

PREPARACION DE ANTIGENOS DE ESPECIES DE ASPERGILLUS Y SU USO EN EL DIAGNOSTICO DE ASPERGILOSIS PULMONAR SECUNDARIA A TUBERCULOSIS

Lilian Ninette Guzmán Aguilar *

Patricia Cáceres de Cifuentes **

Sumario

La aspergilosis es una micosis no contagiosa, esporádica y cosmopolita, con manifestaciones clínicas diversas, pero sobre todo respiratorias, causadas por diferentes especies del género *Aspergillus*.

La forma pulmonar a menudo es una afección superimpuesta en pacientes con tuberculosis, silicosis o respuesta inmunológica deficiente relacionada a una terapia con corticosteroides o antibióticos. La clínica no específica y las manifestaciones radiológicas pulmonares de aspergilosis crean problemas diagnósticos. Las reacciones inmunológicas a menudo proveen la primera y única indicación de una infección fúngica, ya que es muy difícil obtener una evidencia histológica de la enfermedad.

El costo de los reactivos de las pruebas serológicas para el diagnóstico de aspergilosis es elevado, además de que su adquisición en nuestro medio es difícil. El presente estudio pretendió demostrar que en Guatemala es posible preparar antígenos de *Aspergillus* a precios bajos, para ser utilizados en prueba diagnóstica de inmunodifusión en poblaciones con afecciones pulmonares. Los resultados revelan que la preparación de antígenos de *Aspergillus* es sencilla y los costos de producción son muy bajos comparados con los precios de los antígenos comerciales. Por otro lado, se evaluó la especificidad de los antígenos preparados enfrentándolos a sueros de pacientes con otras afecciones fúngicas y de personas aparentemente sanas, no habiendo obtenido ninguna reacción falsa positiva, por lo que se concluye que los antígenos preparados son confiables y específicos para el diagnóstico de aspergilosis.

Con el antígeno de *A. fumigatus* fue posible detectar dos casos positivos en un grupo de 103 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, de lo que se concluye que la aspergilosis secundaria a tuberculosis sí existe en

Guatemala, siendo necesario realizar esta prueba de rutina en personas que padezcan de tuberculosis o de otras enfermedades que predispongan a la adquisición de aspergilosis.

Introducción

La aspergilosis es una infección causada por especies del género *Aspergillus*, hongos oportunistas cuyo aislamiento a partir de muestras broncopulmonares no constituyen evidencia de la enfermedad por ser un contaminante común en el laboratorio. El diagnóstico debe hacerse poniendo de manifiesto el agente etiológico en cortes histológicos o mediante pruebas serológicas confiables (1).

La tuberculosis es una enfermedad cuyas lesiones residuales predisponen a la adquisición de micosis oportunistas como la aspergilosis (2,3,4). En Guatemala, el índice de tuberculosis es alto y se sospecha que un alto porcentaje de pacientes crónicos padezcan de aspergilosis no diagnosticada que podría ponerse de manifiesto mediante pruebas serológicas. Estudios realizados por varios investigadores han demostrado que la inmunodifusión es una excelente ayuda para el diagnóstico de aspergilosis, dada la sensibilidad y especificidad de la prueba, además de ser un procedimiento simple y rápido (5,6,7,8,9,10,11).

Este estudio pretendió preparar los antígenos de las tres especies de *Aspergillus* más frecuentemente aisladas de pacientes, empleando como medio de cultivo caldo Sabouraud dextrosa, para ser utilizado en el procedimiento de inmunodifusión en agar fenolizado con buffer de barbital de pH 8.6.

Materiales y métodos

Antígenos: los antígenos fueron preparados según la técnica descrita por Harrel et al (12) con modificaciones en el procedimiento de concentración (8,9). Se prepararon antígenos a partir de *Aspergillus fumigatus* cepa CDC

* Lic. en Química Biológica

** Lic. en Química Biológica, Depto. Citología y Morfología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

9020, *A. niger* cepa 10577-80 y *A. flavus* cepa CDC 56, las cuales fueron inoculadas separadamente en 400 ml de caldo Sabouraud dextrosa e incubadas por cinco semanas a 31°C, después de lo cual se separó el micelio y el filtrado fue concentrado por varios métodos, siendo estos: a) evaporación al vacío a 37°C por medio de un evaporador Flash; b) evaporación en horno a 37°C; c) adición directa de carbonato de calcio y d) liofilización. A todos los antígenos se les determinó el contenido de carbohidratos por el método fenol-ácido sulfúrico (13) y se evaluaron y estandarizaron por medio de inmunodifusión en gel de agar frente a antígenos y antisueros de referencia homólogos provenientes del Centro para el Control de Enfermedades (CDC).

Prueba de Inmunodifusión: el método de microinmunodifusión empleado se basa en el descrito por Palmer et al (14). La prueba se realizó en cajas de petri descartables, utilizando una matriz plástica de 17 patrones con 7 pozos cada uno*, como molde para la colocación de los reactivos en agar fenolizado adicionado de buffer barbital de pH 8.6. El tiempo de incubación fue de 48 horas en una cámara húmeda, después de lo cual se realizó la lectura. Las bandas de precipitación causadas por proteína C reactiva, que no forman líneas de identidad, fueron identificadas por su disolución al agregar citrato de sodio al 5 por ciento durante 45 minutos. Se consideraron positivos todos los casos que dieron una o más bandas de precipitación y negativos aquellos que no dieron ninguna. Todos los sueros fueron examinados frente a los tres antígenos preparados.

Especímenes de suero: los sueros incluidos en este estudio, fueron obtenidos de 69 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar tratada, 8 con tuberculosis pulmonar activa, 14 con tuberculosis y otras enfermedades y 12 pacientes con enfermedades debilitantes diversas (cuadro 1) todos internados en el Sanatorio Antituberculoso San Vicente y de 50 personas aparentemente sanas como grupo control. Todos los sueros fueron conservados congelados previa adición de timerosal a una concentración 1:10,000, hasta que fueron analizados.

Resultados y discusión

Los antígenos fueron preparados según el procedimiento descrito, el cual es sencillo ya que no necesita equipo sofisticado y los medios y sales que se necesitan son de fácil adquisición.

Para la concentración fueron empleados varios métodos siendo a) evaporación al vacío a 37°C por medio de un evaporador Flash; b) evaporación en horno a 37°C; c) adición directa de carbonato de calcio y d) liofilización. Los métodos por los que se obtuvieron mejores resultados fueron los de evaporación al vacío a 37°C y liofilización. Se pudo observar que por medio de evaporación en horno a 37°C los antígenos se contaminan con frecuencia debido a que se realiza en un sistema abierto, además el tiempo necesario para obtener la concentración deseada es prolongado. Sin embargo, este método puede ser utilizado si los antígenos son puestos en una membrana de diálisis, redu-

CUADRO No. 1
DISTRIBUCION DE PACIENTES POR ENFERMEDAD

DIAGNOSTICO	No. Pacientes (o/o)	Casos positivos ID (o/o)
TB pulmonar activa	8 (7.8)	--
TB pulmonar tratada	68 (66)	1 (0.97)
TB y micosis pulm.	1 (0.97)	--
TB y enf. debilitantes	14 (13.6)	1 (0.97)
Micosis pulmonares	1 (0.97)	--
Enf. debilitantes	6 (5.82)	--
Otras	5 (4.85)	--
Total	103 (100)	2 (1.94)

ciendo así el riesgo de contaminación. La adición directa de carbonato de calcio, no proporciona ningún resultado favorable ya que cualitativamente no se detectó ninguna concentración del antígeno. Este paso del procedimiento de preparación del antígeno fue el más difícil de realizar debido a que no se cuenta con concentradores adecuados ni microconcentradores para tamizaje y ésto prolonga el tiempo de preparación.

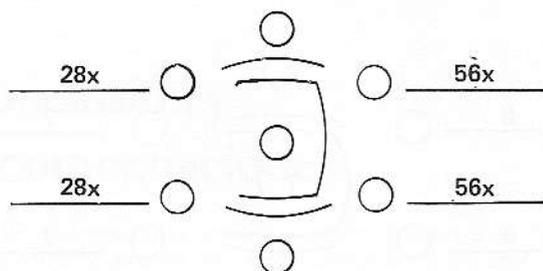
Para obtener bandas de precipitación aceptables fue necesario concentrar el antígeno de *Aspergillus niger* 10577-80, 9 veces (4,750 ug/ml de carbohidratos por el método fenol-ácido sulfúrico); el antígeno de *A. fumigatus* CDC 9020, 7 veces (3,450 ug/ml) y el antígeno de *A. flavus* CDC 56, 56 veces (9,550 ug/ml). Según la referencia empleada, la concentración de carbohidratos de los antígenos debe ajustarse a 1000-1500 ug/ml (12). Sin embargo con estas concentraciones de carbohidratos no se obtuvieron bandas de precipitación, por lo que los antígenos fueron concentrados aún más y en el caso de *A. flavus* se necesitó una concentración de 56 veces (9,550 ug/ml) para obtener una banda de precipitación claramente observable, de lo que se deduce que esta cepa de *A. flavus* no es buena productora de antígeno. La determinación de carbohidratos pone de manifiesto que la concentración de los mismos en el antígeno no es un parámetro que correlacione con la presencia de bandas de precipitación, ya que ninguno de los antígenos preparados tenía la concentración de carbohidratos indicada en el método, cuando se obtuvieron las bandas de precipitación.

Los antígenos de *A. flavus* y *A. niger* fueron evaluados frente a antígenos y antisueros de referencia homólogos provenientes del Centro para el Control de Enfermedades (CDC) (lotes 78-01164X), mostrando una banda de identidad. El antígeno de *A. fumigatus* fue evaluado en el suero de un paciente con diagnóstico comprobado de aspergilosis causada por *A. fumigatus*, obteniendo dos bandas de precipitación, una de ellas de identidad con la del antígeno de referencia del CDC (figura 1).

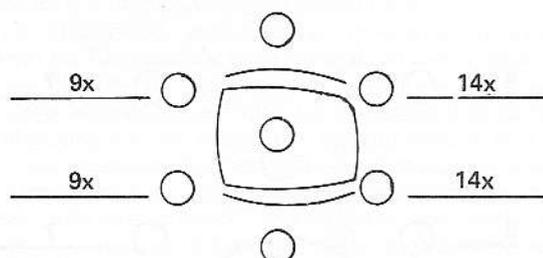
Para la evaluación de los antígenos como prueba serológica de diagnóstico, se escogieron 103 pacientes con diversas afecciones pulmonares (cuadro 1), comprendidos entre las edades de 14 a 83 años, de los cuales 63 eran de sexo masculino y 40 de sexo femenino (cuadro 2). Todos los sueros fueron evaluados en duplicado por el método de inmunodifusión frente a los tres antígenos preparados y también frente a los antígenos de referencia del CDC, encontrando dos casos positivos; uno de ellos en un paciente repartidor de pan, de sexo masculino, de 61 años de edad, originario de Escuintla, que presentaba en el

* L.L. Pellet Co., 1421 Apple Street, Dallas, Texas.

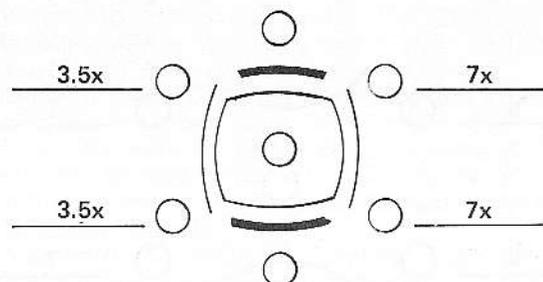
FIGURA No. 1



- a) Inmunodifusión del antígeno de *A. flavus* CDC 56 a diferentes concentraciones (pozos 2,3,5, y 6) y antígeno de referencia 78-01164X (pozos 1 y 4) contra antisuero de referencia 78-01164X (pozo central).



- b) Inmunodifusión del antígeno de *A. niger* 10577-80 a diferentes concentraciones (pozos 2,3,5 y 6) y antígeno de referencia 78-01164X (pozos 1 y 4) contra antisuero de referencia 78-01164X (pozo central)



- c) Inmunodifusión del antígeno de *A. fumigatus* a diferentes concentraciones (pozos 2,3,5 y 6) y antígeno de referencia 78-01164X (pozos 1 y 4) contra suero de un paciente con aspergilosis debida a *A. fumigatus* (pozo central).

diagnóstico radiológico atelectasia del lóbulo superior derecho, bronquiectasia y tuberculosis crónica ulcerada. Al realizarle biopsia de pulmón se observó abundante micelio, cabezas de *A. fumigatus* y necrosis con inflamación aguda y crónica. En la prueba serológica de inmunodifusión se obtuvieron dos bandas de precipitación con el antígeno de *A. fumigatus* y ninguna con los antígenos de *A. flavus* y *A. niger* (figura 2).

El otro caso fue una paciente de sexo femenino, de 48 años de edad, proveniente de la Gomera, Escuintla, dedicada a oficios domésticos. El diagnóstico clínico fue tuberculosis crónica bilateral activa, anemia y carcinoma gástrico. Al realizarle la prueba de inmunodifusión se obtuvo una banda de precipitación con el antígeno de *A. fumigatus* y ninguna con los antígenos de *A. flavus* y *A. niger* (figura 3). El diagnóstico de aspergilosis no fue confirmado por cultivo ni por histología.

Los dos casos positivos fueron encontrados en pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar tratada, que además presentaban otros factores predisponentes tales como edad avanzada y carcinoma gástrico, los cuales aumentan el riesgo de adquirir la aspergilosis, como refieren otros autores, quienes han observado que en un alto porcentaje de casos la aspergilosis pulmonar ocurre secundaria a enfermedades tales como tuberculosis, linfoma y leucemia (5,6,7,8,9,10,11). Además es importante hacer notar que a pesar de que en el grupo etáreo arriba de 60 años sólo habían 10 pacientes, entre ellos se encontró uno de los casos de aspergilosis, confirmando así que el riesgo de adquirir aspergilosis aumenta con la edad (15,16).

La especificidad de los antígenos preparados se evaluó enfrentándolos a sueros de pacientes con otras afecciones fúngicas y de personas aparentemente sanas, no habiendo obtenido ninguna reacción positiva por lo que se concluye que los antígenos preparados son confiables y específicos para el diagnóstico presuntivo de aspergilosis. Sin embargo, sería conveniente buscar cepas que produjeran otras bandas de precipitación para hacer más sensible la prueba detectando así más reacciones antígeno-anticuerpo, o bien, extraer antígenos de por lo menos tres variedades de cada especie para realizar la prueba, ya que se ha informado que existe variabilidad entre los antígenos obtenidos de diferentes cepas de una misma especie.

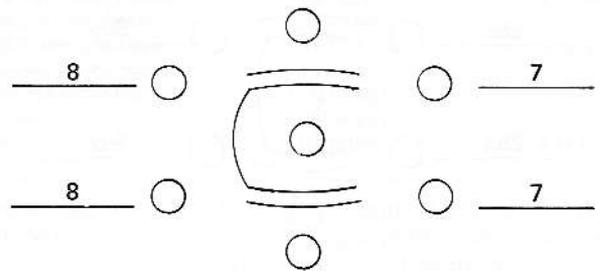
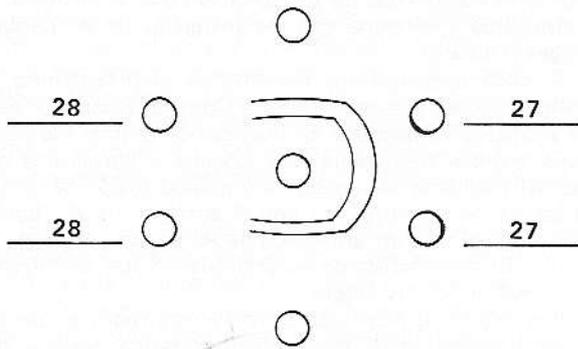
Los costos de producción de los antígenos preparados oscila alrededor de cinco quetzales por mililitro (Q.5.00/ml), que comparado con el precio de los antígenos comerciales, aproximadamente de setenta quetzales por milili-

CUÁDRO No. 2
DISTRIBUCION DE PACIENTES POR EDAD

Edad	No. PACIENTES		Total (o/o)	Positivos ID (o/o)
	Sexo Masc. (o/o)	Sexo Fem. (o/o)		
0 - 20	7 (6.8)	6 (5.82)	13 (12.62)	--
21 - 40	30 (29.13)	19 (18.44)	49 (47.57)	--
41 - 60	18 (17.48)	13 (12.62)	31 (30.1)	1 (0.97)
61 - 80	7 (6.8)	2 (1.94)	9 (8.74)	1 (0.97)
80	1 (0.97)	--	1 (0.97)	--
Total	63 (61.18)	40 (38.82)	103 (100)	2 (1.94)

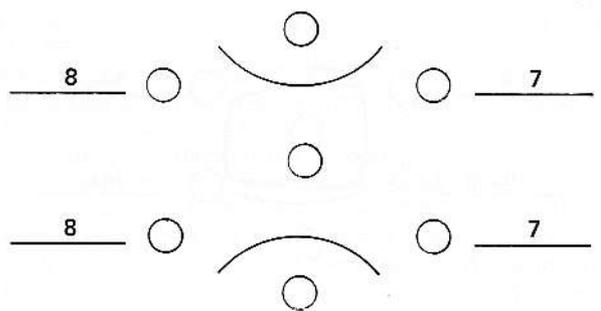
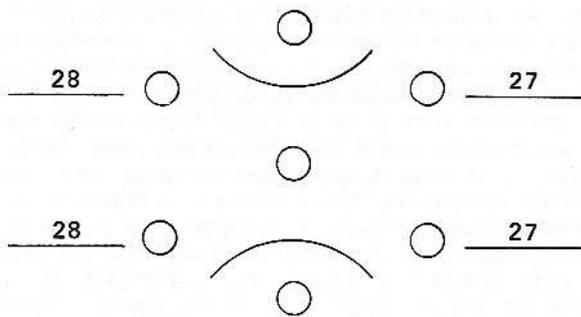
FIGURA No. 2

FIGURA No. 3



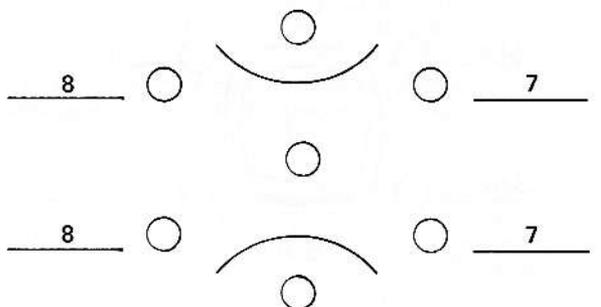
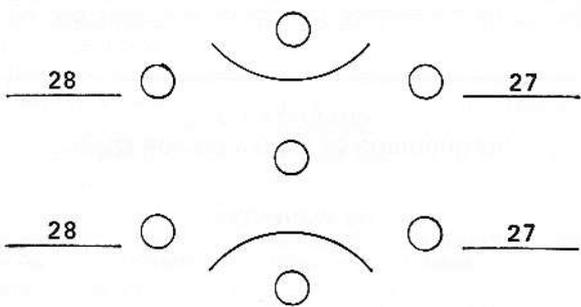
a) Inmunodifusión de suero de paciente positivo (pozos 2 y 3), paciente negativo (pozos 5 y 6) y antisuero de referencia de *A. fumigatus* (pozos 1 y 4) contra antígeno de *A. fumigatus* CDC 9020 (pozo central).

a) Inmunodifusión de suero de paciente positivo (pozos 2 y 3), paciente negativo (pozos 5 y 6) y antisuero de referencia de *A. fumigatus* (pozos 1 y 4) contra antígeno de *A. fumigatus* CDC 9020 (pozo central).



b) Inmunodifusión de sueros 27 y 28 (pozos 2,3,5 y 6) y antisuero de referencia de *A. flavus* 78-01164X (pozos 1 y 4) contra antígeno de *A. flavus* CDC 56 (pozo central).

b) Inmunodifusión de sueros 7 y 8 (pozos 2,3,5 y 6) y antisuero de referencia de *A. flavus* 78-01164X (pozos 1 y 4) contra antígeno de *A. flavus* CDC 56 (pozo central).



c) Inmunodifusión de sueros 27 y 28 (pozos 2,3,5 y 6) y antisuero de referencia de *A. niger* 78-01164X (pozos 1 y 4) contra antígeno de *A. niger* 10577-80 (pozo central).

c) Inmunodifusión de sueros 7 y 8 (pozos 2,3,5 y 6) y antisuero de referencia de *A. niger* 78-01164X (pozos 1 y 4) contra antígeno de *A. niger* 10577-80 (pozo central).

tro (Q.70.00/ml), es bastante bajo. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que el costo estimado no incluye el valor de los antígenos y antisueros de referencia necesarios para la evaluación de los antígenos y se hizo en base al equipo y reactivos disponibles en el laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Conclusión y recomendaciones

En Guatemala es posible preparar antígenos de *Aspergillus* para la prueba de inmunodifusión a un costo bastante bajo comparado con el de los antígenos comerciales.

La cepa de *A. fumigatus* CDC 9020 y *A. niger* 10577 pueden utilizarse para producción de antígeno, no así la de *A. flavus* CDC 56, ya que fue necesario concentrarla mucho para obtener bandas de precipitación aceptables. Es necesario evaluar un mayor número de cepas de cada especie de *Aspergillus* para encontrar las mejores cepas productoras de antígeno, sobre todo cepas de aislamientos recientes y, preparar los antisueros de las tres especies principales de *Aspergillus* para completar los reactivos necesarios para la prueba de inmunodifusión para aspergilosis.

La aspergilosis pulmonar secundaria a tuberculosis sí existe en Guatemala y debe tomarse en cuenta en el diagnóstico diferencial, realizando la prueba de inmunodifusión para aspergilosis a todos los pacientes que padezcan de tuberculosis y no responden favorablemente a la terapia o que presenten lesiones residuales que podrían albergar una micosis oportunista, así como a pacientes que reciben terapia inmunosupresora, tratamiento con antibióticos por largo tiempo o sufran de enfermedades debilitantes.

Cuando se detecten casos de aspergilosis sería conveniente estudiar posibles fuentes de infección para iniciar programas de prevención.

Referencias

1. Connant NF, Smith DT, Baker RD, Callaway JL. Micología Médica. 3 ed. Colchero F. trad. Interamericana. México, 1972. XI + 592 p. (p. 292-310).
2. Hoehne J, Reed C, Dickie H. Aspergillosis bronchopulmonary is not rare. Chest 1973; 63:177-181.
3. Kurup VP, Fink N, Barboriak JJ, Scribner G. The detection of circulating antibodies against antigens from three strains of *Aspergillus fumigatus*. Mykosen 1980;23(7): 368-372.
4. Longbotton JL, Pepys J. Pulmonary aspergillosis: diagnostic and immunological significance of antigens and C substances in *Aspergillus fumigatus*. J Path Bact 1964;88:141-146.
5. Coleman RM, Kaufman L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. Appl Microbiol 1972;23:301-310.
6. Drouhet E, Carney L, Segretain G. Valeur de l'immunoprecipitation et de l'immunofluorescence indirecte dans les aspergilloses bronchopulmonaires. Ann Inst Pasteur 1972;123:379-395.
7. Kim SJ, et al. Characterization of antigens from *Aspergillus fumigatus*. V. Reactivity in immunodiffusion tests with serums from patients with aspergillosis caused by *Aspergillus flavus*, *A. niger* and *A. fumigatus*. Am Rev Res Dis 1980;122:647-650.
8. Negróni R, Robles AM, Galussio JC. Estudio comparativo de las reacciones serológicas cuantitativas con un antígeno metabólico de *Aspergillus fumigatus*. Mycol Appl 1972;48:275-287.
9. Reyes O. Determinación de precipitinas aspergiliares, México: Universidad Autónoma de Puebla (tesis de graduación Facultad de Farmacia) 1970, 32p.
10. Schaefer JC, Yu B, Armstrong D. An *Aspergillus* immunodiffusion test in the early diagnosis of aspergillosis in adult leukemia patients. Am Rev Res Dis 1976; 113:325-329.
11. Yarzabal L, et al. Pruebas de inmunoprecipitación en el diagnóstico de la aspergilosis. Rev. Inst Med Trop Sao Paulo 1973;15(1):1-9.
12. Harrel WK, et al. Procedural Manual for Production of Bacterial, Fungal and Parasitic Reagents. Biological Reagents Section, Center for Disease Control, Atlanta Ga. 1973.
13. Dubois M, et al. The Phenol-Sulfuric acid test for carbohydrates. Analytical Chem 1976; 28:350-356.
14. Palmer D, Cavallaro JJ, Kaufman L, Kaplan W. Serodiagnosis of mycotic diseases. Immunology series No. 8 Procedural Guide. U.S. Department of Health Education and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, Atlanta Ga. 1975.
15. Fraser D, Ward J, Ajello L, Plikaytis B. La aspergilosis y otras micosis sistémicas. JAMA en Centro América 1980; 9:669-675.
16. Osoagbaka OU. *Aspergillus* and *Candida* species isolated from sputa of patients with bronchopulmonary disorders in Nigeria. Mykosen 1980;24(9):547-551.