



7

**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES-CUAUTITLAN**

**PRODUCCION DE UN ANTIGENO DE ASPERGILLUS  
PARA LA PRUEBA DE INMUNODIFUSION EN GEL**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**  
**QUIMICO FARMACOBIOLOGO**  
**p r e s e n t a n**  
**ADRIANA VAZQUEZ OLIVEROS**  
**VICTOR R. TENORIO GUTIERREZ**

**Nombre del Director: MVZ. ROBERTO A. CERVANTES O.**  
**MVZ. M.C. FRANCISCO TRIGO TAVERA**

**1979**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIAL Y METODOS	6
III. RESULTADOS	10
IV. DISCUSION	14
V. CONCLUSIONES	16
VI. BIBLIOGRAFIA	17

## I. INTRODUCCION

Las enfermedades de hombres y animales causados por hongos - son conocidas como infecciones micóticas o micosis, las cuales son divididas según su presentación en exclusivamente tegumentarias, -- cuando los agentes causales afectan tejidos queratinizados y son in capaces de afectar tejidos internos. Se les denomina micosis inicialmente tegumentarias cuando los agentes penetran al organismo por la piel o las mucosas pueden afectar tejidos profundos; por último las - micosis secundariamente tegumentarias son aquellas que penetran al - organismo por vía aérea u oral afectando tejidos profundos para en una forma secundaria lesionar la piel o las mucosas (14).

Las infecciones micóticas han sido diagnosticadas tradicionalmente por aislamiento del agente causal en medios cultivos, esta práctica es muy eficiente; pero tiene sin embargo el inconveniente de que requiere tiempo y en algunas ocasiones no es posible llevar a cabo - el muestreo del tejido que está siendo afectado, sobre todo en micosis secundariamente tegumentarias. Es quizá por esta razón que la - tendencia actual en este tipo de enfermedades sea el uso de pruebas inmunológicas capaces de detectar la invasión del organismo por estos hongos (15,20,23).

Las micosis secundariamente tegumentarias son causadas por hongos que en su mayoría son dimórficos, es decir, que presentan dos formas distintas, una micelial en la naturaleza o en cultivos de laboratorio y

una forma levaduriforme en los tejidos del organismo que están afectando; una excepción son los hongos del género Aspergillus spp. que producen la llamada Aspergilosis y no cambian su forma (6,10,26). - Esta enfermedad ha sido reconocida desde 1815 cuando Mayer y Emmert encontraron que los pulmones de una urraca (Corvus glandarius), estaban invadidos por estos hongos. En 1856 Virchow describió enfermedades bronquiales y pulmonares en humanos reconociendo como agente patógeno al Aspergillus fumigatus.

Los hongos del género Aspergillus son ubicuos en la naturaleza, - se conocen aproximadamente 300 especies en este género, de los cuales 8 se han reconocido como patógenos para humanos y animales (25). Sin lugar a duda la especie que se ha recobrado con mayor frecuencia de tejidos lesionados es el Aspergillus fumigatus; sin embargo este agente se encuentra con facilidad en el medio ambiente, en especial en vegetales de tipo forrajes y henos. Hasta la fecha no se ha podido dilucidar cuales son los factores que podrían favorecer la penetración e implantación de estos hongos en los tejidos del huésped, aunque se han sugerido que una baja de defensas o una exposición masiva a las esporas de Aspergillus fumigatus, condicionarían la presencia de la enfermedad. La Aspergilosis es una enfermedad que presenta distintas formas clínicas como son:

a) Bronco Pulmonar Alérgica, en la cual el hongo no invade los tejidos, pero la presencia de sus estructuras provoca la reacción de defensa del organismo, que se manifiestan con tos y disnea (1,5,6,8,9,10,16,

17,21,23,29,31).

b) Aspergiloma, el Aspergillus penetra al pulmón e invade lesiones ocasionales generalmente por Tuberculosis, colonizando estas cavernas y originando una de las llamadas "bolas de hongos". Esta bola fúngica se observa claramente en las placas de rayos X, la lesión sólo se localiza en estas cavernas afectadas (6,8,10,12,17).

c) Invasiva, el Aspergillus penetra generalmente a pulmón y encuentra ahí las condiciones adecuadas para llevar a cabo su invasión de donde puede diseminarse a otros órganos; esta es la forma más grave de la enfermedad cuyos signos más comunes son neumonía con fiebre, tos y desórdenes respiratorios. La placa de rayos X muestra una consolidación de pequeños puntos diseminados; algunas veces pueden verse excavadas cavernosas que pueden tomarse con Aspergiloma (15, 25,26,27,32).

La respuesta inmunológica ha sido estudiada ampliamente por Pepys (1964) y Malo (1977), quienes demuestran que básicamente la respuesta es celular con la participación de respuestas humoral; por lo cual se han utilizado tanto pruebas para cuantificar la respuesta celular, así como la humoral; siendo estas últimas las que han adquirido mayor popularidad.

Pepys (1959) utilizando un antígeno soluble obtenido al hacer crecer diferentes especies de Aspergillus en medio líquido, demostró que era posible detectar la enfermedad en el suero de pacientes conocidos

de Infección por Aspergillus spp. con la prueba de doble difusión en gel. Correlacionando la efectividad de esta prueba contra los aislamientos obtenidos de los mismos pacientes.

Warnock (1975) describe ampliamente las distintas clases de inmunoglobulinas que se encuentran en pacientes con Aspergilosis, demostrando un título alto de IgG (2,7,13,24).

Malo (1977) realizando un estudio sobre la Aspergilosis Broncopulmonar Crónica, encontró niveles considerables de IgE e IgG; aunque fueron mas altos los títulos de IgE, comprobando con ello que en estos casos de Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica Crónica las reaginas (IgE), son las que ocasionan la sintomatología.

En 1959, Pepys compara diferentes pruebas de diagnóstico, siendo la contraelectroforesis la que mejores resultados muestra; más tarde Malo (1977) corrobora lo reportado por Pepys.

Por otra parte se ha encontrado discrepancia en el método que debe seguirse para la obtención del antígeno empleado en las pruebas inmunológicas (1,7,11,21,23).

En nuestro país la información sobre este padecimiento es casi nula, siendo indispensable contar con los elementos necesarios para poder evaluar la situación, ya que este tipo de padecimiento puede ser fácilmente confundido con algunas otras enfermedades como la Tuberculosis.

Por esta razón el objetivo del presente trabajo fue el de obtener un antígeno de Aspergillus, el cual pueda ser empleado en pruebas de inmunodifusión en gel, comparando diferentes métodos de obtención; así como

implementar técnicas serológicas rápidas y confiables para el diagnóstico de la Aspergillosis.



## II. MATERIAL Y METODOS

Los antígenos fueron obtenidos a partir de 3 especies distintas de Aspergillus: Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus y Aspergillus oryzae. El nombre dado a los distintos antígenos dependió del procedimiento empleado para su obtención:

Antígeno Metabólico: Se obtuvo al hacer crecer cada una de las especies de Aspergillus en botellas Roux que contenían 250 ml de caldo glucosado peptonado e incubado a 28°C en una estufa bacteriológica durante 6 semanas. Procediendo después a separar el micelio por medio de una filtración Seitz a través de un filtro de asbesto de 0.1 micras y sometiendo el filtrado a diálisis con agua destilada durante 5 días a 4°C con cambios de agua destilada cada 24 horas. Finalmente se esterilizó, pasándolo por una membrana Millipore de 0.22 micras.

Antígeno Sonicado: El micelio obtenido del crecimiento en el medio líquido y retirado por la filtración Seitz fue resuspendido en solución salina isotónica y sometido a sonicación en un aparato MSE de ultrasonido a 12 micrones durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se separaron las partículas del micelio por medio de una filtración Seitz y fueron seguidos los pasos de dializado y esterilizado descritos en el método anterior.

Antígeno Congelado: Se prepararon cajas de petri conteniendo me

dio de cultivo de Sabouraud Difco, el cual fue cubierto en su superficie con papel celofán previamente esterilizado, e inoculados con los Aspergillus. Las cajas de petri así inoculadas, fueron incubadas a 28°C durante 2 semanas. Una vez transcurrido este tiempo se retiró el papel celofán junto con el desarrollo obtenido del hongo. Las cajas que contenían el medio de cultivo sin el papel celofán, fueron sometidas a congelación y descongelación alterna en 3 ocasiones. Posteriormente el medio fue cortado por la mitad sobreponiendo una parte del micelio sobre la otra e inclinando la caja con el fin de coleccionar el fluido presente. Este fluido también fue sometido a los procesos de dialización y esterilización descritos con anterioridad.

Antígeno Micelial: El micelio obtenido del crecimiento en medio sólido fue suspendido en una solución salina de Coca y posteriormente fue mantenido a 4°C durante 4 semanas con agitaciones periódicas. -- Una vez transcurrido este tiempo el micelio fue retirado por una filtración Seitz y el filtrado fue sometido a los procesos de dializado y esterilizado.

Por otra parte fue necesario llevar a cabo inoculación de conejos raza Nueva Zelanda con suspensiones de esporas de los Aspergillus con el fin de obtener sueros hiperinmunes a las distintas especies utilizadas. El esquema de inmunización se muestra en el Cuadro No. 1.

Con el fin de poder evaluar los distintos antígenos obtenidos se implementaron las técnicas serológicas de doble difusión y contraelectroforesis siguiendo los métodos descritos por la Sociedad Británica

para Micopatología (1976), comparados con un antígeno escocés proporcionado por la Dra. C.O. Dawson de la Universidad de Glasgow.

## CUADRO No. 1

ESQUEMA DE INOCULACION A CONEJOS

<u>A. oryzae</u>	C.F.	I.F.	I.F.	I.F.
<u>A. flavus</u>	C.F.	I.F.	I.F.	I.F.
<u>A. fumigatus</u>	C.F.	I.F.	I.F.	I.F.
tiempo (semanas)	1a.	2a.	3a.	4a.

C.F. = Adyuvante completo de Freud

I.F. = Adyuvante incompleto de Freud

Vía de inoculación intramuscular

Dosis = 1 ml semanalmente

### III. RESULTADOS

Los resultados obtenidos con los diferentes antígenos de Aspergillus contra los sueros de los conejos previamente inoculados en las pruebas de doble difusión y contraímmunoelectroforesis se muestran en los Cuadro Nos. 2 y 3. La evaluación de los distintos métodos de obtención y de las técnicas inmunológicas se muestran en el Cuadro No. 4.

CUADRO No. 2

DOBLE DIFUSION

	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>
<u>A. oryzae</u>	+						+					
<u>A. flavus</u>		+		+	+							
<u>A. fumigatus</u>		+	+		+	+			+		3+	
Antígenos	Metabólico			Micelial			Congelado			Sonicado		

C-1 Suero del conejo inoculado con Aspergillus oryzae

C-2 Suero del conejo inoculado con Aspergillus flavus

C-3 Suero del conejo inoculado con Aspergillus fumigatus

+ Líneas de precipitación

CUADRO No. 3

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS

	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>
<u>A. oryzae</u>	5+				2+							
<u>A. flavus</u>		3+		3+			3+				2+	
<u>A. fumigatus</u>			5+			+						
Antígenos	Metabólico			Micelial			Congelado			Sonicado		

C-1 Suero del conejo inoculado con Aspergillus oryzae

C-2 Suero del conejo inoculado con Aspergillus flavus

C-3 Suero del conejo inoculado con Aspergillus fumigatus

+ Líneas de precipitación

CUADRO No. 4

MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>	<u>C-1</u>	<u>C-2</u>	<u>C-3</u>
Contrainmu- noelectroforesis	Ao			Ao	Ao										
	Afl	Afl					Afl			Afl				Aes	Aes
			Afu			Afu									
Doble Difusión	Ao			Ao			Ao								
	Afl	Afl			Afl									Aes	Aes
		Afu	Afu		Afu	Afu			Afu		Afu				
	Metabólico			Micelial			Congelado			Sonicado			Escocés		

Ao. Antígeno de Aspergillus oryzae

Afl. Antígeno de Aspergillus flavus

Afu. Antígeno de Aspergillus fumigatus

Aes. Antígeno Escocés proporcionado por la Dra. C.O. Dawson (U. de Glasgow)

C-1 Suero del conejo inoculado con Aspergillus oryzae

C-2 Suero del conejo inoculado con Aspergillus flavus

C-3 Suero del conejo inoculado con Aspergillus fumigatus



#### IV. DISCUSION

Como se aprecia en las tablas de resultados, las reacciones de los antígenos metabólicos con sus respectivos sueros hiperinmunes, mostraron una mayor especificidad, lo cual está de acuerdo con estudios realizados por Pepys y colaboradores (1959), en donde empleando distintos métodos, obtuvieron una serie de antígenos los cuales probaron con sueros de pacientes que sufrían Aspergilosis, encontrando resultados semejantes a los nuestros cuando utilizaron el antígeno metabólico; por lo cual una mezcla de estos antígenos cubriría una gama más amplia en la detección de esta infección.

Por otra parte los antígenos micelial, sonificado y congelado, no proporcionaron resultados satisfactorios al hacerlos reaccionar con sus respectivos suero hiperinmunes, quizá debido a que los métodos empleados no fueron los adecuados.

En nuestros resultados obtenemos reacciones cruzadas con varios antígenos, lo cual había sido observado anteriormente, por Pepys (1959) y Gordon (1976) (15,23). Pensamos que esto puede deberse a la posible existencia de determinantes antigénicos que se encuentran compartiendo las diferentes especies de Aspergillus.

Al comparar las pruebas de difusión en gel, obtuvimos comportamientos semejantes cuando se emplearon los antígenos metabólicos, presentando mayor sensibilidad la contraelectroforesis, lo cual concuerda -

con los estudios efectuados por Malo y colaboradores (1977), quienes sugieren que la prueba de contraelectroforesis deben ser empleada en el diagnóstico de Aspergilosis por la rapidez con que éste se obtiene, así como por la sensibilidad que presenta (21).

Por otra parte se llevó a cabo la prueba de doble difusión (inmunodifusión) con los distintos antígenos de Aspergillus y se observó una mayor especificidad que en la prueba de contraelectroforesis, lo cual está de acuerdo con los resultados encontrados por Gordon (1976), quienes implementando las técnicas de inmunodifusión y contraelectroforesis con antígenos específicos de varias especies de Aspergillus, obtuvo reacciones cruzadas con la contraelectroforesis; sin embargo, en la prueba de inmunodifusión observa especificidad.

Es necesario hacer notar que nuestros resultados fueron obtenidos con sueros de animales previamente inoculados en el laboratorio.

Este trabajo es el inicio de la aplicación de la serología en la detección de la Aspergilosis en México, ya que esta enfermedad es fácilmente confundida con Tuberculosis, debido a la falta de pruebas serológicas que proporcionen un diagnóstico confiable, el cual puede ser efectuado utilizando los antígenos metabólicos en las pruebas de difusión en gel.

## V. CONCLUSIONES

Los antígenos metabólicos obtenidos de las diferentes especies - de Aspergillus, mostraron una mayor efectividad en la detección de anticuerpos contra Aspergillus que los otros antígenos en sueros de - animales de laboratorio, en las pruebas de difusión en gel.

Se estima necesario continuar investigaciones en este campo, so- bre todo realizando estudios serológicos en diferentes especies anima- les, con el objeto de conocer la importancia y difusión de esta in- fección en nuestro ganado.

Se sugiere también, realizar pruebas de conservación y viabili- dad de los antígenos, para su posible uso bajo otras condiciones o - en otros lugares.

Consideramos también que es necesario evaluar cuantitativamen- te los sueros y los antígenos por precipitación, así como probar estos antígenos en algunas pruebas.

Se pueden correr otras pruebas inmunológicas como son: Electrofo- resis, Aglutinación en tubo, Aglutinación con latex, Inhibición de - la hemoaglutinación, Fijación de complemento.

VI. BIBLIOGRAFIA

1.- Arbesman, E. Carl; Konrad Wicher; John I. Wypych; Robert E. Reisman; Helen Dickue and Charles E. Reed. 1974: IgE antibodies in sera of patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis, *Clinical Allergy* 4: 349.

2.- Bardans, E.J.Jr., 1972: The primary interaction of antibody to components of aspergilli II. Antibodies in sera from normal persons and from patients with aspergillosis, *J.Allergy Clin. Immunol.* 50: -- 222.

3.- Barret, James. 1974: *Inmunología; Introducción a la Inmunología y la Inmunobiología*. Interamericana. México.

4.- British society for Mycopathology 1976: Serology of fungal infection and Farmer's Lung Disease. A laboratory Manual. 14.

5.- Campbell, J.M. and Yvone Clayton. 1963: Bronchopulmonary Aspergillosis, *American Review Respiratory Disease.* 89: 186.

6.- Connat, N.F., Smith, D.T., Baker, R.D., Callaway, J.L. and Marti, D.C., 1950: *Manuel of Clinical Micology*, Philadelphia and London, W.B.

7.- Corbel, J.M., and Carol, A. Day., 1978: Examination of the immunoglobulin classes involved in the serological response of pregnant sheep to Aspergillus fumigatus, *Sabouraudia.* 16: 23.

8.- Correa, E.J., Amilcar, M.D., Raul Brincknaus, Saul Kester and Eugenio Martínez, 1975: Aspergillosis of the fourth ventricle, *J.-Neurosurg.* 43: 236.

- 9.- Dessaint, J.P., Bout, D., Frutt, J., and Capron A., -- 1976: Serum concentration of specific IgE antibody against Aspergillus fumigatus and identification of the fungal allergen; Clinical Immunology and Immunopathology. 5: 314.
- 10.- Emmons, CH. W., Bindord, Ch. H., and Utz, J.P., 1971; Medical Micrology, 2nd. Edition Lea and Febiger, U.S.A.
- 11.- English, P., Mary and Herderson, A.H., 1967: Significance and Interpretation of Laboratory Tests in Pulmonary Aspergillosis, J. Clin. Path. 20: 832.
- 12.- Flye Wayne M., and Will C., Sealy, 1975: Pulmonary Aspergilloma, the Annales of Thoracic Surgery, 20: 196.
- 13.- Goldstein, G.B., 1973: Studies of the precipitating antibody response in pulmonary aspergillosis, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol, 44: 1.
- 14.- González O.A., 1974: Apuntes de curso de Micología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N.
- 15.- Gordon, A. Morris PhD: Roberto S. Holzman; Howard Senter Edward W. Lapa; Mark J. Kupersmith, 1976: Aspergillus oryzae Meningitis, JAMA. 235, No. 19: 2122.
- 16.- Hart, J. Robert, Roy Patterson and Herbert Sommers. 1976: Hyperimmunoglobulinemia E in a child with allergic bronchopulmonary aspergillosis and bronchiectasis, The Journal of Pediatrics. 89: No. 1: 38.
- 17.- Institute of the Brompton Hospital. Clinical Conference in Pul-

monary Disease. Immunologic Lung Disease Due to Aspergillus. Medical Unit Staff Round from the cardiothoracic. London 1975: Chest 68: No. 3: 346.

18.- Kazuo Iwata. 1975: Recent Advances in Medical and Veterinary Micology. University Park Press. Baltimore.

19.- Longbottom, J.L., and Pepys, J. 1964: Pulmonary Aspergillus: Diagnostic and Immunologic significance of antigens and C - substance in Aspergillus fumigatus, Journal of Pathology and Bacteriology. 88: 141.

20.- Malo, L.J., Hawkins R., and Pepys, J., 1977: Studies in chronic allergic bronchopulmonary aspergillosis. I Clinical and Physiological findings, Thorax, 32: 254.

21.- Malo, L.J., Longbottom J., Mitchell J., Hawkins R., and Pepys, J., 1977: Studies in chronic allergic bronchopulmonary aspergillosis. 3 Immunological findings. Thorax. 32: 269.

22.- Pauwels, R., Stevens, E.M., and Van Der Straeten M., -- 1976 IgE antibodies in bronchopulmonary Aspergillosis, American Review Respiratory Diseases, 37: 195.

23.- Pepys, J., Riddell, R.W., Citron K.M., Clayton, Y.M., and Short, E.I., 1959: Clinical and Immunologic Significance of - Aspergillus fumigatus in the sputum, American Review of Respiratory Disease 80: 167.

24.- Pepys, J., Ridell, R.W., Citron K.M., and Clayton, Y.M. 1962: Precipitins against extracts of hay and moulds in the serum of patients with farmer's lung aspergillosis, asthma and sarcoidosis, Tho-

rax, 17: 366.

25.- Raper, B., Kenneth and Dorothy I. Fennerl, 1977: The genus Aspergillus, Publishing Company Huntington, New York.

26.- Rippon Willard John, 1974: Medical Micology. The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes W.B. Saunders Company, Philadelphia 406.

27.- Rose D. Harold and Janet L. Stuart. 1976: Mycotic Aneurysm of the Thoracic Aorta Caused by Aspergillus, Chest 70: 81.

28.- Russell, S. Weisser; Quentin N. Myrvik, Nanci N. Pearsall. 1970: Inmunología. Interamericana, S.A. México.

29.- Turner, K.J., Janice O'Mahany, Wetherall J., and Janet - Elder. 1972: Hypersensitivity studies in astmatic patients with bronchopulmonary aspergillosis, Clinical Allergy, 2: 361:

30.- Warnock, W.D. and Eldred G.F., 1975: Immunoglobulin Classes of Antibodies to Aspergillus fumigatus in patients with Pulmonary - Aspergillosis, Sabouraudia, 13: 204.

32.- Young, C. Roberto and Bennett E. John, 1971: Invasive Aspergillus. Absence of Detectable Antibody Response, American Review - of Respiratory Disease 104: 710.