

# Evaluación de la reactividad de un antígeno purificado de *Paracoccidioides brasiliensis* frente a sueros de Paracoccidioidomicosis e Histoplasmosis \*

par J. M. TORRES (1), S. Da LUZ \*, M. H. LOPEZ-LEMES \*, J. GUI SANTES \*.  
M. JOSEF \*, A. NIETO \*\*, J. COCH \*\* et L. A. YARZABAL (2)

\* *Laboratorio de Inmunología Parasitaria, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.*

\*\* *Cátedra de Físico/Química, Facultad de Química y Farmacia, Montevideo, Uruguay.*

## *Resumen.*

Se evaluó la reactividad de un antígeno metabólico « crudo » y de un extracto metabólico « purificado » de *P. brasiliensis*, mediante inmuno-electroforesis, frente a 10 sueros de paracoccidioidomicosis y 6 de histoplasmosis.

Ambos antígenos dieron origen al sistema precipitante específico en 9 de los 10 sueros de paracoccidioidomicosis. El antígeno « crudo » reveló anticuerpos precipitantes en todas las muestras estudiadas, aunque el número de arcos formados fue mayor en los inmunosueños homólogos. El antígeno « purificado », por el contrario, solo reaccionó con los sueros de paracoccidioidomicosis.

Se postula que el uso del antígeno « purificado » puede reducir significativamente el riesgo de inespecificidad en pruebas como la doble difusión en gel, que presentan reacciones cruzadas con sueros de otras micosis, especialmente con la histoplasmosis.

(1) *Dirección actual*: Instituto Municipal de Investigación Médica, Sec. Microbiología y Serología, Paeso Marítimo S/n, Barcelona 3, España.

(2) *Dirección actual*: Service d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Faculté de Médecine, F. 59000 Lille.

### Summary.

#### Reactivity of crude and purified antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* against sera of confirmed cases of Paracoccidioidomycosis and Histoplasmosis.

The immunoelectrophoretic reactivity of a « crude » and a « purified » antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* against the sera of confirmed cases of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis was evaluated.

The « crude » antigen revealed precipitating antibodies in both the homologous and the heterologous human sera ; the number of precipitating systems being higher with the former.

The « purified » antigen reacted only with the homologous sera.

It is postulated that the use of such « purified » antigen may significantly reduce the non specificity of the serologic tests in the immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis.

### Résumé.

#### Evaluation de la réactivité d'un antigène purifié de *Paracoccidioides brasiliensis* sur des sérums de Paracoccidioidose et d'histoplasmosis.

Les auteurs présentent les résultats d'une évaluation de la réactivité immunoélectrophorétique d'un antigène « brut » et d'un antigène « purifié » de *Paracoccidioides brasiliensis*, effectuée sur sérums humains provenant de cas confirmés de paracoccidioidomycose et d'histoplasmosis. L'antigène « brut » a révélé des anticorps précipitants aussi bien dans les sérums homologues que dans les sérums hétérologues ; les premiers ayant donné lieu à un nombre plus élevé de systèmes précipitants. L'extrait « purifié », par contre, a réagi seulement avec les sérums homologues. Quelle que soit la méthodologie utilisée, l'emploi de l'antigène « purifié » doit permettre d'aboutir à un diagnostic immunologique spécifique de la paracoccidioidomycose.

## Introduction

El perfeccionamiento de los métodos de preparación, análisis y estandarización de los antígenos de origen fúngico, ha posibilitado la aplicación de numerosas técnicas serológicas al diagnóstico de la paracoccidioidomycosis [2, 3, 5, 7, 8, 10, 12]. Paralelamente ha permitido determinar en forma parcial la composición antigénica del agente de la enfermedad. Así, la doble difusión en gel (DDG) y el análisis inmunoelectroforético (AIE) han puesto en evidencia que *Paracoccidioides brasiliensis* posee, por un lado, antígenos específicos de la especie, y por otro, determinantes antigénicos comunes con *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Emmonsia crescens*, *E. parva*, *Histoplasma capsulatum* e *H. duboisii* [1, 13, 14].

Estos antígenos comunes constituyen, seguramente, una de las causas más importantes de las reacciones cruzadas que han sido observadas en varias de las pruebas serológicas aplicadas al diagnóstico de la micosis [2, 3, 9, 10, 12].

Dichas reacciones cruzadas son particularmente indeseables en el caso de la histoplasmosis, debido a la superposición de ambas enfermedades en extensas regiones de América del Sur [4]. Por lo tanto, es altamente recomendable la eliminación de los antígenos no específicos contenidos en los reactivos destinados al inmunodiagnóstico de la paracoccidioidomicosis.

Afortunadamente la mayor parte de los componentes del « mosaico » antigénico de *P. brasiliensis* se separa claramente durante la electroforesis en gel, a pH alcalino. En esas condiciones los antígenos comunes con otras especies de hongos, se movilizan hacia el sector anódico de las láminas [12, 13, 14].

Tomando en cuenta este hecho, en nuestros Laboratorios se ha logrado preparar, mediante el uso de intercambiadores iónicos, un extracto antigénico « purificado » de *P. brasiliensis* del que se han eliminado la mayor parte de las fracciones aniónicas solubles del hongo [6].

En el presente estudio se intenta evaluar simultáneamente la reactividad de este extracto « purificado » y de un antígeno metabólico « crudo » del hongo, frente a sueros de pacientes afectados de paracoccidioidomicosis e histoplasmosis.

## Materiales y metodos

### A) Antigenos.

El antígeno metabólico « crudo » se preparó a partir del medio de cultivo de la fase filamentosa de *P. brasiliensis* [Cepas IHM (3) 891, IHM 1 437, IHM 1 572, LIP (4) 70 159] empleando el procedimiento descrito por uno de nosotros (12).

El antígeno « purificado » se obtuvo sometiendo el anterior a cromatografía en columna de Sephadex DEAE A-50, con tampón Tris HCl, pH 8,2 según el método descrito por Nieto *et al.* [6].

### B) Sueros.

Entre las muestras de sueros almacenados en el LIP desde 1967, se seleccionaron 10 de ellas obtenidas de pacientes afectados de paracoccidioidomicosis y 6 extraídas de enfermos con histoplasmosis. En todos los casos el diagnóstico había sido confirmado por la identificación del agente causal. Los sueros permanecieron desde su extracción a — 20 °C con Merthiolate® al 1 : 10 000, y se concentraron 3 veces mediante liofilización en el momento de ser empleados.

### C) Inmunolectroforesis (IEF).

Se empleó la microtécnica recomendada por Scheidegger utilizando tampón Veronal sódico (pH 8,2, fuerza iónica 0,1) y un soporte de agarosa al 0,9 %. La

(3) Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

(4) Laboratorio de Inmunología Parasitaria, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

migración duró 90 minutos bajo una diferencia de potencial de 20 voltios. Los antígenos « crudo » y « purificado » fueron redisueltos en el tampón de veronal hasta lograr concentraciones de 200 y 10 mg/ml respectivamente.

Después de 48 horas de incubación (24 a temperatura ambiente, y 24 a 4 °C) los portaobjetos con la agarosa fueron sumergidos en solución de citrato trisódico durante una hora. Posteriormente, una vez lavados, desmineralizados y secados, se colorearon con Amido-Schwarz. Para la presentación y análisis de los resultados se tomó en cuenta la lectura efectuada después de la coloración.

## Resultados

Ambos reactivos antigénicos pusieron en evidencia anticuerpos precipitantes en los 10 sueros de pacientes con paracoccidiodomicosis. El antígeno metabólico « crudo » siempre originó múltiples sistemas de precipitación cuyo número varió entre 2 y 7. El antígeno « purificado » formó sólo un arco con 9 de los sueros, y dos con el restante (*Tabla I*).

TABLE I. — Resultados comparativos de la inmunolectroforesis de 10 sueros de paracoccidiodomicosis empleando antígenos metabólicos « crudo » y « purificado » de *P. brasiliensis*.

Sueros	Número de arcos de precipitación	
	antígeno « crudo »	antígeno « purificado »
E.C. ....	4 (E) .....	1 (E) .....
J.P. ....	3 (E) .....	1 (E) .....
J.L. ....	3 (E) .....	1 (E) .....
A.F. ....	2 (E) .....	1 (E) .....
J.R. ....	3 (E) .....	1 (E) .....
A.C. ....	3 (E) .....	1 (E) .....
J.L. ....	2 (E) .....	1 (E) .....
C.M. ....	6 (E) .....	1 (E) .....
J.B. ....	7 (E) .....	2 (E) .....
V.V. ....	5 (E, dudoso) .....	1 (E, dudoso) .....

Se señala con (E) aquellos casos en que el arco E fue identificado sin ninguna duda.

Todos los arcos generados por el antígeno « purificado » se distribuyeron en el sector catódico de las láminas. El arco E fue claramente identificado en los diagramas inmunolectroforéticos correspondientes a 9 de los sueros, cualquiera fuera el antígeno empleado (*fig. 1*).

El antígeno « crudo » de *P. brasiliensis* dio origen a arcos de precipitación frente a los 6 sueros de histoplasmosis, variando su número entre 1 y 2. Esto no ocurrió cuando los mismo sueros fueron enfrentados al antígeno « purificado » (*Tabla II*).

El arco E no estuvo comprendido entre los sistemas precipitantes resultantes de la interacción de los sueros de histoplasmosis y el antígeno metabólico « crudo » de *P. brasiliensis*.

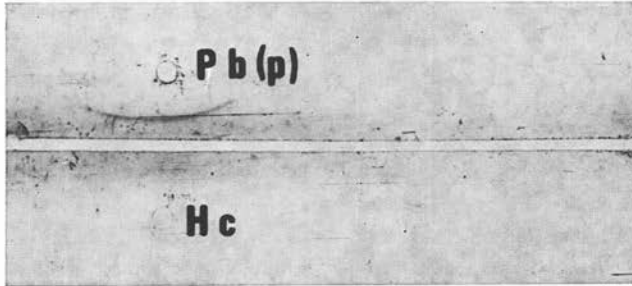


FIG. 1. — Arco E formado por el suero de un paciente de paracoccidiodomicosis (ranura central) frente al antígeno metabólico « purificado » (Pbp). En el hoyo inferior se ha colocado antígeno de *Histoplasma capsulatum* (HC).

TABLA II. — Resultados comparativos de la inmunolectroforesis en 6 sueros de histoplasmosis empleando antígenos metabólicos « crudo » y « purificado » de *P. brasiliensis*.

Sueros	Número de arcos de precipitación	
	antígeno « crudo »	antígeno « purificado »
64 048 *	1	0
64 085 *	1	0
64 103 *	1	0
70 354 *	2	0
1 853 **	1	0
5 343 **	1	0

\* Sueros almacenados en el Laboratorio de Inmunología Parasitaria, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay.

\*\* Sueros enviados por el Dr. Leo Kaufman (Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, U.S.A.).

## Comentarios

Los antígenos catiónicos de *P. brasiliensis*, aislados mediante intercambio iónico a partir de un extracto metabólico del hongo, desempeñan evidentemente un importante papel en las reacciones inmunodiagnósticas de la paracoccidiodomicosis. Dentro de los límites de la experiencia presentada, el antígeno « purificado » reaccionó con todos los sueros de paracoccidiodomicosis que contenían anticuerpos precipitantes contra el antígeno metabólico « crudo », siendo tan eficaz como éste para revelar el sistema precipitante específico de la micosis (arco E). Este arco no se observó en los 6 sueros

de histoplasmosis estudiados con ninguno de los 2 antígenos (« crudo » y « purificado »). La especificidad y la sensibilidad de la inmunolectroforesis no resultaron modificadas por la eliminación de las fracciones aniónicas de *P. brasiliensis*.

El arco E resulta fácilmente identificable aunque la técnica se realice con antígenos « crudos », por lo tanto, no se justifica recurrir al proceso de purificación del extracto si se va a emplear la inmunolectroforesis como prueba diagnóstica.

La situación podría ser diferente si se selecciona para este fin la doble difusión en gel. Esta prueba, de ejecución más simple y rápida, puede ser realizada en Laboratorios mínimamente equipados, y sólo ve limitado su valor en la paracoccidiodomicosis por la posible aparición de reacciones cruzadas.

Las observaciones precedentes indican que el método de purificación escogido, al eliminar las fracciones aniónicas solubles de *P. brasiliensis*, minimiza el riesgo de aparición de reactividad inespecífica en las pruebas de inmunoprecipitación. Los preparados antigénicos así depurados podrían, entonces, aumentar significativamente el margen de seguridad de la doble difusión, lo que simplificaría notablemente el inmunodiagnóstico de la paracoccidiodomicosis.

### Bibliografía

1. ANDRIEU (S.), BIGUET (J.), DUJARDIN (L.) et VAUCELLE (T.), 1969. — Etude antigénique des agents des mycoses profondes par l'analyse comparée des milieux de culture. I. *Histoplasma capsulatum* et *H. duboisii*. Relations avec *H. farciminosum*, *Gymnoascus demonbreunii*, *Blastomyces dermatitidis* et *Paracoccidioïdes brasiliensis*. *Mycopath. et Mycol. Appl.*, 39, 97-108.
2. FAVA-NETTO (C. A.), 1955. — Estudos quantitativos sobre a fixacao do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polisacaridico. *Arq. Clin. Exp.*, 18, 197-254.
3. FAVA-NETTO (C. A.), 1961. — Contribuicao para o estudo immunologico da Blastomicose de Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 21, 99-194.
4. FURCOLOW (M. L.), 1970. — Future trends in the mycosis in Latin America, 265-268. *Proc. Int. Symp. Mycosis*, n° 205. PAHO Sc., Publ., Washington, D.C.
5. MAEKELT (C. A.), 1960. — Estudio sobre el valor de antígenos de *H. capsulatum* y *P. brasiliensis* para el serodiagnóstico de estas micosis. *Arch. venezolano Med. trop. Parasitol. Med.*, 3, 149-160.
6. NIETO (A.), COCH (J. A.), TORRES (J. M.) et YARZABAL (L. A.), 1973. — Aismiento de antígenos catiónicos de *Paracoccidioïdes brasiliensis* por intercambio ionico. *Mycopath. Mycol. Appl.* (à paraître).
7. RESTREPO (A.), 1966. — La prueba de inmunodifusión en el diagnostico de la paracoccidiodomicosis. *Sabouraudia*, 4, 223-230.
8. RESTREPO (A.) et DROUHET (E.), 1970. — Etude des anticorps précipitants dans la blastomicose sud-américaine par l'analyse immunoélectrophorétique des antigènes de *P. brasiliensis*. *Ann. Inst. Pasteur*, 119, 338-346.

9. RESTREPO (A.) et MONCADA (L. H.), 1970. — Serological procedures in the diagnosis of paracoccidioidomycosis, 101-110. *Proc. Int. Symp. Mycosis*, n° 205. PAHO Sc., Publ., Washington, D.C.
  10. RESTREPO (A.) et MONCADA (L. H.), 1972. — Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion tests for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Appl. Microbiol.*, 24, 132-137.
  11. SCHEIDEGGER (J.-J.), 1955. — Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Al. App. Imm.*, 7, 103.
  12. YARZABAL (L. A.), 1971. — Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomycosis sudamericana revelados por immunoelectroforesis. *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo*, 13, 320-327.
  13. YARZABAL (L. A.), BIGUET (J.), VAUCELLE (T.), ANDRIEU (S.), TORRES (J. M.) et DA LUZ (S.), 1973. — Análisis inmunoquímico de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, 11, 80-88.
  14. YARZABAL (L. A.), TORRES (J. M.), JOSEF (M.), VIGNA (I.), DA LUZ (S.) et ANDRIEU (S.), 1971. — Antigenic mosaic of *Paracoccidioides brasiliensis*, 239-244. *Proc. Pan. Am. Symp. Paracoccidioidomycosis*, n° 254. PAHO SC., Publ., Washington, D.C.
-