

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

VÍCTOR TENORIO G.¹
ADRIANA VÁZQUEZ O.¹
ROBERTO A. CERVANTES O.¹
FRANCISCO J. TRIGO T.²

Se compararon diferentes métodos de producción de antígenos de *Aspergillus* para su posterior utilización en las pruebas de doble difusión y contraelectroforesis. Los antígenos fueron obtenidos a partir de tres especies distintas de *Aspergillus*: *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. oryzae*. El nombre dado a los distintos antígenos dependió del procedimiento empleado para su obtención, y teniendo así el *antígeno metabólico*, constituido únicamente por los productos metabólicos fungales; el *antígeno sonificado*, elaborado con los productos metabólicos del cultivo, más fracciones micóticas; el *antígeno congelado* obtenido por congelación y descongelación del medio de cultivo y el *antígeno micelial* producido por el crecimiento de los hongos en medio líquido, dejando al final únicamente los productos metabólicos. Dichos antígenos fueron probados con sueros hiperinmunes de conejos, los cuales habían sido previamente inoculados con suspensiones de esporas de las diferentes especies de *Aspergillus* ya mencionadas. Se concluyó que los antígenos metabólicos obtenidos de las diferentes especies de *Aspergillus* mostraron una mayor efectividad en la detección de anti-

cuerpos contra *Aspergillus*, en comparación con los otros antígenos, al ser probados con sueros de conejo hiperinmunes por medio de las pruebas de difusión en gel.

Las infecciones micóticas han sido tradicionalmente diagnosticadas por el aislamiento del agente causal; siendo ésta una práctica eficiente aunque requiere de tiempo y tiene el inconveniente de que en ocasiones es imposible llevar a cabo el muestreo de los tejidos afectados sobre todo en el caso de micosis profundas. Tratando de solucionar este problema los investigadores de Micología médica y Veterinaria han descrito una serie de métodos inmunológicos, que ayudan considerablemente al diagnóstico de estas micosis (Hart, Patterson and Sommers, 1976; Malo *et al.*, 1977). La respuesta inmunológica en Aspergilosis ha sido estudiada por diversos autores (Malo *et al.*, 1977; Pepys *et al.*, 1962), quienes demostraron que tanto reacciones de tipo celular, como humoral están involucrados en este padecimiento. Las inmunoglobulinas que están presentes en un mayor número son las IgG (Bardans, 1972), aunque cuando el proceso adquiera la modalidad alérgica, son las reagentes IgE las que al estar presentes ocasionan la sintomatología característica (Malo *et al.*, 1977). Sin lugar a dudas uno de los factores más importantes para el estudio de la inmunología en las micosis es la obtención de antígenos que puedan ser utilizados confiablemente en las pruebas, en este punto existen algunas discrepancias entre los autores sobre todo en los métodos de obtención y las especies

Recibido para su publicación, el 4 de julio de 1979.

¹ Departamento de Bacteriología y Micología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.R.H., Km. 15.5 Carretera México-Toluca, México 10, D.F.

² Departamento de Fisiopatología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.R.H., Km. 15.5 Carretera México-Toluca, México 10, D.F.

de *Aspergillus* que deben ser utilizados en las pruebas inmunológicas (Arbesman *et al.*, 1974; Correa *et al.*, 1975; Flyc y Scaly, 1975; Pepys *et al.*, 1959).

De las pruebas inmunológicas que se han ensayado hasta ahora, las pruebas de doble difusión en placa (Ouchterlong) y la contraelectroforesis (CIE), son las que al parecer han mostrado resultados más satisfactorios (Coleman and Kaufmon, 1972; Longbotton and Pepys, 1964).

En nuestro país desgraciadamente este tipo de enfermedades ha sido relegado a un segundo término y en la mayoría de los casos estas micosis no son detectadas debido quizás a que no existen antígenos adecuados para detectarlos, por esta razón los autores decidieron llevar a cabo el presente trabajo con el fin de obtener antígenos de cepas de *Aspergillus* aisladas en nuestro país, así como implementar las pruebas inmunológicas para poder evaluarlos, como un punto adicional se decidió que utilizando diversos tipos de extracción se podría contribuir al conocimiento sobre los métodos que deben de ser empleados para la obtención de los mencionados antígenos.

Las cepas utilizadas fueron *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. oryzae*, aisladas e identificadas de acuerdo con Fennel y Raper (1973), las cepas fueron mantenidas en cultivo puro en Sabouraud dextrosa Difco.*

El nombre dado a los diferentes antígenos correspondió al tipo de procedimiento empleado para su obtención.

Antígeno metabólico: Este se obtuvo al inocular el microorganismo en botellas de Roux que contenían 250 ml del medio Sabouraud dextrosa caldo, incubando las botellas en una estufa bacteriológica a 28 C por seis semanas, una vez transcurrido este tiempo el medio fue separado de la biomasa de una filtración a través de una membrana de asbesto (Seitz 0.1). El filtrado fue depositado en bolsas de diálisis (Visking 218/36) y dializado contra agua destilada durante 5 días a 4 C, con cambios de agua destilada cada 24 horas, finalmente, el dializado se esterilizó por medio de una filtración Millipore .22 (British Society for Mycopathology, 1976).

* Difco Laboratories, Detroit, Michigan.

Antígeno sonificado: El micelio y las esporas obtenidas mediante la filtración Seitz en el método anterior, fueron resuspendidos en una solución salina isotónica y sometidos a sonicación en un aparato MSE de ultrasonido a 12 micrones durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se separaron las partículas del micelio por medio de una filtración Seitz y fueron seguidos los procedimientos de dializado y esterilizado descritos en el método anterior.

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

Antígeno micelial: El micelio obtenido del crecimiento en medio sólido fue suspendido en una solución salina de Coca y posteriormente fue mantenido a 4°C durante 4 semanas con agitaciones periódicas. Una vez transcurrido este tiempo el micelio fue retirado por una filtración Seitz y el filtrado fue sometido a los procesos de dializado y esterilizado (Pepys *et al.*, 1959).

Por otra parte fue necesario llevar a cabo inoculación de conejos adultos raza Nueva Zelanda con suspensiones de esporas de los *Aspergillus* con el fin de obtener sueros hiperinmunes a las distintas especies utilizadas; para lo cual se formaron tres lotes de dos animales cada uno, los cuales recibieron en la primera semana una inoculación de *A. oryzae*, *A. flavus* y *A. fumigatus*, respectivamente, aunados a adyuvante completo de Freund. Subsecuentemente

* C.O. Jawsan, comunicación personal.

CUADRO 1

Resultados obtenidos en las pruebas doble difusión y contraimmunoelectroforesis con los distintos antígenos y con sueros de las conejas inoculadas con distintas especies de Aspergillus

Doble Difusión																
SUEROS DE CONEJO	Antígenos metabólicos				SUEROS DE CONEJO	Antígenos miceliarios			SUEROS DE CONEJO	Antígenos congelados			SUEROS DE CONEJO	Antígenos sonicados		
	1	2	3	control		1	2	3		1	2	3		1	2	3
	A	+	0	0		0	A	0		0	0	A		+	0	0
B	0	+	0	+	C	+	+	+	B	0	0	0	B	0	0	0
C	0	+	+	+	C	0	+	+	C	0	0	+	C	0	+++	0

Contraimmunoelectroforesis																
SUEROS DE CONEJO	Antígenos metabólicos				SUEROS DE CONEJO	Antígenos miceliarios			SUEROS DE CONEJO	Antígenos congelados			SUEROS DE CONEJO	Antígenos sonicados		
	1	2	3	control		1	2	3		1	2	3		1	2	3
	A	++++					A	0		++	0	A		0	0	0
B	0	+++	0	0	B	+++	0	0	B	0	+++	0	B	0	++	0
C			++++	+	C	0	0	+	C	0	0	.	C	0	0	0

en las siguientes tres semanas se repitió el esquema de inoculación descrito, sólo que utilizando adyuvante incompleto de Freund. La vía de inoculación en todos los casos fue la intramuscular, con una dosis de 1 ml.

Con el fin de poder evaluar los distintos antígenos obtenidos se montaron las técnicas serológicas de doble difusión contra inmunolectroforesis siguiendo los métodos descritos por la British Society for Mycopathology (1976), y comparándolos con un antígeno escocés proporcionado por la Dra. C.O. Dawson de la Universidad de Glasgow. Dicho antígeno fue obtenido por el método descrito como metabólico y la cepa usada fue *Aspergillus fumigatus* obtenida de un caso de aborto micótico, el antígeno escocés estaba esterilizado por lo que no existió peligro de que contuviera agentes de enfermedades exóticas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se encuentran resumidos en el Cuadro Nº 1 donde se puede apreciar que los antígenos obtenidos por el método denominado como metabólico fueron los que obtuvieron una mejor respuesta, cuando fueron probados con sueros de conejos inmunizados con la cepa de *Aspergillus* utilizada en la inmunización, esto concuerda con los hallazgos descritos por Pepys *et al.* (1959) quienes además encontraron que no todos los antígenos obtenidos de una sola cepa de *A. fumigatus* reaccionan contra todos los sueros positivos, por lo que sugieren que se obtengan antígenos de distintas cepas y se mezclen para evitar la presencia de falsos negativos en las pruebas de rutina. Los tres métodos de obtención (miceliales, congelados y sonificados) presentaron resultados poco satisfactorios, probablemente esto fue debido a que los antígenos fueron utilizados en forma diluida y es muy probable que este tipo de antígenos dada la naturaleza de su obtención necesiten un método de concentración.

Las dos pruebas inmunológicas utilizadas brincarón resultados satisfactorios siendo la de contraelectroforesis, la que presentó un mayor número de líneas de precipitación, esto concuerda con los resultados obtenidos por Malo *et al.* (1977)

* C.O. Dawson, comunicación personal.

quienes explican que esta prueba debe ser utilizada como prueba de rutina en el diagnóstico de la Aspergilosis, en contraposición Morris *et al.* (1976) encontraron que la contraelectroforesis es demasiado sensible y puede detectar algunos falsos positivos, por lo que es preferible el uso de ambas pruebas para evaluar el estado inmunológico del paciente. Se considera que este trabajo debe de continuarse utilizando los antígenos metabólicos en la doble difusión y contraelectroforesis, pero ahora efectuándolo con suero de bovinos, con el fin de detectar la presencia de precipitinas contra *Aspergillus* en animales de nuestro país y asimismo es necesario el obtener antígenos estandarizados que sirvan como base para el diagnóstico de esta enfermedad.

Summary

A comparative study of different methods of *Aspergilli* antigens production was conducted in order to use them subsequently with diagnostic purposes through double diffusion and contraelectrophoresis tests. The antigens were obtained from three different species of *Aspergillus*, namely: *A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. oryzae*. The specific name given to the different antigens depended upon the proceeding used for the obtention, hence the *metabolic antigen* was constituted solely by the fungal metabolic products; the sonicated antigen was elaborated with the metabolic components of the culture plus mycotic fractions; the *frozen antigen* was obtained through freezing and thawing of the culture with posterior filtration and finally the *micelial antigen* was produced by the growing of the fungi in a liquid media, leaving at the end only the metabolic components. Such antigens were tested against hyperimmune sera collected from rabbits previously inoculated with spore suspensions of the different species of *Aspergilli* already mentioned. It was concluded that the metabolic antigens obtained from the different species of *Aspergillus* showed a higher specificity against *Aspergillus*, in comparison to the other antigens.

Literatura citada

- ARBESMAN, E.C., K. WICHER, J.I. WYPYCH, R.E. REISMAN, H. DICKIE and C.E. REED, 1974, IgE antibodies in sera of patients with Allergic bronchopulmonary *Aspergillosis*, *Clin. Allergy*, 4:349-358.
- BARDNA, E.J., 1972, The primary interaction of antibody to components of *Aspergilli*. II. Antibodies in sera from normal persons and from patients with *Aspergillosis*, *J. of Allergy and Clin. Immunol.*, 50 (4):208-221.
- British Society for Mycopathology, 1976, Serology of fungal infection and farmers lung disease, *Laboratory manual*, 14-17.
- COLEMAN, R.M. and L. KAUFMAN, 1972, Use of Immunodiffusion test in the serodiagnosis of *Aspergillosis*, *Applied Microbiology*, 23:301.
- CORREA, E.J., M.O. AMILCAR, R. BRIOCKNAUS, S. KESTER and E. MARTÍNEZ, 1975, *Aspergillosis* of the fourth ventricle, *J. Neurosurg.*, 4:236-238.
- FLYE, W.M. and W.C. SERLY, 1975, Pulmonary Aspergilloma, *Ann. Thoracic. Surg.*, 20:196-203.
- HART, J, R.R. PATTERSON and H. SOMMERS, 1976, Hyperimmunoglobulinemia E in a child with allergic bronchopulmonary *Aspergillosis* and bronchiectasis, *J. Pediatrics*, 89: 38-41.
- LONGBOTTON, J.L. and J. PEPYS, 1964, Bronchopulmonary *Aspergillosis*. Diagnostic and immunological significance of antigens and C substance in *Aspergillus fumigatus*, *J. of Path., and Bact.*, 88:141-152.
- MALO, L.J., J.L. LONGBOTTON, J. MITCHELL, R. HAWKINS and J. PEPYS, 1977, Studies in chronic allergic bronchopulmonary *Aspergillosis*. 3 immunological finding, *Thorax*, 32:269-274.
- MORRIS, C.A., R.S. HOLZMAN, H. SENTER, E.W. LAPA and M.J. KUPERSMITZ, 1976, *Aspergillus oryzae* meningitis, *J. Am. Med. Ass.*, 235:2122-2123.
- PEPYS, J., R.W. RIDELL, K.M. CITRON, Y.M. CLAYTON and E.I. SHORT, 1959, Clinical and immunological significance of *Aspergillus fumigatus* in the sputum, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 80:167-180.
- PEPYS, J., R.W. RIDELL, K.M. CITRON and L.M. CLAYTON, 1962, Precipitins against extracts of hay and moulds in the serum of patients with farmer's lung, aspergillosis, asthma and sarcoidosis, *Thorax*, 17:366-372.
- RAPER, K.B. and D.I. FENNELL, 1973, The genus *Aspergillus*, *Williams and Wilkins C.O.*: Baltimore, Md.