

24 86



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"ESTUDIO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA PRODUCCIÓN
DE ANTIGENOS DE DIVERSAS ESPECIES PATOGENAS DE
ASPERGILLUS"

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
AMELIA DE LOS ANGELES PEREZ MEJIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1989



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 está 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

	Pags.
INTRODUCCION Y ANTECEDENTES.....	1
Planteamiento del Problema.....	12
Objetivos.....	14
MATERIAL Y METODOS.....	15
1. Hongos.....	15
2. Medios de Cultivo.....	15
3. Condiciones de Cultivo.....	16
4. Curvas de Crecimiento.....	16
5. Obtencion de Antigenos.....	17
6. Obtención de Antigenos Metabólicos.....	17
7. Obtención de Antigenos Polisacáridos.....	18
8. Obtención de Antigenos Citoplásmicos.....	18
9. Métodos Inmunológicos.....	19
10. Métodos Inmunoenzimáticos.....	21
RESULTADOS.....	22
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	26
LISTA DE TABLAS.....	32
LISTA DE FIGURAS.....	33
BIBLIOGRAFIA.....	34

INTRODUCCION / ANTECEDENTES

La aspergilosis, causada por ciertas especies de *ASPERGILLUS*, se caracteriza por la gran diversidad de manifestaciones clínicas que pueden presentarse como lesiones granulomatosas en la piel, ojos externos, senos nasales, órbita de ojo, bronquios, pulmones y ocasionalmente en nasofaringe, vagina, útero, válvulas cardíacas, cavidad pleural, mediastino, hueso, cerebro y meninges (1,11). Esta es considerada como una micosis por oportunista, el individuo sano posee gran resistencia natural a la infección por especies obvias de *ASPERGILLUS*. Un gran porcentaje de los casos estudiados afectan a individuos con baja respuesta inmune, por presentar diferentes padecimientos como tuberculosis, bronquiectasias o carcinoma del pulmón o con gran debilidad general como consecuencia de cáncer metastático, leucemia o enfermedades linfomatosas. Sin embargo, cada vez se observan más casos de infección en individuos aparentemente sanos, lo que en parte depende del amplio uso de hormonas corticoides (5).

La primera autopsia de esta enfermedad fue practicada por Virchow en 1756 (49). Casi todos los casos tempranos fueron estudiados en Francia, sin embargo, en el presente se han informado casos en todas partes del mundo. Desde comienzos del siglo XIX aumentaron en forma gradual el número de casos en Alemania, Inglaterra, Italia, Austria y América del Norte y del Sur (5), por lo que la aspergilosis es una enfermedad que adquiere actualmente mayor relevancia.

La clasificación de los tipos clínicos de la aspergilosis según Rippon (42) es la siguiente:

- H. Aspergilosis pulmonar.
 - 1. Aspergilosis alérgica
 - a. Asma.
 - b. Aspergilosis broncopulmonar
 - 2. Aspergilosis colonizante (aspergilomas)
 - 3. Aspergilosis invasiva
- B. Aspergilosis diseminada
- C. Aspergilosis del sistema nervioso central
- D. Aspergilosis cutánea
- E. Aspergilosis naso-orbital
- F. Aspergilosis iatrogena

Entre las aspergilosis pulmonares más importantes se encuentran la aspergilosis alérgica, que puede producir asma y la enfermedad broncopulmonar.

El asma o alergia asmática a esporas de varias especies de Aspergillus es bien conocida. No varía significativamente de otros tipos de alergias a polen o esporas. Las esporas rara vez germinan en los conductos bronquiales. En radiografías se pueden observar sombras segmentales. frecuentemente en el lobulo superior se pueden encontrar infiltrados característicos, como reacción inmediata y una fibrosis en la enfermedad crónica. Pueden producir fiebres intermitentes, tos, silbidos, escalofríos, dolores y fatiga. En la expectoración se puede observar eosinofilia. El estudio de la función pulmonar demuestra un defecto resp-

relacionado a un debilitamiento de cambio reciente, se pueden presentar anticuerpos del tipo IgG de reacción rápida. Estos pacientes usualmente no presentan precipitados precipitantes o reacción de tipo de látex si reaccionan el antígeno.

La aspergilosis broncopulmonar alérgica o alérgica broncopulmonar puede desarrollarse como consecuencia de la exposición a un ataque tardío de esporas. Se pueden notar los síntomas y en los pulmones a postmórtem se pueden observar filamentos fungoides, además de obtener el cultivo. Se presentan precipitantes en el suero de casi todos los pacientes.

En el aspergiloma, el desarrollo de los nodos fungoides es el resultado de una aspergilosis alérgica crónica o de la colonización de cavidades preexistentes, causadas por otras enfermedades. La anterior condición es asociada por esquistosomiasis y bronquiectasias. Los pacientes usualmente tienen historia clínica consistente de una aspergilosis alérgica crónica o bien de una aspergiloma bronquiectásico. Los síntomas corresponden a una enfermedad alérgica. Estos pacientes tienen anticuerpos reactivos transferibles (IgE) y precipitinas (IgG), fácilmente demostrables además de hipersensibilidad tardía a esporas de *Aspergillus*.

La aspergilosis invasiva es una enfermedad poco común y en donde se conserva el micelio en tejido pulmonar. El padecimiento puede ser crónico o agudo, algunas veces fulminante y fatal. Existen factores predisponentes como por ejemplo infecciones por oportunistas. Los síntomas son neumonía, con fiebres, tos, leucocitosis y otros signos de trastornos respiratorios. En años recientes se ha incrementado la frecuencia de la aspergilosis

es invasiva en pacientes con leucemia y linfoma. Estos grupos se ven predispuestos en particular al desarrollo de la enfermedad con complicaciones clínicas. En pacientes con trasplantes renales, la aspergilosis ha sido más frecuente por el uso de inmunosupresores. Para evitar una reacción de rechazo al transplante.

La aspergilosis diseminada, es una enfermedad que puede presentarse por el uso indiscriminado de antibióticos y esteroides. El primer caso fue reportado por Lind en 1939 (31) y casi todos los casos subsecuentes están asociados al uso de antibióticos o esteroides o ambos. Estos casos se presentan en asociación con otras enfermedades incluyendo neumonía, diarreas, leucemia, e ciampsis y hepatitis.

La aspergilosis del sistema nervioso central, se puede encontrar como resultado en la adicción a drogas y a factores iatrogénicos. El primer síntoma que se presenta es una meningitis aguda y termina rápidamente en la muerte. Se pueden observar en la autopsia lesiones necróticas extensivas en cerebro y meninges. Muy pocos casos pueden ser curados.

A pesar que se han informado casos de aspergilosis cutánea, esta es una enfermedad rara. Es usualmente secundaria a una diseminada, pero puede ser primaria. En principio, la lesión consiste en múltiples nodulos, lesión edematosa en la piel y decoloración. En muchos casos se confunde con lesión lepromatosa.

En la aspergilosis naso-orbital, se observa un aspergilloma en la nariz que puede eventualmente involucrar la órbita del ojo. En

El mundo es una enfermedad rara. Milozar y Bolt (36) describieron 17 casos siendo el agente etiológico más frecuente *A. flavus*.

Como *Aspergillus* se presenta constantemente en el medio ambiente, puede contaminar los cuartos y suministros de hospitales y por consiguiente penetrar en los pacientes susceptibles. Se conocen casos de aspergilosis iatrogénica como consecuencia del uso de dietas en pacientes, de endocarditis después de cirugía cardíaca y después de terapia intratecal (42).

El tratamiento de la aspergilosis puede ser variable dependiendo del tipo clínico que se presenta. La droga más utilizada en este padecimiento es la anfotericina B asociada con 5-fluorocitosina. También se han utilizado los imidazoles (ketokonazol, itraconazol), sin embargo, en combinación con la anfotericina B resultan antagonicos.

Los agentes etiológicos de esta micosis pertenecen a la subdivisión Deuteromycotina, orden de los Moniliales, familia Moniliaceae (12). Son hongos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Entre los más importantes como causantes de la aspergilosis se encuentran: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*. El micelio de los *Aspergillus* se parece al de muchos hongos. Sus hifas están bien desarrolladas, ramificadas, septadas, hialinas y sus células son, por lo general, plurinucleadas. Cuando el micelio es todavía joven producen conidióforos en abundancia. Estos conidióforos no están organizados en ninguna manera, sino que se forman independientemente sobre las hifas. La célula hifal que se ramifica para dar lugar al conidióforo se denomina

célula pedera o basal. Los conidióforos son hifas largas erectas, terminando cada una de ellas en una cabeza bulbosa denominada vesícula. A medida que se desarrolla la vesícula plurinucleada, se produce un gran número de células conidiógenas sobre la superficie, que la recubren por completo. Según la especie, se pueden producir una o dos piezas de células conidiógenas (denominadas fialides). Los conidios de *Aspergillus* se forman dentro del apice de la fialide. Debido a que los conidióforos y los conidios son producidos en abundancia, su color es el que domina en la colonia a la que recubren. Las colonias de *Aspergillus* aparecen por consiguiente negras, pardas, amarillas, verdes, etc., dependiendo del color de la especie y del medio en que el hongo crece (1).

Algunas especies de *Aspergillus*, sobre todo *A. glaucus* y *A. nidulans*, pueden reproducirse sexualmente en medios de cultivo especiales y pueden observarse cleistotecios. Los cleistotecios a su vez contienen ascas como sacos que contienen ascosporas, cuya morfología también puede usarse para la identificación de especie (28).

El diagnóstico micológico de la aspergilosis, se basa en el hallazgo de fragmentos miceliales en las muestras biológicas, en la obtención de un cultivo que revele la presencia del conidióforo típico y de las cadenas de conidios, así como la presencia de elementos fungicos en biopsias. Como *Aspergillus* crece rápidamente y actúa a menudo como contaminante, su desarrollo puede ocultar o inhibir por completo el crecimiento de un hongo patógeno de crecimiento más lento, que puede pasar inadvertido en el material clínico. Es necesaria gran cautela antes de decidir que

un aislamiento de *Aspergillus* es el agente etiológico de una enfermedad pulmonar. Incluso cultivos positivos obtenidos de esputo, recogido en recipientes estériles y protegidos de contaminación por parte de esporas del aire, no confirman el diagnóstico de aspergilosis, ya que hubieran podido penetrar durante el día por acción eólica en tráqueas y bronquios y aparecer en muestra del esputo estéril (34). Por esto es de fundamental importancia para el clínico, el diagnóstico serológico, que es de gran ayuda aunado a los hallazgos clínicos y micológicos (44).

Entre las pruebas serológicas más utilizadas en el diagnóstico de esta enfermedad, se encuentran la inmunodifusión en gel (IDG), la contraelectroforesis (CIE), la aglutinación (AG) y la fijación de complemento (FC). La prueba de inmunodifusión en gel es de las más utilizadas en el laboratorio de rutina. En esta prueba, una simple banda débil puede pertenecer a un paciente con enfermedad asmática. Cuatro bandas o más se presentan en la aspergilosis alérgica con colonización en bronquios y se han encontrado hasta 18 bandas en casos de aspergiloma. En la enfermedad invasiva, si es crónica, pueden detectarse pocas líneas de precipitación. Sin embargo, en el caso agudo, fulminante de la aspergilosis invasiva, con defectos en el sistema inmune en el cual no se producen anticuerpos, la prueba de inmunodifusión es muchas veces negativa (42).

La técnica de CIE presenta ventajas sobre la técnica de IDG por ser más sensible, obtenerse resultados rápidos y el de utilizar pequeños volúmenes de reactivos (34).

La técnica de aglutinación de partículas inertes utilizando

latex para detectar anticuerpos de *Aspergillus*, ha sido también utilizada. En general, los títulos bajos de anticuerpos se encuentran en sujetos sanos y niveles aumentados en pacientes con infección probada.

La fijación de complemento es una de las primeras técnicas que se utilizaron para el diagnóstico serológico de este padecimiento. Algunos autores mencionan ventajas con esta metodología comparada con otras, pero no es evidente (34).

Entre los diferentes trabajos sobre la eficiencia de las pruebas serológicas para el diagnóstico de esta enfermedad, se encuentra el de Drounet y cols. (9) quienes realizaron la técnica de inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos y encontraron títulos altos de inmunofluorescencia (1:40 - 1:320) en 130 sueros de pacientes con aspergilosis, comparados con títulos de 1:10 - 1:20 en controles sanos. Títulos similares han sido informados por Warnock (50) quien concluyó que se debe poner mayor atención a esta técnica, ya que una de las dificultades que presenta es la preparación del antígeno apropiado. Origina una mayor sensibilidad que las pruebas de precipitación, pero menor especificidad.

Los primeros informes utilizando la técnica de ELISA para la aspergilosis fueron los de Hommel y cols. (22) pero no ha sido bien desarrollada hasta la fecha.

Por último, también se han realizado diferentes procedimientos como CIE (51) y ELISA (48) para buscar antígenos en muestras biológicas del paciente, sobre todo en aquellos casos de aspergilosis invasiva o diseminada.

De fundamental importancia para la realización de todas

Estas pruebas serológicas, es la caracterización de los antígenos que deben utilizarse. En este sentido, existen diferentes trabajos. Se ha observado que para obtener un buen antígeno fungino, deben de tomarse en cuenta diferentes parámetros como son: el origen de las cepas, las condiciones de cultivo, el medio de cultivo, la fase de crecimiento del hongo, etc (2).

Entre los diferentes trabajos sobre obtención y caracterización de antígenos de *Aspergillus* se encuentra el de Longbottom y Pepys (3), quienes usaron filtrados de cultivo de *A. fumigatus* en medio de Sabouraud con glucosa o medio Caspary, en varios tiempos, a diferentes temperaturas y en condiciones estáticas o en agitación. Los filtrados fueron evaluados con la técnica de ID₅₀. Con los preparados en condiciones estáticas o en agitación se obtuvieron buenos resultados en cualquiera de los dos medios a 37 °C. El contenido óptimo de antígenos lo obtuvieron a las 3 - 5 semanas de incubación del hongo. Kim y Chaparral (4-7) compararon la producción de antígenos de *A. fumigatus* en tres medios de cultivo definidos incubados a 37 °C en agitación. Ellos obtuvieron el mejor antígeno en el medio de Long con asparagina de 4 días de incubación. Estos mismos autores han comparado las reactividades de preparados comerciales y los obtenidos por ellos. Utilizaron 66 sueros de pacientes con aspergilloma broncopulmonar alérgico, aspergilosis invasiva y aspergilosis no confirmada. Encontraron que la inmunoelectroforesis en cometa es más sensible que la inmunodifusión en dos dimensiones. Asimismo observaron que los extractos de micelio joven fueron más efectivos y produjeron mayor número de bandas de precipitación. De Magaldi y cols (7,8)

estudiaron las reactividades de 13 antígenos preparados a partir de 4 especies de *Aspergillus*, por medio de la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes y ELISA. En la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA), no se presentaron reacciones cruzadas entre *A. fumigatus* y los sueros de 28 pacientes con candidosis, coccidioidomicosis, criptococosis, histoplasmosis, paracoccidioidomicosis y nocardiosis. Las sensibilidades de la prueba de IFA fueron de 94% para los pacientes con aspergiloma y de 83% para los pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica (7). En otros trabajos (8), estos mismos autores prepararon antígenos somáticos (miceliales) y metabólicos (filtrado de cultivo) de *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* y *A. terreus* y los probaron, por medio de la inmunoelectroforesis, en sueros de pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA) y aspergiloma, así como de animales inmunizados. El número de líneas de precipitación observadas en los sueros humanos fue similar para las preparaciones somáticas y metabólicas de *A. fumigatus*, pero el número de bandas se elevó hasta 33 cuando ambos tipos de antígenos fueron probados simultáneamente (8).

Un factor que debe tomarse en cuenta, es la reactividad inespecífica de un polisacárido (sustancia C) que producen los *Aspergillus* y que se asocia con la presencia de la proteína C reactiva en los sueros de pacientes. En los trabajos de Longbottom y Pepys (32), investigaron que el polisacárido sustancia C aparece en filtrados de cultivo después de 6 a 7 semanas a 37 °C pero puede presentarse antes en el micelio. La frecuencia de la aparición de la sustancia C es aparentemente variable, puede

presentarse a las tres y aumentar a los 6 semanas. La sustancia que fue identificada en *A. fumigatus*, *Geotrichum floccosum* y en la defactomenana peptidica de *Trichophyton mentagrophytes* (141, Mishra y cols. 1971) obtuvieron por las reacciones fijas positivas con la proteína L reactiva. Esto lo asociaron a la presencia de citrato de sodio en el medio de cultivo para la producción del antígeno y al regulador de citrato de sodio usado en la inmunodifusión.

Por otro lado, Iran Van Dy y cols. (45-48) estudiaron las actividades enzimáticas de componentes antigénicos en *Aspergillus gillus*, encontrando dos actividades enzimáticas específicas: dos quimi tripsinas y una catalasa que se presentan con una alta especificidad, pudiendo ser un auxiliar para realizar un diagnóstico específico. La quimi tripsina la encontraron en un 96% y la catalasa en 97% en pacientes con aspergilosis pulmonar. Estas actividades enzimáticas las estudiaron en los arcos de precipitación de la técnica de inmunoelectroforesis y en IIF.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Teniendo en cuenta la gran variabilidad en cuanto a la metodología para la obtención de antígenos de Aspergillus, así como las diferencias en los resultados obtenidos con ellos en las pruebas serológicas y la dificultad que se presenta al realizar el diagnóstico de micosis oportunistas como ocurre con la aspergilosis, es importante realizar un modelo para estandarizar las condiciones de obtención de antígenos de Aspergillus en diferentes fases de crecimiento, tratando de obtener las condiciones óptimas de producción y actividad biológica, en las diferentes pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la aspergilosis.

HIPOTESIS

Los antígenos óptimos de *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* serán aquellos obtenidos al final de la fase logarítmica o al principio de la fase estacionaria de crecimiento del hongo, los que desarrollan mejor actividad inmune y los que presentan menor grado de cruce inmune con sueros de otras micosis.

OBJETIVOS.

1. Obtener antígenos para el diagnóstico inmunológico de la aspergilosis.
2. Determinar las condiciones óptimas de producción y actividad antigénica de diferentes tipos de antígenos (metabólicos, polisacáridos y citoplasmáticos) de *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus*.
3. Comparar la actividad inmunológica de los antígenos obtenidos en las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento de los hongos.
4. Determinar la presencia de quimi tripsina y catalasa en las preparaciones antigénicas obtenidas.

MATERIALES Y METODOS

1) Hongos:

- A. fumigatus EH 149
- A. niger EH 23
- A. flavus EH 24

Los numeros de las cepas corresponden a aquellos del cepario del Departamento de Ecologia Humana, Facultad de Medicina, UNAM.

2) Medios de Cultivo:

Los medios de cultivo utilizados en el mantenimiento de las cepas y produccion de los antigenos de este trabajo son los siguientes:

A. Medio de Sabouraud (Bioxon, Mexico). Se utilizo en el mantenimiento de la cepas.

Dextrosa	40 g
Peptona de carne	10 g
Agar	10 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

pH 5.6

B. Medio de Smith (43), se utilizó para la obtención de todos los antígenos estudiados así como para las curvas de crecimiento de las tres cepas.

Citrato ferrico (anhidro)	0.03	g
Fosfato dibásico de potasio	1.31	g
Citrato de sodio (anhidro)	0.40	g
Sulfato de magnesio heptahidratado	1.50	g
Dextrosa (anhidro)	7.0	g
Glicerina	25.6	ml
Asparagina	14.0	g
Cloruro de amonio (anhidro)	7.0	g
Agua destilada C.B.P.	1000	ml

pH 7.2 - 7.4

3) Condiciones de Cultivo.

El inóculo de los matraces con medio de Smith consistió en 200 mg de peso húmedo del hongo para 200 ml de medio en matraces de 1000 ml. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 30 °C en agitación.

4) Curvas de Crecimiento.

El crecimiento del hongo se determinó por medio del consumo de glucosa en el medio de cultivo. Se tomaron muestras diarias

por triplicado de los matraces inoculados en las condiciones descritas con anterioridad. Las muestras fueron filtradas con membranas Millipore (0.22 μ m). La cantidad de glucosa en el medio de cultivo se determinó por el método de la orto-toluidina (6). Se utilizó una solución al 5% de orto-toluidina (titourea (Merck) 3.0 g, o-toluidina (Sigma) 5.0 ml, ácido acético glacial (Merck) 100 ml) la cual fue agregada (3 ml) a 1 ml del filtrado. La coloración resultante fue leída a 630 - 635 nm.

Se hicieron curvas de crecimiento (por triplicado) de cada especie fungica y se obtuvieron las fases logarítmicas y estacionarias de crecimiento.

5) Obtención de Antígenos (Fig 2).

Se obtuvieron tres tipos de antígenos de cada especie: metabólico, polisacárido y citoplásmico. Los 3 tipos de antígenos fueron obtenidos en dos fases de crecimiento del hongo: logarítmica y estacionaria a los 2, 4, y 15 días para *A. fumigatus*, y 4, 8 y 15 días para *A. niger* y *A. flavus*.

Antígeno Metabólico.

El antígeno metabólico se obtuvo a partir del filtrado de cultivo según Mishra y cols. (37). La masa micelial se separó utilizando papel filtro Whatman No. 40 y luego se procedió a diferentes filtraciones con membranas de Millipore (8.0, 0.8 y 0.45 μ m). Después se dializó el filtrado y se concentró 10 veces por medio de ultrafiltración con equipo Amicon, utilizando membrana PM 10 (Amicon). Se determinó la concentración de proteínas

por el método de Lowry (13) y carbohidratos por el método de Dubois y cols. (10).

Obtención de Antígeno Polisacárido.

Este antígeno se obtuvo a partir del filtrado de cultivo concentrado (antígeno metabólico), según la técnica modificada de Harrell y cols. (13). El concentrado del filtrado se precipitó con 2 volúmenes de acetona gota a gota, en frío. Luego se dejó en refrigeración por 24 h. Se centrifugó (3500 x g por 20 min) y el precipitado se disolvió en agua destilada y se reprecipitó con alcohol al 90% (V/V). Esta operación se repitió 3 veces. Se eliminó la acetona del precipitado final por desecación y se determinaron proteínas (13) y carbohidratos (10).

Obtención de Antígeno Citoplásmico.

El antígeno citoplásmico se obtuvo a partir del micelio. Al cabo del tiempo de incubación antes descrito se adicionó a los cultivos, timerosal al 0.05% (Lilly) por 24 h. La masa micelial fue obtenida por filtración. Luego se procedió al rompimiento celular por presión. Se utilizaron 700 mg de micelio de peso húmedo en 100 ml de amortiguador de fosfatos (cloruro de sodio 8.0 g, fosfato de potasio monobásico 0.2 g, fosfato de sodio dibásico 2.9 g, cloruro de potasio 0.2 g, pH 7.2, aforar a 1000 ml con agua bidestilada) y se pasó por el fraccionador Ribi a 40,000 psi de presión durante 2 seg. repitiendo esta operación tres veces. Al comprobar el 90% de lisis celular, se centrifugó a

64.000 g durante 20 min. despues se dializo y se concentro 10 veces por ultrafiltracion con Amicon, utilizando membrana PM 10 (Amicon). Este concentrado se utilizo como antigeno citoplasmico. Se le determino el contenido proteico (30) y de carbohidratos (10).

6) Metodos Inmunologicos .

a) Obtencion de Sueros Hiperinmunes.

Para obtener sueros hiperinmunes anti-*G. fumigatus*, anti-*G. bisetii* y anti-*G. flavus* y probar en ellos los antigenos obtenidos, se utilizaron conejos hembras Nueva Zelanda de 3 k. Para inmunizacion se utilizo antigeno metabolico con un contenido de 4000 µg/ml de carbohidratos (13). Se inoculo 1 ml del antigeno con adyuvante incompleto de Freud (1:1) por via intramuscular los dias 1, 2 y 3. Los dias 10 y 17 se inoculo intravenosamente 0.5 ml del antigeno solamente. Al dia 24 se realizo una sangria de prueba. Se dejo una semana y se volvio a repetir el mismo esquema de inmunizacion al cabo del cual, se sangro el conejo a blanco. Se separo el suero y se conservo en alícuotas en nitrogeno liquido.

b) Sueros Humanos.

Para la observacion de reacciones cruzadas con los antigenos de prueba, se utilizaron sueros provenientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la S.S. pacientes con histoplasmosis, coccidiomicosis, candidosis y esporotricosis.

c) Prueba de Inmunodifusión en gel.

Las pruebas de IDG se realizaron según la técnica de Ouchterlony (38) para la cual se utilizó una solución de agar (agarosa 1 g, azida de sodio 0.01 g, cloruro de sodio 0.85 g, glicina 7.5 g, agua destilada c.b.p. 100 ml, pH 7.2-7.4). En cada portaobjetos con la capa de agarosa, se realizó un diseño que consistió en perforar un pozo central y 6 laterales de 3-4 mm de diámetro. El suero fue colocado en el pozo central y preincubado 15 min a temperatura ambiente. Los antígenos de prueba se colocaron alrededor del pozo central. Los portaobjetos con los sueros y antígenos de prueba fueron incubados en cámara húmeda 24 o 48 h a 4°C. Luego se lavaron con citrato de sodio al 5% por dos días y con solución salina por 24 h, cambiando la solución varias veces. Se secaron y se tiñeron con solución de negro amido (Negro amido 1 g, ácido acético glacial 1 M 40 ml, acetato de sodio 0.1 M 450 ml, glicerol 100 ml) durante 1 min, decolorando con una solución de ácido acético al 5%.

d) Contraelectroforesis.

La CIE se llevó a cabo con solución amortiguadora de veronal (Sigma) pH 8.8. Para el gel se utilizó el mismo amortiguador adicionado de azida de sodio al 0.01% y agarosa al 1%. La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA por placa de 8.3 cm x 10.2 cm durante 45 min (39) y las placas se lavaron y tiñeron como lo descrito para la IDG.

7) Métodos Inmunoenzimáticos.

Estas pruebas se realizaron según la técnica empleada por Uriel y cols. (49) y Iran Van Ey y cols. (45-48) en las bandas de precipitación obtenidas en la IDG y CIE. La determinación de la actividad de la catalasa se realizó utilizando una solución de peróxido de hidrógeno al 50%. Las placas de IDG y CIE con arcos de precipitación específicos se sumergieron durante 15 min en esta solución. La presencia de burbujas, señalando la liberación de oxígeno ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalasa}} 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2^{\uparrow}$) demuestra la reactividad positiva.

La determinación de la actividad de la quimiotripsina se llevo a cabo utilizando una solución del sustrato de la quimiotripsina (2 mg de N-benzoni-L-tirosina) disuelto en dimetilformamida (2 ml); y una solución de Diazo Blue B (15 mg en 20 ml de amortiguador TRIS-HCl pH 7.5 (7.5 g de TRIS hidroximetil metilamino, 4.97 g de cloruro de sodio, 950 ml de agua destilada, adicionar HCl 2 M para pH 7.5 y diluir con agua a 1000 ml). Las placas de IDG y CIE se sumergieron en esta mezcla durante 8 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con solución de ácido acético glacial al 5% durante 30 min. La presencia de color violeta en las bandas de precipitación se considera como una reacción positiva.

RESULTADOS

De las tres especies estudiadas, la cepa de Aspergillus fumigatus fue la que creció más rápidamente. Los antígenos fueron obtenidos al principio (2 y 4 días) y final (8 días) de la fase logarítmica, así como en la fase estacionaria (15 días) de crecimiento como puede observarse en la curva de crecimiento de la figura 3. Las cepas de A. flavus y A. niger (Fig. 3) crecieron más lentamente por lo que se obtuvieron antígenos a los 4, 8 y 15 días de incubación correspondiendo a las mismas fases de crecimiento de los antígenos de la cepa de A. fumigatus.

Se procedió a la obtención de tres tipos de antígenos (metabólicos, polisacáridos y citoplasmáticos) de cada una de las especies estudiadas y se observó que la mayor concentración de carbohidratos, se encontró en la fase estacionaria de crecimiento para las tres cepas, siendo que los antígenos metabólicos presentaron el mayor porcentaje. Con respecto a los resultados obtenidos en cuanto a las concentraciones de proteína, se observó el mismo comportamiento, es decir, la mayor concentración de proteína se obtuvo a los 15 días de crecimiento (Tabla 1) y en los antígenos metabólicos, para las tres especies de Aspergillus estudiadas, el pico máximo siempre correspondió a los 15 días de crecimiento. Los antígenos polisacáridos fueron los que presentaron menor concentración de proteína.

El rendimiento de los antígenos con respecto al volumen

inicial del cultivo (200 ml) para los antígenos metabólicos fue de 14%, los antígenos polisacáridos 10% y los antígenos citoplásmicos 1.7%.

Al ensayar las diferentes preparaciones antigénicas (metabólicas, polisacáridas y citoplásmicas) en las pruebas de ID₅₀ y CIE, con los sueros hiperinmunes de conejo, se observó que el mayor número de bandas correspondió a los antígenos obtenidos de la fase estacionaria (15 días) de crecimiento para las tres especies estudiadas de *Aspergillus*. Sin embargo, desde el inicio de la fase logarítmica (2 días), puede observarse reactividad en todos los antígenos frente al suero homólogo en las dos pruebas utilizadas (Tabla 2).

Al ensayar la reactividad cruzada entre los antígenos metabólicos, polisacáridos y citoplásmicos de 15 días de las tres especies de *Aspergillus*, se observaron algunas reacciones cruzadas frente a los sueros hiperinmunes de conejo. En la figura 4 se pueden observar la ID₅₀ de los antígenos estudiados con los sueros hiperinmunes de conejo. En la figura 4 I se pueden observar los antígenos metabólicos. En el primer diseño se colocó el suero hiperinmune anti-*A. fumigatus* (a) en donde se observó reacción específica con su antígeno homólogo (1) y reacción cruzada con el antígeno de *A. flavus* (3). En el segundo diseño el suero anti-*A. niger* (b) reaccionó con su antígeno homólogo (2) solamente. En el tercer diseño el suero anti-*A. flavus* (c) reaccionó con su antígeno homólogo (3) y presentó además reactividad cruzada con el antígeno de *A. fumigatus* (1). En el caso de los antígenos polisacáridos (Fig 4 II) se presentó reactividad solamente con

los sueros hiperinmunes homologos y no se observaron reactividades cruzadas. Los antigenos citoplasmicos (Fig 4-III) de *A. fumigatus* (1) y *A. niger* (2) presentaron reactividad con los respectivos sueros homologos (a y b) y el antigeno de *A. fumigatus* (1) presento reactividad cruzada con el suero anti-*A. flavus* (3).

Los resultados en cuanto a la reactividad cruzada utilizando las pruebas de IDG y CIE, utilizando todos los antigenos frente a sueros de pacientes con histoplasmosis, coccidiomicosis, candidosis y esporotricosis, se muestran en la tabla 3. Se observo que los unicos antigenos que presentaron reaccion cruzada fueron los metabolicos de *A. fumigatus* y *A. flavus* obtenidos de la fase estacionaria de crecimiento. De estas reacciones la mayoria se obtuvo utilizando la prueba de IDG. El cruce inmune de *A. fumigatus* se manifesto con sueros de pacientes histoplasmosos, utilizando la prueba de CIE y con sueros de pacientes candidosos (IDG), mientras que con el antigeno de *A. flavus* se observo cruce inmune con los 4 sueros de pacientes con las diferentes micosis (Tabla 3).

Los resultados de la actividad de catalasa en precipitados inmunes (IDG y CIE) se muestran en la tabla 4. Se observo esta actividad enzimatica solamente en los antigenos citoplasmicos de *A. fumigatus* y *A. niger*. En los antigenos de *A. fumigatus* solo se observo en los obtenidos a los 15 dias de incubacion, mientras que con el antigenos de *A. niger* se pudo comprobar la actividad de la enzima en los tres dias de obtencion del antigeno (4, 8 y

15 días.

A pesar de que se trató de demostrar la actividad de la amilotripsina en los precipitados inmunes en repetidas ocasiones, no se pudo poner de manifiesto en ninguno de los antígenos estudiados.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las pruebas inmunológicas utilizadas en el diagnóstico serológico de la aspergilosis, requieren de antígenos específicos y reactivos para su realización. Mackenzie y cols. (35) enfatizan la importancia de estandarizar los antígenos de *Aspergillus*, ya que en ellos existe un amplio rango de macromoléculas complejas, muchas de las cuales son antigénicas. Estos antígenos pueden ser obtenidos de micelio, de pared celular, de componentes citoplasmáticos o de productos metabólicos segregados al medio de cultivo. Estos últimos han sido utilizados en las pruebas inmunes. Sin embargo, constituyen una mezcla heterogénea, con componentes de pared celular y sustancias extracelulares segregadas de la autólisis de la célula fúngica, lo que ocasiona una amplia variabilidad en cuanto a la reactividad antigénica.

Tomando en cuenta todos los factores que son importantes para la obtención de antígenos, en este trabajo se utilizó el medio de Smith con asparagina, que es un medio sintético donde *Aspergillus* crece bien, además de condiciones de agitación lo cual redundó en una mayor producción de antígeno (23). Se utilizó 30 °C como temperatura de incubación, ya que Huppert (23) describe esta temperatura como la óptima para obtener antígenos de hongos miceliales patógenos con mejores resultados.

Teniendo en cuenta los diversos trabajos (24-27,29, 30, 37) realizados sobre el tiempo de incubación óptimo para la obtención de mejor antígeno, se probaron diferentes periodos de incubación en este estudio. La mejor reactividad en las pruebas

de IUG y CIE para los tres tipos de antígenos. Siempre se obtuvo a los 15 días de incubación de los hongos. La concentración de los carbohidratos totales no varió críticamente en los antígenos obtenidos a los 2, 4, 8 y 15 días, sin embargo, las proteínas sí aumentaron a los 15 días de incubación en las condiciones que se establecieron para este trabajo. Fiu y Chaparaz (24-27) obtienen antígenos citoplasmáticos miceliales purificados de *G. fumigatus* a los 4 días de incubación a 37 °C, utilizando un medio sintético con asparagina e informan que el mayor contenido de proteínas y carbohidratos lo obtienen a los 4 días de incubación. Esta diferencia pudiera ser debida a la variación de temperaturas de incubación utilizadas, así como a la diversidad en cuanto a los medios de cultivo y la procedencia u origen de las cepas utilizadas.

Por otro lado, diversos investigadores obtienen antígenos en diferentes condiciones de cultivo. Hearn y cols. (14-20) aíslan antígenos a los 3 días de incubación, Kurup y cols. (29, 30) los obtienen a los 5 días de incubación a 37 °C en agitación y Mishra y cols. (37) en condiciones estáticas después de 6 semanas de cultivo, obteniendo todos resultados variables. Esto demuestra la gran variabilidad en cuanto a las condiciones de obtención de antígenos y por consiguiente, la poca uniformidad entre ellos.

Para lograr una mejor estandarización en cuanto a las condiciones de cultivo, se realizaron curvas de crecimiento de las tres especies de *Aspergillus* estudiadas, y se obtuvieron antígenos a partir de la fase logarítmica y estacionaria de crecimiento

de los hongos estudiados, ya que resultados de diversos investigadores (14, 29, 30) coinciden en la obtención de buenos antígenos con menor tiempo de incubación. Teniendo en cuenta que en los cultivos de más de tres semanas, Aspergillus produce carbohidrato C y que este componente reacciona con la proteína C reactiva presente en el suero humano, (la cual se encuentra aumentada en muchos padecimientos infecciosos y da resultados falsos positivos en las pruebas serológicas (32)), solo se obtuvieron antígenos antes de tres semanas para evitar así reacciones inespecíficas debidas a la reacción carbohidrato C-proteína C reactiva.

Con respecto al estudio de la reactividad cruzada que presentan los antígenos de Aspergillus, existen diferentes trabajos. Hessian y cols. (21) realizaron el perfil antigenico de 10 mucorales, Candida albicans y A. fumigatus. Estos fueron comparados por inmunolectroforesis cruzada, donde demostraron poca o nula reactividad entre los extractos de C. albicans y A. fumigatus y los sueros hiperinmunes de mucorales estudiados. Barreto-Bergter y cols. (4) realizaron los estudios de constituyentes celulares de micelio y conidias de A. fumigatus y encontraron que la estructura D-galacto-D-manana aislada de A. fumigatus, no presentó reacción cruzada con sueros hiperinmunes anti-H. capsulatum y anti-P. brasiliensis. Estos autores sugirieron que probablemente estos dos últimos hongos, presentan una fracción antigenica con una actividad serológica diferente a aquella presentada por la D-galacto-D-manana de Aspergillus. En nuestro trabajo sólo presentaron reactividad cruzada con sueros humanos de pacientes con histoplasmosis y candidosis los antígenos metabólicos de A. fumigatus y A.

flavus obtenidos de la fase estacionaria de crecimiento (15 días). Este antígeno crudo representa una mezcla de fracciones antigénicas que probablemente algunas de ellas, puedan ser compartidas por otros hongos similares en cuanto a su composición química (3). Al precipitar este antígeno crudo por medio de la precipitación con alcohol-acetona, la reactividad cruzada ya no se presenta como puede observarse en la tabla 3. En el caso de los antígenos citoplásmicos estudiados, no se observó reactividad cruzada presentando estos una mayor especificidad.

La aspergilosis es causada por diversas especies de Aspergillus, pero la que se presenta con mayor frecuencia es A. fumigatus. Por esto, las pruebas serológicas se realizan principalmente con antígenos de A. fumigatus. En este trabajo se llevaron a cabo pruebas cruzadas para valorar la capacidad de los antígenos de A. fumigatus, de poder detectar anticuerpos en contra de las otras dos especies de Aspergillus causantes de la enfermedad. Los resultados obtenidos con los antígenos metabólicos con sueros hiperinmunes de conejo demuestran que se comparten componentes antigénicos entre A. fumigatus y A. flavus. Sin embargo no se presentó reactividad cruzada con A. niger. Al igual que Longbottom y Pepys (32), se sugiere la utilización de mezclas de antígenos de las tres especies de Aspergillus, para realizar las pruebas serológicas de diagnóstico y poder ampliar el rango de detección de la micosis.

En el trabajo de Hearn y cols. (20) se hace evidente la gran variabilidad en cuanto a la reactividad de los diferentes antígenos y métodos utilizados en su extracción. Esto confirma la

necesidad de estandarizar los antígenos para obtener resultados confiables, independientemente de los métodos empleados. Para poder llegar a esto, sería conveniente contar con marcadores para evaluar los antígenos obtenidos. Un método adecuado serían las enzimas quimiotripsina y catalasa que se presentan en los sueros de pacientes con aspergilosis en un alto porcentaje (45-48). Por lo tanto, en nuestro trabajo se trató de poner de manifiesto estas dos enzimas para una evaluación de los antígenos obtenidos. Para llevarlo a cabo, se utilizaron las preparaciones de antígenos aisladas. Solamente se logró demostrar la presencia de la enzima catalasa en los antígenos citoplásmicos, mientras que la quimiotripsina no fue demostrable. En los trabajos de Tran Van ky y cols. (44-47) realizaron la obtención del suero hiperinmune utilizando dos antígenos, uno obtenido a partir del filtrado de cultivo y el otro citoplásmico. Se podría pensar que el resultado negativo de este trabajo en cuanto a esta enzima, pudiera ser debido a que la inmunización de los conejos se realizó con el filtrado del cultivo y no con el micelio, dando lugar a que el conejo no manifestara respuesta a esta enzima. Por otro lado, no se realizaron pruebas de IDG y CIE con nuestros antígenos en sueros de pacientes con aspergilosis, donde probablemente podría manifestarse esta actividad enzimática.

Los resultados de este trabajo con cepas mexicanas, sugieren que los mejores antígenos de *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus* se obtienen de la fase estacionaria (15 días) de crecimiento en donde se obtuvieron mayores concentraciones de proteínas y carbohidratos en los tres tipos de antígenos (metabólicos, polisacari-

dos y citoplásmicos), siendo que los antígenos citoplásmicos serían los óptimos para el diagnóstico serológico de la aspergilosis, ya que no presentaron reacciones cruzadas frente a sueros de otros padecimientos micológicos y en los cuales se presentó la actividad de la catalasa desde el inicio de la fase logarítmica de crecimiento.

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1. Concentracion de carbohidratos y proteinas en Antigenos de Aspergillus.
- TABLA 2. Inmunodifusion y contraimmunoelectroforesis de 105 diferentes antigenos con sueros hiperinmunes de conejos diferentes tiempos de Incubacion.
- TABLA 3. Reacciones cruzadas encontradas en los antigenos de Aspergillus con sueros hiperinmunes de conejo diferentes tiempos de incubacion
- TABLA 4. Presencia de catalasa en antigenos de Aspergillus.

TABLA 1.
CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS Y PROTEINAS EN ANTIGENOS DE ASPERGILLUS

ANTIGENOS Y HONGOS	DIAS DE OBTENCION	PROTEINAS mg/ml	CARBOHIDRATOS mg/ml
<u>Antigenos metabolicos</u>			
<u>Aspergillus fumigatus</u>	2	1861	4413
	4	3925	4379
	15	6442	4815
<u>A.niger</u>	4	1415	3396
	8	1305	3353
	15	4141	3319
<u>A.flavus</u>	4	3659	2813
	8	4740	3406
	15	6097	4526
<u>ANTIGENOS POLISACARIDOS</u>			
<u>Aspergillus fumigatus</u>	2	50	136
	4	50	192
	15	270	263
<u>A.niger</u>	4	39	154
	8	72	170
	15	77	176
<u>A.flavus</u>	4	20	72
	6	55	76
	15	163	103
<u>ANTIGENOS CITOPLASMICOS</u>			
<u>Aspergillus fumigatus</u>	2	320	234
	4	449	410
	15	553	493
<u>A.niger</u>	4	341	292
	6	408	320
	15	510	342
<u>A.flavus</u>	4	352	409
	6	456	799
	15	615	873

 TABLA 2. INMUNODIFUSION Y CONTRAINMUNOELECTROFORESIS DE LOS DIFERENTES ANTIGENOS CON SUCROS
 HIPERINMUNES DE CONEJO A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION

ANTIGENOS METABOLICOS		INMUNODIFUSION	CONTRAINMUNOELECTROFORESIS
<u>Aspergillus fumigatus</u>	2 Dias	+	++
	4 Dias	+	++
	15 Dias	++	+++
<u>A.niger</u>	4 Dias	+	+
	8 Dias	+	++
	15 Dias	++	++
<u>A.flavus</u>	4 Dias	+	+
	8 Dias	++	++
	15 Dias	++	++
ANTIGENOS POLISACARIDOS			
<u>Aspergillus fumigatus</u>	2 Dias	+	+
	4 Dias	+	+
	15 Dias	++	++
<u>A.niger</u>	4 Dias	+	+
	8 Dias	+	+
	15 Dias	++	++
<u>A.flavus</u>	4 Dias	+	+
	8 Dias	++	++
	15 Dias	+++	+++
ANTIGENOS CITOPLASMICOS			
<u>Aspergillus fumigatus</u>	2 Dias	+	+
	4 Dias	+	++
	15 Dias	++	++
<u>A.niger</u>	4 Dias	+	++
	8 Dias	+	++
	15 Dias	++	+++
<u>A.flavus</u>	4 Dias	+	+
	8 Dias	+	+
	15 Dias	++	++
+ 1 BANDA		++ 2 BANDAS	+++ 3 BANDAS

TABLA 3. REACCIONES CRUZADAS ENCONTRADAS EN LOS ANTIGENOS DE ASPERGILLUS
 CON SUEROS DE OTRAS MICOSIS

ANTIGENOS	DÍAS DE OBTENCIÓN	Sueros de pacientes con				
		Histoplasmosis	Coccidioidomycosis	Cardiomyosis	Esperotricosis	
METABOLICOS						
<u>A. fumigatus</u>	2	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	15	+ (CIE)	-	-	+ (IDG)	-
<u>A. niger</u>	4	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-
<u>A. flavus</u>	4	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	15	+ (IDG)	+ (IDG)	+ (IDG)	+ (IDG)	+ (IDG)
POLISACARIDOS						
<u>A. fumigatus</u>	2	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-
<u>A. niger</u>	4	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-
<u>A. flavus</u>	4	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-
CITOPLASMICOS						
<u>A. fumigatus</u>	2	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-
<u>A. niger</u>	4	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-
<u>A. flavus</u>	4	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-

 TABLA 4. PRESENCIA DE CATALASA EN ANTIGENOS DE ASPERGILLUS

TIPO DE ANTIGENO DIAS DE OBTENCION ACTIVIDAD DE CATALASA

 METABOLICOS

<u>Aspergillus fumigatus</u>	2	-
	4	-
	15	-
<u>A. niger</u>	4	-
	8	-
	15	-
<u>A. flavus</u>	4	-
	8	-
	15	-

 POLISACARIDOS

<u>Aspergillus fumigatus</u>	2	-
	4	-
	15	-
<u>A. niger</u>	4	-
	8	-
	15	-
<u>A. flavus</u>	4	-
	8	-
	15	-

 CITOPLASMICOS

<u>Aspergillus fumigatus</u>	2	-
	4	-
	15	+
<u>A. niger</u>	4	+
	8	+
	15	+
<u>A. flavus</u>	4	-
	8	-
	15	-

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental para la obtención de antígenos de *Aspergillus*.

Figura 2. Obtención de antígenos

Figura 3. Curvas de crecimiento de *Aspergillus fumigatus*,
A. niger y *A. flavus*.

Figura 4. IFA de los antígenos metabólicos (I), polisacáridos (II) y citoplasmáticos (III) con los sueros hiperinmunes de conejo anti-*A. fumigatus* (a), anti-*A. niger* (b) y anti-*A. flavus*.

1= antígenos de *A. fumigatus*.

2= antígenos de *A. niger*.

3= antígenos de *A. flavus*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

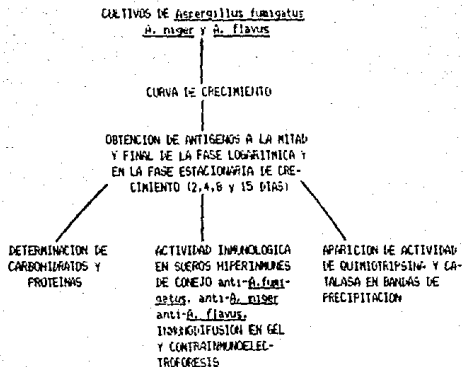


FIGURA 1. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCION DE ANTIGENOS DE ASPERGILLUS

OBTENCION DE ANTIGENOS

Cultivo de *Aspergillus* en medio Smith en agitacion a 300 C

4, 6 y 15 dias (A. *flavus* y *A. niger*)

2, 4 y 10 dias (A. *fumigatus*)

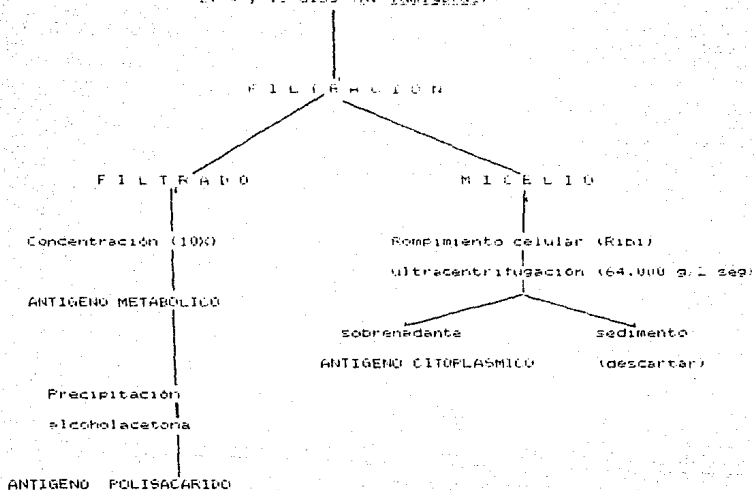
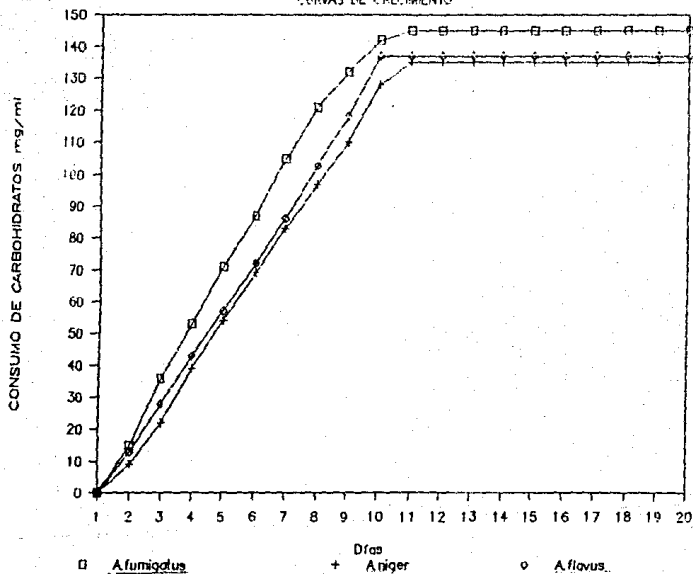


Figura 2. Obtencion de antígenos.

FIGURA 3
CURVAS DE CRECIMIENTO



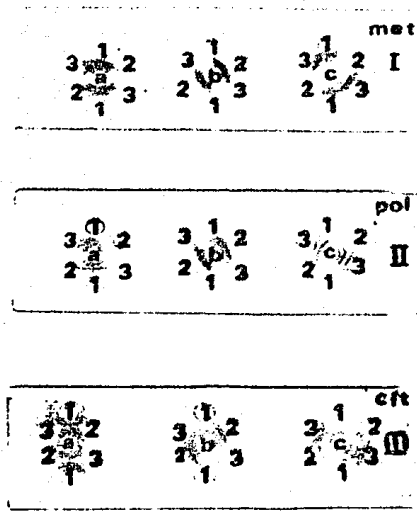


Figura 4. Inmunodifusión en gel de los antígenos metabólicos (I), polisacáridos (II) y citoplasmáticos (III) con los sueros hiperinmunes de conejo anti-A. fumigatus (a), anti-A. niger (b) y anti-A. flavus (c).

- 1= antígenos de A. fumigatus
- 2= antígenos de A. niger
- 3= Antígenos de A. flavus.

BIBLIOGRAFIA.

1. Alexopoulos CJ, Mims J. Introduccion a la micologia. Editorial Omega. Barcelona. 1985.
2. Arenas G, Toriello C. Actividad inmunologica de antigenos miceliares y levaduriformes de diferentes fases de crecimiento de *Sporothrix schenckii*. Rev Mex Med. 2: 131-144. 1986
3. Azuma I, Kanetsuna F, Tanaka Y, Yamamura Y, Carbonell J. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Pachysporidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. Mycopath Mycol Appl. 54: 111-125. 1974
4. Barreto-Bergter E, Gorin PAJ, Travassos RL. Cell constituents of mycelial and conidia of *Aspergillus fumigatus*. Carbohydr Res. 95: 205-218. 1981
5. Conant NF, Tilerson D. Micologia . Tercera edicion. Ed. Interamericana. Barcelona. 1972
6. Dawes RA, McGrill DJ, Midley M. Determination of glucose. In: Methods in Microbiology. Norris JR, Ribbons LW ed. Academic Press. Londres. 1971
7. De Magaldi SW, Mackenzie DWR. Specificity of antigen from pathogenic *Aspergillus* species. I. Studies with ELISA and immunofluorescence. Sabouraudia. 22: 381-394. 1984

8. De Magaldi SW, Mackenzie DWR. Specificity of antigens from pathogenic *Aspergillus* species. II. studies with line immunoelectrophoresis. Sabouraudia. 22: 395-402. 1964
9. Brounet E, Camey L, Segretain H. Valeur de l'immunoprécipitation et de l'immunofluorescence indirecte dans les aspergilloses bronchopulmonaires. Ann Inst Pasteur (Paris).123: 379-395. 1972
10. Dubois M, Giles LA, Hamilton JE, Rebers PA, Smith F. A colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 28: 350-356. 1956
11. Fernando SSE, Lauer GS. *Aspergillus fumigatus* infections of the optic nerve with mycotic arteritis of cerebral vessels. Histopathology. 6: 227-234. 1982
12. Hanlin RT, Ulloa M. Atlas of Introductory Mycology. 2nd Ed. Hunter. Textbooks Inc. Carolina del Norte. 1988
13. Harrell K, Ashworth H, Britt EM, George J R, Gray B, Green J H, Gross H, Johnson JE. Procedural manual for production of bacterial, fungal and parasitic reagents. 3rd Ed. Department of Health, Education, and welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, Georgia. 1976
14. Hearn VM, Mackenzie DWR. The preparation and chemical composition of fractions from *Aspergillus fumigatus* wall and protoplasts possessing antigenic activity. J Gen Microbiol. 112: 35-44. 1979
15. Hearn VM, Mackenzie DWR. The preparation and partial purification of fractions from mycelial fungi with antigenic activity. Mol Immunol. 17: 1097-1103. 1980
16. Hearn VM, Mackenzie DWR. Mycelial antigens from two strains

- of *Aspergillus fumigatus*. An analysis by two-dimensional immunoelectrophoresis. *Mykosen*. 23: 549-550. 1980.
17. Hearn VM, Wilson EV, Mackenzie DWR. The preparation of protoplasts from *Aspergillus fumigatus* mycelium. *Sabouraudia*. 18: 75-77. 1980.
 18. Hearn VM, Wilson EV. Preparation of *Aspergillus fumigatus* antigens and their analysis by two dimensional immunoelectrophoresis. *J Med Microbiol*. 13: 451-458. 1980.
 19. Hearn VM, Mackenzie DWR. Analysis of wall antigens of *Aspergillus fumigatus* by two dimensional immunoelectrophoresis. *J Med Microbiol*. 14: 119-129. 1981.
 20. Hearn VM, Wilson EV, Mackenzie DWR. *Aspergillus fumigatus* antigens used in the serodiagnosis of aspergillosis. *Zbl Bakt Hyg A*. 261: 496-502. 1986.
 21. Hessian PA, Smith JNB. Antigenic characterization of some potentially pathogenic Mucoraceous Fungi. *Sabouraudia*. 20: 209-216. 1982.
 22. Hommel M, Troung T, Klein BDE. Technique immuno-enzymatique (ELISA) appliquée au diagnostic sérologique des candidoses et aspergilloses humaines. *La Nouvelle Presse Medicale*. 41: 2789-2791. 1976
 23. Huppert M. Antigens used for measuring immunological reactivity. In: Howard DH, ed. *Fungi Pathogenic for humans and animals*. Part B. Pathogenicity and Detection: II Marcel Dekker, Inc. 219-301. 1983.
 24. Kim SJ, Chaparas SD. Characterization of antigens from *Aspergillus fumigatus*. I. Preparation of antigens from orga-

- nisms grown in completely synthetic medium. *Am Rev Resp Dis*. 118: 547-551. 1978.
25. Kim SJ, Chaparas SB. Characterization of antigens from *ASPERGILLUS FUMIGATUS*. II. Fractionation and electrophoretic, immunologic and biology activity. *Am Rev Resp Dis*. 718: 553-560. 1978.
 26. Kim SJ, Chaparas SB. Characterization of antigens from *ASPERGILLUS FUMIGATUS*. III. Comparison of antigenic relationships of clinically important aspergilli. *Am Rev Resp Dis*. 12: 1297-1303. 1979.
 27. Kim SJ, Chaparas SB and Buckley H. Characterization of antigens from *ASPERGILLUS FUMIGATUS*. IV. Evaluation of commercial and experimental preparations and fractions in the detection of antibody in aspergillosis. *Am Rev Resp Dis*. 129: 1305-1311. 1979.
 28. Koneman EW, Roberts DG. *Micología. Prácticas de Laboratorio*. 3rd edición. Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires. 1987.
 29. Kurup VP, Resnick A, Scribner GH, Kalbfleisch JH, Fink JN. Comparison of antigens and serological methods in *ASPERGILLUS FUMIGATUS* antibody detection. *Mykosen*. 27: 43-50. 1984
 30. Kurup VP, Ting EY, Fink JN. Immunochemical characterization of *ASPERGILLUS FUMIGATUS* antigens. *Infect Immun*. 41: 698-701. 1983
 31. Linck K. Todlinche Meningitis aspergiloma beim Menschen. *Virchows. Arc Pathol Ant*. 304: 408-412. 1939

32. Longbottom JL, Pappys J. Pulmonary aspergillosis: Diagnostic and Immunological significance of antigens and C-substance in ASPERGILLUS fumigatus. J Patho Bacteriol. 88: 141-151. 1964.
33. Lowry OH, Robebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with folin reagent. J Biol Chem. 193: 265-274. 1951.
34. Mackenzie DWR. Serodiagnosis. In: Howard DR, ed. Fungi pathogenic for humans and animals. Part B. Pathogenicity and Detection: II Marcel Dekker. Inc. Nueva York. 1983.
35. Mackenzie DWR, Wilson EV, Hearn VM. Standardization of ASPERGILLUS serodiagnostic reagent and procedures. In: JK. Prous (Ed). Proceedings of the X Congress of the International Society of Human and Animal Mycology. Barcelona 1988.
36. Milosev B, Mahgoub SG. Primary aspergilloma of paranasal sinuses in the Sudan. Br J Sudan. Br J Surg. 56: 132-137. 1969
37. Mishra SK, Saitb F, Rajendram C, Folkens U. Serodiagnostic value of culture filtrate antigens from aspergilli with septate phialides. Sabouraudia. 20: 63-74. 1982
38. Guchterlony O. Diffusion in gel methods from immunological analysis. II. In: P Kallos y BH Waksman, (eds.). Prog Allergy. VI. 1962
39. Palmer DF, Kaufman L, Kaplan W, Cavallaro JJ. Serodiagnosis of mycotic diseases. Albert Balows (ed). Georgia. 1977
40. Richardson MD, White LO, Warren RC. Detection of circulating antigen of ASPERGILLUS fumigatus in sera

- of mice and rabbits by enzyme-linked immunosorbent assay. Mycopathologia. 67: 83-88. 1979
41. Riddle KW. Fungal disease in Britain. Brit Med J. 2: 783-790. 1956
 42. Rippon JW. Medical Mycology. Saunders Company. Philadelphia. 1988.
 43. Smith CE, Sairo MT, Beard RR, Macadden RL, Wheat LCR, Eddie BV. Serological test in the diagnosis and prognosis of Coccidioidomycosis. Am J Hyg. 62: 1-21. 1950
 44. Tortello L, Rebora GF, Diaz GML, Taylor ML. Criterios para el diagnóstico de aspergilosis y candidosis sistémica. Rev Mex Mic. 217-225. 1986
 45. Tran VKP, Biguet J, Fruit J. Localisation et fréquence des arcs des Immunoélectrophorogrammes produit par le sérum des malades atteints de mycetomes aspergillaires appliqués contra l'antigène Aspergillus fumigatus. Rev Immunol. 30: 13-19. 1966
 46. Tran VKP, Uriel J, Rose F. Caractérisation de types d'activités enzymatiques dans des extraits antigéniques d' Aspergillus fumigatus après électrophorèse en agarosa. Ann Inst Pasteur. (Paris). 2: 161-170. 1966
 47. Tran VKP, Biguet J, Vaucelle I. Etude d'une fraction antigénique d' Aspergillus fumigatus support d'une activité catalasique de l'Aspergillose. Rev. Immunol (Paris). 32: 37-52. 1968
 48. Tran VKP, Biguet J, Vaucelle I, Fruit J. Analyse immunoelectrophoretique et caractérisation des activités

des extraits antigenique d'Aspergillus flavus.

Repercussion sur le diagnostic differentiel des
Aspergillois humaines. Sabouraudia, 9: 210-220. 1971

49. Uriel J. Characterization of enzymes in specific immune precipitates. Ann New York of Sci. 103: 956-977. 1963
50. Virchow R. Beitrage zur Lehre von den beim Menschen vorkommenden pflanzlichen parasiten Virchows. Arch Pathol Anta. 9: 557-593. 1959
51. Warnoch LW. Indirect immunofluorescence test for the detection of Aspergillus fumigatus antibody. J Clin Pathol. 27: 911-912. 1974
52. White LO, Richardson MD, Newham HC, Gibb E, Warren RC. Circulating antigen of Aspergillus fumigatus in cortisone treated mice challengend with Candida: detection by counterimmunoelectrophoresis. FEMS. Microbiol. 2: 155-156. 1977