

PRUEBAS DE INMUNOPRECIPITACION EN EL DIAGNOSTICO DE LA ASPERGILOSIS

Luis A. YARZÁBAL, Silvia DA LUZ, Martha JOSEF, José M. TORRES,
Isabel VIGNA y Olga MURAS

RESUMEN

Basándose en el estudio de 56 casos autóctonos de aspergilosis del aparato respiratorio, los Autores analizan la contribución de las pruebas de precipitación en gel al diagnóstico de la afección en el Uruguay. Antes de que éstas fueran introducidas se conocían en el país 22 casos de esta micosis, diagnosticados entre 1947 y 1967. Desde 1968, el empleo sistemático de la doble difusión en gel (DDG) y la inmunoelectroforesis (IEF) ha permitido el diagnóstico de 34 nuevos casos en un sólo Laboratorio. Los aspergilomas, que constituían, en el primer período, la forma clínico-radiológica más frecuentemente detectada (68.1%), representan sólo el 31.8% en la serie diagnosticada mediante el empleo de las pruebas inmunológicas.

La DDG, de sensibilidad superior a la IEF y mucho más simple, pero afectada por una inespecificidad no despreciable, es recomendada como prueba tamiz para seleccionar los casos merecedores de examen micológico y de un estudio inmunológico más profundo.

La IEF es considerada imprescindible para la estandarización de los extractos antigénicos, así como para fundamentar inmunológicamente el diagnóstico.

La fracción de *A. fumigatus* dotada de actividad quimotrópica II, fue revelada por los 12 sueros en que se intentó su detección, superponiéndose en todos los casos al arco C identificado por TRAN VAN KY & col.¹⁸.

INTRODUCCION

La aspergilosis respiratoria humana era hasta la década pasada una enfermedad excepcional en el Uruguay, a tal punto que en la primera mitad del siglo sólo se identificó un caso en el curso de una autopsia practicada a un individuo de sexo masculino, con antecedentes de bronquitis crónica y etilismo, que murió en plena descompensación cardiorespiratoria^{1, 11}.

Posteriormente, como consecuencia del aumento de los enfermos de tuberculosis pulmonar portadores de secuelas cavitarias de su aparato respiratorio, del interés de los neumólogos en despistar las complicaciones infeccio-

nas de esas lesiones secuelas, y de la instalación de un Laboratorio capacitado para la realización de técnicas micológicas en un centro de enfermedades torácicas, hemos asistido a un aumento progresivo de la incidencia de la enfermedad en nuestro medio.

Así en 1963, fueron comunicados simultáneamente 6 casos de la micosis^{8, 12, 17, 21}, y en 1967 se elevó a 22 el número de observaciones debidamente confirmadas de la enfermedad²³.

En 20 de estos casos el diagnóstico fue orientado por la historia clínica y los hallazgos

radiológicos, siendo confirmado siempre por la visualización de filamentos aspergilaes en el examen directo de la expectoración, el aislamiento reiterado de una ó más especies del género *Aspergillus* a partir de secreciones bronquiales, o la comprobación histológica del hongo en tejidos del aparato respiratorio. Quince (68.1%) de los pacientes presentaban la forma denominada aspergiloma. En 2 observaciones no se sospechó clínicamente el diagnóstico, que una vez se estableció en la necropsia¹, y otra en el acto quirúrgico²². El cultivo de secreciones bronquiales permitió el aislamiento e identificación del agente en 19 de los 20 casos estudiados del punto de vista micológico; en 14 de ellos el examen directo de la expectoración puso en evidencia filamentos gruesos, ramificados y tabicados, de tipo aspergilar. Cinco de los casos fueron confirmados histológicamente en piezas de resección o de necropsia.

Advertida de esta forma la tendencia a un aumento progresivo de la frecuencia de la enfermedad en el medio, nuestro Laboratorio debió enfrentar una demanda creciente de estudios micológicos que no podía absorber habida cuenta del tiempo que insume, y las dificultades que encierra, tal tipo de exámenes.

Por tal motivo, basándonos en los hallazgos de PEPYS & col.¹⁶, BIGUET & col.^{2, 3}, GERNEZ-RIEUX & col.^{9, 10} y PEÑA & col.¹⁵ hemos aplicado de manera sistemática, a partir de 1968, la prueba de doble difusión en gel (DDG) a todos aquellos pacientes dirigidos a nosotros con el fin de descartar una micosis pulmonar. El análisis de la experiencia obtenida mediante la aplicación de tal procedimiento de selección, será el objetivo fundamental de esta comunicación.

MATERIALES Y METODOS

A) Sueros

La sangre fue extraída siempre en condiciones asépticas, y luego de 4 horas de ayuno. Las muestras de suero fueron conservadas, con Merthiolate al 1:10.000 a -20°C hasta la realización de las pruebas serológicas. Nunca fueron inactivadas.

B) Antígenos

Todos los sueros fueron enfrentados a extractos antigénicos "mixtos" de *A. fumigatus* y *A. flavus*, preparados según el método expuesto por BIGUET y col.⁶. Luego de preparados fueron analizados mediante IEF ante sueros hiperinmunes de conejo (Fig. 1).

C) Técnicas

a) *Doble difusión en gel*: se aplicó el método de OUCHTERLONY¹⁴, empleando agarosa al 0.9% como soporte. Los sueros que daban origen a una ó más bandas de precipitación eran luego sometidos a análisis inmunoelectroforético (Fig. 2a y 2b).

b) *Inmunoelectroforesis*: se realizó de acuerdo a lo descrito por BIGUET & col.⁶. Los enfermos que frente a extractos de *A. fumigatus* ó *A. flavus* dieron origen a alguno de los sistemas precipitantes específicos individualizados por TRAN VAN KY & col.^{18, 20} fueron considerados casos inmunológicamente confirmados de aspergilosis (Figs. 3 y 4).

c) *Actividad quimotripsica*: fue investigada de acuerdo a las recomendaciones de TRAN VAN KY & col.¹⁹.

D) Estudio micológico

A todos los pacientes que dieron origen a reacciones positivas en DDG, y a los del grupo control, se les recomendó recoger expectoración matinal, en frascos estériles y secos, durante 3 días sucesivos. La muestra correspondiente a cada día fue examinada microscópicamente en fresco, y sembrada en 6 tubos de agar Sabouraud con examen completo en 30 de los casos.

E) Grupo control

Se empleó como control un grupo de 84 pacientes escogidos al azar entre los 486 que resultaron negativos en la prueba de DDG. Sus sueros fueron sometidos a análisis inmunoelectroforético ante los mismos extractos antigénicos, y se practicó estudio micológico de su expectoración.

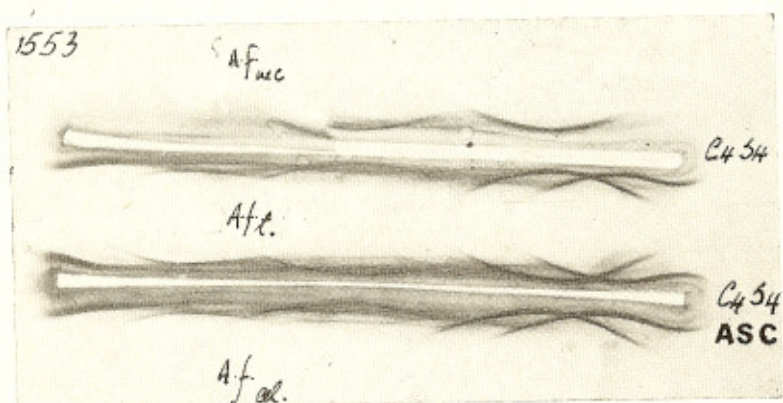


Fig. 1 — Diagrama experimental por análisis inmunoelectroforético de extractos "metabólico" (A.f. mc) "total" (A.f. t) y "celular" (A.F. cel), *Aspergillus fumigatus*, revelados mediante un suero hiperinmune de conejo (ASC-C₄S₁)

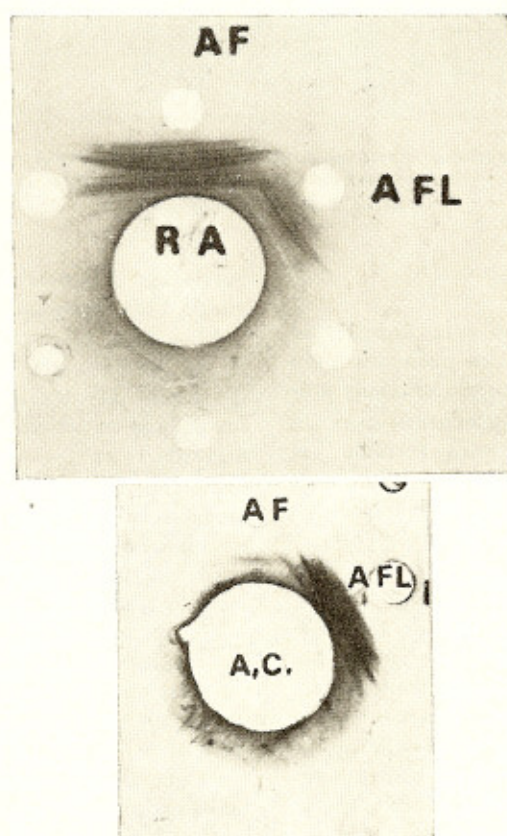


Fig. 2 — Doble difusión en gel de agarosa utilizando extractos "metabólico" de *Aspergillus fumigatus* (AF) y *Aspergillus flavus* (AFL) en dos enfermos de aspergilosis (R.A. — No. 7 y A.C. — No. 24)

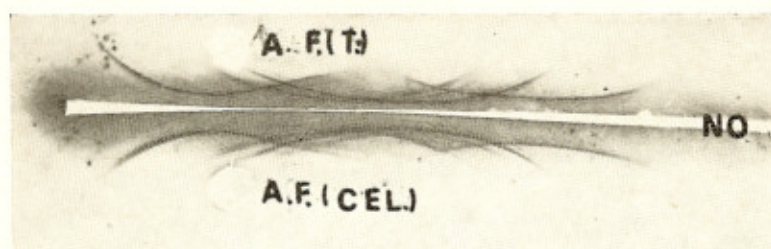


Fig. 3 — Diagrama immunoelectroforético correspondiente al suero de la enferma N.O. (No. 9) enfrentado a antígeno *A. fumigatus* "total" (A.F. (t)) y "celular" (A.F. (cel.))

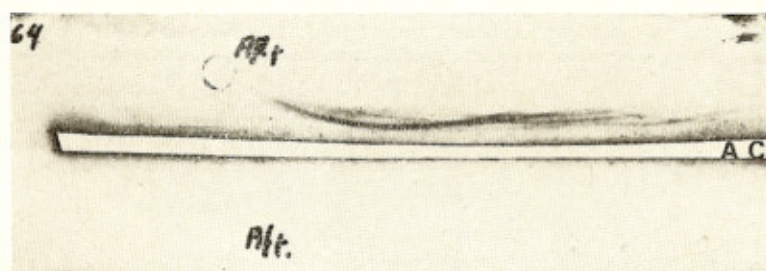


Fig. 4 — Diagrama immunoelectroforético correspondiente al suero del paciente A.C. (No. 24) enfrentado a extractos "totales" de *A. flavus* (A.f. t.) y *A. fumigatus* (A.f. f.)

RESULTADOS

La DDG puso en evidencia anticuerpos anti-aspergiliares en 36 de los pacientes, pero sólo en 34 de ellos la IEF reveló sistemas precipitantes de aspecto característico, y/o en número suficiente, como para formular el diagnóstico inmunológico de aspergilosis. El número de sistemas precipitantes revelados en estos casos, varió entre 1 y 11 en la DDG, y entre 3 y 22 en la IEF (Tabla I). En el caso AR (no. 31) del que se aisló *A. niger*, desconocemos todavía el número real de anticuerpos precipitantes revelables dado que no hemos trabajado con el antígeno homólogo. La clínica y la radiología, revisadas cuidadosamente por los Autores después del hallazgo inmunológico, resultan compatibles con el diagnóstico en las 34 observaciones. El aspecto radiológico típico de aspergiloma pudo ser comprobado en 13 casos, 15 corresponden a formas intracavitarias parenquimatosas en las que no se pudo objetivar un aspergiloma, 4 han sido catalogados como aspergilosis bronco-

cavitaria y 2 tienen los caracteres de la aspergilosis broncopulmonar alérgica.

El cultivo de esputos fue positivo en 25 de los 30 pacientes estudiados correctamente del punto de vista micológico; *A. fumigatus* fue aislado de 18 enfermos, *A. flavus* de 5, *A. niger* de 1; en 1 caso fueron aislados simultáneamente *A. fumigatus* y *A. flavus*. El examen directo demostró filamentos en la expectoración de 8 de estos enfermos (Tabla II).

El diagnóstico final de aspergilosis del aparato respiratorio se fundamentó en 18 casos en la presencia de anticuerpos precipitantes anti-aspergiliares, más el cultivo positivo de esputos; en 8 casos en la asociación de esos argumentos al hallazgo de filamentos aspergiliares al examen directo, y en los 8 casos restantes en la demostración de 4 ó más sistemas precipitantes, y en los datos clínico-radiológicos.

Los 2 enfermos que generaron bandas de precipitación en la DDG pero no dieron origen a sistemas precipitantes significativos en la IEF, no presentan elementos clínicos ni ra-

T A B L A I

Principales características de los 34 casos inmunológicamente confirmados de aspergilosis del aparato respiratorio

No.	Nombre	Edad	Sexo	DDG (*)	IEF (*)	QII (**)	Directo	Cultivo	Forma clínico-radiológica
1	WB	39	M	2	5	...	(-)	<i>A. flavus</i>	Aspergilosis intracavitá- ria atípica (atípica i.c.)
2	IRP	33	F	2	5	(+)	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Aspergiloma
3	ES	28	F	14	20	...	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Aspergiloma
4	MLL	41	F	1	5	...	(+)	<i>A. flavus</i>	Bronco-cavitaria
5	EL	48	F	1	5	...	(-)	<i>A. flavus</i>	Bronco-cavitaria
6	SM	26	M	2	6	...	(-)	<i>A. flavus</i>	Atípica i.c.
7	RA	33	M	11	18	(+)	(+)	<i>A. fumigatus</i>	Alérgica
8	FFC	58	F	11	22	(+)	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Atípica i.c.
9	NO	12	F	7	15	(+)	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Atípica i.c.
10	RG	53	M	8	8	(+)	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Aspergiloma
11	JT	44	M	3	12	(+)	Aspergiloma
12	AM	42	F	8	16	(+)	(+)	<i>A. fumigatus</i>	Atípica i.c.
13	JN	22	M	5	8	(+)	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Aspergiloma
14	LB	33	F	10	12	(+)	Aspergiloma
15	AC	22	M	8	19	...	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Aspergiloma
16	BG	49	F	5	6	(+)	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Aspergiloma
17	RC	49	M	3	15	(+)	Aspergiloma
18	MT	55	F	8	8	...	(+)	<i>A. fumigatus</i>	Aspergiloma
19	TSB	38	F	10	22	(+)	(+)	<i>A. fumigatus</i> <i>A. flavus</i>	Aspergiloma
20	VB	74	M	7	15	Bronco-cavitaria
21	AR	51	F	5	11	...	(-)	(-)	Atípica i.c.
22	BP	81	F	6	8	...	(-)	(-)	Atípica i.c.
23	AF	19	F	10	16	...	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Aspergiloma
24	AC	78	M	6	11	...	(-)	<i>A. flavus</i>	Atípica i.c.
25	JFD	57	M	9	11	...	(-)	(-)	Atípica i.c.
26	OS	54	M	6	10	...	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Alérgica
27	WW	42	M	11	11	...	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Atípica i.c.
28	MS	28	F	4	4	...	(-)	(-)	Atípica i.c.
29	APF	37	F	8	10	...	(+)	<i>A. fumigatus</i>	Atípica i.c.
30	MJO	59	F	4	5	...	(-)	(-)	Atípica i.c.
31	AR	41	M	6	7	...	(+)	<i>A. niger</i>	Bronco-cavitaria
32	LR	48	F	9	9	...	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Atípica i.c.
33	IMR	87	F	11	14	...	(-)	<i>A. fumigatus</i>	Aspergiloma
34	AM	34	M	3	3	...	(+)	<i>A. fumigatus</i>	Atípica i.c.

(*) Salvo en el paciente AR (No. 31) se notan los sistemas precipitantes revelados con el antígeno homólogo

(**) Actividad quimotripsica II (TRAN VAN KY & col.¹⁰)

(...) No realizado

(Atípica i.c.) = Aspergilosis atípica intra-cavitária

T A B L A I I

Estudio inmunológico y micológico de 36 pacientes con prueba de doble difusión positiva

Exámenes	Pacientes estudiados	Positivos	Negativos
IEF	36	34	2
Cultivo	30	25 (*)	5
Directo	30	8	22

(*) Aislamiento reiterado, más de 2 tubos en cada muestra.

T A B L A I I I

Estudio inmunológico y micológico em 84 pacientes seleccionados al azar entre los 486 negativos en la doble difusión

Exámenes	Pacientes estudiados	Positivos	Negativos
DDG	84	0	84
IEF	84	0	84
Cultivo	84	20 (*)	64
Directo	84	0	84

(*) Aislamiento en una sóla de las 3 muestras y como máximo en 2 de los 6 tubos sembrados (sin valor diagnóstico)

T A B L A I V

Incidencia relativa de los aspergilomas antes y despues del empleo de las técnicas inmunológicas

Formas clínico-radiológicas	Periodo	
	1947-67	1968-71
Aspergilomas	15 (68.18%)	13 (38.23%)
Aspergilosis "atípicas"	7 (31.81%)	21 (61.76%)
T o t a l	22 (100%)	34 (100%)

diológicos característicos de una aspergilosis. En uno de ellos, se confirmó operatoriamente un neoplasma broncopulmonar, observándose filamentos aspergílares en un tapón mucoso bronquial, no habiendo signos de invasión fúngica de la mucosa, por lo que lo consideramos una forma de saprofitismo.

En el grupo control la IEF no reveló precipitinas anti-aspergílares (Tabla III), y el examen directo de esputos fue siempre negativo. El cultivo permitió aislar *A. flavus* de 12 enfermos, *A. fumigatus* de 7 y *A. niger* de 1, pero como se aclara en la Tabla III, ese hallazgo no tuvo nunca significación diagnóstica.

La investigación de la actividad quimotripsica en 12 de los sueros positivos en DDG e IEF, reveló constantemente la fracción Q II (Fig. 5) identificada por TRAN VAN KY & col.¹⁹.

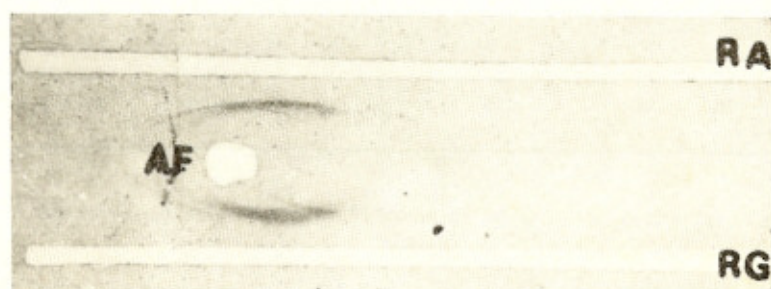


Fig. 5 — Revelación de la actividad quimotripsica Q II (Biguet y col.²⁰) en extractos "frescos" de *A. fumigatus* (A.F.) empleando sueros de los enfermos R.A. (No. 7) y R.G. (No. 10)

COMENTARIOS

Las pruebas de precipitación en gel han resultado particularmente útiles para el diagnóstico de la aspergilosis del aparato respiratorio del hombre en el Uruguay. Nuestro equipo ya había comprobado el valor potencial de estas pruebas al aplicarlas al estudio de los sueros de 12 pacientes con aspergilosis micológicamente demostrada¹⁵. Según se desprende de los datos que ahora aportamos, los métodos de DDG e IEF han permitido, en 4 años, y en un sólo Laboratorio, realizar el diagnóstico de 34 nuevos casos, mientras que el total observado en el país en el período de 20 años que siguió a la primera observación autóctona, sólo llega a 22 pacientes.

El mayor poder resolutivo que caracteriza a los diagramas inmuno electroforético de la serie actual (Figs. 3 y 4), así como el aumento del promedio de sistemas precipitantes detectados, en relación a la ya referida publicación de PEÑA & col.¹⁵, han sido seguramente determinados por el empleo de agarosa como sustrato de las reacciones y por el perfeccionamiento de los métodos de preparación de nuestros antígenos. Este último aspecto ha sido mejorado sobre todo por la estandarización inmunolectroforética sistemática de los extractos antigénicos frente a anti-sueros hiperrinmunes de conejos.

Al incremento del número de casos diagnosticados en el país desde que se emplean las pruebas inmunológicas, debe agregarse el crecimiento porcentual aplicable de las formas consideradas hasta ahora atípicas en sus aspectos clínico-radiológicos. En efecto, sólo 13 (38.2%) de los nuevos pacientes tenían un aspergiloma radiológico demostrable; mientras que 21 (61.7%) han sido clasificados como formas atípicas de la micosis (Tabla IV). Esto concuerda con los hallazgos de GERNEZ-RIEUX & col.¹⁰ y confirma la hipótesis adelantada por uno de nosotros en trabajo anterior²² en el sentido de que el clásico aspergiloma debe ser la forma menos frecuente de la enfermedad.

La sensibilidad de las técnicas de precipitación en gel supera, en la serie actual, a la de los métodos micológicos, pero, dado que el grupo control es pequeño, y teniendo en cuenta que existen casos adecuadamente apro-

bados de aspergilosis en los cuales no se pueden demostrar precipitinas anti-aspergílares⁷, seguimos entendiendo que el examen micológico no debe ser dejado de lado.

El diagnóstico de la aspergilosis, de acuerdo con el estado actual de nuestros conocimientos, debe surgir de una adecuada valoración de los datos clínicos, radiológicos, inmunológicos y micológicos. La aparición de hemoptisis en un bacilar con secuelas inactivas, la expectoración de pseudo-membranas o la instalación de broncoespasmo rebelde en un bronquítico crónico, la detección de infiltrados lábiles o de anematosis segmentarias en un asmático, la opacificación de cavidades pulmonares hasta entonces libres de todo contenido, deben sugerir al clínico la posible existencia de una complicación aspergilar, determinándolo a someter a su paciente a la instancia inmunológica. Si en ésta son puestos en evidencia anticuerpos contra fracciones específicas de especies del género *Aspergillus*, el diagnóstico de aspergilosis puede ser formulado. Sin embargo, el estudio del enfermo no debe detenerse allí. Es necesario intentar la identificación y el aislamiento del agente, sobre todo teniendo en cuenta el comportamiento disímil de las diferentes especies ante drogas anti-fúngicas aparentemente eficaces como la 5-fluorocitosina¹³.

Si las técnicas inmunológicas por el contrario, no dan resultados concluyentes, o resultan negativas, pero los argumentos que fundamentaron la sospecha clínica siguen siendo convincentes, el estudio micológico debe ser igualmente realizado. Sólo cuando la clínica y la radiología se suman a la negatividad de la investigación inmunológica, ésta será considerada argumento básico para descartar la enfermedad.

En lo que concierne a las técnicas de precipitación empleadas, importa destacar que la DDG probó estar dotada de una alta sensibilidad, que le permitió detectar todos los casos que revelaron sistemas precipitantes específicos en la IEF. Sin embargo, puede dar origen a falsos positivos, sobre todo cuando pone en evidencia menos de 3 bandas de precipitación. En consecuencia, su papel en el inmunodiagnóstico de la aspergilosis debe quedar reducido, cuando se trabaja en condiciones similares a las nuestras, a servir de prueba tamiz pa-

ra seleccionar los casos que serán sometidos a IEF, y a estudio micológico.

La experiencia que hemos recogido con la investigación de las actividades quimotripsicas, sugiere que como lo sostienen BIGUET & col.⁵ la identificación de la actividad Q II sobre una lámina de DDG sería argumento suficiente, desde al punto de vista del inmunodiagnóstico. Pero esto no resulta más simple ni más rápido que un análisis inmuno-electroforético.

La IEF, por el contrario, al posibilitar la identificación de los sistemas precipitantes específicos, otorga el máximo de seguridad al diagnóstico inmunológico. Por otra parte, constituye una técnica imprescindible para la estandarización cualitativa de los extractos antigénicos.

SUMMARY

Immunoprecipitation tests in the diagnosis of aspergillosis

On the basis of 56 local cases of aspergillosis of the respiratory system an analysis is carried out of the contribution of the gel precipitation tests in the diagnosis of the disease in Uruguay. Before their introduction, only 22 cases of this mycosis were on record in the country, as diagnosed between 1947 and 1967. Ever since 1968, the systematic utilization of the double diffusion in gel test (DDG) and of immunoelectrophoresis (IEF) has enabled the detection of 34 further cases at one single Laboratory.

The aspergilomas which, during the earliest stage, accounted for the most frequent clinical-roentgenological pattern met with (68.1%), decreased to 31.8% within the series diagnosed by the use of the immunologic tests.

The DDG test of a sensitiveness higher than that of IEF and much simpler as well, although involving a nonspecificity which cannot be overlooked, is advocated as a screening test for the selection of cases deserving a mycologic study with a more elaborate immunologic examination.

The IEF test is regarded as indispensable in the standardization of antigenic extracts, as

well as in the immunologic substantiation of diagnosis.

The *A. fumigatus* fraction, which is endowed with chemotrypsic II activity was rendered manifest by the 12 sera in which their detection was attempted; in every instance it superposed arc C as identified by TRAN VAN KY et al.¹⁸.

REFERENCIAS

1. AMARGOS, A.; MENENDEZ, H. & SOTELO, J. R. — Aspergilosis pulmonar y cardiaca. *Rev. Inst. Inv. Ciencias Biol.* (Montevideo) 1:271-283, 1951.
2. BIGUET, J.; TRAN VAN KY, P.; ANDRIEU, S. & FRUIT, J. — Analyse immunochimique des fractions antigéniques solubles d'*Aspergillus fumigatus*. Ordre d'apparition des anticorps expérimentaux du lapin. Comparaison de ces derniers avec des anticorps naturels humains. *C. R. Acad. Sci.* (Paris) 264:3768-3770, 1962.
3. BIGUET, J.; TRAN VAN KY, P.; CAPRON, A. & FRUIT, J. — Analyse immunoelectrophorétique d'extraits cellulaires et de milieu de culture d'*Aspergillus fumigatus* par des immunosérums expérimentaux et des sérums expérimentaux et des sérums de malades atteints d'aspergillomes bronchopulmonaires. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris) 106:72-97, 1964.
4. BIGUET, J.; TRAN VAN KY, P. & ANDRIEU, S. — L'analyse immunoelectrophorétique des structures antigéniques fongiques. *Bull. Soc. Pharm.* (Nancy) 71:6-25, 1966.
5. BIGUET, J.; TRAN VAN KY, P.; FRUIT, J. & ANDRIEU, S. — Identification d'une activité chymotrypsique au niveau de fractions remarquables de l'extrait antigénique d'*Aspergillus fumigatus*. Repercussions sur le diagnostic immunologique de l'aspergillose. *Rev. Immunol. Thèr. Antimicrob.* 31:317-328, 1967.
6. BIGUET, J.; FRUIT, J.; ANDRIEU, S. & TRAN VAN KY, P. — Structure antigénique et systématique des espèces du genre *Aspergillus*. *Bull. Soc. Mycol. France.* 85:274-284, 1969.
7. BIGUET, J.; TRAN VAN KY, P. & ANDRIEU, S. — Le diagnostic biologique des aspergilloses. *Tórax* (Montevideo) 20:33-47, 1971.
8. CAZES, M. — Aspergilosis pulmonar secundaria. *Tórax* (Montevideo) 12:77-81, 1963.
9. GERNEZ-RIEUX, Ch.; BIGUET, J.; VOISIN, C.; CAPRON, A.; BALGAIREIES, E. & TRAN VAN KY, P. — Diagnostic sérologique des

YARZABAL, L. A.; DA LUZ, S.; JOSEF, M.; TORRES, J. M.; VIGNA, I. & MURAS, O. — Pruebas de inmunoprecipitación en el diagnóstico de la aspergilosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:1-9, 1973.

- aspergillomes bronchopulmonaires par immuno-électrophorèse. *J. Franc. Méd. Chir. Thor.* 17:633-676, 1963.
10. GERNEZ-RIEUX, Ch.; VOISIN, C.; WATTEL, F. & LEMORT, J. — Les formes latentes ou méconnues de l'aspergillose broncho-pulmonaire. *Rev. Praticien.* 15:293-298, 1965.
 11. MACKINNON, J. E.; FERRADA, L. V. & MONTEMAYOR, L. — Investigación sobre las maduromicosis y sus agentes. *An. Fac. Med. (Montevideo)* 34:231-300, 1949.
 12. MURAS, O. & YARZABAL, L. A. — Aspergilloma intracavitaria y bronquitis aspergilar. *Tórax (Montevideo)* 12:58-70, 1963.
 13. MURAS, O.; DA LUZ, S.; VIGNA, I.; TORRES, J. M. & YARZABAL, L. A. — Tratamiento de la aspergilosis del aparato respiratorio con la 5-fluorocitosina. *V.º Congreso Latinoamericano de Microbiología.* Punta del Este, 5-11 diciembre, 1971.
 14. OUCHTERLONY, O. — *In vitro* method for testing the toxin producing capacity of Diphtheria bacteria. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 25:186-191, 1948.
 15. PEÑA, M. E.; YARZABAL, L. A. & JOSEF, M. — Diagnóstico inmunológico de la aspergilosis del aparato respiratorio. *Tórax (Montevideo)* 16:146-150, 1967.
 16. PEPYS, J.; RIDDELL, R. W.; CITRON, K. M.; CLAYTON, Y. M. & SHORT, E. I. — Clinical and immunologic significance of *Aspergillus fumigatus* in the spectrum. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 80:167-180, 1959.
 17. TARALLO, N. H. — Aspergilosis pulmonar secundaria. *Tórax (Montevideo)* 12:82-86, 1963.
 18. TRAN VAN KY, P.; BIGUET, J. & FRUIT, J. — Localisation et fréquence des arcs des immunoélectrophorègrammes produit par le sérum des malades atteints de mycetomes aspergillaires appliqués contre l'antigène *Aspergillus fumigatus*. *Rev. Immunol. (Paris)* 30:13-20, 1966.
 19. TRAN VAN KY, P.; URIEL, J. & ROSE, F. — Caractérisation de types d'activités enzymatiques dans des extraits antigéniques d'*Aspergillus fumigatus* après électrophorèse e immunoélectrophorèse en agarose. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 111:161-170, 1966.
 20. TRAN VAN KY, P.; BIGUET, J.; VAUCELLE, T. & FRUIT, J. — Analyse immunoélectrophorétique et caractérisation des activités enzymatique des extraits antigéniques d'*Aspergillus flavus*. Repercussion sur le diagnostic différentiel des aspergilloses humaines. *Satouradia* 9:210-220, 1971.
 21. YARZABAL, L. A.; GONZALEZ-LEPRAT, J. A. & DIGHIERO, C. S. — Aspergilosis pulmonar con síndrome mediastinal superior. *Tórax (Montevideo)* 12:71-76, 1963.
 22. YARZABAL, L. A.; PIOVANO, S.; BERGALLI, L.; PELUFFO, M.; ARROYO, L. & LODEIROS, L. — Aspergilosis pulmonar intracavitaria. *Tórax (Montevideo)* 15:165-171, 1966.
 23. YARZABAL, L. A.; PEÑA, M. E. & JOSEF, M. — La aspergilosis respiratoria humana en el Uruguay. *Tórax (Montevideo)* 17:67-74, 1968.

Recebido para publicação em 25/5/1972.