

MEDIOS DIAGNÓSTICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS AGENTES CAUSALES DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD

DIAGNOSTIC MEANS FOR IDENTIFICATION OF NEW CAUSAL AGENTS OF PNEUMONITIS BY HYPERSENSITIVITY

Nidia Labarrere Sarduy¹
Alexis Labrada Rosado²
Hilda Pauste Ruiz³
Ibis Ávila Roque⁴
María Elena Guevara Andreu⁵
Elisa Fasenda Ramos⁶

RESUMEN

Con el objetivo de proveer nuevos medios diagnósticos obtenidos a partir de los hongos *Beauveria bassiana* (Bb), *Metarhizium anisopliae* (Ma), *Verticillium lecanii* (Vl) y *Trichoderma spp* (T), se aíslan e identifican las proteínas antigénicas de estos hongos a partir de los extractos antigénicos. Las proteínas fueron caracterizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y electroinmuno transferencia. Se emplearon diferentes métodos tales como el test de ELISA, inmunoelectroforesis inmunodifusión (Ouchterlony), hemoaglutinación pasiva y aglutinación por látex, entre otros, para la prueba de los antígenos. La eficacia diagnóstica del método ELISA con los antígenos obtenidos, expresada a través de la sensibilidad y la especificidad en individuos no expuestos, fue adecuada. La sensibilidad combinada de las 4 pruebas fue de 91%, mientras que la especificidad en individuos no expuestos a dichos antígenos fue de 90-95% para cada antígeno por separado, y de 85% para la combinación de todos.

Palabras clave: medios diagnósticos, bioplaguicidas, agente etiológico

ABSTRACT

The antigenic proteins obtained from fungus *Beauveria bassiana* (Bb), *Metarhizium anisopliae* (Ma), *Verticillium lecanii* (Vl) y *Trichoderma spp* (T) are isolated and identified through the antigenic extracts. Those proteins are characterized by electrophoresis in gel of polyacrilamide with dodecil sodium sulphate and immunoelectric transference. Different methods such as ELISA test, immunoelectrophoresis, immunodifusion (ouchterlony), passive hemoagglutination and latex agglutination, among others, were applied for the test of antigens. The diagnostic efficiency of ELISA method with the obtained antigens, expressed through the sensitivity and the specificity in unexposed individuals, was adequate. The combined sensitivity of the four tests was 91%, while the specificity in unexposed individuals to such antigens was 90-95% for each separate antigen, and 85% for the combination of all.

Key words: Diagnostic means, biopesticides, etiologic agent

INTRODUCCIÓN

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) o alveolitis alérgica extrínseca (AAE) no es más que la inflamación del parénquima pulmonar inducida inmunitariamente, que afecta las paredes alveolares y las vías respiratorias terminales a consecuencia de la inhalación de algunos polvos orgánicos y de otros agentes, por un huésped susceptible^{1,2}. Las neumonitis por hipersensibilidad pueden diagnosticarse a partir de los síntomas referidos por el paciente, la radiografía de tórax y las pruebas funcionales respiratorias, ya que presentan características clínicas, radiológicas y anatomopatológicas muy similares, pero esto sólo aporta un diagnóstico general de la enfermedad y no su agente causal, que es lo que varía y le da identidad a la enfermedad. La identificación de anticuerpos específicos contra el agente causal en el suero de las personas con NH clínicamente demostrable, brinda el diagnóstico definitivo y específico de la enfermedad.

Existen muchos microorganismos que pueden ocasionar la enfermedad; por ejemplo, las esporas del hongo *Cryptosoma corticales*, ('pulmón de los descortezadores de arce'), el *Thermoactinomyces vulgaris* (bagazosis y el 'pulmón del granjero'), el *Aspergillus clavatus* ('pulmón de los trabajadores de la cebada'), el *Penicillium frequentans* (suberosis), el *Aspergillus*

¹ Médico especialista de I grado en Microbiología, máster en Salud de los Trabajadores, Investigadora Agregada, Profesora Asistente. Departamento de Riesgos Químicos y Biológicos, Vicedirección de Higiene del Trabajo, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

² Licenciado en Bioquímica. Doctor en ciencias, Investigador Auxiliar. Centro Nacional de Biopreparados. La Habana, Cuba

³ Médico especialista de I grado en Inmunología. Doctora en Ciencias. Hospital clínico quirúrgico Julio Trigo, La Habana, Cuba

⁴ Médico especialista de I grado en Medicina General Integral, máster en Salud Ambiental, Investigadora Agregada, Profesora Asistente. Vicedirección de Investigaciones y Docencia, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba

⁵ Licenciada en Tecnología de la Salud. Departamento de Riesgos Químicos, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba.

⁶ Licenciada en Microbiología, Investigadora Auxiliar. Centro Nacional de Biopreparados, La Habana, Cuba

Correspondencia:

Nidia Labarrere Sarduy
Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores
Calzada de Bejucal km 7 1/2, apartado 9064, CP10 900, Arroyo Naranjo, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: heliadora.diaz@infomed.sld.cu

versicolor ('caseta del perro'), el *Aureobasidium pullulans* (sequoioisis), los antígenos de las plumas, las deyecciones y el suero de las palomas y el 'pulmón de los criadores de aves', entre otros³⁻⁷.

Se conoce de la existencia de medios diagnósticos comerciales elaborados por Greer Laboratories Inc para el diagnóstico in vitro de la neumonitis por hipersensibilidad. Estos medios, tanto por separado como en kits, posibilitan el diagnóstico de los siguientes agentes causales de la enfermedad: *Thermoactinomyces vulgaris*, *Micropolyspora faeni*, *Aspergillus fumigatus*, *Aureobasidium pullulans* y *Pigeon serum* ('suero de paloma')⁸.

Se conoce a través del catálogo de 1989 n° 17273, de la firma Diagnostic Pasteur, la existencia de medios diagnósticos por separados y polivalentes para la identificación por test de inmunoprecipitación de anticuerpos contra *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *A. terreus* en el suero de personas expuestas a *Aspergillus*, microorganismo que puede también ser causa de NH.

Se ha demostrado por investigaciones realizadas en el Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores de Cuba (INSAT)⁹ que los hongos *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Trichoderma spp* y en especial *Beauveria bassiana*, son capaces de producir NH en los trabajadores expuestos⁹. No se ha reportado previamente la existencia de medios diagnósticos específicos para la identificación de la neumonitis por hipersensibilidad provocada por la inhalación de las esporas de estos hongos, por lo que nos propusimos elaborar los antígenos específicos para la detección de anticuerpos en el suero de personas expuestas con diagnóstico presuntivo de neumonitis por hipersensibilidad.

Tabla 1
Caracterización de los extractos por electroforesis de proteínas

Hongo	Bandas (PM) (KDa)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bb	17	18	38	43	57	61	66	-	-
Ma	18	20	28	35	39	48	53	57	71
Tsp	10	12	18	22	32	44	58	70	95
VI	10	12	18	22	32	44	58	70	95

Fuente: investigación realizada (registro del laboratorio del Centro Nacional de Biopreparados)

La prueba de Western Blotting para los anticuerpos IgG de los sujetos expuestos reconocieron preferentemente los componentes 18, 32, 43, 48, 63 y 72 KDa en los antígenos obtenidos de los bioplaguicidas, los que se expresan en la tabla 2, y el perfil de inmunoreactividad supera el 50% de frecuencia de reconocimiento para uno o más preparados.

La eficacia diagnóstica del método ELISA con los antígenos obtenidos, expresada a través de la sensibilidad y la especificidad en individuos no expuestos, ha

MATERIAL Y MÉTODO

Se aíslan e identifican las proteínas antigénicas de los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* y *Trichoderma spp* a partir de sus extractos antigénicos, las que son caracterizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y electroinmuno transferencia (Western-blotting). Los preparados antigénicos se obtuvieron a partir de cepas de estos hongos empleados comúnmente en la elaboración de bioplaguicidas. El contenido de proteínas típico para cada preparado fue determinado según el método de Lowry con patrón de seroalbúmina bovina. Para la prueba de los antígenos se emplearon diferentes métodos: inmunoenzimático de (ELISA), inmunodifusión (ouchterlony) y hemo-aglutinación Pasiva, aglutinación por látex, entre otros, utilizándose para ello los sueros de 67 sujetos expuestos sintomáticos y de un grupo control de 40 no expuestos a este factor de riesgo. Los resultados se expresan en tablas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de proteínas típico para cada preparado fue de 20-30% para Bb, 33-49% para Ma, 34-50% para T, y 26-38% para VI, determinado según el método de Lowry, y su composición obtenida mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) (tabla 1), en que se refleja la presencia de hasta 9 componentes con pesos moleculares de entre 10 y 95 KDa.

sido adecuada. La sensibilidad combinada de las 4 pruebas fue de 91%, la cual es superior al diagnóstico con cada antígeno por separado: La especificidad en individuos no expuestos a dichos antígenos es de 90-95% para cada antígeno por separado y de 85% para la combinación de los cuatros. De ese modo, el medio es útil para confirmar el diagnóstico en individuos expuestos sintomáticos e identificar el agente etiológico específico causante de la enfermedad

Tabla 2
Frecuencia e intensidad (X) de las bandas antigénicas en Western Blotting para cada microorganismo:

PM (KDa)	Bb		VI		Tsp		Ma	
	Frecuencia (%)	Intensidad						
123	-	-	38,7		-	-	-	-
117	-	-	45,2	X	-	-	-	-
105	41		16,1		-	-	-	-
72	87	XX	93,5	XX	-	-	94	XX
63	59	X	93,5	XX	-	-	65	X
54	31		48,4		-	-	29	X
48	-	-	77,4	X	80	XX	61	X
43	-	-	58,1	X	91	XX	42	
40	-	-	-	-	-	-	10	
37	-	-	-	-	-	-	26	
34	-	-	25,8		20		23	
32	26	X	29,0		-	-	84	XX
30	-	-	-	-	6		26	
29	26		-	-	-	-	19	
26	-	-	-	-	-	-	6	
20	18		-	-	-	-	6	
18	95	XX	93,5	XX	-	-	19	
16	21		-	-	-	-	-	-

Fuente: investigación realizada (registro del laboratorio del Centro Nacional de Biopreparados)

La reactividad de los sueros contra los cuatro antígenos mostró valores superiores en los individuos enfermos con respecto a los sanos. Se definió un límite de corte para considerar la prueba como positiva, tomando la señal promedio de los individuos sanos

más 2 veces la desviación estándar (DE). De acuerdo a dicho límite de corte, el 91% de los pacientes enfermos resultaron positivos al menos a un antígeno, predominando la respuesta a Bb con un total de 85,1% de positividad (tabla 3).

Tabla 3
Comportamiento de la actividad de los diferentes antígenos según el método ELISA en pacientes expuestos sintomáticos (enfermos) y en individuos no expuestos

Expuestos enfermos	Bb	Ma	Tsp	VI	Combinación
N	67	67	67	66	67
DO promedio	0,840	0,620	0,498	0,583	-
Desviación estándar	0,123	0,244	0,261	0,283	-
N positivos	57	14	17	28	61
%	85,1	20,9	25,4	41,8	91,0
No expuestos	Bb	Ma	Tsp	VI	Combinación
N	40	40	40	40	40
DO promedio	0,397	0,426	0,365	0,333	-
Desviación estándar	0,159	0,179	0,136	0,143	-
DO (valor de corte) (promedio + 2 DE)	0,715	0,783	0,636	0,619	-
P (test de Student con relación a positivos)	1,90E-28	4,12E-05	3,31E-03	2,29E-06	-
N negativos	38	36	38	36	34
%	95	90	95	90	85

DO densidad óptica Fuente: investigación realizada

El resultado del diagnóstico combinado se valoró como positivo cuando se obtuvo una respuesta positiva por lo menos a un antígeno, y se valoró como negativo cuando todas las pruebas individuales fueron negativas.

La efectividad diagnóstica de la combinación de los 4 antígenos resultó superior por cada antígeno separado, alcanzando un nivel alto de sensibilidad (91%) y un valor adecuado de especificidad (85%) (tabla 4).

Tabla 4
Parámetros de efectividad diagnóstica (sensibilidad y especificidad) de los antígenos por separado y de la combinación, según ELISA

Criterio	Bb	Ma	Tsp	VI	Combinación
Sensibilidad (%)	85,1	20,9	25,4	41,8	91,0
Especificidad (%)	95,0	90,0	95,0	90,0	85,0

Fuente: investigación realizada

Como comentario adicional, las NH son un grupo de afecciones infradiagnosticadas, pero que, sin embargo, pueden llegar a ser invalidantes, ya que su padecimiento puede evolucionar hacia la cronicidad con el subsiguiente deterioro de la calidad de vida del enfermo y sus familiares.

No existían reportes de la existencia de medios diagnósticos específicos para la identificación de los agentes causales de las neumonitis por hipersensibilidad que hemos observado en trabajadores expuestos ocupacionalmente a bioplaguicidas provenientes de hongos. Actualmente en Cuba existen más de 300 centros encargados de la reproducción de hongos, entomófagos y entomopatógenos (CREE), con el objetivo de elaborar bioplaguicidas para dar servicios a agricultores estatales y privados, así como a cooperativistas, con alrededor de 3 000 trabajadores expuestos ocupacionalmente. En el caso de los productos de origen fúngico que se emplean para la producción de biopesticidas, estos generalmente se obtienen por métodos artesanales, lo que entraña un riesgo ocupacional.

Nuestro trabajo de investigación consistió en obtener, por primera vez a nivel mundial, 4 medios diagnósticos a partir de cepas certificadas de los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* y *Trichoderma spp*, que son empleadas comúnmente en la elaboración de bioplaguicidas.

No existe referencia en la literatura científica internacional sobre estudios que hayan identificado, obtenido y utilizado para pruebas diagnósticas antígenos a partir de esos hongos específicos causantes de NH, de modo que en este sentido el estudio realizado reviste novedad mundial y alcanza impacto científico a partir de que se obtienen por primera vez en Cuba y en el mundo extractos antigénicos para el diagnóstico etiológico de la enfermedad denominada neumonitis por hipersensibilidad ocasionada por bioplaguicidas provenientes de hongos, por lo que se le concedió por parte de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial el certificado de invención correspondiente¹⁰.

BIBLIOGRAFÍA

- Benfer H, Caldweil JL, Ayoub EM. Enfermedades pulmonares y cardíacas. En: Inmunología Básica y Clínica. La Habana, Edición Científica Técnica; 1987. p. 552-89.
- Segarra F. Enfermedades broncopulmonares de origen profesional ocupacional. 1ª ed. Barcelona: Editorial Labor SA; 1985. p. 431-62.
- Berkow R. El Manual Meck de diagnóstico y terapéutica. 7ª ed. La Habana: Editorial Científico Técnica; 1988. p. 86-92.
- Pepys J, Jenking GN, Festenstein PH, Lacey G, Skinner FA. Farmer lung antigen. Lancet 1963;2:607-11.
- Fink JN. Hypersensitivity pneumonitis. En: Ker Patrick CH, Reynolds HY, ed. Immunologic and infectious reactions on the lung. Lung Biology in Health and Disease 1976;1:229-41.
- Barboriak JJ. Pigeon breeder' disease. A clinical study of hypersensitivity pneumonitis. Ann Intern Med 1968;68:1205-19.
- Peckerin CAC, Taylor J. Extrinsic allergic bronchiolites (hypersensitivity pneumonia). En: Perker R. Occupational lung disorders. Oxford: Butterworth Heinmann 1994. p. 667-709.
- Edwards JH. The double method of producing farmer's lung antigens. J. Lab Clin Med 1972;79:683.
- Labarrere N, Hechavarría JH, León E, Pauste H, Castellanos JA, Guevara ME, Valderrama MJ, La Rosa J. Estudio de un grupo de trabajadores expuestos a *Beauveria bassiana*. Revista Cubana de Salud y Trabajo 2000;1(1):36-7.
- Labarrere N, Labrada A, Pauste CH, Ávila I, Guevara ME, Fascenda E, Carol H. Medios diagnóstico para la identificación de agentes causales de neumonitis por hipersensibilidad a bioplaguicidas. Cuba Nº 32140 CH, Res. Nº 849/ 2006. La Habana: Oficina Cubana de la Propiedad Industrial; 2006.

Recibido: 08 de mayo de 2009

Aprobado: 12 de mayo de 2010