

ANTÍGENOS NATIVOS DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* CON UTILIDAD PARA EL INMUNODIAGNÓSTICO DE ASPERGILOMA

José Casquero^{1,a}, Flor Urcia^{1,a}, Elizabeth Sánchez^{2,a}

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la utilidad de los antígenos nativos de cepas autóctonas de *Aspergillus fumigatus* para el inmunodiagnóstico de aspergiloma, se desarrolló un estudio empleando dos cepas de ese hongo, aisladas de pacientes con diagnóstico de aspergiloma (533 y 554), los cuales fueron confrontados con sueros controles comerciales de *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Candida*, *Coccidioides*, *Histoplasma* y *Paracoccidioides* mediante la prueba de inmunodifusión, asimismo, se evaluaron frente a 28 sueros de pacientes con sospecha de aspergiloma. Además, se realizó la caracterización de los componentes proteicos de los antígenos nativos con la técnica de SDS-PAGE y se confrontaron con diez sueros de pacientes con aspergiloma, paracoccidioidomicosis, histoplasmosis, proteína C reactiva e hidatidosis y suero de persona sana por *immunoblot*. Se encontró una buena concordancia (κ 0,92) entre los antígenos 533 y 554, y algo menor de éstos con el antígeno comercial para *A. fumigatus* (κ 0,73 y 0,81 para el 533 y 554; respectivamente). La banda de 97 kDa reaccionó sólo con sueros de pacientes con aspergiloma siendo inmunodominante.

Palabras clave: *Aspergillus fumigatus*; Pruebas inmunológicas; Inmunodifusión; Antígenos (fuente: DeCS BIREME).

NATIVE ANTIGEN OF *ASPERGILLUS FUMIGATUS* WITH USEFUL FOR IMMUNODIAGNOSIS OF ASPERGILLOMA

ABSTRACT

In order to evaluate the usefulness of native antigens of autochthonous strains of *Aspergillus fumigatus* for immunodiagnosis of aspergilloma, We was conducted a study using two strains of this fungus, isolated from patients with aspergilloma (533 and 554), which were confronted with commercial control serum of *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Candida*, *Coccidioides*, *Histoplasma* and *Paracoccidioides* by immunodiffusion test, moreover, we evaluated 28 serum samples from patients with suspected aspergilloma. We also performed the characterization of the protein components of native antigens using the technique of SDS-PAGE and were confronted with ten serum samples from patients with aspergilloma, paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, C-reactive protein and hydatidosis, also healthy person serum by immunoblot. Good agreement (κ 0.92) was found between antigens 533 and 554 and somewhat less than those with commercial antigen *A. fumigatus* (κ 0.73 and 0.81 for the 533 and 554, respectively). The band of 97 kDa reacted only with sera from patients with aspergilloma being immunodominant.

Key words: *Aspergillus fumigatus*; Immunologic tests; Immunodiffusion; Antigens (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

El *Aspergillus fumigatus* es el principal agente etiológico del aspergiloma, una infección oportunista asociada a pacientes con antecedentes de tuberculosis pulmonar cavitaria. El diagnóstico micológico requiere de pruebas de laboratorio directas o indirectas, éstas últimas son de utilidad en la detección de antígenos o anticuerpos en casos primarios o de difícil resolución ⁽¹⁾.

La detección de anticuerpos es un método útil para el diagnóstico de aspergilomas o aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), debido a que 90% de los pacientes inmunocompetentes poseen anticuerpos detectables ⁽²⁻⁵⁾. Asimismo, el conocimiento de los niveles

de antígeno o de anticuerpos permite de gran ayuda en el seguimiento de los pacientes durante el tratamiento ⁽¹⁾. Desde hace décadas se viene realizando investigaciones sobre la caracterización de antígenos de *A. fumigatus*, a fin de contar con reactivos sensibles y específicos para el control de pruebas *in vitro* e *in vivo* ⁽⁶⁾.

Las propiedades antigénicas de los extractos de *A. fumigatus* han permitido el desarrollo inicial de las pruebas inmunológicas usadas para el diagnóstico serológico de la aspergilosis en el individuo inmunocompetente. No obstante, existen diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición de extractos antigénicos preparados en diversos laboratorios, e inclusive, variaciones importantes entre lotes, condicionándose así una variabilidad

¹ Laboratorio de Micología, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Laboratorio de Zoonosis Parasitaria, Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

^a Biólogo

Recibido: 05-09-08 Aprobado: 04-01-09

antigénica que no deja de ser importante. Esta situación se relaciona con el periodo de incubación, composición del medio de cultivo, forma del hongo, método de extracción y origen subcelular del antígeno⁽²⁾.

Son diversos los antígenos de la pared celular de *A. fumigatus* que son reconocidos –éstos son secretados durante su desarrollo *in vitro* o *in vivo*– como la catalasa de 90 kDa, dipeptidyl peptidasa de 88-kDa, proteasa alcalina de 33 kDa, superóxido dismutasa de 19-kDa y ribonucleasa de 18-kDa, entre otros⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Si bien la información nacional es escasa, se ha demostrado que los extractos antigénicos de cepas autóctonas de *A. fumigatus*, tienen mayor reactividad frente a los comerciales⁽¹¹⁾. En ese sentido, nuestro estudio pretende contribuir en el diagnóstico de esta enfermedad, buscando determinar los antígenos nativos de cepas autóctonas de *A. fumigatus* con utilidad para el inmunodiagnóstico de aspergiloma.

EL ESTUDIO

MATERIAL BIOLÓGICO

Se empleó dos cepas de *A. fumigatus*, aisladas de pacientes con diagnóstico de aspergiloma, las cuales estuvieron conservadas en la micoteca del Laboratorio de Micología, manteniéndose en agua destilada estéril y caldo infusión cerebro corazón a -20 °C, para luego, ser subcultivadas sobre agar Sabouraud dextrosa (ASD), e incubarse a temperatura ambiente y a 37 °C por 15 días; finalmente, se procedió a su identificación de acuerdo con las normas nacionales correspondientes⁽¹²⁾.

Asimismo, se usó sueros de 28 pacientes con sospecha de aspergiloma (antecedentes de tuberculosis pulmonar, hemoptisis, tos, presencia de cavidades en radiografía de tórax), disponibles en la seroteca del Laboratorio de Micología y que estuvieron almacenados a 4 °C.

OBTENCIÓN DE ANTÍGENO

Para cada una de las cepas se efectuó tres repiques consecutivos de tres días a 31 °C en ASD para lograr su adaptación. Del último crecimiento se transfirió bloques de agar de 0,5 cm² aproximadamente, a frascos Erlenmeyer conteniendo 250 mL del medio líquido de Sabouraud. Se incubó en fase estacionaria a 31 °C por cuatro semanas. Posteriormente, se agregó mertiolate a una concentración final de 1:5000, para luego almacenar los frascos en refrigeración por siete días, filtrándose y eliminándose el micelio. Se aumentó, gota a gota, un volumen dos veces mayor de acetona al filtrado con agitación constante

y a 4 °C por 15 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm por 50 minutos y a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue colocado a 4 °C para la total evaporación de la acetona. Posteriormente, se suspendió el precipitado en agua destilada estéril para una concentración final de 1:10 del volumen original del filtrado. Se centrifugó a 3000 rpm por 50 minutos. Se eliminó el precipitado insoluble y el sobrenadante fue almacenado a 4 °C para ser finalmente empleado como antígeno crudo⁽¹³⁾.

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Se realizó mediante la técnica de Lowry⁽¹⁴⁾.

PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EVALUAR ANTÍGENOS OBTENIDOS

Se confrontó cada antígeno obtenido con los sueros controles comerciales de *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *Candida*, *Coccidioides*, *Histoplasma* y *Paracoccidioides* (Immuno – Mycologics, Inc.) mediante la prueba de inmunodifusión (ID). Asimismo, se realizó la ID entre los 28 sueros de los pacientes contra los antígenos obtenidos y el antígeno comercial de *A. fumigatus*.

CARACTERIZACIÓN DEL COMPONENTE PROTEICO DE LOS ANTÍGENOS OBTENIDOS

Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE)⁽¹⁵⁾, con gel de separación a 12% y gel de empaquetamiento a 4%, los cuales fueron coloreados con Coomassie; además, el patrón de peso molecular empleado fue de 14 a 97 Kda (Biorad Laboratorios Inc).

INMUNOBLOT

El complejo antigénico de *A. fumigatus* separado por SDS-PAGE, fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (MNT), esto se llevó a cabo en presencia del tampón de transferencia (20% metanol, tris 0,5 M) pH 9,18 por 1,5 horas a 0,32 amp y 55 v. Subsiguientemente, la MNT fue incubada con leche descremada al 5% en *buffer* fosfato salino (PBS) 0,01 M con 0,3% de *tween* 20 por 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación. Las MNT fueron cortadas en tiras y guardadas a -20 °C.

A continuación, las tiras de nitrocelulosa fueron saturadas con solución de PBS –*tween* 20– leche descremada al 5% por 30 minutos a temperatura ambiente y agitación constante (PBS-T-LD). Para el inmunoensayo se confrontó cada antígeno autóctono con un suero de persona sana, diez sueros de pacientes con aspergiloma, un suero positivo a paracoccidioidomicosis, un suero positivo a

Tabla 1. Resultados obtenidos con los antígenos nativos usados en el estudio (533 y 554) y con el antígeno comercial de *A. fumigatus* frente a los sueros controles.

Antígeno	Sueros controles de <i>A. fumigatus</i>		
	Positivo	Negativo	Positividad
533	9	19	32,1%
554	8	20	28,6%
Comercial	6	22	21,4%

histoplasmosis, un suero positivo a proteína C reactiva y un suero positivo a hidatidosis en la solución. Todos los sueros fueron diluidos a 1/200. Se lavó con solución de PBS-*tween* 20 por cinco veces. Después se agregó el conjugado anti-IgG humana, marcado con peroxidasa (Sigma) diluido 1/1000 en PBS-T-LD luego se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente y agitación constante. Finalmente, se reveló con 0,5 mg de 3,3 diaminobenzidina tetrahidroclorado (Sigma) en PBS-peróxido de hidrógeno. La reacción fue parada por lavados con agua destilada (15). Las bandas de precipitación visualizadas en la tira de nitrocelulosa, se expresaron en kilodaltons (kDa) en relación con sus masas relativas.

HALLAZGOS

El contenido de proteínas de los dos antígenos obtenidos fue de 225 µg/mL (554) y 400 µg/mL (533). Éstos, mostraron bandas de precipitación con el suero control comercial de *A. fumigatus* mediante ID. El antígeno 554 mostró banda de precipitación con el suero control comercial de *A. flavus*, ninguno de los antígenos nativos desarrollaron bandas de precipitación con los sueros controles comerciales de *A. niger*, *Candida*, *Coccidioides*, *Histoplasma* y *Paracoccidioides*.

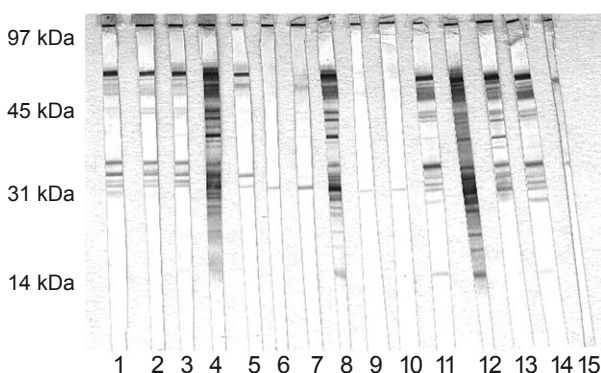


Figura 1. Inmunoensayo entre el antígeno de *Aspergillus fumigatus* 533 y sueros humanos.

1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 14: sueros de pacientes con aspergiloma. 6: suero de persona sana. 7: suero de paciente con proteína C reactiva positiva. 9: suero de paciente con histoplasmosis. 10: suero de paciente con paracoccidioidomicosis. 15: suero de paciente con hidatidosis.

Tabla 2. Concordancia entre los resultados obtenidos con los antígenos nativos usados en el estudio y el antígeno comercial de *A. fumigatus*.

	Acuerdo	Kappa
533 y 554	96,4%	0,92
533 y comercial	89,3%	0,73
554 y comercial	92,9%	0,81

De los 28 sueros estudiados, 26 mostraron reactividad semejante por ID con los dos antígenos nativos y el antígeno comercial de *A. fumigatus*. Dos sueros exhibieron resultados negativos al confrontarse con el antígeno comercial, pero con los antígenos nativos los hallazgos fueron positivos. Se encontró un coeficiente kappa entre los tres antígenos de 0,82 (Tabla 1). La frecuencia relativa del acuerdo y el kappa fue superior entre los antígenos nativos, que cuando se evaluaron estos frente al comercial (Tabla 2).

En el inmunoblot del antígeno 533, aparecen entre 6 a 23 bandas de precipitación reconocidas por los sueros, de los cuales, las que presentan un peso molecular desde 14 a 40 kDa se encuentran en los sueros de pacientes y suero de persona sana como la banda de 31 kDa, mientras que las bandas con pesos moleculares entre 45 a 97 kDa que aparecen nitidamente en sueros de pacientes con diagnóstico de aspergiloma no dan reacción cruzada con otras enfermedades ni tampoco se presentan en el suero de la persona sana; sin embargo, no aparecen en la totalidad de los sueros de pacientes. La banda de precipitación con un peso molecular de 97 kDa apareció solamente en los sueros de pacientes con diagnóstico de aspergiloma (Figura 1).

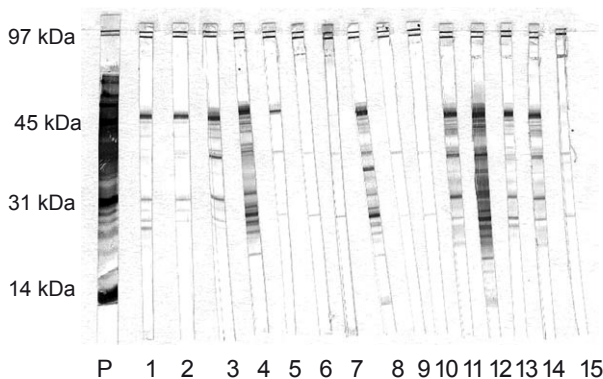


Figura 2. Inmunoensayo entre el antígeno de *Aspergillus fumigatus* 554 y sueros humanos.

P: Patrón de peso molecular. 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 14: sueros de pacientes con aspergiloma. 6: suero de persona sana. 7: suero de paciente con proteína C reactiva positiva. 9: suero de paciente con histoplasmosis. 10: suero de paciente con paracoccidioidomicosis. 15: suero de paciente con hidatidosis.

En el perfil del inmunoblot con el antígeno 554, aparecen bandas entre 3 a 18 bandas de precipitación reconocidas por sueros humanos, de los cuales, las que presentan un peso molecular desde 14 a 40 kDa se encuentran en los sueros de pacientes o suero de persona sana, mientras que las bandas con pesos moleculares de 45, 50, 52, 66, 70 y 80 kDa que aparecen nitidamente en sueros de pacientes con diagnóstico de aspergiloma no dan reacción cruzada con otras enfermedades ni tampoco se presentan en el suero de persona sana, pero no aparecen en la totalidad de los sueros de pacientes. La banda de precipitación con un peso molecular de 97 kDa apareció solamente en los sueros de pacientes con aspergiloma (Figura 2).

DISCUSIÓN

A pesar de que investigaciones similares usaron una sola cepa, en nuestro estudio se optó por emplear dos cepas de *A. fumigatus*, si bien le agrega una mayor variabilidad, nos ha permitido contar con un mayor grado de contraste^(5,11,16). Asimismo, el número de sueros de pacientes con sospecha clínica y radiológica usados en nuestro estudio (28) fue superior al promedio que utilizaron en pesquisas previas (7 a 9)^(16,17).

Por otro lado, la concentración de proteínas cuantificadas en nuestro estudio es inferior a lo descrito por otros autores cuyos valores oscilan entre 580 hasta 1840 µg/mL. Estas diferencias cuantitativas de proteínas entre nuestras dos cepas, es similar a lo observado en cepas de *A. niger* donde existe variabilidad intraespecie e incluso entre cepas de una misma región geográfica^(5,13,18).

El antígeno 554 mostró banda de precipitación con el suero control de *A. flavus*, esto puede responder al hecho de que muy pocos componentes de una especie puede inducir a una buena respuesta de anticuerpos a antígenos que pueden ser predominantes en especies heterólogas. Kim *et al.* también encontraron reactividad entre el antígeno de *A. fumigatus* y el antisuero de *A. flavus*, desarrollando aproximadamente la mitad de bandas como las producidas con su antígeno homólogo⁽⁶⁾. En otro estudio⁽⁴⁾ también se demostró bandas entre sueros de pacientes con aspergiloma y antígenos de *A. fumigatus* y *A. flavus*, la estrecha relación antigénica entre ambas especies ocasiona reacción cruzada que es más frecuente que entre *A. fumigatus* y otras especies⁽⁶⁾.

Nosotros observamos que dos de los sueros evaluados no reaccionaron de la misma forma al confrontarlos con los antígenos nativos y el comercial, siendo los primeros 7% más reactivos, por tanto, es una alternativa a considerar para su potencial uso como prueba diagnóstica.

También se ha descrito que el suero de un paciente con aspergilosis no produjo banda de precipitación con tres antígenos comerciales, resultado inverso al observado con el extracto micelial y filtrado del cultivo de *A. fumigatus*, es probable que existan algunos preparados comerciales de baja calidad, merced a que se obtienen de cepas de *A. fumigatus* almacenadas por largo tiempo en micotecas, lo que conlleva a cambios bioquímicos y estructurales en el hongo, por ende baja cantidad de carbohidratos y proteínas, lo que repercute en una escasa reactividad con los sueros de los pacientes⁽¹⁶⁾.

El nivel de anticuerpos circulantes anti-*Aspergillus* es de 10 a 100 veces más alto en pacientes con aspergiloma que en individuos normales, aunque los antígenos reconocidos son casi idénticos⁽⁷⁾. En nuestro estudio los inmunoblot detectaron bandas en los sueros del individuo sano, pacientes con histoplasmosis, paracoccidioidomicosis, hidatidosis y proteína C reactiva, pero éstas fueron de menor intensidad y cantidad que las detectadas en los sueros de los pacientes con aspergiloma.

En este estudio se empleó un medio de cultivo que contiene glucosa y peptona para obtener el antígeno, y posterior inmunoblot, a partir del cual se obtuvo fuertes bandas que correspondieron a un antígeno de 97 kDa con características diagnósticas, que podría ser similar al antígeno de 94 kDa descrito por Latgé *et al.*, quienes a partir del inmunoblot de precipitados etanólicos de cultivos filtrados obtenidos a partir de un medio de cultivo con glucosa 2% y peptona 1%, evidenciaron la presencia de bandas de precipitación de 94 kDa en sueros de pacientes con aspergiloma, mientras que en sueros de individuos sanos, estas bandas no se observaron⁽⁷⁾. Otro artículo señala que el inmunoblot de una mezcla antigénica de tres cepas de *A. fumigatus* frente a antisueros específicos muestra inmunogenicidad de subunidades proteicas entre 18 a 100 kDa⁽¹³⁾.

La enzima purificada y con características antigénicas, superóxido dismutasa de 19 kDa, ha sido reconocida mediante inmunoblot por 88% de los sueros de pacientes con aspergiloma⁽⁸⁾, nosotros encontramos que el antígeno nativo de 97 kDa está presente en 100% de los sueros de pacientes con aspergiloma. El desarrollo de recombinantes de superóxido dismutasa, mitogilina y ribonucleasa (RNU) permiten obtener resultados más precisos, con lo cual se podría superar los problemas derivados de la variabilidad de cepas y hace de estos marcadores potencialmente útiles para el diagnóstico de la enfermedad^(9,19,20).

Nuestra investigación sugiere que el diagnóstico de laboratorio de pacientes con aspergilomas, empleando

antígenos nativos de *A. fumigatus* preparados en el Laboratorio de Micología del Instituto Nacional de Salud, está relacionado con el reconocimiento de un antígeno de 97 kDa por anticuerpos (siendo inmunodominante) y muestran una alternativa prometedora para el desarrollo de kits de diagnósticos nacionales, no obstante, es recomendable realizar estudios futuros con un mayor número de sueros de pacientes con aspergiloma, y controles negativos; asimismo, someterlo a procedimientos que puedan valorar su validez y fiabilidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Blgo. Eduardo Miranda Ulloa del Laboratorio de Zoonosis Parasitaria del Instituto Nacional de Salud por colaborar en la transferencia tecnológica del inmunoblot.

Fuente de Financiamiento

Instituto Nacional de Salud.

Conflictos de Interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chinchilla M, Kogson M, De Insignares R, Rodriguez M, Vargas M, Torrado E, et al. Valor de las pruebas inmunológicas en el diagnóstico de las enfermedades micóticas: experiencia de un centro de referencia. *Biomédica*. 1998; 18(3): 179-84.
- Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(12): 310-40.
- Denikus N, Orfaniotou F, Wulf G, Lehmann PF, Monod M, Reichard U. Fungal antigens expressed during invasive aspergillosis. *Infect Immun*. 2005; 73(8): 4704-13.
- Kim SJ, Chaparas SD, Buckley HR. Characterization of antigens from *Aspergillus fumigatus*. IV. Evaluation of commercial and experimental preparations and fractions in the detection of antibody in aspergillosis. *Am Rev Res Dis*. 1979; 120(6): 1305-11.
- Kurup VP, Yi Ting E, Fink JN. Immunochemical characterization of *Aspergillus fumigatus* antigens. *Infect Immun*. 1983; 41(2): 698-701.
- Kim SJ, Chaparas SD. Characterization of antigens from *Aspergillus fumigatus* III. Comparison of antigenic relationships of clinically important aspergilli. *Am Rev Res Dis*. 1979; 120(6): 1297-303.
- Latgé JP, Debeaupuis JP, Sarfati J, Diaquin M, Paris S. Cell wall antigens in *Aspergillus fumigatus*. *Arch Med Res*. 1993; 24(3): 269-74.
- Hamilton AJ, Holdom MD, Hay RJ. Specific recognition of purified Cu,Zn superoxide dismutase from *Aspergillus fumigatus* by immune human sera. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(2): 495-96.
- Holdom MD, Lechenne B, Hay RJ, Hamilton AJ, Monod M. Production and characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(2): 558-62.
- Latgé JP, Moutaouakil M, Debeaupuis JP, Bouchara JP, Haynes K, Prévost MC. The 18-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*. 1991; 59(8): 2586-94.
- Caballero Bardales R. Reactividad antigénica de cepa autóctona *Aspergillus fumigatus* en el serodiagnóstico por inmunodifusión doble de aspergilosis pulmonar. [Tesis de grado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1999.
- Casquero J, Guevara M, Urcia A. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Instituto Nacional de Salud. Lima; 2007. Serie de normas técnicas N.º 44.
- Lirio V, Assis CM, N. Cano MI, Lacaz C. Obtencao e avaliacao de antígenos de *Aspergillus fumigatus*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992; 34(4): 359-65.
- Montoya Y, León C, Nolasco O, Talledo M, Padilla C, Valverde M. Guía de práctica del curso teórico – práctico Western Blot y Elisa. Lima: Instituto Nacional de Salud; 1999.
- Sánchez E, Náquira C, Gutiérrez S, Ayala E, Medina S. Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico serológico de la hidatidosis humana. Lima: Instituto Nacional de Salud; 1997. Serie de normas técnicas N.º 22.
- Cuadrado B, Gómez D. Extracción y caracterización de antígeno micelial de *Aspergillus fumigatus*. *Biomédica*. 1995; 15(2): 59-67.
- Chan CM, Woo PC, Leung AS, Lau SK, Che XY, Cao L, et al. Detection of antibodies specific to an antigenic cell wall galactomannoprotein for serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(6): 2041-45.
- Fernández CM, Travieso F, Martínez G, Perurena M. Evaluación de antígenos y antisueros para su utilización en el serodiagnóstico de aspergilosis. *Rev Cub Med Trop*. 1995; 47(2): 118-21.
- Weig M, Frosch M, Tintelnot K, Haas A, Grob U, Linsmeier B, et al. Use of recombinant mitogillin for improved serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* – associated diseases. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(5): 1721-30.
- Sarfati J, Monod M, Recco P, Sulahian A, Pinel C, Candolfi E, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 55(4): 279-91.

Correspondencia: Blgo. José Casquero Cavero.
 Dirección: Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú.
 Teléfono: (511) 617-6200
 Correo electrónico: jcasquero@ins.gob.pe