

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**PRODUCCIÓN DE ASPERGILINAS Y ANTISUEROS Anti- *A. Fumigatus*, anti- *A. flavus* y anti- *A. niger* PARA EL DIAGNOSTICO DE ASPERGILIOSIS PULMONAR**



**PARA OPTAR AL TITULO**

**QUÍMICO BIÓLOGO**

**Guatemala, mayo de 2003**

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
BIBLIOTECA CENTRAL

DL  
06  
T(2131

**JUNTA DIRECTIVA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

|  |            |
|--|------------|
| M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán        | DECANO     |
| Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona | SECRETARIA |
| Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo     | VOCAL I    |
| Lic. Juan Francisco Pérez Sabino           | VOCAL II   |
| Dr. Federico Adolfo Richter Martínez       | VOCAL III  |
| Br. Carlos Enrique Serrano                 | VOCAL IV   |
| Br. Claudia Lucía Roca Berreondo           | VOCAL V    |



## **DEDICO ESTA TESIS**

- A DIOS:** Ser omnipotente que me dio la oportunidad y el privilegio de culminar mis estudios.
- A MIS PADRES:** Por el esfuerzo y apoyo que me brindaron para alcanzar esta meta.
- A MIS HERMANOS  
Y A MI CUÑADA:** Enrique, Cecy, Carlos, Karla y Lisseth por sus consejos y apoyo incondicional.
- A MI FAMILIA  
EN GENERAL:** Por su apoyo y cariño, especialmente a David Dávila Saravia.
- A MIS COMPAÑEROS  
DE PROMOCION:** Por demostrar su amistad en todos los momentos compartidos.
- A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA.**
- A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.**
- A GUATEMALA.**

## AGRADECIMIENTOS

Licda. María Luisa García de López, por su asesoría y orientación; Licda. Heidi Elke Logemann Lima y Lic. Armando Cáceres Estrada por su participación en la revisión, los cuales hicieron posible esta investigación.

Al personal del Departamento de Microbiología, Servicio de Micología, LAMIR y Dirección de Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por su colaboración durante todo el desarrollo de esta tesis.

Al Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas –IIQB- por su financiamiento en la compra de materiales y reactivos.

Al personal del Bioterio, por sus cuidados hacia los modelos experimentales.

Al Sanatorio Antituberculoso San Vicente por permitir realizar este estudio, especialmente a los doctores: Marco Antonio Pérez y Waldemar Castillo; a la Licda. María Eugenia Barahona y a Anabella Muñoz.

A las licenciadas Karla Ozuna, Claudia Martínez, Graciela Cardona de De León, Betsaida Vides, Liliana Acevedo; por su amistad y apoyo.

A las licenciadas Irma López Rodas y Silvia De León, por sus consejos y apoyo incondicional durante la obtención de muestras.

A mis amigos: Rocío Barrios, Dr. Jenner Orozco, Dr. Ervin Marroquín, Dr. Quener Sandoval, Dra. Ana Lucylla Aguilar, Dr. Enrique Urbina, Leticia Gil y Dr. Pablo Santiago; por sus consejos y amistad.

## INDICE

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 1. Resumen                 | 01 |
| 2. Introducción            | 03 |
| 3. Antecedentes            | 05 |
| 4. Justificación           | 23 |
| 5. Objetivos               | 24 |
| 6. Materiales y Métodos    | 25 |
| 7. Resultados              | 34 |
| 8. Discusión de Resultados | 37 |
| 9. Conclusiones            | 40 |
| 10. Recomendaciones        | 41 |
| 11. Referencias            | 42 |
| 12. Anexos                 | 48 |

## 1. RESUMEN

La aspergilosis se ha convertido en los últimos años en una importante micosis oportunista, con una gran variedad de manifestaciones clínicas. En el presente trabajo se prepararon los antígenos y antisueros a partir de cepas de las especies de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* con fin el de utilizarlos en la prueba de inmunodifusión (ID); y posteriormente fueron evaluados con controles del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, mediante la prueba de ID, obteniéndose resultados satisfactorios, con lo que se amplió el diagnóstico serológico en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Para la producción de los antígenos de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*, se cultivaron los hongos en agar y caldo Sabouraud, se incubaron e inactivaron con thimerosal al 1% y luego se realizaron filtraciones para obtener un líquido claro; posteriormente fueron concentrados y dializados con el sistema UHP. Los antígenos obtenidos se inocularon por vía intradérmica a los modelos experimentales. Se realizó un total de cuatro inmunizaciones a cada modelo y se les extrajo aproximadamente 1 cc de sangre para comprobar la reactividad de cada uno de los antisueros con sus respectivos antígenos, con lo que se obtuvo bandas francas de precipitación.

Se realizó una revisión de historias clínicas (266 historias) de pacientes del Sanatorio Antituberculoso San Vicente en forma retrospectiva de un período de dos años, en las que se encontraron únicamente 3 casos (1.1%) sugestivos de aspergilosis pulmonar. Se obtuvieron 20 muestras de sangre de pacientes, las que fueron centrifugadas para obtener el suero.

Los antisueros y antígenos obtenidos fueron utilizados para validar la prueba de ID, los cuales se enfrentaron a los sueros de los pacientes con diagnóstico de tuberculosis y a sueros de pacientes que no respondían al tratamiento y que se encontraban hospitalizados en dicho Sanatorio, utilizando para ello controles positivos del CDC de Atlanta.

El 100% de las muestras analizadas no reaccionaron con los antígenos de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*, por lo que se considera que estos pacientes padecen de cualquier otra enfermedad con síntomas similares a la aspergilosis.

El anterior estudio consistió en la implementación y validación de los antígenos de *Aspergillus* producidos en el Servicio de Micología, por lo que se recomienda ampliar los estudios en grupos como los seleccionados en este trabajo y en otros como por ejemplo en pacientes neutropénicos, con linfomas, en aquellos pacientes que por alguna causa su sistema inmune se encuentra deprimido y un número mayor de pacientes en los que se sospeche tengan infección causada por *Aspergillus* y tuberculosis.

Es importante mencionar que los antígenos de *Aspergillus* deben de producirse continuamente, ya que con el tiempo pierden su potencia.

## 2. INTRODUCCION

El género *Aspergillus* son hongos filamentosos productores de esporas que se encuentran frecuentemente en el ambiente como saprófitos creciendo en material orgánico en descomposición y también en pintura fresca, bolsas para diálisis rotas, medicinas abiertas y descompuestas, paredes de refrigeradores, ropa para cirugía, muestras patológicas contenidas en formol, etc. Las esporas quedan libres y son transportadas por el aire, de modo que los humanos y animales superiores las inhalan de manera casi constante (1-7).

*Aspergillus* es uno de los más importantes patógenos oportunistas causante de enfermedades respiratorias tales como Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica (ABPA), Aspergilosis Invasiva y Aspergiloma. La severidad de cada una de estas enfermedades, depende de la respuesta y condición inmune del hospedero, frecuentemente afecta a pacientes inmunocomprometidos y con problemas alérgicos (5-8). La aspergilosis es una enfermedad fúngica que puede presentarse desde una forma leve con manifestaciones alérgicas hasta una lesión pulmonar severa y progresiva (7). Las manifestaciones clínicas no específicas y las imágenes radiológicas pulmonares de aspergilosis crean problemas diagnósticos. Una combinación de cultivo y una evidencia histológica del agente, proveen la base de un diagnóstico inequívoco. Sin embargo, dicha evidencia no siempre puede ser obtenida y en tales situaciones, los métodos serológicos son útiles e invaluable para el establecimiento de un diagnóstico de aspergilosis (7,14,15).

La demostración de anticuerpos en el suero de pacientes es una técnica útil al clínico para el diagnóstico de las micosis profundas y las oportunistas, entre las cuales se encuentra la aspergilosis, cuya incidencia ha aumentado en los últimos años (1). La técnica más utilizada en la orientación diagnóstica de la aspergilosis es la inmunodifusión (ID), la presencia de líneas de precipitación entre el suero del paciente y los antígenos de *Aspergillus*, indican que debe confirmarse el diagnóstico de un cuadro pulmonar causado por una de las diferentes especies de *Aspergillus* (7,13,16).

Considerando que la producción de aspergilinas en Guatemala es necesaria para ayudar en el diagnóstico diferencial de la aspergilosis pulmonar, se realizó la producción de antígenos de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* y sus respectivos antisueros siguiendo la metodología recomendada por Pérez y Toriello. Además se validó la prueba de ID enfrentando los antígenos producidos de cada hongo, contra sueros de pacientes con antecedentes de tuberculosis o cualquier otra enfermedad que predisponga a la aspergilosis, pacientes que hayan recibido tratamiento con corticosteroides y pacientes con tuberculosis multirresistente que se encontraban en el Sanatorio Antituberculoso San Vicente (1,7).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Aspergilosis

##### 3.1.1. Definición

La aspergilosis es una micosis causada por hongos de género *Aspergillus*. Afecta principalmente a nivel pulmonar, sin embargo también puede ser diseminada, cutánea, ótica, oftálmica y puede causar una reacción de hipersensibilidad (alergia), colonización o invasión. En el paciente inmunocomprometido, especialmente neutropénico, la enfermedad adopta una forma invasiva y diseminada grave (17). La mayoría de veces se adquiere por inhalación ya que el hongo es un contaminante importante del ambiente (2-5,7,8,13). En casos especiales puede adquirirse por traumatismo o por simple contacto con esporas del hongo, como en la otomicosis (13).

El desarrollo de una infección aspergilar verdadera depende de factores internos y externos. El factor externo más importante es la cantidad de esporas inhalada, aunque también la especie de *Aspergillus* involucrada es importante. Las especies involucradas más frecuentemente son: *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. flavus* y *A. terreus* (8-10,13,16).

Los factores internos que pueden debilitar al hospedero y facilitar el inicio de una infección son: a) enfermedades agudas o crónicas (especialmente pulmonares), b) agentes terapéuticos (esteroides, drogas citotóxicas y radiación), c) antibióticos de amplio espectro. Siendo los últimos los más importantes a partir de las últimas décadas (3,5,7,8,10-13).

##### 3.1.2. Etiopatogénesis

Los agentes etiológicos de estas enfermedades son miembros del género *Aspergillus*. Estos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son los hongos más comunes y fastidiosos en el laboratorio (2,3,5,7,8,10-12). El género *Aspergillus* incluye 150 especies y variedades reconocidas, de las cuales sólo un pequeño número son consideradas como patógenas u oportunistas. *A. fumigatus* y *A. flavus* son las especies patógenas más frecuentes de causar aspergilosis pulmonar de la forma típica, severa e invasiva, con eventual diseminación hematógena a otros órganos (7-12, 17). Se han descrito brotes nosocomiales de la enfermedad, relacionados con trabajos de construcción en áreas del hospital o sus alrededores, donde están internados enfermos con neutropenia o receptores de transplantes (17,18). Aunque la neutropenia profunda y



prolongada es el principal factor predisponente, otro factor favorecedor lo constituye el tratamiento con corticoides (17). En un alto porcentaje de casos, la aspergilosis es secundaria a una enfermedad primaria, la cual ha dañado las defensas inmunológicas del paciente (7,14). La forma pulmonar a menudo es una afección superimpuesta sobre tuberculosis, silicosis, una anomalía anatómica, etc (3,5,7,8,10).

### 3.1.3. Etiología

Los principales agentes etiológicos son *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* (7). Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos, de los que sólo 12 se relacionan con enfermedad humana: *A. fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%), *A. niger* (2-3%), *A. terreus* (2-3%), *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus*. La clasificación del género *Aspergillus* se basa en las siguientes características morfológicas del hongo: tamaño de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas, y en la presencia de células de Hülle y de esclerocitos (19).

#### 3.1.3.1. Morfología del género *Aspergillus*:

- **Conidióforo:** Es una hifa erecta, de pared gruesa que se produce en el micelio aéreo en forma perpendicular al sustrato y que suele nacer de la llamada célula pie. Su extremo terminal se dilata constituyendo la vesícula.
- **Vesícula:** Es la parte apical del conidióforo que puede tener forma globosa, elíptica, hemisférica o de maza. Las vesículas pueden ser hialinas o del mismo color del conidióforo. *A. fumigatus* puede presentar vesículas que nacen en el ángulo del eje mayor del conidióforo.
- **Esterigma o fiálides:** Son las estructuras digitiformes productoras de los conidios que se desarrollan en la zona fértil de la vesícula sobre las métulas.
- **Conidios:** Son esporas o propágulos asexuales unicelulares, que se originan en el extremo más estrecho de las fiálides, de color variable que es el que determina el color de la colonia.

- **Cabeza conidial:** Está constituida por los elementos descritos anteriormente y tiene una importancia básica como criterio de identificación y clasificación de *Aspergillus*.
- **Células de Hüle:** *A. nidulans* y *A. flavipes* presentan unas células de paredes gruesas y de forma variable que se producen en las hifas bien terminalmente e intercaladas. Su función no es conocida pero son capaces de germinar por sí solas (20,21).

Las condiciones óptimas de temperatura y humedad para la esporulación máxima de estos hongos se produce probablemente al final del verano y durante el invierno, ya que se ha observado que el número de pacientes en esta época aumenta (22).

En estudios realizados sobre flora fúngica aerovagante, *Aspergillus* se aísla con mayor frecuencia dentro de los domicilios de enfermos asmáticos que en el exterior. Se ha determinado que cada cabeza conidial de *Aspergillus* puede liberar de  $10^3$  esporas y que la concentración de éstas en el aire normal es de 2 - 15 esporas por metro cúbico. Se ha aislado de condimentos como la pimienta negra que puede presentar altas concentraciones de esporas de *A. fumigatus* y *A. flavus*, por lo que Seaton y Robertson recomiendan que los pacientes neutropénicos y asmáticos no tengan contacto con dicho condimento (23).

### 3.1.3.2. Características morfológicas de las especies de *Aspergillus* que causan más frecuentemente aspergilosis

**3.1.3.2.1. *A. fumigatus*:** Este crece rápidamente (2 - 3 días) sobre agar Sabouraud a 25°C, produciendo una colonia blanca, plana que rápidamente se torna gris-verduzca con la producción de conidias. Su textura puede variar de aterciopelada a algodonosa. El reverso de la colonia es generalmente incoloro. El conidióforo es corto, liso y mide más de 300  $\mu$  de largo y de 5 - 8  $\mu$  de diámetro, puede tener una coloración verde o parda, especialmente hacia la parte alta cerca de la vesícula. Los conidióforos se ensanchan gradualmente para formar la vesícula en forma de botella (7).

**3.1.3.2.2. *A. flavus*:** Crece sobre agar Sabouraud a 25°C. Su crecimiento es rápido (6 - 7 cm) o lento (3 - 4 cm) en 10 días. Su textura es aterciopelada, cercana al micelio basal, plana, surcada radialmente o arrugada. Es de color amarillo o amarillo verdusco, el reverso es incoloro y algunas

veces rosáceo, pardo u oscuro. Los conidióforos son de pared gruesa, no pigmentados, largos, midiendo más de 1 mm de largo y 10 - 20  $\mu$  de diámetro en la parte baja de las vesículas.

Las vesículas son globosas o subglobosas, con 10 - 65  $\mu$  de diámetro, y producen esterigmas sobre casi toda su superficie. Los esterigmas pueden estar dispuestos en una o dos series. Los esterigmas primarios miden 10  $\mu$  de largo y los secundarios cerca de 5  $\mu$ . Las conidias son elípticas al principio, pero más tarde, la mayoría son globosas (3.5 - 4.5  $\mu$  de diámetro).

**3.1.3.2.3. *A. niger*:** Crece sobre agar Sabouraud a 25°C, formando una colonia restringida con un diámetro de 2.5 - 3.0 cm en 10 días. El micelio basal es compacto y varía de color blanco a amarillo, pronto produce abundantes estructuras conidiales de color negro. Los conidióforos miden de 1.5 - 3.0 mm por 15 - 20  $\mu$ , es liso e incoloro volviéndose oscuro alrededor de la vesícula. La vesícula es globosa, mide cerca de 60  $\mu$  de diámetro y produce esterigmas sobre toda la superficie. Los esterigmas están dispuestos en dos series. Los primarios son grandes (30  $\mu$  o más por 6  $\mu$ ), de color pardo y pueden ser septados y los secundarios son cortos (8  $\mu$  por 3  $\mu$ ). Las conidias son globosas, miden de 4 - 5  $\mu$  de diámetro, de color café a negro y muy ásperas (7,13,19).

**3.1.3.2.4. *A. terreus*:** Crece sobre agar Sabouraud a 25°C, formando un micelio aterciopelado de color canela, el reverso es de color blanco a marrón. Los conidióforos son cortos (< 250  $\mu$ ) y lisos. Las fiálides son biseriadas agrupándose en forma tubular, algunas veces aparecen células hialinas redondas en el micelio sumergido en el agar (19).

**3.1.3.2.5. *A. versicolor*:** Crece sobre agar Sabouraud a 25°C, formando un micelio aterciopelado, el reverso del cultivo es de color blanco que cambia a amarillo, naranja, marrón-rojizo, verde o rosa. Los conidióforos son largos y lisos. Las fiálides son biseriadas y vagamente radiadas cubriendo la mayoría de las vesículas; microscópicamente, en ocasiones se visualizan células de Hülle (19).

#### 3.1.4. Historia

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por P. A. Micheli, quien comprobó que la cabeza conidial de este hongo se parecía a un "aspergillum" (instrumento utilizado para dispersar agua bendita). *Aspergillus* es un hongo filamentoso hialino ubicuo, productor de enfermedades de distribución universal que ocasionalmente pueden aparecer en forma de brotes hospitalarios tras obras de remodelación (19).

Las primeras comunicaciones de probable aspergilosis fueron aquellas de Meyer en 1815, quien describió una enfermedad fúngica en un pájaro. Un año más tarde Jäger observó una condición similar en los pulmones de dos cisnes. La primera referencia de una infección humana es atribuida a Bennett en 1844. Kuchenmeister en 1855 informó casos similares, pero el primer caso humano en el cual un *Aspergillus* fue definitivamente identificado fue descrito por Sluyter en 1847; se trataba de una mujer agonizante con una infección pulmonar inespecífica. Virchow en 1856 describió cuatro casos de aspergilosis pulmonar en pacientes agonizantes con otras condiciones y el mismo año Friedreich informó el crecimiento del hongo en cavernas tuberculosas (7).

Los estudios más recientes revelan que la aspergilosis se ha incrementado sobre todo en pacientes con enfermedades malignas, especialmente leucemia y linfoma; y en pacientes que están recibiendo terapia inmunosupresora para una amplia gama de enfermedades (7,14).

### **3.1.5. Manifestaciones clínicas**

Las infecciones producidas por *Aspergillus* se pueden clasificar en primarias y secundarias independientemente de la existencia de enfermedades o condiciones predisponentes:

**3.1.5.1. Primaria:** clínicamente presenta fiebre, tos, expectoración mucopurulenta, hemoptisis y dolor torácico. La infección puede estar localizada dando lugar a una bronquitis aspergilar; la lesión puede conformar un aspergiloma primitivo localizado en una cavidad bronquial que se dilata a causa de la masa aspergilar, su ubicación corresponde frecuentemente al segmento apical de los lóbulos superiores.

La hipersensibilidad aparece como consecuencia de una reactividad exagerada contra antígenos aspergilaes y puede observarse rinitis alérgica, asma y aspergilosis broncopulmonar alérgica.

**3.1.5.2. Secundaria:** los aspergilomas secundarios tienen como área una cavidad aérea preexistente: una cavidad tuberculosa residual, una bronquiectasia, un quiste broncogénico y está constituido por la masa o esfera aspergilar (8,16). Mientras el hongo se mantiene vivo las manifestaciones clínicas son nulas, no hay signos de infección pulmonar, puede aparecer una hemorragia en la cavidad, manifestándose una hemoptisis única o repetirse con los movimientos del coma micótico contra las paredes de la cavidad que lo contiene.

Cuando el hongo muere la cavidad aspergilar se comporta como un secuestro con fenómenos de obstrucción e irritación de las paredes de la cavidad provocándose más frecuentemente hemoptisis y supuraciones broncopulmonares. Radiológicamente la aspergilosis primaria puede manifestarse como condensaciones homogéneas que pueden evolucionar hasta la formación de abscesos y cavitación o reabsorción del proceso. Los aspergilomas primarios se presentan como una masa sólida redondeada, homogénea en el interior de una cavidad esférica u ovalada y separada de las paredes por un espacio aéreo en media luna característico de esta patología. Los aspergilomas secundarios se observan especialmente en los lóbulos superiores como imágenes esféricas dentro de las antiguas cavernas o úlceras tuberculosas residuales, el aspergiloma puede moverse con los cambios de posición del paciente lo cual se pone de manifiesto mediante tomografías; pueden presentar calcificaciones, los diámetros de estas imágenes densas varían de 10 – 50 mm y más, debe hacerse diagnóstico diferencial con carcinoma broncogénico, quiste hidatídico, etc (16).

Tal como otros hongos dematiáceos, el *Aspergillus* se manifiesta frecuentemente como abscesos cerebrales, con infartos y formaciones granulomatosas. Comúnmente invade las paredes vasculares, produciendo trombosis y necrosis hemorrágicas subaracnoideas, o bien hemorragias masivas intraparenquimatosas. Siendo un hongo de tipo oportunista, casi siempre se le consigue en estados inmunitarios deficientes. *Aspergillus* es un patógeno poco común en pacientes con SIDA, siendo aún más infrecuente la forma pulmonar invasiva. Por tal motivo el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), que inicialmente había incluido la aspergilosis entre las patologías marcadoras del estadio SIDA, posteriormente la retiró. La explicación pudiera ser que la inmunidad celular juega un papel menor para el *Aspergillus* con respecto a otros hongos, esta situación ha hecho que en 1988 se retirara la aspergilosis de la lista de micosis típicas en los pacientes con SIDA (16,17,21).

### 3.1.6. Tipos clínicos

La aspergilosis no es una sola entidad clínica, sino un grupo de micosis diferentes causadas por hongos del mismo género (7). Es esencial reconocer que *Aspergillus* puede ser un colonizador, causar enfermedad alérgica, infección local o ser responsable de cuadros invasivos de gran gravedad. Es labor del microbiólogo obtener la información clínica necesaria para poder diferenciar estas situaciones (7,19).

**3.1.6.1. Aspergilosis pulmonar.** Este tipo de aspergilosis se subdivide en:

**3.1.6.1.1. Aspergilosis alérgica:** Ocurre en pacientes sensibles como una respuesta a la inhalación de los conidios de *Aspergillus*. Puede afectar a nivel del tracto respiratorio superior causando una rinitis, puede desencadenarse una alveolitis o desarrollarse un proceso asmático (13). El asma o alergia asmática a esporas de varias especies de *Aspergillus* es bien conocida.

Se presenta con mayor frecuencia en agricultores y en personas que trabajan en silos o molino de granos (13,24). Las esporas rara vez germinan en los conductos bronquiales. En radiografías se pueden observar sombras segmentales, frecuentemente en el lóbulo superior se pueden encontrar infiltrados característicos, como reacción inmediata y una fibrosis en la enfermedad crónica.

Puede producir fiebres intermitentes, tos, silbidos, escalofríos, dolor y fatiga (7,13). En la expectoración se puede observar eosinofilia. El estudio de la función pulmonar demuestra un defecto restringido a un debilitamiento de cambio gaseoso. Se pueden presentar anticuerpos del tipo de reagentes (IgE) (19,24).

**3.1.6.1.2 Aspergilosis colonizante (aspergiloma):** Es la colonización de cavidades preformadas a causa de otros padecimientos previos como tuberculosis o histoplasmosis, o puede originarse después de una aspergilosis alérgica crónica (7,8,13,24). Cuando el agente llega al alveolo sano, es eliminado por los macrófagos alveolares. Pero si se introducen en cavidades preformadas, epitelizadas donde no hay macrófagos, puede desarrollarse una masa miceliar (17). Los pulmones son los más afectados, sin embargo, otras cavidades como senos paranasales y vejiga eventualmente pueden verse invadidos, e iniciarse la formación de una bola fúngica o aspergiloma. La sintomatología más importante es fiebre, tos, disnea, dolor torácico y principalmente hemoptisis. Estos pacientes tienen anticuerpos reagentes transferibles (IgE) y precipitinas (IgG), fácilmente demostrables además de hipersensibilidad tardía a antígenos de *Aspergillus* (13,19,24).

En inmunocompetentes el aspergiloma se observa en 10 a 15% de pacientes con enfermedad cavitaria. Aunque usualmente no ocasiona síntomas, más de 25% de los casos tienen hemoptisis masiva. Usualmente permanece estable por largo tiempo, aunque pueden sufrir un crecimiento lento o una resolución espontánea (17).

El diagnóstico es fundamentalmente radiológico, a partir de la visualización de cavidades con una masa opaca rodeada de aire que se mueve cuando el paciente cambia de postura (13,19).

**3.1.6.1.3 Aspergilosis invasiva:** En los últimos años la incidencia de aspergilomas ha disminuido, mientras que la aspergilosis pulmonar invasiva (API) ha ido en aumento. En pacientes con leucemia, la incidencia de API oscila entre el 5-24%, y en transplantados de órgano sólido entre el 1-10%. Los factores de riesgo más importantes son la neutropenia, el tratamiento con drogas citotóxicas y corticosteroides, la enfermedad de injerto contra huésped en los trasplantes de médula ósea, el rechazo agudo y la enfermedad por Citomegalovirus (CMV) en los transplantados de órgano sólido y el SIDA avanzado (13,19,24,25).

Las manifestaciones clínicas suelen comenzar con la aparición de fiebre, seguida a los pocos días de síntomas respiratorios como dolor torácico, tos, taquipnea o hemoptisis. La infección puede diseminarse por vía hematógena, ocurre invasión del tejido pulmonar y puede originarse trombosis de los vasos y necrosis localizada (13,24).

La prueba de inmunodifusión en gel es la más utilizada para el diagnóstico de esta enfermedad. Si la aspergilosis invasiva es crónica, pueden detectarse pocas líneas de precipitación. Sin embargo, en el caso agudo, fulminante de la aspergilosis invasiva, con defectos en el sistema inmune en el cual no se producen anticuerpos, la prueba de ID es muchas veces negativa (24).

**3.1.6.1.3.1. Aspergilosis pulmonar necrosante crónica o forma semiinvasiva:** Suele afectar a ancianos con enfermedades pulmonares previas como tuberculosis, EPOC, bronquiectasis, sarcoidosis, etc. Tiene una evolución lenta (meses o años), la cual da tiempo a la formación de anticuerpos específicos, detectables por medio de ID cuya presencia apoya el diagnóstico. Aunque no suele haber complicaciones, pueden producirse neumotórax, aspergilomas o, incluso, aspergilosis pulmonar invasiva (17,19,26-28).

**3.1.6.1.3.2. Aspergilosis invasiva aguda del pulmón:** Es una complicación grave de cierto grupo de pacientes inmunodeprimidos, a menudo fatal aunque su diagnóstico sea hecho en vida y el enfermo sea tratado. El factor de riesgo más importante para esta forma de enfermedad es la granulocitopenia severa y prolongada, lo que se observa especialmente en pacientes sometidos a tratamiento intensivo de leucemia aguda y en receptores de trasplantes. La enfermedad es rápidamente progresiva. La hemoptisis es poco frecuente. Es habitual la diseminación hematógena a órganos distantes. Las alteraciones radiológicas son variables e inespecíficas: infiltrado nodular

que no remite con el tratamiento antibacteriano convencional, consolidación lobar, diseminación nodular, bronconeumonía, cavidades por necrosis. Un hecho característico de las consolidaciones parenquimatosas es la tendencia a cavitarse al recuperarse el número de neutrófilos (17,26).

#### **3.1.6.2. Aspergilosis diseminada**

Es una afección bastante rara, pero se desarrolla en pacientes tratados con esteroides, pacientes transplantados y tratamiento citotóxico (13,24).

La mayoría de veces se origina por rompimiento de émbolos sépticos (conteniendo al hongo) y la distribución de los mismos a diferentes partes del cuerpo, pudiendo localizarse en cerebro, corazón, hígado, riñón, tiroides, rara vez en huesos y sistema gastrointestinal. La sintomatología va a depender del sistema afectado (13).

En raras ocasiones se presenta en forma iatrogénica, posteriores a las aplicaciones intravenosas de diversas sustancias, cuando se utiliza para ello jeringas contaminadas (24).

#### **3.1.6.3. Aspergilosis naso orbital**

En este cuadro el hongo se desarrolla en los senos paranasales y puede alcanzar la órbita del ojo y otras cavidades. Es un cuadro clínico frecuente en Sudán, probablemente debido a la inhalación masiva de conidios. Desde el punto de vista clínico, provoca edema unilateral y proptosis (24).

#### **3.1.6.4. Aspergilosis iatrogénica**

Clínicamente se comporta como una aspergilosis diseminada, y la sintomatología dependerá del órgano u órganos afectados. El agente etiológico penetra a través de catéteres, cánulas, sondas y la aplicación de medicamentos por vía intravenosa o intratecal. En general el pronóstico no es favorable (24).

#### **3.1.6.5. Aspergilosis ótica**

En esta forma clínica, el hongo crece formando una colonia plana sobre el conducto auditivo externo. El padecimiento es asintomático, sin embargo en ocasiones se presenta hipoacusia, prurito, secreción y dolor discretos. Se observa principalmente en los servicios de



otorrinolaringología y en muchas ocasiones es una infección asociada a otros procesos óticos que deben eliminarse antes de llevar a cabo el tratamiento de la enfermedad primaria (7,17,24,29).

### 3.1.7. Diagnóstico de laboratorio

Los hongos del género *Aspergillus* son frecuentemente observados y cultivados de una amplia variedad de materiales clínicos. En ausencia de material histológico, el diagnóstico de aspergilosis es difícil de establecer. Si en un cultivo de esputo se aísla *A. fumigatus*, debe tenerse gran precaución en considerarlo agente etiológico de la enfermedad (7).

Nelesnick y colaboradores en 1980 establecieron que el aislamiento de *A. fumigatus* y *A. flavus* de secreciones respiratorias no representan usualmente contaminación de laboratorio y debería ser interpretado a la luz de predisposiciones conocidas para aspergilosis. En algunas situaciones, por ejemplo en pacientes granulocitopénicos con leucemia aguda, hasta un solo aislamiento tiene una alta probabilidad de aspergilosis invasiva (30).

Como los *Aspergillus* son frecuentes contaminantes ambientales, el diagnóstico de aspergilosis exige demostrar elementos micóticos en los tejidos afectados. En pacientes neutropénicos sometidos a quimioterapia, el área comprometida por neumonía causada por aspergilosis puede necrosarse con rapidez y producir material necrótico que contiene una cavidad de pared delgada e hifas (31).

#### 3.1.7.1. Histopatología

Aunque los datos clínicos y radiológicos son de gran ayuda, como hemos visto, el diagnóstico de aspergilosis debe ser establecido mediante la combinación de datos histológicos (visualización de hifas compatibles con las de *Aspergillus*) y microbiológicos (visualización de hifas en el examen en fresco y aislamiento de *Aspergillus* en cultivo), dado que ninguno de ellos puede, por sí solo asegurar el diagnóstico (13,19,24). Ver Anexo 2

La pieza de biopsia obtenida se divide en dos fragmentos, una parte se emplea para realizar un cultivo y la otra se fija para cortes histopatológicos, los cuales pueden ser teñidos con hematoxilina-eosina, PAS o Grocott. En caso de aspergilosis invasiva se observan filamentos septados, dicotomizados en ángulos de 45°, de trayectos tortuosos y que en ocasiones invaden el interior de los vasos sanguíneos (19,24). Anexo 3

En el caso de un aspergiloma se encuentran conglomerados de filamentos dispuestos de manera paralela, dicotomizados, septados y con frecuencia se observan cabezas aspergiliares (24).

Las tinciones histológicas más utilizadas son la tinción de metenamina de plata y la de hematoxilina-eosina, aunque esta última no es útil cuando los tejidos están necrosados (7,19,25,31).

La visualización en histología debe ser confirmada con el aislamiento en cultivo, ya que las hifas de *Aspergillus* son indistinguibles de las de *Pseudallescheria boydii* o *Fusarium* sp. *Aspergillus* crece bien en casi todos los medios de cultivo tanto para bacterias como para hongos, aunque muchas especies son sensibles a la cicloheximida, por lo que debe de evitarse su uso. La temperatura óptima de crecimiento es a 37°C pudiendo ser visibles los micelios a las 48 horas de incubación (19).

En ocasiones no es posible obtener una biopsia y el diagnóstico debe basarse solamente en los datos microbiológicos y en las manifestaciones clínicas (19,24).

#### **3.1.7.2. Examen directo**

Se realiza a partir de la muestra de esputo. La visualización de hifas sugestivas de *Aspergillus* (hifas hialinas septadas de unos 2  $\mu$ m de diámetro con ramificaciones dicotómicas en ángulos de 45°) en el examen directo de la muestra suele ser un dato con un alto valor predictivo de enfermedad en el contexto clínico adecuado (19). Algunos autores han demostrado recientemente que la centrifugación de la muestra y el examen en fresco del sedimento incrementa de forma importante la utilidad de este procedimiento. La visualización directa se realiza con KOH al 10%, con o sin componentes fluorescentes, en el que se detectan los fragmentos miceliales bifurcados o las cabezas aspergiliares características del género (13,19,24). Anexos 2 y 3.

El examen en fresco para hongos de muestras procedentes de pacientes inmunodeprimidos debe ser realizado con rapidez y atención y por un experto, dado que la información que de él emane puede ser de trascendencia vital para el paciente. Por otra parte, es importante recordar que con frecuencia las muestras se han obtenido mediante técnicas agresivas para el paciente (fibrobronoscopías, biopsias, punciones, etc.) por lo que son difíciles de reemplazar (19).

#### **3.1.7.3. Cultivo**

Todos los productos biológicos pueden ser cultivados; los medios de cultivo empleados son Sabouraud simple, Sabouraud adicionado con cloranfenicol y el medio Czapeck. Los cultivos se

mantienen unos a 25°C y otros a 37°C. Como los hongos del género *Aspergillus* sp, se aíslan con facilidad del ambiente, se debe ser cuidadoso al emitir un diagnóstico de aspergilosis (24).

En un estudio reciente realizado por Horvath y Dummer se comprobó que el valor predictivo positivo del cultivo de *Aspergillus* oscilaba entre 82% de los transplantados de médula ósea y el 14% en los pacientes seropositivos para el VIH. El aislamiento de numerosas colonias de *Aspergillus*, o hacerlo repetidamente, apoya la significación clínica de un resultado microbiológico (19,32).

#### 3.1.7.4. Pruebas inmunológicas

Las pruebas inmunológicas de detección de anticuerpos constituyen un método diagnóstico de gran utilidad en los aspergilomas, ya que aproximadamente el 90% de los pacientes poseen anticuerpos detectables (19,24). La técnica más utilizada es la inmunodifusión (ID), aunque se han desarrollado otras con mayor sensibilidad, como el inmunoensayo enzimático (ELISA, BALISA), radioinmunoensayo y métodos de inmunofluorescencia indirecta. A diferencia de lo que ocurre con el aspergiloma, estas técnicas no son útiles en el diagnóstico de aspergilosis pulmonar invasiva. Se están estudiando diversos métodos de detección de antígenos, como el galactomanano, o de sus metabolitos, como el d-manitol, tanto en suero como en orina u otros líquidos corporales (19,33,34). Las técnicas habitualmente utilizadas son el inmunoensayo enzimático, el inmunoblotting y el radioinmunoensayo. En un estudio realizado en el año 1993 en el Centro Hospitalario de la Universidad Vaudois, Lausanne de Suiza, se detectó la elastasa IgG anti-*A. fumigatus* en el suero de pacientes con aspergilosis, por medio de Western blot (35). Aunque estos métodos tienen una gran especificidad, su sensibilidad no es muy alta, por el rápido aclaramiento de los antígenos del suero, que hace necesario un seguimiento prospectivo y seriado de los pacientes. En la actualidad aún no forman parte del conjunto de técnicas diagnósticas habitual en dicho centro hospitalario (19).

El desarrollo de técnicas de biología molecular o de detección antigénica puede dar lugar a métodos muy sensibles y rápidos que favorezcan el pronóstico de las aspergilosis más graves. Recientemente se ha desarrollado un ensayo por medio del método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de aspergilosis invasiva en pacientes inmunocomprometidos. Este ensayo amplifica una región de ADN ribosomal muy específica de

*A. fumigatus* cuyos resultados preliminares son muy alentadores por su elevada sensibilidad y especificidad (19,36-39). La literatura sobre pruebas serológicas para micosis sistémicas es muy extensa, pero no se pueden hacer muchas generalidades útiles clínicamente. Bennett atribuyó este factor a la amplia variabilidad de pruebas y reactivos y al pequeño número de pacientes disponibles a un investigador (4). La falta de pruebas serológicas estandarizadas para micosis sistémicas ha hecho difícil la interpretación de resultados. Esta variabilidad también limita la utilidad de generalidades acerca de la sensibilidad y especificidad de los métodos (7).

#### **3.1.7.4.1. Inmunofluorescencia Indirecta**

Utilizada para el diagnóstico de aspergiloma, al igual que la anterior es poco útil para el diagnóstico de aspergilosis invasiva (24).

#### **3.1.7.4.2. Radioinmunoensayo en fase sólida**

Con esta prueba se detectan y cuantifican antígenos circulantes; motivo por el cual es muy útil para los casos de aspergilosis invasiva o sistémica. El índice de positividad es superior al 80%.

#### **3.1.7.4.3. Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA)**

A través de esta prueba se pueden poner de manifiesto tanto los antígenos como los anticuerpos. Por lo que se emplea para diagnosticar cualquier tipo de aspergilosis pulmonar; a pesar de esta característica no se emplea de rutina en los laboratorios (24).

#### **3.1.8. Obtención de antígenos**

Muchos autores han propuesto diferentes métodos de preparación de antígenos de *Aspergillus* para ser usados en la demostración de anticuerpos homólogos en sueros de pacientes. Los antígenos utilizados en estas pruebas varían ampliamente, desde filtrados de cultivo (metabólicos) hasta preparaciones miceliales (somáticas o citoplásmicas) obtenido por ruptura de crecimiento joven (1,7).

En un estudio realizado en 1989 por Pérez y Toriello, el antígeno metabólico se obtuvo a partir del filtrado de cultivo según Mishra y cols (1982). Para obtener el antígeno de *Aspergillus*, se utilizó el medio de Smith con asparagina; éste se mantuvo a 30°C y en agitación. El tiempo óptimo de incubación para la obtención de mejor antígeno fue de 15 días. La masa micelial se



separó por filtración utilizando papel filtro Whatman No. 40 y luego se procedió a diferentes filtraciones con membranas Millipore (8.0, 0.8 y 0.45  $\mu\text{m}$ ). Después se dializó el filtrado y se concentró 10 veces por medio de ultrafiltración con equipo Amicon, utilizando membrana PM 10 (Amicon). Resultados de diversos investigadores coinciden en la obtención de buenos antígenos con menor tiempo de incubación; pero se debe tomar en cuenta que en los cultivos de más de tres semanas de incubación, *Aspergillus* produce carbohidrato C, el cual reacciona con la proteína C reactiva presente en el suero humano (1).

Se han descrito diversos trabajos sobre la obtención de antígenos de *Aspergillus* (Hearn y Mackenzie, 1981; Hearn et al., 1986; Kim y Chaparas. 1978; Kim et al., 1979; Kurup et al., 1979; Kurup et al., 1984). Sin embargo, las diferentes cepas y metodologías empleadas hacen muy difícil una comparación entre los antígenos. Por otro lado, a pesar de que *A. fumigatus* es el principal agente etiológico de la aspergilosis humana, también existen otras especies causales, como lo son, *A. niger* y *A. flavus*. Es por esto que diferentes casos de aspergilosis no podrían ser diagnosticados si las pruebas serológicas se realizaran solamente con antígenos de una sola especie (1,40).

Entre los métodos utilizados para la preparación de antígeno se pueden mencionar los siguientes: crecimiento por 4 a 6 semanas en un medio líquido que posteriormente se usa como fuente de antígeno, una variante de este es la adición de tolueno al cultivo joven causando autólisis en dos o tres días. Otro método es la destrucción mecánica de micelio joven de aproximadamente 3 días, al final de la fase logarítmica de crecimiento (7).

En 1972 Negroni y colaboradores informaron sobre un antígeno de fácil preparación, estable, específico, sensible y útil en muchas técnicas serológicas. El antígeno es preparado de acuerdo a una técnica modificada, descrita originalmente por Ajello y colaboradores en 1959. Se inocula una suspensión densa de esporas en un medio líquido dializado y se incuba con agitación continua a 37°C durante 4 semanas, luego el micelio se separa mediante filtración y el filtrado es concentrado por evaporación (7).

Coleman y Kaufman en 1972; describieron otro método para la preparación de antígenos de *Aspergillus*, el cual ha mostrado una alta especificidad y sensibilidad para la detección de anticuerpos homólogos en sueros de pacientes. El antígeno es obtenido de cultivos en caldo Sabouraud dextrosa, los que son incubados a 31°C por cinco semanas; luego de separado el micelio el filtrado es concentrado ocho veces (7,40).

Varios autores han hecho énfasis en que la preparación antigénica de una sola cepa de *A. fumigatus* no es suficiente para detectar anticuerpos circulantes específicos en los sueros de todos los pacientes. Biguet y colaboradores han demostrado gran número de antígenos de *A. fumigatus*, estableciendo que los conejos inmunizados intensamente con estos hongos producen más de 16 precipitinas. Por lo cual se puede deducir que deberían esperarse muchas reacciones serológicas cruzadas entre las diferentes especies del género *Aspergillus* (7).

### 3.1.9. Obtención de antisueros

La capacidad para formar anticuerpos depende de la naturaleza del antígeno, dosis, modo de administración y la constitución del hospedero. La administración de antígeno en un individuo previamente inoculado le sigue tres o cuatro fases. Primero, existe un período latente durante el cual los anticuerpos no se producen o no aumentan en la circulación sanguínea. Esto es seguido por un aumento agudo en el título hasta un valor máximo; después disminuye gradualmente hasta un valor estable, donde los anticuerpos pueden ser demostrados en la sangre por meses o años; esta respuesta se denomina *respuesta primaria*.

Una segunda estimulación por el mismo antígeno, después de un lapso más o menos prolongado, dará como resultado un aumento más rápido en el título que la primera inoculación, el pico máximo obtenido será mayor y los anticuerpos persistirán por un período mayor de tiempo. Esta se denomina *respuesta secundaria*.

Las inoculaciones de refuerzo se hacen con el fin de estimular en el hospedero la típica respuesta secundaria de producción de anticuerpos. Estas reinmunizaciones son administradas cuando la concentración de anticuerpos ha disminuido por debajo de los niveles protectores. Las inoculaciones de refuerzo originan título de anticuerpos que siguen las características generales de las respuestas secundarias (41).

Recientemente se probó un método de inoculación en conejos, por vía intradérmica para la producción de antisueros fúngicos contra *A. fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Coccidioides immitis*, con el fin de ser utilizados como sueros control positivos para pruebas de inmunodifusión en gel de agarosa. Los antígenos se prepararon por los métodos descritos por el Centro de Control de Enfermedades (CDC), según la técnica descrita por Camargo y colaboradores. Todos los conejos produjeron anticuerpos contra los diferentes antígenos específicos en el momento en que se alcanzaron los picos de respuesta

primaria y luego de cada refuerzo. La respuesta secundaria fue igual o menor que la primaria, aunque se mantuvo la calidad y cantidad de bandas de precipitación específicas detectadas por ID (42).

Tomando en cuenta que *A. fumigatus* es la especie responsable de la mayoría de los casos de aspergilosis que se presentan en el mundo entero, (43-45); en el laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", se realizaba el diagnóstico de esta enfermedad utilizando antígenos de esta especie (43,46), sin embargo, *A. niger*, *A. flavus* y *A. terreus* desempeñan también un papel importante en la causa de la aspergilosis. Para ampliar las posibilidades diagnósticas del laboratorio, completaron el sistema de diagnóstico serológico de esta micosis mediante la elaboración de antígenos metabólicos de estas tres especies con sus respectivos antisueros para ser utilizados en el montaje de técnicas de inmunoprecipitación (43).

En el presente trabajo se utilizará la técnica de producción de antígenos metabólicos de las tres especies de *Aspergillus* con sus respectivos antisueros y posterior inoculación a conejas vírgenes de Nueva Zelanda con un peso aproximado de 5 – 6 libras. Para la inmunización se utilizará antígeno metabólico y adyuvante completo de Freund administrado por vía intradérmica, técnica descrita por Pérez-Toriello (1,7).

### **3.1.9.1. Prueba de Inmunodifusión (ID)**

- **Principio de la Prueba:**

La técnica de ID es una de las formas utilizadas para la determinación de la relación entre las concentraciones de antígeno y anticuerpo, mediante una reacción de formación del complejo antígeno-anticuerpo, dándose una precipitación en el lugar de equivalencia (lugar en el que se encuentran en iguales concentraciones el antígeno y el anticuerpo) y disminuye en la zona de exceso del antígeno o del anticuerpo, la formación de la línea de precipitación depende de la concentración relativa del antígeno y del anticuerpo (47).

- **Factores que afectan la ID:**

La formación del complejo depende de la concentración de los electrolitos de amortiguación, concentración del gel, el pH, la temperatura y la obtención del efecto prozona (47).



### 3.1.9.2. Interpretación de la prueba de ID para aspergilosis:

La prueba de ID es la más ampliamente utilizada por ser sencilla y rápida, además de no necesitar equipo especial para llevarla a cabo. Esta ha demostrado ser de gran ayuda en el diagnóstico de laboratorio de aspergilosis. La presencia de anticuerpos precipitantes, relacionados al número de bandas o título, indican infección, colonización o alergia debido a una especie de *Aspergillus*. También es útil en el seguimiento de la enfermedad, ya que se ha notado disminución en el número de bandas de precipitinas y cambios significativos en el título como una respuesta de los pacientes a la terapia (7,14).

En la prueba de ID se puede detectar la presencia de bandas. En el caso de aspergilosis alérgica pueden presentarse de 1 a 3 bandas, en aspergilosis por colonización (aspergiloma) pueden presentarse hasta 16 bandas y en aspergilosis invasiva el número es irregular (13,16,24). Sin embargo, en el caso agudo fulminante en el cual no se producen anticuerpos, la prueba de ID es muchas veces negativa (24).

También puede utilizarse la demostración de antígeno circulante en suero o líquido cefalorraquídeo. Es muy importante utilizar tanto antígeno como antisuero de diferentes especies de *Aspergillus* ya que son varios los causantes de esta patología. La interpretación debe hacerse con cuidado, ya que tomando en cuenta que *Aspergillus* es un hongo común en el ambiente, es posible que se presenten reacciones positivas en las diferentes pruebas serológicas, por lo que es muy importante relacionar estos hallazgos con las características clínicas del paciente (13,19,24,31).

### 3.1.10. Tratamiento

El tratamiento de la aspergilosis puede ser variable dependiendo del tipo clínico que se presente. Sin embargo, si es una forma alérgica, se recomienda el uso de antihistamínicos y glucocorticoides como prednisona, con dosis de 25 mg/día por vía oral durante una semana. En las otras formas puede utilizarse el ketoconazol, 200 a 400 mg/día y el itraconazol 200 a 300 mg/día. El tiempo de tratamiento va a depender del cuadro clínico y de la severidad de éste (13,24,48).

La droga más utilizada es la anfotericina B, asociada con 5-fluorocitosina. También se han utilizado los imidazoles como el ketoconazol, itraconazol, sin embargo, en combinación con la anfotericina B resultan antagónicos (24).



La anfotericina B intravenosa, a dosis de 0.7 - 1.5 mg/Kg/día , ha sido tradicionalmente el tratamiento de elección para pacientes con aspergilosis invasiva. En una revisión reciente de 2,121 casos de aspergilosis hubo una respuesta favorable a la anfotericina B en el 55% de los pacientes, aunque en transplantados de médula ósea y en casos de aspergilosis cerebral la tasa de mortalidad fue superior al 95% (19).

La gran toxicidad de la anfotericina B ha dado lugar a la difusión del uso de derivados lipídicos, como la anfotericina liposomal, el complejo lipídico y la dispersión coloidal. Estas formulaciones disminuyen de forma muy importante la toxicidad y permiten administrar dosis mucho más elevadas (hasta 5 mg/Kg/día). Su principal problema es su alto costo (19).

El itraconazol es otro fármaco activo frente a *Aspergillus* que puede utilizarse bien como tratamiento de primera línea o como tratamiento de consolidación tras la administración inicial de anfotericina B. Se han obtenido buenos resultados con este fármaco en afecciones pulmonares, óseas y pericárdicas, entre otras (19,31,48-52).

Los aspergilomas son con frecuencia tratados quirúrgicamente, sobre todo cuando se acompañan de hemoptisis o invasión local. Cuando el procedimiento quirúrgico está contraindicado o en casos leves, el tratamiento con itraconazol ha dado buenos resultados (19).

Se plantea la cirugía para el tratamiento de aspergilosis encefálica, senos paranasales, válvula cardíaca, aspergiloma pulmonar que causa hemoptisis, lesión pulmonar localizada y única. La anfotericina B parenteral no es efectiva para tratar el aspergiloma. Como plan de alternativa para los aspergilomas que por motivos del estado del paciente no son operables, en varios centros aconsejan la administración de anfotericina B intracavitaria a través de un cateter implantado por vía transtorácica o por fibrobroncoscopía. Para este fin la anfotericina se preparó en gelatina o glicerina y las dosis usadas han sido: 15 a 50 mg diarios, semanales o cada 3 semanas. Se ha observado que con la anfotericina intracavitaria se detiene la hemorragia (17).

La anfotericina B por vía IV es el fármaco de elección para las formas invasivas o diseminadas. El itraconazol es una droga alternativa, es activa por vía oral y sin riesgos tóxicos (17).

#### 4. JUSTIFICACION

La aspergilosis es una afección causada por especies de *Aspergillus*, hongos oportunistas cuyo aislamiento a partir de muestras pulmonares no constituye evidencia de la enfermedad por tratarse de un contaminante común que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza; razón por la cual, el diagnóstico se debe hacer poniendo de manifiesto el agente causal mediante cortes histológicos o pruebas serológicas confiables.

En Guatemala el índice de tuberculosis es elevado, esta es una enfermedad cuyas lesiones predisponen al desarrollo de micosis oportunistas como la aspergilosis; por lo que se sospecha que existen pacientes con lesiones residuales que quizá ya hayan desarrollado la enfermedad; la que se podría poner de manifiesto mediante la realización de pruebas serológicas como la inmunodifusión, la que es de gran ayuda para el diagnóstico de esta enfermedad, debido a que es simple, rápida y además permite el seguimiento de casos en cuanto a evolución y respuesta al tratamiento y actualmente ya son ampliamente utilizadas en otros países.

Por lo anterior es importante que en Guatemala, se cuente con antígenos y sus respectivos antisueros de las especies de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* producidos localmente, para ser utilizados en pruebas serológicas, las que serán de gran ayuda para establecer un diagnóstico temprano de la aspergilosis pulmonar y de esa manera contribuir a que el médico instaure un tratamiento precoz y específico a pacientes que tengan un diagnóstico de tuberculosis, pacientes que hayan recibido tratamiento con corticosteroides o que no respondan al tratamiento, etc., que se encuentren en el Sanatorio Antituberculoso San Vicente.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General:

Contribuir en el diagnóstico de aspergilosis en Guatemala, implementando la prueba de Inmunodifusión Directa (ID) en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, utilizando antígenos de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* y sus respectivos antisueros producidos localmente.

### 5.2. Específicos:

- 5.2.1. Preparar y evaluar la reactividad de los antígenos metabólicos de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* mediante la prueba de ID.
- 5.2.2. Obtener los antisueros anti-*A. fumigatus*, anti-*A. flavus* y anti-*A. niger*, utilizando los antígenos producidos localmente.
- 5.2.3. Validar la prueba de ID enfrentando los antígenos de cada hongo a sueros de pacientes con diagnóstico de tuberculosis, pacientes que no respondan al tratamiento y pacientes que hayan recibido tratamiento con corticosteroides, que se encuentren en el Sanatorio Antituberculoso San Vicente.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. Universo de trabajo

6.1.1. Cepas de *Aspergillus fumigatus* 076, *Aspergillus flavus* 075 y *Aspergillus niger* 077 identificadas y donadas por la Dra. Conchita Toriello del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de México (UNAM).

6.1.2. Muestras de sueros de pacientes del Sanatorio Antituberculoso San Vicente.

### 6.2. Recursos

#### 6.2.1. Humanos

6.2.1.1. Autora: Claudia Marilú Soto Leonardo.

6.2.1.2. Asesora: Licda. María Luisa García de López. Docente e investigadora del Servicio de Micología, Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

#### 6.2.2. Institucionales

6.2.2.1. Servicio de Micología del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica Edificio T-12 2do. Nivel, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

6.2.2.2. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB-

6.2.2.3. Departamento de Microbiología.

6.2.2.4. Sanatorio Antituberculoso San Vicente.



### 6.3. Materiales

#### 6.3.1. Equipo

- Incubadora con agitación marca Thomas
- Autoclave pequeña
- Campana de flujo laminar
- Incinerador
- Balanza
- Sistema de ultrafiltración UHP
- Tambo de gas nitrógeno
- Refrigeradora
- Centrífuga
- Microscopio
- Estufa
- Jaulas para conejos

#### 6.3.2. Cristalería

- 9 erlenmeyers de 500 ml
- Tubos con tapón de rosca
- Embudos
- Vasos de precipitados
- Pipetas Pasteur
- Láminas portaobjetos 76x26 mm
- Láminas cubreobjetos 22x22 mm
- Cajas de petri
- Varilla de agitación
- Frascos con tapón de hule

- Jeringas de 5 cc. de vidrio
- Perlas de vidrio

### 6.3.3. Materiales

- Papel Whatman No. 40
- Membranas millipore (poro 0.22 y 0.45  $\mu$ m)
- Membranas No. 10 UHP
- Agujas de doble vía (calibres 14,15,18,19 y 21)
- Jeringas desechables
- Jeringas de tuberculina (1cc 25 G 5/8)
- Tijeras grandes y pequeñas
- Algodón
- Batas
- Guantes
- Mascarillas
- Asas bacteriológicas
- Papel mayordomo
- Masking tape

### 6.3.4. Reactivos

- Amortiguador de fosfatos pH 7.2
- Solución salina estéril (0.85%)
- Fenol al 5%
- Alcohol al 70%
- Cloruro de sodio (85%)
- Fosfato de Potasio monobásico
- Fosfato de Sodio dibásico

- Cloruro de Potasio
- Agarosa
- Azida de Sodio
- Adyuvante completo e incompleto de Freund
- Aceite mineral
- Thimerosal
- Xilol
- Glicina
- Tween 80

#### 6.3.5. Medios de cultivo

- Agar Sabouraud
- Medio semisintético de Smith
- Caldo Sabouraud

6.3.6. Modelos experimentales (6 conejas vírgenes New Zeland, de la misma camada, con un peso aprox. 5 - 6 libras y de 6 meses en adelante). Estas fueron criadas en el bioterio de la Facultad; además tuvieron control veterinario y llevaron una dieta balanceada, siendo alimentadas únicamente con concentrado marca Conejina.

6.3.7. Antisueros y antígenos del Centro de Contro y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta y del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

## 6.4. Procedimiento

### 6.4.1. Producción de antígeno

6.4.1.1. Se inocularon 9 tubos de agar Sabouraud con cepas de las tres especies de *Aspergillus* (*A. fumigatus* 076, *A. flavus* 075 y *A. niger* 077).

6.4.1.2. Se inocularon 6 balones de 500 ml , conteniendo 100 ml. de caldo Sabouraud con las tres cepas de *Aspergillus*. Se incubaron a 26°C durante 15 días en una incubadora con agitación.

6.4.1.3. Se taró una caja de petri, luego se pesaron 100 mg. de micelio del hongo e inocularon en balones de 500 ml, conteniendo medio semi-sintético de Smith. Se incubó a 30°C durante 15 días y siempre en una incubadora con agitación.

### 6.4.2. Obtención de los antígenos metabólicos

6.4.2.1. Al cabo de los 15 días se inactivó el hongo con thimerosal al 1%; se separó el micelio con papel Whatman No. 40 mediante filtración y se rompió con una varilla de agitación a la mayor brevedad posible.

6.4.2.2. Se filtró el sobrenadante a través de membranas Millipore de 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  de porosidad, utilizando una bomba de vacío y un sistema Millipore.

6.4.2.3. Se concentró el filtrado 10 veces su volumen inicial con un ultrafiltrador (UHP), utilizando membranas PM 10 UHP.

6.4.2.4. Se dializó el antígeno dos veces con el mismo sistema, utilizando agua desmineralizada.



6.4.2.5. Luego se verificó la reactividad de los antígenos producidos, por medio de la prueba de ID en gel de agarosa al 1%, utilizando antisueros del CDC de Atlanta como controles positivos.

6.4.2.6. Se alicuotaron y almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.4.3. Obtención de sueros hiperinmunes

6.4.3.1. Se cortó el pelo del lomo de cada coneja con una tijera grande y luego con una tijera pequeña a modo de dejar libre el área de inoculación.

6.4.3.2. Se marcó sobre el lomo de cada coneja, el área donde se realizarían las inoculaciones.

6.4.3.3. Se dilató la vena de la oreja con xilol y se extrajo sangre a cada una de las conejas para comprobar que no existiera ninguna reacción inespecífica.

6.4.3.4. Se preparó una emulsión con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund + 0.5 ml de antígeno crudo de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*.

6.4.3.5. Se homogenizó con una jeringa de vidrio de 5 cc de doble vía y agujas de calibres 19, 20 y 21 de diámetro.

6.4.3.6. Se realizaron de 200 a 300 pasadas con la aguja de doble vía de calibre 19 y luego se realizó la prueba de la gota.

6.4.3.7. En un vaso de precipitados de 25 ml, se colocaron 20 ml de solución salina y se mantuvo en refrigeración hasta el momento de utilizarla.

6.4.3.8. Se dejó caer una gota de la emulsión con la aguja No. 21 sobre la solución salina, la gota se formó como una perla que no se dispersa. Si esto no sucediera, se continua homogenizando con la aguja de doble vía, hasta lograr una completa homogenización entre el antígeno y el adyuvante.

6.4.4. Inmunización: (Este procedimiento se realizó con los tres antígenos de *Aspergillus*)

6.4.4.1. Inoculación con Ag metabólico, por vía intradérmica.

6.4.4.1.1. Se realizaron 20 inoculaciones de 0.1 ml de la emulsión a cada coneja, utilizando jeringas de tuberculina de Icc 25G 5/8.

6.4.4.1.2. Se inocularon dos conejas por cada antígeno producido.

6.4.4.1.3. Día 1: se inoculó 1 ml de emulsión del Ag y el adyuvante completo de Freund intradérmicamente.

6.4.4.1.4. Día 8: se dilató la vena de la oreja con xilol, se extrajo sangre y luego se dejó coagular para obtener el suero.

6.4.4.1.5. Se comprobó si los antisueros producidos por las conejas tenían una adecuada reactividad, enfrentándolos a los Ags de *Aspergillus* obtenidos, realizando la prueba de ID.

6.4.4.1.6. Se dejó descansar a las conejas una semana y luego se repitió este procedimiento dos veces más.

6.4.4.1.7. Se realizó una cuarta inmunización ya que las bandas de precipitación que se formaron en la prueba de ID no eran francas.

6.4.5. Sangrado de las conejas por punción cardíaca y defibrinación de la sangre (ver anexos). Este procedimiento debe ser realizado por un Médico Veterinario y la asistencia del Químico Biólogo.

6.4.6. Se verificó la reactividad de los antisueros obtenidos por medio de ID, realizando diluciones y utilizando como controles positivos los antígenos del CDC de Atlanta y los que fueron producidos localmente.

6.4.7. Se alicuotaron los antisueros y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.5. Validación de la prueba de ID

6.5.1. Se elaboró una carta de consentimiento y una hoja de entrevista dirigida a los pacientes que participaron en el estudio (Ver anexo 5 y 6).

6.5.2. Se realizó una revisión de fichas clínicas de pacientes del Sanatorio Antituberculoso San Vicente, en forma retrospectiva de un período de dos años (1999 y 2000). La revisión fue debidamente autorizada por el departamento de docencia del Sanatorio Antituberculoso San Vicente.

6.5.3. Se obtuvieron 20 muestras de sangre de pacientes que aceptaron participar en el estudio; con diagnóstico de tuberculosis, pacientes que no respondían al tratamiento (tuberculosis multirresistente) ó que tenían lesiones residuales; que se encontraban en dicho Sanatorio.

6.5.4. Se realizó la prueba de ID a los sueros de los pacientes con los antígenos y antisueros producidos.

6.5.5. Se realizó la lectura de las pruebas de ID a las 24, 48 y 72 horas.

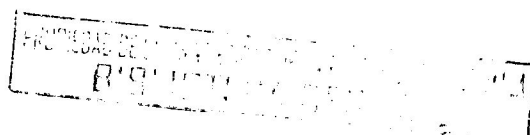
6.5.6. Interpretación de los resultados (anexo 4).

-Una simple banda débil puede pertenecer a un paciente con enfermedad asmática.

-Cuatro bandas o más se presentan en la aspergilosis alérgica con colonización en bronquios.

-En el aspergiloma pueden presentarse hasta 18 bandas.

-En el caso agudo, fulminante de la aspergilosis invasiva, con defectos en el sistema inmune en el cual no se producen anticuerpos, la prueba de ID es muchas veces negativa.



## 6.6. Diseño de investigación

Se realizó un estudio descriptivo a un número de 20 muestras de sangre de pacientes del Sanatorio Antituberculoso San Vicente. Las muestras se recolectaron por conveniencia, ya que estos pacientes tendrían que cumplir con alguno de los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes con antecedentes de tuberculosis o cualquier otra enfermedad que predisponga a la aspergilosis y que tengan lesiones cavitarias residuales en los pulmones.
- Pacientes que hayan recibido tratamiento con corticosteroides los cuales hayan deprimido su sistema inmune.
- Pacientes con antecedentes de tuberculosis que no respondan al tratamiento (tuberculosis multirresistente).

A los sueros de estos pacientes se les realizó la prueba de ID utilizando como controles positivos los antígenos y antisueros del CDC de Atlanta y los producidos en el Servicio de Micología.

## 7. RESULTADOS

El presente estudio fue realizado en cuatro fases:

7.1. Producción de antígenos metabólicos de *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*; de los cuales se obtuvo una cantidad aceptable para la posterior producción de los respectivos antisueros. Se obtuvo una mayor producción del antígeno de *A. niger*. Ver Tabla No. 1

TABLA No. 1

Antígenos metabólicos de *Aspergillus*.

| ANTIGENOS           | CANTIDAD OBTENIDA<br>EN (ml) |
|---------------------|------------------------------|
| <i>A. fumigatus</i> | 66                           |
| <i>A. flavus</i>    | 70.5                         |
| <i>A. niger</i>     | 122                          |

7.2 Producción de antisueros anti- *A. fumigatus*, *A. flavus* y anti- *A. niger*; producidos en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia con el fin de implementar la prueba de ID en dicho servicio. Se obtuvo una mayor producción de anti- *A. niger*. Ver Tabla No. 2

TABLA No. 2

Antisueros anti-*Aspergillus*.

| ANTISUEROS                | CANTIDAD OBTENIDA<br>EN (ml) |
|---------------------------|------------------------------|
| Anti- <i>A. fumigatus</i> | 48 (*)                       |
| Anti- <i>A. flavus</i>    | 25 (**)                      |
| Anti- <i>A. niger</i>     | 107 (***)                    |

(\*) Se obtuvieron 21 ml de la coneja 3 y 27 ml de la coneja 4.

(\*\*) Se obtuvieron 15 ml de la coneja 5 y 10 ml de la coneja 6.

(\*\*\*) Se obtuvieron 48 ml de la coneja 1 y 59 ml de la coneja 2.

7.3 Revisión de fichas clínicas: Se revisó un total de 266 fichas clínicas, de las cuales solamente 3 casos fueron sugestivos de aspergilosis pulmonar diagnosticados clínica y radiológicamente. Ver Tabla No. 3

TABLA No. 3

| CASOS SUGESTIVOS<br>DE ASPERGILOSIS | OTROS DIAGNOSTICOS<br>PULMONARES | TOTAL DE<br>FICHAS CLINICAS |
|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| 03                                  | 263                              | 266                         |

7.4 Prueba de ID realizada a los sueros de los pacientes enfrentados con los antígenos producidos localmente. Ver Tablas 4, 5 y 6.

TABLA No. 4

Sueros de pacientes enfrentados con el Antígeno de *A. fumigatus*.

| Resultado   | No. de Muestras | Porcentaje (%) |
|-------------|-----------------|----------------|
| No reactivo | 20              | 100            |
| Reactivo    | 00              | 0              |
| Total       | 20              | 100            |

TABLA No. 5

Sueros de pacientes enfrentados con el Antígeno de *A. flavus*.

| Resultado   | No. de Muestras | Porcentaje (%) |
|-------------|-----------------|----------------|
| No reactivo | 20              | 100            |
| Reactivo    | 00              | 0              |
| Total       | 20              | 100            |

TABLA No. 6

Sueros de pacientes enfrentados con el Antígeno de *A. niger*.

| Resultados  | No. de Muestras | Porcentaje (%) |
|-------------|-----------------|----------------|
| No reactivo | 20              | 100            |
| Reactivo    | 00              | 0              |
| Total       | 20              | 100            |

## 8. DISCUSION DE RESULTADOS

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue la producción de antígenos y los respectivos antisueros de las tres especies más comunes de *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*), para implementar la técnica de inmunodifusión ID en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala; lo que contribuye con el diagnóstico de las micosis pulmonares en Guatemala, en este caso de la Aspergilosis Pulmonar en pacientes con antecedentes de tuberculosis, pacientes que no responden al tratamiento de la tuberculosis y pacientes que están siendo tratados con corticosteroides.

Durante el desarrollo del trabajo experimental, se encontraron algunos inconvenientes como lo fue la contaminación de los cultivos, esto llevó aproximadamente unos 8 meses en lograr obtener cultivos puros de los hongos, los filtrados obtenidos se concentraron y dializaron para la producción de los antígenos metabólicos y su posterior utilización en la inmunización de los modelos experimentales (Conejas vírgenes de Nueva Zelanda) para la producción de antisueros de las tres especies de *Aspergillus* antes mencionadas, lo cual se logró inoculando los modelos cuatro veces para optimizar la producción de los antisueros.

A los tres antígenos producidos se les comprobó su capacidad antigénica mediante la prueba de ID utilizando los correspondientes antisueros control de cada una de las especies, donados por el CDC de Atlanta, los cuales mostraron bandas francas de identidad. Estos tres antígenos también fueron enfrentados con antisueros de *H. capsulatum*, *C. immitis* y *P. brasiliensis* para comprobar que no existiera alguna reacción cruzada.

Al enfrentar los tres antígenos entre sí, con los antisueros producidos de las tres especies se pudo comprobar que existía reacción cruzada cuando se enfrentó el antígeno de *A. fumigatus* contra el antisuero de *A. niger*. Estudios inmunológicos de las especies de *Aspergillus* han establecido que comparten también determinantes antigénicos de género, los cuales generalmente se expresan de manera más débil que los homólogos, aunque algunos autores han señalado que en ocasiones los determinantes antigénicos son



reconocidos mucho más fácilmente que los de especie, dando lugar a las reacciones cruzadas intragenéricas (43,45).

Durante la producción de antisueros el mayor problema fue el cuidado de los modelos experimentales, ya que se murieron de inanición durante el mes de diciembre y se tuvieron que volver a comprar; esta vez las conejas estaban demasiado pequeñas y en malas condiciones nutricionales; su alimentación se controló y se cuidaron diariamente, además de algunas visitas realizadas por un Médico Veterinario; por lo que se recomienda que siempre se encuentre una persona de turno durante las vacaciones para cuidar a los animales que se encuentren en el bioterio. Las conejas fueron alimentadas con concentrado marca Conejina y esta vez llegaron a un peso de 9 libras, que resultó ser suficiente, ya que el peso requerido es mayor de 6 libras.

Luego de realizar las inmunizaciones a cada una de las conejas, se sangraron, para obtener los antisueros y evaluar su reactividad por medio de la prueba de ID utilizando controles positivos. El suero que se obtuvo se hemolizó, probablemente esto sucedió por la forma de recolectar la sangre en los recipientes. Por lo que se considera importante mejorar la técnica de recolección de la sangre para evitar la hemólisis y de esa manera optimizarla. Se añadieron perlas de vidrio a la sangre recolectada y luego se mezcló cuidadosamente hasta que se formara un coágulo, se dejó reposar durante 30 minutos y luego se extrajo el suero.

La prueba de ID ha sido ampliamente reconocida como una prueba de gran utilidad para el diagnóstico de las micosis profundas y en particular de la aspergilosis. Su sencillez, bajo costo, buena sensibilidad y alta especificidad cuando se emplean controles adecuados, la hacen una prueba de amplio uso en la actualidad (44). Además, se ha podido correlacionar la aparición y número de bandas con las principales formas clínicas de la enfermedad, lo que le confiere un valor adicional a esta prueba (7,14,43).

En este trabajo se logró producir los antígenos y antisueros de las tres especies de *Aspergillus*, los cuales sirvieron para validar la prueba de ID, la cual será de gran utilidad para el diagnóstico de aspergilosis en Guatemala.

Los resultados obtenidos de las muestras de los pacientes que participaron en este estudio, revelaron que el 100% (20 muestras) no reaccionaron con los antígenos de *A.*

*fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*, tanto con los que se produjeron en el Servicio de Micología, como con los donados por el CDC de Atlanta.

Del total de las fichas clínicas revisadas (266), se encontró que solamente 3 (1.1%) casos fueron sugestivos de aspergilosis por los síntomas que presentaban. Su diagnóstico debe realizarse mediante una correcta valoración de los datos clínicos, radiológicos, micológicos y serológicos; en la medida que se obtengan preparados antigénicos y los correspondientes antisueros de una calidad superior, contribuiremos a lograr un diagnóstico más efectivo de esta micosis.

## 10. RECOMENDACIONES

- 10.1 Ampliar este estudio en poblaciones de pacientes con otro tipo de afecciones que predispongan a la aspergilosis, como por ejemplo neutropenia, linfomas, transplantes de órganos, etc.
- 10.2 Evitar la contaminación de los cultivos, trabajando en la campana y desinfectándola previamente con fenol durante 15 minutos.
- 10.3 Se recomienda producir antígenos de *Aspergillus* periódicamente, ya que su potencia disminuye con el tiempo.
- 10.4 Realizar más estudios sobre la detección de anticuerpos anti- *Aspergillus* en pacientes con afecciones pulmonares (micosis profundas), para conocer la frecuencia de aspergilosis en Guatemala.
- 10.5 La aspergilosis pulmonar secundaria a tuberculosis debe de tomarse en cuenta en el diagnóstico diferencial del resto de patologías que afectan a nivel pulmonar.
- 10.6 La técnica de sangrado de los modelos experimentales para la obtención de antisueros, debe ser mejorada y así evitar la hemólisis.

## 11. REFERENCIAS

1. Pérez A, Toriello C. Condiciones óptimas para la producción de Antígenos de *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus* para el Diagnóstico Serológico de la Aspergilosis. Rev. Mex. Mic. 1989;5:261-271.
2. Youmans P, Paterson. Manual de Infecciones. Tomo II. México: Interamericana, 1982. (492p).
3. Lin D, et al. Comparison of Three Methods for Clinical and Environmental Isolates of *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. M. 1995;33:1596-1597.
4. Kwon JK, Bennett JE. Aspergillosis. p.201-204. (In Kwon JK, Bennett JE, eds. Medical mycology. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. 247p).
5. János ER, Ferenczy L. Phenotypic and Genotypic Analysis of Variability in *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. M. 1995;33:2567-2569.
6. Flannigan B, Milne LJ. Morphological Studies on Clinical Isolates of *Aspergillus fumigatus*. J. Med. Vet. Mycol. 1988;26:335-337.
7. Guzmán LN. Preparación de Antígenos de Especies de *Aspergillus* y su uso en el Diagnóstico de Aspergilosis Pulmonar secundaria a Tuberculosis. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1984. 72p.
8. Hamilton AJ, Holdom MD, Hay RJ. Specific Recognition of Purified Cu, Zn Superoxide Dismutase from *Aspergillus fumigatus* by Immune Human Sera. J. Clin. M. 1995;33:495-496.
9. Stynen D, et al. A New Sensitive Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect Galactofuran in Patients with Invasive Aspergillosis. J. Clin. M. 1995;33:497-500.

10. Girardin H, et al. Molecular Epidemiology of Nosocomial Invasive Aspergillosis. J. Clin. M. 1994;32:684.
11. Bodey GP, Vartivarian S. Aspergillosis. Eur. J. Clin. M. 1989;8:413-415.
12. Walsh TJ, Pizzo PA. Nosocomial Fungal Infections; a Classification for Hospital acquired fungal infections and mycoses arising from endogenous flora or reactivation. 1988;42:517-520.
13. Logemann HE. Manual Práctico de Micología Médica. Guatemala: USAC (Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1995. 227p.
14. Coleman RM, Kaufman L. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. Appl. Microb. 1972;23:301-307.
15. Gold JW, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis by hemagglutination assay of antibody. J. Infect. Dis. 1980;142:87-94.
16. Delgado MV, et al. Temas de Micología Médica. Ed. Venezuela: Elalca, 1996. 385p. (p. 279,297,344).
17. Braselli A. Aspergilosis. Clínica de Enfermedades Infecciosas: Facultad de Medicina. Montevideo: 1996. (p. 1-7).
18. Laurel VL, et al. Pseudoepidemic of *Aspergillus niger* Infections Traced to Specimen Contamination in the Microbiology Laboratory: J. Clin. M. 1999;37:1612-1615.
19. Alcalá L, et al. *Aspergillus* y aspergilosis. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. 1994. (p. 1-8).
20. Zuger A, et al. Cryptococcal Disease in patients with the acquired Immuno Deficiency Syndrome; Diagnostic features and out come of treatment. Ann. Int. Med. 1986;104:234-236.

21. Torres JM, Madrenys N. Aspergilosis. (En Torres JM, et al. Manual Micología Médica. ed. Santo Domingo: Interamericana, 1988. 115p.
22. Comunicación personal del Dr. Marco Antonio Pérez, Médico Neumólogo. Sanatorio Antituberculoso San Vicente. 1999.
23. Lisbona R, Lacourciere L, Rosenthal L. Aspergilloma tous abcesses of the brain and thyroid. J. Nuc. Med. 1973;14:541-542.
24. López R, et al. Micología Médica; procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 1 ed. México: Trillas, 1995. 194p.
25. Arango M, Castañeda E. Micosis Humanas. Procedimientos diagnósticos. Exámenes directos. Santafé de Bogotá: Presencia, 1995. (p. 116-121).
26. Puras-Gil AM. Expresión morfológica de las Infecciones Fúngicas Graves. Venezuela, 1998. (p.1-4).
27. De La Fuente L, Ancochea J. Neumonía nosocomial en paciente con EPOC corticodependiente de larga evolución. Servicio de Neumología. Hospital Universitario de la Princesa. Madrid. 1998. (p. 1-3).
28. De La Vega M, et al. Aspergilosis pulmonar necrotizante crónica con invasión cardíaca en paciente inmunodeprimida. p. 1-2. (In Robinson LA, et al. Pulmonary resection for invasive *Aspergillus* infections in immunocompromised patients. J. Thorac Cardiovasc Surg. 1995;109:1182-1197).
29. Moulin-Traffort J, Regli P. A propos de deux cas d'otomycoses. Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. 1989;18:317.

30. Nelesnik MR, et al. Significance of *Aspergillus* Species isolates from respiratory secretions in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. J. Clin. M. 1980;11:370-376.
31. Ronald b, George MD. Micosis Pulmonares; revisión conceptual y terapéutica. Rev. Med. 1990; 1:5-7.
32. Horvarth JA, Dummer S. The use of respiratory-tract cultures in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. Am. J. Med. 1996;100:171-178.
33. Latgé JP, et al. Galactomannan and the circulating antigens of *Aspergillus fumigatus*. p. 143-155. (In Latgé JP, Boucias D. Fungal Cell Wall and Immune Response. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, Vol. 53, 1991.
34. Reinhard K, Arnim SB. New Cause for False-Positive Results with the Pastorex *Aspergillus* Antigen Latex Agglutination Test. J. Clin. M. 1993;31:2489-2490.
35. Pinel C, et al. Western blot detection of IgG anti-*Aspergillus fumigatus* elastase in sera of patients with aspergillosis. J. Med. & Vet. Mycol. 1994;32:231-233.
36. Skladny H, et al. Specific Detection of *Aspergillus* Species in Blood and Bronchoalveolar Lavage Samples of Immunocompromised Patients by Two-Step PCR. J. Clin. M. 1999;37:3865- 3871.
37. Verweij PE, et al. *Aspergillus* Meningitis: Diagnosis by Non-Culture-Based Microbiological Methods and Management. J. Clin. M. 1999;37:1186-1189.
38. Melchers JG, et al. General Primer-Mediated PCR for Detection of *Aspergillus* Species. J. Clin. M. 1994;32:1710-1711.
39. Bretagne S, et al. Detection of *Aspergillus* Species DNA in Bronchoalveolar Lavage Samples by Competitive PCR. 1995;33:1164-1167.

40. Kaufman L. Serodiagnosis of fungal diseases. (In Rose NR, Friedman H, eds. Manual of Clinical Immunology. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1976. (p. 363-381).
41. Bennett CW. Serología Clínica. Buenos Aires: Panamericana, 1976. 244p.
42. Perrotta D, et al. Producción de antisueros fúngicos específicos en conejo. Rev. Arg. Mic. 1998;30:1-3.
43. Fernandez CM, et al. Evaluación de antígenos y antisueros para su utilización en el serodiagnóstico de aspergilosis. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". 1995. (p. 1-4).
44. Torres-Rodriguez JM. Monografías clínicas en enfermedades infecciosas P. 59-69 (En Fernandez CM, et al. Evaluación de antígenos y antisueros para su utilización en el diagnóstico de aspergilosis. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". 1995. p. 1-4)
45. Hearn VM. Antigenicity of *Aspergillus* species. J. Med. Vet. Mycol. 1992;30:11-25.
46. Solano H, et al. Evaluación de un ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Aspergillus fumigatus*. p.215. (En Fernandez CM, et al. Evaluación de antígenos y antisueros para su utilización en el serodiagnóstico de aspergilosis. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". 1995. p.1-4).
47. Nahmias AJ, O'Reilly RJ. Immunology of Human Infection; Part I, Bacteria, Mycoplasmae, Chlamydiae and Fungi. New York: Plenum Publishing Corporation, 1981. 651p.
48. Dupont B. Itraconazole therapy in aspergillosis; Study in 49 patients. J. Am. Acad. Dermatol. 1990;23:607-610.
49. Denning DW, et al. Itraconazole in opportunistic mycoses, Cryptococcosis and aspergillosis. J. Am. Acad. Dermatol. 1990;23:602-607.



50. Aronson S, et al. Aspergilosis y SIDA; presentación de 3 casos. p.81. (En IX Congreso Panamericano de Infectología. II Congreso Centroamericano y del Caribe de Infectología. IV Congreso Guatemalteco de Enfermedades Infecciosas. I Congreso Panamericano de SIDA. 3-7 mayo de 1999, Centro Internacional de Convenciones. Hotel Camino Real. Guatemala: Centro América. 88p).
  
51. Dutra A, et al. Aspergilosis en Pacientes con SIDA. Montevideo. p.66. (En IX Congreso Panamericano de Infectología. II Congreso Centroamericano y del Caribe de Infectología. IV Congreso Guatemalteco de Enfermedades Infecciosas. I Congreso Panamericano de SIDA. 3-7 mayo de 1999, Centro Internacional de Convenciones. Hotel Camino Real. Guatemala: Centro América. 88p).
  
52. Rodríguez N, Vidal G, Beguelin JL. Aspergilosis Intracraneal en Paciente Inmunocompetente. Argentina. (En III Congreso Latinoamericano de Micología. Asociación Latinoamericana de Micología. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela: 1999. 175p).

**12. ANEXOS**

## Anexo No.1

### Desfibrinación de la sangre

#### Material necesario:

- Recipientes plásticos ó de vidrio.
- Perlas de vidrio.

#### Método:

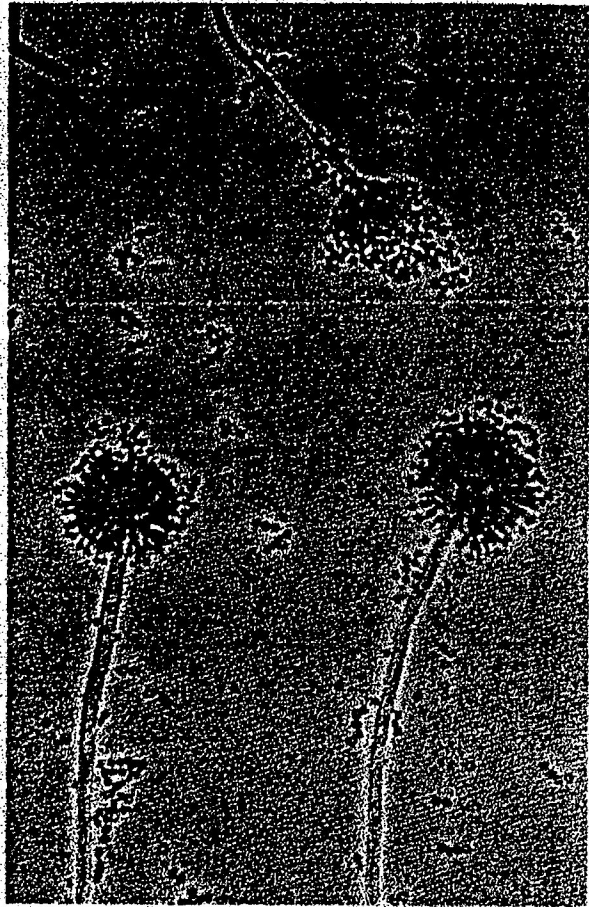
- Añadir las perlas de vidrio y la sangre al recipiente con mucho cuidado para evitar la hemólisis.
- Mezclar cuidadosamente hasta que el coágulo se haya formado completamente aproximadamente de 10 – 20 minutos. No deje coagular la sangre sin haberla mezclado.
- Dejar reposar la sangre coagulada durante 30 minutos, y extraer el suero que contendrá las células libres.

Referencia: Hudson L, Hay FC. Inmunología Práctica. 1 ed. England:JIMS, 1979. (p. 19-20)

Anexo No. 2



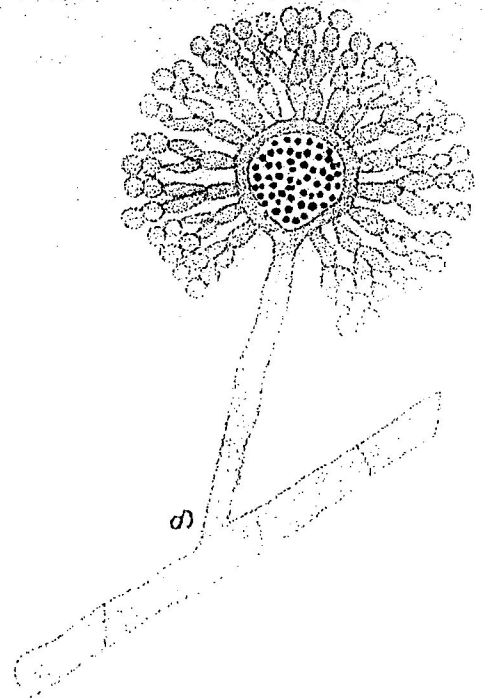
a)



b)

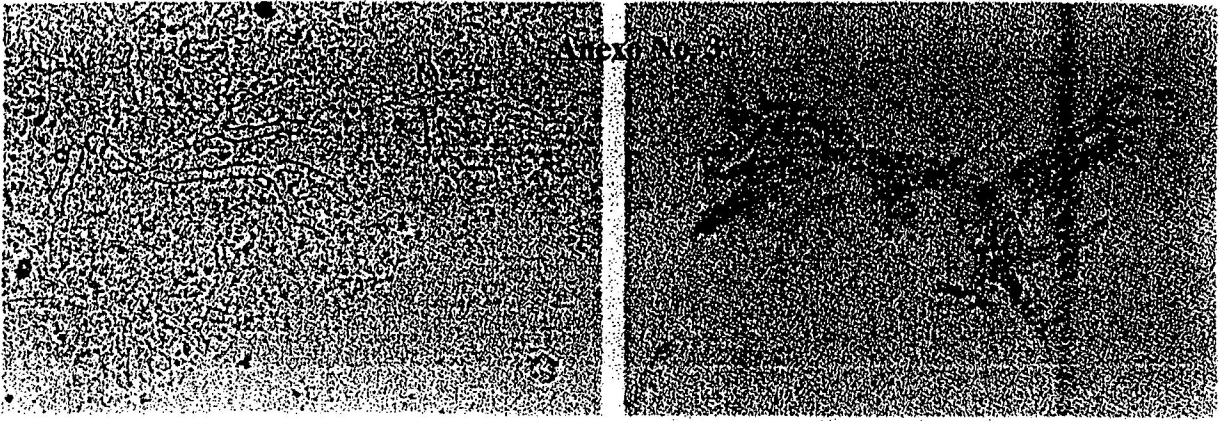


c)

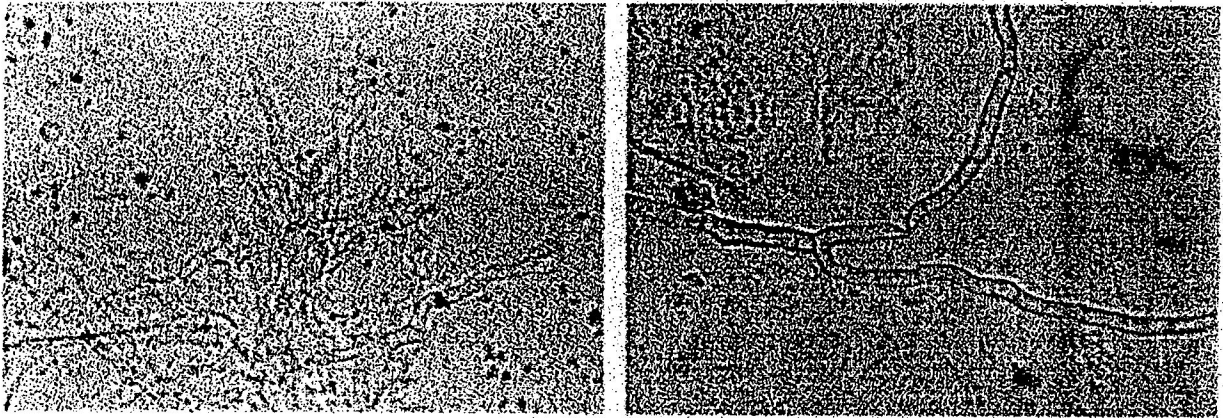


d)

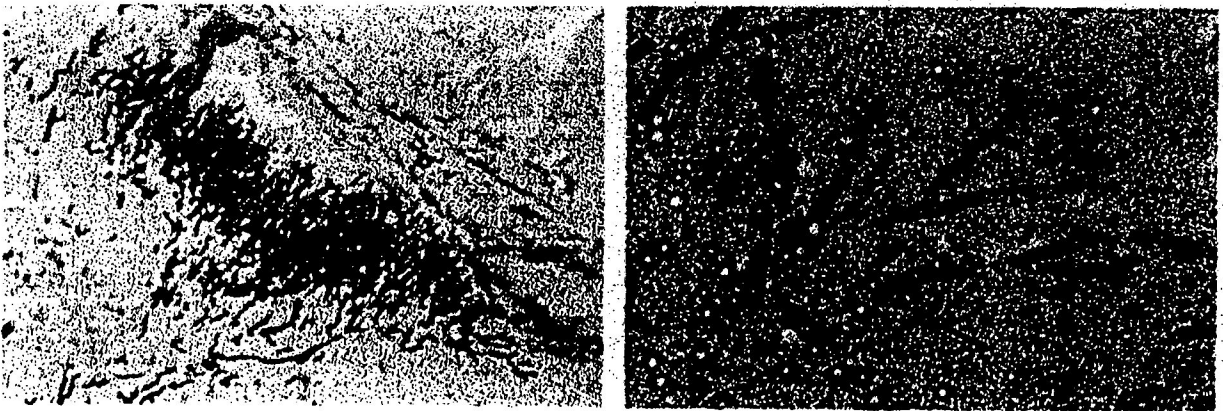
Examen directo de cultivos de *Aspergillus*: a) *A. clavatus*, cabezas aspergílares alargadas, con fiálides grandes y cadenas cortas de fialoconidios; b) *A. flavus*, vesícula esférica con fiálides que la cubren totalmente; c) *A. fumigatus*, vesícula globosa con fiálides que abarcan aproximadamente las dos terceras partes de ella; fialoconidios en grandes cadenas; d) *A. niger*, cabeza aspergílar cubierta totalmente de fiálides y fialoconidios negros.



a,b. Hifas hialinas septadas con ramificación dicotómica en ángulo agudo. KOH, 40x.



c,d. Hifas hialinas septadas con ramificación dicotómica en ángulo agudo. KOH, 40x.

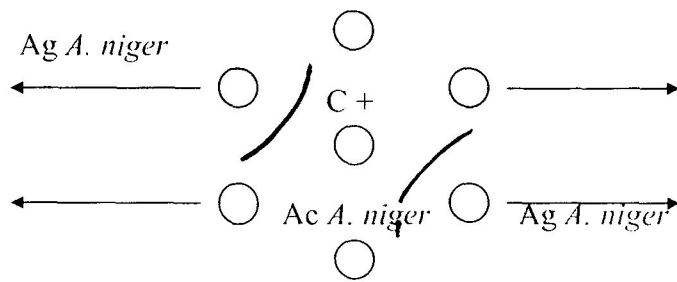
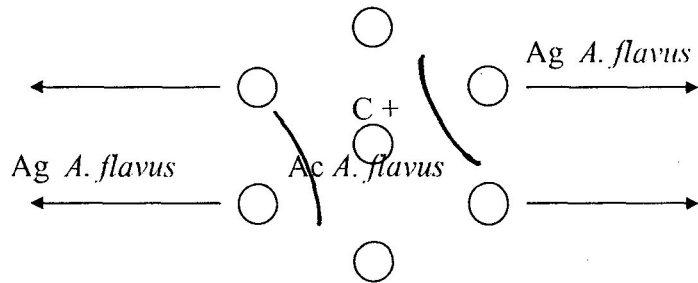
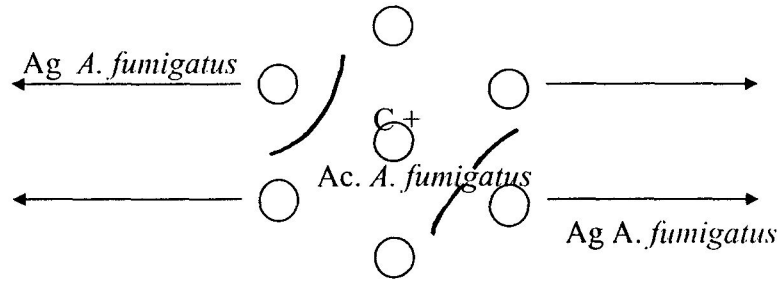


e,f. Hifas septadas con ramificación dicotómica en ángulo agudo.

(e) Plata-metenamina, 10x. (f) Plata-metenamina, HE, 40x.

Anexo No. 4

Esquema utilizado para la Inmunodifusión (ID)



## Anexo No. 5

**PROYECTO:** "Producción de Aspergilas y antisueros anti-*A. fumigatus*, anti-*A. flavus* y anti-*A. niger* para el diagnóstico de Aspergilosis Pulmonar".

**IDENTIFICACION:** Este estudio está siendo conducido por la Licda. María Luisa García de López en el servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Usted está invitado a participar como voluntario dentro del estudio anteriormente mencionado.

**PROCEDIMIENTO:** Durante el estudio será entrevistado acerca de datos personales, forma de trabajo, etc. Las entrevistas serán realizadas por la Br. Claudia Soto (tesista) y será información confidencial; además se le extraerán 5 cc de sangre para realizarle los exámenes.

**RIESGO:** No existe ningún riesgo específico relacionado con su participación en este estudio.

**BENEFICIOS:** Si usted participa en este estudio, recibirá los resultados de los exámenes realizados.

**CONFIDENCIALIDAD:** Su participación será mantenida en la confidencialidad de acuerdo a la práctica médica estándar. Su nombre no será utilizado en ningún reporte ó publicación resultante de este estudio; solamente será utilizado en el informe de su examen, el cual será entregado directamente a su médico.

**CONSIDERACIONES FINANCIERAS:** Su participación en este estudio no implica ningún gasto para usted. No se le dará compensación directa por participar.

**PARTICIPACION VOLUNTARIA:** Su participación en este estudio es voluntaria. Ud. puede decidir no ser parte del mismo o salir en cualquier momento.

**CONSENTIMIENTO:**

1. Yo reconozco que mi participación en este estudio es voluntario. Tengo la libertad para participar o salir de él en cualquier momento.
2. Doy el permiso a los investigadores para utilizar la información recolectada en el cuestionario, así como de extraerme la muestra de sangre solicitada.

Nombre del paciente

Firma del paciente

Firma del investigador

Fecha

Anexo No. 6

Sanatorio Antituberculoso San Vicente

No. de orden \_\_\_\_\_

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

Sexo:  M  F Procedencia: \_\_\_\_\_ Religión \_\_\_\_\_

Profesión: \_\_\_\_\_ Servicio: \_\_\_\_\_

Diagnóstico clínico ( y/o agente que se sospecha): \_\_\_\_\_

SIGNOS Y SINTOMAS

Fiebre \_\_\_\_\_

Tos \_\_\_\_\_

Dolor Torácico \_\_\_\_\_

Hemoptisis \_\_\_\_\_

Otros (especificar) \_\_\_\_\_

TRATAMIENTO \_\_\_\_\_ Ninguno

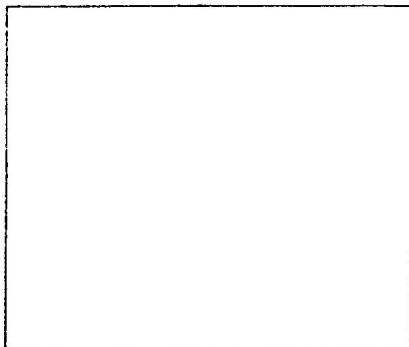
\_\_\_\_\_ Drogas anti-TB \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Otros \_\_\_\_\_

LABORATORIO \_\_\_\_\_ BK positivo \_\_\_\_\_ Frote

\_\_\_\_\_ BK negativo \_\_\_\_\_ Cultivo

RADIOGRAFIA DE TORAX



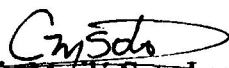
Descripción: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

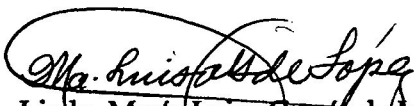
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_




  
Claudia Marilú Soto Leonardo

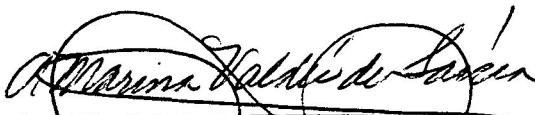
AUTORA

  
Licda. María Luisa García de López

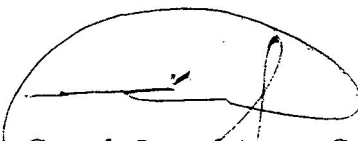
ASESORA

  
Lic. Armando Cáceres Estrada

REVISOR

  
Licda. Alba Marina Valdés Ruiz de García

DIRECTORA

  
Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán

DECANO