

DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA INMUNODIFUSION (ID) Y LA FIJACION DE COMPLEMENTO (FC), UTILIZANDO ANTIGENOS FUNGICOS PRODUCIDOS EN EL SERVICIO DE MICOLOGIA

María Luisa García Masaya de López, Monica Illescas Azurdia

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB-, Servicio de Micología Escuela de Química Biológica

I. SUMARIO

En el presente trabajo de inmunodiagnóstico de micosis se implementó y estandarizó la técnica de Fijación de Complemento (FC); con los antígenos y antisueros de *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis* producidos localmente para mejorar el diagnóstico de las infecciones producidas por los hongos mencionados, y se comparó con la prueba de Inmunodifusión en gel de agarosa (ID), ya establecida en nuestro laboratorio.

La prueba de Fijación de Complemento se realizó en dos fases: 1) Titulación de los reactivos y II) Prueba diagnóstica. De manera que la primera es básica para la segunda.

Se procedió a enfrentar los sueros de 83 pacientes de diferente condición (pacientes aparentemente sanos de las áreas endémicas de los hongos mencionados, pacientes con tuberculosis confirmada y el tercer grupo de pacientes con micosis profundas confirmadas y producidas por *C. immitis* y *H. capsulatum*). Se obtuvo un paciente positivo con la histoplasmina en las dos pruebas, ID y FC. De igual manera ocurrió con la coccidioidina, obteniéndose solo un paciente positivo. Ambos pacientes estaban diagnosticados anteriormente con ID. Se observaron estos resultados a pesar de haber utilizado, entre 80 - 85% de los sueros contaminados con bacterias, lo que provocó falsos positivos en FC, no así con ID. La experiencia adquirida en la implementación de la FC, con nuestros propios antígenos y antisueros, nos permitieron establecer que la calidad y potencia de los mismos en su forma cruda, funcionan adecuadamente en pruebas de tamizaje como la ID, pero en el caso de la FC, por ser cuantitativa y de mayor sensibilidad, es necesario mejorar su potencia y lograr su purificación. Que la FC, en nuestro laboratorio funciona bien con la hemolisina sin fenolizar y se recomienda utilizar el complemento comercial, ya que tratamos de obtener complemento fresco del suero de cobayo, pero resultó ser muy lábil, con bajos títulos y en pequeñas cantidades.

2. INTRODUCCION

En Guatemala, los principales agentes causales de las micosis profundas son: *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis* limitado a ciertas regiones geográficas conocidas como áreas endémicas favorables a su crecimiento, estas regiones están distribuidas en diferentes puntos de la república por su amplia variedad de climas. Conociéndose que el área endémica de histoplasmosis se encuentra en Escuintla y Alta Verapaz con sus regiones tropical - húmedo de abundante vegetación; y la de coccidioidomicosis es el Valle del Río Motagua de región seca, de calor intenso y vegetación xerófito (1-5).

En éstos lugares las personas entran en contacto con las conidias, dando lugar a una transformación morfológica debido a cambios metabólicos desarrollándose la infección. Esta infección puede no manifestarse, si lo hace sus signos y síntomas son similares a los de la tuberculosis (4,6-8).

El diagnóstico micológico puede satisfactoriamente en el menor de los casos, por medio de examen directo de la muestra, histología y/o cultivo, que requieren de mucho tiempo (2 -3 semanas). Por lo que es necesario contar con pruebas serológicas para un diagnóstico más rápido y que ofrezcan mayor sensibilidad. En el Servicio de Micología, actualmente se cuenta con dos técnicas cualitativas: la Inmunodifusión en gel (ID) y la Precipitación en tubo (PT), ambas pruebas son sencillas, sensibles y específicas, la primera detecta las inmunoglobulinas tipo IgG y la segunda las de tipo IgM (9-12).

En este trabajo se implementó la Fijación de Complemento (FC), la que permitió complementar la batería

de pruebas, ya que por ser cuantitativa es valiosa no sólo para el diagnóstico de las micosis profundas, sino también para darle seguimiento a los pacientes en lo que se refiere a pronóstico y tratamiento.

Al realizar las dos pruebas FC e ID, utilizando los antígenos y antisueros producidos en nuestro laboratorio, pudimos establecer que la prueba de FC, requiere de hemolisina y complemento comerciales de alta calidad, de que producir nuestro propio complemento, obteniéndolo de suero fresco de cobayo, no es posible, dado a que se necesitan de muchos ejemplares y el bioterio de nuestra Facultad, aún no cuenta con las instalaciones adecuadas; además que este complemento es lábil y se produce en poca cantidad. La hemolisina utilizada, en nuestro caso funcionó mejor sin fenol. Y que la contaminación bacteriana afecta los resultados que se pueden obtener con nuestra prueba.

Los antígenos crudos que actualmente producimos funcionan bien y detectan adecuadamente las micosis profundas por *C. immitis* *H. capsulatum*, cuando se usa la ID (90% de los casos), pero para que pruebas cuantitativas como la FC, es necesario mejorar su potencia, ya que los títulos presentados fueron bajos, por lo que se debe seguir trabajando para mejorar su potencia y lograr su purificación.

3. MATERIALES Y METODOS

A. ANTIGENOS Y ANTISUEROS: Utilizamos los antígenos de *C. immitis* lote 1989 y el de *H. capsulatum* lote 1992 y sus respectivos antisueros producidos de la siguiente manera: Anti - *C. immitis* del antígeno lote 1989 y anti - *H. capsulatum* del antígeno lote 1990, en conejas New Zeland.

B. FIJACION DE COMPLEMENTO (FC): Se realizó la prueba según Palmer (1977) con las siguientes modificaciones: Suspensión de eritrocitos de carnero al 1.4%, Hemolisina comercial (anti-eritrocitos de carnero -stroma) sin fenolizar, Complemento de cobayo comercial y placas de microtitulación con fondo en "U" (13 - 14).

C. INMUNODIFUSION (ID): Se realizó la prueba de Outhertony con agarosa al 1% y buffer de glicina.

D. PROCEDIMIENTO

1. FIJACION DE COMPLEMENTO (FC): Se realizó en dos fases: (13,14)

a. Fase I: Titulación de los siguientes reactivos: Hemolisina
Complemento
Histoplasmina lote '92
Coccidioidina lote '89

b. Fase II: Prueba diagnóstica en micrométodo: Se enfrentaron los sueros de los pacientes (que fueron conservados a -20°) contra los antígenos mencionados anteriormente, con el fin de hacer un antígeno anticuerpo. Luego se añadió el complemento a la dilución óptima, que le permitiera unirse al complejo antígeno - anticuerpo.

Al día siguiente se añadió el sistema indicador que consiste en eritrocitos de carnero al 1.4% marcados con la hemolisina a una dilución óptima. Se dejó reaccionar por media hora y luego se observó la hemólisis en cada uno de los pozos.

2. INMUNODIFUSION (ID): Se utilizó porta objetos cubiertos con una solución de agar en gel al 1% la que se perforó en base a un portón de seis (6) pozos. Estos se llenaron con controles positivos en los extremos y en los pozos sobrantes con las diferentes muestras en estudio. En el pozo central se colocó el antígeno correspondiente al hongo que se está estudiando. Los porta objetos se dejaron por 48 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Las lecturas se realizaron contra luz indirecta, para poder observar la formación de las bandas de precipitación.

E. EXPERIMENTAL: Se hizo un estudio descriptivo de 83 pacientes elegidos a conveniencia, de la siguiente forma:

- Grupo A:** 24 pacientes aparentemente sanos del área endémica de histoplasmosis y 24 de la coccidioidomicosis; totalizando 48 pacientes.
- Grupo B:** 24 pacientes con tuberculosis confirmada, con rayos X y cultivo.
- Grupo C:** 10 pacientes con histoplasmosis (incluyendo uno sólo con Precipitación en tubo positivo) y 1 paciente con coccidioidomicosis; todos diagnosticados en el Servicio de Micología.

Y con el antígeno de *H. capsulatum* se trabajaron únicamente 25 sueros distribuidos de la siguiente manera:

- 6 sueros del grupo A
- 6 sueros del grupo B y
- 7 sueros del grupo C.

4. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En la fase preliminar de la Fijación de Complemento se encontraron títulos altos de hemolisina y complemento, no así en los antígenos producidos en el Servicio de Micología (ver tabla No. 1)

Con éstos títulos se procedió a realizar la prueba diagnóstica a las distintas muestras almacenadas a -20°C. Obteniéndose los resultados con FC que se observan en la tabla No. 2; de estos sueros tenemos que el 41% están positivos con coccidioidina y el 60% con histoplasma como lo muestra la tabla No. 3.

Los resultados muestran falsos positivos debido a la contaminación; producida por las bacterias que utilizan los eritrocitos promoviendo hemólisis, positivizando la reacción (13,15, Trent F, comunicación personal). Esto se dió en la mayoría de los sueros a pesar del uso del thimerosal como preservante y que probablemente se debió a los continuos congelamientos y descongelamientos, que nos vimos en la obligación de realizar.

Al mismo tiempo se usó la técnica de Inmunodifusión en gel de agar con las mismas muestras coincidiendo en un positivo para cada antígeno (ver tabla No. 4). Dado el apoyo a que ambas técnicas son complementarias para el diagnóstico de los pacientes con micosis profundas.

Los resultados obtenidos nos muestran la importancia de realizar ambas pruebas, que nos permitan contar con más criterios para realizar el inmunodiagnóstico de las micosis profundas en nuestro país (16).

Además, la utilidad de la prueba de ID, que por tratarse de una prueba cualitativa menos sensible que la FC (13), la contaminación le afecta menos, manteniendo con esto su especificidad y su importancia como prueba de tamizaje, ya que es una prueba fácil, y al alcance de nuestras posibilidades, en lo que se refiere a costos. Que es importante mejorar la calidad y potencia de la histoplasmina y la coccidioidina producidas en nuestro laboratorio para su uso y en pruebas cuantitativas como la FC y ELISA.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- A. Los antígenos y antisueros de *C. immitis* e *H. capsulatum*, producidos localmente presentan títulos bajos con la prueba de Fijación de Complemento.
- B. Para realizar la prueba de Fijación de Complemento en las condiciones del Servicio de Micología se debe utilizar el Complemento y la Hemolisina comerciales, esta última sin fenolizar; ya que el fenol precipita al ser almacenado a -20°C.
- C. La contaminación bacteriana provoca anticomplementariedad en los sueros resultado falsos positivos por lo que se recomienda alicuotarlos o bien usarlos frescos.
- D. Es recomendable, utilizar las dos técnicas, Inmunodifusión y Fijación de Complemento, en el mismo

paciente para evaluarlo tanto en el diagnóstico como el pronóstico del mismo y obtener muestras seriadas durante el tratamiento y post tratamiento.

- E. Estandarizar la concentración proteica de los antígenos previo a ser utilizados en Fijación de Complemento.
- F. Se recomienda purificar los antígenos, produciendo un complejo purificado de proteínas para cada antígeno.

6. AGRADECIMIENTOS

- A. Al Lic. Frederick Trent por colaboración en la realización del montaje e interpretación de la técnica de Fijación de complemento.
- B. Al Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB- por el apoyo incondicional, aportando el financiamiento necesario hasta alcanzar el objetivo de nuestro trabajo.
- C. A las Docentes - Investigadoras de la UNAM, México, Dra. Conchita Toriello, Dra. María del Rocío Reyes y Dra. Lucía Taylor; por su colaboración y adiestramiento en la realización del montaje de la técnica de Fijación del Complemento.

7. REFERENCIAS

- 7.1 Pérez E. Coccidiooidomycosis en Guatemala. Guatemala: Imprenta Universitaria, 1971. 98p. (p 25-60)
- 7.2 Mayorga R. Areas endémicas de Coccidiooidomycosis en Guatemala. Guatemala: Resúmenes del Congreso Centroamericano de Microbiología. Doc. Tec. 1971. 289p. (p15-35).
- 7.3 Zaid P. Prueba de coccidiooidomycosis e histoplasmina en la población de la villa de Tiquisate y sus alrededores. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1988. 69p.
- 7.4 Muñoz C. Aislamiento de *T. schoenleinii* del ambiente de Totonicapán y algunos factores que favorecen o inhiben su crecimiento. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1983. 60p.
- 7.5 Mayorga R, Camey I, Rendón J. Histoplasmosis of *H. capsulatum*. Inf Imm 1987; 6: 1971; 1:19-23
- 7.6 Medoff G, et. al. Morphogenesis and Pathogenesis of *H. capsulatum*. Inf Imm 1987; 6: 1355-1358
- 7.7 Jiménez JA. Caracterización bioquímica de hongos causantes de micosis profundas; Análisis inmunológico. México: Universidad Autónoma de México -UNAM-, (tesis de graduación Facultad de Medicina), 1988. 33p.
- 7.8 Rippon JW. Medical Mycology, 2a. ed. Philadelphia:W. B. Saunders Co. 1982. 587 p.
- 7.9 Maresca B, et. al. Role of cistein in regulation of morphology and mitochondril activity in the dimorphic fungi. Proc. Natl. Acad. Scien. Microb. 1981; 7:4596-4600.
- 7.10 Izaguirre T. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del suelo de Alta Verapaz. Guatemala: Universidad de

San Carlos, (tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1983.63p.

- 7.11 Standard P, kaufmann L. Specific immunological test for the rapid identification of the members of the genus *Histoplasma*. J Clin Microbiol 1976; 3:191-199.
- 7.12 Kobayashi GS, Pappagianis D. Preparation and standarization of antigens of *H. capsulatum* and *C. immitis*. Mycopath et Mycol Appl 1970; 41: 139-153p.
- 7.13 Palmer DE, et. al. Serodiagnosis of micotic disease. Atlanta: American Lecture Series, 1977. XII + 191 p.
- 7.14 Restrepo A. Procedimiento serológico en la paracoccidioidomicosis. Medellín, Colombia: Adelantos Microb Enferm Infec 1984; 3:1183-211.
- 7.15 Organization Panamericana de la Salud. Manual of standarized serodiagnostic procedures for systemic mycoses. Part II: Complement Fixation, Washington: Public Health Service, 1974., 17 p.
- 7.16 Toriello C. et. al. Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic respiratory disease. Mycoses, 1991; 34: 133-40.0

VII. ANEXOS

TABLA No. 1: TITULACION DE REACTIVOS
1 fase de FC

REACTIVO	TITULO
Hemolisina	1:4000
Complemento	1:600
Coccidioidina	1:8
Histoplasmina	1:16

TABLA No. 2: RESULTADOS OBTENIDOS

CRITERIO	COCCIOIDIOIDINA		HISTOPLASMINA	
	No.	%	No.	%
POSITIVO	34	40.96	15	60
NEGATIVA	49	59.04	10	40
TOTAL	83	100.00	25	100)

TABLA No. 3
TITULOS DE LOS SUEROS POSITIVOS EN FC

POSITIVOS EN DILUCION	COCCIDIOIDINA		HISTOPLASMINA	
	No.	%	No.	%
1:4	13	39.39	ND	ND
1:8	10	30.30	6	40.00
1:16	7	21.21	6	40.00
1:32	3*	9.09	2	13.33
1:64	0	0.00	1*	6.67
(TOTAL	33	100.00	15	100.00)

ND: No hay dato dilución no significativa

* Pacientes con ID positiva con el antígeno mencionado en el encabezado.

TABLA No. 4: RESULTADOS OBTENIDOS CON ID

CRITERIO	COCCIDIOIDINA		HISTOPLASMINA	
	No.	%	No.	%
POSITIVO	1	1.20	1	4
NEGATIVO	<u>82</u>	<u>98.80</u>	<u>24</u>	<u>96</u>
(TOTAL	83	100.00	25	100)