

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Obtención de inmunoglobulina G anti-*Cryptococcus neoformans*

Dra. María Teresa Illnait Zaragoza¹, Dr. Gerardo Martínez Machín² y Lic. Carlos Fernández Andreu³

RESUMEN

Con el objetivo de obtener una IgG anti-*Cryptococcus neoformans*, se llevaron a cabo simultáneamente 2 esquemas de inmunización en conejos con una cepa autóctona. Para ambos se emplearon células enteras formalinizadas que se diferenciaban entre sí en cuanto a dosis y vías de inmunización. Los sueros obtenidos fueron titulados y se seleccionó el de mayor título (1: 1 024 por el método de aglutinación en lámina) el cual fue purificado mediante precipitación salina y cromatografía de intercambio iónico, con la obtención de una IgG de pureza y actividad biológica altas.

Descriptores DeCS: CRYPTOCCUS NEOFORMANS/inmunología; CROMATOGRAFIA POR INTERCAMBIO IONICO; TEST DE AGLUTINACION/métodos; CONEJOS/inmunología.

Cryptococcus neoformans, hongo levaduriforme, constituye el agente causal de la criptococosis. Esta enfermedad puede iniciarse como una infección pulmonar con tendencia a diseminarse con especial predilección hacia el sistema nervioso central, aparece con frecuencia como infección oportunista en pacientes con daño inmunológico. (Hay RI. Extrameningeal manifestations of Cryptococcosis. 3rd International Conference on Cryptococcus & Cryptococcosis. Abstract, 1996: 117-8).

La levadura está rodeada de una cápsula polisacáridica que ha sido estudiada de forma amplia, ya que resulta el principal factor de virulencia del microorganismo; se encuentra estrechamente relacionada con su taxonomía, y su detección en los fluidos corporales ha permitido el diagnóstico rápido y la evaluación del pronóstico de la enfermedad.^{1,2}

El polisacárido capsular (PSC) está compuesto por manosa, xilosa, ácido glucurónico y grupos O-acetil.³ Los diferentes grados de acetilación de las cadenas laterales determinan la presencia de serotipos cuya com-

plejidad estructural aumenta del serotipo D al A, al B, al C.^{4,5} Estos serotipos, se encuentran agrupados en 2 variedades: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos A y D) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C).⁶

La estructura antigénica de la levadura resulta ser un inmunógeno pobre, tanto para el hombre como en modelos experimentales en animales, por lo que la producción de anticuerpos específicos ocurre sólo en una parte de los pacientes con criptococosis y los títulos son usualmente bajos.^{2,6}

Esta característica ha hecho difícil la obtención de anticuerpos específicos anti- *Cryptococcus neoformans* útiles en el desarrollo de técnicas para el diagnóstico rápido como las de aglutinación, en especial aquellas asociadas al látex y otras novedosas como los ensayos inmunoenzimáticos.

El objetivo de este trabajo fue la obtención de IgG específica anti-*Cryptococcus neoformans* con vistas a su posterior utilización en el desarrollo de técnicas para detección de antígenos que permitan ampliar las posibilidades diagnósticas del laboratorio.

¹ Especialista de I Grado en Microbiología.

² Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado. Jefe del Departamento de Bacteriología-Micología.

³ Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Jefe del Laboratorio de Micología.

MÉTODOS

Preparación de la suspensión antigénica. Se utilizó una cepa autóctona de *C. neoformans* var. *neoformans*, la cual fue cosechada durante 5 d en infusión cerebro-corazón a 30 °C con agitación constante (150-180 rpm). La cosecha fue inactivada con formalina a una concentración final de 0,5 % y lavada con solución salina formalinizada al 0,5 %. Mediante conteo en cámara de Neubauer se ajustó la concentración a 10^7 células/mL. Esta suspensión fue almacenada a 4 °C hasta el momento de su utilización.⁷

Inmunización de los animales. Se emplearon 2 grupos de 3 conejos cada uno, de la raza Nueva Zelanda de aproximadamente 2 kg de peso, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

Al primer grupo se le aplicó el esquema de inmunización propuesto por *Palmer*⁷ y al otro uno propuesto por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) (M. Dolande, comunicación personal).

Para el primer esquema los animales fueron inmunizados con 3 mL de la suspensión antigénica vía endovenosa (e.v.) de lunes a viernes durante 2 semanas. Después de 7 d de reposo, se repitió el mismo procedimiento.

El segundo esquema se inició con la administración intramuscular (i. m.) de 0,5 mL de la suspensión antigénica en 0,5 mL de Adyuvante Completo de Freund en cada pata posterior, lo cual se repitió en Adyuvante Incompleto de Freund a los 14 y 21 d en las patas anteriores. Luego se continuó a partir del día 23 de iniciado el esquema con inmunizaciones e.v. de 1 mL de la suspensión antigénica en días alternos hasta el día 33. Pasados de 7 a 10 d de finalizados los esquemas, se realizó una extracción de sangre para la titulación.

Titulación y procesamiento de los sueros. Los sueros de los animales fueron titulados por inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación en tubo (AT) y aglutinación en lámina (AL).^{7,8}

Se seleccionó el suero de más alto título para la obtención de la IgG por precipitación salina con sulfato de amonio al 50 % y cromatografía de intercambio iónico en una columna de HiLoad Q Sepharosa FF XK 26/10 (Pharmacia).⁹

Al producto se le determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry¹⁰ y se ajustó a 10 mg/mL mediante ultrafiltración con membrana

de AMICON.⁹ Después se evaluó en términos de pureza y actividad biológica mediante SDS-PAGE¹¹ y titulación en lámina respectivamente.

RESULTADOS

De los conejos inmunizados según el esquema propuesto por *Palmer*, 1 alcanzó altos títulos (1:1 024). Los 2 restantes sólo llegaron a tener 1:128. Los que recibieron el esquema del CDC tuvieron títulos de 1:32 (2 de ellos) y el otro 1:16.

La AL fue definitivamente la más factible debido a su fácil interpretación y rapidez, los resultados coinciden (100 %) con los obtenidos mediante IFI. A su vez ésta fue más rápida, fácil de realizar e interpretar que la aglutinación en tubo, cuyos resultados fueron imprecisos y no se tuvieron en cuenta.

De la representación gráfica del proceso de purificación se obtuvo un cromatograma (fig. 1). El primer pico mostró un patrón característico de IgG. Esta fracción fue recolectada y durante su evaluación mostró poseer alta pureza y actividad biológica

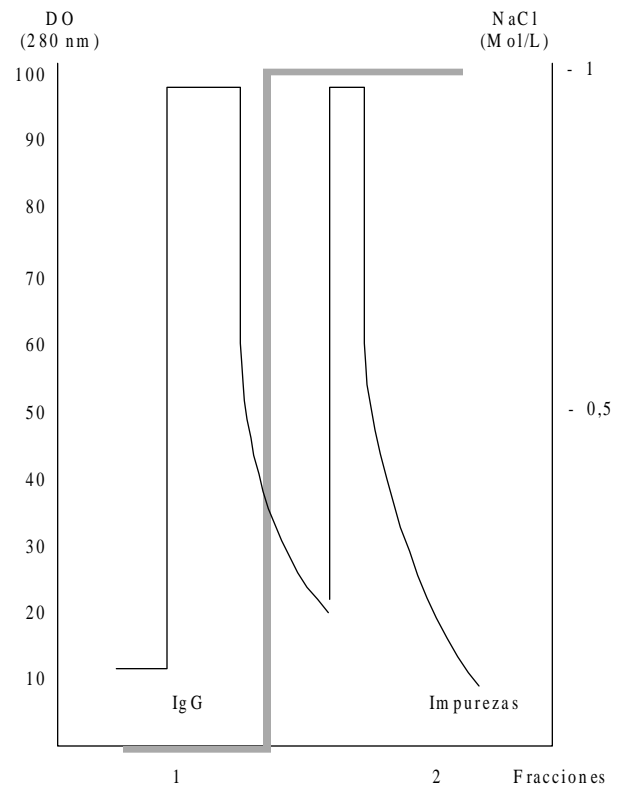


Fig 1. Purificación cromatográfica de IgG anti-*Cryptococcus neoformans*

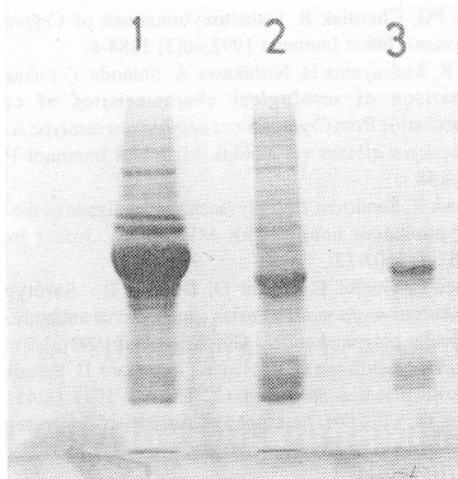


Fig.2. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación de la IgG anti-*C. neoformans*. 1) Suero de conejo anti-*C. neoformans*. 2) Precipitado globulínico del suero de conejo anti-*C. neoformans*. 3) IgG anti-*C. neoformans*.

TABLA. Control del material obtenido en el proceso de purificación de la IgG de conejo anti-*Cryptococcus neoformans*

	Volumen (mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Actividad (título)
Fracción gamma precipitada	5	30	1/1 000
IgG purificada	16	10	1/1 000

específica (tabla). En la figura 2 puede observarse el alto grado de pureza que se obtuvo para la IgG.

DISCUSIÓN

Entre las principales propiedades biológicas del PSC, se destaca su pobre inmunogenicidad, evidenciada en lo difícil que resulta desarrollar una adecuada respuesta de anticuerpos, tanto durante el curso de la infección natural como tras la inmunización activa con este microorganismo.¹²

El uso de cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* en los esquemas de inmunización es un elemento importante para la obtención de sueros con altos títulos y suficiente reactividad cruzada con otros serotipos, requisitos ambos imprescindibles para la utilización de un suero hiperinmune en el diseño de pruebas serológicas.¹³

En nuestro trabajo la utilización de una cepa autóctona de *C. neoformans* var. *neoformans* estuvo

motivada por 2 razones fundamentales. Primero, el 100 % de las cepas estudiadas en nuestro país procedentes tanto de muestras clínicas como ambientales, corresponden a esta variedad,¹⁴ y segundo, debido al escaso desarrollo de la cápsula alcanzado por esta cepa.

La importancia del tamaño de la cápsula y su relación con la inmunogenicidad, fue demostrada temprano por los trabajos de *Neil* y otros. Ellos comprobaron que las suspensiones preparadas con cepas capsuladas de forma débil, mostraban una mayor capacidad inmunogénica que las preparadas con cepas fuertemente capsuladas.¹⁵

En el presente trabajo, donde se comparan 2 métodos de inmunización, sólo 1 conejo de los inoculados según el esquema de Palmer alcanzó títulos de 1: 1 024, mientras que en el resto de los animales la respuesta de anticuerpos en general resultó débil, y fue algo más baja en los inoculados con el esquema del CDC. Este hecho pudiera ser explicado porque la respuesta de anticuerpos es susceptible de ser enmascarada por un exceso de antígeno polisacárido circulante,¹⁶ o según lo señalado por *Murphy* y otros autores, los cuales demostraron que el PSC es capaz de inducir un estado de tolerancia inmunológica, la cual resulta de una disminución del número de células productoras de anticuerpos más que una simple neutralización de éstos por el antígeno.¹⁷ También, y debido a la pobre inmunogenicidad del PCS ya descrita, se ha señalado que en el curso de la enfermedad pudiera presentarse una inmunosupresión, la cual involucra, al menos como a uno de sus mecanismos probables, la producción de células supresoras.¹⁸

Nuestros resultados no coinciden plenamente con los reportados por algunos autores, los cuales prefieren más de una vía de inoculación y la multipuntura¹⁷ como en el esquema del CDC. No obstante, la pobre respuesta de anticuerpos obtenida pudiera deberse más que al tipo de esquema utilizado, a la capacidad de respuesta de cada animal en particular, criterio fundamentado en la baja repetibilidad alcanzada en los resultados.

El empleo de diferentes técnicas para la titulación de los sueros, permitió no sólo precisar al título de anticuerpos circulantes, sino también evaluar la factibilidad y utilidad de cada una de ellas al compararlas entre sí.

Ya ha sido reportado que la IFI presenta resultados satisfactorios en el diagnóstico a causa de su sensibilidad, especificidad y porque resulta más fácil de realizar e interpretar en relación con otras.¹⁹

La AL ha sido empleada con éxito en la serotipificación de *C. neoformans*, ya sea mediante anticuerpos policlonales previamente adsorbidos o monoclonales específicos.⁸ No encontramos antecedentes de su empleo en la titulación de sueros; no obstante, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, esta prueba presenta un comportamiento similar a la IFI, por lo que sumado a sus otras ventajas (rapidez, bajo costo, etcétera) recomendamos su empleo con este propósito.

La AT fue utilizada por *Gordon y Vadder*, quienes demostraron que era segura para el diagnóstico. Ellos encontraron aglutininas en las primeras etapas de la infección del sistema nervioso central y en infecciones sin compromiso de éste.²⁰ Es, probablemente, uno de los métodos más específicos para la detección de anticuerpos, sin embargo, en nuestra experiencia resultó ser una prueba engorrosa y de difícil interpretación.

Por último, como resultado del proceso de purificación se obtuvo una IgG con alta actividad biológica y pureza ensayadas por aglutinación en láminas e inmunoelectroforesis, respectivamente, útil en el diseño de procedimientos rápidos para el diagnóstico mediante la detección de antígenos de *C. neoformans*.

SUMMARY

Two immunization schemes were applied to rabbits with an autoctonous strain aimed at obtaining an anti-*Cryptococcus neoformans* IgG. Whole cells treated with formalin were used. Dosages and immunization routes were different. The sera obtained were titered and that with the highest titer was selected (1:1 024 by the laminar agglutination method) and purified by saline precipitation and ion exchange chromatography. An IgG of high purity and biological activity was obtained.

Subject headings: CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/immunology; CHROMATOGRAPHY; ION EXCHANGE, AGGLUTINATION TEST/methods; RABBITS/immunology.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kozel TR, Wilson MA, Murphy JW. Early events in initiation of alternative complement pathway activation by the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immunol* 1991;59(9): 3101-10.
2. Kozel TR. Antigenic structure of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides. En: Kurstak E, ed. *Immunology of fungal diseases*. New York: Marcel Dekker, 1989:144-54.

3. James PG, Cherniak R. Galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immunol* 1992;60(3):1084-8.
4. Ikeda R, Matsuyama H, Nishikawa A, Shinoda T, Fukazawa Y. Comparison of serological characteristics of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A - D and *Cryptococcus albidus* var *albidus*. *Microbiol Immunol* 1991;35(2):25-138.
5. Cherniak R, Sundtrom JB. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. Minireview. *Infect Immunol* 1994;62(5):1507-12.
6. Dromer F, Gueho E, Ronin O, Dupont B. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. *J Clin Microbiol* 1993;31(2):359-63.
7. Palmer DE, Kauffman L, Kaplan W, Cavallaro JJ. Serodiagnosis of mycotic diseases. Springfield: CC Thomas, 1977:1-245.
8. Pfeiffer TJ, Ellis DH. Serotypes of Australian environmental and clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* 1993;31(5):401-4.
9. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassay in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ* 1976:53-5.
10. Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Ranadal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biol Chem* 1951;193:265-75.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
12. Dromer F. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. *Infect Immunol* 1987;55(3):1749-52.
13. Scholer HI. Diagnosis of cryptococcosis and monitoring of chemotherapy. *Mykosen* 1985;28(1):5-10.
14. Fernández C, Martínez G, Menéndez de San Pedro J, Oramas B. Identificación de las variedades de *Cryptococcus neoformans* mediante la utilización de medios de cultivo. *Rev Cubana Med Trop* 1991;43(2):100-2
15. Neil IM, Abrahams J, Kapros CE. A comparison of the immunogenicity of weakly encapsulated and strongly encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol* 1950;59:263-75.
16. Gade W, Hinnefeld SW, Babcock LS, Gilligan P, Kelly W, Wait K, et al. Comparison of premier cryptococcal antigen enzyme immunoassay and the latex agglutination assay for detection of cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol* 1991;29(8):1616-9.
17. Murphy IW. Serological, electrophoretic and biological properties of *Cryptococcus neoformans* antigens. *Infect Immunol* 1988;56(2):424-31.
18. Stevens DA, Dromer JE, Ashman RB, Blackstock R, Brumer E. Immunomodulation in mycoses. *J Med Vet Mycol* 1994;32(1): 253-65.
19. Balows A, Hausler WJ, Jr. Diagnostic procedures for bacterial, mycotic and parasitic infections. 6 ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1981;1043-55.
20. Gordon MA, Vedder DK. Serologic test in diagnosis and prognosis of cryptococcosis. *J Am Med Assoc* 1984;19(12):131-4.

Recibido: 31 de enero de 1997. Aprobado: 20 de mayo de 1997.
 Dra. *María Teresa Illnait Zaragoza*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.