

394

DETENCION DE COMPONENTES PROTEICOS Y GLUCOPROTEICOS DE
ANTIGENO MICELIAL DE ASPERGILLUS FUMIGATUS

INVESTIGADORES PRINCIPALES

DORIS GOMEZ CAMARGO
LORENA MARRUGO FERNANDEZ
CARLOS A. URIBE RIOS

CO-INVESTIGADOR

MARTHA PUELLO HOYOS

S C I B

00032002

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

1994

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCION	1
1. OBJETIVOS	12
2. JUSTIFICACION	13
3. METODOLOGIA	15
4. RESULTADOS	20
✓ 5. CONCLUSIONES	21
6. RECOMENDACIONES	23
BIBLIOGRAFIA	24
ANEXOS	28

INTRODUCCION

El género Aspergillus, comprende cientos de especies, pero sólo unos pocos han sido relacionados consistentemente con afecciones en el hombre y en animales.

El término Aspergilosis designa una serie de afecciones diversas producidas por hongos del género Aspergillus. Las afecciones más frecuentes ocurren a nivel del pulmón, pero realmente no existe órgano ni sistema que no sea afectado por estos hongos.

El término "Aspergillus", fué usado por primera vez en 1850, por Fresenius, en un trabajo propio sobre infección fúngica en el saco aéreo de un pájaro; dando al microorganismo aislado el nombre de Aspergillus fumigatus; siendo Sluyter probablemente el primero en informar un caso de Aspergilosis en el hombre. En 1856, Virchow publicó un informe en el cual describía exactamente el agente etiológico que permitió identificarlos como Aspergillus fumigatus.

Existen alrededor de 900 especies dentro del género

Aspergillus. Ellas constituyen el mayor número de todos los hongos ambientales. En orden de importancia son: Aspergillus fumigatus, A. flavus, A. terreus, A. nidulans, A. clavatus y otras especies.

Los mohos del género Aspergillus son cosmopolitas y logran proliferar bajo diversas condiciones ambientales, necesitando tan sólo una fuente de material orgánico y alguna humedad. Son básicamente organismos oportunistas, que se aprovechan de ciertas alteraciones del huésped para producir trastornos. Dentro de este grupo existen alrededor de 170 especies y variedades de importancia médica y económica.

El gran número de especies dentro del género Aspergillus dificulta la investigación. A fin de superar esta dificultad el género Aspergillus se ha dividido en 18 grupos en función de sus similitudes morfológicas. La identificación se basa en la apariencia macroscópica de las colonias y en la caracterización microscópica de las diferentes estructuras asexuadas y sexuadas producidas por algunas especies.

Los mohos del género Aspergillus, se reproducen más a menudo en la forma asexual (anamorfo). Las cepas de algunas especies tienen también la capacidad de

desarrollar una forma sexual (teleomorfo) .po.

El Aspergillus fumigatus crece rápidamente en agar Sabouraud o en agar solución Czapek (25° C. a 37° C.) produciendo una colonia blanca, que rápidamente se convierte a gris verdosa, con la producción de conidias.

El reverso es generalmente incoloro, la masa de cabezas de conidias son columnas compactas y a menudo llenas; el rango de tamaño va de 400 a 50 micras. La textura puede variar de aterciopelado a pulverulento fino, presento como características microscópicas las siguientes:

- Cabeza conidiana, va de verde claro a verde oscuro. Su forma típica de columna a veces es muy compacta.
- Vesícula, en forma de mazo; fértil a partir de la mitad o las tres cuartas partes superiores de la misma. Es de 20 a 30 micras de diámetro, produciendo en la parte superior una simple serie de fiálides.
- Esterigmas o fiálides, una sola serie llevada directamente por las vesículas y son paralelas al eje del conidióforo.
- Conidióforo, corto, liso y coloreado de verde en la zona terminal.
- Conidias, redondas o elípticas, equinuladas ligeramente rugosas.

- Peritecios, presentes en algunas especies por producir colonias planas.

En el hombre el parasitismo es relativamente raro, más aún si se tiene en cuenta la frecuencia con la que se encuentran las esporas formando parte de la microflora de las cavidades naturales, sobre todo en el tracto respiratorio.

Las conidias son las unidades infectantes o sensibilizantes, y su penetración en el organismo puede hacerse por muchas vías, pero la respiratoria es la más importante.

La Aspergilosis humana puede ser primaria, afectando individuos con condiciones predisponentes tales como terapias prolongadas de antibióticos, esteroides en pacientes debilitados por enfermedades como el cáncer, leucemia, trasplantes o en personas que han sufrido traumas con material contaminado como es el caso de la queratitis, micetomas, etc.

El 90% de las infecciones por Aspergillus son atribuidas a la especie Aspergillus fumigatus; otras especies han sido reportadas en un porcentaje menor de casos, estas observaciones no son sorprendentes ya que muchos microorganismos oportunistas son hábiles de desarrollarse

en pacientes inmunosuprimidos; esto es por supuesto, un ejemplo, pero sabemos que la distribución de las especies se afecta por las condiciones ambientales que varían de un lugar a otro.

Los Aspergillus poseen un mosaico completo de antígenos proteicos, glucoproteicos y polisacáridos. Cerca de 60 diferentes componentes antigénicos han sido descubiertos en extractos de Aspergillus fumigatus y anticuerpos precipitantes contra más de 30 componentes han sido encontrados en suero de pacientes con Aspergiloma.

Los antígenos que se han utilizado son: celulares obtenidos del sobrenadante de micelio roto, y metabólicos, estos últimos constituidos por el filtrado después del desarrollo en medios líquidos con fracciones ricas en polisacáridos, parcialmente purificados por precipitación de dicho filtrado con acetona.

Algunas investigaciones se han enfocado en la pared estructural y en los componentes activos de las conidias, es decir, en los antígenos conidiales. Los antígenos conidiales difieren considerablemente de los antígenos miceliales; sin embargo en la actualidad muchos estudios han demostrado que los que son obtenidos a partir del micelio fúngico o de los productos extracelulares muestran

propiedades de unirse a la Ig E.

Los polisacáridos de las paredes hifales están compuestos por glucanos y quitina a concentraciones entre 50 y 80% de peso seco. El galactomanano y el galactosaminogalactano son compuestos menores, también están presentes en pequeñas cantidades, proteínas y lípidos. Los galactomananos son un grupo de polisacáridos ampliamente estudiados con una estructura no bien definida, con características antigénicas y a los que se les ha atribuido ser los responsables en cierto grado, de la reactividad cruzada intra e interespecie de los hongos y además de ser el tipo ó la clase de antígeno que con mayor frecuencia se ha aislado del suero de pacientes con aspergilosis.

Los constituyentes hidrosolubles de Aspergillus obtenidos por la ruptura física del micelio, han probado ser una fuente rica en antígenos para uso diagnóstico y con el uso de cultivos jóvenes, se evita el efecto adverso de la exposición prolongada del antígeno a enzimas autolíticas.

Un antígeno de 58 kD encontrado en extracto micelial de Aspergillus fumigatus demostró estar compuesto en un 50% de proteína, al ser teñido con azul de Coomassie, conteniendo además carbohidratos. Dicho antígeno fue

purificado, por cromatografía de inmunoafinidad empleando anticuerpos monoclonales. El análisis del antígeno purificado por cromatografía de gas- líquido reveló la presencia de manosa, galactosa y residuos de glucosa en una proporción 1:16:1. Las proteínas contienen cantidades relativamente altas de ácido glutámico y aspártico, glicina, alanina, serina y treonina, también posee grupos prostéticos como parte de su estructura.

Azuma y cols. analizaron una fracción carbohidrato de APS-K 66 (que es una proteína galactomanano extraída con piridina del micelio desgrasado de Aspergillus fumigatus), y el galactomanano obtenido por extracción con alcohol, precipitación fraccionada con acetona y cromatografía de intercambio iónico.

Se analizaron también antígenos con un peso molecular de 150 a 200 kD, que se unían a la concanavalina A, utilizando una inmunolectroforesis cruzada en gel indicando la presencia de residuos terminales de D - manosa - piranosa y D- glucosa - piranosa.

Weisnes y Coast Stephen (1979), fraccionaron un homogeneizado del sobrenadante de Aspergillus fumigatus en Sephacril S-200 para obtener una glucoproteína acidica con peso molecular de 150 a 180 kD.

Los Antígenos de Aspergillus fumigatus y otras especies Aspergillus con actividad enzimática han sido demostrados mediante inmunoelectroforesis siendo visualizada dicha actividad empleando los sustratos adecuados.

Trans Van Ky y cols. identificaron 18 antígenos activos enzimáticamente incluyendo fosfatasa, enterasa, deshidrogenasa, proteasa, catalasa y amilasa; y de acuerdo a los estudios reportados por Saccagochi y col. y Azuma y col. demostraron que la estructura de Aspergillus fumigatus definida como el galactomanano tiene un papel inmunológicamente importante.

Bordalaye y Nordin, Reiss y Lehman caracterizaron los galactomananos después de extracción alcalina a partir de la pared celular de A. niger y A. fumigatus.

Algunos estudios de tejidos invadidos por Aspergillus fumigatus en los que se usaron secciones delgadas con lectinas conjugadas con fluoresceína, mostraron una fuerte coloración las lectinas específicas para N - acetilgalactosamina y D- galactosa con una reacción moderada en las lectinas específicas para los residuos de S- manosa y D- glucosa.

El uso de la electroforesis en gel de policrilamida (SDS

- PAGE 1), ha permitido el estudio del antígeno de A. fumigatus, identificándose o detectándose, en una serie de diferentes estudios, fracciones antigénicas.

Girault y cols. identificaron un antígeno de 250 kD, en suero de pacientes, el cual se purificó por cromatografía de intercambio y filtración de gel.

Reiss y Lehman identificaron fracciones antigénicas de 27 y 75 kD correspondientes a un antígeno de 124 kD, este se obtuvo del suero de pacientes infectados.

Kurup y cols. separaron componentes extracelulares de cultivos jóvenes preparados en Sephadex G-75, usando electroforesis bidimensional y encontraron unidades antigénicas de 20, 40, y 80 kD, las cuales fueron purificadas por cromatografía de afinidad.

Piechura y cols. en un test de inmunodifusión en suero de pacientes con Aspergiloma y Aspergilosis alérgica broncopulmonar, encontraron fracciones antigénicas de 41, 53 y 83 kD obtenidas por SDS - PAGE.

Schonheider y Anderson, separaron unas fracciones antigénicas de peso molecular entre 25 y 50 kD, de un antígeno de 250 kD, a partir del suero de pacientes con Aspergiloma, usando inmunoelectroforesis.

Bessie Yu y cols. detectaron en suero y orina de ratas infectadas, fracciones antigénicas de 88, 40, 27 y 20 kD por medio de electroforesis, SDS - PAGE e inmunotransferencia.

Laige y cols. separaron un antígeno de 18 kD de suero de pacientes con Aspergiloma, dicha fracción es una proteína básica y fue purificada por cromatografía de intercambio catiónico.

Burnie y Matthews, encontraron unas bandas correspondientes a fracciones antigénicas de 88, 84, 51 y 40 kD obtenidas por inmunotransferencia de suero de pacientes infectados.

En resumen, se puede decir que los estudios referentes a los antígenos de A. fumigatus y otras especies han avanzado rápidamente en los últimos años. Este género de hongos está repartido extensamente en la naturaleza, su observación micro - macroscópica y los cultivos en serie no son suficientes para establecer un diagnóstico de certeza. En vista de esto es de suma importancia determinar las fracciones proteicas y glucoproteicas por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida, el cual es un método analítico de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida. Los geles de

poliacrilamida resultan de la polimerización de largas cadenas de acrilamida monomérica con bis - acrilamida en presencia de un iniciador del proceso. Experimentalmente la electroforesis en gel de poliacrilamida puede efectuarse en tubos o en placas. La electroforesis en gel de poliacrilamida puede desarrollarse también usando soluciones buffer que contienen sustancias disociantes en especial detergentes no iónicos, una de las más usadas es el Dodecilsulfato de Sodio (SDS). Este método conocido como Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS ó SDS-PAGE, permite por comparación de sustancias de pesos moleculares conocidos que han sido corridas simultáneamente, determinar el peso molecular relativo de los productos en análisis.

1. OBJETIVOS

Detectar fracciones protéicas y glucoprotéicas en el antígeno micelial de Aspergillus fumigatus, utilizando la técnica SDS-PAGE, determinando con ésta, los pesos moleculares relativos de las proteínas del antígeno analizado y relacionándolos con los pesos moleculares relativos de estándares.

este trabajo. Se basó en los principios de las técnicas de inmunología y microbiología para la caracterización de antígenos miceliales de Aspergillus fumigatus.

2. JUSTIFICACION

En nuestro medio no se conoce la incidencia real de la Aspergilosis en la población general, esto debido a la falta de técnicas de diagnóstico rápidas y sensibles, con el siguiente problema de tener que determinar si el crecimiento obtenido corresponde al agente causal de la enfermedad y no se trata de un contaminante.

De ahí la necesidad de caracterizar, un antígeno de Aspergillus fumigatus propio de nuestra región ya que se han descrito diferencias antigénicas que pueden ocurrir aún entre lote y lote de antígenos preparados, además las técnicas para detectar anticuerpos específicos contra Aspergillus, han demostrado pobre sensibilidad, de modo que actualmente se está incrementando la atención hacia las pruebas que detecten antígenos.

Por todo esto; y basándonos en un trabajo de post-grado de Microbiología sobre extracción y caracterización de antígeno Micelial de Aspergillus fumigatus realizado en la Universidad de Cartagena, identificamos los componentes proteicos y glucoproteicos de dos antígenos miceliales.

Con este trabajo, se le brinda a las áreas clínicas, la posibilidad de discutir, evaluar y proponer investigaciones futuras, dirigidas a lograr un mejor diagnóstico y manejo de la Aspergilosis.

...ativo de Schiff Acido ...

3. METODOLOGIA

... de proteínas ...

... curado ...

Se utilizaron dos tipos de Antígeno micelial de A. fumigatus; uno de tipo filtrado pasado a través de una membrana de 0.45 micras y el otro llevado hasta el proceso de diálisis (Punto de corte 12.000 daltons), obtenido en el laboratorio del post-grado de microbiología a partir de cepas puras de A. fumigatus en medios líquidos. El antígeno micelial presentó una concentración de proteínas totales de 8.800 µgs/ml, por el método de Bradford y una concentración de carbohidratos totales de 2.452,5 µgr/ml por el método Fenol-Ácido Sulfúrico de Dubois, encontrándose mayor concentración de galactosa (38,6%) comparada con la de otros carbohidratos (31% de glucosa y 30.5% de xilosa). En antígeno micelial filtrado se utilizó con el fin de compararlo con el dializado.

Se determinaron las fracciones protéicas y glucoprotéicas por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida (Técnica de Laemmli modificada) y las fracciones protéicas se tiñieron con azul de Coomasie y las

S C I B

00032002

glucoproteicas con reactivo de Schiff Acido peryódico (PAS).

Se utilizó una solución patrón de proteínas (Merck N9 15125), obtenida por eslabonamiento cruzado altamente purificado de lisozima de peso molecular de 14.300 g/mol con dietil pirocarbonato, y luego liofilizado. Los oligómeros que se encontraron poseían pesos moleculares de 14300, 28600, 42900, 57200 y 71500 daltons. Esta solución se preparó disolviendo el contenido del vial (2 mg) en 1 ml. de solución buffer diluyente de la muestra.

Se usó un equipo para electroforesis vertical Miniprotean II Dual Cell Bio - Rad.

Se armó el equipo y se probó con agua para observar que no hubo fuga entre los cristales; se sacó el agua y se agregó el gel separador hasta el nivel. Se dejó una hora para que gelificara; luego se pasó a agregar el gel apilador colocando el peine, dejando gelificar por una hora.

Entonces se sacó el peine y se colocaron los geles en la cubeta electroforética llenándola con tampón electroforético y se pasó a dispensar el antígeno y las proteínas estándares mezclados con el diluyente de la muestra.

Antes de usar las muestras, estas se sometieron a calentamiento durante 5 minutos a 100°C con la solución diluyente, al igual que los patrones de peso molecular.

Con una microjeringa de 50 µl entre los dos cristales colocamos 20 µl de las muestras en cada uno de los pozos dejados por el peine. Se conectaron los electrodos y se aplicaron 140 a 150 voltios constantes por 90 - 110 minutos, hasta que la línea azul marcadora de las corridas llegó al final del gel de separación, entonces se sacaron cuidadosamente los geles, se colocaron en una cubeta con solución colorante Azul de Coomasie para proteínas por 20 - 30 minutos con agitación. Antes de colorear el gel este se midió. Después se decoloró, cambiando el decolorante varias veces durante las dos primeras horas, luego se dejó en esta solución durante toda la noche. Una vez se observaron bien las bandas se pasó a la lectura del gel; para ello se midió con un pie de rey el tamaño del gel, el frente de la corrida y cada una de las bandas aparecidas, calculamos la movilidad relativa de cada fracción (Rf), según la ecuación:

$$Rf = (DMP / DMC) * (LGAT / LGDT)$$

Donde : DMP = Distancia de la migración de la proteína

DMC = Distancia de la migración del colorante

LGAT = Logaritmo del tamaño del gel antes de la tinción.

LGDT = Logaritmo del tamaño del gel después de la tinción.

Con las proteínas patrón se hizo una recta de regresión y se extrapolaron en ella los pesos moleculares de cada fracción de las muestras a estudiar.

Se probaron diferentes diluciones y concentraciones del antígeno así:

DILUCIONES

Antígeno (ml) Diluyente (ml)

1	1
1	2
1	3

CONCENTRACIONES

Antígeno (ml) Diluyente (ml)

2	1
3	1
4	1

Las glucoproteínas separadas en el gel de poliacrilamida fueron fijadas por inmersión en solución de etanol al 40% y ácido acético al 5% en agua destilada durante 18 horas, efectuando cambios periódicos de la solución.

Se transfirió el gel a una solución de ácido peryódico al 0.7% durante 2½ horas.

Se trató con solución de metabisulfito al 0.2% en ácido acético al 5% durante 2½ horas con un recambio luego de los primeros 30 minutos.

Se incubó con el reactivo de Schiff de 12 a 18 horas y se guardaron los geles a 4° C, con el mismo reactivo en la oscuridad. Se buscaron bandas de color rosado.

4. RESULTADOS

Al analizar los dos tipos de antígeno micelial (filtrado y dializado) no se encontraron marcadas diferencias, por lo tanto para la medición de los Rf resulta igual tomar cualquiera. En dicho antígeno se observaron 5 bandas nítidas; las más difusas no se tomaron en cuenta por ser difícil su interpretación. (figura 1)

Con los valores del Rf y Log. P.M. de las proteínas estándares se hizo una curva de regresión (tabla 1), luego, en esta curva se colocaron los Rf de las proteínas de los antígenos analizados y se halló su peso molecular (figura 2 y tabla 2) obteniéndose 5 bandas en ambos antígenos comprendidos entre 18 - 68 kD, a saber: 18, 28.6, 35, 48 y 67.1 kD.

Los antígenos analizados no presentaron bandas correspondientes a glucoproteínas.

5. CONCLUSIONES

Después de haber realizado alrededor de 30 corridas electroforéticas y de probar las diferentes diluciones y concentraciones antes expuestas determinamos que la concentración óptima es de 2:1 (2 partes de antígeno por 1 de diluyente). Se comprobó también que no hay bandas proteicas de pesos moleculares menores de 12000 daltons, pues, las bandas del antígeno filtrado son iguales a las del dializado.

Los ensayos realizados para la determinación de proteínas y glucoproteínas demostró que los antígenos estudiados no presentaron marcadas diferencias con relación a los resultados de otros trabajos mencionados en la literatura.

Con respecto a las glucoproteínas hubo diferencias con algunos trabajos, pues el antígeno analizado no mostró bandas que las revelaran, concluyendo que posiblemente la técnica no es muy sensible.

Hearn y cols. analizaron extractos de la pared hifal de Aspergillus fumigatus mediante electroforesis en gel de policrilamida en dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

mostrando un arreglo complejo de bandas que varía en tamaño, y van desde 100 kD a 10 kD de peso molecular; la mayoría de estas partes parecen ser glucoproteicas, carbohidratos y residuos azucarados.

Las proteínas que aparecen más frecuentes en los trabajos realizados varían entre 10 - 100 kD, lo que está de acuerdo con lo encontrado por nosotros.

En nuestro trabajo se encontraron proteínas entre estos pesos moleculares. Las diferencias con otros trabajos realizados se deben a la variabilidad que existe en el medio ambiente en que se desarrollan las especies de A. fumigatus, técnica de aislamiento y a una gran cantidad de factores que varían de un lugar a otro. La técnica utilizada nos llevó a encontrar proteínas con pesos moleculares cercanos a los mencionados en la bibliografía.

Las glucoproteínas no se detectaron posiblemente por ser de menor peso molecular o a la sensibilidad del método utilizado.

6. RECOMENDACIONES

Hacer un estudio de ensayos para determinar qué parte protéica es la que posee mayor poder antigénico mediante inmunotransferencia.

Probar una coloración alternativa de proteínas aun más sensible como la de nitrato de plata.

Utilizar marcadores de peso molecular de rangos más amplios.

Concentrar más el antígeno, por liofilización u otro método de concentración que acepte éste.

Revisar la sensibilidad del método para glucoproteínas.

Utilizar un método alternativo para la detección de glucoproteínas, éste puede ser Cromatografía de inmutioafinidad gas - líquido, porque las glucoproteínas que tienen baja concentración de hidratos de carbono necesitan un método bastante sensible y este puede ser nuestro caso.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, J. and CHUNG, CH. Conversion of versiconal acetate to versiconal and versicolorin C in extracts from Aspergillus parasiticus. En: Micopathologia. (1990); p. 110 - 132.
2. AUSINA, V. Micosis producidas por hongos oportunistas. En: Enfermedades infecciosas Verger. Vol. 2, (1988); p. 378 - 390.
3. AZAIEH, H.; PETTIT, R.; SARR, B. and PHILLIPS, T.D. Effect of peanut tannin extracts on growth of Aspergillus parasiticus and aflatoxin production. En: Micopathologia. Vol. 110, (1990); p. 125 - 132.
4. BODEY, G. P. and VARTIVARIAN, S. Aspergillosis. En: J. Clin Microbiologia Dis. N° 8 (1989); p. 413 - 437.
5. CVETNIE, Z. and PEPELJNAJAK. Ochratoxingenicity of Asperigillus ochraceus strains from nephropatic and non-nephropatic areas in Yugoslavia. En: Mycopathologia N° 110 (1990); p. 93-99.
6. GIRALDO ESTRADA, H.; CASTAÑEDA, E. y ORDÓÑEZ, N. Micosis profundas en el Amazonas Colombiano. En: Hosmil médica. Vol. 189, N° 2; p. 65 - 70.
7. GREENBERGER, P. and PATTERSON, R. Aplicacion of enzyme linked inmunsorbent assay (ELISA) in diagnosis of allergic bronchopulmonary Aspergillosis. En: J. Lab/ Clin Med. Vol. 2, N° 99 (1982); p. 288 - 293.

8. GUGNANI, R.H.; REIJULA, K.; KURUP, V. and FINK, J. Detection of IgG and IgE antibodies to Aspergillus fumigatus in human sera by immunoblot assay. En: Mycopathologia. N° 109 (1990); p. 33 - 40.
9. HAYNES, K.; LATGE, J. and ROGERS, T. Detection of Aspergillus antigens associates with infection. En: Journal of Clinical Microbiology. Vol. 9, N° 28 (1990); p. 2.040 - 2.044.
10. HEARN, V. and MACKENSIE, D. Antigenic structure of Aspergillus Species En: Immunology of fungal diseases. E Kurstak. New York. (1989); p. 87 - 111.
11. HUIZAR, H. E.; BERTIKE, C.; KLICK, M. and ARONSON, J. Cytochemical localization and ultrastructure of A. flavus in cotton seed. En: Mycopathologia. N° 110 (1990); p. 43 - 50.
12. KOZAKIEWICZ, Z. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. En: Mycopathologia. Vol. 100 N° 991 (1990); p. 183 - 202.
13. LONGBOTTON, J. and AUSTWICK, P. Antigens and allergens of Aspergillus fumigatus I. Characterization by quantitative immunoelectrophoretic techniques En: J. Allergy Clin. Immunol. Vol. 1, N° 78 (1986); p. 9 - 17.
14. LOPEZ MARTINEZ, R.; CASTAÑON, L. y cols. Diagnóstico serológico de las micosis pulmonares por oportunistas. En: Rev. Lat. Amer. Microb. N° 30 (1988); p. 317 - 320.
15. MAZEN, M.; EL KADY, I. and SABER, S. Survey of the Mycoflora and mycotoxins of cotton seeds and cotton seed products in Egypt. En: Micopatologia N° 110 (1990); p. 133 - 138.

16. MOHAN, B.; WARREN, R. C. and RICHARD, M. D. Serodiagnosis of invasive Aspergillosis; Attempts to determine antigen and antibody relevance to infection. En: Micopatología. Vol. 1, N° 70 (1980); p. 37 - 41.
17. NEGRONI, R. Inmunología de las micosis. En: Inmunología e Inmunoquímica. Margni. Edit. Panamericana 4ª edición, 1989. p. 427 - 449.
18. RIPON. Micelial fungi. Aspergillosis En: Medical Mycology. Third edition, 1988. p. 618 - 650.
19. SWATEK, F.; HALDE, C.; RINALDI, M. and SADOMY, H. J. Especies de Aspergillus y otros hifomicetos hialinos saprófitos oportunistas. En: Manual de Microbiología de Lennete. 4ª Edición. Ed. Panamericana, 1987. p. 733 - 745.
20. TALBOT, G.; HUANG, A. and PROVENCHER, M. Invasive Aspergillus rhinosinusitis in patients with acute leukemia. En: Reviews of Infectious Diseases N° 13 (1991); p. 219 - 232.
21. TRUJILLO JURADO, D.; INFANTE, F.; SOLDEVILLA, C. and DOMINGUEZ, E. Seasonal daily variation of Aspergillus Mich Ex. Fr. spores in the atmosphere of Córdoba (Spain). En: Allergología et inmunopatología. Vol. 3, N° 18 (1990); p. 167 - 173.
22. VELEZ ARANGO, Herta. Curso avanzado de hongos oportunistas. Diagnóstico de laboratorio de agentes más comunes. Facultad de Medicina. Universidad de Antioquia, Medellín. 1989; p. 48 - 79.
23. VERNES, A. Humoral response in Aspergillosis En: Immunology of fungal diseases. E. Kurstak. New York. 1989; p. 401 - 417.

24. YU, B.; NIKI, Y.; ARMOSTRONG, D. Use of immunoblotting to detect *Aspergillus fumigatus* antigen in sera and urines of rats with experimental invasive *Aspergillus*. En: Journal of Clin. Vol. 7, N° 28 (1990); p. 1575 - 1579.
25. LATGE, J.P.; MOUTAQUAKIL, M.; DEBEAUPUIS, J.P.; HAYNES, K.; BOUCHARA, J.P. and PREVOST, M.C. The 18 - Kilodalton Antigen Secreted by *Aspergillus fumigatus*. En: Infection and Immunity, Vol.8 N°59 (1991); p. 2586 - 2594.
26. FRATAMICO, P. and BUCKLEY, H. Identification and characterization of and Immunodominant 58 - kilodalton Antigen of *Aspergillus fumigatus*. Recognized by sera of patients with invasive *Aspergillus*. En: Infection and Immunity. Vol.1, N° 59 (1991); p. 309 - 315.
27. FRATAMICO, P.; LONG, W. and BUCKLEY, H. Production and characterization of monoclonal antibodies to a 58 - kilodalton Antigen of *Aspergillus fumigatus*. En: Infection and Immunity. Vol. 1, N° 59 (1990); p. 316 - 322.
28. JAKLITSCH, W.; KUBICEK, C. and SCRUTTON, M. Intracellular location of enzymes involved in citrate production by *Aspergillus niger*. En: J. Microbiol. N° 37 (1991); p. 823 - 827.
29. LIRIO, V.; ASSIS, C.; CANO, M. I. & LACAZ, C. Obtencao e avalicao de antigenos de *Aspergillus fumigatus*. En: Rev.Inst. Med. trop. Sao Paulo. Vol. 4, N° 34 (1992); p. 359-365.
30. KURUP, V.; RESNICK, A.; SCRIBNER, G.; GUNASEKARAN, M. and FINK, J. Enzyme profile and immunochemical, characterization of *Aspergillus fumigatus* antigens. En: J. Allergy Clin. Immunol. Vol 6, N° 78 (1986); p. 1166 - 1173.

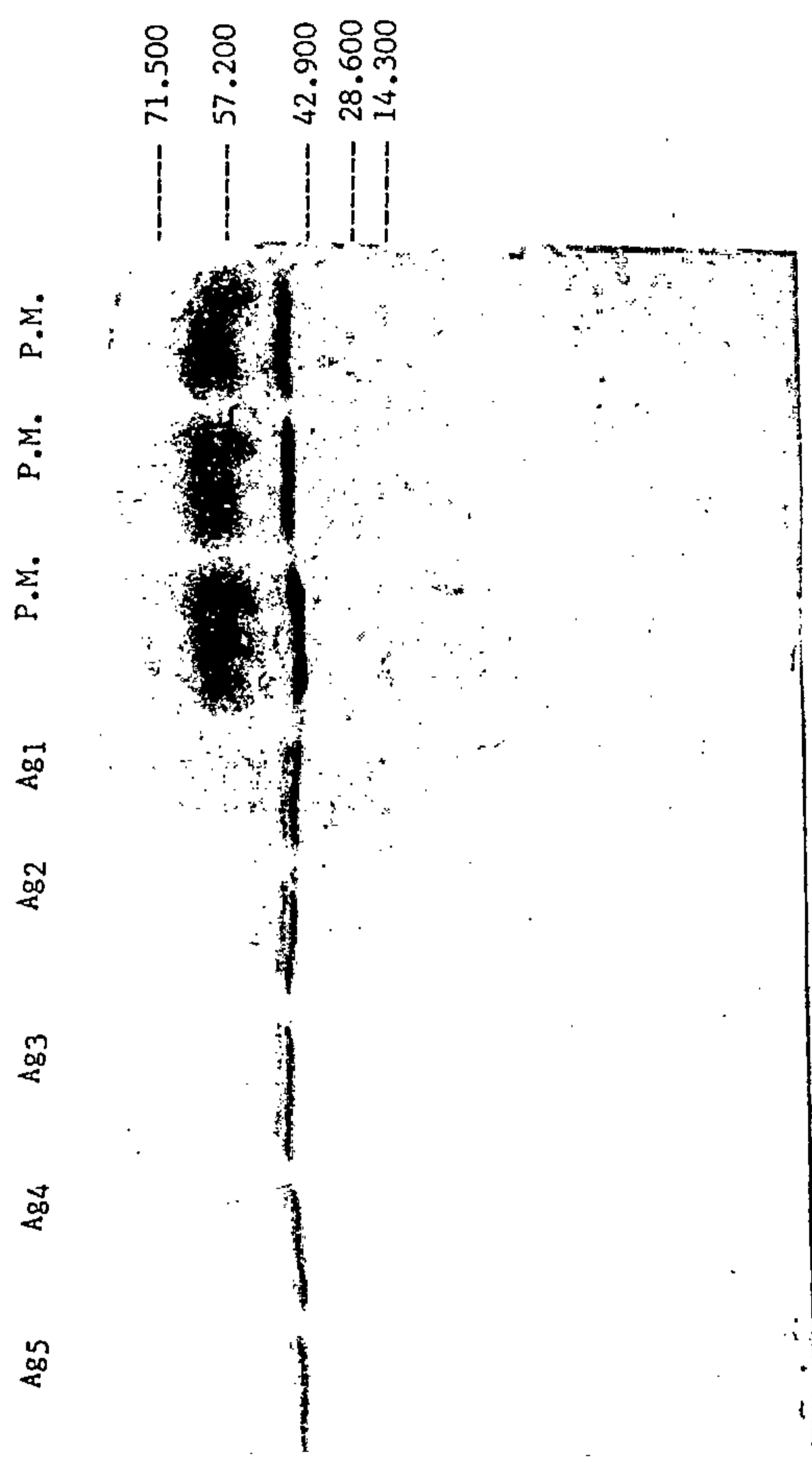
ANEXOS

SISTEMA DE ANEXOS Y
PROTEINAS

LISTA DE ANEXOS

- FIGURA 1. Electroforesis del antígeno analizado y marcadores del P.M. para proteínas.
- FIGURA 2. Curva de regresión de las proteínas estándares y antígeno analizado.
- TABLA 1. Logaritmo del peso molecular de las proteínas estándares contra sus movilidades relativas (Rf).
- TABLA 2. Logaritmo del peso molecular del antígeno analizado contra sus movilidades relativas (Rf).

Fig. 1 Electroforesis de los Antígenos analizados y Marcadores de peso molecular para proteínas

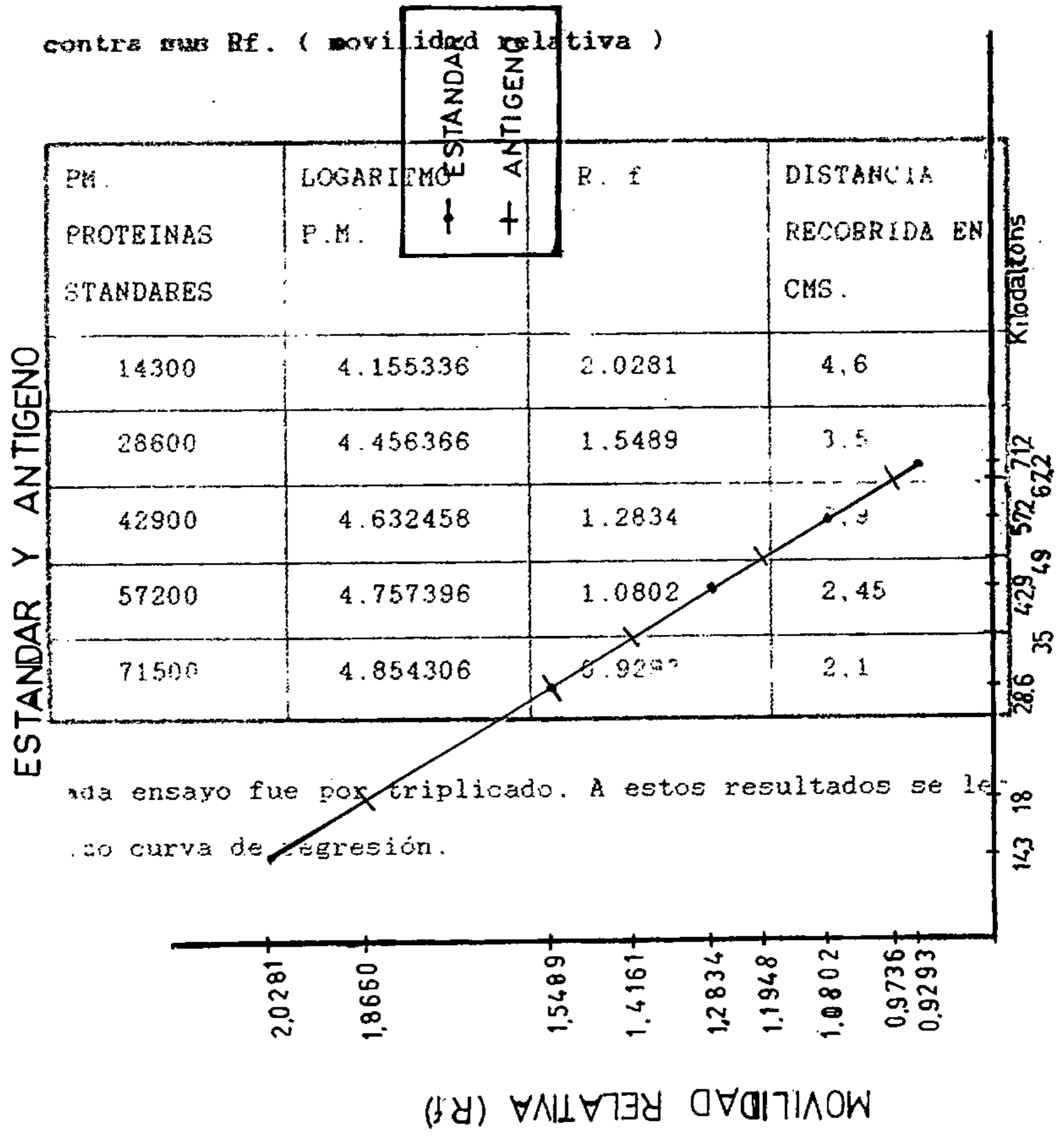


P.M. : Marcadores de peso molecular

A81- A82: Antígeno filtrado de A. fumigatus conc. 2:1

A83- A84- A85 : Antígeno dializado de A. fumigatus conc. 2:1

TABLA I. Log. peso molecular de las proteínas estándares contra sus Rf. (movilidad relativa)



CURVA DE REGRESION

ESTANDAR Y ANTIGENO

ada ensayo fue por triplicado. A estos resultados se le
so curva de regresión.

LOGARITMOS DE PESOS MOLECULARES

FIGURA 2

TABLA I. Log. peso molecular de las proteínas standares
contra sus Rf. (movilidad relativa)

PM. PROTEINAS STANDARES	LOGARITMO P.M.	R. f.	DISTANCIA RECORRIDA EN CMS.
14300	4.155336	2.0281	4,6
28600	4.456366	1.5489	3,5
42900	4.632458	1.2834	2,9
57200	4.757396	1.0802	2,45
71500	4.854306	0.9293	2,1

Cada ensayo fue por triplicado. A estos resultados se les hizo curva de regresión.

TABLA II. Log. de pesos moleculares de los Antígenos analizados contra sus Rf. (movilidad relativa).

PM. PROTEINAS DEL ANTIGENO ANALIZADO	LOG. PM	RF	DISTANCIA RECORRIDA EN CMS.
18.000	4,2552	1,8660	4,2
28.600	4,4563	1,5489	3.5
35.000	4,5440	1,4161	3.2
48.000	4,6812	1,1948	2.7
67.100	4,8267	0.9736	2.2

Cada ensayo se hizo por triplicado.