

CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS DE Aspergillus fumigatus, A. niger Y A. flavus PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA ASPERGILOSIS

por Amelia Pérez Mejía* y
Conchita Toriello*

OPTIMAL CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF Aspergillus fumigatus, A. niger AND A. flavus ANTIGENS FOR THE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF ASPERGILLOSIS

SUMMARY

Metabolic (culture filtrate), polysaccharide and cytoplasmic antigens of Aspergillus fumigatus, A. niger and A. flavus were obtained at 2, 4, 8 and 15 days of fungal growth. No antigens were isolated after 3 weeks to eliminate non-specific reactions due to C carbohydrate-C reactive protein. Their immunological reactivity was evaluated and compared by gel immunodiffusion and counterimmunoelectrophoresis with anti-A. fumigatus, anti-A. niger and anti-A. flavus hyperimmune rabbit antisera. Fifteen days cytoplasmic antigens from the three fungal species, showed a good reactivity and no cross reactions when tested with sera from patients with other mycotic diseases.

RESUMEN

Se obtuvieron antígenos metabólicos (filtrados de cultivo) polisacarídicos y citoplásmicos de Aspergillus fumigatus, A. niger y A. flavus a los 2, 4, 8 y 15 días de crecimiento de los hongos. No se procesó ninguno después de 3 semanas para eliminar la reacción inespecífica debida a carbohidrato C-proteína C reactiva. Se comparó su reactividad inmunológica por medio de las pruebas de inmunodifusión en gel y contraimmunoelectroforesis frente a sueros hiperinmunes de conejo anti-A. fumigatus, anti-A. niger y anti-A. flavus. Los antígenos citoplásmicos obtenidos a los 15 días de crecimiento de las tres especies presentaron buena reactividad y no mostraron reacciones cruzadas frente a sueros de pacientes con otras infecciones micóticas.

INTRODUCCIÓN

La demostración de anticuerpos en el suero de pacientes es una técnica útil al clínico para el diagnóstico de las micosis profundas y las oportunistas, entre las cuales se encuentra la aspergilosis, cuya incidencia ha aumentado en los últimos años (Rippon, 1988). Entre los métodos más utilizados en el laboratorio de se-

*Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 04510.

rodiagnóstico para este padecimiento se encuentran la inmunodifusión en gel (Coleman y Kaufman, 1972), la conrainmunolectroforesis (Mackenzie y Philpot, 1975), la fijación de complemento (Walter y Jones, 1968), la hemaglutinación (Ikemoto y Shibata, 1973), la inmunofluorescencia (Warnock, 1974) y las técnicas inmunoenzimáticas (Richardson y Warnock, 1984). La presencia de anticuerpos aunada a los hallazgos clínicos y del laboratorio micológico (cultivo e histopatología) constituyen un importante criterio diagnóstico de esta micosis (Toriello et al., 1986).

Los antígenos utilizados en estas pruebas varían ampliamente, desde filtrados de cultivo (metabólicos) hasta preparaciones miceliales (somáticas o citoplásmicas). Se han descrito diversos trabajos sobre la obtención de antígenos de Aspergillus (Hearn y Mackenzie, 1981; Hearn et al., 1986; Kim y Chaparas, 1978; Kim et al., 1979; Kurup et al., 1979; Kurup et al., 1984). Sin embargo, las diferentes cepas y metodologías empleadas hacen muy difícil una comparación entre los antígenos. Por otro lado, a pesar de que Aspergillus fumigatus es el principal agente etiológico de la aspergilosis humana, también existen otras especies causales, como lo son, A. niger y A. flavus. Es por esto que diferentes casos de aspergilosis podrían no ser diagnosticados si las pruebas serológicas se realizaran solamente con antígenos de una sola especie (Kaufman, 1977; Longbottom y Pepys, 1964).

Debido a la necesidad de uniformización de antígenos de Aspergillus y de disminuir la gran variabilidad que existe entre diferentes lotes de preparaciones antigénicas, se realizó el presente trabajo para conocer las condiciones óptimas de producción y de reactividad inmunológica de tres tipos de antígenos (metabólicos, polisacáridicos y citoplásmicos) de tres especies de Aspergillus: A. fumigatus, A. niger y A. flavus aisladas en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo. En este estudio se utilizaron A. fumigatus EH 149, A. niger EH 23 y A. flavus EH 24, del cepario de hongos del Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M. Los hongos fueron mantenidos en agar de Sabouraud a 26°C. Para obtener los antígenos de 2, 4, 8 y 15 días de crecimiento de los hongos estudiados, se utilizó el medio sintético de Smith (Smith et al., 1950). Para cada microorganismo se usó un matraz de 1 l conteniendo 200 ml de medio de Smith y se inoculó con 200 mg (peso húmedo) de micelio y conidios. Los matraces se incubaron a 30°C en condiciones de agitación.

Obtención de antígenos. Se obtuvieron tres tipos de antígenos de cada especie: metabólicos, polisacáridicos y citoplásmicos. A los 2, 4 y 15 días para A. fumigatus y a los 4, 8 y 15 días para A. niger y A. flavus.

El antígeno metabólico se obtuvo a partir del filtrado de cultivo según Mishra et al. (1982). La masa micelial se separó por filtración utilizando papel filtro Whatman No. 40 y luego se volvió a filtrar a través de membranas Millipore de diferente poro (8.0, 0.8, 0.45 µm). El filtrado se dializó y concentró 10 veces por ultrafiltración con equipo Amicon, utilizando una membrana PM 10 (Amicon). El antígeno polisacáridico se obtuvo a partir del filtrado del cultivo concentrado (antígeno metabólico) según la técnica modificada de Harrell et al. (1976). El concentrado del filtrado se precipitó con 2 volúmenes de acetona en frío, el precipitado se separó por centrifugación (3500 x g por 20 min) y se disolvió en 1 ml de

agua destilada. Se volvió a precipitar 3 veces con 3 volúmenes de alcohol al 90%, separando el precipitado otra vez por centrifugación (3500 x g por 20 min). El precipitado final se disolvió a una concentración de 1 mg/ml. La obtención del antígeno citoplásmico fue a partir del micelio. La masa micelial fue separada por filtración. Este micelio se lavó varias veces con solución salina estéril y se procedió al rompimiento celular (700 mg peso húmedo/100 ml de amortiguador de fosfatos: cloruro de sodio 8.0 g, fosfato de potasio monobásico 0.2 g, fosfato de sodio dibásico 2.9 g, cloruro de potasio 0.2 g, aforado a 1000 ml con agua bidestilada pH 7.2) utilizando el fraccionador Ribi a 40,000 psi de presión durante 2 seg, tres veces. Al comprobar el 90% de lisis celular, se centrifugó a 64,000 x g por 20 min, el sobrenadante se concentró 10 veces por ultrafiltración con equipo Amicon (membrana PM 10 Amicon) y se utilizó como antígeno citoplásmico. A todos los antígenos se les determinó el contenido de proteínas (Lowry et al., 1951) y carbohidratos totales (Dubois et al., 1956).

Obtención de sueros hiperinmunes. Para obtener sueros anti-A. fumigatus, anti-A. niger y anti-A. flavus se utilizaron conejos hembras Nueva Zelanda de 3 kg. Para la inmunización se utilizó antígeno metabólico con un contenido de 4 mg de carbohidratos/ml. Se inoculó 1 ml de este antígeno con adyuvante incompleto de Freund (1:1) por vía intramuscular los días 1, 2 y 3. Se inocularon intravenosamente 0.5 ml del antígeno solo, los días 10 y 17. Se dejó descansar al animal una semana y se volvió a repetir el mismo procedimiento de inmunización, al cabo del cual se sangró a blanco. Se separó el suero y se conservó en alícuotas de 1 ml en nitrógeno líquido.

Fuentes de obtención de suero humano. Para observar reacciones cruzadas con los antígenos estudiados, se utilizaron sueros de pacientes con histoplasmosis, coccidioidomicosis, candidosis y esporotricosis, provenientes todos ellos del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la S.S.

Pruebas serológicas. La inmunodifusión en gel (IDG) se realizó según la técnica de Ouchterlony (1962) en una solución de glicina (7.5%), cloruro de sodio (0.9%) y azida de sodio (0.1%) en agarosa al 1%. La técnica de conrainmunolectroforesis (CIE) se realizó utilizando una solución amortiguadora de barbituratos pH 8.2 (SIGMA de México) con agarosa al 1% y un voltaje de 20 mA por placa de 8.3 por 10.2 cm, según Palmer et al. (1977).

RESULTADOS

Los antígenos de A. fumigatus fueron obtenidos a los 2, 4 y 15 días de incubación ya que es un hongo de crecimiento muy rápido. Las cepas de A. flavus y A. niger crecieron más lentamente por lo que se obtuvieron antígenos a los 4, 8 y 15 días de incubación. En la tabla 1 se puede observar la concentración de proteínas y carbohidratos presentes en todos los antígenos estudiados de las tres especies fúngicas. Siempre se observó la mayor concentración de estos componentes en las preparaciones antigénicas de 15 días.

La actividad inmunológica de las preparaciones antigénicas estudiadas en las pruebas de IDG y CIE con los sueros hiperinmunes de conejo se muestran en la tabla 2. El mayor número de bandas correspondió a los antígenos obtenidos a los 15 días, en las tres especies y en los tres tipos de antígenos, sin embargo, los antígenos

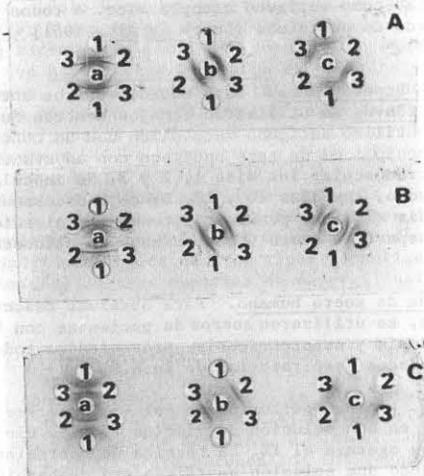


Fig. 1. Inmunodifusión en gel de los antígenos metabólicos (A) polisacáridicos (B) y citoplásmicos (C) con los sueros hiperinmunes de conejo anti-*A. fumigatus* (a), anti-*A. niger* (b) anti-*A. fumigatus* (c). 1= antígenos de *A. fumigatus*, 2= antígenos de *A. niger* y 3= antígenos de *A. flavus*.

aislados a los 2 días de crecimiento, también presentaron reactividad inmunológica con 1 banda de precipitación a excepción del antígeno metabólico de *A. fumigatus* que en la prueba de CIE presentó 2 bandas.

Los resultados de las pruebas de IDG y CIE con los antígenos probados frente a sueros de pacientes con histoplasmosis, coccidioidomicosis, candidosis y esporotricosis se muestran en la tabla 3. Se observó que los únicos antígenos que mostraron reacción cruzada fueron los metabólicos de 15 días de crecimiento de *A. fumigatus* y *A. flavus*, los cuales mostraron una banda de precipitación en las dos pruebas utilizadas. El antígeno de *A. fumigatus* sólo mostró cruce inmune con los sueros de pacientes con histoplasmosis y candidosis, mientras que el de *A. flavus* con los cuatro sueros probados.

Al probar la reactividad cruzada entre los antígenos metabólicos, polisacáridicos y citoplásmicos de 15 días de las tres especies frente a los sueros hiperinmunes de conejo, se observó cruce inmune entre los antígenos metabólicos de *A. fumigatus* y *A. flavus* con los sueros hiperinmunes anti-*A. flavus* y anti-*A. fumigatus* respectivamente (Fig. 1 A). Con los antígenos polisacáridicos y citoplásmicos sólo se observaron bandas de precipitación específicas entre cada antígeno y su suero homólogo (Fig. 1 B y C).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Mackenzie *et al.* (1988) enfatizan la importancia de estandarizar los antígenos de *Aspergillus*, ya que en ellos existe una gran variedad de macromoléculas complejas, muchas de las cuales son antigénicas. Tomando en cuenta los factores importantes para la estandarización de antígenos, en este trabajo se utilizó el medio de Smith con asparagina, que es un medio sintético en el que *Aspergillus* crece bien, y que no contiene componentes complejos que pudieran interferir en la elaboración del antígeno específico. Los cultivos se mantuvieron en agitación, lo cual repercutió en una mayor producción de antígeno (Huppert, 1982) y se utilizó una temperatura de incubación de 30°C, ya que el mismo autor (Huppert, 1982) describe esta temperatura como la óptima para obtener antígenos de hongos miceliales patógenos con mejores resultados. Con respecto al tiempo de incubación del hongo, con el objeto de obtener el mejor antígeno, existen diversos trabajos (Kim y Chaparas, 1978; Kurup *et al.*, 1984; Mishira *et al.*, 1982) y resultados muy variables entre ellos. Por esto, se probaron diferentes períodos de incubación en este trabajo, teniendo como resultado la mejor reactividad en las tres especies de hongos y en los tres tipos de preparaciones antigénicas estudiadas, aquellas obtenidas a los 15 días de incubación de los microorganismos. La concentración de los carbohidratos y proteínas fue siempre mayor en las preparaciones de 15 días lo que varía de los resultados obtenidos por Kim y Chaparas (1978) y Kim *et al.* (1979), quienes encuentran el mayor contenido proteico en sus preparaciones de 4 días. Esta variación pudiera ser debida a la diferente temperatura de incubación utilizada así como a la diversidad de medios de cultivo y a la diferente procedencia de las cepas utilizadas.

Tomando en cuenta que en los cultivos de más de tres semanas de incubación *Aspergillus* produce carbohidrato C, y que este componente reacciona con la proteína C reactiva del suero humano, que se encuentra elevada en muchos padecimientos infecciosos y por consiguiente puede dar resultados falsos positivos en las pruebas serológicas (Longbottom y Pepys, 1964), las preparaciones estudiadas siempre

fueron obtenidas antes de este tiempo de incubación para evitar reacciones inespecíficas debidas a la reacción carbohidrato C-proteína C reactiva.

Entre los trabajos sobre reactividad cruzada de *A. fumigatus* y otros hongos patógenos para el hombre, se encuentra el de Barreto-Bergter *et al.* (1981), quienes observaron que la D-galacto-D-manana aislada del micelio y conidios de *A. fumigatus* no presentó reacción cruzada con sueros hiperinmunes anti-*Histoplasma capsulatum* y anti-*Paracoccidioides brasiliensis*. En el presente trabajo sólo se encontró reacción cruzada entre los antígenos metabólicos de *A. fumigatus* y *A. flavus*, obtenidos a los 15 días de incubación, con sueros humanos de pacientes con histoplasmosis y candidosis. Este antígeno crudo representa una mezcla de fracciones antigénicas, entre las cuales puede existir alguna similar a la de otros hongos patógenos, por lo que se manifiesta la reacción cruzada. Estas reacciones inespecíficas no se observaron con los antígenos polisacáridicos y citoplásmicos.

La aspergilosis es causada por diversas especies de *Aspergillus*, pero la que se presenta con mayor frecuencia es *A. fumigatus*. Por ello, las pruebas serológicas se realizan principalmente con antígenos de este hongo. En el presente trabajo se llevaron a cabo pruebas cruzadas con el fin de valorar la capacidad de antígenos de *A. fumigatus* para determinar anticuerpos en contra de las otras dos especies de *Aspergillus* causantes de la enfermedad. Los resultados obtenidos muestran reactividad cruzada solamente entre *A. fumigatus* y *A. flavus* al utilizar sueros hiperinmunes de conejo. Al igual que Longbottom y Pepys (1964), se sugiere la utilización de mezclas de antígenos de las tres especies de *Aspergillus* para realizar las pruebas serológicas de diagnóstico y poder ampliar los límites de detección de estas micosis.

Los resultados de este trabajo sugieren que los mejores antígenos de *A. fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus* se aislaron a los 15 días de crecimiento, de los cuales se obtuvieron las mayores concentraciones de carbohidratos y proteínas, siendo que una mezcla de los antígenos citoplásmicos de las tres especies serían los óptimos para el diagnóstico serológico de la aspergilosis, pues no desarrollaron reacciones cruzadas frente a sueros de otros padecimientos micóticos y presentaron una buena reactividad inmune.

TABLA 1. CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS Y PROTEÍNAS EN ANTÍGENOS DE *Aspergillus*

ANTÍGENOS Y HONGOS	DÍAS DE OBTENCIÓN	PROTEÍNAS µg/ml	CARBOHIDRATOS µg/ml
METABÓLICOS			
<i>A. fumigatus</i>	2	1062	4413
	4	3895	4815
	15	6448	4879
<i>A. niger</i>	4	1415	3806
	8	1805	3853
	15	4141	3919
<i>A. flavus</i>	4	3859	2813
	8	4740	3406
	15	6097	4326
POLISACARÍDICOS			
<i>A. fumigatus</i>	2	50	136
	4	50	192
	15	270	263
<i>A. niger</i>	4	38	154
	8	72	170
	15	77	178
<i>A. flavus</i>	4	20	72
	8	55	76
	15	163	103
CITOPLÁSMICOS			
<i>A. fumigatus</i>	2	320	234
	4	449	410
	15	593	493
<i>A. niger</i>	4	341	292
	8	408	320
	15	510	342
<i>A. flavus</i>	4	352	409
	8	456	798
	15	615	873

TABLA 2. INMUNODIFUSIÓN Y CONTRAINMUNOELECTROFESIS DE LOS DIFERENTES ANTÍGENOS DE *Aspergillus* CON SUEROS HIPERINMUNES DE CONEJO A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN

ANTÍGENOS Y HONGOS	DÍAS DE OBTENCIÓN	INMUNODIFUSIÓN	CONTRAINMUNOELECTROFESIS
METABÓLICOS			
<i>A. fumigatus</i>	2	+	++
	4	+	++
	15	++	+++
<i>A. niger</i>	4	+	+
	8	+	++
	15	++	++
<i>A. flavus</i>	4	+	+
	8	++	++
	15	++	++
POLISACARÍDICOS			
<i>A. fumigatus</i>	2	+	+
	4	+	+
	15	++	++
<i>A. niger</i>	4	+	+
	8	+	+
	15	++	++
<i>A. flavus</i>	4	+	+
	8	++	++
	15	+++	+++
CITOPLÁSMICOS			
<i>A. fumigatus</i>	2	+	+
	4	+	++
	15	++	++
<i>A. niger</i>	4	+	++
	8	+	++
	15	++	+++
<i>A. flavus</i>	4	+	+
	8	+	+
	15	++	++

+ 1 banda, ++ 2 bandas, +++ 3 bandas.

TABLA 3. REACCIONES CRUZADAS DE LOS ANTÍGENOS DE *Aspergillus* CON SUEROS DE OTRAS MICOSIS

ANTÍGENOS Y HONGOS	DÍAS DE OBTENCIÓN	SUEROS DE PACIENTES CON			
		Histoplasmosis	Coccidioidomicosis	Candidosis	Esporotricosis
METABÓLICOS					
<i>A. fumigatus</i>	2	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	15	+(CIE)	-	+(IDG)	-
<i>A. niger</i>	4	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	4	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	15	+(IDG)	+(IDG)	+(IDG)	+(IDG)
POLISACARÍDICOS					
<i>A. fumigatus</i>	2	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	4	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	4	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
CITOPLÁSMICOS					
<i>A. fumigatus</i>	2	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	4	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	15	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	4	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	15	-	-	-	-

IDG = Inmunodifusión en gel
CIE = Contrainmunolectroforesis
+ = 1 banda

LITERATURA CITADA

- Barreto- Bergter, E., P.A.J. Gorin y R.L. Travassos, 1981. Cell constituents of micelia and conidia of Aspergillus fumigatus. Carbohydr. Res. 95: 205-218.
- Coleman, R.M. y L. Kaufman, 1972. Use of the immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. Appl. Microbiol. 23: 301-308.
- Dawes, R.A., D.J. MacGrill y M. Midley, 1971. Determination of glucose. In: J.R. Norris y D.W. Ribbons, (eds.), Methods in Microbiology. Academic Press, Londres.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- Harrell W., H. Ashworth, L. Britt, J. George, S. Gray, J. Green, H. Gross y J. Johnson, 1976. Procedural Manual for Production of Bacterial, Fungal, Parasitic Reagents. 3a. ed., Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service. Center for Disease Control, Atlanta.
- Hearn, V.M. y D.W.R. Mackenzie, 1981. Analysis of wall antigens of Aspergillus fumigatus by two dimensional immunoelectrophoresis. J. Med. Microbiol. 14: 119-129.
- Hearn, V.M., E.V. Wilson y D.W.R. Mackenzie, 1986. Aspergillus fumigatus antigens used in the serodiagnosis of aspergillosis. Zbl. Bakt. Hyg. A 261: 496-502.
- Huppert, M., 1982. Antigens used for measuring immunological activity. In: D.H. Howard, (ed.), Fungi Pathogenic for Humans and Animals. Part B. Pathogenicity and Detection: II. Marcel Dekker, Nueva York.
- Ikemoto, H. y S. Shibata, 1973. Indirect haemagglutination in pulmonary aspergilloma diagnosis. Sabouraudia 11: 167-170.
- Kaufman, L., 1977. Immunology: its value in diagnosing systemic fungal infections. Contrib. Microbiol. Immunol. 3: 95-105.
- Kim, S.J. y S.D. Chaparas, 1978. Characterization of antigens from Aspergillus fumigatus. I. Preparation of antigens from organisms grown in completely - synthetic medium. Am. Rev. Resp. Dis. 118: 547-551.
- Kim, S.J., S.D. Chaparas y H. Buckley, 1979. Characterization of Antigens from - Aspergillus fumigatus. IV. Evaluation of Commercial and Experimental Preparations and Fractions in the Detection of Antibody in Aspergillosis. Am. Rev. Resp. Dis. 120: 1305-1311.
- Kurup, V.P., A. Resnick, G.H. Scribner, J.H. Kalbfleisch y J.N. Fink, 1984. Comparison of Antigens and Serological Methods in Aspergillus fumigatus Antibody Detection. Mykosen 27: 43-50.
- Longbottom, J.L. y J. Pepys, 1954. Pulmonary aspergillosis: Diagnostic and Immunological significance of antigens and C-substance in Aspergillus fumigatus. J. Pathol. Bacteriol. 88: 141-151.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, 1951. Protein measurements with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Mackenzie, D.W.R. y C.M. Philpot, 1975. Counterimmunoelectrophoresis as a routine mycoserological procedure. Mycopathologia 57: 1-8.
- Mackenzie, D.W.R., E.V. Wilson y V.M. Hearn, 1988. Standardization of Aspergillus serodiagnostic reagent and procedures. In: J.R. Prous, (ed.), Proceedings of the X Congress of the Society for Human and Animal Mycology. Barcelona.
- Mishira, S.K., F. Staib, C. Rajendran y U. Folkens, 1982. Serodiagnostic value of culture filtrate antigens from aspergilli with septate phialides. Sabouraudia 20: 63-74.
- Ouchterlony, O., 1962. Diffusion in gel methods for immunological analysis. II. In: P. Kallos y B.H. Waksman, (eds.), Progress in Allergy. Vol VI. Karger, Basel.
- Palmer, D.F., L. Kaufman, W. Kaplan y J.J. Cavallaro, 1977. Serodiagnosis of Mycotic Diseases. Albert Ballows, Atlanta.
- Richardson, M.D. y D.W. Warnock, 1984. Antigen and antibody attachment in ELISA for Aspergillus fumigatus IgG antibodies. J. Immunol. Methods 66: 119-132.
- Rippon, J.W., 1988. Medical Mycology. 3a. ed. Saunders, Filadelfia.
- Smith, C.E., M.T. Saito, R.R. Beard, R.K. MacFadden, L.C.R. Wheat y B.V. Eddie, 1950. Serological test in the diagnosis and prognosis of coccidioidomycosis. Amer. J. Hyg. 62: 1-21.
- Toriello, C., F. Rébora Gutiérrez, M.L. Díaz Gómez y M.L. Taylor, 1986. Criterios para el diagnóstico de aspergilosis y candidosis sistémica. Rev. Mex. Mic. 2: 217-225.
- Walter, J.E. y R.D. Jones, 1968. Serologic Tests in Diagnosis of Aspergillosis. Dis. Chest 53: 729-735.
- Warnock, D.W., 1974. Indirect immunofluorescence test for the detection of Aspergillus fumigatus antibodies. J. Clin. Pathol. 27: 911-914.