



11261
2e)
ATB
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE
ANTIGENOS DE HONGOS CAUSANTES
DE MICOSIS PROFUNDAS: ANALISIS
INMUNOLOGICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

AREA: INMUNOLOGIA

P R E S E N T A :

JOSE ANTONIO JIMENEZ MONTIEL

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.,

1988



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.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
HIPOTESIS	9
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	17
DISCUSION Y CONCLUSIONES	21
ABSTRACT	26
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	27
BIBLIOGRAFIA	28

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo inmunológico de antígenos crudos (histoplasmina, blastomicina, coccidioidina y paracoccidioidina) y purificados (complejo polisacrido proteina desproteinizado CPPD) de Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis y Paracoccidioides brasiliensis respectivamente, agentes etiológicos de micosis profundas en el hombre. Diversos autores atribuyen las reacciones cruzadas, en antígenos de hongos, a las galactomananas. Por lo tanto, los antígenos crudos y CPPD's de estos cuatro hongos fueron tratados con α (25°C, pH 6.5, 30 min) y β (37°C, pH 7.3, 30 min) galactosidasa para eliminar las reacciones cruzadas. La liberación de galactosa se determinó por medio de cromatografía en capa fina utilizando los sustratos específicos como control. Los antígenos se probaron en inmunodifusión en gel con suero de paciente histoplasmoso antes y después del tratamiento enzimático. Para observar la reactividad de los antígenos y cruces inmunes en los antígenos crudos y purificados de los cuatro hongos, se realizó una inmunolectroforesis en dos dimensiones con suero hiperinmune de conejo anti-H.capsulatum, además de una comparación en tandem entre ellos. El tratamiento enzimático con α y β galactosidasa sugiere que los antígenos crudos y purificados contienen galactosa unida mediante enlaces β y que la fracción galactosil liberada por la β galactosidasa no modificó los cruces inmunes en estos antígenos al utilizar suero humano. La inmunolectroforesis en doble dimensión mostró 14 bandas de precipitación para la histoplasmina, siendo los números 1, 3 y 4 las específicas de éste antígeno, que aparecen más concentradas en el CPPD correspondiente. El análisis en tandem de la histoplasmina con los otros antígenos estudiados mostró una gran diversidad de determinantes antigénicos comunes.

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

Los hongos de las micosis profundas se caracterizan por producir un cuadro primario pulmonar a partir del cual pueden diseminarse a diferentes tejidos del cuerpo, produciendo lesiones granulomatosas (8). Los agentes etiológicos que causan estas micosis son : Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis y Paracoccidioides brasiliensis. Estos hongos viven en la naturaleza, en el suelo o en material orgánico y debido a sus requerimientos específicos están limitados a ciertas regiones geográficas. En estas las personas adquieren la infección a través de las vías respiratorias. La mayoría solo desarrolla síntomas menores o ninguno y cuando se desarrolla la enfermedad, ésta puede ser leve, grave o mortal. En la naturaleza, estos hongos crecen en el suelo como saprófitos, produciendo micelio y conidias. Cuando estas estructuras son inhaladas por el hombre u otros animales, los organismos son capaces de adaptarse y crecer, ocurriendo cambios drásticos en su metabolismo, en su pared celular, contenido, estructura, sistema enzimático y en sus procesos de reproducción, sufriendo una transformación a otra forma morfológica : la fase levaduriforme. (43).

Una de estas enfermedades es la histoplasmosis producida por Histoplasma capsulatum. Este hongo tiene la característica de ser un parásito intracelular preferencial del sistema fagocítico mononuclear, donde se encuentra en forma de levaduras ovoides de 2 a 4 μ de diámetro. En su fase de vida libre micelial, se encuentra en forma de macroconidias equinuladas y microconidias, en un habitat muy particular, caracterizado por un alto contenido de nitrógeno y fósforo, como el suelo mezclada con guano de murciélago, excretas de aves, etc., que se encuentran en cuevas inexploradas, minas abandonadas, graneros y silos (43). La histoplasmosis es la micosis sistémica más importante en el mundo, la de mayor trascendencia en el continente americano y en particular en México. La histoplasmosis pulmonar primaria, constituye un serio problema de salud pública en México, tanto por la elevada frecuencia de los brotes epidémicos como por la gravedad del cuadro clínico (51). Esta micosis puede ser considerada como ocupacional

ya que afecta principalmente a trabajadores, como los mineros, que se exponen al agente etiológico al penetrar en viejas minas. Al ser adquirida la infección en recintos cerrados donde se forman aerosoles de esporas, se incrementa la gravedad del cuadro clínico, lo que determina una elevada morbilidad, haciendo de la histoplasmosis pulmonar primaria en México una de las de mayor tasa de letalidad en el mundo (52). Esta micosis no es considerada una enfermedad rara en México, ya que al poseer la República más de 2000 minas sin explotar, un gran número de bocaminas indígenas y miles de cavernas de todos tamaños, asegura una alta morbilidad entre los individuos que frecuentan este tipo de recintos; geólogos, recolectores de guano, gambusineros, antropólogos, excursionistas, espeleólogos, etc., (53). Aunque se tienen datos de la existencia de brotes epidémicos en todos los estados del país, los que presentan mayor frecuencia son aquellos que poseen mayor número de cavernas y minas abandonadas: Guerrero, Michoacán, Querétaro, Jalisco, Guanajuato, Hidalgo, San Luis Potosí, Morelos, Tamaulipas, Chiapas y Península de Yucatán (15, 16).

Otra de las enfermedades producidas por estos hongos es la blastomicosis norteamericana, cuyo agente etiológico es Blastomyces dermatitidis. Las aleuriosporas ovoides de 2 a 10 μ de diámetro encontradas en la fase micelial de este hongo son los elementos infectantes que al penetrar al huésped se transforman en levaduras de 8 a 15 μ de diámetro con un característico septo ancho de gemación simple. El hábitat preciso de este organismo es desconocido a pesar de que Denton y Disalvo (11) lo aislaron de una muestra de suelo cerca de Augusta - Georgia, EE.UU. Sin embargo, bajo las mismas condiciones y en el mismo lugar no se ha podido aislar nuevamente. En México esta infección es bastante rara, con un sólo caso descrito en la literatura (36), -- siendo sin embargo, bastante frecuente en el vecino país del norte

La coccidioidomicosis, tiene como agente etiológico a Coccidioides immitis, cuya fase micelial infectante es a base de artroconidias, y está asociado a un ambiente semiárido. Al penetrar por las vías respiratorias del huésped, se transforma en esférulas que al madurar se llenan de endosporas. Estas células pueden llegar a tener de 40 a 80

μ de diámetro. Es probablemente el más virulento de los hongos patógenos para el hombre (43). Se aísla con frecuencia del suelo con material orgánico carbonizado y alta concentración de sales, particularmente sulfato de calcio y boratos. Las áreas endémicas de esta enfermedad incluyen el suroeste de los Estados Unidos (Valle de San Joaquín) y más de la mitad del territorio mexicano repartido en tres zonas áridas : la zona I, comprende los estados que limitan con los Estados Unidos, la zona II, comprende los estados de la comarca lagunera : San Luis Potosí, Zacatecas y Guanajuato, y la zona III -- comprende los estados de Sinaloa, Nayarit y Colima y dos microáreas tropicales, en Apatzingán, Michoacán y el valle de Arcelia en Guerrero (17, 18). Existe también en algunas regiones de Centroamérica -- como el valle de Motagua en Guatemala, el valle de Comayagua en Honduras (35) y Sudamérica (Venezuela, Ecuador y Colombia) (8).

La paracoccidioidomycosis es producida por Paracoccidioides brasiliensis. La forma micelial infectante de este hongo es muy similar a las conidias sencillas de 2 a 4 μ de diámetro de B. dermatitidis -- que al penetrar al huésped toma la forma de levaduras multigermantes (timón de barco) típica de P. brasiliensis. Hasta ahora el hábitat saprofítico y las asociaciones ecológicas del hongo no están completamente claras, sin embargo, estudios recientes de pruebas cutáneas en poblaciones y el aislamiento del organismo del suelo ha comenzado a clarificar la ecología y la epidemiología de la enfermedad (43). Los casos de la enfermedad generalmente provienen de lugares con clima templado, de zonas boscosas y húmedas. Geográficamente la infección está restringida a las áreas de Sudamérica, Centroamérica y México. En 1980 Velasco Castrejón (54), logró reunir mediante estudios epidemiológicos 56 casos que provenían de 10 estados de la República Mexicana, la mayoría de pacientes eran del estado de Veracruz y las Huastecas.

Debido a la alta incidencia de histoplasmosis y coccidioidomycosis en México, teniendo en cuenta la frecuencia de casos nuevos y conociendo además la gravedad de estas enfermedades pulmonares, sobre todo en condiciones de mala nutrición o en clases socioeconómicas bajas, así como en estados inmunosupresivos del huésped, es de fundamental importancia el diagnóstico preciso y temprano de estas enfer-

medades. En vista de la dificultad y el largo tiempo requerido para el diagnóstico micológico, es necesaria la ayuda del diagnóstico serológico. Para estas pruebas son necesarios antígenos específicos, con buen grado de reactividad y de fácil obtención, que puedan ser utilizados en los laboratorios de serodiagnóstico fúngico. Para conseguir este objetivo, muchos autores han tratado de identificar, aislar y caracterizar los antígenos de los hongos causantes de micosis profundas.

Ya en 1958, Heiner (22) identificó en H. capsulatum, por medio de la técnica de inmunodifusión, dos bandas de precipitación que denominó h y m. Bradley et al. (6) lograron purificar y separar estos antígenos de la histoplasmina a través de cromatografía en columna, pero a pesar de la purificación, estos antígenos contenían fracciones comunes, como lo demostraron Green et al. (20) al preparar antígenos h y m libres de antígenos heterólogos, mediante un suero mono específico anti-H. capsulatum.

En B. dermatitidis, Kaufman (28) obtuvo del filtrado de cultivo de la fase levaduriforme dos bandas por inmunodifusión a las que denominó A y B, que se consideraron antígenos específicos para B. dermatitidis.

Posteriormente Green (19) usando cromatografía de intercambio iónico purificó una fracción de B. dermatitidis que presentó una banda A en Ouchterlony. Sin embargo, al ensayarlo con suero de pacientes en blastomicosis. El mismo problema apareció con la prueba de fijación de complemento y aunque la técnica de ELISA demostró con este antígeno -- 92% de casos conocidos también presentó 20% de reacción cruzada con sueros de otras enfermedades fúngicas. Young (61) trabajando con el antígeno A mediante cromatografía de afinidad y gels de poliacrilamida identificó por esta última técnica 5 bandas teñidas con la tinción de azul de Coomassie y 20 bandas con la tinción de plata. Dos de ellas desaparecían de la preparación antigénica después de la incubación con un gel de afinidad unido al suero de referencia anti-A concluyendo que dos componentes de esta mezcla estaban asociados a la actividad del antígeno A. Cox (9) describió un antígeno de la pared celular de la fase levaduriforme de B. dermatitidis soluble en alcali y en agua que pudo diferenciar de cobayos sensibilizados con B. dermatitidis de los sensibilizados con H. capsulatum sin haber podido comprobar la presencia del -

antígeno A descrito por Kaufman.

En Coccidioides immitis Huppert (23), haciendo un análisis antigénico de la coccidioidina y esferulina por medio de la inmunoelectroforesis bidimensional, encontró 26 antígenos en la coccidioidina de los cuales 10 eran comunes con la esferulina, y dos antígenos que denominó A y B presentes solamente en la esferulina. El mismo autor (24), con la misma técnica, identificó los antígenos comunes entre hongos de enfermedades sistémicas usando un sistema de referencia - coccidioidina-anticoccidioidina, encontrando 12 y 10 antígenos comunes en preparaciones de B. dermatitidis e H. capsulatum respectivamente. Ward et al. (56) prepararon un antígeno soluble en alcali y en agua de C. immitis, de la misma forma que el de B. dermatitidis. El antígeno funcionó bien en las pruebas serológicas pero las reacciones cruzadas con B. dermatitidis e H. capsulatum fueron evidentes.

En P. brasiliensis, Yarzabal (58) aisló un extracto que presentó dos bandas en Ouchterlony, a las que denominó E/1 y E/2, demostrando la primera actividad de fosfatasa alcalina. Estudios subsecuentes -- con la banda E/2 (59), comprobaron su especificidad para P. brasiliensis, ya que reaccionaba únicamente con sueros de pacientes con paracoccidioidomicosis. El mismo autor (60), determinó la localización subcelular del antígeno E/2 en la fase levaduriforme de P. brasiliensis mediante estudios inmunoenzimáticos y de microscopía electrónica. Por otro lado Restrepo y Moncada (40) en un estudio sobre la caracterización de antígenos de este mismo hongo, utilizando la técnica de Ouchterlony, obtuvo 3 bandas de precipitación, observando que la banda 1 era similar al antígeno E/2 obtenido por Yarzabal y la banda 3 presentaba reacción cruzada con el antígeno m de H. capsulatum poniendo en duda la especificidad de dicho antígeno. Puccia et al. (39) obtuvieron del mismo modo un antígeno específico de P. brasiliensis, -- del filtrado de cultivo de la fase levaduriforme, denominándolo gp - 43 ya que corresponde a una glicoproteína de 43 Kd por electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta banda presentó la misma migración electroforética que el antígeno E de Yarzabal. Sin embargo, se obtiene en poca cantidad y su obtención no es constante ya que depende de la cepa, del medio de cultivo y del tiempo de incubación.

A pesar de todos los trabajos anteriormente mencionados, hasta la fecha no se han podido obtener fracciones antigénicas suficientemente reactivas y sensibles a bajo costo y de fácil elaboración que pudieran ser utilizadas de rutina en todas las pruebas de inmunodiagnóstico micológico.

Los intentos para remover completamente la proteína por procedimientos químicos, electroforéticos o cromatográficos reteniendo sin embargo, la reactividad inmunológica, generalmente han fracasado. La pérdida de la fracción proteica está asociada a la pérdida de la -- hipersensibilidad de tipo retardado pero no necesariamente con la -- reactividad serológica, por lo tanto, la mayoría de los investigadores han reportado una heterogeneidad en la fracción aislada. Así Taylor et al. (47) en un estudio sobre H.capsulatum aislaron un complejo polisacárido proteína (CPP) con buena especificidad en inmunodifusión en gel, observando que por la acción de la enzima β -glucosidasa hubo pérdida de la actividad de la inmunodifusión, en tanto que con calor y una enzima proteolítica pronasa, no se alteró la actividad del antígeno. En otro trabajo el mismo autor (48) determinó la respuesta mediada por células en ratones inmunizados con H.capsulatum y C.immitis utilizando el complejo polisacárido-proteína -- (CPP) y una fracción desproteinizada del complejo (CPPD). En el ensayo del cojinete plantar, la histoplasmina y coccidioidina (antígenos crudos) presentaron reacción cruzada en los animales sensibilizados, pero al utilizar el CPP y el CPPD de H.capsulatum se obtuvo respuesta solamente en los animales sensibilizados con el hongo respectivo. En estudios subsiguientes, Reyes et al. (41), compararon la actividad inmunológica de complejos polisacárido-proteína desproteinizados de H.capsulatum y B.dermatitidis. En las pruebas humorales utilizadas se pusieron de manifiesto reacciones cruzadas, sin embargo, estas fueron menores que al utilizar los antígenos crudos -- (histoplasmina y blastomicina). Por otro lado, Toriello et al. -- (49) realizaron un estudio sobre la composición química de la fracción polisacárida de los CPPD's de H.capsulatum, B.dermatitidis y -- C.immitis, por medio de cromatografía en capa fina y gas líquido, y encontraron manosa (38.6-54%), glucosa (43.2-52.7%) y galactosa (2.8-10.6%) además de hexosaminas en un pequeño porcentaje. Utilizando antígenos crudos y CPPD's, Becerril et al. (3) realizaron un

estudio en pacientes con enfermedades respiratorias encontrando menor reacción cruzada con los CPPD's que con los antígenos crudos en las diferentes pruebas utilizadas. Conociendo el valor de los anticuerpos monoclonales en la obtención de antígenos específicos, Reyes Montes et al. (42) obtuvieron 3 anticuerpos diferentes contra el CPPD de H.capsulatum que servirán en estudios posteriores para la purificación del antígeno.

En vista de que a pesar de existir antígenos específicos de los hongos productores de micosis profundas, estos todavía presentan cierto grado de reacciones cruzadas, algunos autores han orientado sus estudios hacia las unidades de cruce con el fin de eliminarlas o bloquearlas. Azuma et al. (2) identificaron galactomananas compartidas por H.capsulatum, B.dermatitidis, y P.brasiliensis. Por otro lado Ishizaki et al. (25) identificaron un residuo D-galactosil como el responsable de la reacción cruzada entre Sporothrix schenckii y algunos hongos no relacionados. Habiendo determinado la presencia de galactosa y manosa, además de otros monosacáridos en los antígenos crudos y purificados (CPPD's) obtenidos en el laboratorio (49) y teniendo en cuenta las observaciones anteriores, se consideró que la eliminación de los residuos de galactosa por actividad enzimática podría reducir las reacciones cruzadas de estos hongos en pruebas de serodiagnóstico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los CPPD's de H.capsulatum, B.dermatitidis, C.immitis y P.brasiliensis son antígenos de fácil obtención, bajo costo y alta sensibilidad y reactividad. Tomando en consideración la dificultad y el alto costo para aislar fracciones antigénicas específicas por las técnicas descritas con anterioridad, y teniendo en cuenta la necesidad fundamental de contar con reactivos útiles en las pruebas inmunológicas de rutina en el diagnóstico de las micosis profundas, sobre todo de la histoplasmosis y la coccidioidomicosis que son endémicas en nuestro país, se desarrolló este trabajo con el objeto de caracterizar inmunológicamente y analizar las fracciones antigénicas obtenidas y tratar de eliminar las reacciones cruzadas, que presentan este tipo de hongos.

H I P O T E S I S

La eliminación de los residuos de galactosa por actividad enzimática de los antígenos de hongos causantes de micosis profundas reducen el cruce inmune en pruebas de serodiagnóstico.

Los antígenos crudos y purificados de Histoplasma capsulatum poseen componentes antigénicos específicos y comparten componentes antigénicos comunes con Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis y Paracoccidioides brasiliensis.

Los antígenos crudos de H. capsulatum, B. dermatitidis, C. immitis y P. brasiliensis poseen varias fracciones con diferente peso molecular.

O B J E T I V O S

1. Obtener antígenos con buen grado de reactividad, sensibilidad, especificidad, a bajo costo, mediante una metodología sencilla.
2. Tratar de eliminar las reacciones cruzadas que existan entre estos antígenos.
3. Establecer diferencias y semejanzas entre los antígenos crudos y los antígenos purificados (CPPD's).
4. Conocer la gama de determinantes antigénicos comunes existente en las preparaciones obtenidas.

MATERIAL Y METODOS

1. HONGOS

Los hongos utilizados en este estudio para la obtención de antígenos fueron : Histoplasma capsulatum EH 53, Blastomyces dermatitidis EH 42, Coccidioides immitis EH 45 y Paracoccidioides brasiliensis EH 55, todas aisladas de pacientes y mantenidas en medio de agar micobiótico (Bioxón) a 26°C en el cepario del departamento de Ecología Humana de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M.

2. MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron diferentes medios de cultivo tanto para el mantenimiento de las cepas como para la producción de antígenos.

- a) Medio de agar micobiótico (21) para conservar los hongos.
- b) Medio sintético de Smith (45) para la obtención de los antígenos.

Como el crecimiento de P.brasiliensis es pobre en el medio de Smith se hizo la siguiente modificación : se disolvieron 5 g de extracto de levadura y 5 g de peptona en 100 ml de agua y se dializaron contra 1000 ml de agua a 4°C, durante 24 horas. El dializado fue utilizado como solvente para los componentes del medio de Smith.

CONDICIONES DE CULTIVO

Para la obtención de la forma micelial, se sembró el hongo en matraces de 1000 ml conteniendo 250 ml de medio y se incubó 3 meses a la temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se identificó su morfología característica y se agregó a los cultivos una solución de timerosal 1/5000 (concentración final) durante una semana. Posteriormente se hizo una prueba de viabilidad de los microorganismos.

3. OBTENCIÓN DEL ANTIGENO CRUDO.

Se separó la masa micelial por medio de filtración en papel - Whatman No. 3. El filtrado se pasó por membrana Millipore (0.45 μ m) se dializó y concentró por ultrafiltración (Amicón, membrana PM 10) a 10 veces el volumen inicial (Fig 1). Estos antígenos crudos se denominan histoplasmina, blastomicina, coccidioidina, y paracoccidioidina.

4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y CARBOHIDRATOS

A todos los antígenos crudos y CPP's se les determinaron proteínas y carbohidratos. Las proteínas por el método de Lowry et al. (32) y los carbohidratos por el método de Dubois et al. (13).

5. AISLAMIENTO DEL COMPLEJO POLISACARIDO PROTEINA (CPP)

Los CPP's de los cuatro hongos a estudiar fueron obtenidos a partir del filtrado del cultivo anteriormente descrito, utilizando la técnica de Kirby (29), adaptada por Bonilla-Soto et al. (5) y - modificada por Taylor y Bojalil (47), de la siguiente manera : por cada 10 g de filtrado se añadieron 15 ml de fenol líquido. Se incubó a 56°C por una hora, agitando repetidas veces. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 500 xg durante 15 minutos. La fase acuosa se separó cuidadosamente y se mezcló con 3 volúmenes de alcohol etílico al 95%. Esta mezcla se dejó a 4°C toda la noche. El precipitado obtenido se disolvió en agua destilada y se le agregó nuevamente etanol al 95%. Se repitió este procedimiento 3 veces, y por último el precipitado se secó con acetona anhidra y se guardó a 4°C hasta su utilización (Fig 1).

TRATAMIENTO DEL CPP CON PRONASA Y SEVAG

Se procedió a tratamiento de desproteínización de los CPP's - con pronasa (14) y el reactivo de Sevag (44) para la obtención de los complejos polisacáridos proteína desproteínizados (CPPD-histo, CPPD-blasto, CPPD-cocci y CPPD-paracocci respectivamente).

La digestión de los CPP's con pronasa se llevó a cabo durante

una semana a 37°C. Los CPP's se trataron en una proporción proteína enzima de 100:1, se resuspendió en un amortiguador de fosfatos 0.15 M, pH 7.5 con CaCl 0.05 M, MgSO₄ 0.03 M y dos gotas de tolueno para evitar la contaminación. Se incluyó en el proceso un control de albúmina bovina incubada bajo las mismas condiciones con pronasa. Además se incluyó un blanco que contenía todos los componentes usados menos el sustrato. La enzima se añadió diariamente a los sustratos agregando cada día la mitad de la cantidad usada el día anterior. Los aminoácidos liberados durante la digestión se determinaron al inicio y al final del tratamiento enzimático mediante la prueba de la ninhidrina (26) usando lisina como testigo. La reacción enzimática fue parada por congelación.

METODO DE SEVAG

El reactivo de Sevag (44) está compuesto de butanol (1 V) y cloroformo (9 V). Se mezclaron partes iguales del reactivo de Sevag y de la muestra por desproteínizar (CPPD). Se separó en frío la fase cloroformo-butanol de la fase acuosa por medio de una ampolla de decantación. La extracción se repitió de 5 a 10 veces; las fases acuosas recuperadas se dializaron contra agua destilada durante 24 horas a 4°C cambiando el agua 5 veces. El CPPD obtenido se liofilizó y se conservó a 4°C.

6. TRATAMIENTO ENZIMATICO DE LOS ANTIGENOS CRUDOS Y CPPD'S CON α Y β - GALACTOSIDASA

Se procedió a eliminar los residuos de galactosa mediante un tratamiento enzimático de los antígenos crudos y CPPD's con las enzimas α y β -galactosidasa para tratar de eliminar las reacciones cruzadas que existen entre los antígenos de estos hongos. Se utilizaron diferentes concentraciones de antígenos crudos (0.1 y 0.5 ml) y CPPD's (0.65, 1 y 1.25 mg), así como de enzimas (2.4 U de α -galactosidasa y 0.5, 1 y 1.25 U de β -galactosidasa) en la mezcla de reacción enzimática. La enzima α -galactosidasa de Escherichia coli (Sigma) fue incubada en 0.2 ml de regulador de fosfatos 5 mM, pH 6.5, 25°C, durante 30 minutos. El control de la actividad se realizó con 5 mg de p-nitrofenil α D-galactopiranosido (Sigma), con una unidad de la enzima, la cual al hidrolizar el sustrato produce-

un color amarillo característico (31). La enzima β -galactosidasa de hígado de Bovino tipo III (Sigma) fue incubada en 0.2 ml de regulador de fosfatos 5 mM, pH 7.3, 37°C, durante 30 minutos siguiendo — las técnicas de Chytil (10), Distler y Jourdian (12) y Wan & O'Brien (55). El control fue 5 mg de α -nitrofenil β -D-galactopiranosido — (Sigma) con una unidad de la enzima, la cual al hidrolizar el sustrato produce un color anaranjado característico. Las dos reacciones fueron paradas con 1 ml de regulador de carbonato de sodio-glicina 0.17 M a un pH de 9.8. Las mismas condiciones se aplicaron a los antígenos crudos y CPPD's.

Para eliminar la enzima de los antígenos crudos y CPPD's, éstos fueron tratados con el reactivo de Sevag anteriormente descrito.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Después del tratamiento con la enzima α y β -galactosidasa, — los antígenos crudos y CPPD's fueron sometidos a una cromatografía en capa fina (4) para poner en evidencia la galactosa liberada durante el tratamiento enzimático. Se utilizó como solvente + regulador de fosfatos pH 5, 0.1 M (10 V); acetona (50 V); butanol (40 V).

La cromatografía se realizó en cromatofolios (Merck) de 10X10 cm. El solvente se dejó correr hasta 1 cm antes del borde final de la placa. La cantidad de muestra fue de 50 μ l. Al final del desplazamiento la placa se secó a 80°C durante 10 minutos. Al mismo tiempo se corrió un control de galactosa (2mg/10 ml de alcohol isopropílico). Las placas se revelaron rociándolas uniformemente con el revelador ftalato de anilina (Merck). Luego se secaron en la estufa a 85°C por 20 minutos.

7. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

Se utilizó la técnica de inmunodifusión de Ouchterlony (38) — con sueros hiperinmunes de conejo anti-H.capulatum, anti-C.immitis y anti-P.brasiliensis y sueros de pacientes con histoplasmosis y coccidioidomicosis para demostrar la reactividad de los antígenos crudos y CPP's de los cuatro hongos, así como para determinar el efecto del tratamiento a los antígenos con las enzimas α y β -galactosi

dasa. Se utilizó agarosa al 1% en solución de glicina (glicina 7.5gr NaCl 0.9%, azida de sodio 0.01%), aforado a 100 ml.

Sueros Hiperinmunes de conejo

Se inmunizaron seis conejos Nueva Zelanda (2 kg) con antígeno crudo de cada uno de los hongos estudiados (2 animales por cada — hongo) con excepción de B.dermatitidis. Se utilizó 0.5 ml de antígeno (3-5 mg de proteína/ml en 0.5 ml de adyuvante incompleto de - Freund). Se aplicaron inyecciones subcutáneas 2 veces por semana - durante 3 semanas con intervalos de 15 días. Este esquema se repitió varias veces hasta la obtención de bandas de precipitación demostradas por la prueba de inmunodifusión en gel.

Inmunolectroforesis en doble dimensión

La inmunolectroforesis en doble dimensión (IEDD) fue realizada según la técnica descrita por Huppert (23). Se utilizó suero - hiperinmune de conejo anti-H.capsulatum en esta técnica para conocer el número de fracciones que contenían las preparaciones antigénicas de H.capsulatum, así como la IEDD en tandem entre H.capsulatum, B.dermatitidis, C.immitis y P.brasiliensis para poner en evidencia las fracciones comunes entre estos antígenos. Debido a la cantidad de suero hiperinmune necesario para la realización de este método sólo se pudo utilizar el suero anti-H.capsulatum. Experimentos preliminares demostraron que las condiciones óptimas para los antígenos obtenidos fueron: solución amortiguadora de barbital de sodio 3.09 g/l, barbital ácido 0.542 g/l, tris-base 9.86 g/l, - azida de sodio 0.2 g/l, a un pH de 8.6. Se utilizaron placas de vidrio de 8 X 10 cm, cubiertas con 22 ml de agarosa al 1% en amortiguador de barbital. Se llevó a cabo una pre-electroforesis durante 30 minutos a 100 V. Posteriormente se hizo un pozo de 4 mm a 2 cm del borde inferior y a 2 cm del borde lateral derecho. Se colocaron 22 µl de antígeno y se corrió a 200 V durante 2 horas. Se cortó el gel a 0.5 cm del pozo y se substituyó con 10 ml de agarosa en regulador de barbital, con 15% de suero hiperinmune de conejo anti-H.capsulatum a 45°C. Se dejó gelificar y se giró la placa 90° para aplicar una corriente de 60 V durante 17 horas.

La IEDD en tandem se hace de la misma manera que la anterior, con la modificación de otro pozo a 7 mm del primero con la misma cantidad de antígeno a comparar. La lectura de bandas se realizó 24 horas después. Posteriormente se lavaron las placas con citrato de sodio al 5% durante 3 horas y luego con solución salina durante 3 días cambiando la solución 4 veces al día. Las placas se secaron con papel filtro y se tificaron con negro amido.

3. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Los antígenos crudos fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA) (30,57) para conocer el número de fracciones existentes en los extractos antigénicos, así como su peso molecular. Se utilizaron como control 7 proteínas con diferente peso molecular (Merck) que variaba de 14 a 66 Kd. Se hizo una mezcla de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%. Este gel de poliacrilamida se utilizó a diferentes concentraciones para el gel separador y el gel concentrador.

Gel inferior o separador al 10%

10 ml de poliacrilamida, 10 ml de tris-base 2M, pH 8.8, 14.5 ml de agua, 0.5 ml de persulfato de amonio al 10%, 0.6 ml de SDS al 10% (dodecilsulfato de sodio) y 30 μ l de TEMED (N,N,N,N, Tetrametiletilendiamina).

Gel superior o concentrador al 4%

4 ml de poliacrilamida, 7.5 ml de tris-HCl 2 M, pH 6.8, 14.8 ml de agua, 0.3 ml de persulfato de amonio, 0.3 ml de SDS y 15 μ l de TEMED.

La cantidad de muestra utilizada fue de 100 μ g/100 μ l, más 100 μ l de cóctel de electroforesis (SDS 0.2g, EDTA 0.0074g, glicerol - 1 ml, tris-HCl 0.05 M, pH 6.8, azul de bromofenol, 5mg).

La electroforesis fue llevada a cabo a 40 mA durante 7 horas.- El amortiguador de corrimiento fue : glicina 11.3 g y tris-base 2.4g aforado a un litro de agua desionizada, pH 8.8. Una vez que el color

rante se desplazó 15 cm se paró la electroforesis y el gel fue teñi
do con azul de Coomassie al 0.06%, metanol al 30% y ácido acético -
al 10 %.

RESULTADOS

El rendimiento de los antígenos obtenidos fue relativamente bajo. De los antígenos crudos se obtuvo aproximadamente de 5 a 10% en relación al filtrado de cultivo total, mientras que con el procedimiento para separar los CPPD's sólo se recuperó de 0.4 al 1% de antígeno purificado en relación al antígeno crudo. Por otro lado, a pesar de los tratamientos enérgicos de desproteínización con pronasa y Sevag, los CPPD's siguen conteniendo proteínas en cantidades variables (tabla 1). Pevio a la utilización de los antígenos en diferentes tratamientos y pruebas analíticas, la reactividad de los mismos fue comparada por inmunodifusión en gel con sueros hiperinmunes de conejo para H.capsulatum (Fig 2), C.immitis (Fig 3) y P.brasiliensis (Fig 4). En los pozos del lado izquierdo de las figuras 2, 3 y 4 se observan las bandas de precipitación entre cada antígeno --crudo y purificado con su respectivo antisuero homólogo. Entre las --fracciones antigénicas y los sueros hiperinmunes de conejo no se observaron reacciones cruzadas como puede observarse en los pozos del lado derecho en las mismas figuras (2, 3 y 4). Al repetir esta prueba con suero de paciente con histoplasmosis (Fig 5), las reacciones cruzadas entre los diversos antígenos, tanto crudos como purificados (CPPD's) se pusieron de manifiesto ya que se pueden observar líneas de precipitación con todos los antígenos probados a excepción del CPPD-blasto. Al utilizar el suero de un paciente con coccidioidomicosis (Fig 6) se observaron bandas con su antígeno homólogo (coccidioidina) así como reacciones cruzadas con histoplasmina, blastomicina y paracoccidioidina.

Debido a que no se encontraron reacciones cruzadas al utilizar los sueros de conejos hiperinmunes (Figs 2, 3 y 4), fue necesario utilizar los sueros de pacientes con histoplasmosis y coccidioidomicosis, para confrontarlos en inmunodifusión con los antígenos tratados enzimáticamente y ver la posible eliminación de las reacciones cruzadas. La cantidad de antígeno crudo que fue sometido al tratamiento --enzimático fue 0.1 ml de cada uno de ellos, que contenían las siguientes cantidades de carbohidratos totales por ml : histoplasmina --

4500 μ g, blastomicina 6550 μ g, coccidioidina 6550 μ g y paracoccidioidina 8000 μ g. La cantidad de CPPD utilizada fue 5 mg/ml de cada uno de los antígenos que contenían las siguientes cantidades de carbohidratos totales : CPPD-histo 1159 μ g, CPPD-blasto 1952 μ g, CPPD-cocci 1621 μ g y CPPD-paracocci 1550 μ g. La enzima α -galactosidasa fue utilizada a 2.4 U para cada preparación antigénica. La enzima β -galactosidasa para 0.1 ml de antígeno crudo fue 1 y 1.5 U y para 1.25 mg de CPPD fue 0.5 y 1 U. La cantidad de proteínas que contenían estos antígenos, están descritos en la tabla 1. El tratamiento con α -galactosidasa tanto para los antígenos crudos (Fig 7) como para los CPPD's (Fig 8) frente a suero humano histoplásmico, no eliminó las reacciones cruzadas observadas antes del tratamiento enzimático ya que se puede observar en estas figuras las líneas de precipitación no sólo entre la histoplasmina y el suero histoplásmico sino también entre la coccidioidina, paracoccidioidina y blastomicina con el mismo suero (Fig 7); así también entre los CPPD's de cocci, paracocci y blasto con el suero histoplásmico (Fig 8). Al realizar la cromatografía en capa fina de estos antígenos tratados con α -galactosidasa en las condiciones descritas anteriormente no se pudo observar liberación de galactosa. El tratamiento de los antígenos crudos y CPPD's con β -galactosidasa tampoco eliminó las reacciones cruzadas frente al suero histoplásmico. En la figura 9 se pueden observar las líneas de precipitación comunes entre la histoplasmina, coccidioidina, paracoccidioidina y blastomicina frente al suero histoplásmico; en la figura 10 se puede observar a excepción del CPPD-blasto, existe cruce con los CPPD's de histo, cocci y paracocci. Las reacciones cruzadas entre los antígenos crudos y CPPD's frente al suero de paciente coccidioidomicono tampoco fueron eliminadas con ambos tratamientos enzimáticos. Los resultados siempre fueron los mismos aún al utilizar las diferentes concentraciones de enzima y antígenos. La cromatografía en capa fina de los antígenos de H. capsulatum, B. dermatitidis, C. immitis y P. brasiliensis, después de la aplicación de la β -galactosidasa reveló la presencia de galactosa, eliminada por esta enzima. Estos resultados sugieren que existen residuos de galactosa presentes en los antígenos, unidos por enlaces β y la prueba de inmuno-difusión en gel muestra que estos residuos no son una fracción importante como elemento de cruce.

Para observar los diferentes componentes antigénicos presentes - en las preparaciones estudiadas se procedió a la inmunoelectroforesis en doble dimensión (IEDD). Para obtener la mejor resolución de bandas en esta técnica, se ensayaron diferentes concentraciones de suero hiperinmune en la agarosa, que variaron del 5 al 20%. El mejor resultado se obtuvo con el 15%, el cual fue utilizado en las pruebas posteriores. Para el análisis de la IEDD se tomaron en cuenta solamente -- las líneas de precipitación bien delimitadas. Los resultados con histoplasmina frente al suero hiperinmune de conejo anti-H.capsulatum -- (Fig 11), mostraron 14 bandas de precipitación bien definidas, numeradas del 1 al 14. La confrontación entre el antígeno crudo de H.capsulatum y el CPPD histo en tandem (Fig 12) mostró que la mayoría de las bandas expresas en la histoplasmina con excepción de la 11 y 14 -- también se encontraron en el CPPD-histo, siendo que la banda 1 se presentó más nítida en ésta que en la histoplasmina. Al comparar la histoplasmina con la blastomicina (Fig 13) se encontró que las bandas 2,5,6,7,11,12 y 13 son comunes para los 2 antígenos, sin embargo, se observó una mayor definición de las bandas compartidas al utilizar el antígeno purificado CPPD-blasto apareciendo con este antígeno la banda 9 (Fig 14). Cuando se comparó la histoplasmina con la paracoccidioidina (Fig 15) se observaron las bandas 2,8,10,11 y 14 de la histoplasmina, así como otras bien definidas no numeradas en la histoplasmina, indicando otras fracciones comunes entre estos antígenos. Al -- comparar el antígeno CPPD-paracocci (Fig 16) con la histoplasmina -- se manifestó una variación en las bandas compartidas, ya que se desaparece la 14 y se manifiesta la 8. Al comparar la histoplasmina con -- la coccidioidina (Fig 17) se identificaron muchos de los componentes comunes de los otros antígenos crudos y además un gran número de bandas que no se apreciaron en las preparaciones en tandem con los antígenos crudos anteriores, los cuales desaparecieron al utilizar el -- CPPD-cocci (Fig 18), sin embargo, la comparación en tandem con CPPD-cocci define un mayor número de bandas, apareciendo la 8,10,12 y 13 -- que no se observaron con la coccidioidina (Fig 18).

Los resultados de los gels de poliacrilamida de los antígenos -- crudos (Fig 19) mostraron que la histoplasmina presentó 11 bandas, -- unas más teñidas que otras: 1 de ellas con peso molecular de 66 Kd, 2

con PM entre 45 y 66 Kd, 2 entre 36 y 45, 2 entre 29 y 36 Kd, 1 de 29, 1 entre 24 y 29 Kd, 1 entre 20 y 24 Kd y 1 entre 14 y 20 Kd. La blastomicina presentó 4 bandas: 1 entre 45 y 66 Kd, 1 de casi 45 Kd, 1 entre 29 y 36 y 1 entre 24 y 29 Kd. La coccidíoidina presentó 6 bandas: 1 de 36 Kd, 1 entre 29 y 36 Kd, 1 de 29, 1 entre 24 y 29, 1 entre 20 y 24 y 1 entre 14 y 20 Kd. La paracoccidíoidina, presentó 6 bandas: 2 entre 36 y 45 Kd, 1 entre 29 y 36, 1 de 29 Kd, 1 entre 24 y 29 y 1 de 24 Kd.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El estudio de la caracterización de antígenos de hongos patógenos es de fundamental importancia ya que estos son de utilidad para el diagnóstico y pronóstico de micosis profundas. En ocasiones, la alta frecuencia de reacciones cruzadas entre diferentes especies fúngicas ha limitado su utilidad diagnóstica.

Se conocen antígenos específicos h y m para H.capsulatum (22), A para B.dermatitidis (19), F y HL para C.immitis (33) y E y gp 43 para P.brasiliensis (59,39), sin embargo, la preparación de estos es laboriosa y sofisticada, obteniéndose cantidades mínimas, lo que resulta impráctico para su empleo en los laboratorios de rutina de serodiagnóstico de hongos. Además la especificidad de estos antígenos es aún cuestionable ya que Restrepo y Moncada (40) demostraron que el antígeno m descrito como específico para H.capsulatum presenta cruce en la técnica de inmunodifusión en gel con el antígeno 3 de P.brasiliensis.

Azuma et al. (2) al aislar galactomananas comunes entre H.capsulatum, B.dermatitidis y P.brasiliensis, sugirieron que estas moléculas son las responsables del cruce inmune entre ellos. Ishizaki et al. (25) lograron inhibir las reacciones cruzadas entre Sporothrix schenckii con células de C.werneckii y D-galactosa, mostrando que los residuos D-galactosil son los responsables de las reacciones cruzadas. Sin embargo, en S.schenckii los determinantes de galactosa son componentes menores, aparecen tardíamente durante su desarrollo en medio de cultivo y su papel en el cruce inmune no es importante, en cambio, las ramnomananas son las moléculas específicas de este hongo (50).

Por otro lado, Mendonça Previsto et al. (37) aislaron galactomananas con cadenas laterales β -galactofuranosil de filtrados de cultivo de S.schenckii y sugirieron que las reacciones cruzadas entre los antígenos fúngicos son debidas a unidades β -galactofuranosil no reductoras.

En un estudio previo sobre la caracterización del CPPD-histo se mostró que este antígeno pierde su reactividad inmunológica por trata

miento con β -glucosidasa y no se modifica por tratamiento con α -glucosidasa (47). En el presente trabajo se confirma que en los complejos polisacáridos proteínas de H.capsulatum están presentes los enlaces β y que además este enlace también se presenta en los antígenos -crudos y CPPD's de B.dermatitidis, C.immitis y P.brasiliensis. Por otro lado, la actividad de la β -galactosidasa sobre estos antígenos -identifica la presencia de residuos terminales no reductores, ya que esta enzima actúa sobre enlaces β de residuos no reductores de galactosa (12). Sin embargo, no se encontró que este componente fuera el responsable de las reacciones cruzadas, ya que estas no se eliminaron con el tratamiento enzimático. Teniendo en cuenta que los trabajos anteriormente citados sobre reactividad cruzada fueron realizados utilizando sueros hiperinmunes de conejo y que en el presente estudio no se encontraron cruces con los sueros de origen animal, en contraste con los sueros de pacientes, se sugiere que la respuesta inmune del paciente no involucra a los residuos no reductores de galactosa, como elementos importantes en las reacciones de cruce. La eliminación de estas moléculas no condujo a la desaparición de las reacciones cruzadas sugiriendo que las enzimas utilizadas no actuaron sobre otros residuos de galactosa (e.)reductores) que pudieran ser responsables de este cruce.

Tomando en cuenta la alta resolución de la técnica de IEDD, así como la utilización en diferentes hongos patógenos (7,23,34 y 46) se planteó su empleo para determinar la multiplicidad antigénica presente tanto en los antígenos crudos como CPPD's. Debido a que en esta metodología se utiliza gran cantidad de suero, sólo se usó un suero hiperinmune anti-H.capsulatum y por lo tanto al confrontar las diferentes preparaciones antigénicas de los otros hongos, se pusieron de manifiesto bandas de precipitación comunes entre los hongos estudiados-causantes de micosis profundas. Este método mostró múltiples bandas de precipitación comunes entre H.capsulatum, B.dermatitidis, C.immitis y P.brasiliensis, lo que concuerda con el trabajo de Huppert (24) donde encuentra 10 bandas de precipitación compartidas entre H.capsulatum y C.immitis y 12 entre B.dermatitidis y C.immitis. Se pudo observar también que los antígenos purificados (CPPD's) de los cuatro hongos mostraron una mejor definición de bandas de precipitación comu

nes. Por último se observó que las bandas 1,3 y 4 que aparecen en la histoplasmina, más concentradas en el CPPD-histo y no en los demás antígenos, podrían corresponder a los antígenos específicos de H.capsulatum. Esta técnica demuestra una amplia gama antigénica presente en las preparaciones que pone en evidencia el cruce inmune entre B.dermatitidis, P.brasiliensis, C.inmitis e H.capsulatum ya que solamente se utilizó suero hiperinmune de H.capsulatum.

Por otro lado, el análisis electroforético de fracciones antigénicas fúngicas ha sido ampliamente utilizado, sin embargo, el número de bandas presentes está estrechamente relacionado con los reveladores -- utilizados. Al revelar con tinciones para proteínas como azul de Coomassie se ponen en evidencia un menor número de fracciones en hongos ya que estos presentan un mayor porcentaje de carbohidratos. El trabajo de Young y Larsh (61) sobre el antígeno A de B.dermatitidis mostró 5 bandas en electroforesis en gel de acrilamida al teñir con azul de Coomassie, y 20 bandas al utilizar la tinción de plata para carbohidratos.

La técnica EGPA de los antígenos crudos utilizados mostraron 11 fracciones para H.capsulatum, 4 para B.dermatitidis, 6 para C.inmitis y 6 para P.brasiliensis lo que se aproxima a los resultados de Kashkin et al. (27) quienes encuentran en filtrados de cultivo con esta misma técnica 8 fracciones para la histoplasmina, 6 para la blastomicina y 6 para la paracoccidioidina.

En trabajos previos, Toriello et al. (49) realizaron una EGPA de los CPPD's donde en contraste con los antígenos crudos se encontraron solamente 3 bandas en el CPPD-histo, 2 en el CPPD-blasto y 1 en el CPPD-cocci. Estos hallazgos aparentemente contrastan con las múltiples bandas de precipitación encontrados en la IEDD para estos mismos antígenos. Sin embargo en la EGPA lo que se pone de manifiesto es el número de fracciones que contiene el antígeno purificado (CPPD) que pudiera representar tres componentes independientes o bien componentes de una misma molécula que pudieran haberse separado por los diversos pasos -- del proceso de purificación. Por otro lado, en la IEDD no sólo se identifica la presencia de diferentes fracciones antigénicas sino también una gran gama de determinantes antigénicos presentes en una sola molécula de antígeno, que darían reactividad frente a una población heterogénea de anticuerpos que se generan frente a una inmunización con un --

antígeno complejo como es la histoplasmina.

Al incluir marcadores de peso molecular en la EGPA, se encontraron fracciones entre 24 y 25 Kd para P.brasiliensis. Es interesante notar que al antígeno específico gp 43 de P.brasiliensis descrito por Puccia et al. (39), que precipita con suero hiperinmune anti-E tiene un peso molecular de 43 Kd. Anderson et al. (1) en su trabajo sobre C.immitis encuentra fracciones reactivas conteniendo carbohidratos y proteínas con pesos moleculares entre 10 y 60 Kd siendo que en este trabajo se encontraron en la coccidioidina 6 fracciones entre 14 y 36 Kd que caen dentro del rango de pesos moleculares encontrados por Anderson. Bradley et al. (6) identificaron por medio de sephadex G-200, en el filtrado de la fase micelial de H.capsulatum (histoplasmina), además de componentes de alto peso molecular, los antígenos h de 30 Kd y m de 24 Kd. En el presente estudio la histoplasmina mostró 3 fracciones con pesos moleculares entre 24 y 29 Kd.

Los datos anteriormente descritos sugieren la presencia de múltiples fracciones antigénicas o bien una amplia gama de determinantes antigénicos en las preparaciones crudas y purificadas de estos hongos. Esto explica la abundancia de reacciones cruzadas entre ellos que implica la necesidad de un método que logre el aislamiento del antígeno específico en suficiente cantidad, o bien técnicas que bloqueen los determinantes de cruce. Esto se ha comenzado a realizar mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (42).

Es un hecho ampliamente conocido que la fracción proteica de los antígenos fúngicos es la responsable de las reacciones de hipersensibilidad tardía, mientras que la fracción polisacárida es de importancia para las reacciones inmunes humorales. Los antígenos aquí estudiados presentan un alto porcentaje de carbohidratos lo que los hace útiles para las reacciones de precipitación. Sin embargo, también presentan una fracción proteica que los hace reactivos en las pruebas de intradermorreacción. Becerril et al. (3) mostraron en una población de pacientes con enfermedades respiratorias, utilizando los antígenos crudos y CPPD's que los primeros presentaron una mayor reactividad que los antígenos purificados (CPPD's) en pruebas de menor sensibilidad como la inmunodifusión en gel y la contrainmunolectroforesis. Sin embargo, --

los CPPD's fueron útiles en pruebas de mayor sensibilidad como la ELISA. A pesar de que los CPPD's presentaron menor reactividad que los antígenos crudos en las pruebas de precipitación estos son quizás más útiles porque exhiben un menor grado de reactividad cruzada. Los antígenos crudos por reaccionar en pruebas de fácil manejo y rápida detección son los ideales para estudios de precipitación en general y epidemiológicos, mientras que los purificados son útiles para pruebas de diagnóstico y pronóstico ya que ha sido demostrado su menor grado de cruce en estas pruebas (47,48).

No hay que perder de vista la importancia que reviste la obtención de un buen antígeno. Hasta la fecha, no existe uniformidad en cuanto a las condiciones en las que se realizan estos estudios: las cepas y medios de cultivo utilizados, morfología del hongo, tipo de antígeno (de filtrado de cultivo o somático) y metodología de obtención y por lo tanto es difícil la comparación de los resultados entre diferentes laboratorios. Sin embargo, la experiencia adquirida durante el presente trabajo muestra que el mejor antígeno proviene de cepas autóctonas aisladas de pacientes con micosis; el medio de cultivo de donde se obtiene debe ser sintético o semi-sintético para que las sustancias de alto peso molecular del medio no intervengan en la actividad biológica del antígeno específico en un huésped susceptible; la fase micelial del hongo es la más recomendable para producir antígeno por ser más fácilmente manipulable y producir buenos resultados, además de que produce resultados similares al antígeno que proviene de la fase levaduriforme. Por último la utilización de una metodología sencilla para la producción de antígenos a partir de filtrados de cultivo que implica bajo costo y buen rendimiento, hace que las preparaciones antigénicas así elaboradas, puedan ser ampliamente difundidos entre los laboratorios que realizan el serodiagnóstico de rutina en las infecciones por hongos.

A B S T R A C T

Crude (histoplasmin, blastomycin, coccidioidin and paracoccidioidin) and purified (Deproteinized polysaccharide-protein complex DPPC)-antigens from Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis and Paracoccidioides brasiliensis, etiological agents of systemic mycoses, were used in a comparative immunological study. Different authors point out galactomannans as responsible for cross-reactions among fungi. Therefore, both crude and purified antigens from these four fungi, were treated with α (25°C, pH 6.5, 30 min) and β (37°C, pH 7.3, 30 min) galactosidase in order to eliminate cross-reactions. Release of galactose was checked by thin layer chromatography using their specific substrate as control. Antigens were assayed by Ouchterlony's immunodiffusion test using histoplasmosis human sera before and after enzymatic treatment. In order to observe the different antigen-reactivity and cross-reactions present in both crude and purified antigenic preparations, a bidimensional immunoelectrophoresis test with rabbit hyperimmune anti-H.capsulatum serum was performed as well as a tandem comparison among them. Enzymatic treatment suggested that crude and purified antigens present β linked galactose and that galactosyl-residues elimination did not modify cross-reactions when human sera was used. Bidimensional immunoelectrophoresis showed 14 precipitation-bands for histoplasmin where bands 1,3 and 4 are specific appeared more concentrated in its corresponding DPPC. Tandem comparison between histoplasmin and the other antigens studied, showed a great diversity of common antigenic determinants.

LISTA

DE

TABLAS Y FIGURAS

T A B L A 1

PROTEINAS Y CARBOHIDRATOS TOTALES DE LOS ANTIGENOS CRUDOS Y PURIFICADOS
(CPPD's)

ANTIGENOS	PROTEINAS ug/ml	CARBOHIDRATOS ug/ml
<u>CRUDOS</u>		
HISTOPLASMINA	3662	4500
BLASTOMICINA	2329	6548
COCCIDIOIDINA	4080	6500
PARACOCCIDIOIDINA	3750	8000
<u>PURIFICADOS</u>		
CPPD-histo	205	1159
CPPD-blasto	255	1952
CPPD-cocci	134.7	1621
CPPD-paracocci	86.2	1550

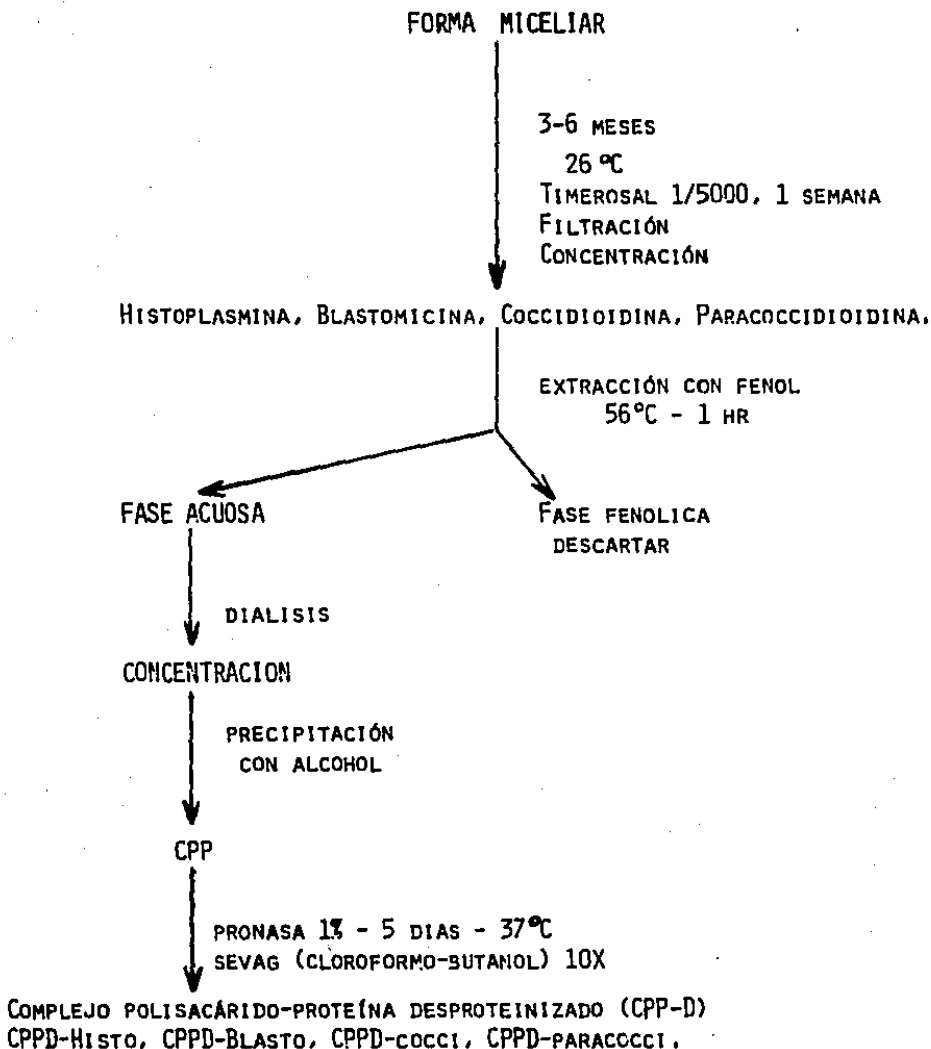


FIG. 1. ESQUEMA DE AISLAMIENTO DEL COMPLEJO POLISACARIDO PROTEINA DESPROTEINIZADO (CPP-D)



Fig.2 ID en gel de suero hiperinmune de conejo anti H. capsulatum (c) con los siguientes antígenos : 1.CPPD-histo, 2.histoplasmina, 3. CPPD-blasto, 4. blastomicina, 5.CPPD-paracocci, 6. paracoccidioidina.

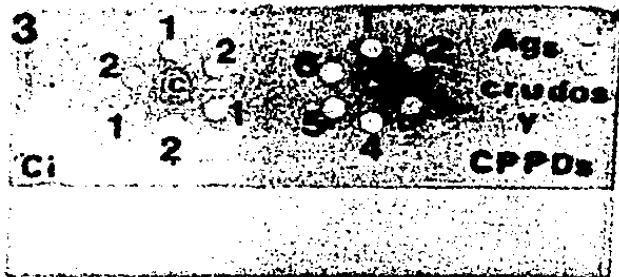


Fig.3 ID en gel de suero hiperinmune de conejo anti C. immitis (c) con los siguientes antígenos : 1. CPPD-cocci, 2.coccidioidina, 3. CPPD-para-cocci, 4. paracoccidioidina, 5. CPPD-blasto, 6. blastomicina.

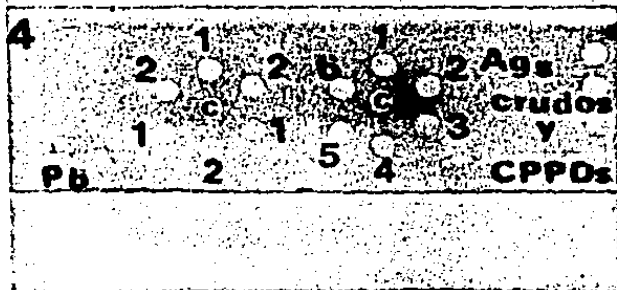


Fig 4 ID en gel de suero hiperinmune de conejo anti- P. brasiliensis - (c) con los siguientes antigenos : 1. CPPD-paracocci, 2. peraco ccidioidina, 3. CPPD-histo, 4. histoplasmina, 5. CPPD-blasto, .. 6. blastomicina.

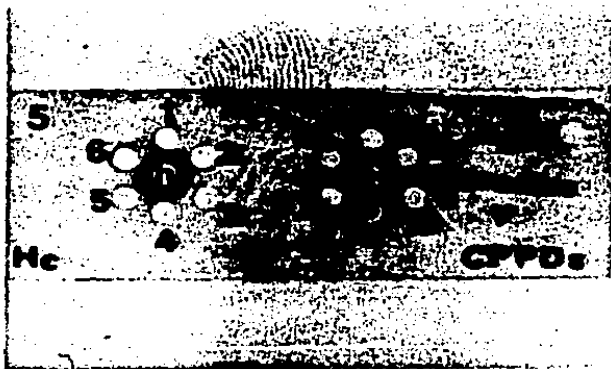


Fig 5 ID en gel de suero de paciente con histoplasmosis (h) con los siguientes antígenos : 1. histoplasmina, 2. CPPD-histo, 3. blastomicina, 4. CPPD-blasto, 5. paracoccidioidina, 6. CPPD-paracocci, 7. coccidioidina, 8. CPPD-cocci

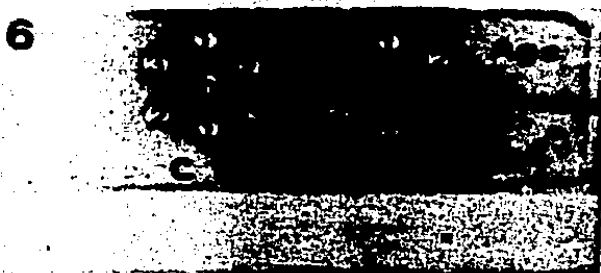


Fig 6 ID en gel de suero de paciente con coccidioidomycosis (h) con los siguientes antígenos : 1. histoplasmina, 2. coccidioidina, 3. paracoccidioidina, 4. blastomicina.

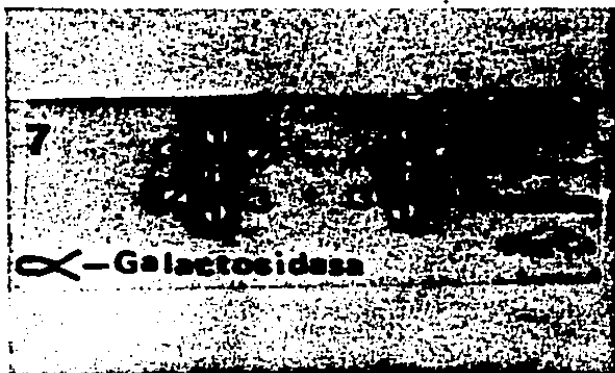


Fig 7 ID en gel de suero de paciente con histoplasmosis (h) con los siguientes antígenos crudos tratados con α -galactosidasa : 1. histoplasmina, 2. coccidioidina, 3. paracoccidioidina, 4. blastomicina

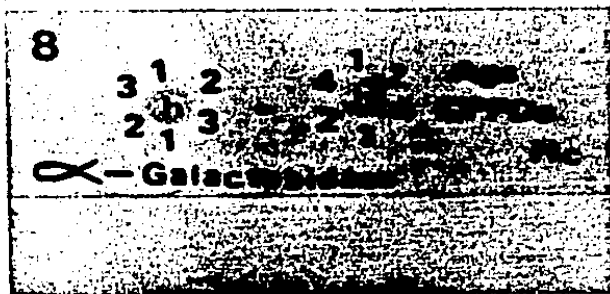


Fig 8 ID en gel de suero de paciente con histoplasmosis (h) con los siguientes antígenos purificados tratados con α -galactosidasa : -- 1. CPPD-histo, 2. CPPD-cocci, 3. CPPD-paracocci, 4. CPPD-blasto

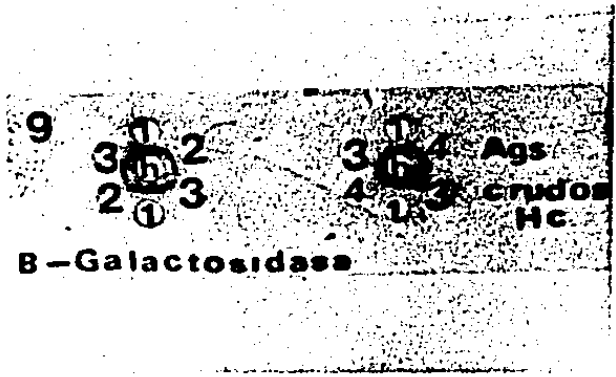


Fig 9 ID en gel de suero de paciente con histoplasmosis (h) con los siguientes antígenos crudos tratados con β -galactosidasa : 1. histoplasmina, 2. coccidioidina, 3. paracoccidioidina, 4. blastomicina

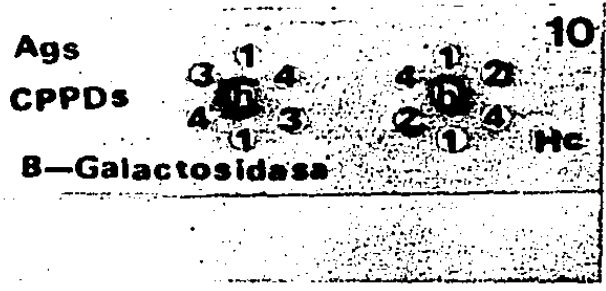


Fig 10 ID en gel de suero de paciente con histoplasmosis (h) con los siguientes antígenos purificados tratados con β -galactosidasa : CPPD-histo, 2. CPPD-cocci, 3. CPPD-paracocci, 4. CPPD-blasto

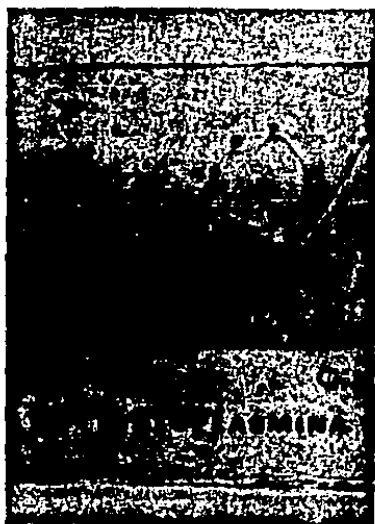


Fig.11 IEDD de la histoplasmina con suero de conejo hiperinmunizado con antígeno de H-capriatum (H)

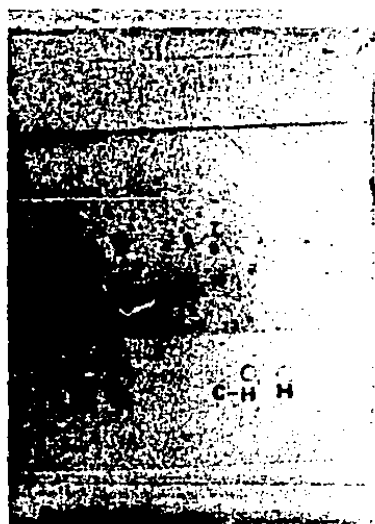


Fig.12 IEDD en tandem de la histoplasmina (H) y CPPD-histo (C-H)

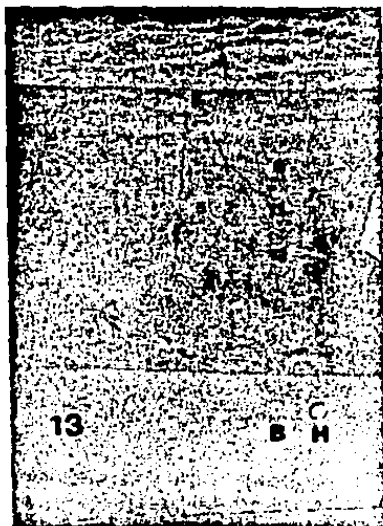


Fig.13 IEDD en tandem de la histoplasmina (H) y blastomicina (B)



Fig.14 IEDD en tandem de la histoplasmina (H) y CPPD-blasto (C-B)

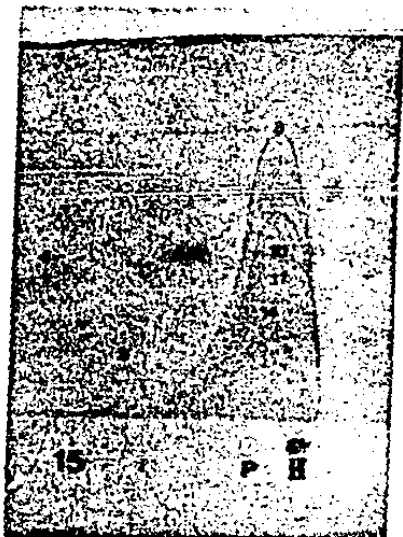


Fig.15 IEDD en tandem de la histoplasmina (H) y paracoccidioidina - (P)

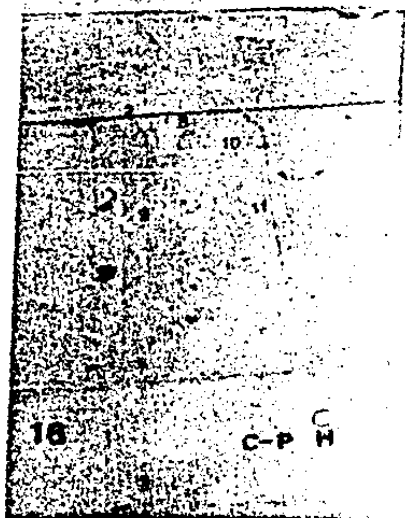


Fig.16 IEDD en tandem de la histoplasmina (H) y CPPD-paracocci (C-P)

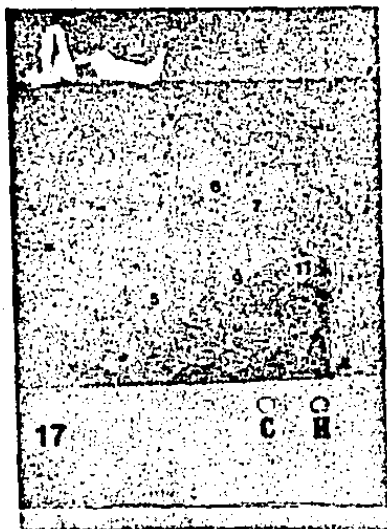


Fig.17 IEED en tandem de la histoplasmina (H) y coccidioïdina (C)

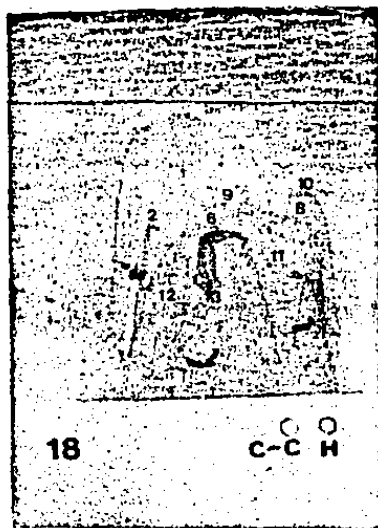


Fig.18 IEED en tandem de la histoplasmina (H) y CPPD-cocci (C-C)

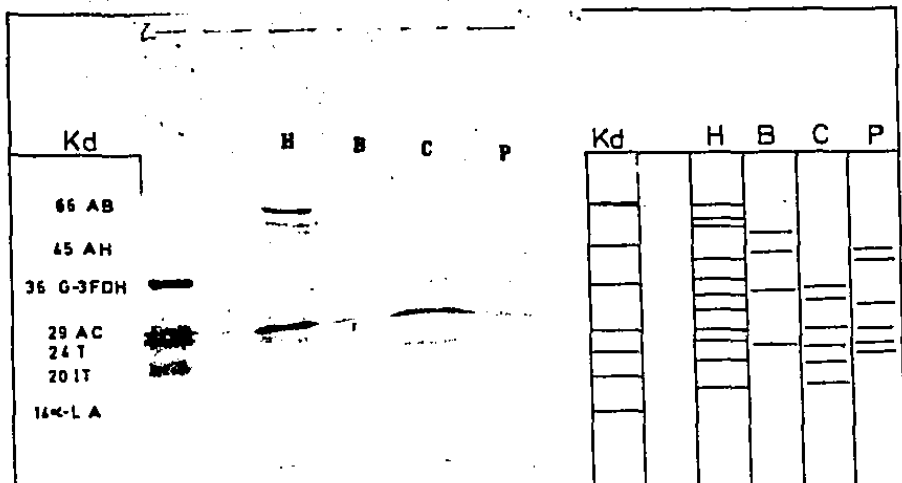


Fig 19 Electroforesis en geles de poliacrilanida

H) histoplasmina, b) blastomicina, C) coccidioidina, P) paracoccidioidina
 AB) albumina bovina, AH) albumina de huevo, G-3 FDH) gliceraldehido-3 fosfato
 deshidrogenasa, AC) anhidrasa carbónica, T) tripsinógeno, IT) inhibidor del -
 tripsinógeno, α -LA) alfa-lactoalbumina, Kd) kilodaltons

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson KL, Wheat RW, Conant NF: Fractionation and composition studies of skin test active components of sensitins from Coccidioides immitis. Appl Microbiol 1971; 22:294-299.
2. Azuma I, Kanetsuna F, Tanaka Y, Yamamura Y, Carbonell LM :Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from Histoplasma duboisii, Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis and Blastomyces dermatitidis. Mycopathol Mycol Appl 1974;54:111-125.
3. Becerril M, Acosta G, Casasola J, Rebora Gutiérrez F, Díaz Gómez ML, Velasco Castrejón O, Taylor ML, Toriello C : Investigación de la respuesta inmune a antígenos fúngicos en pacientes de un hospital de enfermedades respiratorias. Rev. Mex Mic 1986;211-226
4. Bolinlier HR : Thin-layer Chromatography. In : Sthal (ed). A Laboratory Handbook. Springer-Verlag, Berlin, 2nd ed 1969.
5. Bonilla-Soto O, Rose NR, Alberman CE : Allergic molds. J. Allerg 1961;32:246-250.
6. Bradley G, Pine L, Reeves MW, Moss CW : Purification, composition and serological characterization of Histoplasmin h and m antigens. Infect Immun 1974;9:870-880.
7. Bruneau SM, Guinet RHF : Characterization of Candida antigens by crossed immunoelectrophoresis. Sabouraudia : J Med Vet Microbiol 1985;23:107-119.
8. Conant NF, Smith DT : Micología Médica. Editorial Interamericana, 3a ed. 1981.
9. Cox RA, Larsh HW : Isolation of skin test-active preparations -- from yeast phase cells of Blastomyces dermatitidis. Infect Immun 1974;10:42-47.
10. Chytil F : Mammalian β -galactosidases. Biophys Res Commun 1965; 19:630-636.
11. Denton HF, Disalvo AF : Isolation of Blastomyces dermatitidis -

- from natural sites at Augusta, Georgia. Am J Trop Med Hyg 1964; 13:716-722.
12. Distler JJ, Jordain GW : The purification and properties of β -galactosidase from Bovine Testes. J Biol 1973;248:6777-6780.
 13. Dubois M, Guilles KA, Hamilton JK, Reber BA, Smith F : Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal Chem 1956;28:350-356.
 14. Gerety RF, Ferraresi RWS : Polysaccharide in delayed hypersensitivity I. Pneumococcal polysaccharide as inducer and elicitor of delayed reactivity in guinea pigs. J Exp Med 1970;131:189-193.
 15. González Ochoa A : Epidemiología de la histoplasmosis primaria en México. Rev Inst Salubr Enfer Trop (Méx) 1963;23:65-80.
 16. González Ochoa A, Félix D : Distribución geográfica de la reactividad cutánea a la histoplasmina en México. Rev Invest Salud Publ (Méx) 1971;31:74-77.
 17. González Ochoa A : Las micosis pulmonares en México y Centroamérica. Rev Invest Salubr Enfer Trop (Méx) 1960;20:129-145.
 18. González Ochoa A : La importancia de la coccidioidomicosis en la frontera entre México y los Estados Unidos de América. Rev Salud Publ (Méx) 1968;3:319-325.
 19. Green JH, Harrell WK, Benson R : Isolation of an antigen from Blastomyces dermatitidis that is specific for the diagnosis of Blastomycosis. Current Microbiol 1980;4:293-296.
 20. Green JH, Pine L : Preparation of h and m Antigens of Histoplasma capsulatum free of heterologous Antigens. Current Microbiol 1985;12:209-216.
 21. Healey LD, Calaway CS : Laboratory Methods in Medical Mycology. Atlanta, Georgia : 1978 : New Publication No.(CDC) 78-8361.
 22. Heiner DC : Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. Pediatrics 1958;22:616-620.
 23. Huppert M, Spratt NS, Vucovich KR, Sun SH, Rice EH : Antigenic analysis of coccidioidin and spherulin determined by two dimensional immunoelectrophoresis. Infect Immun 1978;20:541-551.

24. Huppert M, Adler JP, Rice EH, Sun SH : Common antigens among systemic disease fungi analysed by two dimensional immunoelectrophoresis. *Infect Immun* 1979;23:479-485.
25. Ishizaki H, Nakamura Y, Wheat RW : Serological cross-reactivity between Sporothrix schenckii and various unrelated fungi. *Mycopathologia* 1981;73:65-68.
26. Kabat EA : *Experimental Immunochemistry*. CC Thomas Publishers, 2nd ed, Springfield 1961:559.
27. Kashkin KP, Drozdov AI, Ponomarenko VA : Comparative immunochemical studies of different antigens of deep mycosis pathogens. *Ann Immunol* 1978;129:287-300.
28. Kaufman L, Mc Laughlin DH, Clark MJ, Bluner S : Specific immunodiffusion test for blastomycosis. *Appl Microbiol* 1973;26:244-247.
29. Kirby KS : A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *J Biochem* 1956;64:405-409.
30. Laemmli UK : Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 1970;227:680-685.
31. Li YT, Li SC : α -Manosidase, B-N-acetyl Hexosaminidase, and β -galactosidase from Jack Bean Meal. *Meth Enzymol* 1972;28:702-704.
32. Lowry OH, Rosebrough NY, Farr AL, Randall RJ : Protein Measurements with the Folin-reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
33. Mackenzie DWR; Serodiagnostics In : Howard DH (ed) *Fungi Pathogenic for Humans and Animals Part B. Pathogenicity and Detection: II*. New York : Marcel Dekker, Inc, 1982;158-162.
34. Mackenzie DWR, Hearn VM, Wilson EV, Proctor AG : Preparation of Aspergillus fumigatus antigens and their analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. *J Med Microbiol* 1980;13:451-458.
35. Mayorga PR, Hernan E : Coccioidomycosis in Mexico and Central America. *Mycopathol Micol Appl* 1970;40:13-21.
36. Martínez Báez MA, Reyes MA, González Ochoa A : Blastomycosis Norteamericana en México. *Rev Inst Salubr Enfer Trop (Méx)* 1954;14:225-239.
37. Mendonça PL, Gorin PAJ, Lloyd KO, Travassos LR : Polymorphism of Sporothrix schenckii surface polysaccharides as a function of morpho

logical differentiation. Biochem 1976;15:2423-2431.

38. Ouchterlony O : Diffusion in gel methods for immunological analysis, Prog Allergy 1962;6:30-36.
39. Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR : Extracellular components of Paracoccidioides brasiliensis : Identification of a specific antigen. Infect Immun 1986;51:199-206.
40. Restrepo AM, Moncada LH : Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. Appl Microbiol 1974;28:138-144.
41. Reyes-Montea MR, Martínez A, Toriello C, Taylor ML : Antigens from Histoplasma capsulatum and Blastomyces dermatitidis. Immunological comparative studies from polysaccharide-protein complexes of both fungi. Mycopathologia 1982;78:17-23.
42. Reyes-Montes MR, Sullivan LJ, Casasola J, Selman L, Taylor ML: Ca racterización y producción de anticuerpos monoclonales contra Histoplasma capsulatum. II Congreso Nacional de Micología, Oaxtepec, Mor. Noviembre 25-29, 1986;P.37
43. Rippon JW : Medical Mycology. Philadelphia WB Saunders Company : 2nd ed 1982.
44. Sevag MG : Eine neue Physikalische Enteiweissungsmethode zur Darstellung biologisch wirksamer Substanzen. Isolierung von Kohlenhydraten aus Hühnerereiweiss und Pneumococcen. Biochem A 1934;273: 419-429.
45. Smith CE, Saito MT, Beard RR, Mc Padden RK, Wheat LCR, Eddie BV : Serological test in the diagnosis and prognosis of Coccidioidomycosis. Amer J Hyg 1950;62:1-21.
46. Svejgaard E : Immunologic properties of a fraction of Trichophyton rubrum with affinity to concanavalin A. J Med Vet Mycol 1986;24: 271-280.
47. Taylor ML, Bojalil L : Inmunología de la histoplasmosis, Aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmunoespecífica a partir de Histoplasma capsulatum. Arch Invest Med (Mex) 1977; 8:91-102.

48. Taylor ML, Reyes-Montes MR, Lachica A, Eslava CC, Olivera J, Maxwell R : Immunology of histoplasmosis : humoral and cellular activity from a polysaccharide-protein complex and its deproteinized fraction in experimentally immunized mice. *Mycopathologia* 1980;71:159-166.
49. Toriello C, Rosas JL, Reyes-Montes MR, Taylor ML : Biochemical studies of polysaccharide protein antigen from fungi causing systemic mycosis In : Baxter M, (ED). *Proceedings VIII Congress ISHAM, Massey University, Palmerston North, Nueva Zelandia 1982; 220-224.*
50. Travassos LR, Mendonça-Previato L : Synthesis of monochomosyl L-rhamno-D-mannans by conidia of Sporothrix schenckii. *Infect Immun* 1978;19:1-4.
51. Velasco-Castrejón O, González Ochoa A : Primary pulmonary epidemic histoplasmosis in an abandoned mine. *Mykosen* 1977;20:393-399.
52. Velasco-Castrejón O, Fujigaki LA : Importancia de la histoplasmosis pulmonar primaria en trabajadores de minas. *Neumol Cir Torax* 1984;44:7-9.
53. Velasco-Castrejón O : Quelques aspects de L'histoplasmosis en République Mexicaine. *Medicine Tropicale* 1981;41:681-683.
54. Velasco-Castrejón O : Paracoccidioidomycosis. Informe Técnico No 5 Dirección Gral. de Epidemiología, México D.F. 1980.
55. Wan HM, O'Brien JS : Differential effect of chloride ions on β -galactosidase isoenzymes. A method for separate assay. *Clin Chim Acta* 1971;32:443-450.
56. Ward ER, Cox RA, Schmitt JA, Huppert M, Sun SH : Delayed-type hypersensitivity responses to a cell wall fraction of the mycelial phase of Coccidioides immitis. *Infect Immun* 1975;12:1093-1097.
57. Weber K, Osborn M : The realization of M.W. determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol Chem* 1969; 244:4406-4412.
58. Yarzabal LA, Sout D, Andrieu S : Isolation of a specific antigen with alkaline phosphatase activity from soluble extract of Paracoccidioides brasiliensis. *Sabouraudia* 1976;14:275-280.

59. Yarzabal LA, Bout D, Naquira F, Andrieu S : Identification and purification of the specific antigen of Paracoccidioides brasiliensis responsible for immunoelectrophoretic band E. Sabouraudia 1977; 15:79-85.
60. Yarzabal LA, Campo-Aasen I, De Cabral NA : Sub-cellular localization of antigen E/2 of Paracoccidioides brasiliensis : an immunoenzymatic electron microscopy study. Sabouraudia 1980;18:167-171.
61. Young KD, Larsh HW : Identification of the active precipitin components in a purified preparation of the A antigen of Blastomyces dermatitidis, Infect Immun 1981;33:171-177.