

Caracterización biológica del hongo *Aspergillus sp* y su impacto en la salud

Antonio Vásquez Hidalgo

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar e identificar el hongo encontrado en las semillas del árbol nacascal y su impacto en la salud del medioambiente. El proceso estuvo conformado por tres fases y tuvo como resultado la identificación de un hongo del género *Aspergillus sp*, que incide en las infecciones respiratorias agudas. Se encontró una nueva especie de *Aspergillus sp* en El Salvador.

<https://revistas.ues.edu.sv/index.php/launiversidad/article/view/2168>

Introducción

En nuestro medioambiente la salud es un valor agregado al capital humano. No solo es necesario identificar los riesgos ambientales, sino también contribuir a resolver la problemática encontrada. Es tarea de todos colaborar en la minimización del daño al medioambiente.

En esta ocasión se investiga sobre una planta natural muy conocida en nuestro medio: el árbol nacascal o nacasclo. Esta semilla tiene una particularidad inerte, necesita la presencia de un hongo del género *Aspergillus sp*, para que, junto con las propiedades del barro, se puedan teñir de color negro las vasijas, lo que les otorga una particular belleza, quizás incluso un aspecto colonial. Asimismo, se puede curtir la piel del ganado vacuno.

Sin embargo, se ha encontrado que en los cinco lotes de semillas se alberga un hongo que infiere daño a la salud luego de exposiciones prolongadas y si la persona tiene las defensas inmunológicas bajas, tal como se demuestra en muchos estudios del género *Aspergillus*, y ya sea por negligencia o desconocimiento, se ignora el «peligro» que encierra la aspiración de las esporas.

En muchas ocasiones las afecciones pulmonares se diagnostican como Bronquitis Aguda o Asma Bronquial, cuando en realidad no se debe descartar una Micosis Pulmonar, y el tratamiento debería conformarse por antimicóticos y no antibióticos. Así también se reportan fenómenos alérgicos.

La investigación estuvo compuesta por tres fases:

- a) Primera fase: Recolección de las semillas de nacascal.
- b) Segunda fase: Extracción y preparación del tanino de la semilla y el hongo.
- c) Tercera fase: Pruebas de laboratorio, que consistieron en sembrar el inóculo del hongo presente en la semilla en tubos de agar sabouroud y examinar la muestra por microscopía simple y microscopía electrónica de barrido.

El descubrimiento

El árbol conocido como nacascal tiene como nombre científico *Caesalpinia coriaria*. Perteneció a la familia *Caesalpinieaceae*, del género *Caesalpinia*. Es una planta leguminosa con tallo de 3 a 11 metros de altura, con hojas en pares pinnas de 5 a 10 cm de largo (cada una con más de 10 folíolos de 4 a 8 mm de largo y 2 mm de ancho, ápice redondeado) y semillas de color café de aspecto negro.

En estas semillas crece un hongo parecido al *Aspergillus niger*, considerado como patógeno oportunista para el ser humano; sin embargo, su morfología es diferente, sus esporas varían con el anterior. En este caso están dispuestas en forma de espículas separadas en toda la espora. Son múltiples, coalescentes, unas pigmentadas y otras claras, de diámetro pequeño, y de color negro a café según pigmentación, no son planas ni rugosas como la de especie *niger*. Al ser cultivadas en medio especial generan una coloración negra con producción de pigmento en la región posterior del tubo antes de las 24 horas al agregar al medio agar saboroud más sustancias oxidantes. Según el análisis fitoquímico preliminar del árbol de *Caesalpinia*

coriaria, contiene taninos, triterpenos, glicosidos y flavonoides. El hongo se reproduce en las semillas del árbol nacascol, luego se cultiva in vitro para la producción del colorante.

Figura 1-1. *Semilla de nacascol*



El hongo encontrado en las semillas se describe así:

Esterigmas. La cabeza de la conidia es negra, conidioforo liso largo de 1 a 4 mm con conidias o esporas internas moderadas de 1 a 3 micras, coloreadas de color café a negro.

Características macroscópicas: colonia en agar saboraud es de color blanco, luego cambia a verde de aspecto radiado y después se hace negro, el reverso es amarillo o pigmentado de color negro según agente oxidante, altura del micelio bajo, aspecto de la colonia es polvoriento de color negro.

Características Microscópicas: cabezas conidiales lisas de una pared redonda e irregular, dispuesta en forma radial; estipes de pared delgada lisas y pronunciadas, coloreadas de color café a negro; no se observa vesícula o columella; hay conidias abundantes desprendiéndose de la cabeza; tiene una hilera de fialides. El esporangio es una estructura globosa peridial simple, del esterigma es de color negro. Las conidias maduras de color café son esféricas con proyecciones

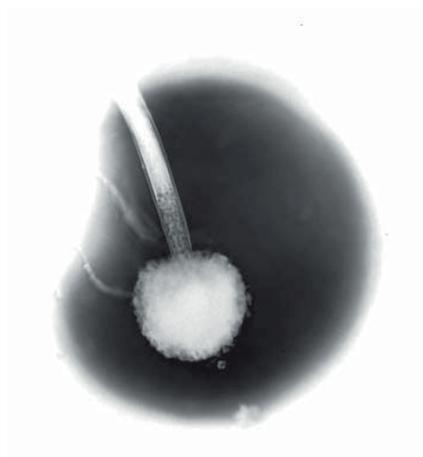
en forma de picos triangulares en toda la periferia, abundantes; y las centrales son escasas formando espículas en número mayor de diez. La conidia tiene un aspecto esférico estrellado con espículas, de los extremos emergen filamentos dispuestos en forma de cadenas lineales que salen de las protuberancias. Toda la estructura forma una coraza sólida. Las esporas inmaduras asexuales son esféricas de pared delgada, incolora, de tamaño grande, que luego se llenan formando masas internas de color café. El conioforo es largo, liso, con esporas abundantes. Hay otras conidias que se diferencian de la anterior porque tienen una forma de núcleo al interior de tamaño regular a grande color celeste que adopta del colorante con borde hialino de pared simple más pequeñas que las anteriores, sin protuberancias de aspecto rugoso plano en número no mayor de diez, no forman espículas que corresponde al níger.

En general, la espora es de forma esférica e irregular, aseptada, ameropora, coloreada y oscura del tipo feospora, tamaño grande, cuyo diámetro es de 1 a 3 micras; las hifas no son septadas con micelio continuo. Crece a temperatura ambiente 37 o C.

Figura 1-2. *Esporas Aspergillus sp.*40X



Figura 1-3. *Vesícula y esporangio del hongo*



En cultivo de agar saboraud de placa y tubo: se observan colonias abundantes de color blanco a verde radiado que cambia a color negro, dispuestos en forma radial del centro hacia fuera, el reverso es color amarillo a pigmentado negro según uso de oxidantes.

En cuanto a esta variedad de *Aspergillus* encontrada, se sugiere que, dada su caracterización morfológica, es otra especie y ha sido encontrada en El Salvador. Esto se ha deducido ya que por la clasificación taxonómica internacional no corresponde a la especie niger. Entre sus diferencias importantes están: conidioforo no es liso, no tiene septos, da pigmento al reverso anterior de los tubos, la espora es forma de cactus o mazo o de botella con prominencias triangulares que tienen proyecciones en forma difusa.

Se observa que, si la vasija se coloca, luego del quemado, en el suelo donde están tiradas las semillas de donde se extrajo el colorante, es evidente que se vuelve a contaminar. El contacto de la vasija al horno probablemente quema la espora, ya que la temperatura es de un horno artesanal aproximadamente es de más de 300°C.

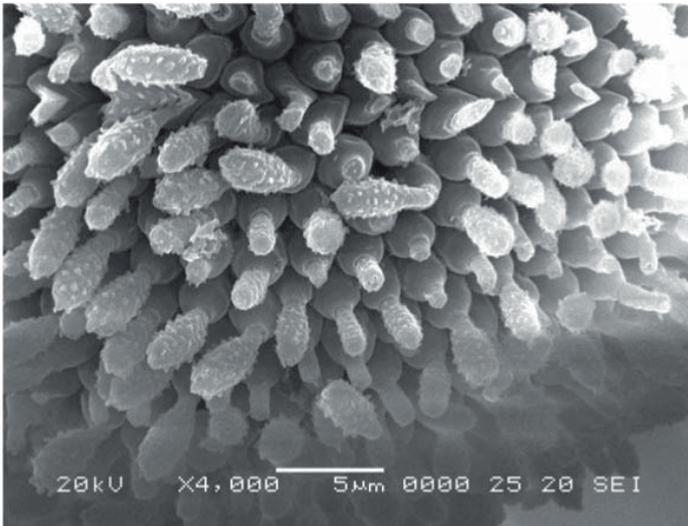
También utilizan esta misma materia prima para las curtiembres de pieles, cuyo proceso es similar. Durante el preparado no usan mascarillas ni guantes de protección. La mayoría de personas que trabajan estas artesanías son humildes y andan descalzas. Además de estas condiciones, se debe agregar que todos somos susceptibles a la presencia del antígeno o alergeno del hongo, incluso si se reporta la presencia y diseminación del hongo en el suelo.

Por método de laboratorio se encontró, por microscopia, que a las 24 horas del cultivo hubo crecimiento rápido de esporulación, a los cinco minutos. Luego de transcurrida una hora había millones de esporas en diez campos. Esto se puede observar más adelante en la secuencia fotográfica del cultivo y microcultivo del hongo *Aspergillus* sp.

Al revisar el reporte epidemiológico del Ministerio de Salud, se ha encontrado que en estas zonas existe una alta prevalencia de infecciones respiratorias agudas en niños y adultos. Su explicación es

la siguiente: «el problema es viral». Esto revela que desconocen que los fenómenos alérgicos y respiratorios tienen otras causales.

Figura 1-4. Imagen obtenida con microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 X). Cortesía de la doctora Vianey de Ábrego (Tomada en CENSALUD, febrero de 2008)

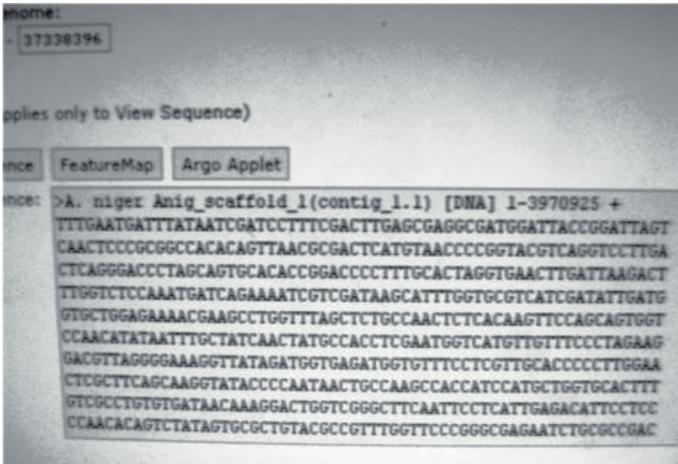


En la Figura 1-4 se observa la imagen obtenida con microfotografía electrónica de barrido: vesícula y esporas del hongo (6,500 x). Puede notarse, según reporte de CENSALUD, que es un «hongo filamentos, donde sobresalen del micelio las cabezas conidiales, redondeadas. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fialides en forma de botella, en cuyo extremo se fijan las esporas, en este caso solo se aprecia uno no una cadeneta», el conidioforo no tiene septos y es liso, la vesícula es redonda de donde emergen múltiples de una a dos esporas en forma de mazo o cactus con espículas dispersas, en el cultivo dan un pigmento al reverso del tubo, las otras especies no. Fenotípicamente corresponde a otra especie del género *Aspergillus*.

A partir de estudios genotípicos se identificó su pertenencia al género *Aspergillus*, ya que presenta la siguiente secuenciación de ADN.

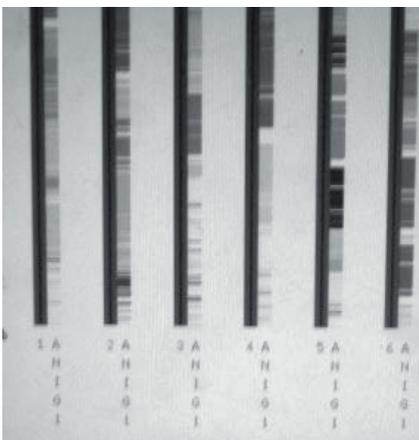
En la Figura 3 se observa la secuenciación del ADN del género *Aspergillus* sp, en la que genótipicamente las secuencias de bases púricas y pirimididicas se diferencian entre las diversas especies del género, tal como se ve el mapa cromosómico en las Figuras 3 y 4.

Figura 2. Secuenciación del ADN del género *Aspergillus* sp.



Fuente: Broad Institute, *Aspergillus* Comparative Database 2007.

Figura 3. ADN cromosomal del género *Aspergillus* sp.



Fuente: Broad Institute, *Aspergillus* Comparative Database 2007.

Figura 4. Comparación de especies de *Aspergillus* por secuenciación cromosomal de ADN.



Impacto en la Salud

El contacto directo entre el humano y el hongo tiene como consecuencias el daño a la salud y la erogación del gasto público en la atención de Infecciones Respiratorias Agudas, en los niveles de atención I, II y III de la red del Ministerio de Salud. De tal forma que clasifican en forma general el diagnóstico de Infección Respiratoria Aguda sin explicar la causa de su origen.

Se ha determinado por amplia revisión bibliográfica que el agente causal de *Aspergillus* da Aspergilosis Broncopulmonar o Alérgica, en otros casos cáncer pulmonar. En esto se incluye, del género *Aspergillus*, las especies de *fumigatus*, *níger*, *terreus*, *flavus*, *nidulans* y *ochraceus*. En nuestro medio es más frecuente el género *Aspergillus* de la especie *níger*.(1)

Cultivo y microcultivo del hongo *Aspergillus sp*

Foto 1. Semilla de nacascal. Obsérvese la pigmentación de color café a negro presente en la superficie de la semilla.



Foto 2. Tubo en agar saboraud con el hongo. Siembra de raspado de semilla nacascal que presenta pigmentación de color negro. Se observa que al segundo día el hongo *Aspergillus sp* ya está esporulando rápidamente. Al cuarto día está invadido todo el tubo en agar saboroud.

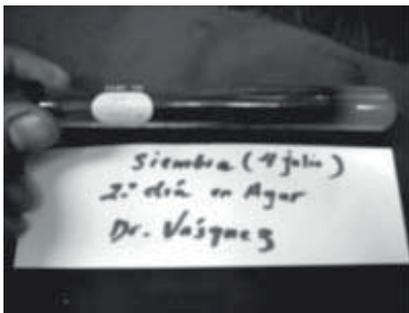


Foto 3. Crecimiento del hongo a las 24 horas, 10x. Se observa en el microscopio 10x que la esporulación a los cinco, quince y treinta minutos es alta, en cincuenta campos está completamente invadido.

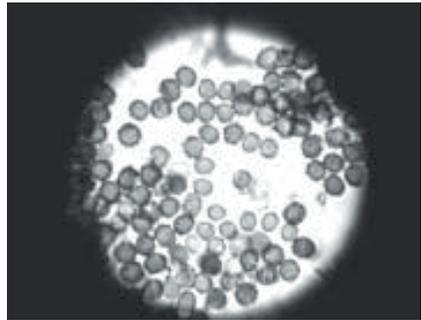


Foto 4. Microcultivo del hongo. Se hizo microcultivo del hongo y hubo aparecimiento de «mancha» en la placa a las 48 horas.



Foto 5. Observación del hongo a partir del microcultivo 10x. Se observa el conioforo más la vesícula adherida al medio.



Foto 6. Hongo *Aspergillus* sp 10x. Se observa el hongo encontrado en las semillas de nacascol con la vesícula y el conioforo, presenta inicio de esporas en forma de cadena lineal.

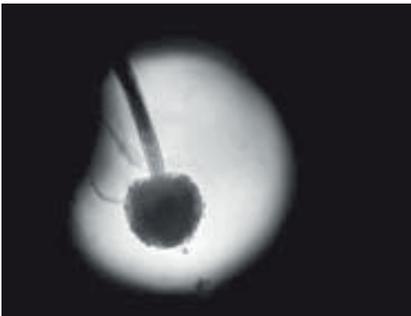


Foto 7. Espora del hongo *Aspergillus* sp 40x. Ampliada 100 veces. Se observan esporas encontradas en el cultivo en todas las láminas que se desprenden de las vesículas.

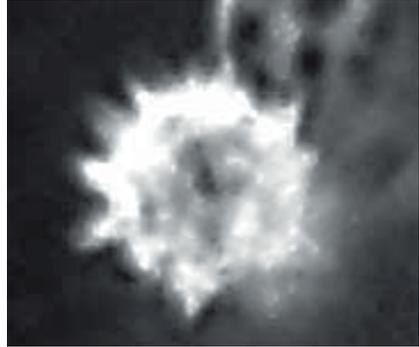
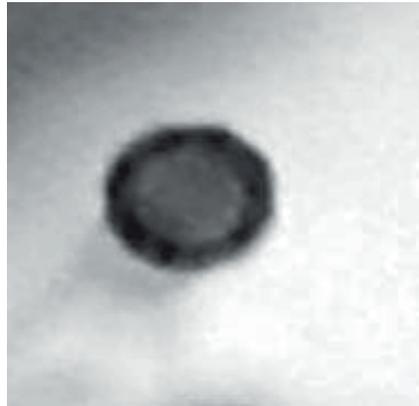


Foto 8. Espora del hongo *Aspergillus* Níger 40x. Se observa que la variedad níger es la que está asociada al género *Aspergillus*, pero en las semillas no se encontró esta variedad. La de la foto 7 es la más frecuente, con esporulación alta.



Existen varias formas de aspergilosis que causan enfermedades en el ser humano, entre las más conocidas se encuentran:

- Aspergilosis pulmonar de tipo bronco pulmonar alérgica: se debe a una reacción alérgica al hongo por aspiración. Se desarrolla con asma bronquial.
- Aspergiloma: es un tumor que se desarrolla en un lóbulo pulmonar, como una tuberculosis o absceso pulmonar.
- Aspergilosis pulmonar invasiva: es una infección grave con neumonía que se disemina a otras partes del cuerpo. La infección ocurre en personas con sistemas inmunitarios debilitados debido al cáncer, SIDA, leucemia, trasplante de órganos, quimioterapia entre otros. (2,3,5)

Revisando la literatura, se ha encontrado que los aspergilomas se forman cuando el hongo *Aspergillus* crece como una masa en cavidades pulmonares (pulmón) o cuando el organismo invade tejido previamente sano, y causa un absceso. (4,6-9)

El *Aspergillus*, en altas concentraciones, puede producir aspergilosis. La especie invasora provoca alteraciones pulmonares. Esta enfermedad aparece con más frecuencia en agricultores, ya que inhalan el polvo del hongo con más facilidad. (4)

La forma de reproducción del *Aspergillus* son sus esporas, que con un tamaño de 2 a 3.5 μ m entran fácilmente a las vías aéreas. Al germinar estas esporas, y ser introducidas en un individuo susceptible (asma atípico, fibrosis quística), forma hifas que colonizan los bronquios. Las hifas tienen de 3 a 7 μ m de diámetro, y se caracterizan por sus ramificaciones en ángulo de 45 grados. (10-13,1)

El tamaño del inóculo es variable, el número de esporas inhaladas es un factor importante en la producción de Aspergilosis. El asma (atopia), fibrosis quística y asma son de las más frecuentes de consulta externa. (14)

En general el *Aspergillus* es un hongo filamentoso del grupo Deuteromycetes u hongos imperfectos. Su aspecto microscópico es típico y se caracteriza por unas estructuras esporíferas o reproductoras llamadas cabezas conidiales. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella, en cuyo extremo se forman cadenas de esporas en forma lineal. (15,10)

Rapper y Fennell las clasifican en 18 grupos, basándose en su aspecto macroscópico y en las características morfológicas de los conidióforos y fiálides; de ellas, doce se relacionan con enfermedad humana. Las más importantes son: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*. (16, 18,2)

Otros autores consideran que el *Aspergillus* es un género de alrededor de 200 hongos. Puede existir en dos formas básicas: levaduras e hifas. El *Aspergillus* es filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas, el tipo de hongos opuesto a las levaduras, que se componen de una sola célula redonda). (18)

El *Aspergillus niger* tiene el micelio lanoso de color blanco amarillento que cambia a negro, el reverso es blanco amarillento, conidióforos largos y lisos y fiálides biseriadas que cubren completamente la vesícula. (10)

Los *Aspergillus* pueden ocasionar múltiples procesos patológicos. Entre los factores de patogenicidad de este hongo se encuentran: el pequeño tamaño de sus conidias permite que sean aspiradas y causen infección en el pulmón y en los senos paranasales; su capacidad de crecer rápidamente a 37°C lo hace idóneo para afectar al humano; así como su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos; y la producción de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células. (9)

El *Aspergillus* por su naturaleza es «patógeno oportunista», es decir, suele afectar a pacientes con mecanismos de defensa comprometidos, por lo que su lesión es muy grave.

Los síntomas principales al contraer *Aspergillus* pueden ser: dolor torácico, expectoración con sangre (se observa hasta en un 75% de los pacientes), fiebre, insuficiencia respiratoria, pérdida de peso, sibilancias, tos seca. (18)

Entre las complicaciones más relacionadas están: dificultad respiratoria progresiva, hemorragia pulmonar, diseminación de la infección, entre otros. La aspergilosis constituye la infección micótica oportunista más frecuente del pulmón, (5) por lo que en pacientes con SIDA es fulminante. (19)

Medioambiente

En la Figura 5 se observa por radiografía de tórax simple un paciente que presenta patrones nodulares característicos de personas que se han contaminado con el hongo *Aspergillus* sp, y que presentan manifestaciones clínicas de una Aspergilosis Pulmonar, y en otros casos Aspergiloma Pulmonar.

Se aclara que este diagnóstico diferencial a priori tiene similitudes con una Bronquitis Aguda, y por desconocimiento los pacientes son tratados con antibióticos, cuando en realidad tendría que ser con un antimicótico.

Figura 5. Radiografía de tórax. Se observan opacidades bilaterales con patrón nodular características de aspergilosis pulmonar invasora. ⁽²⁰⁾



El *Aspergillus* es un hongo ampliamente difundido en la naturaleza que se desarrolla en vegetales en descomposición, granos de cereal, heno, tejidos de algodón, lana y plumas. Su medio ideal son los ambientes oscuros, húmedos y cerrados. Podemos encontrar esporas de *Aspergillus* en los depósitos de trigo, en los edificios en construcción, en los aparatos de aire acondicionado y en los alimentos enmohecidos.

El *Aspergillus* es un hongo filamentoso, ubicuo y cosmopolita que se encuentra en la naturaleza y en las viviendas. Se puede aislar de la tierra, de los sistemas de ventilación, del agua. (4)

Los aspergilos se reproducen con facilidad a temperaturas altas y se encuentran con frecuencia en cereales, forrajes, algodón y algunas aves como las palomas; abundan en materiales orgánicos en descomposición. Las esporas se diseminan por el aire (conidios) y son inhaladas. (5)

Las esporas pueden sobrevivir, en las condiciones adecuadas, durante miles de años. Estudios recientes han demostrado que las esporas de *Aspergillus* mantienen intacta su capacidad invasiva, e incluso parece aumentar su potencial alergénico después de miles de años. Se han encontrado esporas de *A. níger* y *flavus* en la comida, las ropas, las flores y otros objetos de las tumbas de los faraones del antiguo Egipto, en momias y en el sarcófago de Ramsés II.(13) La propagación rápida del *Aspergillus* en ambientes llenos de polvo y a través de los sistemas de aire acondicionado puede ser el origen de los brotes de aspergilosis que acontecen en hospitales y otros edificios después de obras de remodelación o construcción.(4)

Las especies de *Aspergillus* son termoestables y son capaces de crecer a temperatura entre 15 y 53 grados centígrados. Las esporas están presentes todo el año, pero predominan en otoño e invierno, recuperándose de paja, estiércol, madera, vegetales en descomposición, abono de tierra, alcantarillas, deposiciones de aves, heno enmohecido y aire atmosférico.(2-5)

Prevención en la salud para resolver el problema identificado

La investigación consiste en un nuevo aporte científico de conocimiento en el impacto ambiental en salud de nuestro país, en identificar no solamente el hongo y su localización, sino también en contribuir con la educación sanitaria y ambiental. Incluso en cuanto a capacitar el personal de salud sobre el descubrimiento y conocimiento de aspectos microbiológicos en la prevención de la enfermedad, optando la posibilidad de pensar en otros diagnósticos.

Se ha encontrado que, al utilizar un método sencillo de protección, como el uso de mascarilla y guantes, se reduce considerablemente la diseminación y contaminación de los susceptibles a contraer el hongo, así como otras medidas de eliminar o destruir el hongo durante el preparado. También es importante proteger el producto luego del quemado en otras áreas estériles. También a nivel de suelo se ha reportado la presencia de *Aspergillus*, por lo que es un antígeno o alérgeno susceptible al ser humano.

En conclusión, se encontró una nueva especie de hongo del género *Aspergillus* en las semillas de nacascal y en el suelo salvadoreño en la zona norte del país, el cual será denominado en el futuro con el nombre científico: *Aspergillus ues salvadoriensis*, del género *Aspergillus*; ues, porque se descubrió en la Universidad de El Salvador, y salvadoriensis, porque está en territorio de El Salvador; o es el caso nombre científico binomial: *Aspergillus ues salvadoriensis* A Vásquez. Se hizo búsqueda en base de datos de Atlanta CDC y sociedades de micología en donde no se reporta la especie encontrada en particular.

Se agradece a CENSALUD por su colaboración en la toma de macrofotografías electrónicas de barrido y a la doctora Vianney Ábrego.

Bibliografía

1. Revista Chilena Enfermedades Respiratorias, 2004; 20:30-36
2. Alacalá L. et al. *Aspergillus* y aspergilosis. Servicio de Microbiología Clínica, Madrid, 1998.
3. Rapaer Kb et al. The genus *Aspergillus*. Tratado de Micología Médica. 3a edic, 1998, pp. 668-703.
4. Sarria C. et al. Aspergilosis. Servicio Clínico de Medicina Interna, Madrid, 2005.
5. Gassiot C. et al. Aspergilosis pulmonar: un nuevo enfoque en la reemergencia. *Acta Médica*, 2000, 9(1-2): 67-72
6. Baker. S. *Aspergillus Níger* genomics: past, present and into the future. *Medical Micology*, septiembre, 2006, pp. 44, 517-521.
7. Couri, S. et al. "Digital Image processing a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus níger* 3TSB8 solid state fermentation: preliminary results", *Journal of Microscopy*, vol. 224.pt, December 2006, pp. 290-297.
8. Schaberciter-Gurtner et al. Molecular diagnosis of *Aspergillus* and *Candida* infections. *J. clinic Microb.* 2006. DOI: 10.1128/jcm-01344-06.
9. Kilich, M. Identification of clinically relevant *Aspergillus*. *Medical Micology*, September 2006, 44, 5127-5131.
10. Universidad de El Salvador. Manual de Diagnostico Micológico. Depto de Microbiología, 2007.
11. Bille, G. et al. *Aspergillus* species isolated from clinical specimens: suggested clinical and microbiological criteria to determine significance. *Clini. Microbiology Infect.* 1998, 4:700-716.

12. Departamento de Microbiología. Atlas Virtual de Micología Médica. Universidad de Panamá, 2007.
13. The Aspergillus Website. Fungal Reseca trust, 2007.
14. Arenas. R. Micología Médica Ilustrada, Mc Graw Hill, México, 2003.
15. Rippon. JW. Tratado de Micología Médica, Mc Graw Hill, México, 1990.
16. Negroni R. Micosis broncopulmonares del adulto y niño, Editores Beta S.R.L, Buenos Aires, 1981.
17. Negroni R. Micosis cutáneas y viscerales, Editores Beta S.R.L, Buenos Aires, 1984.
18. Conant, S. et al. Micología, Interamericana, México, 1972.
19. Torres-Rodríguez JM, Brunet MI. Aspergilosis sistémica. Monografía clínica en Enfermedades Infecciosas. Micosis sistémicas. Doyma. 1991; Cap. 9: 59-69.
20. Arteaga, E. y otros. "Aspergilosis pulmonar invasora en el síndrome de inmunodeficiencia". Rev Iberoam Micol, 1999; 16: 211-215.
21. Broad Institute. Aspergillus Comparative Database, 2007.

Anexos

Comparación de la nueva especie del género *Aspergillus* con especie *Níger*. Microscopía electrónica de barrido

Foto 1. Nueva especie del género *Aspergillus*. Cortesía doctora Vianney de Ábrego (CENSALUD, UES, 2008).

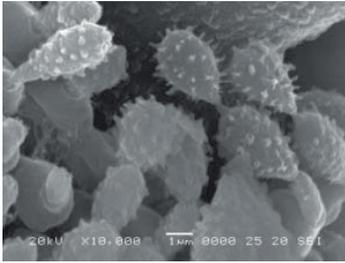


Foto 2. Nueva especie del género *Aspergillus*. Cortesía doctora Vianney de Ábrego (CENSALUD, UES, 2008).

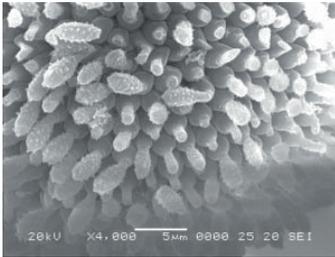


Foto 3. Nueva especie del género *Aspergillus*. Cortesía doctora Vianney de Ábrego (CENSALUD, UES, 2008).

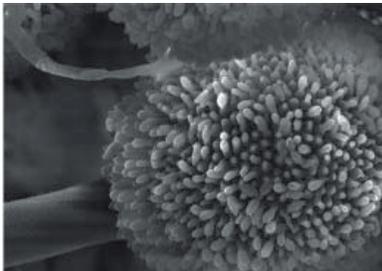


Foto 4. Es la especie más frecuente a nivel mundial. Se observa que las esporas son redondas o circulares diferentes a la especie nueva que es en forma de «mazo o botella».

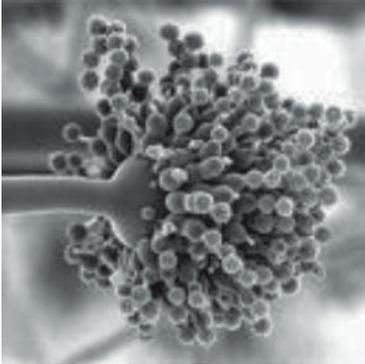
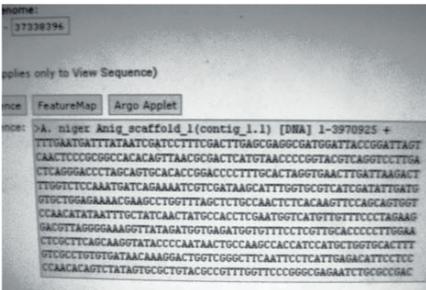


Foto 5. Secuenciación de ADN del género *Aspergillus*.



Microfotografías electrónicas de barrido de la nueva especie *Cortesiá doctora Vianney de Ábrego*, CENSALUD, 2008

