

ASPERGILOSIS BRONCOPULMONAR ALERGICA

ESTUDIO EN PACIENTES ASMATICOS

B. BOLAÑOS, A RESTREPO

Tratando de establecer la presencia de aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABA) en nuestro medio, se llevó a cabo un estudio en 342 pacientes asmáticos crónicos. Se practicaron pruebas cutáneas (multipunción e intradermorreacción) con extractos de *A. fumigatus*. En los individuos reactivos se hicieron pruebas serológicas con antígenos de *Aspergillus*, determinación de eosinofilia tanto pulmonar como periférica y estudios radiológicos.

Se encontró que 31 pacientes (9%) tenían hipersensibilidad a los extractos de *A. fumigatus*; 14 (4.1%) de ellos, presentaron además una respuesta intermedia positiva a las 6 horas. De estos 14 pacientes, 4 reunían todos los criterios primarios para el diagnóstico de ABA, a saber, asma, infiltrados pulmonares con eosinofilia periférica e hipersensibilidad cutánea dual a los extractos de *A. fumigatus*. Sin embargo, solo se logró establecer el diagnóstico en 3 pacientes, quienes pre-

sentaban además precipítinas contra el hongo y cambios radiológicos de tipo crónico. La descripción de estos casos indica la necesidad de considerar la aspergilosis broncopulmonar alérgica en el diagnóstico diferencial de procesos asmáticos crónicos.

INTRODUCCION

El término "Aspergilosis" se aplica a un grupo de enfermedades que tienen en común el ser causadas por hongos del género *Aspergillus* (1-3). La capacidad más notoria de los miembros de este género es la de crecer en sustratos muy diferentes, bajo un rango amplio de condiciones ambientales, logrando proliferar en suelos, vegetales en descomposición y en general, en cualquier tipo de material orgánico (1-3).

Aunque el hongo se halla presente en forma constante en el medio ambiente, sólo unas cuantas de las 150 especies descritas han sido implicadas, consistentemente, en afecciones del hombre y de los animales. El *Aspergillus fumigatus* es la especie más frecuentemente responsable de tales afecciones; con menor frecuencia se han incriminado otras especies tales como: *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* y *A. clavatus* (1-3).

Las esporas del *Aspergillus* son livianas y pueden ser dispersadas fácilmente por el

Trabajo realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín.

Dr. Benjamín Bolaños R.: Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad del Valle, Cali; Dra. Angela Restrepo M.: Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB), Hospital "Pablo Tobón Uribe", Medellín.

Solicitud de separatas al Dr. Bolaños.

aire. Por consiguiente, un gran número de personas suelen inhalar altas concentraciones de esporas sin infectarse, ya que normalmente, los mecanismos de limpieza y de defensa del tracto respiratorio se encargan de desalojarlas (4). Sin embargo, en ciertas personas con una serie de factores predisponentes, el *Aspergillus* puede invadir o colonizar varios órganos y sistemas, produciendo diversas formas clínicas de Aspergillosis (2-4).

Con respecto a la aspergilosis pulmonar, la siguiente es la clasificación más aceptada (2-5).

1. Forma invasiva: existe evidencia de invasión pulmonar, con compromiso de las paredes bronquiales; puede producirse la invasión sistémica, que es generalmente mortal. Esta forma ocurre en pacientes con compromiso del sistema inmune, o con alteraciones fisiológicas marcadas.

2. Forma colonizante o aspergiloma: hay crecimiento restringido del hongo, el cual se localiza en tejidos previamente lesionados, por ejemplo, en cavernas. No ocurre invasión del tejido y el crecimiento es saprofito, a nivel local.

3. Forma alérgica: comprende dos variedades a saber:

a) Asma de tipo extrínseco: reacción de hipersensibilidad a la inhalación de esporas de *Aspergillus*; esta forma no se diferencia de la producida por la inhalación de otros alérgenos como polvo, polen, etc.

b) Aspergilosis broncopulmonar alérgica: las esporas inhaladas no solo causan hipersensibilidad, sino que logran desarrollarse en la luz bronquial, aunque sin producir compromiso tisular. Como consecuencia se producen ciertos signos y síntomas característicos.

La aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABA) fue descrita por primera vez por Hinson, Moon y Plummer (6) en Inglaterra en 1952.

En 1959, Pepys (7) encontró que los pacientes con la entidad presentaban reactividad cutánea de tipo inmediato, así como reactividad bronquial y anticuerpos precipitantes para antígenos de *Aspergillus*.

Inicialmente, se consideró esta nueva entidad como una rareza, pero actualmente se la reconoce como una de las causas más frecuentes de lesión pulmonar en Inglaterra

(8,9). En Norteamérica, la entidad viene siendo descrita con frecuencia en los últimos años (10-12).

La ABA además de causar molestias respiratorias, puede originar lesiones permanentes tales como bronquiectasias, fibrosis apical y obstrucción progresiva de los conductos respiratorios que, eventualmente, llevan al paciente a una falla respiratoria (13-17).

Actualmente se han configurado ciertos requisitos para clasificar una afección respiratoria como ABA y diferenciarla de otras entidades clínicamente similares (neumonía tipo Loeffler, tuberculosis, eosinofilia pulmonar, parasitosis, enfermedad de Hodgkin, granuloma eosinofílico, bronquitis, carcinoma, etc.). Los requisitos mencionados han sido catalogados en dos grupos, criterios primarios y criterios secundarios, como sigue (14, 16-19):

Criterios primarios:

1. Historia de asma extrínseca, generalmente de larga duración.

2. Infiltrados pulmonares con eosinofilia periférica concomitante.

3. Reacción de hipersensibilidad a la inyección cutánea de antígenos derivados de *Aspergillus fumigatus* y manifestada por una respuesta dual, inmediata (roncha y eritema tipo I) a los 15 minutos e intermedia (edema y eritema tipo III) a las 6 - 12 horas.

Criterios secundarios:

1. Evidencia en el suero de precipitinas para los antígenos de *Aspergillus*.

2. Producción de esputos viscosos con presencia de masas y tapones de color café.

3. Aislamiento repetido de *Aspergillus* (principalmente de *A. fumigatus*) a partir de los esputos.

4. Cambios sugestivos de enfermedad pulmonar crónica en la radiografía.

Para diagnosticar la ABA, el paciente deberá llenar todos los criterios primarios y al menos dos de los secundarios (14,16).

En la literatura colombiana, no parece existir estudios sobre la presencia de la ABA. Por ello se consideró interesante realizar un estudio sobre el tema, estableciendo por métodos de laboratorio, unidos a criterios clínicos, la existencia de la entidad en nuestro medio.

El presente informe analiza los resultados del estudio de 342 pacientes as-

máticos, en los cuales se realizaron pruebas intradérmicas y en casos especiales, búsqueda de anticuerpos precipitantes en el suero, determinación de eosinofilia pulmonar y periférica, así como estudios radiológicos.

MATERIAL Y METODOS

Población estudiada. El estudio de los pacientes se realizó entre Julio y Diciembre de 1977; se seleccionaron los enfermos con historia de asma extrínseca crónica, con un mínimo de dos años de evolución, que estuvieran asistiendo con regularidad, para evaluación y tratamiento de su problema respiratorio, a los consultorios de alergias del Instituto de Seguridad Social (ISS) y del Hospital Universitario San Vicente de Paul de la ciudad de Medellín. Los pacientes seleccionados fueron citados a la Sección de Micología de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, en donde les fueron practicadas las pruebas de laboratorio y una encuesta de tipo personal, en la cual constaban datos de la historia clínica, factores predisponentes, tiempo de evolución, tendencia atópica, síntomas clínicos, tratamiento, etc..

Es de anotar que todos los pacientes se encontraban asintomáticos en el momento del estudio.

Preparación de los antígenos:

a) Obtención de los antígenos para pruebas serológicas: se cultivaron individualmente 4 cepas autóctonas, diferentes de *A. fumigatus*, aisladas de pacientes. Se utilizaron las técnicas de Longbottom y Pepys (20), cultivando los hongos individualmente en caldo de Sabouraud con incubación a 37°C. por 4 semanas. Se procedió luego a cosechar los antígenos, filtrando por gasa para separar el micelio; se descartó la masa miceliar, guardándose el filtrado. Este se virió en una membrana de celulosapara diálisis estéril (Tubo para diálisis, porosidad: 4.8 μ ., Arthur H. Thomas Co., Filadelfia Pa.) la cual fue sumergida en agua corriente por 24 horas a temperatura ambiente; a continuación se filtró el material por membrana tipo Millipore de 0.45 μ . Se hicieron pruebas de esterilidad en medio de BHI (Bacto BHI, Difco, Detroit, Mi.) y tioglicolato (Bacto fluid Thioglycolate médium, Difco, Detroit, Mi.) con incubación a 37°C por 6 días. Una vez comprobada la ausencia de gérmenes, el fil-

trado fue liofilizado y conservado como polvo seco a 4°C..

b) Obtención de los antígenos para prueba cutánea: se cultivaron individualmente 3 de las cepas de *A. fumigatus* en los medios y en condiciones idénticas a las de los antígenos para serología, con la diferencia de que, al momento de cosecharse, se utilizó no solo el producto metabólico sino también el micelio del hongo: con una licuadora (Waring Blendor) se homogenizó por 5 a 10 minutos el cultivo total, luego se filtró por gasa para retener el material sólido, sometiendo el filtrado a todos los pasos descritos anteriormente (7,20).

Estandarización de los antígenos:

a) Antígenos para pruebas serológicas: los antígenos preparados en el laboratorio fueron probados simultáneamente con el antígeno de referencia, (suministrado por los Doctores J. Pepys y J. Longbottom, del Cardiothoracic Institute de Londres), mediante la prueba de inmunodifusión en gel de agar, empleándose como controles positivos 2 sueros de referencia de pacientes con ABA y 3 sueros de pacientes con aspergiloma intracavitario.

b) Antígenos para prueba cutánea: los extractos obtenidos en el laboratorio fueron ensayados simultáneamente con los extractos de referencia en 15 personas aparentemente sanas y sin historia de asma, a quienes se les aplicaron 5 pruebas según el siguiente patrón: 1—Antebrazo izquierdo : a) control del medio de cultivo estéril con glicerina en multipunción; b) prueba de multipunción y prueba de intradermorreacción con el extracto de referencia. 2.—Antebrazo derecho: a) pruebas de multipunción e intradermorreacción con el extracto preparado en el laboratorio.

Pruebas cutáneas: el antígeno liofilizado para pruebas cutáneas, se reconstituyó en solución de carbol-salino (solución de Coca) con glicerol al 50% (V/V), a concentraciones de 10, y 0.1 mg. peso seco /ml, según el procedimiento descrito por Pepys y col. (7) y Turner - Warwick y col. (17). Las varias soluciones se centrifugaron a 2.000 R.P.M. durante 10 minutos y se filtraron por membrana esterilizante Millipore 0.45 μ , luego se hizo prueba de esterilidad en medio de BHI y tioglicolato. Una vez demostrada su esterilidad, los

antígenos se conservaron en nevera a 4°C. y fueron utilizados para las pruebas de multipunción e intradérmica.

a) Prueba de multipunción ("Prick test"): utilizando algodón impregnado en alcohol, se desinfectó el antebrazo del paciente; una vez seca el área, se colocó una gota (aproximadamente 0.5 ml.) del antígeno reconstituido, a concentraciones de 10 mg./ml.; se procedió a puncionar la piel repetidamente con una aguja estéril (calibre 26) a través de la gota, con el fin de hacer penetrar el antígeno; se hizo un control (medio de cultivo estéril: glicerol V/V), el cual se aplicó en la misma forma. Después de 15 minutos se leyeron las pruebas considerándose como positivas aquellas con una roncha mayor de 8 mm. rodeada de un área de eritema (reacción tipo I) (21).

b) Prueba Intradérmica: con una jeringa de tuberculina y una aguja calibre 26 ambas desechables, y previo aseo de la piel del antebrazo, se procedió a inocular intradérmicamente un volumen de 0.1 ml. del antígeno a la menor concentración (0.1 mg./ml.) y luego de 15 minutos, se leyó la prueba. Se consideraron positivas las reacciones que mostraban ronchas mayores de 8 mm. (21).

Tanto para la prueba de multipunción como para la intradérmica, se buscó la manifestación de reacciones intermedias (tipo III) después de 6 horas de la aplicación de los antígenos; se aceptaron como positivas aquellas que mostraban edema, infiltración y enrojecimiento mayores de 8 mm..

Es de advertir que las pruebas fueron practicadas siempre en ausencia de droga anti-histamínica.

Pruebas Serológicas. El antígeno liofilizado para serología se disolvió en NaCl al 0.9% adicionado de NaN₃ (Azida de Sodio) al 0.05%, en concentraciones de 30 mg. peso seco/ml.: se centrifugó a 2.000 R.P.M. durante 10 minutos para eliminar cualquier material insoluble y se usó el sobrenadante (7,20).

a) Prueba de Inmunodifusión (ID): para esta prueba se utilizó la base recomendada por Longbottom y Pepys (7) que consta de agar purificado (Difco, Detroit, Mi.) a una concentración del 3% en

solución salina isotónica al 0.9%; una vez disuelto por calentamiento corto, el agar se mezcló con un volumen igual de tampón de ácido cítrico, (pH 7.0), mantenido a 50°C. y que fue preparado como sigue: ácido cítrico 0.1M=18 ml., PO₄ Na₂ 0.2M=82 ml.; como preservativo se adicionó azida de sodio (0.1 gr/100 ml.). El agar, se fundió y se vertió en placas de vidrio (lámina de 76 mm.x51 mm.) en cantidad de 8,5 ml. lo que da un gel con profundidad aproximada de 3.5 mm.. Una vez endurecido el agar se perforaron varias cavidades de acuerdo al siguiente patrón: pozo central (diámetro 12.5 mm.), rodeado a una distancia de 6 mm. por 6 pozos periféricos de 4 mm. de diámetro cada uno (20). Se obturó el fondo de cada cavidad con una gota de agar fundido y por medio de pipetas capilares se colocaron los varios antígenos en la periferia y el suero en el pozo central las placas se incubaron a 28°C. en cámara húmeda por 4 a 6 días, con lecturas diarias. Se consideraron positivos aquellos sueros que produjeran siquiera una banda de precipitado (22). Cuando la prueba fue negativa, el suero del paciente fue concentrado por liofilización 3 a 4 veces y repetido el proceso (23,24).

Con el fin de evidenciar reacciones débilmente positivas, se colorearon las láminas con azul de Comassie G de acuerdo a la técnica de Mackenzie y Philpot (25).

b) Prueba de contrainmunolectroforesis (CIEF): se preparó un medio tamponado así: barbital 3.44 gr., barbital sódico 7.57 gr., agar purificado (Difco, Detroit, Mi.) 50 gr., agarosa (Seakem Agarose, MCI Biomedical, Rockland, Maine) 5.0 gr. y agua destilada hasta 1.000 ml. Los reactivos fueron disueltos por calentamiento a 100°C. ajustándose el pH a 8.2.

Una vez preparado el medio, se fundió y vertió en placas de vidrio (láminas de 76 mm. x 51 mm.), en cantidad de 5.5 ml. lo que da un gel con profundidad aproximada de 1.4 mm.. Una vez endurecido el agar, se perforaron varias cavidades según el siguiente patrón: hileras de pozos para el suero (diámetro 4.5 mm.) separadas por una distancia de 3 mm. de hileras de pozos para el antígeno (diámetro 2.5 mm.). Mediante una jeringa de tuberculina con aguja calibre 26, se depositaron los an-

tígenos (volumen aproximado 10 μ l.) y los sueros (volumen aproximado de 20 μ l.); la contraelectroforesis se efectuó con una solución tamponada de barbital, pH 8.2 (barbital 3.44 gr., barbital sódico 7.57 gr., y agua destilada hasta 1.000 ml.); se aplicó una corriente de 4 v./cm. por un período de 60 a 90 minutos. Se determinó la presencia de bandas de precipitado, por observación inmediata; sin embargo, las placas se incubaron a 28°C. en cámara húmeda, por 2 días para permitir una mejor visualización de los arcos de precipitado (25). Con el fin de evidenciar las reacciones débilmente positivas, se colorearon las placas previo lavado por 2 a 3 días en una solución de 0.4% de tetraborato de sodio y 0.4% de cloruro de sodio, con cambio diario de esta solución; se deshidrató el agar sobre la placa por evaporación y se tiñó con azul de Commasie G. Se consideraron como positivos aquellos sueros que dieron al menos una banda de precipitado con el antígeno (25).

Estudio de los esputos: a excepción de los pacientes sin expectoración se obtuvieron 3 muestras de esputo de la primera expectoración de la mañana, luego de aseo bucal cuidadoso; la muestra se recogió en un frasco estéril y se llevó al laboratorio en un lapso inferior a 2 horas.

Cada muestra fué procesada así:

a) Exámenes directos: se examinó el esputo macroscópicamente tratando de evidenciar la existencia de masas o tapones de color café, buscando los micelios del hongo al microscopio por preparación en fresco con KOH. Si el esputo no presentaba estas masas, se procedió a homogenizarlo, agregándole un volumen igual de pancreatina, (Buffered Pancreatin tablets, Colab Laboratories, Glenwood, Illinois) al 2%, la cual se dejaba por 1 hora en baño de maría a 37°C. Al cabo de este tiempo se centrifugaba la muestra y con el sedimento se hacía examen directo con KOH para buscar micelios del hongo y con el fin de observar la eosinofilia pulmonar, un frote del sedimento para colorear con Wright. Se aceptó como eosinofilia pulmonar, recuentos de eosinófilos mayores del 20% del total de leucocitos presentes en la muestra (13). En caso de disponer de varias muestras, se hizo un promedio.

b) Cultivos: muestras de los tapones macroscópicos o unas asadas del sedimento se sembraron, por duplicado, en los siguientes medios de cultivo: 1: Sabouraud (Bacto Sabouraud dextrose agar, Difco, Detroit, Mi.), simple con antibióticos (0.4mg./ml. de estreptomycin y 20 unidades ml. de penicilina) y 2: Sabouraud modificado (Mycosel agar, BBL, Cockeysville, Maryland) con cloranfenicol 0.05 gr./ml. y ciclohexamida 0.5 gr./ml. Los medios se empacaron en cajas de Petri.

Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente y se observaron cada 2 días; las colonias compatibles con *Aspergillus* fueron identificadas microscópicamente. Las cajas que no evidenciaron crecimiento de *Aspergillus* fueron descartadas luego de 7 días. Sólo se aceptaron como cultivos positivos aquellos en los que se obtuvo abundante crecimiento (más de 10 colonias) en los sitios de la siembra y en las 3 muestras estudiadas (24,26).

Examen de sangre: con el fin de determinar la eosinofilia periférica, los pacientes fueron sangrados en ayunas, obteniéndose, al menos, 2 muestras de sangre en días diferentes; se hicieron recuento de leucocitos y recuento absoluto de eosinófilos; se aceptó como eosinofilia periférica el recuento con promedio mayor de 500 células por mm³ (18, 24, 26).

Comprobación del estado atópico: se tuvo en cuenta para este criterio, la historia clínica familiar del paciente (20).

Examen coprológico: mediante examen de materias fecales, por el método directo, se determinó la presencia de parásitos intestinales que pudieran causar la eosinofilia periférica.

Radiografías: solamente fueron estudiados desde el punto de vista radiológico aquellos pacientes con pruebas cutáneas positivas. A éstos les fue tomada una radiografía estandar postero-anterior del tórax, hecha a 1.8 metros, en el momento de máxima inspiración (examen practicado en el servicio de Radiología del Hospital Universitario San Vicente de Paul) Los resultados de las lecturas fueron clasificados de acuerdo a los parámetros establecidos para las aspergilosis broncopulmonar alérgica (15, 17, 27).

Análisis estadístico: para el análisis de la relación entre las diferentes variables se

empleó la prueba de regresión lineal (r), siendo significativo un índice mayor de 0.5 (28).

En el análisis de los antígenos se empleó la prueba de distribución de t "Student" con muestras pareadas, aceptándose como nivel de significancia uno igual o menor de 0.05 (28).

RESULTADOS

Fueron estudiados por pruebas cutáneas con los extractos de *A. fumigatus*, 342 pacientes asmáticos crónicos. En 31 de ellos (9%) se demostró reactividad inmediata a los 15 minutos; de este último grupo 14 (4.1%) presentaron además reacción a las 6 horas. Estos 14 pacientes fueron seleccionados para los exámenes posteriores.

Pruebas cutáneas y evaluación de los extractos: en todos los casos la reactividad cutánea fue detectada simultáneamente con el extracto de referencia de Pepys (P) y con el preparado en el laboratorio (L); se presentaron, sin embargo, diferencias en el tamaño de las reacciones, que oscilaron entre 8 y 35 mm. Con base en el diámetro de las pruebas cutáneas, se compararon los 2 antígenos, considerándose como iguales aquellas reacciones que diferían solo en 2 mm. y como diferentes, aquellas con variaciones mayores.

Con respecto a la lectura a los 15 minutos con multipunción (Tabla 1), 11 pacientes (35.5%) dieron reacciones de mayor tamaño con el extracto P, mientras

que los 20 restantes (64.5%) tuvieron pruebas de igual tamaño. En la prueba intradérmica, 32.3% de los pacientes presentaron reacciones mayores con P; 9.7% mayores con L, mientras que 58.0% tuvieron reacciones del mismo tamaño. No se demostró una diferencia significativa en la potencia de los extractos en la lectura a los 15 minutos. En cuanto a la lectura de las pruebas tardías y en la multipunción (Tabla 1), 1 paciente (3.2%) dió reacciones de mayor tamaño con el extracto L, mientras que los 13 restantes (41.9%), tuvieron pruebas de igual tamaño. En la prueba intradérmica el 22.6% de los pacientes presentaron reacciones mayores con P, 12.9% mayores con L, en tanto que 9.6% tuvieron reacciones

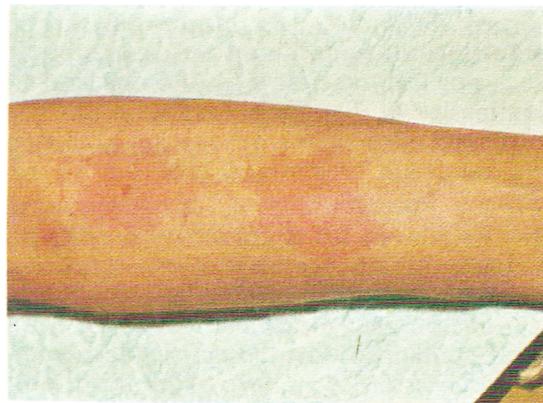


Figura 1: Aspecto de las pruebas cutáneas positivas con extractos de *A. fumigatus*, lectura a los 15 minutos. Prueba de multipunción: Tercio medio del brazo; prueba intradérmica, tercio inferior. Observar la roncha y el eritema.

Tabla 1.- Comparación de las pruebas cutáneas practicadas en 31 pacientes asmáticos crónicos con los extractos de *A. fumigatus*.

Comparación Tamaño Reacciones con los Extractos									
Prueba Cutánea	Tiempo de Lectura	P* = L**		P > L		P < L		Totales	Reactivos
		No.	%	No.	%	No.	%		
Multipunción	15 minutos	20	64.5	11	35.5	0	0	31	100.0
	6 horas	13	41.9	-	-	1	3.2	14	45.1
Intradérmica	15 minutos	18	58.0	10	32.3	3	9.7	37	100.0
	3	3	9.6	7	22.6	4	12.9	14	45.1

*P = Extracto Extracto de Referencia (PEPYS)

** L= Extracto Propio (Laboratorio)

Tabla 2.— *Características de 14 pacientes asmáticos con respuesta dual positiva (15 minutos y 6 horas) a Extractos de A. fumigatus.*

Caso	Edad (años)	Sexo	Evolución Asma Extrínseca (años)	Rayos X (Toráx)	Síntomas Clínicos *	Historia Familiar
1	14	F	7	Infiltrados	+	+
2	46	F	45	Infiltrados	+	+
3	58	F	20	Infiltrados	+	+
4	43	F	24	infiltrados	+	+
5	56	M	20	Infiltrados	+	+
6	11	F	7	Infiltrados	+	+
7	30	F	24	Normal	+	+
8	50	F	20	Normal	+	+
9	32	F	15	Normal	+	+
10	40	F	5	Normal	+	+
11	12	M	11	Normal	+	—
12	10	M	8	Bronquiectasias	+	+
13	33	M	30	Bronquiectasias	+	+
14	46	F	14	Infiltrados	+	—

*Tos, fiebre, sibilancias y expectoración.

de igual tamaño. Una comparación entre estas pruebas, multipunción e intradérmica, demostró que no había diferencia significativa en el empleo de los 2 extractos en la lectura a las 6 horas. La Figura 1 muestra las reacciones positivas de tipo inmediato.

Pruebas serológicas: ni en la ID ni en la CIEF se logró demostrar la presencia de anticuerpos para los antígenos de *A. fumigatus* (P y L) empleados, cuando los sueros obtenidos de los 14 casos fueron ensayados sin concentrar. Al concentrar por liofilización y repetir la ID, se evidenció la presencia de precipitinas en 3 sueros (21.4%): en 1 se obtuvieron 2 bandas y en 2 una sola. Estas reacciones positivas se evidenciaron por igual con ambos antígenos de *A. fumigatus*.

Análisis de la población estudiada: las 14 personas que presentaron respuesta cutánea positiva dual (Tabla 2) tenían edades comprendidas entre 10 y 58 años; 10 eran mujeres y 4 varones. Todos tenían historia de asma extrínseca y síntomas clínicos tales como, sibilancias, fiebre, tos y expectoración; la evolución de la sintomatología osciló ente 5 y 45 años.

Al momento del presente estudio, las radiografías del tórax mostraron alteraciones compatibles con el proceso alérgico

en 9 de los 14 casos (64.2%). Doce casos (85.7%) tenían historia de alergia familiar.

Desde el punto de vista de laboratorio (Tabla 3), presentaron hipersensibilidad cutánea dual, a los 15 minutos y 6 horas, siendo las reacciones inmediatas generalmente de mayor tamaño que las retardadas: como era de esperar, la intensidad de las reacciones de multipunción fué menor que la de las pruebas intradérmicas. En 3 casos (21.4%) fueron demostradas precipitinas contra *A. fumigatus*; en 6 casos (42.8%) se comprobó eosinofilia en sangre y en 8 (66.6%) eosinofilia en los esputos. Debe anotarse que en 2 pacientes no fue posible obtener expectoración para el examen. En 4 pacientes (33.3%) coincidió la eosinofilia sanguínea con la pulmonar.

El resto de los exámenes practicados (coprológicos, cultivos en búsqueda de *Aspergillus* en esputos y evidencia de tapones mucosos en los mismos), dieron resultados negativos en todos los casos.

Relacionando la evolución de la enfermedad con el diámetro de las pruebas cutáneas, se evidenció una correlación significativa ($r \leq 0.5$) tanto en la multipunción como con la intradermorreacción en la lectura a los 15 minutos (Gráfica 1), pero no a las 6 horas. Igualmente se correlacio-

Tabla 3.— Resultado de los exámenes de laboratorio practicados a 14 pacientes con respuesta cutánea dual positiva a extractos de *A. fumigatus*.

CASOS No.	TAMAÑO PRUEBA CUTANEA (mm) CON EXTRACTOS DE <i>A. FUMIGATUS</i> (1)		PRESENCIA DE PRECIPITINAS EN EL SUERO		EOSINOFILOS EN***	
	15 MINUTOS INTRADERMICA MULTIPUNCION	6 HORAS INTRADERMICA MULTIPUNCION	ID***	ClEF***	ESPUTO %	SANGRE TOTALES
1	12/9	9/0	1 banda	—	*	758
2	21/18	11/18	2 bandas	—	8	500
3	13/8	8/0	1 banda	—	98	550
4	20/16	35/20	—	—	35	433
5	14/11	11/0	—	—	*	250
6	16/9	30/0	—	—	17	150
7	15/8	25/15	—	—	56	300
8	13/9	10/7	—	—	60	725
9	16/14	30/20	—	—	42	312
10	18/12	12/0	—	—	11	442
11	13/8	8/0	—	—	93	1750
12	11/8	8/0	—	—	65	625
13	16/12	13/0	—	—	31	400
14	15/10	8/0	—	—	12	239
% Positividad	100	100	21.4	—	66.6	42.8

1) Antígenos de referencia y del laboratorio.

* No se obtuvo muestra; **Prueba de inmunodifusión en gel de agar; *** Prueba contra inmunoelectroforesis

*** Eosinofilia: a- en esputo: más del 20% de linfocitos; b- en sangre; recuentos mayores de 500 células por mm.³.

naron los dos tipos de prueba cutánea (multipunción e intradérmica) en la lectura a los 15 minutos ($r = 0.8406$), indicando (Gráfica 2) que ambas están midiendo el mismo fenómeno. Lo anterior no fué demostrado cuando las pruebas fueron leídas a las 6 horas. Existió correlación significativa ($r = 0.6249$) entre eosinófilos en esputo y eosinófilos en sangre (Gráfica 3).

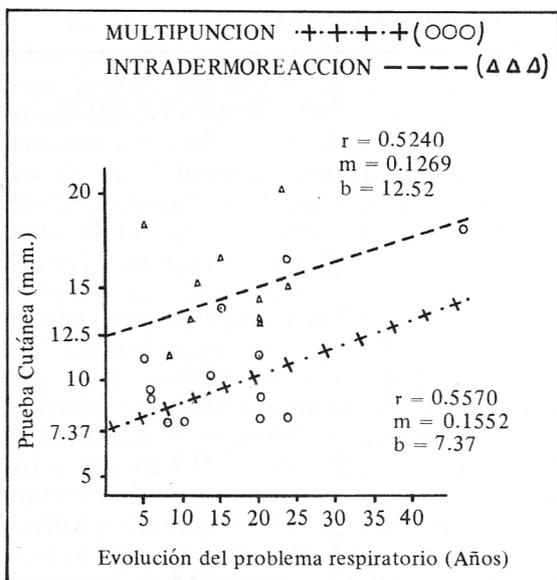
No se demostraron diferencias significativas al relacionar otros parámetros tales como el sexo, la edad y la presencia de eosinófilos con la evolución de la entidad.

La clasificación de los 14 pacientes de acuerdo a los criterios establecidos para la ABA por dos grupos de investigadores (16, 29), aparece en la Tabla 4. Puede observarse que aunque dos de los tres criterios primarios (asma y sensibilidad cu-

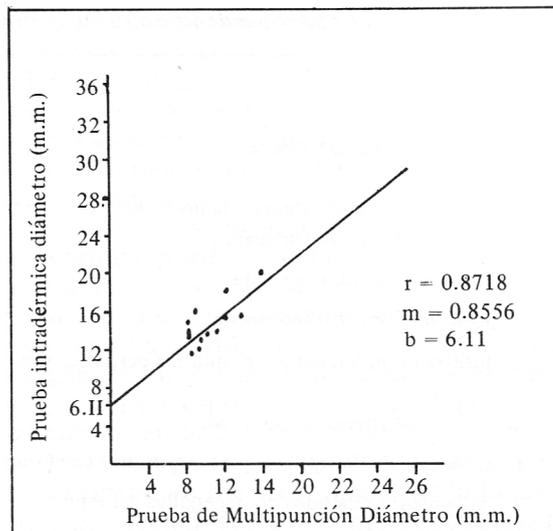
tánea dual) se hicieron presentes en todos los pacientes, solo en 3 de ellos (21.4%), coincidieron todos los criterios primarios y al menos dos de los secundarios. En estos últimos pacientes se estableció el diagnóstico de ABA.

Resumen de las historias clínicas de los tres pacientes con ABA:

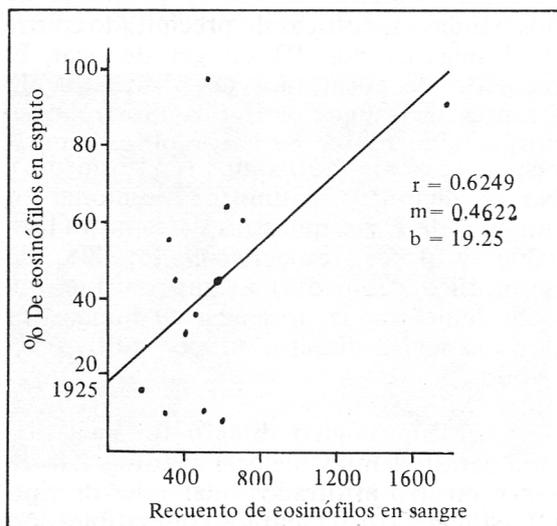
Caso No. 1: SAGE, H.C. No. 788.909, HUSVP. Paciente de sexo femenino, 14 años de edad, con historia de episodios de broncoespasmo durante los últimos 7 años, que ceden a tratamiento con esferoides y recidivan periódicamente. Antecedentes familiares de atopía: el padre y un hermano sufrieron "crisis de asfixia". En octubre de 1976 consulta por su problema alérgico y se le hacen pruebas de escarificación, resultando sensible al polvo. Se le hace hipo-



Gráfica 1.— Relación entre el tiempo de evolución del problema respiratorio y el diámetro de la prueba cutánea, lectura a los 15 minutos



Gráfica 2.— Relación entre el diámetro de la prueba de multipunción y el diámetro de la prueba de intradermoreacción, lectura a los 15 minutos



Gráfica 3: Relación entre el recuento de eosinófilos en sangre y el porcentaje de eosinófilos en el esputo.

sensibilización. Un año después la paciente, en buenas condiciones generales, es sometida a pruebas cutáneas (por multipunción e intradermoreacción) con extractos de *A. fumigatus*, las cuales demostraron hipersensibilidad inmediata (reacciones de 8 mm. y 12 mm. respectivamente) e inter-

media (infiltrado de 9 mm.) a la intradermoreacción. En vista de este resultado le fueron practicadas pruebas serológicas, determinándose por ID en gel de agar la presencia de 1 banda de precipitado específico para *A. fumigatus*. El recuento de eosinófilos en 3 muestras diferentes de sangre periférica mostró eosinofilia 375.900 y 1.000 eosinófilos xmm.3 respectivamente (758 eosinófilos x mm.3 en promedio). No fue posible obtener muestras de esputo. Un coprológico directo fue negativo para parásitos intestinales; la radiografía de tórax (Figura 2) mostró infiltrados bilaterales de tipo intersticial y otros cambios compatibles con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Caso No. 2: FLA, H.C. No. 107.439, HUSVP. Paciente de sexo femenino. 45 años de edad, con historia de disnea espasmódica desde la niñez, que cede a broncodilatadores y recidiva periódicamente. En 1.964 una radiografía de tórax fue informada como no satisfactoria y sugestiva de TBC pulmonar; ello motivo estudios bacteriológicos repetidos que fueron negativos para AAR. Antecedentes familiares de atopia: el padre sufrió enfermedad pulmonar "con asfixia" de tipo no aclarado.

Tabla 4. - *Análisis de los pacientes de acuerdo a los criterios establecidos para el diagnóstico de ABA'*

Criterios Primarios	Pacientes que llenan el criterio:	
	No.	%
1. Historia Asma Extrínseca	14	100
2. Hipersensibilidad cutánea a la inyección de Extractos de <i>A. fumigatus</i> :		
Reacción Tipo I, Inmediata	14	100
Reacción Tipo III, Intermedia	14	100
3. Infiltrados pulmonares y eosinofilia periférica simultánea	4	28.5
Criterios Secundarios		
1. Evidencia de Precipitinas para <i>Aspergillus</i> en el suero	3	21.4
2. Aislamiento repetidos de <i>Aspergillus</i> del esputo	0	—
3. Presencia de tapones en esputos	0	—
4. Cambios crónicos en radiografía	3	21.4

Criterios establecidos por Malo, J. L. et al. (14) y Rosemberg, M. et al (16).

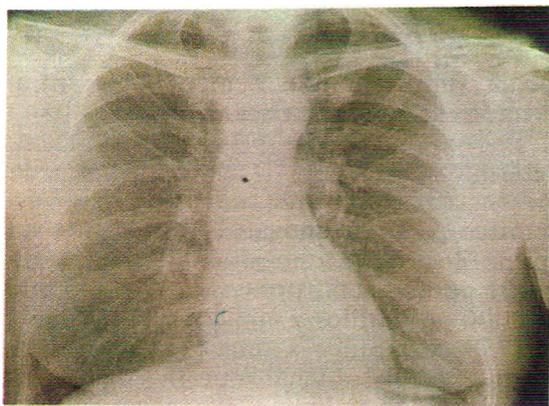


Figura 2: Caso 1: Radiografía de tórax mostrando infiltrados bilaterales de tipo intersticial y otros cambios pulmonares de tipo crónico.

En Octubre de 1.977 la paciente se encontraba en buenas condiciones generales; como únicos hallazgos positivos se anotaron silbancias espiratorias y enflaquecimiento. Pruebas cutáneas por multipunción e intradermoreacción con extracto de *A. fumigatus*, practicadas días más tarde, demostraron hipersensibilidad inmediata (reacciones de 18 y 21 mm. respectivamente) e intermedia (infiltrado de 8 a 11 mm.). En vista de este resultado le fueron practicadas pruebas se-

rológicas, determinándose la presencia de dos bandas específicas de precipitado contra *A. fumigatus* por ID en gel de agar. El recuento de eosinófilos en 3 muestras diferentes de sangre periférica mostró eosinofilia 125, 650 y 875 eosinófilos xmm.³ respectivamente (550 xmm.³ en promedio). No se demostró eosinofilia pulmonar en ninguna de las 3 muestras de esputo (1%, 10% y 15% respectivamente; 8% de eosinófilos promedio). Tampoco fue posible demostrar la presencia de hongos ni por exámenes directos ni por cultivos repetidos.

Un coprológico directo fué negativo para parásitos intestinales. La radiografía de tórax mostró infiltrados bilaterales de tipo intersticial y otros cambios compatibles con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, (EPOC), con gran destrucción parenquimatosas.

Caso No. 3: EMG, H.C. No. 20252 ISS. Paciente de 58 años, sexo femenino con historia de disnea asmátiforme de 20 años de evolución que cede al tratamiento con esteroides y recidiva periódicamente. Antecedentes familiares de atopía, el padre "sufrió asfixia".

En Junio de 1977 la paciente consulta por disnea asmátiforme, encontrándose broncoespasmo y auscultándose sibilancias espiratorias. Pruebas cutáneas (multipunción e intradermorreacción) con extractos de *A. fumigatus*, practicadas en esa época demostraron hipersensibilidad inmediata al hongo (diámetro de 8 y 12 mm. respectivamente), presentándose luego de 6 horas un infiltrado de 9 mm. en la prueba intradérmica. Las pruebas serológicas demostraron por la ID en gel de agar la presencia de una banda de precipitado específica contra *A. fumigatus*. El recuento de eosinófilos sanguíneos mostró eosinofilia (550 eosinófilos \times mm^3) y 3 muestras de esputo revelaron también eosinofilia pulmonar (99% de eosinófilos promedio). En ninguna de estas muestras se demostró la presencia del hongo, ni por examen directo ni por cultivo. Un coprológico fue negativo para parásitos intestinales. La radiografía de tórax mostró infiltrados densos de tipo intersticial y otros cambios compatibles con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Figura

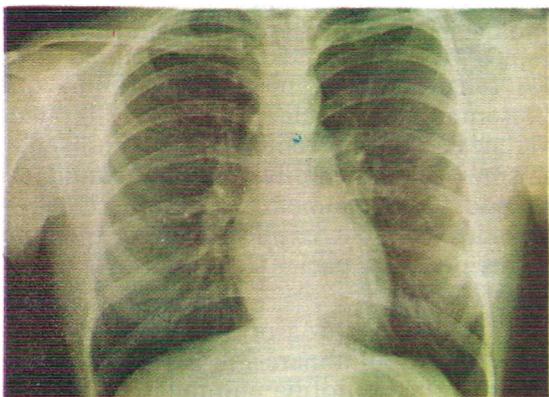


Figura 3: Caso 2: Radiografía de tórax mostrando infiltrados intersticiales densos y otros cambios pulmonares de tipo crónico.

DISCUSION

Las pruebas cutáneas con extractos de *A. fumigatus* suelen ser positivas en forma inmediata en 14 a 38% de los pacientes (7, 11, 16, 30). En estos casos, el problema alérgico se presenta al poco tiempo de la inhalación de las esporas del *Aspergillus* y es debido a la interacción del hongo con

los anticuerpos específicos, tipo IgE; tal interacción desencadena la liberación, por células basófilas y mastocitos, de mediadores, con el consiguiente espasmo bronquial (31). Las esporas del hongo son albergadas transitoriamente en el árbol bronquial no reproduciéndose allí (32). Dentro de este grupo de asma bronquial extrínseca por *Aspergillus* pueden catalogarse, al menos inicialmente, los pacientes con ABA, a pesar de que las entidades son diferentes (33,34). La ABA se distingue de otras alergias respiratorias en que el alérgeno mismo, o sea las esporas del hongo, logran desarrollarse en la luz bronquial. Sin embargo, la ABA comparte con las formas extrínsecas la sintomatología resultante de la liberación de mediadores, así como la tendencia atópica (33). La producción de exudado mucoso que ocasiona oclusión bronquial, permite el desarrollo del hongo. Si bien el crecimiento no produce invasión tisular, da lugar a la liberación de antígenos los cuales, al ser absorbidos por el huésped, promueven la producción de precipitinas de tipo IgG (35). El aumento en la concentración de antígeno, representado por el desarrollo del hongo, produce una reacción de hipersensibilidad local mediada por dos tipos de anticuerpos, IgE e IgG (33, 36-38), el resultado es la aparición de infiltrados pulmonares y de eosinofilia, tanto pulmonar como periférica. Los pacientes con ABA exhiben el mismo tipo de hipersensibilidad dual a los extractos del *Aspergillus*, cuando éstos son aplicados en la piel, con una reacción inmediata tipo I, mediada por IgE y una respuesta intermedia tipo III, mediada por IgG. Esta última es considerada por varios autores como una característica diagnóstica importante de la ABA (7, 18, 39-41).

Los infiltrados que se presentan en la ABA son de tipo recurrente; múltiples episodios pueden traer como secuela, la formación de lesiones pulmonares permanentes (15, 27, 33, 35). La ABA es un proceso de mayor gravedad que la alergia extrínseca, por lo cual es necesario establecer un diagnóstico temprano e instaurar el tratamiento que impida el daño pulmonar permanente.

Es posible que la ausencia de datos sobre la ABA en nuestro medio, obedezca a las dificultades para llevar a cabo el diagnóstico por el laboratorio. Sin embargo, el presente estudio indica que pueden prepararse los reactivos necesarios para efectuar tal diagnóstico.

El estudio de los 342 pacientes asmáticos crónicos mostró 31 (9.1%) con reactividad inmediata al *Aspergillus*, porcentaje inferior al anotado (14 a 38%) para grupos similares de pacientes norteamericanos e ingleses (7, 11, 13, 16). Sin embargo, esta cifra demuestra que el asma extrínseca por *Aspergillus* existe también en nuestro medio. En cuanto a la reacción intermedia a las 6 horas, fue observada en 14 pacientes (4.1%); cifra igualmente inferior a la de otras series que oscila entre 8 a 36% (11, 30, 38). El grupo con reactividad intermedia mostró también la forma inmediata, constituyéndose en el de más riesgo en cuanto se refiere a la ABA (38).

Sin relación con los casos mismos pero comparando los dos tipos de pruebas inmediatas, multipunción e intradérmica, los resultados correlacionaron en forma significativa ($r = 0.8718$), lo que indica que cualquiera de tales pruebas puede usarse con igual confianza, ya que ambas detectan el fenómeno en forma semejante. No fue posible establecer una correlación similar cuando las pruebas fueron leídas a las 6 horas; en este caso, la intradermorreacción detectó hipersensibilidad en los 14 casos mientras que la multipunción solo lo hizo en cuatro. Por consiguiente, debe preferirse el primer tipo de prueba, si interesa detectar la respuesta de tipo III.

Analizando los pacientes, no fue posible demostrar diferencias en cuanto al sexo o la edad. En todos existía historia de síntomas clínicos compatibles con ABA y en 12 (85.1%) evidencias de atopía. Al comparar la evolución del proceso asmático con los resultados de las pruebas cutáneas de tipo inmediato, se halló una correlación significativa ($r = 0.5570$) en la multipunción y ($r = 0.5240$) en la intradérmica; ello indica que la intensidad de la hipersensibilidad es proporcional a la duración de la afección. Muy posiblemente

la exposición al alérgeno por períodos prolongados, de años, condiciona una más intensa respuesta cutánea.

En el examen radiológico practicado al momento del estudio, 9 de los 14 pacientes (64.2%) mostraron alteraciones pulmonares compatibles con proceso tipo ABA, tales como infiltrados, bronquiectasias y signos de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La mayoría de los autores estima que los pacientes con ABA deben presentar alguna vez durante el transcurso de la enfermedad, alteraciones visibles a los rayos X (15, 16, 27). En un estudio de tipo transversal como el nuestro, no era de esperarse que todos los pacientes presentaran signos radiológicos al momento del examen.

Los estudios de eosinófilos revelaron eosinofilia periférica en 6 de los 14 pacientes (42.8%) y eosinofilia pulmonar en 8 de 12 pacientes (66.6%) en los cuales se obtuvo muestra de esputo. En 4 casos (33.3%) se presentó eosinofilia concomitante en esputo y sangre. Comparando la eosinofilia pulmonar con la periférica, se halló una correlación significativa ($r = 0.6249$), lo cual indica que, en un mismo paciente, el número de eosinófilos en los esputos es directamente proporcional al de los sanguíneos. Si bien la eosinofilia que presentan estos pacientes es alta, ella puede variar en los diferentes casos y aún en el mismo paciente en diferentes oportunidades debido, principalmente, al empleo de esteroides (39); ello explicaría el por que no todos nuestros pacientes tenían esta característica.

Se encontró asociación entre las alteraciones pulmonares a los rayos X (9 casos) y la eosinofilia pulmonar (8 casos) en 5 pacientes (62.5%). La presencia de los infiltrados pulmonares transitorios asociados a eosinofilia pulmonar, es una característica diagnóstica importante en ABA (17, 18, 36).

El estudio serológico demostró la presencia de precipitinas en 3 casos (24.1%). Según Longbottom y Pepys (20) y Campbell y Clyton (8) las precipitinas en ABA pueden detectarse en un 70 a 90% de los pacientes, si se concentran los sueros mediante liofilización. Para la formación de las precipitinas se requiere el crecimiento del

hongo a nivel bronquial, no siendo suficiente la simple inhalación de las esporas (26). Estos anticuerpos están relacionados con colonización activa o reciente (8, 20, 30), siendo muy posible que el bajo porcentaje de precipitinas encontrado en nuestros pacientes, obedezca a que éstos eran asintomáticos en el momento del estudio.

La búsqueda del *Aspergillus* a partir de los esputos fue negativa en todos los casos estudiados. El criterio de aislamiento del hongo a partir de este tipo de muestra es característica secundaria para la mayoría de los autores, puesto que en muchos de los pacientes con ABA no se observan tapones mucosos ni se aísla el *Aspergillus* del esputo cuando han pasado las crisis de broncoespasmo, y se encuentran libres de síntomas (24,26), como sucedió en nuestros casos.

Los criterios primarios de ABA, a saber, asma, sombras pulmonares acompañadas de eosinofilia en sangre, e hipersensibilidad dual a extractos del *A. fumigatus* se cumplieron en 4 pacientes. Sin embargo solo se logró diagnosticarla entidad en 3 casos en los que, además, de los elementos primarios mencionados, se verificó la presencia de criterios secundarios tales como precipitinas contra *Aspergillus* y cambios radiológicos pulmonares, de tipo crónico.

Si fuera posible hacer un estudio longitudinal en los 11 pacientes restantes del grupo, es probable que se reunieran algunos de los criterios necesarios para establecer el diagnóstico de ABA, dado que las características diagnósticas de la enfermedad son intermitentes y suelen presentarse en determinadas fases de la historia natural de la enfermedad.

En los colombianos de ABA se hace necesario considerar esta entidad en el diagnóstico diferencial de los procesos asmáticos crónicos. Urge la realización de un estudio conjunto, de tipo longitudinal, en grupos de pacientes con asma extrínseca y en el cual se analicen, en forma detallada, los aspectos clínicos y de laboratorio de ABA.

SUMMARY

A study of 342 chronic asthma patients was undertaken trying to establish

the presence of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABA). Multiple puncture and intradermal skin tests were carried out using *Aspergillus fumigatus* extracts. Reactive patients underwent blood tests with *Aspergillus* antigens, eosinophil count both pulmonary and peripheric, and X-ray studies.

31 patients (9%) were hypersensitive to *Aspergillus fumigatus* extracts; 14 of them (4.1%) displayed a positive intermediate reaction six hours later. Out of these, 4 fulfilled all primary criteria for ABA diagnosis, i. e. asthma, pulmonary infiltrates with peripheric eosinophilia, and dual cutaneous hypersensitivity to *Aspergillus fumigatus* extracts. However, diagnosis was confirmed in only 3 cases who also had fungus precipitins and chronic X-ray changes. Their description points to the need of considering allergic bronchopulmonary aspergillosis among the differential diagnoses of chronic asthmatic processes.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Jack Pepys y Joan Longbottom, por el suministro de los extractos, antígenos y sueros de referencia.

Al Doctor Donald L. Greer, por el suministro de medios de cultivo y reactivos empleados en el trabajo.

A los Doctores Guillermo Velázquez y Jesualdo Fuentes, por la colaboración en la lectura de las radiografías.

A los Doctores Martha Inés García y Ricardo Garcés, por permitirnos el estudio de sus pacientes.

Al Doctor Luis Fernando García M., por su colaboración en el análisis estadístico.

Al Doctor Marcos Restrepo, Jefe del Laboratorio Departamental del Servicio Seccional de Salud de Antioquia, en donde se realizaron algunos de los estudios.

A la señorita Angela Pérez y a las señoras Victoria Velázquez de Aristizábal., Martha Gloria Buitrago de Gómez y Ligia Diez de Cifuentes, por su colaboración en varios aspectos del trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Raper, K.E. and Fennel, D.L.: The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1965.
- 2.- Rippon, J.W.: Medical Mycology. 1st. Ed., pp., 406-429. W.B. Saunders Philadelphia, 1974.
- 3.- Emmons, Ch. E., Binford, Ch. H., Utz, J. and Kwon-Chung, K.J.: Medical Mycology. 3rd. Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1977.

- 4.- Sinski, J. T.: The epidemiology of Aspergillosis In Y. Al Doory: The epidemiology of Human Mycotic Disease pp. 210-266, Charles C. Thomas Springfield, 1975.
- 5.- Bardana, E.: The general and specific humoral immune responses to pulmonary aspergillosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 112: 799-805, 1975.
- 6.- Hinson, K. F., Moon, A.J. and Plummer, E.S.: Bronchopulmonary aspergillosis. *Thorax* 7:317-333, 1952.
- 7.- Pepys, J., Ridell R.W., Citron, Y.M. and Short, E.I.: Clinical and immunologic significance of *Aspergillus fumigatus* in the sputum. *Am. Rev. Resp. Dis.* 80:167-180, 1959.
- 8.- Campbell, J. and Clayton, Y.M.: Bronchopulmonary aspergillosis: A correlation of clinical and laboratory findings in 272 patients investigated for bronchopulmonary aspergillosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 89: 186-196, 1964.
- 9.- Rosemberg, M. and Patterson, R.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis is an emerging disease. *J. Chron. Dis.* 30:193-194, 1977.
- 10.- Agbayani, B.F., Norman, P. and Winkernwerder, W.L.: The incidence of aspergillosis in chronic asthma. *J. Allergy* 40: 319-326, 1967.
- 11.- Hoehne, J.H., Reed, C.E and Dickie, H.A., Allergic bronchopulmonary aspergillosis is not rare. With a note on preparation of antigen for immunologic test. *Chest*, 63:177-181, 1973.
- 12.- Schwartz, H.J., Citroen, K.M. et al.: A comparison of the prevalence of sensitization to *Aspergillus* antigens among asthmatics in Cleveland and London. *J. Am. Clin. Imm.* 62:9-14, 1978.
- 13.- Handerson, A.H.: Allergic Aspergillosis: A review of 32 cases. *Thorax* 23:501-512, 1968.
- 14.- Malo, J.L., Hawkins, R. and Pepys, J.: Studies in choric allergic bronchoaspergillosis, 1. Clinical and Physiological findings. *Thorax* 32:254-261, 1977.
- 15.- Malo, J.L., Pepys, J. and Simon, G.: Studies in chronic allergic bronchopulmonary aspergillosis, 2-Radiological findings. *Thorax* 32:262-268, 1977.
- 16.- Rosemberg, M., Patterson, R., Mintzer, R., Cooper B., Roberts, M. and Harris, K.: Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann. Intern. Med.* 86:405-414, 1977.
- 17.- Turner-Warwick, M., Citron, K.M., Carrol, K.B., Heard, B. E., Mitchell, D., Pepys, J., Scadding, J.G, and Soutar, C.: Immunologic lung disease due to aspergillus. Medical Unit Staff Round from the Cardiothoracic Institute of the Brompton Hospital. *London. Dis. Chest.* 55:346-355, 1969.
- 18.- McCarthy, D.S. and Pepys, J.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Clinical immunology, (1) Clinical features. *Clin. Allergy* 1:261-286, 1971.
- 19.- Safirstein, B.H., D, Souza, M.F., Simon, G., Edward, H.C. Tai and Pepys, J.: Five year follow up of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 108:450-459, 1972.
- 20.- Longbottom, J.L., Pepys, J.: Pulmonary aspergillosis: Diagnostic and immunological significance of antigens and C-substance in *Aspergillus fumigatus*. *J. Pathol. Bact.* 88:141-151, 1964.
- 21.- Vanselow, N.A.: Skin testing and other diagnostic procedures, in: Sheldon, J.M., Lowell, R.G. and Mathews, K.P. *A Manual of Clinical Allergy*, 2a. Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1970.
- 22.- Ouchterlony, O.: Precipitin test for the detection of circulating antibody to specific antigen. *Acta. Pathol. Microbiol Scand.* 32:231-240, 1953.
- 23.- Malo, J.L., Longbottom, J.L., Mitchell, J., Hawkins, R. and Pepys, J.: Studies in chronic allergic bronchopulmonary aspergillosis. 3- Immunological findings. *Thorax* 32:269-274, 1977.
- 24.- Sandhu, R. S., Misha, S.K., Randhawa, H.S. and Parkash, D.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis in India. *Scand. J. Resp. Dis.* 53:289-301, 1972.
- 25.- Mackenzie, D.W.R. and Philpol, C.M.: Counterimmunoelectrophoresis as a routine mycoseological procedure. *Mycopathologia* 57:1-7, 1975.
- 26.- Khan, Z.U., Sandhu, R.S., Randhawa, H.S., Menn, M.P.S., Dusaj, J.S.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis. A study of 46 cases with special reference to laboratory aspects. *Scand. J. Resp. Dis.* 57:73-87, 1976.
- 27.- McCarthy, D. S., Simon, G. and Hargreaves, F.E.: Radiological appearances in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin. Radiol.* 21:366-375, 1970.
- 28.- Spiegel, M.R. *Estadística*. pp. 188-201; 241- 269 - 4a. Edición, McGraw Hill, México, 1969.
- 29.- McCarthy, D.S. and Pepys, J.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Clinical immunology, (2) Skin, nasal and bronchial test. *Clin. Allergy* 1:415 -432, 1971.
- 30.- Henderson, A.H., English, M. and Vecht, R.J.: Pulmonary aspergillosis. *Thorax* 23:513-518, 1968.
- 31.- Hamburger, R.N.: Allergy and the immune system. *Am. Scient.* 64:157-164, 1976.
- 32.- Jordan, M.C., Bierman, C.W. and Van Arsdell, P.P.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis. Report of two cases and evaluation of test for hypersensitivity. *Arch. Inter. Med.* 128: 576-581, 1971.
- 33.- Slavin, R.G.: Immunologically-mediated lung diseases. *Post-grad. Med.* 59:137-141, 1976.
- 34.- Malo, J.L., Inouye, T., Hawkins, R., Simon, G., Turner-Warwick, M. and Pepys, J.: Studies in chronic allergic bronchopulmonary aspergillosis. 4- Comparison with a group of asthmatics. *Thorax* 32:275-280, 1977.
- 35.- Golbert, T. M. and Patterson, R.: Pulmonary allergic aspergillosis. *Ann. Intern. Med.* 72:395-403, 1970.
- 36.- Edge, J, R., Standsfield, D. and Fletcher, E.: Pulmonary aspergillosis in an unselected hospital population. *Chest* 59: 407-413, 1971.
- 37.- Kumar, N., Varkey, B. and Landis, F.B.: Allergic bronchopulmonary aspergillosis, an increasing clinical problem. *Postgrad. Med.* 58:141-145, 1975.
- 38.- Pepys, J.: Possible role of precipitins against *A. fumigatus*. *Am. Rev. Resp. Dis.* 90:465-467, 1964.
- 39.- Warren, W.P. and Rose, B.: Hypersensitivity bronchopulmonary aspergillosis. *Chest*:425-421, 1969.
- 40.- Patterson, R., Fink, J.N., Pruzansky, J.J., Reed, C., Roberts, M., Slavin, R. and Zeiss, R.: Serum immunoglobulin levels in pulmonary allergic aspergillosis and certain other lung diseases, with special reference to immunoglobulin E. *Am. J. Med.* 54:16-22, 1973.
- 41.- Rosemberg, M., Patterson, R. and Roberts, M.: Immunologic responses to therapy in allergic bronchopulmonary aspergillosis. Serum IgE values as an indicator and predictor of disease activity. *J. Pediatrics* 91:914-920, 1977.