

LOCALIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE EN SPOROTHRIX SCHENCKII.

Félix J. Tapia ***, María Carolina Castillo ***, Imelda Campo-Aasen ** y María B. de Albornoiz *.

Secciones de Micología *, Histoquímica ** y Biología Molecular ***, Instituto Nacional de Dermatología, Apartado 4043, Caracas 1010A, Venezuela.

Sporothrix schenckii un hongo dimórfico de la Clase Hifomicetos, es el agente causal de la esporotricosis humana. Métodos inmunocitoquímicos tienen además de un valor diagnóstico, importancia en la localización subcelular y caracterización de antígenos bioactivos. Utilizando un anticuerpo contra *S. schenckii* (SS-78-0258, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia) producido en conejo después de inoculación con *S. schenckii* (6 días, 37°C, levaduriforme) y anticuerpo de unión marcado con oro coloidal, se localizó el antígeno en la pared celular (3, 6, 9 y 15 días; levaduriforme 37°C y micelial 25°C; cepas 0073, 0261, 8770 y 9977 I.N.D.). Brevemente, el hongo en suspensión y sin fijar fue incubado por 30 minutos a 25°C ó 37°C dependiendo de la fase del hongo en: 1. anti-SS, 2. Carnero anti-SS, 1:200; 2. Carnero anti-conejo oro coloidal, 1:2. Similarmente se hizo una localización simultánea usando el anti-SS oro coloidal y Concanalina A-peroxidasa. La especificidad del anti-SS se demostró por la falta de reacción con los siguientes controles: a) *P. brasiliensis*, *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* *Geotrichum* sp.; b) Eliminando cualquiera de los anticuerpos; c) Absorbiendo el anti-SS con su antígeno homólogo. Este estudio demuestra la presencia de antígenos comunes en las 2 fases del hongo. Los puntos de marcaje del anti-SS coincidieron algunas veces con los de la Concanalina A, indicando parte de la naturaleza polisacárida del antígeno estudiado.

Sporothrix schenckii (Hektoen & Perkins, 1900) es un hongo dimórfico agente causal de la esporotricosis humana. La clasificación de este hongo en el género *Sporotrichum* es incorrecta, ya que *S. schenckii* no se parece a *Sporotrichum aureum*, la especie lectotipo del género (Carmichael, 1962). La esporotricosis se caracteriza clínicamente por presentar lesiones cutáneas y subcutáneas fijas o localizadas, distinguidas por úlceras, placas verrugosas, abscesos; o por lesiones diseminadas que generalmente abarcan una extremidad y raramente varias regiones del cuerpo. También existen formas extras-cutáneas localizadas principalmente en el pulmón, huesos, articulaciones, etc. (Wilson et al., 1967). Debido a que el diagnóstico clínico no es fácil como resultado del polimorfismo del cuadro clínico y su similitud con otras enfermedades tropicales como la leishmaniasis tegumentaria, se hace necesario utilizar procedimientos especiales que nos permitan el diagnóstico diferencial.

El diagnóstico por medio del método serológico tiene gran importancia y es de especial valor en la enfermedad sistémica (Albornoiz, 1981). El uso de técnicas inmunocitoquímicas, como la inmunofluorescencia y la inmunoperoxidasa tienen su aplicación desde el punto de vista diagnóstico (Kaplan & Ivens, 1960; Russell et al., 1979).

Los métodos inmunocitoquímicos también pueden ser usados en la caracterización celular de los organismos en diferentes estados biológicos. En este estudio, utilizando una novedosa técnica inmunocitoquímica a dos pasos o 'sandwich', que

nvuelven el uso de anticuerpos específicos contra *S. schenckii* y anticuerpos de unión marcados con oro coloidal, localizamos antígenos de superficie en este hongo. gualmente, hicimos una localización simultánea usando el anti-*S. schenckii* oro coloidal y Conavalina A-peroxidasa, para comparar y visualizar la distribución topográfica de ambas.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron las siguientes especies de hongos dimórficos: *Sporothrix schenckii* cepas 0073, 0261, 8770, 9977), *Paracoccidioides brasiliensis* (cepa 0350), *Candida albicans* (cepa 8385) *Cryptococcus neoformans* (cepa 8551) y *Geotrichum sp.* (cepa 0001). Todos los hongos fueron obtenidos originalmente de pacientes y pasados a medio de cultivo. *C. neoformans* del Center for Diseases Control (CDC), Atlanta, Georgia, EEUU, y el resto en la sección de Micología de nuestro Instituto. Las cepas 0073 y 0261 de *S. schenckii* provienen de lesiones fijas, y las cepas 8770 y 9977 de lesiones diseminadas linfagíticas.

Las cepas de *S. schenckii* fueron cultivadas en medio cerebro-corazón-agar (CCA, Difco) a 37°C (fase levaduriforme) y en medio Sabouraud dextrosa agar a 25°C (fase micelial), por 3, 6, 9 y 15 días. *P. brasiliensis* fue cultivado en CCA a 37°C (fase levaduriforme) por 6 días, y el resto de los hongos en medio Sabouraud a 25°C por 6 días.

El anti-*S. schenckii* SS-78-0258 fue una donación del Dr. William Kaplan del CDC, Atlanta, Georgia, EEUU. Este antisuero fue producido por inmunización de un conejo *S. schenckii* de 6 días en fase levaduriforme muertos con formalina de acuerdo con Kaplan & González Ochoa (1963).

El anticuerpo de unión fue un carnero anti-conejo (IgG purificada por afinidad) marcado con partículas de oro coloidal de aproximadamente 20nm en diámetro (donación del Dr. Jan De Mey, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica). El oro coloidal fue preparado por reducción química del ácido cloroáurico (HAuCl_4) con citrato de sodio y conjugado a la IgG de acuerdo a protocolos existentes (De Mey et al., 1981).

El procedimiento inmunocitoquímico fue realizado de acuerdo con De Waele y colaboradores (1981) con varias modificaciones. Un inóculo tomado del medio de cultivo fue lavado 2 veces en el buffer de trabajo (Buffer fosfato 0.1M, pH 7.2 con 1% albúmina de suero bovino). El lavado consistió en la suspensión del inóculo o pellet en 200 μ l del buffer y centrifugación a 300g en una microcentrífuga Fisher Modelo 59, a temperatura ambiente por 5 minutos. Con 2 lavados después de cada paso el pellet fue resuspendido en 25 μ l de las siguientes soluciones: 1. anti-*S. schenckii* SS-78-0258, 1:200, por 30 minutos a 25°C ó 37°C dependiendo de la fase del hongo en estudio; 2. carnero anti-conejo IgG marcado con oro coloidal, 1:2, por 45 minutos a la temperatura apropiada; 3. gluteraldehído al 2.5% en buffer cacodilato 0.1M, pH 7.2, por 30 minutos a temperatura ambiente; 4. post-fijación en tetróxido de osmio al 1% en soluciones acuosa, por 45 minutos a temperatura ambiente. Después de 2 lavados con agua destilada el pellet se amoldó en agar Noble, e inmediata-

mente se procedió a la deshidratación, impregnación e inclusión en Epon en la forma convencional.

La especificidad de la inmuno-reacción fue estudiada con los siguientes controles: 1. Sustitución en el primer paso de la inmuno-reacción por el anti-*S. schenckii* SS-78-0258 previamente absorbido con *S. schenckii* fase levaduriforme de 6 días; 2. Eliminación del anticuerpo primario o el de unión en la inmuno-reacción; 3. Evaluación de la inmuno-reacción en los hongos controles. *P. brasiliensis*, *C. neoformans* y *Geotrichum sp.*

El experimento de doble marcaje, anti-*S. schenckii* oro coloidal y Conavalina A-HRP (= Horseradish Peroxidase, peroxidasa de rábano) se llevó a cabo con la cepa 8770 cultivadas a 37°C por 6 días, partiendo de una suspensión inicial de 2×10^8 células/ml. La localización con anti-*S. schenckii* oro coloidal se realizó de la forma arriba descrita, hasta antes de la fijación con gluteraldehído. Se lavó el pellet con PBS (Buffer fosfato en solución salina 0.1M, pH 7.2) y se incubó en una solución de Conavalina A en PBS (3 concentraciones fueron estudiadas 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C por 15 minutos. La reacción se reveló de acuerdo con Graham & Karnovsky (1966) usando 3,3' diaminobenzidina hidrocloreuro (DAB) como cromógeno. El resto del proceso fue idéntico a los pasos 3 y 4 del procedimiento inmunocitoquímico. Como control también se realizó la técnica simple con A-HRP siguiendo el procedimiento original de Bernhard & Avrameas (1971).

Los cortes ultrafinos fueron obtenidos en un ultramicrotomo Porter-Blum MT-2B, recogidos en rejillas de Cobre de 400mesh y examinados después de teñidos con acetato de uranilo y citrato de Plomo (este último a veces omitido en los experimentos Con A-HRP) en un microscopio electrónico Hitachi H-500.

RESULTADOS

La apreciación a simple vista de la toma de un color rojo claro por el pellet celular después de haber sido añadido el anticuerpo de unión-oro coloidal y lavado 2 veces, es indicativo de una inmuno-reacción positiva. Reacción que también se pudo ver al microscopio de luz, cuando un frotis del pellet fue observado. Por este criterio y por su observación al microscopio electrónico se pudo demostrar que las 4 cepas de *S. schenckii* estudiadas fueron inmuno-reactivas al antisuero SS-78-0258. Inmuno-reactividad que se observó en las 2 fases del hongo, sin ninguna aparente diferenciación entre cepas procedentes de lesiones fijas o aquellas de lesiones diseminadas (Figura 1 y 2). Similarmente, se demostró que este anticuerpo no reconoce componentes antigénicos en *P. brasiliensis* (Figura 2d), *C. albicans* (Figura 2e), *C. neoformans* y *Geotrichum sp.* La falta de inmuno-reacción en los otros controles como fueron la eliminación de pasos en el procedimiento inmunocitoquímico, y la absorción del anticuerpo específico con su antígeno homólogo, demostró la alta especificidad del antisuero SS-78-0258.

El estudio ultraestructural consistió y se analizó en 2 partes. La parte convencional donde se observó la estructura celular en las diferentes fases del hongo y la parte cito-

química (técnica Con A-HRP) e inmunocitoquímica (técnica con oro coloidal). El estudio convencional reveló todas las características morfológicas previamente descritas para *S. schenckii* por Lane y colaboradores (1969; 1970). Las levaduras son generalmente esféricas, ovoides o fusiformes de unas 2-6 μ m en su diámetro máximo (Figura 1, a y b), un halo que se puede visualizar mejor cuando no se tiñe con citrato de Plomo, está presente en la mayoría de las células (Figura 1c). La pared celular de las levaduras mide de 100-300nm en grosor, tiene apariencia microfibrilar y parece compuesta por 2 capas o más (figura 1, d y e). Citoplásmicamente las levaduras muestran una gran diversidad donde se pueden ver entre otras cosas gránulos osmiofílicos, vesículas vacías, pequeñas gotas lipídicas, etc. (Figura 1, a y b). En la fase micelial, la pared celular de las hifas es de 35-90nm y no se ve el halo de las levaduras (Figura 2, a y b). La pared celular de las conidias, por su parte mide unos 300nm de diámetro. En la segunda parte de nuestro estudio, con el anti-*S.schenckii* SS-78-0258 se localizaron antígenos en la pared celular del hongo, localización que se pudo observar tanto en la parte interna como externa de la pared (Figura 1f). Estos antígenos aparecen distribuidos sobre la entera superficie de la pared, sin ninguna aparente segmentación en la distribución de la inmuno-reacción. En una misma población celular no todas las levaduras, hifas o conidias tenían la misma cantidad de oro coloidal en su superficie. La localización de carbohidratos con la técnica Con A-HRP, simultáneamente con los antígenos reconocidos por el SS-78-0258, permitió la comparación directa (Figura 2c).

CONCLUSION

La localización de antígenos de superficie a nivel de microscopía electrónica en *Sporothrix schenckii*, ha estado limitada a la detección de radicales carbohidratos con Conavalina A en las 2 fases del hongo (Travassos et al., 1978), y a la demostración de grupos aniónicos con hidróxidos de hierro coloidal y ferritina en levaduras (Benchimol et al., 1979). El oro coloidal el cual ha demostrado ser un excelente marcador para microscopía electrónica (ver revisiones por Horisberger, 1981; Vardell et al., 1982), es aquí utilizado por primera vez en la localización de antígenos de superficie en *S. schenckii*. Esta tecnología tiene la ventaja de su simplicidad y gran poder de visualización, por ser el marcador en partículas electron-densa que se puede preparar de diferentes tamaños. Así mismo esta técnica inmunocitoquímica se puede comparar directamente con otros métodos, tal como lo hicimos en el experimento con Con A-HRP.

Nuestro estudio demuestra la presencia de antígenos comunes en la pared celular de las 2 fases del hongo a diferentes intervalos en su ciclo de vida. La aparente variabilidad en la intensidad de la inmuno-reacción observada en una misma población, sugiere que la expresión de los componentes antigénicos reconocidos con el antisuero SS-78-0258 es dependiente del ciclo celular.

Los puntos reconocidos por el anticuerpo SS-78-0258 algunas veces coincidieron con los reconocidos por la Conavalina A, demostrativo de la naturaleza polisacárida del antígeno detectado.

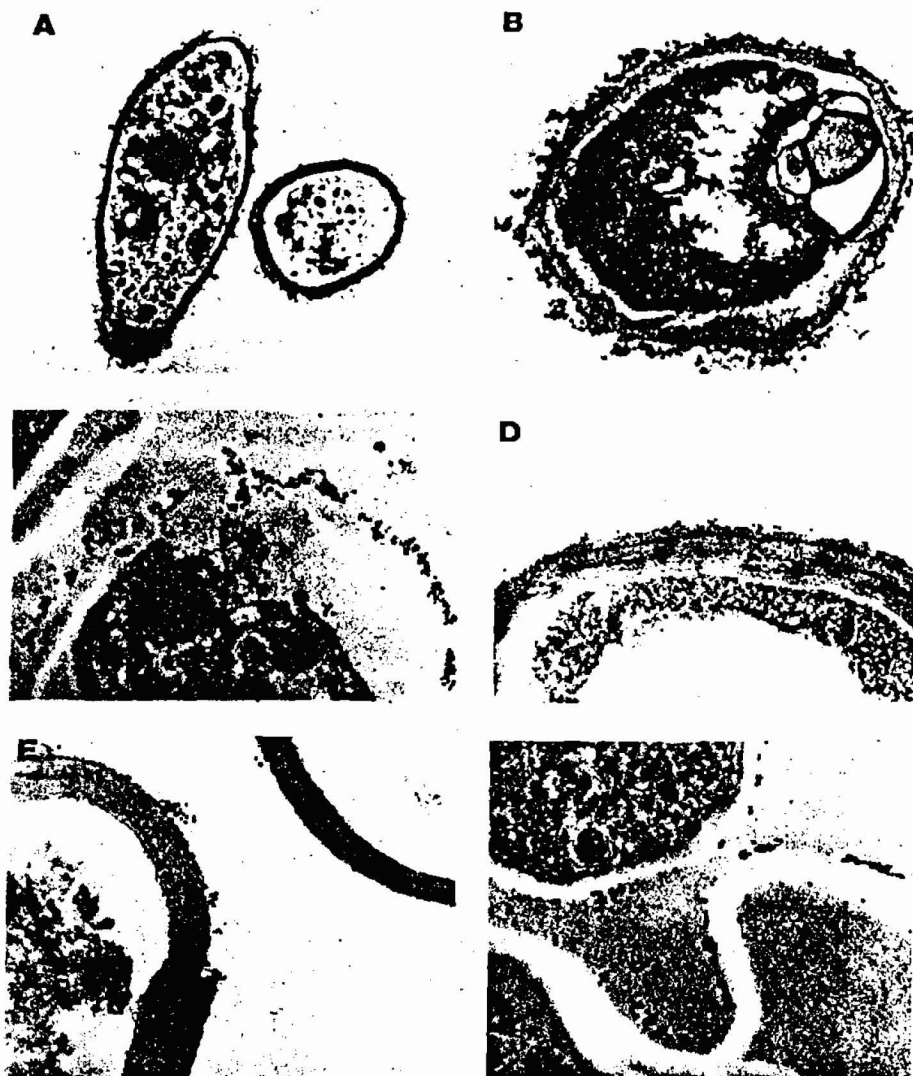


Figura 1. Electron inmunotinción usando la técnica del oro coloidal y el anti SS-78-0258 en *S. schenckii*. A. Cepa 8770, levaduras 6 días, X 13,880. B. Cepa 8770, levaduras 3 días, X 35,100 A y B muestran algunas de las características morfológicas descritas. C. Cepa 8770, levadura 6 días, la tinción sin citrato de plomo deja ver más claramente el halo circundante, X 25,750. D. Cepa 0261. Levadura 6 días mostrando varias capas en la pared, X 26,650. E. Cepa 0261, levadura 6 días, problema en la pared muestra también inmunoreacción en la membrana interna, X 35,000 F. Cepa 8770, levadura 6 días, sin citrato de plomo, se ve inmuno-reacción en ambos lados de la pared celular, X 26,300.



Figura 2. *S. schenckii*-oro coloidal, Con A-HRP y Hongos Controles. A. Cepa 0073, hifas y conidias, 3 días, X 8,750. B. Cepa 9977, hifas y conidias 3 días, X 20,000. C. Cepa 8770, levadura 6 días, anti-SS-78-0258 oro coloidal y Con A-HRO (depósito electrón-denso), X 72,850. D. *P. brasiliensis*, Cepa 0350, levadura 6 días, X 8,750. E. *C. albicans*, Cepa 8385, levadura 6 días, X 27,500. En D & E la inmunoreacción fue negativa después de tratado con anti-SS-78-0258, en E se aprecian agregados de oro coloidal que no reaccionaron específicamente.

Futuros estudios deben estar dirigidos hacia la caracterización bioquímica de los antígenos específicos por nosotros reconocidos y a los posibles cambios dependientes del ciclo celular. Asimismo se piensa estudiar otros antígenos altamente específicos producidos metabólicamente por la fase micelial aislado por Alborno (1981).

SUMMARY

Sporothrix schenckii a dimorphous fungus of the Hyphomycetes class, is the causative agent of human sporotrichosis. Immunocytochemical methods, apart from a diagnostic value, are important for the subcellular localization and characterization of bioactive antigens. Using an anti *S. schenckii* antigen (SS-78-0258, Center for Disease Control, Atlanta) produced in rabbits after inoculation with *S. schenckii* (6 days, 37°C, yeastform) and a binding antibody labelled with colloidal gold, we localized the antigen in the cell-wall (3, 6, 9, 15 days; yeastform 37°C and mycelial 25°C; strains 0073, 0261, 8770 and 9977 IND) Briefly, a suspension of non-fixed fungi was incubated during 30 minutes at 25 or 37°C depending on the phase of the fungus in: 1) anti-SS, 1:200; 2) goat anti-rabbit-colloidal gold 1:2. Simultaneously we localized with anti-SS-colloidal gold and a peroxidase Concanavalin A. The specificity of the anti-SS was demonstrated by reactions with the following controls: a) *P. brasiliensis*, *C. albicans*, *C. neoformans* and *Geotrichum sp.* b) Eliminating any of the antibodies. c) Absorbing the anti-SS with homologous antigen. This study shows common antigens in both phases of the fungus. The Binding sites of anti-SS not always coincided with those of Concanavalin A, indicating part of the polysaccharide nature of the antigen studied.

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer la ayuda prestada por el Dr. Antonio Breña de la Sección de Microscopía Electrónica de nuestra Institución. Asimismo la asistencia técnica de Elio Villanueva, Mireya Mendoza y Zuleima Cova. Parte de este trabajo fue financiado por los proyectos S1-1162 y S1-1297 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

BIBLIOGRAFIA

1. ALBORNOZ, M.B. Composición antigénica del *Sporothrix schenckii*. Su importancia en la orientación diagnóstica de las formas cutáneas y extracutáneas de la esporotricosis. Tesis de ascenso, Universidad Central de Venezuela, 1981.
2. BENCHIMOL, M., SOUSA, W., TRAVASSOS, L.R. Distribution of anionic groups at the cell surface of different *Sporothrix schenckii* cell types. *Infect. Immun.* 24 (1979) 912-919.
3. BERNHARD, W., AVRAMEAS, S. Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of Concanavalin A. *Exp. Cell Res.* 64 (1971) 232-235.
4. CARMICHAEL, J.W., Chryssosporium and some other aleurosporidic hyphomycetes. *Can. J. Bot.* 40 (1962) 1137-1173.
5. DE MEY, J., MOEREMANS, M., GEVENS, NUYDENS, R., DE BRABANDER, M. High resolution light and electron microscopy localization of tubulin with the IGS (immunogold staining) method.
6. DE WAELE, M., DE MEY, J., MOEREMANS, M., VAN CAMP, B. The immunogold staining method: and immunocytochemical procedure for leukocyte characterization by monoclonal antibodies. *Leukemia Markers*, editado por Knapp, W., Academic Press, Londres. 1981, pp. 173-176.

7. GRAHAM, R.C., KARNOVSKY, M.J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem, Cytochem*, 14 (1966) 91-302.
8. HEKTOEN, L., PERKINS, C.F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii* a new pathogenic fungus. *J. Exp. Med.* 5 (1900) 77-89.
9. HORISBERGER, M. Colloidal gold: a cytochemical marker for light and fluorescent microscopy and for transmission and scanning electron microscopy. *Scanning Electron Micros.* 2 (1981) 9-31.
10. KAPLAN, W., GONZALEZ OCHOA, A. Application of the fluorescent antibody technique to the rapid diagnosis of sporotrichosis. *J. Lab. Clin. Med.* 62 (1963) 835-841.
11. KAPLAN, W., IVENS, M.S. Fluorescent antibody staining of *Sporotrichum schenckii* in cultures and clinical materials. *J. Invest. Dermatol.* 35 (1960) 151-159.
12. LANE, J.W., GARRISON, R.G., FIELD, M.F. Ultrastructural studies on the yeast-like and micelial phases of *Sporotrichum schenckii*. *J. Bacteriol.* 100 (1969) 1010-1019.
13. LANE, J.W., GARRISON, R.C. Electron microscopy of the yeast to micelial phase conversion of *Sporotrichum schenckii*. *Can J. Microbiol* 16 (1970) 747-749.
14. RUSSELL, B., BECKETT, J.H., JACOBS, P.H. Immunoperoxidase localization of *Sporothrix schenckii* and *Cryptococcus neoforms* staining of tissue sections fixed in 4% formaldehyde solution and embedded in paraffin. *Arch, Dermatol*, 115 (1979) 433-435.
15. TRAVASSOS, L.R., MENDOCA-PREVIATO, L., GORIN, P.A.J. Heterogeneity of the rhamnomannans from one strain of the human pathogen *Sporothrix schenckii* determined by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Inf. Immun.* 19 (1978) 1107-1109.
16. VARDELL, I.M., TAPIA, F.J., PROBERT, L., BUCHAN, A.M.J., GU, J., DE MEY, J., BLOOM, S.R., POLAK, J.M. Immunogold staining procedure for the localization of regulatory peptides. *Peptides* 3 (1982) 259-272.
17. WILSON, D.D., MANN, J.J., BENNET, J.E., UTZ, J.P. Clinical features of extracutaneous Sporotrichosis. *Medicina (Baltimore)* 46 (1967) 265-279.