

Géneros fúngicos aislados de pacientes con rinitis alérgica y su relación con la prueba de hipersensibilidad subcutánea de Prick

Alain R. Rodríguez Orozco,¹ Elvia Vargas Villegas,¹ Liliana Tafolla Muñoz,¹
Héctor Ruiz Reyes,¹ Liliam A. Hernández Chávez,² Soledad Vázquez Garcidueñas³

¹ Laboratorio de Inmunología. División de Posgrado. Facultad de Medicina y Ciencias Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. ² Servicio de Alergia del Hospital Vasco de Quiroga (ISSSTE), Morelia, Michoacán, México. ³ Laboratorio de Genética Microbiana. División de Posgrado. Facultad de Medicina y Ciencias Biológicas "Dr. Ignacio Chávez". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México

Fungal genera isolated from patients with allergic rhinitis and their relation with Prick test

Abstract. Skin Prick test was applied to 108 patients with allergic rhinitis from the Hospital Vasco of Quiroga, ISSSTE, placed in Morelia, Michoacan. For the isolation of strains on PDA, nasal and pharyngeal swabs were obtained from patients had a positive skin prick tests for allergenic fungi, being the specimens identified by morphological methods and using a biotypification system (Biolog). The frequencies of positive skin Prick test to allergenic fungi genera were the following: *Candida* 65.7%, *Aspergillus* 15.7%, *Cladosporium* 13.89%, *Alternaria* 10.2%, *Rhizopus* 9.3%, *Helminthosporium* 6.5%, *Penicillium* 5.6% and *Mucor* 4.6%. Statistical correlation between the results of the different methods was not significant ($P > 0,05$), due to several fungal genera identified did not induce detectable hypersensitivity reactions in the subcutaneous test, and the allergenicity of some fungi detected by Biolog system is not known. It is required to continue studying the relation between apparently non allergenic fungi with the atopic host and his pathogenic microbiota.

Key words: Allergenic fungi, microbial identification, Biolog system, Prick test.

Resumen. Se realizaron pruebas de hipersensibilidad cutánea a alérgenos (Prick), a 108 pacientes con rinitis alérgica del Hospital Vasco de Quiroga (ISSSTE) de Morelia, Michoacán. A los pacientes que presentaron respuesta positiva a antígenos de hongos se les practicó un exudado nasal y faríngeo para aislar las cepas en APD, procediendo a identificarlas morfológicamente y por un sistema de biotipificación (Biolog). De acuerdo a la prueba de Prick, los géneros fúngicos más frecuentemente observados fueron: *Candida* 65.7%, *Aspergillus* 15.7%, *Cladosporium* 13.89%, *Alternaria* 10.2%, *Rhizopus* 9.3%, *Helminthosporium* 6.5%, *Penicillium* 5.6% y *Mucor* 4.6%. La correlación entre los resultados de los diferentes métodos no fue estadísticamente significativa ($P > 0.05$), debido a que se identificaron géneros que no indujeron reacciones de hipersensibilidad inmediata detectables por la prueba cutánea y se desconoce la alergenicidad de varios de los hongos detectados por el sistema Biolog. Se requiere continuar estudiando la relación entre hongos aparentemente no alérgicos con el huésped atópico y con su microbiota patógena.

Palabras clave: hongos alérgicos, identificación microbiana, sistema Biolog, prueba Prick.

Received: 26 February 2008; accepted 13 December 2008.

Recibido: 26 de febrero, 2008; aceptado 13 de diciembre 2008.

Autor para correspondencia: Alain R. Rodríguez Orozco
arorozco@hotmail.com

Introducción

La inhalación de estructuras fúngicas puede inducir en personas sensibles, patología alérgica respiratoria, tanto en las vías aéreas superiores como inferiores. Las principales moléculas fúngicas involucradas en la fisiopatología de las alergias respiratorias son glucoproteínas, proteínas y polisacáridos, que pueden desencadenar reacciones de hipersensibilidad de tipo I o anafiláctica, la cual es mediada por la inmunoglobulina E (Chapman *et al.*, 2003). Los hongos más importantes desde el punto de vista alergológico, por su elevada cantidad en el ambiente y potencia alergénica, pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Aureobasidium*, (Sabariego Ruiz *et al.*, 2004, Ruiz-Reyes y Rodríguez-Orozco, 2006, Martínez *et al.*, 2002), y a basidiomicetos tales como *Schizophyllum commune* (Buzina *et al.*, 2003).

La importancia de los hongos como fuente de aeroalergenos no depende solo de su antigenicidad, sino también de su presencia en el ambiente y su proliferación, transporte y depósito en las mucosas de un huésped susceptible (Robinson *et al.*, 2004). Cuando se inhalan los hongos, en su tránsito por la nariz quedan atrapados en las fimbrias y se ponen en contacto con la mucosa nasal. Esta situación puede originar cultivos positivos en secreciones nasales aparentemente normales. No basta el aislamiento de alguna especie fúngica de la mucosa de un huésped alérgico para inferir que éste sea la causa de la alergia respiratoria, ya que estos hallazgos deben interpretarse junto con el cuadro clínico de la enfermedad y con otros tipos de estudios, por ejemplo: presencia de eosinófilos en la mucosa nasal y/o citocinas IL-4 e IL-5 en lavados nasales (Ruiz-Reyes y Rodríguez-Orozco, 2008), y las pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata para antígenos fúngicos (Braun *et al.*, 2003).

Por otra parte, los procedimientos habitualmente empleados para el aislamiento e identificación de los hongos implicados en las enfermedades fúngicas llevan mucho tiempo y en ocasiones son laboriosos, ya que algunos hongos son de crecimiento lento y sus cultivos deben incubarse 3 a 4 semanas antes de ser descartados como negativos. Estos problemas pueden evitarse empleando técnicas moleculares o métodos rápidos de biotipificación, sumamente útiles cuando hay un número elevado de muestras (Kobayashi, 1995) y que complementa la caracterización genética y morfológica de los aislamientos. Uno de los equipos más utilizados es producido por la compañía Biolog, Inc. (Klingler *et al.*, 1992; Praphailong, 1997).

El objetivo de este trabajo fue identificar géneros fúngicos aislados en las mucosas nasal y faríngea de individuos con diagnóstico de rinitis alérgica, los cuales presentaban síntomas alérgicos al momento de la toma de la muestra, y comparar estos resultados con los obtenidos mediante prueba de hipersensibilidad inmediata a alérgenos fúngicos realizadas por el método Prick, con la finalidad de determinar si la caracterización de los aislados puede complementar el diagnóstico alergológico convencional obtenido con la prueba cutánea.

Materiales y métodos

Obtención de las muestras

Participaron 108 pacientes con rinitis alérgica, de ambos sexos y mayores de 10 años de edad, diagnosticados por personal médico especializado del Hospital Vasco de Quiroga del ISSSTE. El 73.15 % de los pacientes padecían también asma. El estudio se realizó de mayo a julio de 2003.

Pruebas de hipersensibilidad cutánea a alérgenos (Método Prick)

Se utilizaron extractos alérgicos en una concentración 1:20

p/v (Allerstand), de los hongos *Alternaria* sp, *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Helminthosporium* sp., *Cladosporium* sp, *Mucor* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. La inoculación de los alérgenos se realizó con lancetas estériles Duotip-Test (Lincoln Diagnostic), empleando la técnica por rotación a 360° para la penetración del alérgeno en la piel de la cara flexora del antebrazo. En todos los casos se emplearon controles positivo [solución de fosfato de histamina (1 mg/mL)] y negativo (solución amortiguadora de fosfatos). La interpretación de las reacciones cutáneas contra los diferentes alérgenos se basó en las indicaciones del proveedor.

Toma de muestras y procesamiento

A los pacientes que resultaron positivos con la prueba de hipersensibilidad cutánea (Prick) se les tomaron muestras con un hisopo estéril de exudados nasal y faríngeo, inoculándolas en medio de cultivo Stuart (Bioxon) para su posterior procesamiento.

Para el aislamiento de los hongos, las muestras obtenidas fueron sembradas en medio de agar con papa y dextrosa (APD) (Bioxon). Las cajas se incubaron a 37°C y 26°C, y fueron observadas cada 24 h hasta detectar el crecimiento de los micelios. Las muestras con crecimiento micelial se sembraron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, para obtener un cultivo puro de cada especie fúngica. El proceso de resiembra se repitió al menos dos veces y posteriormente los hongos aislados se identificaron por las características macromorfológicas de los micelios desarrollados: tamaño, forma, color en la superficie o en el reverso, textura, índice de crecimiento micelial y difusión del pigmento. Para esto última característica se realizaron preparaciones por disociación montadas en azul de lactofenol. En las observaciones microscópicas se determinó el grosor, presencia o ausencia de septos, números de núcleos, forma y tamaño de esporas, talo y aparato conidiógeno del micelio (Joklik, 1994; Barnett y Hunter, 1998). Además, se estimó el índice de crecimiento micelial basándose en la

medición diaria de los diámetros de los micelios, durante 3 semanas de incubación.

Identificación de las especies fúngicas por sistema Biolog

El medio BUG™ se preparó según indicaciones del proveedor (Ff Inoculating Fluid, Biolog). Las cepas mantenidas en APD fueron sembradas en el medio BUG™ (Biolog) agar, adicionado con maltosa al 2%, para hongos filamentosos. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 5 a 10 días, hasta obtener un crecimiento adecuado para su identificación.

Una vez desarrollado el hongo, se removió el micelio de la superficie de la placa de agar con una varilla de vidrio estéril y se colocó dentro de un tubo de vidrio seco. El hongo se maceró hasta su pulverización y se agregaron 3 mL del medio BUG™. La suspensión de hongos filamentosos se colocó sobre el reservorio multicanal estéril, y se incubó a 26 °C, realizando la lectura tras 24, 48, 72 y 96 horas de incubación. Las reacciones positivas para hongos se pusieron de manifiesto por una reacción de turbidez.

Análisis estadístico

Se expresaron las frecuencias de las especies de hongos alérgicos causantes de hipersensibilidad en la muestra estudiada. Para relacionar las pruebas *in vivo* (pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata positiva a antígenos fúngicos) y las pruebas *in vitro* (caracterización macro y microscópica de los aislados y sistema Biolog) se utilizó la prueba de correlación de Pearson, aceptando un nivel de significación del 95%.

Resultados

De los 108 pacientes participantes el 65.74% de los pacientes resultaron positivos a la prueba de Prick para los antígenos de *Candida* sp, seguido por *Aspergillus* sp. (15.74%) y *Cladosporium* sp (13.89%).

De los exudados nasales analizados por el sistema Biolog se obtuvieron 127 cepas, 83 pertenecientes a hongos filamentosos y 44 a levaduras, siendo los géneros más frecuentes: *Candida* 40.74%, *Penicillium* 18.52% , *Aspergillus* 13.89% y *Alternaria* 12.96%; mientras que en los exudados faríngeos se aislaron 69 cepas, 41 provenientes de hongos filamentosos y 28 de levaduras. *Candida* 25.93%, *Aspergillus* 10.19% y *Penicillium* 7.41% fueron los géneros más frecuentemente observados (Tabla 1).

Los pacientes presentaron entre una a tres respuestas positivas a algún género fúngico de acuerdo a la prueba cutánea, y entre una a dos respuestas positivas con el sistema Biolog.

En la Tabla 1 se citan los 16 géneros fúngicos aislados de los exudados nasales y faríngeos y las frecuencias de reacciones positivas en la prueba de cutánea. No existió correlación entre los resultados de la pruebas Prick y Biolog, ni con los resultados de la caracterización morfológica de los

aislados provenientes de exudados nasales y faríngeos ($r=0.210$; $p>0.05$).

Discusión

Entre los padecimientos alérgicos, la rinitis ocupa el primer lugar en frecuencia (Sacre Hazouri, 2006; Bartra y Shoenwetter 2000). La exposición a fragmentos de micelios, conidios, toxinas y otros metabolitos de los hongos en el hábitat donde más tiempo permanece el paciente alérgico (casa, escuela o trabajo) tiene resultados complejos con efectos inmunológicos desconocidos, que parecen favorecer la sensibilización alérgica, la que a su vez tiene relación directa con la atopía.

En el presente trabajo, los aislados fúngicos con mayor frecuencia observados en las diferentes pruebas empleadas fueron: *Candida*, *Aspergillus*, *Cladosporium*,

Alternaria, *Penicillium* y *Mucor*. De acuerdo a García Caballero *et al.* (2001), estos géneros están dentro de los más frecuentemente asociados a reacciones de hipersensibilidad y alergias respiratorias. Otros géneros encontrados con menor frecuencia fueron: *Absidia*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Eurotium*, los cuales no siguen un patrón de crecimiento estrictamente asociado a las condiciones climáticas. Por otra parte, *Helminthosporium* es poco frecuente en nuestro medio, por lo que la baja concentración de sus estructuras fúngicas justifica, en parte, su difícil aislamiento.

Los datos referidos en la literatura mundial establecen que la aparición de síntomas de asma y rinitis se correlaciona con la densidad de conidios presentes en el ambiente en el cual se desenvuelve el paciente (García Caballero *et al.*, 2001). De acuerdo a los resultados observados en estudios de aerobiología de hongos, se observa una mayor concentración de conidios en el ambiente intramuros, respecto al atmosférico (Bartra, 2003).

Por otra parte, en el presente estudio se encontró una mayor frecuencia de rinitis alérgica en las mujeres (71.3%), en una relación 3:1, con respecto a los varones (28.7%) lo que concuerda con estudios previos (González *et al.*, 2003).

El hecho de considerar el género *Candida* como el que más indujo resultados positivos en la prueba de hipersensibilidad cutánea inmediata, y de ser el organismo más frecuentemente identificado en muestras provenientes de los exudados nasales y faríngeos, nos obliga a preguntarnos si la contribución de este género al proceso alérgico de los pacientes no se esté sobrestimando, máxime si consideramos que *Candida* es parte de la biota normal en cavidad nasal y faringe. Algunos argumentos que pudieran explicar la alta frecuencia de este género en el estudio son, entre otros, que la toma de muestras se realizó en presencia de síntomas alérgicos de los pacientes y que las prueba de Prick detectó reacciones inmediatas a alérgenos fúngicos mediadas por anticuerpos IgE, los cuales inducen una reacción cutánea

positiva en pacientes atópicos sensibilizados con este hongo, ya que la prueba cutánea es negativa en individuos no atópicos o en atópicos no sensibilizados con el hongo.

Con respecto a este punto, son necesarios estudios sobre inmunogenética y ecología que permitan identificar las relaciones de la microbiota del paciente alérgico y aspectos genéticos de la respuesta del huésped, con la finalidad de determinar las condiciones que propician que un género que forma parte de la biota normal devenga en alérgico, en individuos con predisposición alérgica (atópicos).

Por otro lado debemos considerar que diferentes estructuras fúngicas se encuentran de manera ubicua en el medio ambiente y pueden estar presentes al momento de la toma de muestra, pero no necesariamente ser parte de un proceso alérgico. Respecto al diagnóstico de alergias, las pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata a hongos son más específicas que los estudios micro y macroscópicos, debido a que los extractos alérgicos utilizados en las pruebas de Prick contienen los epítopes específicos que inducen alergia y desencadenan reacciones de hipersensibilidad inmediata mediada por anticuerpos IgE, y estas pruebas permiten estimar las sensibilizaciones que pudieran relacionarse con los síntomas alérgicos.

El sistema Biolog fue una herramienta útil para complementar la identificación de los aislados fúngicos, pero al igual que la caracterización morfológica de los géneros, no son técnicas útiles para explorar la alergenidad de los aislados y usarlos como complemento del diagnóstico alérgico convencional, debido a su costo y lentitud en obtener resultados. Además, en este estudio no se observó una correlación significativa con los resultados de las pruebas para demostrar hipersensibilidad cutánea inmediata.

En conclusión, se desconoce aún la alergenidad de varias especies fúngicas y su participación en las patologías alérgicas, así como en los mecanismos de defensa a nivel de las mucosas. Es por ello que el empleo de técnicas morfológicas y otras que usen principios bioquímicos y

Tabla 1. Principales géneros de hongos detectados por la prueba cutánea de Prick y aislados a partir de los exudados nasales y faríngeos

Hongo	Prueba cutánea positiva a hongos		Exudado nasal		Exudado faríngeo	
	¹ Nº	² %	Nº	%	Nº	%
<i>Candida</i> sp.	71	65.74	44	40.74	28	25.93
<i>Aspergillus</i> sp.	17	15.74	15	13.89	11	10.19
<i>Cladosporium</i> sp.	15	13.89	11	10.19	4	3.7
<i>Alternaria</i> sp.	11	10.19	14	12.96	4	3.7
<i>Rhizopus</i> sp.	10	9.26	—	—	5	4.63
<i>Helminthosporium</i> sp.	7	6.48	—	—	—	—
<i>Penicillium</i> sp.	6	5.56	20	18.52	8	7.41
<i>Mucor</i> sp.	5	4.63	4	3.7	3	2.78
<i>Absidia</i> sp.	—	—	7	6.48	—	—
<i>Neurospora</i> sp.	—	—	7	6.48	4	3.7
<i>Eupenicillium</i> sp.	—	—	2	1.85	—	—
<i>Fusarium</i> sp.	—	—	1	0.93	—	—
<i>Neosartorya</i> sp.	—	—	1	0.93	—	—
<i>Paecilomyces</i> sp.	—	—	1	0.93	—	—
<i>Acrodontium</i> sp.	—	—	—	—	1	0.93
<i>Eurotium</i> sp.	—	—	—	—	1	0.93

¹ Número de pacientes; ² Porcentaje de pacientes.

fisiológicos para identificar los aislados fúngicos, deben aplicarse en congruencia con los hallazgos clínicos y los resultados de las pruebas cutáneas y de laboratorio clínico. Se requiere continuar estudiando la relación entre hongos aparentemente no alergénicos con hospederos atópicos y microbiota patógenas, así como la contribución de estos fenómenos a la respuesta alérgica del paciente.

Literatura citada

- Castellano, M.A., J.M. Trappe, Z. Maser, C. Maser, 1989. Key to spores of the genera of hypogeous fungi of north temperate forests with special reference to animal mycophagy. Mad River Press, Eureka, California.
- Barnett, H.L., B.B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th edition American Phytopathological Society Press. Saint Paul, 218 p.
- Bartra, J.T., 2003. Mapa fúngico y estudio multicéntrico de sensibilización a hongos en Cataluña. *Alergología e Inmunología Clínica* 18: 106-121.
- Bartra, J.T., M.D. Shoenwetter, 2000. Rinitis alérgica: epidemiología e historia natural. *Allergy and Asthma Proceedings* 14: 1-7.
- Braun, H., H. Stammberger, W. Buzina, K. Freudenschuss, Lackner A, Beham A., 2003. Incidence and detection of fungi and eosinophilic granulocytes in chronic rhinosinusitis. *Laryngorhinootologie* 82: 330-340.
- Buzina, W., H. Braun, K. Freudenschuss, 2003. The basidiomycete *Schizophyllum commune* in paranasal sinuses. *Revista Medica de Micología* 46: 23-27.
- Chapman, J.A., A.L. Terll, R.L. Jacobs, E.N. Charlesworth, E.J. Bardana, 2003. Toxic mold: phantom risk vs science. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 91: 222-232.
- García Caballero, R., O. Nader, B. Morfin Maciel, 2001. Correlación entre pruebas cutáneas positivas a hongos, IgE total e IgE específica para ELISA y cultivos de hongos en el medio ambiente de pacientes pediátricos. *Revista Alergia México* 48: 137-140.
- González, H.J., V.J. Gómez, S.M. Orea, S.G. Flores, N.R. Ruiz, 2003. Hiperrespuesta de las vías aéreas en los pacientes con rinitis alérgica y no alérgica. *Revista Alergia México* 50: 86-90.
- Joklik, W. K., H. P. Willett, B. Amos, C. M. Wilfert (eds.), 1994. *Zinsser Microbiología*, 20^a ed. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, 1696 p.
- Klingler, J.M., R.P. Stowe, D.C. Obenhuber, T.O. Groves, S.K. Mishra, D.L. Pierson. 1992. Evaluation of the BIOLOG automated microbial identification system. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2089-2092.
- Kobayashi, G.S., 1995. Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. *Archives Medical Research* 28: 293-296.
- Martínez, R.V., C. Castañeda, G. Esquivel, S.J. Lazo, V. Velasco, 2002. Fungoesporas en el hábitat del paciente asmático en una zona semidesértica en México. *Revista Alergia México* 49: 2-7.
- Praphailong, W., M. Van Gestel, G.H. Fleet, G.M. Heard, 1997. Evaluation of the BIOLOG system for the identification of food and beverage yeasts. *Letters in Applied Microbiology* 24: 455-459.
- Robinson, D.S., M. Larche, S.R. Durham, 2004. Tregs and allergic diseases. *Journal of Clinical Investigation* 114: 1389-97.
- Ruiz-Reyes, H., A.R. Rodríguez-Orozco, 2006. Alergenos fúngicos: importancia de la estandarización de alergenos fúngicos y su aplicación en la práctica clínica. *Revista Alergia México* 53: 144-149.
- Ruiz-Reyes, H., A.R. Rodríguez Orozco, 2008. Expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 durante la respuesta inmunitaria *in vitro* a alérgenos fúngicos. *Revista Alergia México* 55: 181-188.
- Sabariego Ruiz, S., C. Díaz de la Guardia, F. Alba Sánchez, 2004. Estudio aerobiológico de los conidios de *Alternaria* y *Cladosporium* en la atmósfera de la ciudad de Almería. *Revista Iberoamericana de Micología* 21: 121-7.
- Sacre Hazouri, J.A., 2006. Rinitis alérgica. Enfermedades coexistentes y complicaciones. Revisión y análisis. *Revista Alergia México* 53: 9-29.