A, MacNeill SJ, Newman Taylor A, Cullinan P. The outcome of occupational asthma after cessation of exposure: a systematic review. *Thorax* 2007; 62:147–52. PMID: [17040933](#)
30. Vandenas O, Malo JL. Inhalation challenges with agents causing occupational asthma. *Eur Respir J* 1997; 10:2612–29. PMID: [9426105](#)
31. Descatha A, Leproust H, Choudat D, Garnier R, Pairon JC, Ameille J. Factors associated with severity of occupational asthma with a latency period at diagnosis. *Allergy* 2007; 62(7):795–801. PMID: [17573728](#)
32. Malo JL, Lemièrre C, Desjardins A, Cartier A. Prevalence and intensity of rhinoconjunctivitis in subjects with occupational asthma. *Eur Respir J* 1997; 10(7):1513–5. PMID: [9230239](#)
33. Hur GY, Kim SH, Park SM, Ye YM, Kim CW, Jang AS, et al. Tissue transglutaminase can be involved in airway inflammation of toluene diisocyanate-induced occupational asthma. *J Clin Immunol* 2009; 29:786–94 doi: [10.1007/s10875-009-9314-8](#) PMID: [19562471](#)
34. Wisnewski AV, Liu Q, Liu J, Redlich CA. Human innate immune responses to hexamethylenediisocyanate (HDI) and HDI-albumin conjugates. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:957–67. doi: [10.1111/j.1365-2222.2008.02982.x](#) PMID: [18498542](#)
35. Maestrelli P, Yucosoy B, Park HS, Wisnewski AV. Mechanisms, genetics and pathophysiology. In: Malo JL, Chan-Yeung M and Bernstein DI, editors. *Asthma in the workplace*. Fourth Edition. Boca Raton; CRC Press; 2013, pp 40–56.
36. Vandenas O, D'Alpaos V, Evrard G, Jamart J. Incidence of severe asthmatic reactions after challenge exposure to occupational agents. *Chest* 2013; 143: 1261–8. doi: [10.1378/chest.12-1983](#) PMID: [23117442](#)
37. Hox V, Vanoirbeek JA, Alpizar YA, Voedisch S, Callebaut I, Bobic S, et al. Crucial role of transient receptor potential ankyrin 1 and mast cells in induction of nonallergic airway hyperreactivity in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187(5):486–93. doi: [10.1164/rccm.201208-1358OC](#) PMID: [23262517](#)
38. Vandenas O, Suojalehto H, Aasen TB, Baur X, Burge PS, de Blay F, et al; ERS Task Force on Specific Inhalation Challenges with Occupational Agents. Specific inhalation challenge in the diagnosis of occupational asthma: consensus statement. *Eur Respir J* 2014; 43:1573–87 doi: [10.1183/09031936.00180313](#) PMID: [24603815](#)
39. Girard F, Chaboillez S, Cartier A, Côte J, Hargreave FE, Labrecque M, et al. An effective strategy for diagnosing occupational asthma: use of induced sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:845–50. PMID: [15271693](#)