

PREPARACION, EVALUACION Y ESTANDARIZACION DE ANTIGENO DE COCCIDIOIDES IMMITIS PARA DIAGNOSTICO SEROLOGICO POR INMUNODIFUSION

Angela Victoria Pérez Reyes *

Patricia Cáceres **

DOI: <https://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.v3i1.465>

Licencia: CC-BY 4.0

Sumario

Los estudios extensivos realizados por diversos autores han demostrado que las micosis pulmonares como la coccidioidomicosis ocurren con bastante frecuencia en el continente americano.

La coccidioidomicosis es una enfermedad infecciosa causada por *Coccidioides immitis* que presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas. La magnitud exacta de este problema en Guatemala, aún no ha sido determinado ya que su diagnóstico depende del aislamiento e identificación del hongo infectante, lo cual no siempre es posible realizar.

Los métodos inmunológicos proveen la evidencia primaria de una infección por hongos. Se ha observado que en casos de Coccidioidomicosis la inmunodifusión (ID) es un método serológico rápido y seguro para la detección de anticuerpos humorales como una indicación de enfermedad activa. Sin embargo debido a la difícil obtención y alto costo de los reactivos, se hace cada vez más necesario producir localmente nuestros propios reactivos. El objeto primordial de este estudio fue la preparación, evaluación y estandarización de antígenos de *C. immitis* para ser utilizado en pruebas serológicas de inmunodifusión para el diagnóstico de coccidioidomicosis pulmonar en una población guatemalteca con afecciones pulmonares, habiendo encontrado un caso positivo en un grupo de 100 pacientes.

Se comparó el antígeno miceliar con el metabólico (soluble) comprobando que el metabólico no es útil para la prueba de inmunodifusión (ID), ya que no se obtuvieron bandas de precipitación.

Además se evaluó la especificidad de uno de los antígenos preparados en la prueba de ID realizándola con suero de pacientes con otras afecciones fúngicas y de

personas aparentemente sanas, no habiendo encontrado ninguna reacción falsa positiva, por lo que se considera un reactivo confiable, específico y útil para el diagnóstico de coccidioidomicosis.

Introducción

La coccidioidomicosis es una enfermedad respiratoria primaria, causada por *Coccidioides immitis*, cuya distribución parece estar restringida a las áreas desérticas del nuevo mundo (1, 2, 3, 4).

En Guatemala las micosis pulmonares ocurren con mucha mayor frecuencia que la informada; pero debido a que sus manifestaciones clínicas suelen confundirse con otras afecciones como la Tuberculosis, en muchas ocasiones no son diagnosticadas adecuadamente. Asimismo no se cuenta con reactivos, medios y personal entrenado para este tipo de diagnóstico (5, 6, 7, 8).

Las pruebas serológicas han demostrado su gran efectividad para poner de manifiesto una afección fúngica como la coccidioidomicosis y su uso se hace necesario tanto como para diagnóstico o como para evaluación de terapia, pronóstico y estudios epidemiológicos (9,10).

Entre las pruebas serológicas existentes, los estudios anteriores han demostrado que la inmunodifusión (ID) es una técnica sencilla, rápida, reproducible y de alta sensibilidad para el diagnóstico de coccidioidomicosis (10).

Los antígenos empleados en estas pruebas están disponibles comercialmente fuera del país, pero los costos para un medio como el guatemalteco resultan altos; por lo que se inició la preparación de antígenos metabólico (soluble) y miceliar de *C. immitis* en un medio líquido para evaluar su utilidad en la prueba de inmunodifusión, establecer la frecuencia de casos de coccidioidomicosis en una población guatemalteca con afecciones pulmonares y demostrar que la producción de los mismos es posible en Guatemala a un costo mucho menor que el de los reactivos importados.

Materiales y métodos

ANTIGENOS: los antígenos fueron preparados según la técnica descrita por Harrel y colaboradores (11).

Se prepararon antígenos a partir de una cepa de *Coccidioides immitis* guatemalteca GU-2 del cepario del Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y una proveniente del Centro Para el Control de Enfermedades (CDC Atlanta, GA, USA) B-475, en un

* Químico Biólogo

** Químico Biólogo. Depto. Microbiología
Facultad de C.C. Q.Q. y Farmacia

medio líquido compuesto por extracto de levadura al uno por ciento dializado y glucosa al dos por ciento, incubando durante tres días a 30°C estacionariamente y después tres días en movimiento a 30°C a 120 RPM. El antígeno metabólico se obtuvo del filtrado del cultivo y el antígeno miceliar por tratamiento del micelio con agua destilada y tolueno dejándose incubar a 37°C durante tres días para producir autólisis, después de lo cual se filtró y se obtuvo el antígeno miceliar que fue concentrado al igual que el antígeno metabólico, empleando varios métodos: evaporación al vacío a 37°C, evaporación en horno a 37°C y liofilización. Los antígenos fueron evaluados determinando la concentración de carbohidratos (fenolsulfúrico de Dubois) (12), proteínas (Biuret) y por inmunodifusión frente a antígeno y antisuero de referencia (Huppert XV-B-83UFR y CDC Standard) respectivamente.

MUESTRAS DE SUERO: los sueros evaluados provenían de una población constituida por 100 pacientes con afecciones pulmonares hospitalizados en el Sanatorio Antituberculoso San Vicente; 50 personas aparentemente sanas; 2 pacientes con Aspergilosis y 1 con Histoplasmosis.

Los sueros fueron obtenidos por punción venosa y almacenados en congelación previa adición de timerosal (1:10000), hasta el momento de su análisis

PRUEBA DE INMUNODIFUSION: el método de inmunodifusión empleado es el descrito por Harrel et al (11),* empleando cajas de petrí descartables*, una matriz de 17 patrones de 7 pozos cada una y agar fenolizado al 1 o/o. El pozo central se utilizó para el antisuero de referencia (CDC standard); los pozos superior e inferior se llenaron con antígeno de referencia (Huppert XV-B-83UFR) y los otros 4 pozos se emplearon para los antígenos preparados. Cuando se corrieron los sueros de los pacientes se colocó en el pozo central el antisuero de referencia; los pozos superior e inferior se llenaron con antisuero de referencia y los otros 4 pozos se emplearon para los sueros de los pacientes. Se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda, después de lo cual se realizó la lectura. Previa adición de citrato de sodio al 5 o/o durante 45 minutos para eliminar bandas inespecíficas como las causadas por proteína C reactiva.

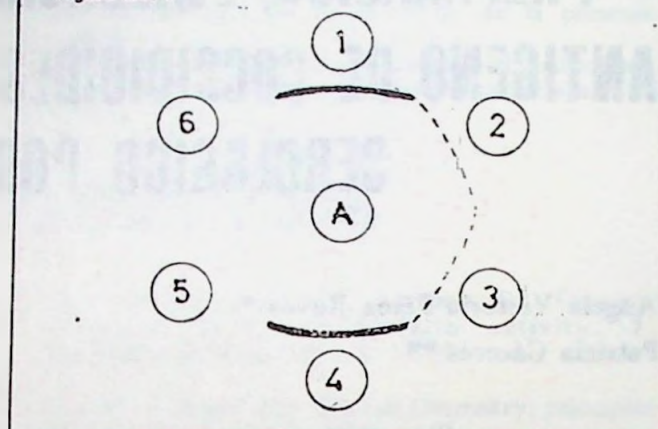
Se consideraron positivos todos los casos que daban por lo menos una banda de precipitación y de identidad con los reactivos de referencia y negativos aquellos que no presentaban banda de identidad.

Resultados y Discusión

Los antígenos de *Coccidioides immitis*, se prepararon con dos cepas diferentes: una guatemalteca GU-2 seleccionada entre 4 cepas por extracción de exoantígenos y la otra enviada por el Centro para el Control de Enfermedades (CDC Atlanta, GA., USA), B-475 (Fig. 1).

De esta manera se contaba con una cepa standard de producción de antígeno conocida y que servirá de control para evaluar el método de producción y la eficacia del antígeno preparado.

Figura No. 1

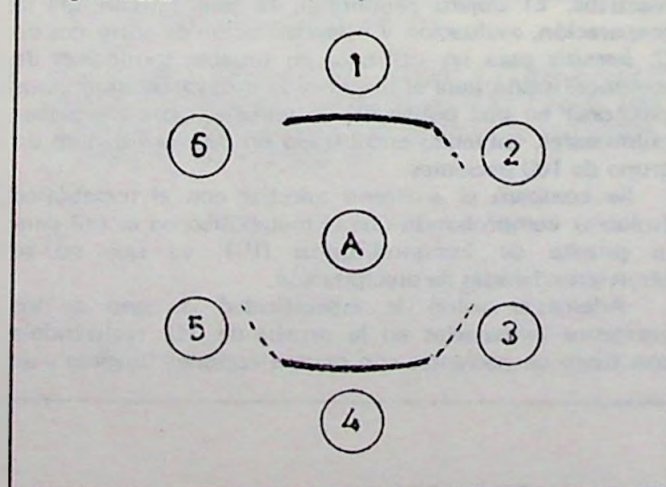


Microinmunodifusión de exoantígenos de cepas de *C. immitis*. Pozo A; antisuero de referencia, pozos 1 y 4: antígeno de referencia, pozos 2 y 3: antígenos de la cepa GU-2.

Los antígenos miceliar y metabólico (soluble) se prepararon por el método descrito (11) y se evaluaron por inmunodifusión. Sin embargo y por comunicación personal de la Doctora Conchita Toriello de la Universidad autónoma de México con amplia experiencia en la preparación de antígenos, el poco tiempo de incubación del hongo (6 días) y así su escaso desarrollo, podría influir directamente en la baja producción de antígeno.

Al evaluar el antígeno de la cepa GU-2 antes de ser concentrado frente al antisuero homólogo de referencia (CDC Standard) daba una banda de precipitación débil y difusa (Fig.2) y el preparado a partir de la cepa B-475 producía también una banda débil antes de ser concentrado (Fig.3).

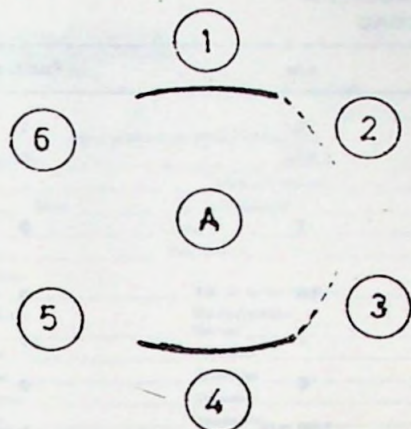
Figura No. 2



Inmunodifusión de antígenos B-475 a diferentes concentraciones en pozos 2, 3, 5 y 6 y antígeno de referencia en los pozos 1 y 4. Contra antisueros de referencia en el pozo A.

* L.L. Pellet co., 1421 Apple Street, Dallas, Texas.

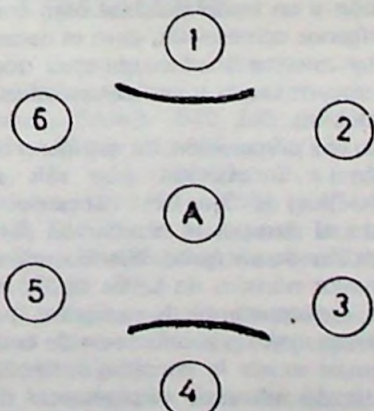
Figura No. 3



Inmunodifusión de sueros de pacientes, positivos pozos 2 y 3. Negativos: pozos 5 y 6 y antisuero de referencia en pozos 1 y 4 frente a antígeno B-475 en el pozo central (A).

Los antígenos miceliares fueron concentrados por diversos métodos, incluyendo: a) evaporación al vacío a 37°C, con el, no se logró una buena concentración, siendo necesaria una bomba de vacío de alta potencia y un control constante de temperatura y presión; b) evaporación al horno a 37°C, que conlleva un alto riesgo de contaminación, debido al largo tiempo que se requiere para lograr la concentración deseada y c) liofilización, que tiene la desventaja que en ocasiones causa desnaturalización proteica durante el proceso de congelación y se emplea solamente para volúmenes pequeños.

Figura No. 4

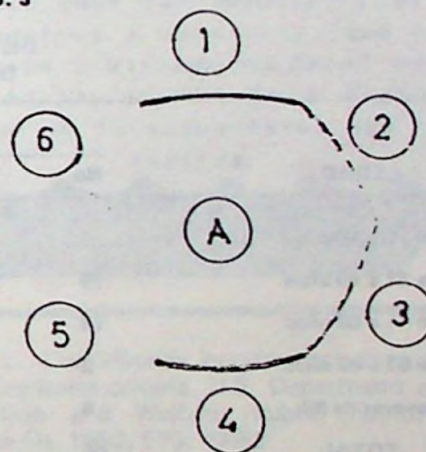


Inmunodifusión de antígeno metabólico B-475 en los pozos 2, 3, 5 y 6 y antígeno de referencia en los pozos 1 y 4 contra antisuero de referencia pozo central (A).

Una vez concentrado el antígeno, se dializó en agua a 4°C antes de evaluarlo por inmunodifusión (ID) para eliminar cualquier traza de tolueno que pudiera interferir en la reacción antígeno-anticuerpo. El antígeno GU-2 se analizó posteriormente para determinar el contenido de carbohidratos y proteínas, empleando los métodos de fenosulfúrico de Dubois (12) y Biuret respectivamente, obteniendo concentraciones de 1200 microgramos de carbohidratos por mililitro y 0 de proteínas. El antígeno B-475 no se analizó debido al poco volumen obtenido después de concentrarlo.

Posterior a la concentración de 2 a 140X el antígeno de la cepa GU-2 no reaccionó con el antisuero de referencia (CDC standard), mientras que el antígeno de la cepa B-475 persistía con una banda de precipitación débil, que no se logró intensificar con una concentración de 2-8X. Sin embargo a pesar que el antígeno B-475 no cumple con este requisito; si detecta presencia de anticuerpos en suero de pacientes con coccidioidomicosis.

Figura No. 5



Inmunodifusión de sueros de pacientes, positivos pozos 2 y 3. Negativos: pozos 5 y 6 y antisuero de referencia en pozos 1 y 4 frente a antígeno de referencia (Huppert) en pozo A.

El antígeno metabólico concentrado al igual que el anterior fue evaluado por inmunodifusión, no obteniéndose ninguna banda de precipitación con el antisuero de referencia homólogo (Fig. 4).

Para ser usado como referencia el antígeno debe formar una banda de identidad con el antígeno de referencia (10).

Para evaluar si la banda de precipitación que presentaba el antígeno B-475 era útil en el diagnóstico serológico de coccidioidomicosis se seleccionó una población de 100 pacientes (60 del sexo masculino y 40 del sexo femenino) con afecciones pulmonares (tabla 1) comprendidos entre las edades de 14 a 80 años (tabla 2) hospitalizados en el Sanatorio Antituberculoso San Vicente. Únicamente uno fue positivo dando una reacción similar con ambos antígenos, aunque más intensa con el antígeno de Huppert (Fig. 5) (formulario No. 1).

Este paciente tenía además diagnóstico de tuberculosis confirmado por baciloscopia, por lo que es importante

TABLA 1
DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LA MUESTRA
SEGUN DIAGNOSTICO Y POSITIVIDAD

Diagnóstico	No.	o/o	Posit. o/o
Tuberculosis pulmonar activa	8	8	1
Tuberculosis pulmonar tratada	71	71	0
Tuberculosis pulmonar con micosis pulmonar asociada	1	1	0
Tuberculosis pulmonar con enf. crónica debilitante asociada	14	14	0
Micosis Pulmonar	1	1	0
Enfermedades Debilitantes	5	5	0
TOTAL	100	100 o/o	1 o/o

Fuente: Archivo Clínico Hospital San Vicente, 1982-83.

TABLA 2
DISTRIBUCION SEGUN EDAD Y SEXO
DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

EDAD	Femenino		Masculino	
	No.	o/o	No.	o/o
De 0 a 20 años	6	15	7	12
De 21 a 40 años	19	47	27	44
De 41 a 60 años	13	33	18	30
De 61 a 80 años	2	5	7	12
Mayores de 80	0	—	1	2
TOTAL	40	100 o/o	60	100 o/o

Fuente: IDEM.

hacer notar que la tuberculosis no es excluyente de una coccidioidomicosis, pudiendo coexistir ambas entidades clínicas en un mismo paciente.

Por otro lado el antígeno B-475 no mostró ninguna reacción cruzada con los sueros de pacientes con otras afecciones fúngicas (Aspergilosis, Histoplasmosis) ni con sueros de personas aparentemente sanas.

El costo estimado del antígeno preparado en el Laboratorio de Micología es de diez quetzales (Q.10.00) por mililitro de antígeno tomando en cuenta que se hizo con el equipo y reactivos de referencia disponibles de este laboratorio. El precio de los antígenos de *C. immitis* cotizado por una casa comercial que importa estos reactivos es de aproximadamente setenta quetzales (70.00) por mililitro de antígeno.

Conclusiones y Recomendaciones

En Guatemala es posible preparar antígeno de *Coccidioides immitis* para realizar la prueba de

inmunodifusión a un costo bastante bajo comparado con el de los antígenos comerciales, pero es necesario adquirir más equipo y cristalería adecuada para que así puedan producirse a mayor escala y realizar estudios más amplios en toda la república.

El método de preparación de antígeno de *C. immitis* por agitación e incubación por seis días no es recomendable por lo que es necesario modificarlo, incrementando el tiempo de incubación para lograr una mejor producción de antígeno. Siendo además necesario evaluar un mayor número de cepas de *C. immitis* sobre todo aisladas recientemente de pacientes guatemaltecos, para encontrar las mejores productoras de antígeno.

En Guatemala existe la coccidioidomicosis asociada a tuberculosis siendo necesario implementar de rutina una prueba serológica para diagnóstico de esta micosis en pacientes con el diagnóstico de tuberculosis y además ampliar el estudio serológico a otras poblaciones sobre todo, residentes en áreas endémicas como las aledañas al Valle del río Motagua para una mejor evaluación de la frecuencia de tales casos.

Formulario 1.

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Química Biológica.

No. de Orden _____

Fecha _____

Investigación sobre Micosis Pulmonares

Nombre del paciente _____ Registro _____

Hospital _____ Fecha de ingreso _____

Edad _____ Sexo _____ Procedencia _____

Ocupación _____ Otros _____

Dx Clínico _____ Tpo. de evol. _____

Exámenes de Lab.: B.K. de esputo _____ B.K. de lavado gástrico _____

Signos y Síntomas: Dx Radiológico _____

Asma _____ Normal _____

Tos productiva _____ Infiltrado _____

Pérdida de peso _____ Cavidades _____

Pérdida de apetito _____ Derrame _____

Dolor de pecho _____ opacidades _____

Dificultad respiratoria _____ Otros _____

Fiebre _____

Hemoptisis _____

Otros _____

Tratamiento _____

Pruebas serológicas (detección de anticuerpos):

Antígeno Posit. Negat. No. de bandas Reacciones cruzadas

C. *Immitis*

Análisis micológico de esputo: _____

Otras pruebas adicionales: _____

Suero enviado al CDC: Si _____ No _____ Resultado _____

Suero congelado para otras pruebas serológicas: Si _____ No _____

Observaciones: _____

El antígeno miceliar GU-2 está constituido básicamente por carbohidratos, por lo que no es adecuado para prueba diagnóstica; mientras que el antígeno C. *immitis* B-475 aún cuando la banda de precipitación es débil, puede usarse en el diagnóstico serológico de coccidioidomicosis.

Referencias

1. Kaufman L. Serology: its value in the diagnosis of coccidioidomycosis, criptococosis and histoplasmosis, PAHO. 1970; 205: 96-100.
2. Connant N, Smith D, Baker R, and Callaway J. Micología, 3 ed. Colchero F. trad. México: Interamericana, 1972. XI + 592p (p 134-160).
3. Emmons C W, Binford C, and Utz J. Medical Micology 3 ed. Philadelphia: Lea and Fabiger, 1977. V + 508p (p 207 -229).
4. Mayorga R, Espinoza H. Coccidioidomycosis in Mexico and Central América. Mycopathol. Mycol. appl. 1970; 41: 13-23.
<https://doi.org/10.1007/BF02051480>
5. Andrade C. Investigación de la Coccidioidomicosis en la capital de Guatemala por medio de la intradermoreacción a la coccidioidina: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación. Facultad de Ciencias Médicas) 1945. 32p.
6. Mayorga R. Coccidioidomycosis in Central America. University of Arizona Press, 1967; 8: 287-291.



ESTABLECIDOS EN 1926

Jaeger Sucs.

12 CALLE 8-53 ZONA 1
TELEFONOS: 510746 - 85165

El haber
podido servir
a usted durante
58 años consecutivos
es nuestro mayor orgullo.

...y continuaremos durante
muchos años más, suministrando
los equipos y materiales que el
químico y biólogo moderno ne-
cesita hoy en día, para desta-
car en la ardua tarea que
realiza.

7. Ajello L. *Coccidioides immitis*, isolation procedures and diagnostic criteria. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Atlanta Ga. 1953; 575: 47-52.
<https://doi.org/10.1080/00362176685190231>
8. Ajello L, Grecias G, Hugenholtz PG, Hall Lb. Recovery of *Coccidioides immitis* from the air. J. Int. Coc. Hum. Anim. Mycol 1965; 4: 92-95.
9. Kaufman L. Serodiagnostic of Fungal diseases. In Rose V. R. Friedman H. eds Manual of Clinical immunology. Washington, D.C. Am. Soc. Microbiol. 1976; 363-381 p.
10. Huppert M. Serology of Coccidioidomycosis. Rev. Med. Vet. Mycol. 1970; 41 : 107-113.
<https://doi.org/10.1007/BF02051487>
11. Harrel W. R. et al. Procedural Manual for Production of Bacterial, Fungal and Parasitic Reagents. Biological Reagents Section, Centre for Disease Control, Atlanta G.A. 1973.
12. Dubois M. et al. The Phenol-Sulfuric acid test for Carbohidratos. Analytical Chem. 1976; 28; 350-356.

Copyright (c) 1985 Angela Victoria Pérez Reyes y Patricia Cáceres



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) - [Texto completo de la licencia](#)