

Hospital de Enfermedades del Tórax  
El Tomillar. Sevilla. Ciudad Sanitaria  
Virgen del Rocío. Sevilla

## VALOR DE LA INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA EN EL DIAGNOSTICO DE LAS ASPERGILOSIS RESPIRATORIAS

A. Ginel, R. Torronteras, A. González, J. Peñas del Castillo  
y M. Torres Cansino

### Introducción

Desde que Pepys en el año 1959<sup>1</sup>, introduce en la clínica la investigación de anticuerpos séricos específicos frente al *Aspergillus* y estudia el valor de esta determinación en una serie de pacientes, la búsqueda de estos anticuerpos precipitantes por cualquiera de los métodos, ha sido un paso obligado en el enfermo sospechoso de padecer una infección aspergilar.

A pesar de los perfeccionamientos aportados a las reacciones de precipitación en gelosa, del 10-20 % de las aspergilosis escapan aún al diagnóstico inmunológico realizado con las técnicas de inmunodifusión doble e inmunolectroforesis, sobre todo si se trata de sueros con escaso nivel de anticuerpos<sup>2</sup>.

Cuando en 1976 realizamos nuestro primer trabajo sobre aspergilosis respiratorias<sup>3</sup>, nos llamó extraordinariamente la atención el que en una serie de aspergilomas (en varios casos comprobados quirúrgicamente), obtuviéramos títulos de anticuerpos determinados por inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.) muy bajos, máxime cuando esta técnica se ha mostrado de gran valor en el diagnóstico de otras enfermedades infecciosas y parasitarias<sup>4\*</sup>. Este ha sido el motivo que nos ha llevado a revisar la técnica, establecer un grupo testigo que consideramos lo suficientemente amplio y a practicar la reacción en una serie de enfermos con evidencia o gran sospecha de infección aspergilar, incluyendo en este grupo a los enfermos que sirvieron de base a nuestra primera comunicación, con objeto de

intentar establecer el valor de la I.F.I. en el diagnóstico de esta afección.

A raíz de las investigaciones de Marrack<sup>7</sup> y Eagle<sup>8</sup>, que mostraron la posibilidad de acoplamiento proteína-anticuerpo con diversos compuestos diazotados, sin que esta operación afectase esencialmente las propiedades inmunológicas específicas, Coons en 1941 y posteriormente en 1942<sup>9,10</sup>, tiene la idea de acoplar al anticuerpo (suero de conejo antineumocócico tipo III), las sales de fluoresceína, observando como el conjugado que se ha obtenido conservaba todas las propiedades inmunológicas del antisuero de origen.

Sin embargo, las dificultades técnicas para marcar directamente anticuerpos, eran considerables; este mismo autor, Coons<sup>11</sup>, basándose en la propiedad que tienen los anticuerpos (globulinas) de actuar como antígenos cuando se inyectan a un animal y producir anti-anticuerpos, tuvo la idea de marcar esta inmunoglobulina (anti-anticuerpo) con el isocianato de fluoresceína.

En un primer paso, se fija el anticuerpo con el antígeno correspondiente y en un segundo tiempo, la antiglobulina fluorescente se fija en el anticuerpo; si el anticuerpo no existe, la antiglobulina no encuentra molde para fijarse y el antígeno no queda marcado, apareciendo sin fluorescencia.

### Material y método

Hemos estudiado el nivel en suero de anticuerpos antiaspergilaes en 94 casos, distribuidos de la siguiente forma:

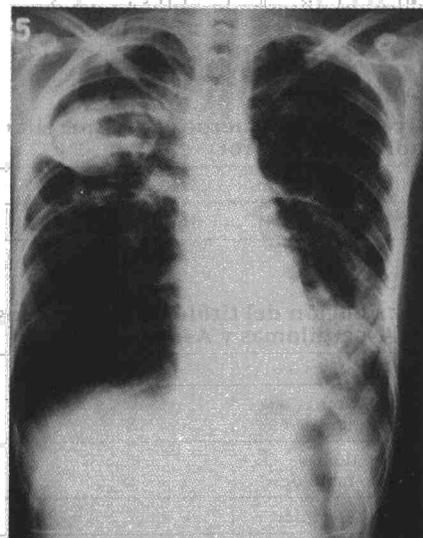
A) Grupo testigo control, compuesto por 81

sujetos sin evidencia de alteraciones pulmonares, de los cuales 5 eran lactantes, 8 preescolares, 8 jóvenes de menos de 15 años y 60 adultos.

B) Grupo formado por 13 enfermos afectados de una aspergilosis respiratoria, 5 de ellos con confirmación quirúrgica de aspergiloma intracavitario, que en un caso coexistía con un empiema aspergilar contralateral (fig. 1); 4 con sospecha clínico-radiológica de aspergiloma y que no fueron intervenidos por diversos motivos y otros cuatro con diagnóstico de probable asma aspergilar, aunque solamente un caso cumpliera con todo rigor con los patrones de la enfermedad alérgica aspergilar. (eosinofilia por encima de 500 cl/mm., opacidades fugaces, presencia de *A. Fumigatus* en el esputo, reacciones cutáneas positivas y título de anticuerpos elevados en el suero).

El método empleado para la detección de anticuerpos anti-aspergilaes, ha sido la inmuno-fluorescencia indirecta (I.F.I.), emplean-

Fig. 1. Aspergiloma intracavitario en lóbulo superior derecho y empiema aspergilar en hemitórax izquierdo.



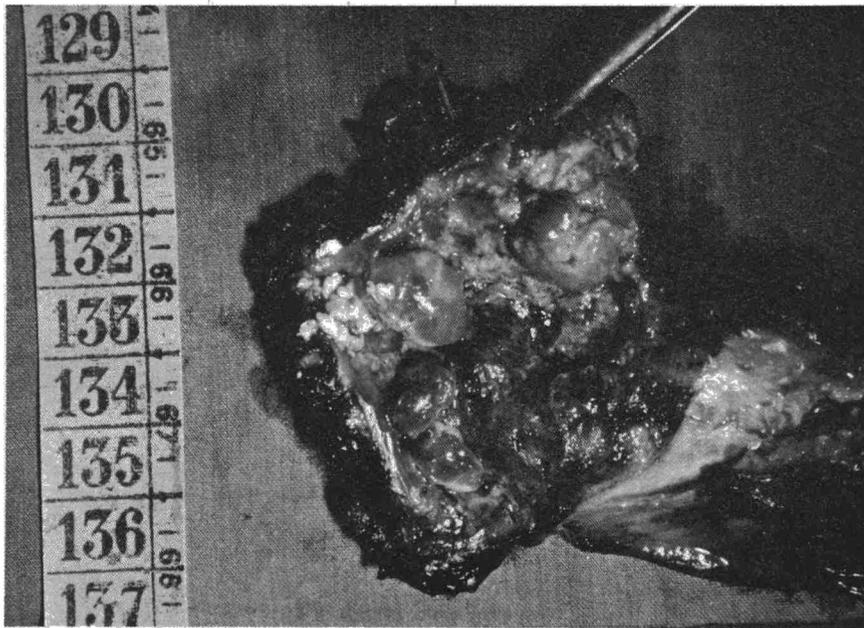


Fig. 2. Aspergiloma del que se aisló el hongo que hemos empleado como antígeno.

do como antígeno un *A. Fumigatus* aislado de uno de nuestros enfermos (fig. 2) y cultivado en caldo Saboreaud a temperatura ambiente en un agitador magnético para lograr colonias miceliales no esporuladas. Tras varios lavados con solución salina, fueron fragmentados en un agitador de hélice y diluidas de modo que dieran 20 - 40 fragmentos miceliales por campo 40 x y objetivo 10 x.

El conjugado fluorescente antiglobulina humana ha sido el preparado por el Instituto Pasteur diluido al 1/100.

El microscopio utilizado fué un Ortolux Leitz con mechero de 200 W. y filtros de excitación ultravioleta de 4 mm. y de bloqueo K 530.

## Resultados

Los sueros de los sujetos testigos, sin alteraciones aparentes en el aparato respiratorio ni otomicosis, presentaron títulos de anticuerpos anti-aspergiliares en I.F.I. comprendidos entre el negativo y la dilución 1/128

TABLA I

Niveles de anticuerpos anti-aspergiliares determinados por I.F.I. en 81 individuos control

Títulos anticuerpos	< 1/16	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
N.º de casos	81	16	25	18	14	8

TABLA II

Distribución del título de anticuerpos anti-aspergiliares en Aspergilomas y Asma Aspergilar

N.º casos	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Aspergilomas quirúrgicos	5			3	2
Aspergilomas clínico-radiolog.	4	1	1	2	
Asma aspergilar	4		1	1	1

(Tabla I). No presentaron anticuerpos específicos los 5 lactantes, 6 de los 8 niños en edad preescolar, dos jóvenes de 13 y 14 años y 2 adultos.

En el segundo grupo (Tabla II), los aspergilomas quirúrgica y micológicamente demostrados, alcanzaron títulos de anticuerpos superiores a la dilución 1/256; los 4 casos de asma aspergilar, presentaron niveles de 1/128, 1/256, 1/512 y 1/1024. De los 4 casos de aspergiloma con solo evidencia clínico-radiológica, 2 alcanzaron títulos de 1/512 mientras que los otros dos fueron de 1/64 y 1/128.

## Conclusiones

1. Aunque algunos autores como Drouhet y Segretain<sup>12,13</sup>, dan como positivos títulos superiores a 1/40, no-

sotros encontramos en la serie de sujetos testigos niveles de hasta 1/128, que creemos por tanto deben de considerarse negativos, lo que posiblemente sea debido al empleo de distinto antígeno y material usado, así como a la subjetividad de esta prueba (por lo cual creemos necesario establecer un grupo control que nos diera una idea lo más exacta posible del nivel de anticuerpos anti-aspergiliares en la población normal).

2. Las distintas técnicas empleadas para la detección de anticuerpos frente al hongo, dan resultados positivos según los distintos autores consultados en un porcentaje del 80 al 90 %. En nuestros aspergilomas quirúrgicamente demostrados, no hemos encontrado títulos inferiores a 1/256.

3. En el grupo de enfermos con sospecha clínico-radiológica de aspergiloma, obtuvimos en dos casos títulos inferiores a 1/256, lo que creemos puede ser debido a que distintos procesos pueden dar lugar a imágenes radiológicas similares, tales como la presencia de un hematoma intracavitario, un secuestro caseoso, etc.

4. En el tercer grupo de enfermos con sospecha de asma aspergilar encontramos 3 positividads mientras que un caso tenía un título de 1/128.

Por todo ello, pensamos que la técnica de la inmunofluorescencia indirecta, tiene un puesto que debemos de considerar importante junto con las otras técnicas inmunológicas en el diagnóstico de las aspergilosis respiratorias, siendo ésta, sensible, de fácil realización y de lectura rápida.

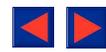
## Resumen

Tras hacer una breve introducción sobre la técnica de la Inmunofluorescencia indirecta, exponemos el material y método seguido en nuestro estudio y analizamos los resultados obtenidos con dicha técnica en 13 enfermos afectados de una aspergilosis respiratoria.

## Summary

VALUE OF INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE IN THE DIAGNOSIS OF RESPIRATORY ASPERGILLOSIS

After a brief introduction on the technique of indirect immunofluorescence, the authors expound on the material and methodology used in their study and analyze the results obtained with this technique for 13 patients affected with respiratory aspergillosis.



## BIBLIOGRAFIA

1. PEPYS, J. RIDDEL, R. CITRON, K. CLAYTON, Y.M. y SHORT, E.: Clinical and immunologic significance of aspergillus fumigatus in the sputum. *Am. Rev. Res. Dis.*, 80: 167, 1959.
2. DROUHET, E. TABET-DERRAZ, D. SANCHEZ-SOUSA, A. y VIVIANI, M.A.: Application de l'immunoelectrophorese bidimensionnelle au diganostic des aspergilloses et a la standardisation des antigenes aspergillaires. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.*, 2: 7, 1973.
3. A. GINEL, LIBRERO, M. BREA, P. y TORRES CANSINO, M.: Aspergiloma intracavitario, análisis de nuestra experiencia. *Arch. Bronconeumol.*, 13: 133, 1977.
4. GARIN, J.P. y AMBROISE-THOMAS, P.: Le diagnostic serologique de la Toxoplasmose par la methode des anticorps fluorescents. *Presse Med.*, 71: 2.485, 1963.
5. KAUFMAN, L.: The application of fluorescent antibody techniques for the detection and identification of mycotic disease agents. *Mycopathol.* 26: 257, 1965.
6. TÓRRONTERAS, R. Toxoplasmosis en la provincia de Sevilla. Estudios epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y tratamiento. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla. 1976.
7. MARRACK, J.: Nature of antibodies. *Nature*, 133: 292, 1934.
8. EAGLE, M., SMITH, D.E. y VICKERS, P.: The effect of combination with diazo compounds on the immunological reactivity of antibodies. *J. Exp. Med.*, 63: 617, 1936.
9. COONS, A.H. CREECH, H.J. y JONES, R.N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, 47: 200, 1941.
10. COONS, A.H. CREECH, H.J. JONES, R.N. y BERLINER, E.: The demonstration of pneumococcal antigens in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.*, 45: 159, 1942.
11. COONS, A.: Labeled antigens and antibodies. *Ann. Rev. Microbiol.*, 8: 333, 1954.
12. DROUHET, E., CAMEY, L. y SEGRETAIN, G.: Valeur de l'immunoprecipitation et de l'immunofluorescence indirecte dans les aspergilloses broncho-pulmonaires. *Ann. Inst. Pasteur*, 123: 379, 1972.
13. SEGRETAIN, G.: Diagnostic de laboratoire en mycologie médicale. 3.<sup>a</sup> Edt. Maloine. Paris, 1974.