

29  
20j



# Universidad Nacional Autónoma de México

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLÁN"

### PRODUCCION DE EXUDADOS MICOTICOS EN ALGUNAS ESPECIES DEL GENERO ASPERGILLUS Y SU POSIBLE USO COMO ANTIGENOS

# T E S I S

Que para obtener el Título de:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

P r e s e n t a:  
**VICTOR MANUEL MENDOZA ENRIQUEZ**

Director de Tesis:

M.V.Z. Ph. D. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1988

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**





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.

## INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
i).= INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	i
ii).= RESUMEN	ii
I).= INTRODUCCION	I
A).= Género <u>Aspergillus</u>	I
a).= Historia	I
b).= Crecimiento y características microscópicas	2
B).= Aspergilosis	6
a).= Historia	6
b).= Generalidades de la enfermedad	8
C).= Diagnóstico de la Aspergilosis	11
a).= Diagnóstico Serológico	12
I.= Técnicas inmunológicas empleadas	12
2.= Antígenos disponibles	19
D).= Exudados Micóticos	28
II.= OBJETIVOS	33
III.= MATERIAL Y METODOS	34
A).= Producción de exudados	34
a).= Cepas utilizadas	34
b).= Medios de Cultivo	35
c).= Temperaturas de Cultivo	36
d).= Sistemas de humedad	36
e).= Cultivo en obscuridad	39
f).= Variación de carbohidratos	39
B).= Recolección y preservación de exudados	42

C).=	Cuantificación de proteínas	42
D).=	Pruebas de doble difusión	42
IV.=	RESULTADOS	48
A).=	Producción de exudados micóticos	48
B).=	Cuantificación de proteínas	60
C).=	Doble Difusión	62
V.=	DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS	66
VI.=	CONCLUSIONES	73
VII.=	APENDICE	74
VIII.=	BIBLIOGRAFIA	76

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura # 1.=	Características microscópicas del género <u>Aspergillus</u> .....	4
Cuadro # 1.=	Pruebas inmunológicas de uso común en el diagnóstico de micosis.....	14
Figura # 2.=	Diagrama general de trabajo.....	41
Figura # 3.=	Preparación de gel para doble difusión.....	43
Figura # 4.=	Montaje de las pruebas de doble difusión.....	45
Cuadro # 2.=	Resultados generales de producciones de exudados micóticos (I).....	49
Cuadro # 3.=	Resultados generales de producciones de exudados micóticos (II).....	50
Cuadro # 4.=	Resultados de producciones micóticos Cepa=Medio de cultivo.....	51
Cuadro # 5.=	Resultados de producciones de exudados micóticos Cepa=Carbohidrato.....	53
Cuadro # 6.=	Resultados de producciones de exudados micóticos Cepa=Temperatura.....	55
Cuadro # 7.=	Resultados de producciones de exudados micóticos Cepa=Sistema de humedad.....	56
Cuadro # 8.=	Resultados de producciones de exudados micóticos Cepa=Presencia o Ausencia de luz.....	58
Cuadro # 9.=	Resultados de producciones de exudados micóticos Cepa=Etapa de Crecimiento.....	59
Cuadro # 10.=	Cuantificación de proteínas de exudados.....	61

**Figura # 5.= Diagramas de resultados de doble difusión..... 64**

**Cuadro # 11.= Resultados de doble difusión..... 65**

## RESUMEN

Los hongos del género Aspergillus se encuentran de manera natural en el medio ambiente, por lo que la convivencia y la relación con ellos es constante. Estos hongos también tienen la capacidad de colonizar tejidos animales provocando la enfermedad denominada aspergilosis.

El diagnóstico de esta enfermedad es difícil y complicado, basado en el aislamiento del hongo en cultivo o en la observación de hifas en tejido presenta varios inconvenientes, y a pesar de que se han desarrollado gran cantidad de técnicas inmunológicas para el diagnóstico serológico en la actualidad no se cuenta con antígenos específicos y estandarizados que pueden ser de utilidad en el diagnóstico acertado de la aspergilosis.

Por otra parte, la presencia de pequeñas gotas de líquido sobre la superficie de las colonias fungales es una característica de algunos grupos de hongos, incluyendo a los del género Aspergillus. La información acerca de estos exudados micóticos es escasa y poco frecuente.

Con el fin de conocer algunos de los posibles factores involucrados en su producción, se efectuaron una serie de experimentos con diferentes especies de hongos del género Aspergillus en diferentes medios sintéticos en los cuales se variaron carbohidratos, temperatura, humedad y presencia o ausencia de luz.

Para la evaluación de su posible uso como antígenos, con fines diagnósticos, se montaron pruebas de inmunodifusión doble, utilizando sueros hiperinmunes obtenidos a partir de animales inmunizados con diferentes tipos de antígenos.

Los resultados obtenidos muestran que en general la producción de exudados es mejor utilizando como medio de cultivo Agar Sabouraud adicionando dextrosa al 10%, cultivando a 37° C y al parecer la presencia o ausencia de luz durante el crecimiento del hongo no es un factor importante siendo por el contrario, la humedad un factor a considerar para su producción. Adicionalmente se pudo determinar que dicha producción se presenta predominantemente durante la etapa de crecimiento activo de la colonia.

Los resultados obtenidos en las pruebas de inmunodifusión muestran que los exudados micóticos son buenos antígenos.



**INTRODUCCION**

**A).= Género Aspergillus.**

Los hongos del género Aspergillus son hongos filamentosos que se clasifican dentro del grupo de los ascomicetos, conociéndose hasta la fecha 18 grupos diferentes.

**a).= Historia.**

La historia reporta que es Micheli en el año de 1729 el primero en distinguir tallos, esporas y cabezas, notando que las cadenas de esporas irradian a partir de una estructura central, para producir una figura que semeja un Aspergillum ( del latín hisopo, escobilla para las asperciones de agua bendita), lo cual como sacerdote le fue familiar, aplicando el nombre de Aspergillus a los mohos que observó.

En años posteriores autores como Haller (1742) Persoon (1797, 1801) y Link (1809) hacen interpretaciones equivocadas del hongo clasificándolo dentro de otros géneros. Siendo Corda (1828) el primero en establecer una interpretación correcta de este género.

(2)

A partir de 1850 pocos trabajos fueron capaces de identificar correctamente estos especímenes.

En 1901 Wehmer publica su monografía sobre el género Aspergillus. Blochwitz, Meanwhile y Thom prosiguen las investigaciones alrededor de 1910, publicando una serie de reportes sobre diferentes grupos de Aspergillus importantes en microbiología de alimentos, los que culminan en 1926 con la publicación de su monografía taxonómica " The Aspergilli ".

Desde Micheli hasta nuestros días, mucha literatura se ha acumulado siendo el libro de Raper y Fennell (1965) el mejor tratado con el que se cuenta hasta la fecha para la identificación de este complejo género de hongos.

**b).= Crecimiento y Características Microscópicas.**

En condiciones naturales estos hongos crecen sobre materia orgánica en descomposición y frecuentemente lo hacen sobre forrajes o semillas en almacenaje, contaminándolos con metabolitos tóxicos (v.g. Aflatoxinas). Este crecimiento se ve favorecido por un exceso de humedad y de calor en el medio ambiente.

(3)

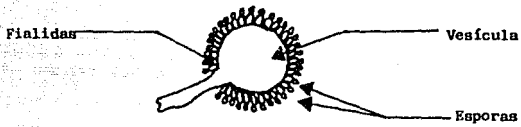
A nivel laboratorio crecen bien en medios de cultivo sintéticos de uso común en micología, tales como Sabouraud Dextrosa, Dextrosa papa y Czapek Dox (Campbell, 1980). Este género puede desarrollarse adecuadamente en un amplio rango de temperaturas, las cuales pueden estar entre los 25=45° C y en intervalos de pH de 6.0=8.0 (Agnihotri, 1964).

En Czapek Dox las colonias en general crecen con texturas finas aterciopeladas o ásperas, rugosas, lanosas o algodonosas, variando en color de blanco a rosa, anaranjado, amarillo, verde, gris, café y negro, según el grupo del que se trate (Campbell, 1980).

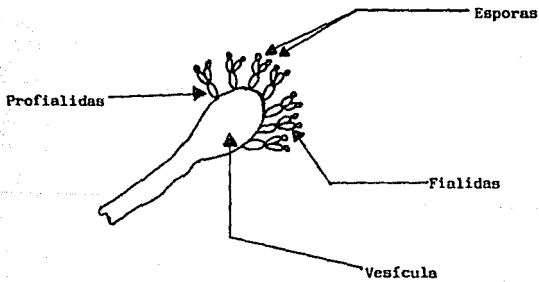
Microscópicamente este género se caracteriza por la presencia de una vesícula hinchada en la punta de una estructura llamada conidióforo, del cual irradian pequeñas prolongaciones denominadas fiálidas (antiguamente llamado esterigma). Las fiálidas pueden estar soportadas directamente sobre la vesícula (uniseriadas) o estar sobre profiálidas que salen de la vesícula (biseriadas). Sobre estas estas estructuras se encuentran colocadas las esporas (Figura # 1).

(4)

Figura # 1.- Características microscópicas del Género  
ASPERGILLUS.



Uniseriado



Biseriado

(5)

La implicación de los hongos del género Aspergillus en enfermedades tanto en humanos como en animales se ha ido incrementando en los últimos tiempos, produciendo cuadros patológicos severos (Trigo y col., 1978; Kurup y Shelt, 1981; Ghazilkhanian, 1982).

B).- **Aspergilosis.**

a).- **Historia.**

La capacidad de Aspergillus para crecer en diferentes sustratos dentro de diferentes condiciones de crecimiento es amplia, pudiendo también colonizar tejidos animales. La invasión de tejidos vivos puede causar muchas formas de enfermedad en el hombre y en animales de sangre caliente, pero esta relación en muchas ocasiones puede ser saprofitica sin causar mayor problema (Raper y Fennell, 1965).

Aspergillus fue uno de los primeros microorganismos en ser reconocido dentro de procesos patológicos, causando mucha controversia su papel en la etiología de algunas enfermedades. La falta de una adecuada descripción del hongo y de una uniformidad en los criterios, hace más difícil el establecimiento de su capacidad patógena real.

De Réaumur (1749) hace una de las primeras observaciones sobre la actividad patógena del hongo, cuando reporta la presencia de mohos en huevos en incubación.

La primera descripción del crecimiento dentro de un organismo vivo fue hecha por Montagne (1813), quien encuentra un "moho o mucor azul", dentro de sacos aéreos torácicos de aves. Mayer y Emmert en 1815 y Jager años más tarde describen procesos similares.

(7)

El primer reporte de la asociación de un Aspergillus sp con la aparición de lesiones es realizado por Royer y Montagne en 1842, quienes identifican Aspergillus candidus a partir de sacos aéreos de aves.

Desde entonces, Aspergillus se reporta frecuentemente en enfermedades pero su significancia en cada caso se discute.

El papel de Aspergillus en enfermedades pulmonares humanas es primeramente reportado por Virchow en el año de 1856, siendo muy probable que muchos de estos casos fueran causados por Aspergillus fumigatus.

No es sino hasta después de 1860 cuando muchas especies patógenas se describen adecuadamente, motivando este hecho a muchos investigadores a realizar trabajos experimentales con este hongo, lo que contribuye grandemente al establecimiento de su epidemiología y patología.

En 1859 Cramer reporta a Aspergillus niger como agente causal de una infección en oído.

(8)

La importancia de Aspergillus fumigatus en enfermedades humanas es demostrada por Gaucher y Sergent en 1894 dentro de procesos pulmonares. La capacidad patógena y toxigénica de Aspergillus es reconocida actualmente, sabiéndose que las enfermedades que puede producir son de una gran variedad, de regular ocurrencia y de considerable importancia en medicina humana y veterinaria.

**b).= Generalidades de la Enfermedad :**

La aspergilosis es una enfermedad infecciosa micótica, con causas diversas y patogénesis distintas, la cual puede ser causada por diferentes especies del género Aspergillus, aunque el agente más frecuentemente asociado con esta enfermedad es A. Fumigatus (Jawetz,1983).

Hoy en día se sabe que Aspergillus puede causar enfermedades a diferentes niveles. Estas se clasifican en tres grupos :

**1.= Infección o micosis :** Es la invasión de tejidos vivos por el hongo, pudiendo ser :

**a).= Primaria :** Que se produce como resultado de la penetración directa del hongo en un tejido sano del hospedador.



b).= **Secundaria** : Se presenta por crecimiento del hongo en lesiones previas o por la complicación con enfermedades debilitantes.

2.= **Alergia** : Asociada con la inhalación de conidias, esporas o algún otro contacto con el hongo.

3.= **Intoxicación** : Por la ingestión de productos contaminados con metabolitos tóxicos producidos por el hongo (Raper y Fennell, 1965).

Sin embargo la forma más característica en la que se presenta la **aspergilosis** es la pulmonar. Esta se manifiesta con lesiones inflamatorias granulomatosas y necrosantes. Aunque pueden verse involucrados otros sitios con procesos no invasivos como pueden ser : oído externo, piel, uñas, senos nasales, ojo, nasofaringe, vagina, uretra, cavidad pleural, árbol bronquial y cerebro (Finegold, 1959).

**Aspergillus** se transforma en invasor oportunista en personas con deficiencias inmunitarias, con anomalías anatómicas del sistema respiratorio y en aquellas en las que se emplean drogas antineoplásicas, esteroides adrenocorticales, corticotropina y radiaciones (Finegold, 1959; Jawetz 1983).

**La aspergilosis pulmonar puede presentarse en diferentes formas :**

- 1.= El desarrollo del hongo en una cavidad previa, ejemplo cavidad tuberculosa, cavidad paranasal, en las cuales Aspergillus no invade a los tejidos.
  
- 2.= Una segunda forma es el granuloma activamente invasivo que se disemina en el pulmón, dando lugar a una neumonía necrosante con hemoptisis y diseminación secundaria a otros órganos. Esto ocurre principalmente en personas inmuno suprimidas o con inmunodeficiencias.
  
- 3.= Una tercera forma es la aspergilosis pulmonar alérgica con presencia de asma, eosinofilia, elevación de anticuerpos del tipo E y con solo mínima invasión de tejidos (Arbesman y col., 1974 ; Bardana y col., 1975 Hart y col., 1976 ; Pauwels y col., 1976).

Esta enfermedad puede encontrarse en todas las razas a través del mundo, siendo mas común en adultos que en niños y en hombres que en mujeres (Finegold, 1959).

**C).- Diagnóstico de la Aspergilosis :**

El diagnóstico de la *aspergilosis* es difícil y complicado. Este se basa en el aislamiento y caracterización del hongo causal de la infección en cultivo puro, a partir de muestras de lesión, esputo o lavados bronquiales. Sin embargo, la significancia de los cultivos positivos es difícil de interpretar debido a que el hongo está presente frecuentemente en la atmósfera y por lo tanto, se puede presentar como un contaminante de secreciones bronquiales, no estando éste relacionado con el verdadero estado del paciente (Pepys y col., 1959; English y Henderson, 1967).

La observación microscópica directa de este tipo de muestras, puede revelar la presencia de fragmentos de hifas, las cuales se pueden observar en preparaciones de hidróxido de potasio (KOH) o más fácilmente en una tinción de metenamina-nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) como hifas de  $2.5-8.0\mu\text{m}$  de ancho, usualmente septadas, dicotómicas (divididas en dos partes iguales) y ramificadas en un ángulo de  $45^\circ$ . Aunque la identificación se basa en el cultivo y aislamiento del hongo, con los inconvenientes ya citados.

Otra herramienta que podría ser de utilidad en el diagnóstico de la *aspergilosis pulmonar* son las placas de rayos X, pero debido a que existen un sin número de microorganismos responsables de enfermedades a nivel pulmonar, el valor diagnóstico de este procedimiento se minimiza considerablemente, de ahí que exista la necesidad imperiosa de contar con un sistema y métodos más adecuados para llevar a cabo el diagnóstico de la enfermedad de una manera confiable, lo cual repercutiría indudablemente en el establecimiento de un tratamiento eficaz y oportuno.

Todo lo anterior ha impulsado a muchos investigadores hacia la búsqueda de métodos de diagnóstico alternativos para la aspergilosis, enfocándose la gran mayoría de los esfuerzos en los métodos de serodiagnóstico.

**a).= Diagnóstico Serológico :**

**1.= Técnicas Inmunológicas Empleadas :**

Las pruebas serológicas son de importancia en el reconocimiento y monitoreo de enfermedades micóticas y desde hace tiempo muchos laboratorios han ido incrementando su desarrollo y aplicación. Estas pruebas se basan en la detección de la respuesta humoral del hospedero hacia la infección micótica o en la detección de algunas sustancias producidas por el hongo.

Las pruebas inmunológicas juegan un papel importante en la evaluación de la histoplasmosis, coccidioidomicosis, cryptococosis y paracoccidioidomicosis (Conti=Diaz y col., 1973; Mackenzie y Philot, 1975; Yarzabal y col., 1978; Seeliger, 1982).

También se han desarrollado interesantes pruebas serológicas para blastomicosis, candidosis, esporotricosis, cromomicosis, micetoma y aspergilosis (Murray y Mahgoub, 1968; Mackenzie, 1975; Yu y Armstrong, 1975).

Los tipos de pruebas inmunológicas comunmente usadas como procedimiento de diagnóstico y prevalencia en micosis se muestran en el cuadro No. 1.

Como podemos apreciar los métodos usados en el diagnóstico serológico de algunas micosis son variados y en el caso particular de la **aspergilosis** también así lo son.

Los primeros estudios serológicos con Aspergillus se remontan hasta los primeros años de la década de los años veinte, Sartory en 1922 realiza trabajos tratando de diferenciar serológicamente a A. fumigatus de otros grupos. Pocos años después Matsumoto en 1929 utilizando sueros hiperinmunes obtenidos de conejo y pruebas de aglutinación y precipitación establece que la diferenciación serológica de grupos no es posible.

A partir de entonces se han desarrollado una gran cantidad de técnicas tendientes a encontrar pruebas de diagnóstico adecuadas para la **aspergilosis**.

Cuadro # 1 . = Pruebas Inmunológicas de uso común en el diagnóstico de micosis.

ENFERMEDAD	DD	FC	IF	ACF	API	CIE	IDR
Aspergilosis	+	(+)	(+)		(+)	(+)	+
Blastomicosis	(+)	+					+
Candidosis	+	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+
Cromomicosis	(+)						
Coccidioidomicosis	+	+	(+)		(+)	(+)	+
Cryptococosis			(+)	(+)	+		
Histoplasmosis	+	+	(+)		+	(+)	+
Micetoma	(+)						
Paracoccidioidomicosis	(+)	(+)				(+)	(+)
Ficomicosis	(+)					(+)	
Esporotricosis	(+)	(+)					(+)

DD=Doble difusión ; FC=Fijación de complemento ; IF= Inmunofluorescencia;  
ACF= Aglutinación de células fúngicas; API= Aglutinación con partícula  
inerte; CIE= Contraelectroforesis ; IDR= Intradermoreacción.

(+) = Reactivos disponibles solamente de referencia o en laboratorios  
especiales,

+ = Reactivos disponibles de manera comercial.

En el campo de las pruebas de aglutinación han habido varios intentos, específicamente aglutinación con látex y hemaglutinación, pero los resultados son bastante cuestionables, siendo necesaria mucha más investigación al respecto (Hipp y col., 1970; Ikemoto y Shibata, 1973).

La inmunofluorescencia, método basado en una reacción antígeno=anticuerpo en donde uno de los dos se encuentra marcado con un fluorocromo (generalmente isotiocianato de fluoresceína), ha sido ampliamente utilizado en la detección de anticuerpos contra A.fumigatus y en estudios comparativos con otros métodos (fijación de complemento, inmunodifusión y contraelectroforesis) se ha establecido que este tipo de ensayos poseen alta sensibilidad y muy poca especificidad, además de no ofrecer grandes ventajas sobre otras técnicas y ser subjetivos y laboriosos (Negroni, 1977; Shønheyder y Andersen, 1982; John y col., 1984 ).

La falta de un método de inmunofluorescencia capaz de distinguir pacientes con aspergilosis de aquellos con otras infecciones micóticas o sanos, se ha atribuido a la fluorescencia no específica de los antígenos usados en el ensayo, encontrándose que ésta es más pronunciada si se emplean preparaciones antigénicas viejas (Gordon, 1977 citado por Warnock y Hann, 1981).

Recientemente se ha puesto de moda el uso de técnicas más sofisticadas. Una de estas pruebas es el radioinmunoensayo o RIA. Este método se basa en el "marcaje" de un antígeno utilizando isótopos radioactivos (generalmente  $I^{125}$ ), que al reaccionar con su respectivo anticuerpo se une a los sitios receptores de este último. Posteriormente cantidades conocidas de antígeno no marcado son añadidas a la mezcla de antígeno-anticuerpo estableciéndose una competencia por los sitios receptores del anticuerpo. Después de un período apropiado de incubación, el antígeno marcado fijado al anticuerpo es separado del antígeno adicionado no marcado. Utilizando un contador de centelleo se puede construir una curva, midiendo la cantidad de antígeno no marcado fijado a diversas concentraciones, lo cual permite la medición de cualquier concentración de anticuerpos desconocida. Este método ha mostrado ser adecuado.

Particularmente se ha utilizado también para detectar antígeno circulante (ésto en conejos inmunizados expuestos), obteniéndose resultados significativos, siendo este hecho de importancia para su posible uso en pacientes con aspergilosis invasiva en los que la presencia de anticuerpos anti-Aspergillus es muy baja o totalmente nula (Young y Bennett, 1971 Shaffer y col., 1979).

Sin embargo, los reactivos usados, frecuentemente tienen una vida media corta y están legalmente restringidos en su uso, venta o disposición.



El uso de un método de radioinmunoensayo muy particular se ha reportado recientemente, denominado RAST (por sus siglas en Inglés), este método llamado Prueba de Radioalergen sorbente, ha mostrado ser una herramienta útil en el diagnóstico de la **aspergilosis broncopulmonar alérgica**, específicamente en la detección y cuantificación de anticuerpos anti-Aspergillus del tipo E, los que se encuentran considerablemente elevados en esta forma de la enfermedad (Arbesman y col., 1974; Hart y col., 1976 Pauwels, 1976).

Aunque también la prueba se ha usado en la detección de anticuerpos IgG en otros desórdenes pulmonares con buenos resultados, el inconveniente de este ensayo es que, la batería de reactivos empleados se encuentran disponibles comercialmente, lo que eleva mucho los costos (Dewair y col., 1984).

Otras de las técnicas que han tomado auge en los últimos tiempos son los llamados Inmunoensayos Enzimáticos, específicamente el conocido con el nombre de ELISA ( siglas en Inglés), en el cual se usan anticuerpos o antígenos marcados o conjugados con enzimas, las que posteriormente se hacen reaccionar con sus sustratos específicos coloreados que al unirse a la enzima correspondiente produce una coloración (medida fotocolorimétricamente ) proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en la muestra problema.

Este método al igual que el RIA se ha empleado para medir y detectar anticuerpos o antígenos en circulación . La evaluación de su utilidad así como de su sensibilidad y especificidad, ha sido motivo de controversia, lo que ha causado opiniones bastante polarizadas.

Existen estudios que indican que el método de ELISA es altamente sensible, en comparación con pruebas tradicionales, tales como inmunodifusión y contrainmunoelectroforesis (Richardson y col., 1979 y 1983 ; Mishra y col., 1983; Sabetta y col., 1985; Hearn y col. 1987).

Por otra parte, hay quienes sostienen que el método de ELISA parece ser de menor confianza que la contrainmunoelectroforesis y la doble difusión, pues existe la posibilidad de obtener reacciones positivas no específicas o falsos positivos. Así mismo, se han hecho intentos por estandarizar tanto técnicas como reactivos obteniéndose resultados ambiguos (Warren y col., 1979; Khan y col., 1984).

Aunque muchos métodos, así como modificaciones de los mismos se han propuesto, la mayoría de los reportes toman como parámetros a la inmunodifusión en gel y a la contrainmunoelectroforesis, demostrándose que ambos son los métodos serológicos más simples y más específicos en el diagnóstico de una gran variedad de micosis, incluyendo a la aspergilosis.

En las dos pruebas el número y la intensidad de las líneas de precipitación son significativas para la interpretación del grado de implicación con Aspergillus (Philpot y col., 1975; Mackenzie y Philpot, 1975; Shaefer y col., 1976; White y col., 1977; Malo y col., 1977; Yarzabal y col. 1978 )

En los métodos que hemos descrito, una de las condiciones de mayor importancia, es la disponibilidad de reactivos confiables y estandarizados (específicamente estamos hablando de los antígenos ).

La mayoría de las preparaciones con las que se cuenta contienen numerosos componentes antigénicos, algunos de los cuales son comunes para una gran variedad de hongos. Si se usan preparaciones antigénicas no específicas para realizar pruebas de detección de anticuerpos podrían entonces producirse reacciones no específicas. De ahí que exista la necesidad de encontrar antígenos puros y confiables para el diagnóstico de la aspergilosis.

## 2.- Antígenos Disponibles :

En la actualidad la literatura describe varios tipos de antígenos, los que a grandes rasgos se pueden clasificar en dos grupos :

1.= **Somáticos** : Como su nombre lo indica estos antígenos se obtienen a partir del cuerpo del hongo.

2.= **Metabólicos** : Obtenidos de los medios de cultivo en los que se desarrolla el hongo.

**Antígenos Somáticos :**

Dentro de los antígenos somáticos se han descrito principalmente a los extractos miceliales y a las fracciones de pared celular.

Se ha demostrado que los extractos miceliales de Aspergillus poseen entre 15 y 25 fracciones antigénicas, aún cuando cepas diferentes de una misma especie tienen algunas particularidades antigénicas, tanto cualitativas como cuantitativas (Biguet y Vernes, 1977).

Kim y col. en 1978 y Hearn y Mackenzie en 1979 realizan estudios sobre diferentes fracciones obtenidas a partir del micelio de A.fumigatus, encontrando que existen cinco componentes mayoritarios de tipo carbohidrato, aunque la proporción relativa de azúcares varía (hexosamina, azúcar neutra, glucosa, galactosa y manosa ).

(21)

Por otra parte, encuentran que una alta porción de las azúcares se presentan en forma de gluco=proteínas.

Dentro de estas fracciones pueden detectarse altos niveles de galactosa y de manosa, demostrando algunas evidencias que este antígeno es una galactomanana (galactosa=manosa 1:1.17) con un peso molecular de aproximadamente 25=75 000 (Reiss y Lehmann, 1979).

Se ha demostrado que este mismo antígeno se encuentra en cantidades relativamente considerables en orina (830=1900 ng/ml) y en menor cantidad en suero (108=356 ng/ml) de animales inmunizados experimentalmente y en pacientes con **aspergilosis invasiva** (Lehmann y Reiss, 1978; Hearn y Mackenzie, 1979; Dupont y col., 1987).

La detección de este antígeno en circulación podría ser de utilidad en el diagnóstico de **aspergilosis invasiva**, ya que en estos casos la presencia de anticuerpos anti=Aspergillus se encuentra considerablemente disminuída, sin embargo, el inconveniente que presenta este ensayo es el de que a medida que la infección avanza los niveles de antígeno circulante disminuyen, lo cual limita su uso como herramienta diagnóstica (Dupont y col., 1987).

Experimentos más recientes indican que sueros de pacientes con aspergilosis pulmonar, tienen anticuerpos dirigidos específicamente contra dos fracciones, una de aproximadamente 470 000 de peso molecular y otra de 250 000, observándose que ésta última fracción posee actividad de catalasa y que la de 470 000 está compuesta en realidad de dos entidades, lo cual ha hecho que se le llame complejo antigénico 470 000. Las cantidades de dicho complejo presentes en el micelio de A.fumigatus varían, pero se encuentra presente en la mayoría de las cepas (Schönheyder y col., 1985).

Los extractos conidiales han demostrado tener componentes antigénicos específicos que no poseen otras preparaciones. Esto evidencia que el mosaico antigénico de Aspergillus es extenso y complejo (Scholer, 1977).

Por otra parte, se ha visto que existe reacción cruzada entre diferentes especies del género Aspergillus al usar fracciones miceliales. Esto indica que no existen componentes antigénicos específicos de género y especie (Mishra y col., 1982; De Magali y Mackenzie, 1984).

Los estudios con respecto a reacciones cruzadas con otros géneros coinciden en afirmar que éstas existen fuertemente con Candida albicans y en menor grado con Paracoccidioides brasiliensis

y Blastomices dermatitidis, no observándose cruce con Cryptococcus neoformans (Filobasidiella neoformans) Histoplasma capsulatum y Coccidioides immitis (De Magali y Mackenzie, 1984; Wilson y col., 1984).

En su gran mayoría, la obtención de este tipo de antígenos implica la utilización de técnicas que emplean equipo sofisticado o de metodologías demasiado laboriosas. Además de observarse muchas reacciones inespecíficas al hacerlos reaccionar con sueros hiperinmunes.

#### Antígenos Metabólicos :

Estos antígenos se han utilizado en la mayoría de los casos en pruebas de doble difusión, por medio de las cuales se han podido demostrar alrededor de 52 antígenos diferentes, dentro de los cuales existen proteínas y carbohidratos (Kim y Chaparas, 1978), observándose que la gran mayoría son de tipo protéico (Atkinson y Memon, 1977).

Con los antígenos obtenidos de esta manera hay dos tipos de reacciones de precipitación :

La primera y más importante desde el punto de vista diagnóstico ocurre con los antígenos protéicos (glucoproteínas), las que dan como resultado la

aparición de bandas claramente definidas.

La segunda reacción ocurre con los antígenos de tipo polisacárido y característicamente aparecen como bandas anchas y difusas. Esta reacción es la que causa cruces entre las diferentes especies de Aspergillus e inclusive con otros géneros (Longbottom, 1977).

Los antígenos en los filtrados de cultivo se pueden detectar aproximadamente a las dos semanas de incubación, pero el número máximo de líneas de precipitación se ha demostrado con antígenos colectados después de la sexta semana de incubación (Thurston y col., 1973).

Como ya se ha mencionado este tipo de antígenos se obtienen a partir de los medios de cultivo en los que se hace crecer al hongo. Este hecho hace que su utilización y obtención presente varios inconvenientes :

Primeramente dentro del filtrado de cultivo existen sustancias no deseables que pueden interferir en las reacciones de precipitación que se producen al reaccionar con los sueros.



Específicamente se ha descrito con frecuencia a la llamada proteína C que produce precipitaciones no específicas con la proteína C reactiva que se encuentra presente en el suero de numerosos pacientes con enfermedades bacterianas, virales, micóticas y parasitarias. Sin embargo, estas precipitaciones inespecíficas se pueden eliminar adicionando a las placas con bandas ya formadas, soluciones de citrato de sodio o fosfato disódico de alta fuerza iónica y con un pH de 8.2 sin que esto tenga efecto sobre las otras bandas. La sustancia C empieza a aparecer en el seno del medio de cultivo entre la sexta y séptima semana de incubación (Longbottom y Pepys, 1964; Biguet y Vernes, 1977).

Así mismo, existe una relación significativa entre el contenido de antígenos y el medio de cultivo utilizado, observándose que su aparición se asocia con una baja en el contenido de nitrógeno y una elevación en la concentración de carbohidratos y del pH en el medio de cultivo (Thurston y col., 1973; Martínez y col., 1985).

Otro inconveniente de importancia lo representan las variaciones que ocurren durante el desarrollo del hongo en el medio de cultivo. Durante el crecimiento exponencial ocurre una baja considerable del pH debido a un incremento en la cantidad de ácidos orgánicos.

Posteriormente el pH se vuelve a elevar originado presumiblemente por la utilización de los ácidos o a la acción amortiguadora de nuevos productos originados de moléculas más grandes. Del mismo modo períodos de incubación demasiado prolongados aumentan la cantidad de sustancias extrañas que no son dializables, así como la desnaturalización por enzimas autolíticas (Kim y Chaparas, 1978).

Estudios comparativos entre extractos miceliales, filtrados de cultivo y antígenos comerciales, han demostrado que los extractos miceliales tienen ciertas ventajas sobre los filtrados de cultivo y sobre los antígenos comerciales, ya que las fracciones del extracto micelial de A. fumigatus tienen mayor capacidad para detectar anticuerpos específicos en personas con **aspergilosis pulmonar**, produciendo más bandas de precipitación en pruebas de doble difusión, además de tener la ventaja de estar libres de sustancias que reaccionan con la proteína C reactiva. Sin embargo, muchas veces existen anticuerpos que no son detectados por dichas fracciones, pero sí por los otros antígenos (Bardana, 1978; Kim y col., 1978 y 1979; Chaparas y col., 1980; Cervantes, 1983; Kurup y col., 1984).

(27)

Como hemos podido apreciar la complejidad antigénica de Aspergillus es grande y la utilidad de los antígenos obtenidos hasta la fecha presentan varios inconvenientes. Esto es reconocido por la gran mayoría de los autores, todos los esfuerzos son constantemente dirigidos hacia la obtención de antígenos sensibles, específicos y estandarizados que puedan solucionar esta gran deficiencia que existe para el serodiagnóstico de la aspergilosis.

D).- Exudados Micóticos :

Los exudados son una característica común en la superficie del micelio aéreo de algunos hongos. Estos se presentan como pequeñas gotas de líquido que pueden ser de color ambar oscuro, amarillo o totalmente claros.

Los reportes acerca de este fenómeno no son frecuentes. De Bary en 1877 es el primero en percatarse de la presencia de estos exudados y establece que estas pequeñas gotas de líquido son características de todas las células micóticas.

Muchos de los primeros trabajos realizados por Pfeffer (1900), Lepeschkin (1906) y Knoll (1912), concernientes a la secreción de líquidos fúngicos, se explicaron a partir del crecimiento en plantas.

Tulasne y Tulasne (1913) mencionan que la secreción de pequeñas gotas de líquido en los conidióforos de Agaricus racemosus se lleva a cabo cuando el desarrollo del hongo es completo.

Corner (1948) menciona que los exudados encontrados sobre las basidiosporas y cistidias de Ophiobolus canarij contenían citoplasma y líquido vacuolar.

Años más tarde Buller (1958) describe la existencia de gotas de líquido sobre un cierto número de basidios micetos y asumió que esas gotas contenían un gran número de sustancias y agua.

Por otra parte, Fenner (1932) nota en Mycotypha microspora, que las gotas se presentan sobre el micelio durante uno o dos días y Wilson (1948) establece que en condiciones normales de cultivo la secreción de líquido puede suceder desde el primer día hasta el día sesenta.

La gran mayoría de los estudios más recientes acerca de este interesante fenómeno se han realizado bajo condiciones controladas, y hoy en día se sabe que cierto número de hongos en cada una de las cinco clases principales pueden producir exudado (Colotelo, 1978).

Los exudados han sido utilizados como criterio taxonómico en el género Penicillium (Thom, 1930) y en el género Aspergillus (Raper y Fennell, 1965), notándose la presencia de exudado en 10 de los 18 grupos de este último género, incluyendo algunos potencialmente patógenos como : A. fumigatus, A. terreus, A. flavus y A. niger.

Uno de los hongos que ha sido más intensamente estudiado en este campo es Sclerotinia sclerotiorum. Cook en 1969 (citado por Colotelo 1978) establece que el exudado producido por este hongo contiene carbohidratos solubles y refiere la presencia de agua.

Así mismo, plantea que los exudados se producen durante un cierto período del desarrollo del hongo, predominantemente en la etapa de crecimiento activo de la colonia.

De la misma manera Jones en 1970 (citado por Colotelo, 1978) menciona que este exudado tiene actividad enzimática (fenoloxidasas) y que contienen sales, aminoácidos y proteínas. Sin embargo, no se describen con detalle.

No es sino hasta estudios posteriores cuando se reportan datos concretos acerca de la composición química del exudado de Sclerotinia encontrándose la presencia de iones potasio (K), Sodio (Na) y Magnesio (Mg); de enzimas tales como polifenoloxidasas, catalasa, peroxidasa, glucosidasa y poligalacturonidasa; aminoácidos libres, amoníaco, proteínas, ácidos grasos y ácido oxálico (metabolito de gran importancia en la patogénia de algunos hongos) Observándose también que estos exudados tienen actividad pectolítica y celulítica (Colotelo y col., 1971).

Otro dato interesante que se reporta en la bibliografía, es que las cantidades de algunos de los constituyentes ya mencionados disminuyen a medida que el exudado se obtiene a un mayor tiempo de cultivo (Colotelo, 1973).

Reportes más recientes de trabajos realizados con Armillaria mellea indican la presencia de metabolitos muy similares a los de S. sclerotiorum, encontrándose adicionalmente ion Fierro (Fe) y dos enzimas diferentes como son proteasa ácida y proteasa alcalina (Mallet y Colotelo, 1984).

De la misma manera se ha reportado que el exudado producido por Coccidioides immitis, así como su micelio y sus esporas contienen y producen respectivamente una proteinasa extracelular que tiene muy alta actividad, lo cual podría jugar un papel bastante importante en la patogénesis de este hongo, pues adicionalmente tiene la capacidad de inactivar " *in vitro* " IgG sérica e IgA secretoria (Yuan y Cole, 1987).

La teoría que trata de explicar este fenómeno, plantea que el hongo libera hacia la superficie del micelio aéreo metabolitos, nutrientes y algunas otras sustancias como material de reserva, para reabsorberlos e incorporarlos a su metabolismo en estadios posteriores de su desarrollo. Sin embargo, éste es un planteamiento aún no bien definido (McPhee y Colotelo, 1977).

Aspergillus es otro de los géneros que tienen la propiedad de producir exudado, siendo nulos los reportes de estudios en exudados de este género. No obstante experimentos realizados por Cervantes en 1983, indican

que en algunas especies de este género existe el exudado, en los cuales se encuentran presentes proteínas.

En estos mismos estudios se reporta que a concentraciones relativamente bajas de carbohidratos adicionadas al medio a utilizar, la producción de exudado puede verse favorecida y se plantea que la humedad en las condiciones de cultivo podría ser un factor importante para la producción de exudado. Sin embargo, para encontrar la verdadera influencia de estos parámetros es necesario realizar mucho más estudios.

Así mismo, Cervantes (1983) probó algunos exudados en doble difusión con sueros hiperinmunes positivos a Aspergillus, detectando la presencia de algunas bandas.

Por todo lo anterior es de gran importancia e interés conocer en el género Aspergillus las condiciones de cultivo a las cuales se podría obtener exudado, que especies lo producen, cual es su composición química parcial y sobre todo determinar la capacidad antigénica que poseen, lo que podría solucionar la falta de antígenos confiables para el diagnóstico de la aspergilosis prevaeciente hasta la fecha.



**OBJETIVOS**

- Estudiar las condiciones de cultivo para la producción de exudados micóticos.
  
- Analizar algunos de los factores que influyen en la producción de los exudados micóticos.
  
- Determinar parcialmente la composición química de los mismos.
  
- Probar y evaluar la utilidad de dichos exudados como antígenos con fines diagnósticos.

**BACTERIAL Y MICOLÓGICAS.**

**A).= Producción de Exudados :**

Con el fin de evaluar los factores que podrían influir en la producción de exudados micóticos se plantearon las siguientes variables :

- a).= Cepa
- b).= Medio Cultivo
- c).= Temperatura
- d).= Humedad
- e).= Presencia o ausencia de luz (cultivo en oscuridad)
- f).= Variación de nutrientes (Carbohidratos).

a).= Cepas : En el presente estudio se utilizaron las siguientes cepas del género Aspergillus, pertenecientes al laboratorio de Micología de la Coordinación de Investigación y Estudios de Posgrado de la facultad de Estudios Superiores Cuautitlán :

- 1.= Aspergillus niger.
- 2.= Aspergillus flavus
- 3.= Aspergillus clavatus
- 4.= Aspergillus fumigatus A20<sup>+</sup>
- 5.= Aspergillus fumigatus 561<sup>+</sup>
- 6.= Aspergillus fumigatus TEC<sup>++</sup>

**b).= Medios de Cultivo :**

Se trabajaron en total cuatro medios de cultivo que a continuación enunciamos :

**1.= Agar Czapek Dox (Raper y Fennell, 1965).**

Nitrato de Sodio $\text{NaNO}_3$	3.0 g
Difosfato dibásico de potasio $\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.0 g
Sulfato de Magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Cloruro de potasio KCl	0.5 g
Sulfato ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.01 g
Sacarosa	30.0 g
Agar Bacteriológico	12.0 g
Agua destilada	1000 ml

**2.= Agar Dextrosa Papa (bioxon)**

**3.= Agar Zanahoria (Colotelo y col., 1971)**

Extracto de Zanahoria	30.0 ml
Agar Bacteriológico	16.0 g
Agua Destilada	700 ml

**4.= Agar Sabouraud Dextrosa (Bioxon)**

**c).= Temperatura :**

Para evaluar el efecto de la temperatura, los cultivos se colocaron en dos condiciones de temperatura :

- 1.= 37°C
- 2.= Temperatura ambiente.

**d).= Humedad**

Con este fin se diseñaron cuatro sistemas de humedad :

**1.= Sistema frasco de vidrio :**

Este sistema se lleva a cabo en frascos viales de vidrio de aproximadamente 5 cm de largo, 2.5 cm de diámetro y 22 ml de capacidad con tapón de rosca de baquelita.

(37)

Estos recipientes se sirven con aproximadamente 9 ml de medio de cultivo, incli =  
nándolos.

Una vez esterilizado y solidificado el agar, se siembran por estría y se colocan en las condiciones de cultivo elegidas.

## 2.- Sistema gel-líquido :

Por su parte este sistema se realiza en cajas de petri de vidrio de 60 X 15 mm, servidas con aproximadamente 14 ml del medio de cultivo correspondiente ya esterilizado.

Una vez gelificado el medio, se hace una perforación circular en el centro de la caja de aproximadamente 1.3 cm de diámetro y se procede a llenar este "pozo" con medio de cultivo líquido; es decir agar SDA con caldo SDA en el centro, por ejemplo. Este mismo procedimiento se repite con todos y cada uno de los medios de cultivo a probar, con sus respectivos medios líquidos, sembrando posteriormente por estría sobre el agar, tratando de no

(38)

invadir la zona del "pozo" que contiene el medio líquido. Una vez sembradas las cajas se colocan en las condiciones de cultivo elegidas.

**3.= Sistema Celofán = Líquido :**

De la misma manera que en el sistema anterior, pero en cajas de Petri de vidrio de 100 X 15 mm servidas con aproximadamente 27 ml de medio de cultivo, se hace una perforación circular en el centro de la caja de aproximadamente 2.8 cm de diámetro llenando el "pozo" con medio líquido. Posteriormente encima de la perforación, previamente llena, se coloca un trozo de papel celofán cuadrado de aproximadamente 5 X 5 cm y se procede a sembrar por estría sobre el cuadro de papel.

**4.= Sistema Cámara Húmeda :**

En este sistema, un recipiente de plástico de cierre hermético se acondiciona colocando en el fondo del mismo una capa de papel periódico húmedo, manteniéndolo así el tiempo necesario.

(39)

Una vez acondicionado el recipiente se colocan en su interior cajas de Petri de vidrio de 60 X 15 mm previamente servidas con el agar correspondiente (14 ml) y sembradas por estría, enseguida se cierra el recipiente y se coloca a las condiciones de cultivo elegidas.

**e).= Cultivo en oscuridad :**

En el caso de la ausencia de luz una parte de los sistemas anteriores se coloca dentro de cajas de cartón forradas por la parte interior con una cartulina negra , tratando de cubrir cualquier hueco por el que se pueda filtrar algún rayo de luz.

**f),= Variación de Carbohidratos :**

En este punto se trabajaron los siguientes carbohidratos :

- = Sacarosa (J.T. Baker, México)
- = Dextrosa (J.T. Baker, México)
- = Manitol (Reactivos Técnica Química, México)
- = Lactosa (J.T. Baker, México)

(40)

Todos estos carbohidratos se trabajaron a una concentración del 10% (P/V) en cada uno de los medios de cultivo a probar.

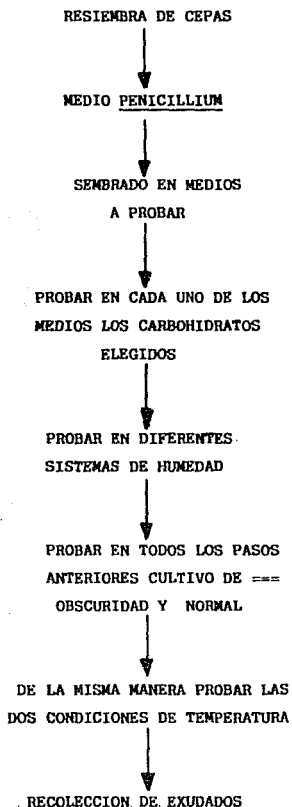
En el caso de los medios de cultivo que ya en su formulación tienen el carbohidrato que se va a trabajar, únicamente se adiciona la cantidad necesaria para que la concentración quede ajustada al 10%.

En la figura # 2 se presenta el diagrama general de trabajo.

Una vez realizado todo lo anterior, los cultivos se observaron durante 26 días, haciendo lecturas cada 2 días para observar la presencia del exudado. En caso de existir éste se recolectaba, volviendo a colocar el sistema en las condiciones trabajadas en ese momento, realizando los siguientes pasos con los exudados :



Figura # 2.- Diagrama general de trabajo.



**B).= Recolección y preservación de exudados :**

Los exudados se recolectaron utilizando pipetas Pasteur estériles. Estos se colocaron en viales de plástico de 3ml de capacidad estériles, metiéndolos en congelación a 0°C. De tal manera que se tuviera un concentrado para cada una de las cepas utilizadas.

Una vez que la cantidad acumulada fué buena, los exudados fueron esterilizados por filtración, haciéndolos pasar a través de filtros Millipore de 0.45 $\mu$ m.

Los exudados esterilizados se colocaron nuevamente en viales de plástico y se preservaron en congelación a 0°C hasta el momento de su utilización en las pruebas posteriores.

**C).= Cuantificación de proteínas :**

Ya obtenidos y esterilizados los exudados, se llevó a cabo la cuantificación de proteínas para cada uno de los concentrados de las 6 cepas, de acuerdo al método de Lowry (Lowry y col., 1951).

**D).= Pruebas de doble difusión :**

Con la finalidad de evaluar la capacidad antigénica de los exudados obtenidos, se montaron pruebas de doble difusión en gel, preparadas de acuerdo a la figura # 3.

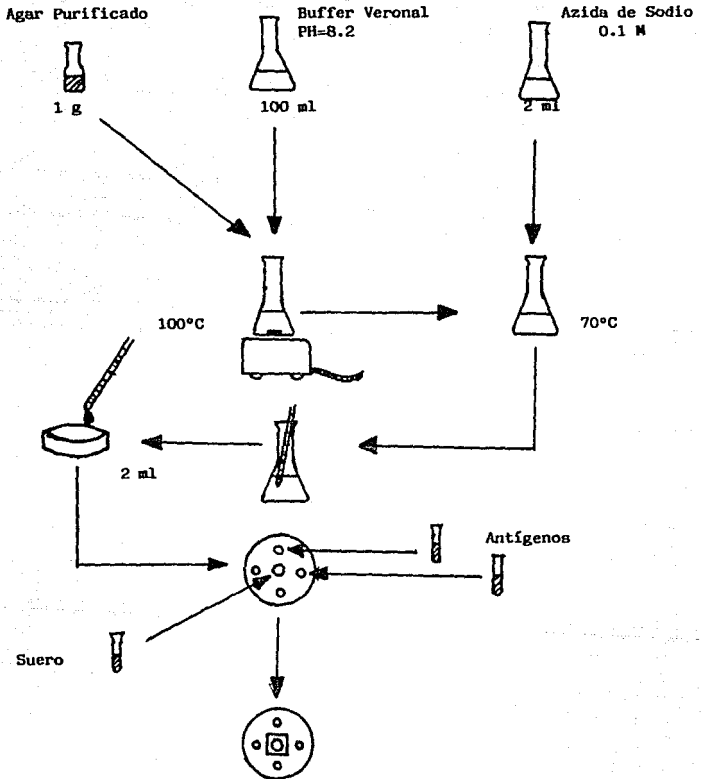


Figura # 3.- Preparación de gel para doble difusión.

(44)

El gel preparado se vació en cajas de plástico de 35 X 10 mm (Falcon, Becton, Dickinson and Co., Oxnard, California, USA) adicionando 2 ml de gel por caja. Hecho ésto, las cajas se colocan sobre una superficie plana y nivelada dejándolas gelificar, conservandolas en refrigeración durante 24 hrs. antes de su utilización.

Las dobles difusiones se montaron de acuerdo a la figura # 4 utilizando los siguientes reactivos :

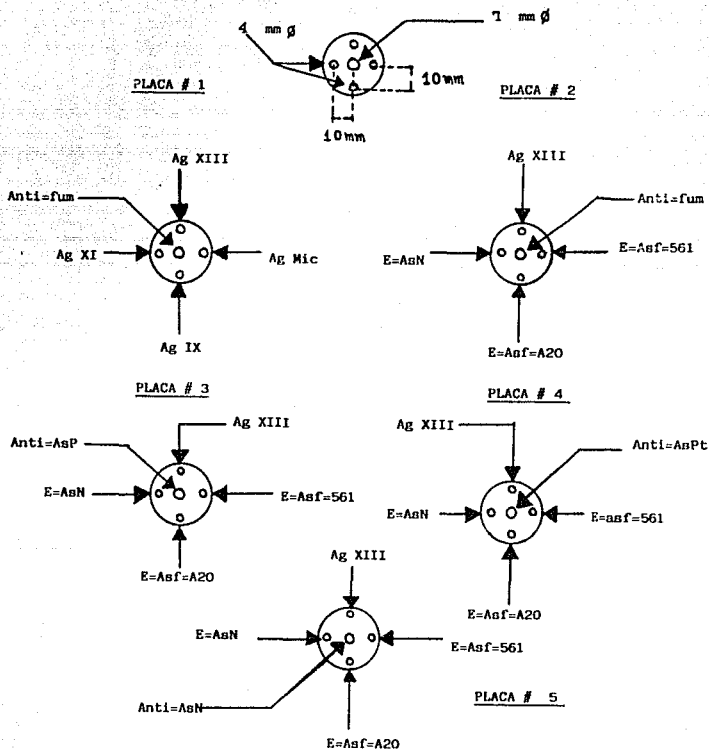
a).- Antígenos :

- 1.= Antígeno Metabólico XIII de A.fumigatus A20 (AgXIII)
- 2.= Antígeno Metabólico XI de A.fumigatus A20 (Ag XI)
- 3.= Antígeno Metabólico IX de A.fumigatus A20 (Ag IX)
- 4.= Antígeno Micelial de A.fumigatus A20 (Ag Mic)
- 5.= Exudado de A.niger (E=AsN)
- 6.= Exudado de A.fumigatus 561 (E=Asf=561)
- 7.= Exudado de A.fumigatus A 20 (E=Asf=A20)

b).- Sueros :

- 1.= Suero Anti=A. fumigatus A20 (Anti=Fum)
- 2.= Suero de perro Anti=Aspergillus, obtenido de un caso clínico (Anti=Asp)
- 3.= Suero de perro "Toro" Anti=Aspergillus, obtenido de un caso clínico (Anti=AsPt)
- 4.= Suero Anti=A.nidulane (Anti=AsN)

Figura # 4.- Montaje de las Pruebas de Doble Difusión.



(46)

Posteriormente las pruebas se incuban durante 48 Hrs a temperatura ambiente, haciendo una lectura cada 24 Hrs.

Transcurrido ese tiempo las cajas se colocaron en refrigeración por otras 24 Hrs.

Terminado el corrimiento se procedió a separar los geles de las cajas y enseguida se realizaron los siguientes lavados :

**Lavado # 1.** Los geles ya separados se enjuagan en una solución de Citrato de Sodio al 5% (P/V) durante 30 min., con la finalidad de eliminar las bandas de precipitación inespecíficas que se pudieran haber formado durante el corrimiento.

**Lavado # 2.** Después de enjuagar con citrato de sodio, los geles se lavan durante 24 Hrs con PBS pH= 8.2 (Buffer de fosfatos), manteniéndolos con agitación y realizando dos cambios de Buffer.

**Lavado # 3.** Después del lavado con PBS pH=8.2 los geles se sacan y se lavan con agua destilada durante 24 Hrs en agitación, haciendo dos cambios.

(47)

Una vez realizados todos los lavados los geles se colocan sobre placas de vidrio y se secan por 24 Hrs. a 37°C.

Ya deshidratados los geles se sumergen en solución colorante de Negro de Amido durante 30 min, cumplido el tiempo de tinción, los geles se colocan inmediatamente en solución decolorante, llevando a cabo varios cambios, hasta que los geles queden lo más claros posible y unicamente prevalescan las bandas de precipitación formadas.

Para la preparación de las soluciones y de los reactivos empleados puede consultarse el apéndice.

**R E S U L T A D O S .**

**A).- Producción de exudados micóticos :**

Dada la gran cantidad de datos que se obtuvieron durante la realización del trabajo experimental tendiente a estudiar las condiciones de cultivo y a analizar los factores involucrados en la producción de los exudados micóticos, presentamos tanto los resultados obtenidos en general y desglosados, así como para cada uno de los factores probados. Los cuales se describen en los cuadros 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

Los cuadros # 2 y # 3 presentan los datos de manera desglosada e involucrando todas las interacciones de las variables estudiadas. Estos dan una visión general de todo el experimento y del trabajo realizado.

En el cuadro # 4 tenemos los resultados totales obtenidos por cepa y para cada uno de los medios de cultivo probados, los cuales nos indican la detección del número de producciones de exudado para cada uno.

Así pues, en este cuadro podemos apreciar que en todas las cepas estudiadas se detectaron más producciones de exudado utilizando como medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar, lo cual se observa de manera más clara si nos fijamos en los totales de producciones de exudado para cada medio de cultivo, esto nos permite ver que la diferencia con respecto a los demás medios es bastante considerable.



CUADRO No. 2. RESULTADOS GENERALES DE PRODUCCIONES DE EXUDADOS MICOTICOS (1)

VARIABLE	0 37 C=245																TOTAL																																
	SAC=74				DEX=85				LAC=39				MAN=47																																				
TEMPERATURA	CD=17		ADP=7		AZ=4		SDA=46		CD=12		ADP=11		AZ=4		SDA=58		CD=7		ADP=18		AZ=5		SDA=9		CD=0		ADP=1		AZ=0		SDA=46																		
CARBOHIDRATO	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D													
MEDIO DE CULTIVO																																																	
SISTEMA																																																	
DE HUMEDAD																																																	
<u>A. niger</u>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	4	0	0	0	0	9	4	1	2	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	32				
<u>A. flavus</u>	1	5	0	0	0	4	0	0	0	9	3	4	4	0	0	0	4	0	0	0	5	2	3	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3	57				
<u>A. clavatus</u>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17								
<u>A. fumigatus</u> S61	5	0	0	0	0	0	0	0	4	2	2	0	2	0	0	0	4	2	2	0	4	0	0	0	7	0	0	5	5	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	7	3	9	2	69				
<u>A. fumigatus</u> A20	3	2	0	0	0	0	0	0	3	5	1	0	4	0	0	2	1	0	0	0	2	1	4	9	0	0	0	1	0	0	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	1	2	6	0	54				
<u>A. fumigatus</u> TEC	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1	16				
TOTAL	10	7	0	0	0	4	1	2	20	11	8	7	10	0	0	2	5	2	1	3	20	11	12	15	6	0	1	0	7	0	0	11	5	0	0	0	6	1	2	0	0	0	0	0	13	5	21	7	245

SAC=SACAROSA  
CD=CZAPEX DDX

DEX=DEXTROSA  
ADP=AGAR PAPA DEXTROSA

LAC=LACTOSA  
AZ=AGAR ZANAHORIA

MAN=MANITOL  
SDA=AGAR SABAURAU DEXTROSA

CUADRO No. 3. RESULTADOS GENERALES DE PRODUCCIONES DE EXUDADOS MICOTICOS (II)

VARIABLE	TEMPERATURA AMBIENTE																TOTAL
	SAC=9				DEX=71				LAC=6				MM=11				
	CD=0	ADP=5	AZ=0	SDA=4	CD=0	ADP=4	AZ=0	SDA=67	CD=0	ADP=5	AZ=0	SDA=1	CD=1	ADP=2	AZ=0	SDA=8	
MEDIO DE CULTIVO SISTEMA DE HUMEDAD	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	A B C D	
<u>A. niger</u>	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	2 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	17 2 2 2	0 0 0 0	0 0 0 1	0 0 0 0	0 0 1 0	0 0 0 0	0 0 0 1	0 0 0 0	3 0 2 0	33
<u>A. flavus</u>	0 0 0 0	5 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 1 0	0 0 0 0	0 0 0 1	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 1	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	8
<u>A. clavatus</u>	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	3 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	3
<u>A. fumigatus</u> 561	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	4 0 0 2	0 0 0 0	0 0 0 3	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	9
<u>A. fumigatus</u> A20	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	8 0 7 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	3 0 0 0	19
<u>A. fumigatus</u> TEC	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	1 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 4	0 0 0 0	5 3 2 9	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 1 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	25
TOTAL	0 0 0 0	5 0 0 0	0 0 0 0	4 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 4	0 0 0 0	37 5 12 13	0 0 0 0	0 0 0 5	0 0 0 0	0 0 1 0	0 0 0 1	0 1 0 1	0 0 0 0	6 0 2 0	97

Nota: para evitar confusiones en los sistemas de humedad se cambio la nomenclatura de tal manera que A=sistema No. 1, B=sistema No. 2, C=sistema No. 3 y D=sistema No. 4.

(51)

Cuadro # 4.- Resultados de presencia de exudados micóticos.  
CEPA=MEDIO DE CULTIVO

CEPA		CD	ADP	AZ	SDA	TOTAL
<u>A. niger</u>		1	6	0	58	65
<u>A. flavus</u>		12	15	0	38	65
<u>A. clavatus</u>		0	3	4	13	20
<u>A. fumigatus</u>	561	11	15	7	45	78
<u>A. fumigatus</u>	A20	12	4	0	57	73
<u>A. fumigatus</u>	TEC	1	10	2	28	41
<b>TOTAL</b>		<b>37</b>	<b>53</b>	<b>13</b>	<b>239</b>	<b>342</b>

CD = Czapek Dox Agar

ADP = Dextrosa Papa Agar

AZ= Agar Zanahoria

SDA= Sabouraud Dextrosa Agar

Por otra parte, el cuadro # 5 en el que tenemos los datos obtenidos para los carbohidratos utilizados, nos permite apreciar que la mayoría de las cepas tienen más producciones de exudado al utilizar dextrosa, a excepción de A.flavus que tiene más producciones al utilizar sacarosa y de A.fumigatus cepa 561 que las tiene casi en igual número con sacarosa que con dextrosa.

(53)

Cuadro # 5.- Resultados de presencia de exudados micóticos.

CEPA-CARBOHIDRATO

CEPA		SAC	DEX	MAN	LAC	TOTAL
<u>A. niger</u>		10	40	10	5	65
<u>A. flavus</u>		31	21	7	6	65
<u>A. clavatus</u>		7	11	1	1	20
<u>A. fumigatus</u>	561	15	16	21	26	78
<u>A. fumigatus</u>	A20	15	38	13	7	73
<u>A. fumigatus</u>	TEC	5	30	6	0	41
<b>TOTAL</b>		<b>83</b>	<b>156</b>	<b>58</b>	<b>45</b>	<b>342</b>

SAC = Sacarosa

DEX = Dextrosa

MAN = Manitol

LAC = Lactosa

Los totales nos permiten apreciar claramente las diferencias que se determinaron, siendo la dextrosa la de mayor número.

En el cuadro # 6 se presentan los resultados obtenidos para cada una de las condiciones de temperatura trabajadas, podemos observar que la mayor cantidad de producción de exudado se detectó al utilizar una temperatura de 37°C, aunque existen cepas como A. niger y A. fumigatus cepa TEC en las cuales hubo más exudados al utilizar temperatura ambiente .

Sin embargo, la diferencia no es muy grande, no obstante la diferencia entre los totales es bastante elocuente.

Por otro lado, el cuadro # 7 en el que se analizan los resultados para cada uno de los sistemas de humedad podemos ver que la mayor cantidad de producciones de exudado se observó al utilizar el sistema # 1, el cual corresponde al sistema de cultivo en frasco vial de vidrio con tapón de baquelita, aunque existieron cepas que no siguieron esta tendencia general, como fueron A. clavatus y A. fumigatus cepa TEC, en las que el mayor número se detectó utilizando el sistema # 4, correspondiente al sistema de cultivo en cámara húmeda.

## Cuadro # 6.- Resultados de presencia de exudados micóticos.

CEPA=TEMPERATURA

CEPA	37°C	T.A.	TOTAL
<u>A. niger</u>	32	33	65
<u>A. flavus</u>	57	8	65
<u>A. clavatus</u>	17	3	20
<u>A. fumigatus</u> 561	69	9	78
<u>A. fumigatus</u> A20	54	19	73
<u>A. fumigatus</u> TEC	16	25	41
<b>TOTAL</b>	245	97	342

T.A. = TEMPERATURA AMBIENTE

Cuadro # 7.- Resultados de presencia de exudados micóticos.

CEPA=SISTEMA DE HUMEDAD

CEPA	1	2	3	4	TOTAL
<u>A. niger</u>	39	7	7	12	65
<u>A. flavus</u>	33	14	10	8	65
<u>A. clavatus</u>	3	2	2	13	20
<u>A. fumigatus</u> 561	43	7	14	14	78
<u>A. fumigatus</u> A20	28	11	21	13	73
<u>A. fumigatus</u> TEC	8	6	8	19	41
<b>TOTAL</b>	<b>154</b>	<b>47</b>	<b>62</b>	<b>79</b>	<b>342</b>

1 = Sistema frasco de vidrio

2 = Sistema Gel=Líquido

3 = Sistema Celofán=Líquido

4 = Sistema Cámara húmeda.



Observando el cuadro # 8 correspondiente al análisis de la influencia de la luz en la producción de exudados micóticos, podemos ver que aunque el mayor número de presencias de exudado en total fue cultivando en obscuridad, la diferencia con respecto al cultivo normal no es muy grande.

Finalmente y dado que los cultivos fueron observados durante un lapso de 26 días fue posible registrar durante que etapa de tiempo de cultivo se producen preferentemente los exudados. Con este fin este lapso se dividió en tres etapas, las cuales denominamos : temprana, media y tardía, correspondiendo de los días 1 al 9, del 10 al 18 y del 19 al 26 respectivamente, los datos se muestran en el cuadro # 9 y nos permiten ver que el mayor número de exudado se detecta principalmente a partir de la etapa media, es decir del período correspondiente entre el día 10 y 18 de cultivo.

Cuadro # 8.= Resultados de presencia de exudados micóticos.  
 CEPA=PRESENCIA O AUSENCIA DE LUZ.

CEPA	LUZ	OSC	TOTAL
<u>A. niger</u>	32	33	65
<u>A. flavus</u>	22	43	65
<u>A. clavatus</u>	7	13	20
<u>A. fumigatus</u> 561	36	42	78
<u>A. fumigatus</u> A20	35	38	73
<u>A. fumigatus</u> TEC	28	13	41
<b>TOTAL</b>	160	182	342

LUZ = Condiciones normales

OSC = Oscuridad

**Cuadro # 9.- Resultados de producciones de exudados micóticos**  
**CEPA=ETAPA DE CRECIMIENTO**

CEPA		TEMPRANA	MEDIA	TARDIA	TOTAL
<u>A. niger</u>		14	39	12	65
<u>A. flavus</u>		9	28	28	65
<u>A. clavatus</u>		8	6	6	20
<u>A. fumigatus</u>	561	14	44	20	78
<u>A. fumigatus</u>	A20	8	37	28	73
<u>A. fumigatus</u>	TEC	1	20	20	41
<b>TOTAL</b>		<b>54</b>	<b>174</b>	<b>114</b>	<b>342</b>

TEMPRANA = DE 1=9 días de cultivo  
 MEDIA = DE 10=18 días de cultivo  
 TARDIA = DE 19=26 días de cultivo

**B).- Cuantificación de Proteínas :**

Los resultados obtenidos al determinar proteínas en los concentrados de cada una de las cepas trabajadas, los cuales se muestran en el cuadro # 10 nos permiten apreciar que en todos los casos en los exudados existen proteínas, siendo en el que mayor cantidad se detectó el concentrado de A. niger con 2.348 mg/ml y el más bajo el de A. flavus con 1.128 mg/ml . Aunque la diferencia en cuanto al contenido de proteínas en el resto de las cepas no es muy significativa.

Cuadro # 10.- Cuantificación de proteínas en exudados por el método de Lowry.

CEPA		PROTEINAS EN EXUDADO ( mg/ml)
<u>A. niger</u>		2.348
<u>A. flavus</u>		1.128
<u>A. clavatus</u>		1.604
<u>A. fumigatus</u>	561	1.144
<u>A. fumigatus</u>	A20	1.808
<u>A. fumigatus</u>	TEC	1.196

C).= Doble Difusión :

Los resultados obtenidos se describen en la figura # 5 y en el cuadro # 11.

En la inmunodifusión número 1 se observaron bandas de precipitación con todos los antígenos probados, distinguiéndose dos bandas en tres, a excepción del antígeno metabólico XIII con el cual se produjo una banda claramente definida. Por lo que se eligió como antígeno patrón para probar los exudados micóticos en las demás inmunodifusiones.

Al hacer reaccionar el suero anti=fumigatus A 20 con el antígeno XIII, el exudado de A. niger, el exudado de A. fumigatus A 20 y el exudado de A. fumigatus 561 en la inmunodifusión # 2, se pudo observar una banda claramente definida con el antígeno XIII ya que se utilizó el mismo suero que en la inmunodifusión # 1. De la misma manera se observaron bandas de precipitación con los exudados de A. fumigatus A20 y de A. fumigatus 561, aunque la banda correspondiente al exudado de A. fumigatus A20 fué más intensa y definida.

Por otra parte, en la inmunodifusión # 3, correspondiente a la reacción entre uno de los sueros de perro de caso clínico y los antígenos, se pudieron observar bandas de precipitación con los exudados de A. niger y de A. fumigatus A20, siendo la banda del exudado de A. niger la más intensa. No hubo reacción con el resto de los antígenos.

(63)

En la inmunodifusión # 4 se pudieron observar bandas de precipitación con los exudados de A. fumigatus A20 y con el exudado de A. fumigatus 561, ambas de intensidad y definición parecida. No hubo reacción en los demás pozos.

En la inmunodifusión # 5 correspondiente al suero anti=A. nidulans no se observó reacción en ninguno de los pozos probados.

Figura # 5.- Diagramas de Resultados de Dobles Difusiones.

PLACA # 1



PLACA # 2



PLACA # 3



PLACA # 4



PLACA # 5





Cuadro # 11.- Resultados de Doble difusión.

SUERO	Ag XIII	Ag XI	Ag IX	Ag-Mic	E-AsN	E-Asf-561	E-Asf-A20
Anti-fum	+	+	+	+	+	+	+
Anti-fum	+	*	*	*	-	+	+
Anti-AsP	+	*	*	*	+	+	+
Anti-AsPt	-	*	*	*	-	+	+
Anti-AsN	-	*	*	*	-	-	-

+= Precipitación

- = No precipitación

\* = No probado

**DISCUSION Y ANALISIS DE RESULTADOS**

La secreción de pequeñas gotas de líquido hacia la superficie del micelio aéreo en algunos hongos, es un fenómeno interesante, complejo y poco estudiado, escasos son los trabajos que tratan este tema y la mayor parte de ellos están enfocados hacia la determinación de la composición química de lo que se ha dado en llamar exudados micóticos, lo cual se ha realizado en muy pocos géneros.

Quizá debido a la misma complejidad que implican los exudados micóticos y a la escasa información que existe hasta el momento, no se ha logrado captar en toda su magnitud la importancia que éstos podrían tener o el porqué de este fenómeno. Sin embargo algunos trabajos y en particular lo reportado por Cervantes en 1983 nos permiten apreciar que posiblemente estos exudados tengan una perspectiva más amplia de lo que se cree. Sobre todo, en el género Aspergillus.

La intención del presente trabajo es la de tratar de dilucidar algunos de los factores y algunas de las condiciones de cultivo que pueden estar involucrados en la aparición o producción de estos exudados, así como determinar que utilidad pueden tener como antígenos para su posible utilización en el diagnóstico de la aspergilosis.

Así pues, los resultados obtenidos nos permiten observar lo siguiente :

El medio de cultivo tiene una gran importancia e influencia en la producción de exudados (Cuadro # 4), el medio de Sabouraud Dextrosa Agar resulta el medio más adecuado. Colotelo y col. (1971) reportan grandes producciones de exudado al utilizar su medio de Agar Zanahoria con S. sclerotiorum, pero como podemos ver en algunas especies del género Aspergillus no es adecuado, del mismo modo Cervantes (1983) obtuvo producción al utilizar Czapek Dox Agar con Aspergillus, no obstante que resultados como los que nosotros reportamos no se mencionan y de que en estos estudios no se utiliza el medio SDA.

El cuadro # 5 nos permite apreciar que de los **carbohidratos** probados la **dextrosa** es con el que se obtienen mejores resultados. Esto de alguna manera nos indica que la complejidad química de los **carbohidratos** que en algún momento determinado se empleen, podría influir en la producción debido quizá a la mayor o menor facilidad que el hongo puede tener para su asimilación. Sin embargo, para establecerlo con certeza serían necesarios mucho más estudios.

Por otra parte, y de acuerdo al Cuadro # 6 podemos ver que la **temperatura** óptima es de 37°C, ya que las mayores cantidades de exudado se obtuvieron en los cultivos incubados a esta **temperatura**.

**Cervantes (1983)** menciona que **la humedad** puede ser un factor de influencia importante, si consideramos que los sistemas que nosotros denominamos de humedad y que no son otra cosa que técnicas de cultivo que de alguna manera y debido a las características de cada uno de ellos nos proporcionan mayor o menor cantidad de humedad según sea el caso, tenemos que el **sistema # 1** fue relativamente el mejor, siguiéndole en orden decreciente el número 4, el número 3 y el número 2 (**Cuadro # 7**). Esto nos permite establecer que la humedad es un factor importante y que sobre todo, es importante hacer uso de recipientes y técnicas de cultivo que nos permitan tener una humedad mayor durante el crecimiento activo del hongo.

La presencia o ausencia de **luz** no influye en la producción de exudados (**Cuadro # 8**).

La mayoría de los autores mencionan que la producción de exudado se da preferentemente entre el día 5 y 20 de cultivo. **Cervantes (1983)** establece que el tiempo de producción está entre el día 5 y 12 de cultivo, por lo que nuestros resultados concuerdan con éste, ya que la **mayor producción** o presencias de exudado se detectaron entre los días 10 y 18.

Aunque la cinética de crecimiento podría ser diferente para cada una de las cepas estudiadas, nuestros resultados son acordes con los que menciona **Cook en 1969 (citado por Colotelo, 1978)**, quien establece que los exudados se producen durante un cierto período del desarrollo del hongo, predominantemente en la **etapa de crecimiento activo** de la colonia.

Como podemos apreciar tratamos de dar uno de los primeros pasos en este campo, por lo que mucha investigación es necesaria y posible de realizar.

En cuanto a la cantidad de protefna presente en los diferen= tes concentrados de exudado que se obtuvieron para cada una de las cepas investigadas, vemos que estos poseen cantidades considerables, lo cual concuerda con los resultados reportados por Cervantes en el año de 1983 respecto a la presencia de proteínas en algunos exudados de hongos del género Aspergillus, aunque específicamente para A. fumigatus y para A. flavus se mencionan cantidades mucho mayores (6.38 y 4.0 mg/ml respectivamente ).

Por otra parte, en estos mismos trabajos se reporta que A. niger no produjo exudado y en el presente estudio si hubo producción, siendo el concentrado en el cual se detectaron mayores cantidades de protefna.

Todas estas diferencias pueden ser atribuibles a muchos factores, pero no contamos hasta el momento con los elementos suficientes para poder explicarlas. Sin embargo, podría ser que, los diferentes medios de cultivo, métodos y cepas utilizadas tengan alguna relación, siendo muy aventurado concluir algo al respecto.

Los resultados obtenidos en las pruebas de doble difusión llevan a pensar varias cosas :

Primero, se puede ver sin duda, que los exudados micóticos probados contienen antígenos, lo cual nuevamente concuerda con lo reportado por Cervantes, pues en sus trabajos también aprecia bandas de precipitación al hacerlos reaccionar con sueros que contienen anticuerpos naturales.

Así mismo, podemos apreciar que existe cierta especificidad antigénica en ellos, pues si consideramos los diagramas obtenidos (Figura # 5), podemos ver en las inmunodifusiones 3 y 4 (las cuales corresponden a los sueros de casos clínicos) que existe reacción contra los exudados de A. fumigatus A20 y A. fumigatus 561 preferentemente, lo anterior es posible debido a que, se comprobó que los animales de los que se tomaron los sueros que se probaron se infectaron en forma natural con A. fumigatus. De la misma manera lo obtenido en la inmunodifusión # 5 reafirma lo anterior pues es el suero dirigido contra A. nidulans no reaccionó con ninguno de los antígenos probados, lo cual evidencia que existe de alguna manera especificidad en los exudados.

Debido a que en uno de los casos (inmunodifusión # 3) hubo reacción con el exudado de A. niger, creemos que existe la posibilidad de que el animal haya tenido contacto con A. niger, por lo que el suero entonces contenía anticuerpos dirigidos contra A. niger, lo cual provocó que hubiera reacción antígeno-anticuerpo al ponerse en contacto con el exudado. Esto nos hace tener varias conjeturas: Primeramente si tomamos en cuenta este resultado, existe entonces la posibilidad de que los exudados micóticos sean producidos "in vivo" y no solamente "in vitro" como hasta la fecha ha sido reportado (Colotelo, 1978; Cervantes, 1983).

En **segundo lugar** y abordando desde otro punto de vista, se puede pensar entonces que hay antígenos similares entre los exudados micóticos y los diferentes antígenos que el hongo pueda producir dentro del organismo durante la infección y en **tercero** que exista una reacción cruzada entre especies o que compartan algún antígeno similar para todo el género, lo cual consideramos lo menos probable pues en la prueba realizada con el otro de los sueros de caso clínico la reacción no se produjo. Son conjeturas que están sujetas a comprobación.

Dado a que en ningún caso se observó identidad entre los diferentes antígenos probados, consideramos que éstos no comparten antígenos similares, coincidiendo con lo reportado por **Biguet y Vernes (1977)**, **Scholer (1977)** **Kim y Chaperon (1978)**, quienes establecen que existen una gran variedad de fracciones antigénicas dependiendo del tipo de antígeno de que se trate, pero a diferencia de estos reportes en los cuales se obtienen en el mismo tipo de antígeno muchas fracciones (evidenciadas por la presencia de varias líneas de precipitación al reaccionar con sueros y por estudios físicoquímicos), nuestros resultados muestran que los exudados micóticos no son tan variados en fracciones antigénicas, pues en todos los casos se obtuvieron líneas de precipitación únicas, lo cual representaría una gran ventaja sobre los demás tipos de antígenos con los que se cuenta hasta el momento, además de no provocar reacciones de precipitación inespecíficas cuando se ponen en contacto con sueros problema como lo ha reportado **Longbottom y Pepys** en 1964 y **Biguet y Vernes** en 1977.

Todo esto nos hace pensar que los exudados micóticos son antígenos de una pureza considerable.

Por otra parte, considerando que los exudados podrían clasificarse como antígenos metabólicos y basándonos en lo establecido por Longbottom en 1977, quien menciona que con este tipo de antígenos se producen dos tipos de reacciones de precipitación perfectamente diferenciadas, una con proteínas la cual se manifiesta como bandas claramente definidas y otra con polisacáridos determinada como bandas anchas y difusas, y tomando en cuenta la cantidad relativamente considerable de proteínas que pudimos encontrar en nuestros exudados nos hace pensar en la posibilidad de que las fracciones antigénicas presentes en los exudados sean primordialmente de tipo proteico, además de que autores como Atkinson y Memon (1977), Kim y col. (1978) y Hearn y Mackenzie (1979) han establecido que en los diferentes tipos de antígenos utilizados predominan las fracciones de tipo proteico y específicamente en forma de glucoproteínas.

Finalmente, podemos decir que el presente trabajo es uno de los primeros pasos que se dan en cuanto a la finalidad de analizar y tratar de conocer los factores que están involucrados en el complejo e interesante campo de la producción de los exudados micóticos, por lo que las preguntas y sobre todo las hipótesis al respecto son variadas y numerosas. Sin embargo, hemos podido determinar algunos de los factores que consideramos están involucrados y sobre todo hemos podido observar y confirmar la utilidad que los exudados micóticos tienen como antígenos, en especial en el género Aspergillus.

Todo esto, abre ante nosotros una amplia línea de investigación mediante la cual podría solucionarse el gran problema de diagnóstico que existe en muchos tipos de micosis y en especial en la aspergilosis.



## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, las conclusiones a las que podemos llegar son :

- El mejor sistema para la producción de exudados micóticos en el género Aspergillus es utilizando como condiciones de cultivo, Agar Sabouraud Dextrosa adicionado con dextrosa al 10%, cultivando a una temperatura de 37°C en el sistema de humedad de frasco de vidrio con tapón de rosca.
- La luz es poco significativa sobre la producción de exudados micóticos en el género Aspergillus
- La producción de exudado se presenta predominantemente durante la etapa de crecimiento activo de la colonia.
- Los exudados micóticos son buenos antígenos y su aplicación en el diagnóstico de la aspergilosis es bastante prometedora.

**A P E N D I C E**

**Buffer de Veronal (Barbituratos).**

Acido 5,5 -diethylbarbitúrico	$C_8H_{12}N_2O_3$	1.66 g
5,5-diethylbarbiturato sódico	$C_8H_{11}N_2O_3 Na$	12.76 g
Agua destilada		1000 ml

**Azida de sodio 0.1 M.**

Azida de sodio	$NaN_3$	3.25 g
Agua destilada		500 ml

**Citrato de sodio 5%.**

Citrato de sodio	$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	5.0 g
Agua destilada		100 ml

**Buffer de fosfatos (PBS) pH=8.2**

Cloruro de sodio	$NaCl$	8.0 g
Fosfato de potasio dibásico	$K_2HPO_4$	1.21 g
Fosfato de potasio monobásico	$KH_2PO_4$	0.34 g
Agua destilada		1000 ml

(75)

Solución colorante de Negro de amido

Negro amido (naftaleno)	1.0 g
Metanol=Acido acético=Agua	1000 ml

Solución decolorante de geles

Metanol	500 g
Acido acético glacial	100 ml
Agua destilada	400 ml

Los ingredientes se mezclan y la solución se conserva en un frasco ámbar.

**BIBLIOGRAPHIA**

- Agnihotri, V.P.(1964). Studies on Aspergilli.XVI.Effect of pH, temperature, and carbon and nitrogen interaction.Mycopathologia et Mycologia Applicata; 24 (4); 305=314.
- Arbesman, C.E.; Wicher, K.;Wypych, J.I.;Reisman, R.E.; Dickie, H. and Reed, C.E.(1974). IgE antibodies in sera of patients with allergic bronchopulmonary Aspergillosis. Clinical Allergy; 4;349=358.
- Atkinson, G.W. and Memon, N.A.(1977). Characterization and purification of precipitating antigens of Aspergillus fumigatus. Laboratory investigation; 36; 354=355.
- Bardana, E.J.(1978).Culture and antigen variants of Aspergillus. J. Allergy Clin. Immunol.; 61 (4); 225=239.
- Bardana E.J.; Gerber, J.D.; Craig, S. and Cianciulli, D.F. (1975). The general and specific humoral immune response to pulmonary Aspergillosis. Am. Rev. Respir. Dis.; 112;799=805.
- Biguet, J. and Vernes, A. (1977). Antigenic structure of Aspergillus. Proceedings of the 4 th International symposium on Aspergillosis and Farmer's lung in man and animals. Davos. ;53=57.

Campbell, C.M. and Stewart, J.L.(1980). The Medical Mycology Handbook. = 1a.ed.Ed.Jhon Wiley and sons. USA.

Cervantes, R.A.(1983). Studies on antigens of Aspergillus; Their use in Veterinary Mycology. Ph.D.Thesis. University of Glasgow, Scotland.

Colotelo, N.(1973). Physiological and biochemical properties of the exudate associated with developing sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) DeBary. Can. J. Microbiol.; 19; 73=79.

Colotelo, N.(1978). Fungal exudates. Can. J. Microbiol.; 24; 1173=1181.

Colotelo, N.; Summer, J.L. and Voegelin, W.S.(1971). Chemical studies on the exudate and developing sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) DeBary. Can. J. Microbiol.; 17; 1189=1194.

Conti=Diaz, J.A.; Somma=Moreira, R.E.; Gezuele, E.; DeJimenez, A.C.; Pena, M.I. and Mackinnon, J.E.(1973). Immunoelectrophoresis= Immunodiffusion in Paracoccidioidomycosis. Sabouraudia.; 11; 39=41.

Chaparas, S.D.; Kaufman, L.; Kim, S.J. and McLaughlin, D.V.(1980). Characterization of antigens from Aspergillus fumigatus. V. Reactivity in Immunodiffusion tests with serums from patients with Aspergillosis

caused by Aspergillus flavus, A. niger and A. fumigatus Am.Rev.Respir. Dis.;122;647=649.

Chaparas,S.D.;Worgan,P.A.;Holobaugh,P.and Kim,S.(1986).Inhibition of cellular immunity by products of Aspergillus fumigatus. Sabouraudia ;24;67=76.

DeMagali,S.W. and Mackenzie,D.W.R.(1984).Specificity of antigens from pathogenic Aspergillus species I.Studies with ELISA and Immunofluorescence.Sabouraudia.; 22;381-394.

Dewair, M. and Baur,X(1984).Radioallergosorbent test (RAST) for measurement of IgG antibodies to Aspergillus fumigatus in sera of patients with different lung diseases.J. of ImmunMeth.; 75;117=128.

Dupont,B.;Huber,M.;Kim,S.J. and Bennett,J.E.(1987).Galactomannan Antigenemia and Antigenuria in Aspergillosis: Studies in patients and Experimentally Infected Rabbits.J. infect.Dis.;155(1);1=11.

English,M.P. and Henderson,A.H.(1967).Significance and interpretation of laboratory tests in pulmonary Aspergillosis.J. Clin. Path.;20;832=834.

ESTA TERCERA NO DEBE  
SER DE LA BIBLIOTECA

Finegold, S.M.; Will, D. and Murray, J.F. (1959). Seminar on mycotic Infections Aspergillosis. A review and report of twelve cases.

Am. J. of Med.; 27:463=482.

Chazilkhanian, G. (1982). Aspergillosis, not a mystery. Poultry Dig.; 8:396=400.

Hart, R.J.; Patterson, R. and Sommers, H. (1976). Hyperimmunoglobulinemia E in a child with allergic bronchopulmonary Aspergillosis and Bronchiectasis. J. Pediatrics.; 89:38=41.

Hearn, V.M.; Donaldson, G.C. and Healy, J.J.R. (1987). A method to determine significant levels of immunoglobulin G to Aspergillus fumigatus antigens in a ELISA system and comparison with counterimmunoelectrophoresis and Double diffusion techniques. Myc. Ref. Lab. ; 1=18.

Hearn, V.W. and Mackenzie, D.W.R. (1979). The preparation and chemical composition of fractions from Aspergillus fumigatus wall and protoplasts possessing antigenic activity. J. Gen Microbiol.; 112 ;35=44

Hipp, S.S.; Berns, D.S.; Tompkins, V. and Buckley, H.R. (1970). Latex slide agglutination test for Aspergillus antibodies. Sabouraudia. ;8:237=241.

Ikemoto, H. and Shibata, S. (1973). Indirect haemagglutination in pulmonary Aspergilloma diagnosis. Sabouraudia; 11; 167=170.

Jawetz, E.; Welnick, J. L. y Adelberg, E. A. (1983). Microbiología Médica 10a. ed. Ed. El manual moderno. México.

John, J.; Wilson, E. V. and Hearn, V. M. (1984). Analysis of Aspergillus fumigatus Germ tube surface structures by an Immunofluorescent labelling Technique. Mykosen; 27(10) ; 485=497.

Khan, Z. V.; Richardson, M. D.; Warnock, D. W. and Lane, J. G. (1984). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of Aspergillus fumigatus intranasal infection of the dog. Sabouraudia; 22; 251=254.

Kim, S. J. and Chaparas, S. D. (1978). Characterization of antigens from Aspergillus fumigatus I. Preparation of antigens from Organisms Grown in completely synthetic medium. Am. Rev. Respir. Dis.; 118; 547=551

Kim, S. J.; Chaparas, S. D.; Brown, T. M. and Anderson, M. C. (1978). Characterization of antigens from Aspergillus fumigatus II. Fractionation and electrophoretic, Immunologic, and Biologic activity. Am. Rev. Respir. Dis. 118; 553=560.



Kim, S.J.; Sotiros, D.; Chaparas, S.D. and Buckley, H.R. (1979). Characterization of antigens from Aspergillus fumigatus IV. Evaluation of commercial and Experimentally preparations and fractions in the Detection of antibody in Aspergillosis. Am. Rev. Respir. Dis.; 120:1305-1311.

Kurup, V.P.; Resnick, A.; Scribner, G.H.; Kalbfleisch, J.H. and Fink, J.N. (1984). Comparison of antigens and serological Methods in Aspergillus fumigatus Antibody detection. Mykosen.; 27(1); 43-50.

Kurup, V.P. and Shelt, N. (1981). Experimental aspergillosis in rabbits. Comp. Immun. Microbiol. Inf. Dis.; 4 :161-174.

Lehman, P.F. and Reiss, E. (1978). Invasive Aspergillosis: Antiserum for circulating antigen produced after immunization with serum from Infected Rabbits. Infection and Immunity.; 20:570-572.

Longbottom, J. (1977). Physico-Chemical properties and antigenicity depending on different culture conditions. Proceedings of the 4th International symposium on Aspergillosis and Farmer's lung in man and animals. Davos.; 41=44.

Longbottom, J.L. and Pepys, J. (1964). Pulmonary Aspergillosis: Diagnostic and immunological significance of antigens and C-substance in Aspergillus fumigatus. J. Path. Bact.; 88; 141=153.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem.; 193; 265=275.

Mackenzie, D.W.R. (1975). Reference Materials and Procedures for serological testing of Mycoses. Recent advances in Medical and Veterinary Mycology. University park. Press. 37=42.

Mackenzie, D.W.R. and Philpot, C.M. (1975). Counterimmunoelectrophoresis as a routine mycoserological procedure. Mycopathologia. ; 57(1); 1=7.

Martinez, J.; Nieto, A.; Vives, J. and Torres, J.M. (1985). Application of ELISA=inhibition to Aspergillus antigen standardization for immunodiagnosis. Sabouraudia.; 23; 317=320.

Matsumoto, T. (1929). The investigation of Aspergilli by serological methods. Trans. Brit. Myc. Soc. XIV; 69=88.

Malo, J.L.; Longbottom, J.; Mitchell, J.; Hawkins, R. and Pepys, J. (1977). Studies in chronic allergic bronchopulmonary aspergillosis 3 Immunological findings. Thorax.; 32; 269=274.

Mallet, K.I. and Colotelo, N. (1984). Rhizomorph exudate of Armillaria mellea. Can. J. Microbiol.; 30; 1247=1252.

McPhee, W.J. and Colotelo, N. (1977). Fungal exudates. I. Characteristics of hyphal exudate in Fusarium culmorum. Can. J. Bot.; 55; 358=365.

Mishra, S.K.; Falkenberg, S. and Masihi, N.K. (1983). Efficacy of Enzyme Linked Immunosorbent Assay in serodiagnosis of Aspergilosis. J. of Clin. Microbiol.; 17 (4); 708=710.

Mishra, S.K.; Staib, F.; Rajendran, C. and Folkens, V. (1982). Serodiagnostic value of culture filtrate antigens from Aspergilli with septate phialides. Sabouraudia. ; 20; 63=74.

Murray, I.G. and Mahgoub, E.S. (1968). Further studies on the diagnosis of Mycetoma by double diffusion in agar. Sabouraudia. ; 6; 106=110.

Negróni, R.; Iovannitti, C. y Robles, A.M. (1977). Estudio sobre el valor diagnóstico de la inmunofluorescencia indirecta en la Aspergilosis pulmonar. Sabouraudia. ; 15 ; 195=200.

Pauwels, S.R.; Stevens, E.M. and Vander Straeten, M. (1976). IgE antibodies in bronchopulmonary Aspergillosis. Ann. Alle.; 37; 195=200

Pepys, J.; Riddell, R.W.; Citron, K.M.; Claton, Y.M. and Short, E.I. (1959). Clinical and immunologic significance of Aspergillus fumigatus in the sputum. Amer. Rev. Respir. Dis. ; 80:167-180.

Philpot, M.C. and Mackenzie, D.W.R. (1975). A comparison of Aspergillus fumigatus antigens by counterimmunoelectrophoresis. Mycopathologia. ; 58 (1):19-20.

Raper, B.K. and Fennell, D.I. (1965). The Genus Aspergillus. 1a.ed.Ed. The Williams and Wilkins company. USA. 3-6:82-126.

Reiss, E. and Lehman, P.F. (1979). Galactomannan Antigenemia in Invasive Aspergillosis. Infection and Immunity. ; 25 (1); 357-365.

Richardson, M.D. and Warnock, D.W. (1983). Review Article. Enzyme-linked immunosorbent assay and its application to the Serological diagnosis of fungal infections. Sabouraudia. ; 21 ; 1-14.

Richardson, M.D.; White, L.O. and Warren, R.C. (1979). Detection of circulating antigen of Aspergillus fumigatus in sera of mice and rabbits by enzyme-linked immunosorbent assay. Mycopathologia. ; 67 (2); 83-88.

Sabetta, J.R.; Minitier, P. and Ambricole, V.T. (1985). The diagnosis of invasive Aspergillosis by an Enzyme-linked immunosorbent assay for circulating antigen. J. Infect. Dis.; 152 (5); 946-953.

Schöneyder, H.J. (1977). Specific mycelial and conidial antigens from Aspergillus fumigatus. Proceedings of the 4th International symposium on Aspergillosis and Farmer's lung in man and animals. Davos; 45=52.

Schöneyder, H. and Andersen, P. (1982). An indirect immunofluorescence study of antibodies to A. fumigatus in sera from children and adults without Aspergillosis. Sabouraudia; 20; 41=50.

Schöneyder, H.; Storgaard, L. and Andersen, P. (1985). Variation of a 470000 daltons antigen complex and catalase antigen in clinical isolates of A. fumigatus. Sabouraudia; 23; 339=348.

Seeliger, H.P.R. (1982). Significance of Immunological Methods for Diagnosis of Fungal Disease. Chemotherapy; 28; 54=63.

Schaefer, J.C.; Yu, B. and Armstrong, D. (1976). An Aspergillus Immunodiffusion test in the early diagnosis of Aspergillosis in Adult leukemia patients. Am. Rev. Respir. Dis.; 113; 325=329.

shaffer, P.J.; Medoff, G. and Kobayashi, G.S. (1979). Demonstration of antigenemia by Radioimmunoassay in Rabbits experimentally Infected with Aspergillus. J. Infect. Dis.; 139:313-319.

Thurston, J.R.; Richard, J.L. and McMillen, S. (1973). Cultural and serological comparison of ten strains of Aspergillus fumigatus fresenius. Mycopath. et Mycol. appl.; 51(4);327-335.

Trigo, F.; Cervantes, R. y Ontiveros, L. (1978). Aspergilosis pulmonar en un bovino. Veterinaria México. ; 9 ;103-187.

Warnock, D.W. and Eldred, G.P. (1975). Immunoglobulin classes of antibodies to Aspergillus fumigatus in patients with pulmonary Aspergillosis. Sabouraudia. ; 13; 204-208.

Warnock, D.W. and Hann, E.M. (1981). Further evaluation of indirect immunofluorescence methods for detection of antibodies against A. fumigatus. Sabouraudia.; 19 ; 45-54.

Warren, R.C.; White, L.O.; Mohan, S. and Richardson, M.D. (1979). The occurrence and treatment of false positive reactions in Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the presence of fungal antigens in clinical samples. J. Immunol. Meth.; 28;177-186.

White, L.O.; Richardson, M.D.; Newham, H.C.; Gibb, E. and Warren, R.C. (1977). Circulating antigen of Aspergillus fumigatus in cortisone-treated mice challenged with conidia: Detection by counterimmunoelectrophoresis. FEMS. Microbiol. Lett.; 12;153;156.

Wilson, E.V.; DeMagali, S.W. and Hearn, V. (1984). Preparative Isoelectric focusing of Immunologically reactive components of Aspergillus fumigatus mycelium. J. Gen. Microbiol.; 130;919-925.

Yarzabal, L.A.; Dealbornoz, M.B.; DeCabral, N.A. and Santiago, A.R. (1978). Specific double diffusion microtechnique for the diagnosis of Aspergillosis and Paracoccidioidomycosis using monospecific antisera. Sabouraudia. ; 16(1);55=62.

Young, R.C. and Bennett, J.E. (1971). Invasive Aspergillosis; Absence of detectable antibody response. Am. Rev. Respir. Dis. ; 104;710=716.

Yu, B.H. and Armstrong, D. (1975). Serological Tests for invasive Aspergillus and Candida Infections in patients with Neoplastic Disease. Recent advances in medical and Veterinary Mycology. Proceedings of the sixth Congress of the International Society of the Human and Animal Mycology. University park. Press. Tokyo 47=58.

Yuan, L. and Cole, G.T. (1987). Isolation and characterization of an Extracellular Proteinase of Coccidioides immitis. Infect. and Immun. ; 55(9); 1970-1978.