

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA INTERNA**

**MÉTODOS NO INVASIVOS DE MEDICIÓN DE LA INFLAMACIÓN EN LAS  
NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD: UTILIDAD DEL ESPUTO  
INDUCIDO**

**Autor:** Ana Villar Gómez

**Director:** Dr. Xavier Muñoz Gall

**Codirector:** Dra. M<sup>a</sup> Jesús Cruz Carmona

**Convocatoria Junio 2010**



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**DEPARTAMENT DE MEDICINA**

El Dr. Xavier Muñoz Gall, Metge Adjunt del Servei de Pneumologia de l'Hospital Vall d'Hebron, i la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Cruz Carmona, Investigadora del Laboratori de Pneumologia de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron

FAN CONSTAR,

que el treball titulat **Métodos no invasivos de estudio de la inflamación en las Neumonitis por Hipersensibilidad** ha estat realitzat sota la nostra direcció pel llicenciat **Ana Villar Gómez**, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna (curs 2009-2010), a la convocatòria de **juny**.

Barcelona, 1 de juny de dos mil deu.

---

Dr. Xavier Muñoz Gall

---

Dra. M<sup>a</sup>Jesús Cruz Carmona

**PALABRAS CLAVE:**

Neumonitis por Hipersensibilidad

Espujo Inducido

Prueba de Provocación Bronquial Específica

**PARAULAS CLAU:**

Pneumonitis per Hipersensibilitat

Esput Induït

Prova de Provocació Bronquial Específica

**RESÚMEN:**

El diagnóstico de la neumonitis por hipersensibilidad requiere en ocasiones la realización de técnicas diagnósticas invasivas que en ocasiones no son posibles de practicar dado el deterioro de la capacidad funcional que presenta el paciente. El empleo de nuevas técnicas de estudio de la inflamación pulmonar, a través de métodos no invasivos, podrían ser de utilidad en el diagnóstico y seguimiento de esta entidad. En el presente estudio, planteamos el valor del estudio del esputo inducido en el diagnóstico de la neumonitis por hipersensibilidad, así como su posible utilidad en el contexto de las pruebas de provocación bronquial específica.

**RESUM:**

El diagnòstic de la pneumonitis per hipersensibilitat requereix en ocasions la realització de tècniques diagnòstiques invasives que de vegades no són possibles de practicar donat el deteriorament de la capacitat funcional que presenta el pacient. L'ús de noves tècniques d'estudi de la inflamació pulmonar, a través de mètodes no invasius, podrien ser d'utilitat en el diagnòstic i seguiment d'aquesta entitat. En el present estudi, plantejem el valor de l'estudi de l'esput induït en el diagnòstic de la pneumonitis per hipersensibilitat, així com la seva possible utilitat en el context de les proves de provocació bronquial específiques.

## **ABREVIATURAS**

NH: Neumonitis por Hipersensibilidad.

LBA: Lavado broncoalveolar.

FBC: Fibrobroncoscopia.

BPQ: Biopsia pulmonar quirúrgica.

BTB: Biopsia transbronquial.

TCAR: Tomografía computerizada de alta resolución.

PPBE: Prueba de provocación bronquial específica.

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

TCHI: Test cutáneos de hipersensibilidad inmediata.

## ÍNDICE

## Capítulo (Páginas)

Resumen	Cap.1 (Pag 1-2)
Introducción	Cap. 2 (Pag 1-2)
Hipótesis	Cap. 3 (Pag 1)
Objetivos	Cap. 4 (Pag 1)
Material y Métodos	Cap. 5 (Pag 1-5)
Resultados	Cap. 6 (Pag 1-7)
Discusión	Cap. 7 (Pag 1-8)
Conclusiones	Cap. 8 (Pag 1)
Bibliografía	Cap. 9 (Pag 1-5)

## 1. Resumen

**Introducción:** La neumonitis por hipersensibilidad (NH) representa a un grupo heterogéneo de entidades patológicas en respuesta a una extensa variedad de antígenos, provocando diferentes grados de desestructuración del parénquima pulmonar (1). El diagnóstico de esta enfermedad requiere en ocasiones de la realización de técnicas diagnósticas invasivas tales como la FBC con LBA/BTB, que en ocasiones no son posibles de practicar dado el deterioro de la capacidad funcional que presenta el paciente (1-5). El empleo de nuevas técnicas de estudio de la inflamación pulmonar, a través de métodos no invasivos, podrían ser de utilidad en el diagnóstico y seguimiento de esta entidad. En el presente estudio, planteamos el valor del estudio del esputo inducido en el diagnóstico de la NH, así como posible su utilidad en el contexto de las pruebas de provocación bronquial específica.

**Material y métodos:** Se estudian prospectivamente 23 pacientes diagnosticados de NH, confirmada por PPBE positiva al agente causal. Se realizó estudio de esputo inducido 24h pre y/o post realización de prueba de provocación bronquial específica.

**Resultados:** El estudio celular de esputo inducido mostró un recuento celular medio de  $1,11 \times 10^6$  células, con una diferenciación celular media de 28.70% Macrófagos, 69.40% Neutrófilos, 1.00% Linfocitos y 0.90% Eosinófilos. Si bien no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la diferenciación celular según el agente causal, se observó un incremento superior al 10% en el porcentaje de neutrófilos respecto al valor normal en un 90% de los casos, siendo este incremento de forma basal superior en el caso de las NH producidas por hongos. El estudio del esputo inducido post PPBE mostró un recuento celular medio de  $1.59 \times 10^6$ , con 20,94% de macrófagos, 77,10% de neutrófilos, 0,78% de linfocitos y 1,00% de eosinófilos. Se observó un incremento superior al 10% en las cifras de neutrófilos respecto a su valor basal después de la realización de la PPBE en un 66,6% de los casos, alcanzando este incremento la significación estadística en las NH cuyo agente etiológico fueron los

hongos ( $p= 0.025$ ). Tras la exposición al agente causal en el contexto de la realización de una PPBE, la neutrofilia existente en el esputo inducido fue significativamente superior en las NH producidas por hongos. Finalmente el 55% de los pacientes diagnosticados de NH presentan un recuento de linfocitos superior o igual al 1% en estudio basal de esputo inducido.

**Conclusión:**

En las NH existe una inflamación neutrofílica basal, que podría ser superior en las NH cuyo agente etiológico son los hongos. El aumento de neutrófilos tras la PPBE podría ayudar a disminuir el número de falsos negativos de esta prueba, aunque son necesarios futuros estudios para confirmar estos hechos.



## 2. Introducción

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) representa a un grupo heterogéneo de entidades patológicas, de intensidad y presentación clínica variable, que resultan de una reacción inflamatoria pulmonar, de causa inmunológica, en respuesta a una extensa variedad de antígenos, provocando diferentes grados de desestructuración del parénquima pulmonar (1). El diagnóstico de esta entidad, engloba diferentes aspectos, como son la demostración de un estímulo antigénico responsable a través de una historia clínica sugestiva (2) y/o determinación de precipitinas en suero o prueba de intradermorreacción positiva (3) unos hallazgos radiológicos y estudios de función pulmonar compatibles (4) e infiltrado de predominio linfocitario, demostrado por la presencia de linfocitosis en LBA y/o hallazgos anatomopatológicos característicos en muestras de tejido obtenidas por BTB y/o BPQ (1, 5). En este contexto, Schuyler y Cormier (6) proponen unos criterios mayores y menores para el diagnóstico de la NH:

Criterios Mayores: 1) Síntomas compatibles con NH. 2) Evidencia de exposición antigénica apropiada a través de historia y/o detección de precipitinas específicas en suero y/o LBA. 3) Hallazgos compatibles con NH en radiología simple de tórax o TC torácico. 4) Linfocitosis en LBA (si se practica LBA). 5) Cambos histológicos compatibles con NH. 6) PPBE positiva (reproducción de la sintomatología y alteraciones de laboratorio tras la exposición al antígeno sospechoso. Criterios Menores: 1) Crepitantes bibasales. 2) Disminución de la capacidad de difusión de CO. 3) Hipoxemia arterial, al menos tras ejercicio. El diagnóstico se confirma si al menos están presentes 4 criterios mayores y 2 criterios menores, y si otras patologías de características similares han sido descartadas (sarcoidosis o fibrosis pulmonar idiopática)

La utilidad de los métodos no invasivos de estudio de inflamación como el esputo inducido a penas han sido estudiados en pacientes con NH. Si bien el estudio del

esputo inducido ha demostrado ser muy útil para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con asma y EPOC (7, 8) su utilidad es más dudosa en pacientes con patología intersticial pulmonar. En este sentido, en pacientes con sarcoidosis, se ha demostrado un aumento del número de células totales con un aumento del porcentaje de linfocitos en el recuento celular diferencial (9, 10). En pacientes con esclerodermia sistémica y afectación pulmonar se ha observado un porcentaje mayor de neutrófilos, con descenso de macrófagos, además de un incremento en el número total de células respecto a sujetos sanos (11). Finalmente en pacientes con NH los tres únicos estudios realizados hasta la actualidad han demostrado, al igual que en la sarcoidosis, un aumento del número de células totales con incremento del número de linfocitos comparado con sujetos (9, 12, 13).

### **3. Hipótesis**

El estudio celular diferencial del esputo inducido en las Neumonitis por Hipersensibilidad puede tener utilidad en el diagnóstico de esta patología. Su realización en el contexto de la prueba de provocación bronquial específica puede tener utilidad en el diagnóstico de positividad o negatividad de la prueba cuando ésta resulta inespecífica.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivos Principales:**

1. Estudiar las características del recuento celular diferencial del esputo inducido en las NH, comparando los datos obtenidos con la población general.
2. Estudiar la respuesta celular en el esputo inducido tras realizar una PPBE al agente causal en las NH.

#### **4.2. Objetivos secundarios:**

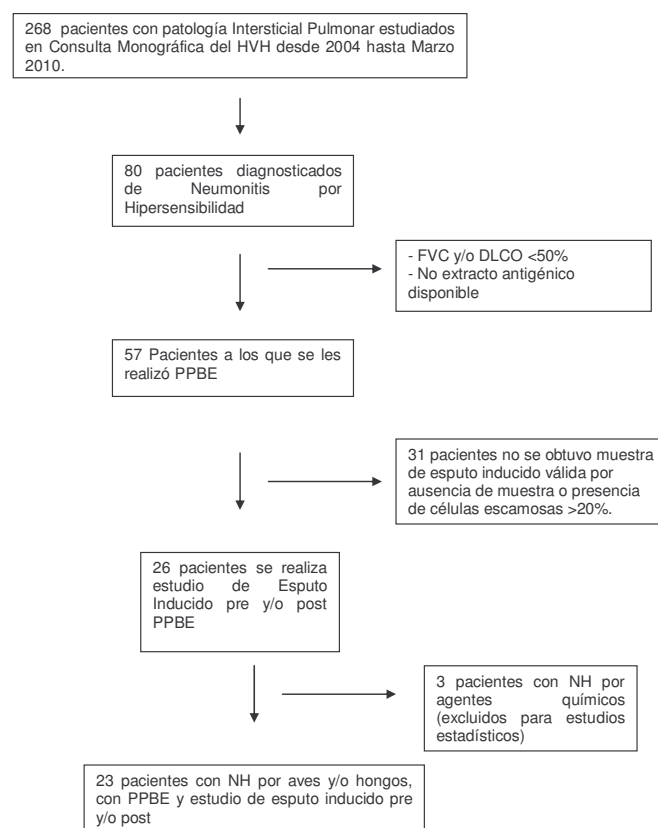
3. Estudiar cambios en las características del esputo inducido en las NH en función del agente causal.
4. Estudiar posibles relaciones entre los datos obtenidos en el esputo inducido y otros parámetros empleados habitualmente en el diagnóstico de las NH (forma de presentación clínica, estudio funcional, estudios de hipersensibilidad cutánea, precipitinas específicas en suero, radiología, estudio de sangre periférica, y lavado broncoalveolar).
5. Describir las características clínicas y exploraciones complementarias basales en las NH, así como en relación a la naturaleza del antígeno responsable.

## 5. Material y métodos

### 5.1 POBLACIÓN A ESTUDIO:

Se estudiaron de forma prospectiva todos los pacientes que acudieron entre los años 2004 y Febrero de 2010 a una consulta monográfica de patología intersticial cuya actividad ha sido recientemente publicada (3). De un total de 268 pacientes con sospecha de patología intersticial, se realizó el diagnóstico de neumonitis por hipersensibilidad en 80. En 57 de estos pacientes fue posible realizar una PPBE, debido a que su estudio de función pulmonar permitió la realización de la misma (FVC >50%, DLCO >50%), siendo excluidos los que no cumplían esta condición. En 26 pacientes, en el contexto de la PPBE, se realizó inducción del esputo previa y posteriormente a la PPBE, no obteniendo muestra válida en 31 pacientes. Finalmente, 3 pacientes fueron excluidos por presentar una NH secundaria a la inhalación de agentes químicos (Figura 1).

Figura 1



## 5.2 MÉTODOS:

### 5.2.1. Criterios Diagnósticos.

El diagnóstico de NH se estableció siguiendo los criterios propuestos por Schuyler et al (6). Se consideró que la forma de presentación era aguda cuando los síntomas (mal estar general, disnea, tos con/sin expectoración, fiebre, dolor torácico) aparecían a las pocas horas de contacto con el antígeno y desaparecían tras la evitación del agente causal. Se consideró una forma subaguda cuando durante un periodo de semanas o meses, el paciente presentaba síntomas tales como astenia, síndrome constitucional, febrícula, pérdida de peso, tos seca y/o productiva, y/o disnea de esfuerzo. Finalmente se consideró una forma crónica cuando un paciente, con o sin exposición antigénica actual o previa, presentaba disnea grado III/IV, y el TC o la biopsia pulmonar demostraron enfermedad pulmonar intersticial difusa con fibrosis establecida (4).

La Intensidad de la exposición fue cuantificada en base a la duración total de la misma, calculada ésta a partir de los datos obtenidos en la historia clínica, o según las horas de totales de exposición a la fuente alérgica. Se siguieron los siguientes criterios, modificados de Rodríguez et al (14) para su clasificación en 3 categorías: leve (incluyendo exposiciones esporádicas y de escasa duración) 1-6 horas a la semana; moderada 6-18h a la semana; intensa: más de 18horas a la semana.

### 5.2.2. Estudios de función pulmonar:

Los estudios de función pulmonar fueron realizados empleando un MasterLab Apparatus (MasterLab, Jaegger, Germany) y siguiendo las recomendaciones propuestas en las guías de la European Respiratory Society (ERS) descritas en 1993 (15). El estudio de los volúmenes estáticos pulmonares, fue realizado siguiendo el método pletismográfico, y la DLCO fue medida mediante el método de la respiración única (16). Los valores teóricos espirométricos empleados fueron los descritos para la población mediterránea (17). Los valores predictivos de la DLCO y de los volúmenes

estáticos pulmonares fueron los propuestos por la European Respiratory Society (15, 18)

### 5.2.3. Prueba de provocación bronquial específica.

La PPBE fue realizada en nuestro centro hospitalario, tras obtener el consentimiento informado por parte del paciente. Se empleó un Nebulizador de Vilbiss 646, y un dosímetro Mefar MB3 que liberan la solución de preparado de antígeno sospechoso durante el primer segundo de cada inspiración. La técnica consistió en la inhalación de 2ml de la solución, a una dilución de 1/100 (0.01mg/ml). FVC, FEV1, TLCO y la temperatura del paciente fueron valoradas en situación basal, a los 20 minutos tras la exposición, y cada hora durante las siguientes 8 horas. En todos los casos un test basal con solución placebo fue realizado el día previo (4). La PPBE fue considerada positiva según los siguientes criterios:

1. Descenso de FVC >15% o descenso de DLCO >20% respecto a los valores de referencia.
2. Descenso de 10-15% de la FVC con al menos uno de los siguientes criterios:
  - a) incremento de linfocitos periféricos superior al 20% en sangre periférica, b) descenso de la saturación arterial de oxígeno superior al 3%, c) cambios radiológicos significativos, d) incremento en la temperatura corporal superior al 0.5 °C, y e) aparición de sintomatología característica.
3. Descenso de FVC inferior al 10% pero con 3 o más de los anteriores criterios clínicos, analíticos y radiológicos anteriormente descritos (19).

En los casos en los que el test resultó negativo con una dilución de 1/100 de la solución de antígeno sospechoso, se repitió la exposición durante las siguientes 24 horas, a una dilución de 1/10 (0.1mg/ml), siguiendo el mismo procedimiento (4).

#### 5.2.4. Espuito Inducido:

El estudio del esputo inducido, se realizó 24h antes y 24h después de la PPBE. Los sujetos fueron premedicados con salbutamol a dosis de 200mcg. El aerosol fue generado a través de un nebulizador ultrasónico OMROM® NE-U17 Ultra air. El método se basó en la inhalación en concentraciones crecientes de solución salina hipertónica (3, 4, y 5%) durante 7 minutos cada uno a través de una boquilla sin pinzas nasales. Después de cada período de inhalación de 7 minutos, el FEV1 fue evaluado mediante un espirómetro Datospir 120, Sibemed ® (Sibel SA, Barcelona, España). En los casos en los que el FEV1 disminuyó del 10-20%, se repitió la inhalación con la misma concentración de solución salina; en los casos en los que se produjo una disminución del FEV1 superior al 20%, acompañado o no de sintomatología, se suspendió la prueba y se administró tratamiento beta2 adrenérgico. En los casos en los que el descenso del FEV1 fue inferior al 10%, se repitió la nebulización a dosis creciente de la solución salina según lo descrito previamente. Tras cada nebulización, los sujetos fueron instados a realizar limpieza nasal y enjuague bucal, para reducir la contaminación del esputo con el goteo postnatal y la saliva, e intentar realizar una muestra de esputo en un contenedor. El procesado de la muestra se realizó en un plazo de 2 horas manteniendo la misma refrigerada a temperatura de 4º C, y analizada en laboratorio con recuento celular total, viabilidad, y diferenciación de subclases celulares. El estudio del esputo inducido fue llevado a cabo según la técnica descrita por Pizzichini et al (20).

#### 5.2.5. Análisis Estadístico:

De los resultados obtenidos al analizar a los 23 pacientes, se calculó la media y la desviación estándar de la media, mediana y rango. Las diferencias entre grupos fueron analizadas mediante el test *Mann- Witney* para pruebas no paramétricas en dos grupos independientes. Para establecer la asociación entre los diferentes parámetros analizados se calculó el coeficiente de correlación de *Spearman*. El

análisis estadístico se realizó mediante el programa informático SPSS, versión 17.0, para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)



## 6. Resultados

### Características demográficas y clínicas:

En la **Tabla 1** se describen los datos demográficos y las características clínicas de la población estudiada.

**Tabla 1: Características clínicas y demográficas**

	TODOS (n=23)	AVES (n=14)	HONGOS (n=9)	p
<b>Sexo</b>				0.583
Mujeres	16/23 (69.6%)	10/14 (71.4%)	6/9 (66.7%)	
Varones	7/23 (30.4%)	4/14 (28.6%)	3/9 (33.3%)	
<b>Edad Media</b>	52,60 (26-80)	52,35 (26-74)	53,00 (31-80)	0,975
<b>Hábito tabáquico</b>				0,590
Fumadores activos	9/23 (39.1%)	2/14 (14.3%)	2/9 (22.2%)	
No fumadores	9/23 (39.1%)	6/14 (42.9%)	2/9 (22.2%)	
Ex Fumadores	9/23 (39.1%)	6/14 (42.9%)	5/9 (55.6%)	
<b>Paquetes Año (n=14)</b>	14.71 ( $\pm$ 13.07) paq/año	16.37 ( $\pm$ 13.09) paq/año	13.06 ( $\pm$ 13.74) paq/año	0.950
<b>Síntomas</b>				
Fiebre	9/23 (39.1%)	5/14 (35.7%)	4/9 (44.4%)	0.505
Tos	18/23 (78.3%)	10/14 (71.4%)	8/9 (88.9%)	0.327
Disnea	22/23 (95.7%)	13/14 (92.9%)	9/9 (100%)	0.609
IRPA	17/23 (73.9%)	12/14 (85.7%)	5/9 (55.6%)	0.132
Artromialgias	17/23 (73.9%)	12/14 (85.7%)	5/9 (55.6%)	0.226
<b>Auscultación <sup>(1)</sup></b>				
Normal	12/21 (57.14%)	9/13 (69.23%)	3/8 (37.5%)	0.355
Crepitantes bibasales	7/21 (33.3%)	3/13 (23.07%)	4/8 (50.0%)	
Sibilancias	2/21 (9.52%)	1/13 (7.69%)	1/8 (12.5%)	
<b>Período de latencia <sup>(2)</sup></b>				0.063
<6 meses	2/22 (9.09%)	-	2/8 (25%)	
6 meses a 1 año	2/22 (9.09%)	2/14 (14.28%)	-	
1 año a 5 años	6/22 (27.27%)	4/14 (28.57%)	2/8 (25%)	
5 años a 10 años	4/22 (18.18%)	4/14 (28.57%)	-	
10 años a 20 años	2/22 (27.27%)	-	2/8 (25%)	
>20 años	6/22 (27.27%)	4/14 (28.57%)	2/8 (25%)	
<b>Tiempo Total de Exposición <sup>(2)</sup></b>				0.143
<6 meses	2/22 (9.09%)	-	2/8 (25%)	
6 meses a 1 año	-	-	-	
1 año a 5 años	3/22 (13.63%)	3/14 (21.42%)	-	
5 años a 10 años	8/22 (36.36%)	6/14 (42.85%)	2/8 (28%)	
10 años a 20 años	3/22 (13.63%)	1/14 (7.14%)	2/8 (25%)	
>20 años	6/22 (27.27%)	4/14 (28.57%)	2/8 (25%)	
<b>Tiempo de Exposición Sintomática <sup>(2)</sup></b>				0.136
<6 meses	4/22 (18.18%)	1/14 (7.14%)	3/8 (37.5%)	
6 meses a 1 año	4/22 (18.18%)	2/14 (14.28%)	2/8 (25%)	
1 año a 5 años	10/22 (45.45%)	9/14 (64.28%)	1/8 (12.5%)	
5 años a 10 años	2/22 (9.09%)	1/14 (7.14%)	1/8 (12.5%)	
10 años a 20 años	1/22 (4.54%)	-	1/8 (12.5%)	
>20 años	1/22 (4.54%)	1/14 (7.14%)	-	
<b>Intensidad de la Exposición <sup>(1)</sup></b>				0.209
Leve	4/23 (17.4%)	4/14 (28.6%)	-	
Moderado	4/23 (17.4%)	2/14 (14.28%)	2/9 (22.2%)	
Intenso	15/23 (65.21%)	8/14 (57.14%)	7/9 (77.8%)	
<b>Presentación Clínica <sup>(2)</sup></b>				0.802
Aguda	3/22 (13.63%)	2/14 (14.28%)	1/8 (12.5%)	
Subaguda	10/22 (45.45%)	7/14 (50%)	3/8 (37.5%)	
Crónica	9/22 (40.90%)	5/14 (35.71%)	4/8 (50.0%)	

<sup>(1)</sup>: No disponemos de datos en 2 pacientes <sup>(2)</sup>: No disponemos de datos en 1 paciente

En el momento del diagnóstico, los pacientes presentaban un período de latencia desde el inicio de la exposición al comienzo de los síntomas, de 1 a 5 años en un 26,1% de los casos (6/22), y un tiempo total de exposición al agente de 5 a 10 años en un 34.80% (8/22); la exposición al antígeno una vez iniciada la clínica se prolongó de 1 a 5 años en un 43,5% (10/22). La exposición al antígeno fue intensa en un 65,2% de los casos (15/23), alcanzando un porcentaje del 77,8% en las NH por hongos (7/9); no hemos objetivado diferencias significativas respecto a las NH por aves ( $p= 0.209$ ).

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en las exploraciones complementarias realizadas.

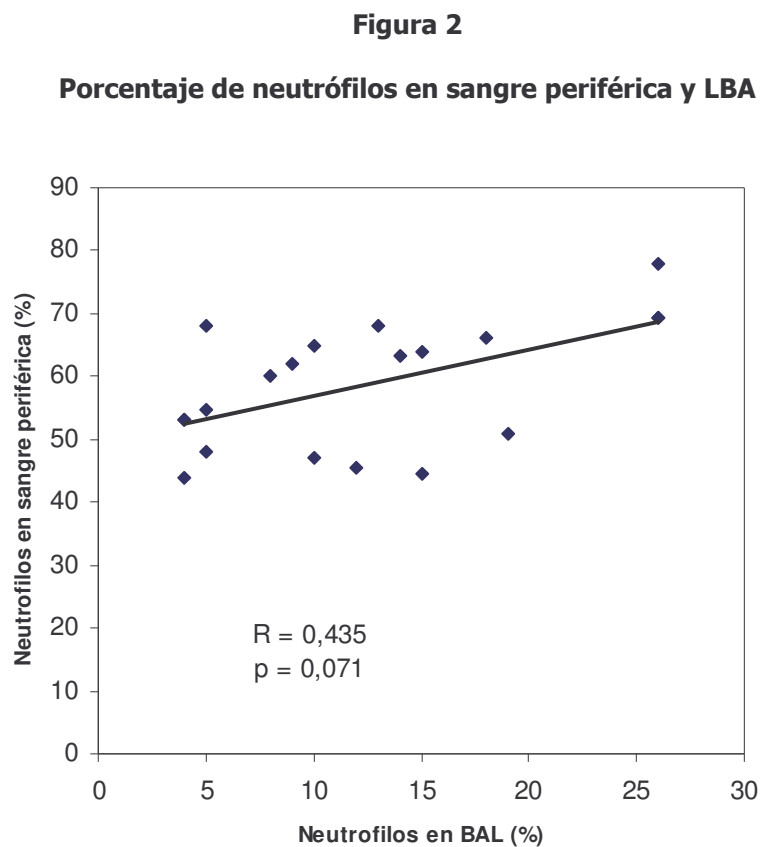
Tabla 2. Exploraciones Complementarias

	TODOS (n= 23)	AVES N= 14	HONGOS (n=9)	p
<b>Sangre Periférica</b>				
Leucocitos/mm3	7865,21	7535,71	8377,77	0.600
Recuento Celular (%)				
N%	59,28%	55,15%	65,71%	0.039
L%	28,63%	31,93%	23,50%	0.053
M%	7,70%	8,57%	6,50%	
Eo%	2,72%	2,16%	3,40%	
<b>Patrón Radiológico</b>				
Normal	4/22 (18.18%)	2/13 (15.38%)	2/9 (22,2%)	0.482
Reticular	1/22 (4.54%)	-	1/9 (11,1%)	
Nodulillar	7/22 (31.8%)	4/13 (30.76%)	3/9 (33,3%)	
NIU	2/22 (9.09%)	1/13 (7,69%)	1/9 (11,1%)	
Vidrio deslustrado	8/22 (36.36%)	6/13 (46.15%)	2/9 (22,2%)	
<b>Pruebas Funcionales Respiratorias</b>				
FVC	76,49%	73,35%	81,36%	0.250
FEV1	83,57%	81,28%	87,13%	0.516
FEV1%	81,23%	81,84%	80,26%	0.877
TLCO	60,94%	59,40%	65,35%	0.516
KCO	71,37%	71,35%	71,40%	0.975
<b>Lavado Broncoalveolar <sup>(2)</sup></b>				
N%	12,11%	11,16%	14,0%	0.964
L%	23,52%	24,15%	22,16%	0.368
M%	66,22%	69,25%	60,16%	0.213
Eo%	0,16%	0,08%	0,33%	0.750
<b>IgG Específica <sup>(1)</sup></b>				0.144
Positiva	12/19 (63.15%)	6/12 (50%)	7/8 (87.5%)	
Negativa	7/19 (36.84%)	6/12 (50%)	1/8 (12.5%)	
<b>TCHI <sup>(1)</sup></b>				0.574
Positivo	15/19(78.94%)	9/11 (81.81%)	7/9 (77.7%)	
Negativo	4/19 (21.05%)	2/11 (18.18%)	2/9 (22.2%)	

<sup>1</sup>: No existen datos en 4 pacientes <sup>(2)</sup>: n=18 <sup>(3)</sup>: No existen datos en 1 paciente

Se objetivó una diferencia significativa en el recuento diferencial celular en sangre periférica según el agente causal, con un predominio de neutrófilos en las NH por hongos con un porcentaje de 65.71% ( $p = 0,039$ ) y predominio de linfocitos en los casos de NH por antígenos aviáres, con un porcentaje de 31,93% ( $p = 0,053$ ).

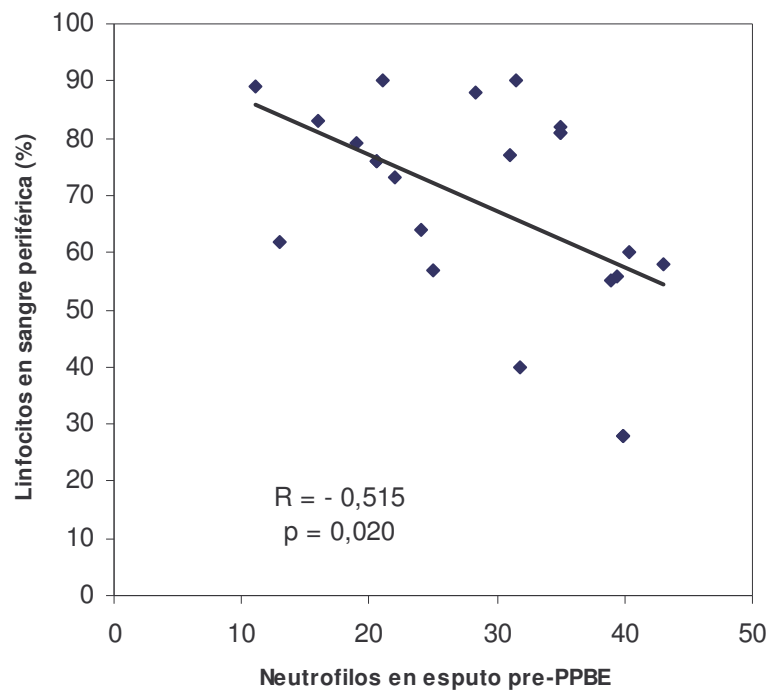
No hallamos una correlación significativa entre la cifra de neutrófilos en sangre periférica y LBA ( $R = 0.435$ ,  $p = 0.071$ ). (Figura 2) En el recuento diferencial de linfocitos, encontramos una relación inversa entre porcentaje de linfocitos en LBA y sangre periférica ( $R = -0.001$ ) aunque sin significación estadística ( $p = 0.996$ )



En cambio, si se objetivó una correlación estadísticamente significativa entre el número de linfocitos en sangre periférica, y el recuento celular de neutrófilos en las

muestras de esputo inducido, con una relación inversamente proporcional entre ambas medidas ( $R = -0.515$ ,  $p = 0.020$ ) (Figura 3)

**Figura 3**  
**Linfocitos en sangre periférica y neutrófilos en LBA**



El estudio celular de esputo inducido mostró un recuento celular medio de  $1,11 \times 10^6$  células, con una diferenciación celular media de 69,40% de Neutrófilos, 1,00% de Linfocitos, 28,70% de Macrófagos, y 0.90% de Eosinófilos. Si bien no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la diferenciación celular según el agente causal, se observó un incremento superior al 10% en el porcentaje de neutrófilos respecto al valor normal en un 90% de los casos, siendo este incremento de forma basal superior en el caso de las NH producidas por hongos. El estudio del esputo

inducido post PPBE mostró un recuento celular medio de  $1,59 \times 10^6$ , con 77,10% de neutrófilos, 0,78% de linfocitos, 20,94% de macrófagos, y 1,00% de eosinófilos, con un predominio de neutrófilos en el estudio del esputo inducido en las NH por hongos, en comparación con las NH por aves, con un 84,22% y 70,70% respectivamente ( $p=0.035$ ). (Figura 4) (Tabla 3). Se observó un incremento superior al 10% en las cifras de neutrófilos respecto a su valor basal después de la realización de la PPBE en un 66,6% de los casos. Además, se observó un incremento de N en los casos de NH por hongos con un porcentaje pre PPBE de 71,50% y post PPBE de 84,22% % de neutrófilos respecto al valor basal ( $p=0,025$ ) tras la realización de la PPBE al antígeno responsable, (Figura 5) sin diferencias significativas en el resto de las series.

**Tabla 3. Métodos no invasivos de medición de la inflamación:**

	TOTAL	AVES	HONGOS	p
<b>ESPUTO INDUCIDO pre PPBE <sup>(1)</sup></b>				
Nº Total Células ( $\times 10^6$ )	1,11	0,53	1,97	0.624
Recuento Celular (%)				
N%	69,40	68,0	71,50	0.571
L%	1,00	1,33	0,50	0.384
M%	28,70	29,75	27,12	0.473
Eo%	0,90	0,91	0,87	0.910
<b>ESPUTO INDUCIDO post PPBE <sup>(2)</sup></b>				
Nº Total Células ( $\times 10^6$ )	1,59	0,96	2,28	0.356
Recuento Celular (%)				
N%	77,10	70,70	84,22	0.035
L%	0,78	1,0	0,55	0.604
M%	20,94	27,20	14,00	0.028
Eo%	1,00	1,30	1,22	0.720

<sup>(1)</sup> n= 20 <sup>(2)</sup> n= 19

Figura 4 **Porcentaje de recuento celular de Neutrófilos en esputo inducido pre y post PPBE en las NH por inhalación de hongos.**

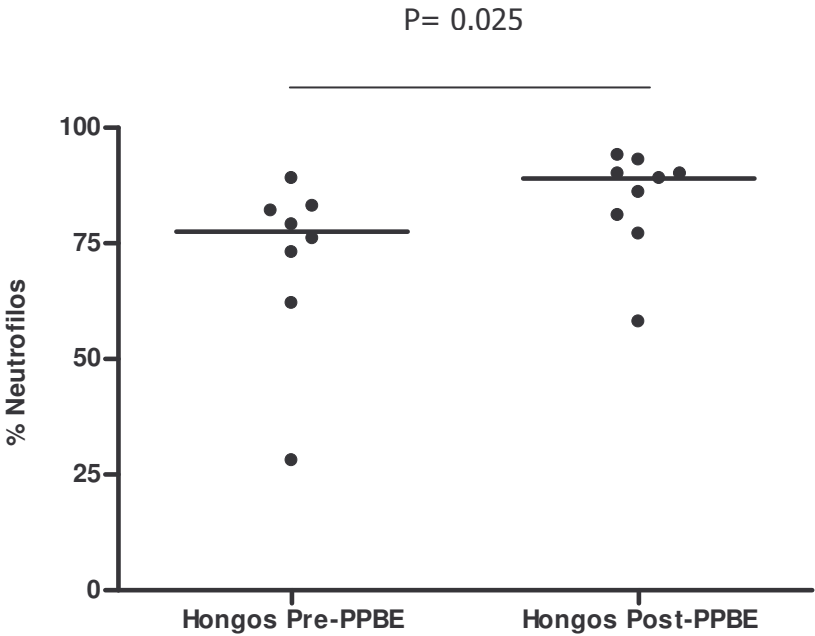
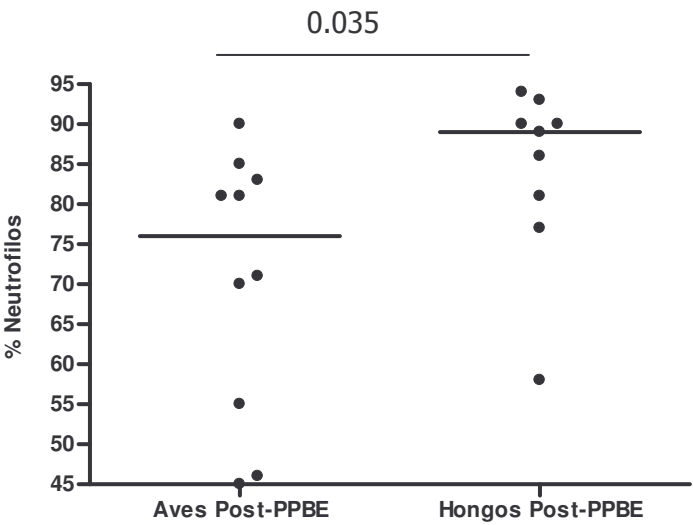
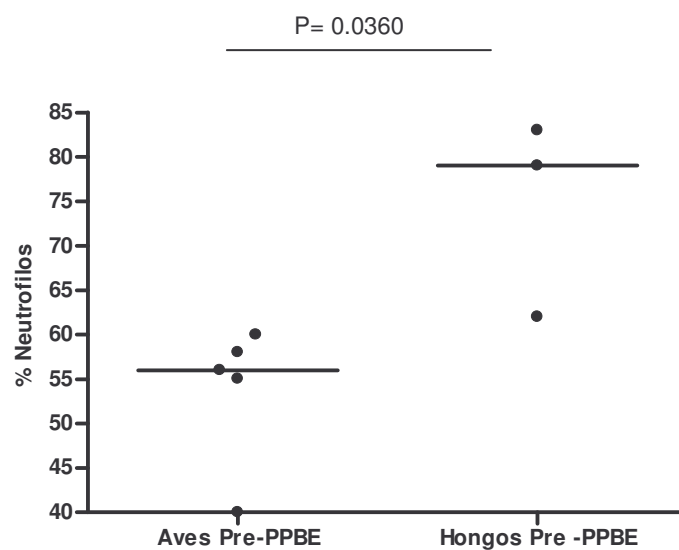


Figura 5 **Porcentaje de recuento celular de Neutrófilos en esputo inducido post PPBE en las NH por inhalación de proteínas aviares y hongos.**



Tampoco se observaron diferencias significativas en el recuento celular en el esputo inducido de forma global en función de la forma de presentación clínica. En cambio, si que se objetivó una inflamación neutrofílica basal en las muestras de esputo inducido en las NH por Hongos en las formas subagudas ( $p= 0.036$ ) en relación a las formas subagudas en las NH por aves, sin diferencias en el resto de formas de presentación. (Figura 6). Finalmente, en las formas agudas, se objetivó un predominio de neutrófilos en esputo inducido en las NH por aves con una diferencia estadísticamente significativa respecto a los recuentos de neutrófilos en formas subaguda y crónica ( $p= 0,041$ ).

#### Porcentaje de Neutrófilos en esputo inducido en las formas de presentación subagudas



## **7. Discusión:**

El presente estudio demuestra que en las NH existe un incremento del recuento celular de neutrófilos en el esputo inducido, con respecto tanto a la población general. Si bien de forma basal la inflamación neutrofílica en las NH secundarias a inhalación de hongos no alcanzó la significación estadística respecto a las NH producidas por antígenos aviares, su incremento significativo tras la exposición al antígeno responsable en el contexto de la PPBE, podría sugerir una respuesta neutrofílica superior en las NH cuyo agente etiológico son los hongos. Esta reacción neutrofílica basal, acentuada tras PPBE al antígeno responsable, podría ser también de utilidad en el contexto de la PPBE para intentar reducir los posibles falsos negativos de esta prueba.

La NH es una entidad que se caracteriza por una respuesta inflamatoria de causa inmunológica, que afecta de forma preferente al parénquima pulmonar, pero en la que también puede estar implicada la afectación de las vía aéreas más distal. Para demostrar esta inflamación, es necesario recurrir a técnicas invasivas de diagnóstico, como el LBA y la BTB, en las que la presencia de linfocitosis y/o infiltrado de predominio linfocitario respectivamente es característica. En ocasiones, estas técnicas no son viables, debido a la situación funcional del paciente. En este contexto, el desarrollo de nuevas técnicas de estudio de inflamación pulmonar por métodos no invasivos, como el esputo inducido, pueden ser de utilidad en la evaluación diagnóstica de estos pacientes.

El estudio del esputo inducido se ha demostrado útil en enfermedades como el asma o el EPOC (21, 22, 23), si bien su utilidad en enfermedades intersticiales pulmonares no está definida. D'Ipollito et al (10), plantearon por primera vez la utilidad del estudio del



recuento celular diferencial en el esputo inducido en pacientes con sarcoidosis de reciente diagnóstico. Se trató de un estudio prospectivo, realizado sobre 15 pacientes diagnosticados de sarcoidosis en estadio I-II y 12 individuos sanos, en el que los resultados obtenidos mostraron cifras de linfocitos en E1 significativamente superiores en pacientes con sarcoidosis frente a sanos, así como mayor número de células totales, y células epiteliales. El recuento celular de linfocitos en pacientes con sarcoidosis fue de 9.4%, frente a 3.8% en individuos sanos. Posteriormente, Moodley et al (24), demostraron unas cifras basales de linfocitos en esputo inducido en pacientes con sarcoidosis de un 17.9%, con recuento de células totales de  $9.4 \times 10^6/\text{ml}$ , sin objetivar correlación en el recuento celular diferencial en esputo inducido y LBA para las diferentes series celulares. Finalmente, Mroz et al (25), tras evaluar el recuento celular diferencial en muestras de LBA y esputo inducido, antes y después de tratamiento oral con corticosteroides en 17 pacientes diagnosticados de sarcoidosis en estadio II, objetivaron cifras de neutrófilos basales de 62%, macrófagos 31%, y linfocitos 4%, con descenso de la cifra de neutrófilos e incremento de macrófagos tras tratamiento, con cifras de 37% y 54% respectivamente. Las cifras de linfocitos (4%), no mostraron variaciones en el estudio del esputo inducido pre y post tratamiento oral. Tampoco observaron cambios significativos en el recuento diferencial de células T antes y después del tratamiento en muestras de LBA, aunque el número de células T fue inferior en muestras de esputo inducido respecto a LBA. Sin embargo, si que demostraron una correlación positiva en estudios de LBA y esputo inducido en el número de células T CD4+ ( $r=0.59$ ), CD8+ (0.34) y en el índice CD4/CD8 ( $r= 0.66$ ).

La utilidad de la medición de la inflamación pulmonar mediante el esputo inducido en entidades como la esclerodermia y la fibrosis pulmonar Idiopática también ha sido estudiada. En este sentido en un estudio reciente, Damjanov et al (26), observaron un incremento del numero total de células en muestras de esputo inducido de pacientes con esclerodermia frente a individuos sanos, con incremento en el porcentaje de

Neutrófilos y Linfocitos, con cifras medias de 41.79% y 17.42% respectivamente; también observaron una correlación en los porcentajes de Neutrófilos y Macrófagos en muestras de esputo inducido y LBA. Antoniou et al (27) , al estudiar 20 pacientes con FPI, demostraron también en esputo inducido un incremento en el numero total de células, así como en el recuento celular de linfocitos ( $5 \pm 1.7\%$ ); además, también demostraron una estrecha correlación en el recuento diferencial de eosinófilos, linfocitos T CD8+ y CD4/CD8 ratio en esputo inducido y LBA.

En la NH, hasta la actualidad, tan sólo tres trabajos han intentado evaluar la utilidad del estudio del esputo inducido para su diagnóstico, siendo tan sólo dos los publicados en lengua inglesa. Mroz et al (13), describen un recuento de linfocitos de 13.8% en las NH, argumentando su utilidad en el estudio de la inflamación en esta entidad. Sobiecka et al (9), realizaron un estudio prospectivo, basado en 59 pacientes. De éstos, 36 pacientes habían sido diagnosticados de sarcoidosis, 7 de FPI, y 16 diagnosticados de NH según los criterios de la ATS. Las formas clínicas de presentación, de acuerdo a criterios radiológicos de TCAR, fueron NH subagudas en 11 pacientes y NH crónica en 5 pacientes. Durante el estudio diagnóstico, se realizó estudio de LBA y esputo inducido. Los autores, objetivan un recuento de linfocitos de hasta un 20.7% en muestras de esputo inducido en pacientes con NH, con una correlación significativa respecto a los valores obtenidos en LBA. Finalmente, D'Ippolito et al (12), realizan un estudio basado en pacientes afectos de NH, y 9 individuos sanos. El diagnóstico se basó en la presencia de síntomas compatibles, estudio radiológico y serológico, con precipitinas séricas a *M. faeni* en 7 pacientes y frente a proteínas aviares en 2 pacientes. Las formas de presentación clínica, basada en criterios radiológicos, fueron en forma de NH subaguda en 8 pacientes y NH crónica en uno de ellos. El grupo control, estaba formado por 9 individuos sanos, no fumadores, sin patología respiratoria previa. Los resultados obtenidos, demostraron la existencia de un incremento significativo del número total de células y linfocitos en

muestras de esputo inducido. En este caso, a diferencia de los estudios anteriores, los valores fueron comparados con un grupo control. El porcentaje de linfocitos en esputo inducido fue de  $(4\pm 3\%)$  con  $81 \times 10^5/\text{ml}$  células totales en los pacientes afectados de NH, siendo los valores obtenidos en el grupo control de  $0.8\pm 2\%$  con  $34.4 \times 10^5/\text{ml}$  células totales. En este caso, no se demostró correlación entre las cifras de células totales, y subtipos celulares en muestras de esputo inducido y LBA.

A diferencia de lo hallado por estos autores, en el presente estudio, basado en una cohorte de 23 pacientes afectados de NH, y cuyo diagnóstico de certeza del agente causal fue efectuado mediante una PPBE, hallamos una inflamación neutrofílica de forma basal en la mayoría de los pacientes, y aunque no de forma significativa, especialmente en las NH cuyo agente etiológico fue un hongo. El recuento de neutrófilos en las muestras de esputo de estos pacientes, fue superior a un 10% del valor normal observado en una población general en el 90% de los casos, siendo del 50% de los casos respecto al valor normal de sujetos de igual edad que la población a estudio (28,29). Esta característica es especialmente relevante en los casos de presentación subaguda, en los que además, encontramos una diferencia estadísticamente significativa al compararlo con las NH secundarias a inhalación de antígenos aviares.

Esta diferencia en el tipo de inflamación objetivado en relación al agente causal, no había sido descrita hasta la actualidad. En este sentido, en nuestro medio, las causas más frecuentes de NH son la exposición a proteínas aviares (4), el pulmón del granjero (30) la espartosis en los trabajadores de la construcción (31) y la suberosis en los trabajadores del corcho (19). Estas tres últimas entidades, en las que el agente causal implicado son hongos, se caracterizan por tener fundamentalmente una exposición laboral, con una duración mayor en el tiempo, y una intensidad de exposición valorable, a diferencia de las NH por otros agentes, como las NH por aves, en las que

la exposición generalmente es intermitente en el tiempo y de baja intensidad (4). Esta característica diferencial, podría explicar el desarrollo de una respuesta inflamatoria con características diferenciales, que hagan que las NH por Hongos presenten un mayor grado de inflamación que las NH por aves, siendo este hecho especialmente relevante tras la exposición al agente causal.

La existencia de una neutrofilia basal en las NH, no se correspondería con lo descrito hasta la actualidad en la literatura. En nuestro caso, los estudios se han realizado siguiendo la técnica de Pizzichini (20) para la inducción y procesamiento del esputo. El recuento celular obtenido en las diferentes series celulares se encuentra además en concordancia con los valores descritos por Rebecca et al (28,29), considerados en la actualidad, como valores de referencia. Por el contrario, en el estudio realizado por Sobiecka et al (9), así como en el descrito por D'Ipollito et al (12), la técnica de inducción y procesamiento del esputo difiere con la descrita por Pizzichini et al (20), no pudiendo comparar los resultados descritos con los obtenidos en el presente trabajo de forma fiable. De este modo, la ausencia de una técnica estandarizada de inducción y procesamiento del esputo podría ser la responsable de parte de las diferencias encontradas.

Paralelamente, si bien, el alto porcentaje de neutrófilos en esputo inducido es el hallazgo más relevante en el presente estudio, también hemos observado un incremento en el porcentaje de linfocitos, sobretodo en las NH por aves, con cifras de 2.6% en las formas subagudas, aunque sin alcanzar este hallazgo la significación estadística al compararlo con las NH producidas por hongos. A diferencia de lo observado en el esputo inducido, el estudio de la celularidad en el LBA si que demostró cifras de linfocitos superiores al 20% en la mayoría de los casos, al igual que ocurría en los anteriores trabajos descritos (9) y lo hallado previamente por nuestro grupo en una serie de 86 casos de NH por aves recientemente publicada (4). Los estudios de correlación realizados entre las cifras de linfocitos en LBA y esputo

inducido, no fueron significativos. Este hecho, estaría en desacuerdo por lo descrito por Sobiecka et al (9), donde los autores encuentran una correlación significativa entre las cifras de linfocitos en esputo inducido y LBA ( $R\ 0.64$ ,  $p = 0.035$ ) en las NH. En cambio, estos hallazgos, estarían de acuerdo con el estudio descrito por D'Ipollito et al (12), en el que los autores tampoco hallan correlación entre ambas series celulares en las diferentes muestras.

El estudio de una respuesta inflamatoria diferente en relación al agente causal, y de una posible compartimentalización de la respuesta inflamatoria, se hace también evidente en los estudios realizados en sangre periférica. En nuestro caso, objetivamos recuentos de linfocitos en sangre periférica significativamente inferiores en las NH por hongos respecto de las NH por antígenos aviares, sin que en ninguno de los casos, los niveles de linfocitos en sangre periférica fueron inferiores al 20%. La existencia de linfopenia periférica, clásicamente se asocia a un recuento superior de linfocitos en el LBA (4) debido probablemente a un reclutamiento de los mismos a nivel pulmonar. Un dato interesante del presente trabajo, ha sido el hecho de hallar una correlación inversamente proporcional entre el recuento de linfocitos en sangre periférica y el recuento de neutrófilos en muestras de esputo inducido. Es conocido que en los casos de infección sistémica grave, la presencia de leucocitosis periférica es característica, y se asocia frecuentemente a la presencia de formas celulares jóvenes. La reducción del número de leucocitos circulantes, puede sin embargo también estar presente, siendo además un factor de mal pronóstico. Dicha leucopenia periférica, suele caracterizarse por una disminución del número de neutrófilos sanguíneos, aunque el descenso de linfocitos, eosinófilos, basófilos y monocitos también puede ser el responsable. Este descenso de las series celulares, puede ser consecuencia un consumo aumentado, asociada a la migración de los leucocitos desde el compartimento vascular (32). De este modo, podríamos hipotetizar que, quizás, en las NH producidas por Hongos, existe una respuesta inflamatoria de mayor intensidad que en las NH en las que el

agente etiológico son las proteínas aviares, y se produce una mayor migración de leucocitos hacia la vía aérea más distal, responsable de la respuesta neutrofílica objetivada en esputo inducido.

Es conocido, que el recuento celular de neutrófilos en los diferentes compartimentos pulmonares decrece desde la vía aérea mas proximal hasta los compartimentos mas distales. Nightingale et al (33), en un estudio realizado sobre 16 pacientes, estudiando muestras procedentes de aspirado traqueal, esputo inducido y LBA, concluyen que el recuento celular de neutrófilos en vías proximales es mayor que en vías distales, de forma independiente de la inhalación o no de suero hipertónico para la inducción, siendo por lo tanto independiente de la existencia de una irritación de la vía aérea. Los autores entienden el recuento celular de neutrófilos en esputo inducido como reflejo de inflamación de las vías aéreas más proximales. En este sentido, la técnica empleada en el presente estudio para la obtención de las muestras de esputo inducido , siguiendo el método de Pizzichini et al (20) y el control de calidad de la muestra realizado, descartando aquellas muestras en las que la presencia de células escamosas fue superior al 20%, apoya la idea que el elevado porcentaje de neutrófilos observados es reflejo de una posible inflamación de la vía aérea más distal.

Finalmente, como hemos comentado anteriormente, el diagnóstico de la NH engloba diferentes aspectos: que incluyen la demostración de un estímulo antigénico responsable a través de una historia clínica sugestiva y/o la determinación de precipitinas en suero o prueba de intradermorreacción positiva; hallazgos radiológicos y estudios de función pulmonar compatibles, y presencia de un infiltrado de predominio linfocitario, demostrado por la presencia de linfocitosis en LBA y/o hallazgos anatomopatológicos característicos en muestras de tejido obtenidas por BTB y/o BPQ. El empleo de técnicas de provocación bronquial específica mediante la inhalación o mediante la exposición directa al alérgeno o material causal está indicado en los casos

en los que, a pesar de los estudios previos, no ha sido posible establecer un diagnóstico definitivo. El resultado de una prueba de provocación bronquial positiva se considera el «patrón de oro» en el diagnóstico de la NH (34), siendo su especificidad, sensibilidad, y valor predictivo y negativo superior al 80% según un estudio realizado sobre 17 pacientes afectados de NH crónica, 17 pacientes diagnosticados de otras enfermedades intersticiales pulmonares y 5 individuos sanos en el que se evaluaba la utilidad de monitorización de la T<sup>a</sup>, SatHbO<sub>2</sub> y FVC en el contexto de la realización de la PPBE (35). En nuestro estudio, en el contexto de la realización de una PPBE, se realizó estudio de esputo inducido previo y posterior a la realización de la misma, con la finalidad de estudiar posibles variaciones en las características celulares del mismo, que a su vez pudiesen tener utilidad, en la validación de la PPBE en los casos en los que ésta resulta inespecífica. Como ya hemos comentado, tras la exposición al agente causal en las NH cuyo agente etiológico eran los hongos, observamos una respuesta inflamatoria neutrofílica más marcada. Este hallazgo, sustentaría la hipótesis previa de la existencia de una respuesta inflamatoria diferente en relación al agente causal. Además, permite también plantear la rentabilidad del estudio del esputo inducido en el contexto de las PPBE. La presencia de neutrofilia en esputo tras la realización de la PPBE, podría ser considerada como marcador de inflamación en las NH. Este hecho, podría ser especialmente interesante en los casos en los que el agente etiológico son los hongos, pudiendo resultar útil en la definición de positividad de la PPBE en aquellos casos en los que ésta resulta inespecífica. Este hecho, debido al escaso tamaño muestral, condiciona que sean necesarios más estudios para poder definir su rentabilidad diagnóstica en este contexto.

## **8. Conclusiones**

En las NH existe una inflamación neutrofílica basal, que es superior en las NH cuyo agente etiológico son los hongos, en comparación con las NH producidas por antígenos aviares, si bien, esta diferencia no alcanza la significación estadística.

Tras la realización de la PPBE observamos un incremento en las cifras de neutrófilos en EI, especialmente en las NH producidas por hongos en comparación con las NH producidas por antígenos aviares, dato que podría tener relevancia en el contexto de la validación de la PPBE.

No encontramos correlación entre los datos obtenidos en el esputo inducido y los estudios funcionales, estudios de hipersensibilidad, radiología y lavado broncoalveolar. En cambio, observamos una correlación negativa entre las cifras de linfocitos en sangre periférica y neutrofilia en esputo inducido, especialmente en las NH por hongos.

Las NH producidas por antígenos aviares no se diferencian de las NH producidas por hongos en sus características clínicas, ni exploraciones complementarias, salvo en los estudios realizados en sangre periférica, existiendo un recuento de linfocitos inferior en las NH producidas por hongos.



## **9. Bibliografía**

1. Selman M. Hypersensitivity pneumonitis: a multifaceted deceiving disorder. Clin Chest Med 2004; 25:531-547
2. Hanak V, Golbin JM, Ryu JH. Causes and presenting features in 85 consecutive patients with hypersensitivity pneumonitis. Mayo Clin Proc. 2007;82(7):812-816
3. Morell F, Reyes L, Doménech G, de Gracia J, Majó J, Ferrer J. Diagnosis and diagnostic procedures in 500 consecutive patients with clinical suspicion of interstitial lung disease. Arch Bronconeumol 2008; 44(4):185-1912
4. Morell F, Roger A, Reyes L, Cruz MJ, Murio C, Muñoz X. Bird Fancier's lung. A series of 86 patients. Medicine 2008; 2: 110-130
5. Cormier Y, Belanger J, LeBlanc P, Laviolette M. Bronchoalveolar lavage in farmer's lung disease: diagnostic and physiological significance. Br J Ind Med. 1986 June; 43(6): 401–405
6. Schuyler M, Cormier Y. The diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis. Chest 1997;111:534-536
7. Alvarez M, Uribe P, Echegoyen A, Almudevar E, Olanguibel J, Urbiola E. Eosinophils in induced sputum versus nitric oxide in exhaled air: clinical utility in bronchial asthma. An Sist Sanit Navar 2009; 32(2):217-225
8. Sozanska E, Barczyk A, Biedron-Machura M, Pierzchala W. Usefulness of induced sputum in the diagnostics of selected chronic inflammatory airway diseases. Pneumonol Alergol Pol. 2009;77:349-356
9. Sobiecka M, Kus J, Demkow U, Filewska M, Jozwik A, Radwan-Rohrenschef P, Chorostowska-Wynimko J. Induced sputum in patients with interstitial lung disease: a non-invasive surrogate for certain parameters in bronchoalveolar lavage fluid. J Physiol Pharmacol 2008; 6:645-657

10. D'Ippolito R, Foresi A, Chetta A, Casalini A, Castagnaro A, Leone C, Olivieri D. Induced sputum in patients with newly diagnosed sarcoidosis: comparison with bronchial wash and BAL. . Chest. 1999 Jun;115(6):1611-5
11. Vatrella A, Bocchino M, Perna F, Scarpa R, Galati D, Spina S, Pelaia G, Gazzola M, Sanduzzi A. Induced sputum as a tool for early detection of airway inflammation in connective diseases-related lung involvement. Respir Med. 2007 Jul;101(7):1383-9
12. D'Ippolito R, Chetta A, Foresi A, Marangio E, Castagnaro A, Merlini S, Zompatori M, Olivieri D. Induced sputum and bronchoalveolar lavage from patients with hypersensitivity pneumonitis. Respir Med 2004; 98 (10):977-983
13. Mroz RM, Chyczewska E, Korniluk M, Stasiak-Barmuta A, Ossolinska M. Comparación 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):468-477
14. Rodríguez de Castro F, Carrillo T, Castillo R, Blanco C, Díaz F, Cuevas M. Relationships between characteristics of exposure to pigeon antigens. Clinical manifestations and humoral immune response. Chest. 1993 Apr;103(4):1059-63
15. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen 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
16. Forster RE, Fowler WS, Bates DV, Van Lingen B. The absorption of carbón monoxide by the lungs during breathholding. J Clin Invest. 1954;33:1135-1145
17. Roca J, Sanchos J, Agustí-Vidal A, et al. Spiro metric referent values from a Mediterranean population. Bull Eur Physiopathol Respir 1986; 22: 217-224
18. 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 test, European Community for Steel and Coal, Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J.* 1993;6(Suppl.16): 41-52

19. 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;124:1145-1152

20. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, Evans S, Morris MM, Squillace D, Gleich GJ, Dolovich J, Hargreave FE. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:308-317

21. Green RH, Brightling CE, McKenna S, Hargadon B, Parker D, Bradding P, Wardlaw AJ, Pavord ID. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002 Nov 30;360(9347):1715-21.

22. Jayaram L, Pizzichini MM, Cook RJ, Boulet LP, Lemièrre C, Pizzichini E, Cartier A, Hussack P, Goldsmith CH, Laviolette M, Parameswaran K, Hargreave FE. Determining asthma treatment by monitoring sputum cell counts: effect on exacerbations. *Eur Respir J.* 2006 Mar;27(3):483-94.

23. Chlumský J, Striz I, Terl M, Vondracek J. Strategy aimed at reduction of sputum eosinophils decreases exacerbation rate in patients with asthma. *J Int Med Res.* 2006 Mar-Apr;34(2):129-39.

24. . Moodley YP, Dorasamy T, Venketasamy S, Naicker V, Lalloo UG. Correlation of CD4:CD8 ratio and tumour necrosis factor (TNF) alpha levels in induced sputum with bronchoalveolar lavage fluid in pulmonary sarcoidosis. *Thorax.* 2000 Aug;55(8):696-9

25. Mroz RM, Korniluk M, Stasiak-Barmuta A, Chyczewska E. Comparison of induced sputum and bronchoalveolar lavage fluid cell profile during the treatment of pulmonary sarcoidosis. *J Physiol Pharmacol.* 2007 Nov;58 Suppl 5(Pt 2):445-52).

26. Damjanov N, Ostojic P, Kaloudi O, Alari S, Guiducci S, Stanflin N, Nestorovic B, Knezevic J, Camiciottoli G, Porta F, Pistolesi M, Ibba-Manneschi L, Conforti ML,

Candelieri A, Matucci Cerinic M. Induced sputum in systemic sclerosis interstitial lung disease: comparison to healthy controls and bronchoalveolar lavage. *Respiration*. 2009;78(1):56-62

27. Antoniou KM, Alexandrakis M, Tzanakis N, Tsiligianni I, Tzortzaki EG, Siafakas NM, Bouros DE. Induced sputum versus bronchoalveolar lavage fluid in the evaluation of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration* 2005;72:32-38

28. Belda J, Leight R, Parameswaran K, O'Byrne PM, Sears MR, Hargreave FE. Induced Sputum Cell Counts in Healthy Adults. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 161. pp 475–478, 2000

29. Rebecca A. Thomas, MB; Ruth H. Green, Chris E. Brightling, Surinder S. Birring, Debbie Parker, BSc (Hons); Andrew J. Wardlaw, Ian D. Pavord The Influence of Age on Induced Sputum Differential Cell Counts in Normal Subjects. *Chest* 2004;126;1811-1814

30. Morell F. Alveolitis Alérgica Extrínseca. En: Morell F, Editor. *Pneumologica. Pautas, diagnósticas en medicina respiratoria*. 8a. Ed. Barcelona:Masson; 2007

31. 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 (Barc)* 2003;120(15):578-83

32. Indira Briceño M.D. Sepsis: Definiciones y Aspectos Fisiopatológicos. *Medicrit* 2005; 2(8):164-178

33. Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax* 1998; 53: 87±90

34. Xaubet et al Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades intersticiales difusas.. *Arch. Bronconeumol* 2003; 39(12): 580-600

35. 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: 862-869