

# *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* en la fibrosis quística: significado clínico e inmunorrespuestas séricas específicas de inmunoglobulinas G, A y M

Luis Máiz<sup>a</sup>, Manuela Cuevas<sup>b</sup>, Adelaida Lamas<sup>a</sup>, Aurora Sousa<sup>c</sup>, Santiago Quirce<sup>d</sup> y Lucrecia Suárez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Fibrosis Quística. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

<sup>b</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

<sup>c</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

<sup>d</sup>Servicio de Alergia. Hospital Universitario La Paz. Madrid. España.

**OBJETIVO:** Estudiar el significado clínico de *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* en las secreciones respiratorias de los pacientes con fibrosis quística (FQ) y las inmunorrespuestas séricas frente a estos hongos.

**PACIENTES Y MÉTODOS:** Se estudió a 66 pacientes con FQ (34 varones; edad media: 16,2 años). Como grupo control se utilizaron los sueros de 15 individuos sanos.

**RESULTADOS:** Las concentraciones de inmunoglobulina (Ig) G, IgA e IgM frente a *A. fumigatus* y *C. albicans* estuvieron más elevadas en los pacientes con FQ que en el grupo control. No hubo correlación entre el hallazgo de *A. fumigatus* en las secreciones respiratorias y las inmunorrespuestas séricas frente al hongo. Sí hubo correlación entre la presencia de *C. albicans* en las secreciones respiratorias y las inmunorrespuestas frente a *C. albicans*. A medida que aumentaba la edad de los pacientes, aumentaba la probabilidad de cultivar *A. fumigatus* en las secreciones respiratorias. La presencia de estos hongos en muestras respiratorias no fue un factor de riesgo para un mayor deterioro respiratorio.

**CONCLUSIONES:** Como respuesta a la elevada colonización del aparato respiratorio inferior por *A. fumigatus* y *C. albicans*, los pacientes con FQ presentan respuestas séricas elevadas de IgG, IgA e IgM frente a estos hongos. En los pacientes con FQ el cultivo de esputos y aspirados orofaríngeos no sirve para evaluar la colonización del aparato respiratorio inferior por *A. fumigatus*, pero sí por *C. albicans*. En estos pacientes, la colonización fúngica del aparato respiratorio inferior no es un factor de riesgo para el deterioro respiratorio.

**Palabras clave:** *Aspergillus fumigatus*. *Candida albicans*. Fibrosis quística. Colonización fúngica.

## Introducción

En la fibrosis quística (FQ) se produce una infección broncopulmonar crónica por bacterias que da lugar a la

Correspondencia: Dr. L. Máiz.  
Unidad de Fibrosis Quística. Hospital Ramón y Cajal.  
Ctra. Colmenar, km 9,1. 28034 Madrid. España.  
Correo electrónico: lmaiz.hrc@salud.madrid.org

Recibido: 18-12-2006; aceptado para su publicación: 24-7-2007.

*Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in Cystic Fibrosis: Clinical Significance and Specific Immune Response Involving Serum Immunoglobulins G, A, and M

**OBJECTIVE:** The aim of this study was to analyze the clinical significance of *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in respiratory secretions from patients with cystic fibrosis and to assess the immune response to these fungi in serum.

**PATIENTS AND METHODS** The study included 66 patients with cystic fibrosis (34 men; mean age, 16.2 years). Sera from 15 healthy individuals were used as controls.

**RESULTS:** The serum concentrations of immunoglobulin (Ig) G, IgA, and IgM against *A. fumigatus* and *C. albicans* were higher in patients than in the control group. There was no correlation between the presence of *A. fumigatus* in respiratory secretions and the immune response to the fungus measured in serum. In contrast, the presence of *C. albicans* in respiratory secretions was correlated with the immune response to that fungus. The likelihood of obtaining *A. fumigatus* cultures from respiratory secretions increased with age. The presence of these fungi in respiratory samples was not a risk factor for greater respiratory impairment.

**CONCLUSIONS:** In response to increased colonization of the lower respiratory tract by *A. fumigatus* and *C. albicans*, patients with cystic fibrosis have elevated serum levels of IgG, IgA, and IgM against those fungi. In patients with cystic fibrosis, culture of sputum and oropharyngeal secretions is adequate for the assessment of lower respiratory tract colonization by *C. albicans* but not *A. fumigatus*. Fungal colonization of the lower respiratory tract is not a risk factor for greater respiratory impairment in patients with cystic fibrosis.

**Key words:** *Aspergillus fumigatus*. *Candida albicans*. Cystic fibrosis. Fungal colonization.

formación de bronquiectasias. Además de la colonización bacteriana, los pacientes con FQ están predispuestos a la colonización fúngica por la capacidad que tienen algunos hongos de colonizar el aparato respiratorio inferior y por los frecuentes ciclos de antibióticos que precisan para el control de su enfermedad<sup>1,2</sup>. Los hongos que se cultivan con más frecuencia en las secreciones respiratorias de estos pacientes son *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*. *A. fumigatus* se aísla en

las secreciones respiratorias de los afectados de FQ con una frecuencia que oscila entre un 9 y un 57%<sup>3,4</sup>; en el caso de *C. albicans* la frecuencia es algo más elevada<sup>4,5</sup>. En los pacientes con FQ la colonización del aparato respiratorio inferior por *A. fumigatus* se traduce en una tasa elevada de respuestas inmunitarias frente al hongo<sup>6,7</sup>. En la actualidad no está claramente definido el papel de los hongos en la FQ, aunque se considera que son microorganismos no patógenos<sup>8</sup>, excepto en los casos de aspergilosis invasiva<sup>9</sup> y de aspergilosis broncopulmonar alérgica<sup>10,11</sup>. Sin embargo, algunos investigadores señalan que en ciertos casos *A. fumigatus* puede contribuir a la patogenia de la enfermedad, quizá por factores de virulencia intrínsecos a este hongo<sup>12</sup>, hecho no contrastado por otros<sup>3</sup>.

En este trabajo nos planteamos 3 objetivos principales: a) analizar las respuestas séricas inmunitarias de inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina M (IgM) frente *A. fumigatus* y *C. albicans* en los pacientes con FQ; b) determinar si el cultivo de las secreciones respiratorias refleja de forma fidedigna la colonización del aparato respiratorio inferior por estos hongos en los pacientes con FQ, y c) estudiar el significado clínico de la presencia de estos hongos en las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ.

## Pacientes y métodos

### Población de estudio

Se estudió de manera prospectiva a 66 pacientes con FQ (34 varones y 32 mujeres), con una edad media  $\pm$  desviación estándar de  $16,2 \pm 8,3$  años (rango: 3-36). En todos ellos el diagnóstico se estableció por un test del sudor con valores de cloro superiores a 60 mEq/l en 2 determinaciones y clínica indicativa del diagnóstico<sup>13</sup>. La media de su capacidad vital forzada (FVC) en porcentaje del valor teórico fue del  $79,85 \pm 26,24\%$ , y la del volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>) fue del  $72,09 \pm 31,28\%$ . El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del hospital. Se informó a todos los pacientes de las características del estudio, pero no se requirió consentimiento firmado porque no se modificó la práctica clínica habitual de la Unidad de FQ.

### Diseño y métodos de estudio

Se evaluó prospectivamente a los pacientes durante sus visitas de control a la consulta de la Unidad de FQ (cada 3 o 4 meses) a lo largo de un período de entre 2 y 6 años. En cada consulta, además de la exploración física general, se realizó una exploración selectiva de la cavidad bucal con el fin de evaluar si había en ésta colonización por *C. albicans*. A los pacientes con *C. albicans* en la cavidad bucal se les trató con un antifúngico tópico y se retiraron temporalmente del estudio hasta su erradicación. Se realizaron consultas y estudios adicionales cuando los clínicos responsables lo consideraron necesario. Se efectuó un estudio anual que incluía radiografía de tórax (evaluada con el sistema de puntuación de Brasfield siempre por el mismo neumólogo)<sup>14</sup> y espirometría. Todas las secreciones respiratorias se cultivaron para hongos durante los 6 años del estudio. Durante los últimos 4 años del estudio se analizó en cada paciente al menos una muestra de suero cada 8 meses. Tras una primera fase del estudio, ya mencionada, el suero restante se congeló a  $-20$  °C para su procesamiento posterior en una segunda fase del estudio. En esta segunda fase se analizaron las respuestas humorales IgG, IgA e

IgM frente a *A. fumigatus* y *C. albicans* sólo en los pacientes que tenían al menos 4 muestras de secreciones respiratorias analizadas en el último año del estudio (n = 66). Como grupo control se utilizaron los sueros de 15 individuos sanos, no atópicos ni fumadores, de similar edad y sexo que la población de estudio.

### Definición de diagnósticos específicos

Se definieron varios grupos de acuerdo con los resultados microbiológicos: pacientes que tuvieron al menos un cultivo positivo para *A. fumigatus* o *C. albicans* en las secreciones respiratorias durante todo el tiempo que duró el estudio (pacientes con *A. fumigatus* o pacientes con *C. albicans*, respectivamente), y pacientes que nunca tuvieron *A. fumigatus* o *C. albicans* en las secreciones respiratorias durante el estudio (pacientes sin *A. fumigatus* o pacientes sin *C. albicans*, respectivamente).

### Procesamiento de las secreciones respiratorias

Las muestras respiratorias (esputos o aspirados orofaríngeos en los menores de 2 años o en los pacientes con dificultad para expectorar) se recogieron con una frecuencia variable, habitualmente una en cada consulta, con un máximo de una al mes. Las muestras se trataron con N-acetilcisteína durante un tiempo no superior a 30 min para lograr su fluidificación. A continuación se realizaron siembras por duplicado, en medio de Sabouraud-cloranfenicol y de Sabouraud-cloranfenicol-actidiona a 2 temperaturas, una a 30 °C y otra a 37 °C, durante 4 semanas, con revisión diaria y lectura semanal.

### Espirometría

Se efectuó espirometría a 60 pacientes mayores de 5 años que fueron capaces de realizarla. La FVC y el FEV<sub>1</sub> se midieron sin broncodilatación con un espirómetro VMax 20 (SensorMedics Corporation, Yorba Linda, California, EE.UU.) según las recomendaciones de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica<sup>15</sup>. Los resultados se expresaron como porcentaje de los valores teóricos de acuerdo con la edad, sexo, peso, estatura y raza basados en los teóricos de la Comunidad Económica del Carbón y el Acero<sup>16</sup>. Para su análisis estadístico se han utilizado los valores medios obtenidos por cada paciente a lo largo del estudio.

### Sistema de puntuación de Brasfield

El sistema de puntuación de Brasfield valora 5 aspectos radiológicos: atrapamiento aéreo, sombras lineales, lesiones noduloquisticas, consolidaciones segmentarias o lobulares y una impresión general de la gravedad. En el caso del atrapamiento aéreo, las marcas lineales y las lesiones noduloquisticas, la puntuación 0 significa ausente, y se puntúa de 1 a 4 según la gravedad. En las lesiones mayores, la puntuación 0 indica ausente y se puntúa de 3 a 5 según la gravedad. En cuanto a la gravedad general, 0 significa ausente y se puntúa de 1 a 5 según la gravedad. La puntuación total se obtiene restando la suma de todo lo anterior de 25. Por tanto, a mayor puntuación, mejor estado radiológico, de modo que 25 indica una radiografía de tórax sin alteraciones. Para su análisis estadístico se han utilizado los valores medios obtenidos por cada paciente a lo largo del estudio.

### Análisis de las inmunoglobulinas G, A y M séricas específicas frente a *A. fumigatus* y *C. albicans*

Los resultados de IgG, IgA e IgM específicas frente a *A. fumigatus* y *C. albicans* se determinaron por métodos de inmunoenzimología. Para *A. fumigatus*, cada pocillo de la mi-

croplaca (Costar 3590 Corp., Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) se llenó con 0,1 ml del antígeno de *A. fumigatus* diluido a 1:2.000 en tampón fosfato salino (PBS), pH: 7,2. Después de incubarse durante 18 h a 4 °C, se lavó la placa con PBS-TW 20 (Sigma, San Luis, EE.UU.), se añadió a todos los pozos 0,1 ml de PBS con un 2% de albúmina bovina (Sigma) y se incubaron a 37 °C durante 1 h. A continuación volvió a lavarse la placa en PBS-TW y se añadió a cada pocillo 0,1 ml del suero de los pacientes diluido a 1:1.000 en PBS-TW, tras lo cual se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente volvieron a lavarse las placas con PBS-TW y se añadió en cada pocillo, para la IgG específica, una anti-IgG humana marcada con peroxidasa diluida a 1:8.000 en PBS-TW con un 25% de suero de ternera fetal; para la IgA, una anti-IgA humana a 1:2.000, y para la IgM, una anti-IgM humana a 1:2.000 (Biosource International, Camarillo, California, EE.UU.), y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron en PBS-TW y se añadió 0,1 ml de sustrato (o-fenilendiamina, 2 mg/ml, en agua destilada y un 0,03% de peróxido de hidrógeno) a temperatura ambiente. Después de 15 min se paró la reacción en color añadiendo 0,1 ml de ácido sulfúrico 4N. Los resultados se expresaron en densidades ópticas (DO) y se midieron a 492 nm mediante un espectrofotómetro Titertek-Multiscan (Flow Laboratories, Irvine, Escocia, Gran Bretaña). Todas las pruebas se realizaron por duplicado. Para las IgG, IgA e IgM específicas frente a *C. albicans* se utilizó el mismo método, con las antiinmunoglobulinas humanas de la casa comercial Sanofi Diagnostic Pasteur (Laboratorio Arístegui, Bilbao, Vizcaya, España). Como grupo control se utilizaron los sueros de 15 individuos sanos, no atópicos ni fumadores. Se consideró que la reacción inmunológica era positiva cuando su valor era mayor que la media más 2 desviaciones estándar del valor de dicha inmunoglobulina en el grupo control (respecto a *A. fumigatus*: IgG positiva > 0,67 DO; IgA positiva > 0,21 DO; IgM positiva > 0,94 DO. Respecto a *C. albicans*: IgG positiva > 0,56 DO; IgA positiva > 0,41 DO; IgM positiva > 0,90 DO).

#### Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de la  $\chi^2$  para comparar entre sí las variables cualitativas. La variable del sistema de puntuación de Brasfield se consideró semicuantitativa y se utilizaron análisis no paramétricos (H de Kruskal-Wallis, prueba de Spearman) cuando se estudió la asociación con otras variables. Si una de las variables se consideraba cuantitativa y la otra cualitativa, se estudió la diferencia de las medias y se comprobó la homogeneidad de las variancias mediante la prueba de Bartlett. Si ambas variables eran cuantitativas, se realizaron correlaciones utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Se llevó a cabo un análisis multivariable para estudiar la posible asociación entre las inmunorrespuestas frente a *A. fumigatus* y a *C. albicans* con la edad, el sexo, parámetros espirométricos y sistema de puntuación de Brasfield. El estimador utilizado de la media poblacional fue la media muestral. Para estimar la variabilidad poblacional (variancia, desviación estándar) se empleó la distribución de la t de Student con n-1 grados de libertad. Todos los análisis se realizaron con los programas estadísticos DBase-IV, EpiInfo versión 6.04-b (Borland International, Scotts Valley, California, EE.UU.) y SPSS para Windows versión 8.0 (Chicago, Illinois, EE.UU.).

#### Resultados

Se cultivaron 1.239 muestras de secreciones respiratorias de 66 pacientes (18,77 cultivos de media por paciente; rango: 4-48). *A. fumigatus* se cultivó en 256

muestras de secreciones respiratorias (20,7%) y *C. albicans* en 588 (47,5%). Cuarenta pacientes tuvieron al menos un cultivo positivo para *A. fumigatus* y 58 tuvieron al menos un cultivo positivo para *C. albicans* (datos ya publicados)<sup>6</sup>.

Durante el estudio, el 92,1% de los pacientes tuvo al menos una respuesta inmunológica positiva a *A. fumigatus* en alguna ocasión y el 91% a *C. albicans*. Los valores de anticuerpos IgG, IgA e IgM frente a *A. fumigatus* y *C. albicans* estuvieron significativamente más elevados en los pacientes con FQ que en el grupo control ( $p < 0,001$ ) (tabla I).

#### Características de los pacientes según la presencia o ausencia de *A. fumigatus* y *C. albicans* en las secreciones respiratorias

Las características de los pacientes según la presencia de *A. fumigatus* y *C. albicans* se muestran en la tabla II. Respecto a la edad, fue mayor en el grupo de pacientes con *A. fumigatus* que el grupo de pacientes sin dicho hongo, y no hubo diferencias entre los pacientes con y sin *C. albicans*. Además, la edad se asoció con un aumento de la probabilidad de cultivar *A. fumigatus* en las secreciones respiratorias ( $r = 0,28$ ;  $p < 0,05$ ), pero no con la probabilidad de cultivar *C. albicans* ( $r = 0,10$ ;  $p = 0,41$ ). No hubo diferencias significativas en los valores de inmunoglobulinas específicas frente a *A. fumigatus* entre los pacientes con y sin *A. fumigatus*, ni hubo una correlación significativa entre los valores de inmunoglobulinas específicas y la probabilidad de cultivar *A. fumigatus* en las secreciones respiratorias.

La probabilidad de cultivar *C. albicans* en las secreciones respiratorias se asoció con un deterioro respiratorio mayor, aunque sólo alcanzó significación estadística para el sistema de puntuación de Brasfield ( $r = -0,24$ ;  $p < 0,05$ ). A diferencia de lo observado para *A. fumigatus*, las respuestas inmunitarias específicas frente a *C. albicans* fueron significativamente mayores en los pacientes con *C. albicans* que en los pacientes sin *C. albicans*. Además, hubo una correlación significativa entre la probabilidad de cultivar *C. albicans* en las muestras respiratorias y los valores de inmunoglobulinas

TABLA I  
Comparación de las respuestas inmunitarias específicas a *A. fumigatus* y a *C. albicans* entre los pacientes con fibrosis quística (FQ) y el grupo control

Respuesta inmunitaria	Pacientes con FQ (n = 66)	Grupo control (n = 15)	p
IgG-A. <i>fumigatus</i> (DO)	0,94 ± 0,49	0,43 ± 0,12	< 0,001
IgA-A. <i>fumigatus</i> (DO)	0,32 ± 0,23	0,13 ± 0,04	< 0,001
IgM-A. <i>fumigatus</i> (DO)	0,99 ± 0,51	0,50 ± 0,22	< 0,001
IgG-C. <i>albicans</i> (DO)	1,23 ± 0,81	0,36 ± 0,10	< 0,001
IgA-C. <i>albicans</i> (DO)	0,74 ± 0,67	0,19 ± 0,11	< 0,001
IgM C. <i>albicans</i> (DO)	0,85 ± 0,47	0,48 ± 0,21	< 0,001

Todos los resultados se expresan como media ± desviación estándar. DO: densidades ópticas; IgA-A. *fumigatus*: inmunoglobulina A específica frente a *A. fumigatus*; IgA-C. *albicans*: inmunoglobulina A específica frente a *C. albicans*; IgG-A. *fumigatus*: inmunoglobulina G específica frente a *A. fumigatus*; IgG-C. *albicans*: inmunoglobulina G específica frente a *C. albicans*; IgM-A. *fumigatus*: inmunoglobulina M específica frente a *A. fumigatus*; IgM-C. *albicans*: inmunoglobulina M específica frente a *C. albicans*.

TABLA II  
Características de los afectados de fibrosis quística (n = 66) con y sin *A. fumigatus* y con y sin *C. albicans* en las secreciones respiratorias

Características	<i>A. fumigatus</i>		p	<i>C. albicans</i>		p
	Sí (n = 40)	No (n = 26)		Sí (n = 58)	No (n = 8)	
Edad (años)	17,17 ± 8,20	12,23 ± 7,81	< 0,05	15,15 ± 8,64	15,75 ± 6,32	0,85
Sexo (varón/mujer)	19/21	15/11	0,58	29/29	5/3	0,71
Brasfield	17,47 ± 4,30	18,92 ± 5,42	0,23	17,86 ± 4,67	19,37 ± 5,73	0,41
FEV <sub>1</sub> %	70,40 ± 26,72	74,35 ± 40,33	0,53	71,72 ± 31,23	72,09 ± 38,20	0,97
FVC%	78,44 ± 25,32	81,61 ± 29,45	0,67	77,60 ± 31,08	79,80 ± 26,27	0,84
IgG-A. <i>fumigatus</i> (DO)	0,95 ± 0,34	0,83 ± 0,48	0,22	NR	NR	NR
IgA-A. <i>fumigatus</i> (DO)	0,30 ± 0,20	0,30 ± 0,26	1,00	NR	NR	NR
IgM-A. <i>fumigatus</i> (DO)	1,04 ± 0,43	0,84 ± 0,33	0,14	NR	NR	NR
IgG-C. <i>albicans</i> (DO)	NR	NR	NR	1,36 ± 0,74	0,65 ± 0,47	< 0,05
IgA-C. <i>albicans</i> (DO)	NR	NR	NR	0,83 ± 0,63	0,18 ± 0,08	< 0,001
IgM-C. <i>albicans</i> (DO)	NR	NR	NR	0,93 ± 0,48	0,63 ± 0,21	< 0,05

Todos los resultados, excepto el sexo, se expresan como media ± desviación estándar.

DO: densidades ópticas; FEV<sub>1</sub>%: volumen espiratorio forzado en el primer segundo, en porcentaje sobre el valor teórico estándar; FVC: capacidad vital forzada, en porcentaje sobre el valor teórico estándar; IgA-A. *fumigatus*: inmunoglobulina A específica frente a *A. fumigatus*; IgA-C. *albicans*: inmunoglobulina A específica frente a *C. albicans*; IgG-A. *fumigatus*: inmunoglobulina G específica frente a *A. fumigatus*; IgG-C. *albicans*: inmunoglobulina G específica frente a *C. albicans*; IgM-A. *fumigatus*: inmunoglobulina M específica frente a *A. fumigatus*; IgM-C. *albicans*: inmunoglobulina M específica frente a *C. albicans*; NR: no realizado.

TABLA III  
Correlación entre los valores de inmunoglobulinas séricas específicas frente a *A. fumigatus* y *C. albicans* con la edad y situación respiratoria en los pacientes con fibrosis quística (n = 66)

Características	IgG-A. <i>fumigatus</i>	IgA-A. <i>fumigatus</i>	IgM-A. <i>fumigatus</i>	IgG-C. <i>albicans</i>	IgM-C. <i>albicans</i>	IgM-C. <i>albicans</i>
Edad	0,30 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,07	0,20	0,11	0,11
Brasfield	-0,43 <sup>b</sup>	-0,53 <sup>b</sup>	-0,28 <sup>a</sup>	-0,47 <sup>b</sup>	-0,35 <sup>a</sup>	-0,35 <sup>a</sup>
FEV <sub>1</sub> %	-0,46 <sup>b</sup>	-0,50 <sup>b</sup>	-0,18	-0,37 <sup>a</sup>	-0,15	-0,15
FVC%	-0,35 <sup>a</sup>	-0,36 <sup>a</sup>	-0,18	-0,25	-0,19	-0,19

Los resultados expresan el valor de r.

FEV<sub>1</sub>%: volumen espiratorio forzado en el primer segundo, en porcentaje sobre el valor teórico estándar; FVC: capacidad vital forzada, en porcentaje sobre el valor teórico estándar; IgA-A. *fumigatus*: inmunoglobulina A específica frente a *A. fumigatus*; IgA-C. *albicans*: inmunoglobulina A específica frente a *C. albicans*; IgG-A. *fumigatus*: inmunoglobulina G específica frente a *A. fumigatus*; IgG-C. *albicans*: inmunoglobulina G específica frente a *C. albicans*; IgM-A. *fumigatus*: inmunoglobulina M específica frente a *A. fumigatus*; IgM-C. *albicans*: inmunoglobulina M específica frente a *C. albicans*.

<sup>a</sup>p < 0,05. <sup>b</sup>p < 0,001.

específicas (r = 0,63, p < 0,001 para la IgG específica frente a *C. albicans*; r = 0,61, p < 0,001 para la IgA específica, y r = 0,40, p < 0,05 para la IgM específica).

#### Correlación entre las inmunorrespuestas específicas con la edad, el sexo y la situación respiratoria en los pacientes con fibrosis quística

En la tabla III se muestran las correlaciones entre las concentraciones de IgG, IgA e IgM específicas frente a *A. fumigatus* y *C. albicans*, así como las características de los pacientes. No hubo correlación significativa entre el sexo y los valores de IgG, IgA e IgM específicas frente a *A. fumigatus*. Sin embargo, a diferencia de lo hallado para *A. fumigatus*, las mujeres sí presentaron concentraciones de IgG, IgA e IgM específicas frente a *C. albicans* mayores que los varones, con significación estadística para la IgG e IgM (p < 0,05).

Para eliminar posibles factores de confusión se realizó un análisis de regresión lineal múltiple. En este análisis, utilizando el FEV<sub>1</sub> como variable dependiente y las IgG, IgA e IgM frente a *A. fumigatus*, presencia de *A. fumigatus* en las secreciones respiratorias, edad y sexo como covariables, la edad fue la variable que más contribuyó a un FEV<sub>1</sub> menor (beta = -0,21; *standar error* (SE) = 0,32; p < 0,05). Se observaron resultados similares

cuando se utilizó la FVC como variable dependiente (beta = -0,18; SE = 0,42; p < 0,05). Tras un análisis de regresión logística, la edad también fue la principal variable asociada con un Brasfield inferior (beta = -0,14; SE = 0,12; p < 0,05), definido para este análisis como un sistema de puntuación de Brasfield < 18.

Cuando se utilizó el FEV<sub>1</sub> como variable dependiente y las inmunorrespuestas frente a *C. albicans*, presencia de *C. albicans* en las secreciones respiratorias, edad y sexo como covariables, se objetivó que la edad fue la variable que contribuyó en mayor medida a un FEV<sub>1</sub> menor (beta = -0,22; SE = 0,34; p < 0,05). Se observaron resultados similares cuando se utilizó la FVC como variable dependiente. En el análisis de regresión logística la edad también fue la única variable asociada con un sistema de puntuación de Brasfield inferior.

#### Discusión

Nuestros resultados muestran que la mayoría de los pacientes presentó en algún momento del estudio una respuesta inmunitaria frente a *A. fumigatus* y *C. albicans*, lo que confirma la elevada tasa de exposición de los pacientes con FQ a estos hongos<sup>7</sup>. Al comparar las respuestas inmunitarias de los pacientes con FQ con las del grupo control observamos, ampliando las investigaciones de

otros autores<sup>17</sup>, que los pacientes con FQ tienen títulos de inmunoglobulinas séricas específicas IgG, IgA e IgM frente a *A. fumigatus* y *C. albicans* significativamente más elevados que los individuos sanos, como respuesta a la colonización fúngica del aparato respiratorio inferior<sup>9</sup>. Esta facilidad para colonizar las vías aéreas inferiores se debe al daño existente en la primera línea de defensa frente a los hongos (barrera epitelial mucosa y macrófagos alveolares), que es secundario a las bronquiectasias. Esta colonización fúngica estimula las respuestas tipo T helper-1, con una gran producción de IgG, IgA e IgM frente a estos hongos, y en algunos pacientes una respuesta T helper-2, con producción de IgE específicas<sup>6,18</sup>.

Como se ha demostrado en investigaciones anteriores<sup>17</sup>, no encontramos relación entre la presencia o ausencia de *A. fumigatus* en las secreciones respiratorias (esputos o aspirados orofaríngeos) y los valores de IgG, IgA e IgM frente este hongo. A diferencia de *A. fumigatus*, los títulos de inmunorrespuestas frente a *C. albicans* fueron mayores en los pacientes que tenían *C. albicans* en las secreciones respiratorias que en los pacientes sin *C. albicans*. Sabiendo que las inmunorrespuestas fúngicas séricas traducen el grado de exposición a los hongos<sup>19-21</sup>, puede plantearse que el cultivo de estas muestras respiratorias no refleja el grado de exposición del tejido pulmonar a *A. fumigatus*, pero sí a *C. albicans*. Esto podría explicarse porque la presencia de un hongo en las secreciones respiratorias puede depender del tamaño de sus esporas, como observaron Mullins y Seaton<sup>22</sup>. Así, *A. fumigatus*, con esporas de pequeño tamaño, queda atrapado en las vías aéreas distales y puede encontrarse en el pulmón con mayor frecuencia de lo que cabría esperar por el cultivo de esputos o aspirados orofaríngeos. Una segunda hipótesis capaz de explicar esta discordancia entre el aislamiento de *A. fumigatus* en las muestras respiratorias y las respuestas inmunitarias específicas sería que quizá *A. fumigatus* puede desencadenar una respuesta inmunitaria específica, que persistiría en el organismo después de haber sido eliminado por las células fagocíticas locales<sup>23</sup>. Por ello, creemos que en los pacientes con FQ el cultivo de esputos y aspirados orofaríngeos no es un método válido para conocer la colonización del aparato respiratorio inferior por *A. fumigatus*, ya que infravaloran dicha colonización, pero sí es válido para conocer la colonización por *C. albicans*. Nuestros resultados muestran que las inmunorrespuestas humorales específicas frente a *A. fumigatus* y *C. albicans* sí pueden ser unos buenos marcadores de la colonización respiratoria por estos 2 hongos<sup>20</sup>.

Sin embargo, nuestro trabajo tiene algunas limitaciones metodológicas, ya que sólo se descartó la contaminación por *C. albicans* de la cavidad bucal mediante examen físico y no se descartaron otros posibles reservorios de este hongo, como son el aparato digestivo y la vagina. Así, el hecho de que las mujeres con FQ presentaran unos títulos de anticuerpos IgG e IgM frente a *C. albicans* significativamente mayores que los varones podría explicarse por la facilidad con que *C. albicans* coloniza el aparato genitourinario de las mujeres, especialmente si reciben ciclos frecuentes de antibióticos, con la posibilidad de generar también inmunorrespuestas específicas a la misma<sup>24</sup>.

En nuestro estudio también intentamos averiguar si *A. fumigatus*, *C. albicans* o sus inmunorrespuestas podían ser factores de riesgo para un mayor deterioro respiratorio. Sabiendo que muchas de las variables estudiadas están relacionadas unas con otras (así, a medida que aumenta la edad de los pacientes empeora su estado respiratorio), se realizó el análisis multivariable para intentar eliminar los factores de confusión. Una vez eliminados éstos, demostramos que ni el hallazgo de *A. fumigatus* ni el de *C. albicans* en las secreciones respiratorias, ni sus inmunorrespuestas séricas específicas IgG, IgA e IgM fueron factores de riesgo independientes para un mayor deterioro respiratorio, como ya habían señalado algunos autores para *A. fumigatus*<sup>3</sup>.

En resumen, los pacientes con FQ tienen títulos séricos elevados de IgG, IgA e IgM específicas frente a *A. fumigatus* y *C. albicans* en respuesta a la colonización del aparato respiratorio inferior por estos hongos. Para evaluar el grado de colonización del aparato respiratorio inferior de los pacientes con FQ por *A. fumigatus* no son válidos los cultivos de esputos ni aspirados orofaríngeos, sino que deben utilizarse las inmunorrespuestas séricas IgG, IgA e IgM frente a *A. fumigatus*. El aumento de la edad de los pacientes fue el principal factor de riesgo asociado con la probabilidad de cultivar *A. fumigatus* en las muestras respiratorias. Por último queremos destacar que la presencia de *A. fumigatus* y de *C. albicans* en las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ no es un factor de riesgo independiente asociado con un deterioro respiratorio mayor, por lo que no debe realizarse un tratamiento específico de la colonización fúngica.

## Agradecimientos

Al Dr. José Francisco Cañón, de la Organización Nacional de Trasplantes, por su ayuda inestimable con el análisis estadístico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Blaschke-Hellmessen R, Spitzer H, Paul KD, Hoffmann C. Mycological surveillance of children with cystic fibrosis. *Mycoses*. 1991;34 Suppl 1:43-7.
2. Burns JL, Van Dalen JM, Shawar RM, Otto KL, Garber RL, Quan JM, et al. Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis*. 1999;179:1190-6.
3. Milla CE, Wielinsky CL, Regelmann WE. Clinical significance of the recovery of *Aspergillus* species from the respiratory secretions of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 1996;21:6-10.
4. Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nubling G. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*. 2003;46:19-23.
5. Bauernfeind A, Bertele R, Harms K, Horl G, Jungwirth R, Petermuller C, et al. Qualitative and quantitative microbiological analysis of sputa of 102 patients with cystic fibrosis. *Infection*. 1987;4:270-7.
6. Máiz L, Cuevas M, Quirce S, Cañón JF, Pacheco A, Sousa A, et al. Serologic IgE immune responses against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2002; 121:782-8.
7. El-Dahr JM, Fink R, Selden R, Arruda LK, Platts-Mills TA, Heymann PW. Development of immune responses to *Aspergillus* at an early age in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150:1513-8.

8. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:918-51.
9. Brown K, Rosenthal M, Bush A. Fatal invasive aspergillosis in an adolescent with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1999;27:130-3.
10. Laufer P, Fink JN, Bruns WT, Unger GF, Kalbfleisch JH, Greenberger PA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1984;73:44-8.
11. Zeaske R, Bruns WT, Fink JN, Greenberger PA, Colby H, Liotta JL, et al. Immune responses to *Aspergillus* in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1988;82:73-7.
12. Arruda LK, Mann BJ, Chapman MD. Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp fI, in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases. *J Immunol*. 1992;149:3354-9.
13. Máiz L, Baranda F, Coll R, Prados C, Vendrell M, Escribano A, et al. Normativa del diagnóstico y el tratamiento de la afección respiratoria en la fibrosis quística. *Arch Bronconeumol*. 2001;37:316-24.
14. Gutiérrez V, Olivera MJ, Girón RM, Rodríguez-Salvanés F, Caballero P. Fibrosis quística en adultos: acuerdos inter e intraobservador para las escalas de puntuación de Brasfield y Chrispin-Norman en la radiografía de tórax y relación con datos clínicos y espirométricos. *Arch Bronconeumol*. 2005;41:553-9.
15. Sanchis J, Casán P, Castillo J, González N, Palenciano R, Roca J. Normativa para la práctica de la espirometría forzada. *Arch Bronconeumol*. 1989;25:132-4.
16. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault JC. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur Respir J Suppl*. 1993;16:5-40.
17. Przyklenk B, Bauernfeind A, Horl G, Emminger G. Serologic response to *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis. *Infection*. 1987;15:308-10.
18. Wojnarowski C, Eichler I, Gartner C, Gotz M, Renner S, Koller DY, et al. Sensitization to *Aspergillus fumigatus* and lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155:1902-7.
19. Burrell R, Rylander R. A critical review of the role of precipitins in hypersensitivity pneumonitis. *Eur J Respir Dis*. 1981;62:332-43.
20. Arruda LK, Muir A, Vailes LD, Selden RF, Platts-Mills TA, Chapman MD. Antibody responses to *Aspergillus fumigatus* allergens in patients with cystic fibrosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;107:410-1.
21. Máiz L, Cuevas M, Quirce S, Pacheco A, Escobar H. Allergic bronchopulmonary aspergillosis with low serum IgE levels in a child with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100:431-2.
22. Mullins J, Seaton A. Fungal spores in lung and sputum. *Clin Allergy*. 1978;8:525-33.
23. Hutcheson PS, Rejent AJ, Slavin RG. Variability in parameters of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1991;88:390-4.
24. Warnock DW, Speller DC, Morris JA, Mackie PH. Serological diagnosis of infection of the urinary tract by yeast. *J Clin Pathol*. 1976;29:836-40.