

**RESULTADO DEL EMPLEO
DE LAS TECNICAS DE
INMUNOPRECIPITACIONES
EN LA ORIENTACION DIAGNOSTICA
DE LAS MICOSIS PROFUNDAS.**

RESUMEN

*Empleando las técnicas de inmunoprecipitación (ID e IEF) fueron estudiados 750 sueros de pacientes con lesiones pulmonares, ganglionares y/o cutáneas, obteniendo reacciones positivas en 143 (19%). Los sueros de los casos de paracoccidioidomicosis dieron bandas de precipitación en 66 de los 68 casos (46%) diagnosticados por cultivo. En la IEF, se visualizaron al mismo tiempo anticuerpos contra el *H. capsulatum* en 12 de estos sueros.*

*Con el antígeno del *H. capsulatum*, se obtuvieron anticuerpos precipitantes en 41 (28%) sueros siendo más resolutive la JEF; el uso del "pool" de antígenos en la aspergilosis (ID) seguido del empleo de cada especie por separado permite un diagnóstico más preciso el cual es corroborado por la IEF en los casos de *A. fumigatus*; contra estos antígenos obtuvimos bandas de precipitación en 13 (9%) sueros. Los 5 (3%) casos sospechosos de coccidioidomicosis fueron manejados mediante la ID y la obtención de las líneas de identidad con sueros de referencia. En la esporotricosis cutánea fueron observados anticuerpos, en 11 (13%) sueros de los 18 estudiados visualizándose siempre el arco S en la IEF. Los resultados positivos obtenidos en 5 sueros procedentes de lesiones pulmonares continúan en estudio.*

MARIA B. DE ALBORNOZ (*)
ELIO VILLANUEVA (*)

El uso de las técnicas de inmunoprecipitación demuestra una vez más que ofrecen una gran ayuda en la orientación diagnóstica de las micosis profundas. Sin embargo, debido al hecho de trabajar con antígenos no totalmente específicos y a las diferentes formas de reaccionar el huésped, es muy importante que este estudio vaya acompañado de una historia clínica completa del paciente y que sus resultados sean, en lo posible, corroborados por el diagnóstico final del caso. También es necesario que el médico conozca los alcances y limitaciones de estas técnicas pues de lo contrario puede originar interpretaciones erróneas.

El estudio de las micosis, constituye un gran problema diagnóstico debido al polimorfismo clínico con que estas enfermedades se manifiestan y a las dificultades existentes para el aislamiento de su agente causal.

El empleo de las técnicas de inmunoprecipitación han demostrado ser de gran utilidad en su orientación diagnóstica (3, 8, 16) acrecentándose su valor en la medida que este estudio sea acompañado de una historia clínica del caso y que se conozca el diagnóstico definitivo.

El estudio de 750 sueros procedentes de diversos centros hospitalarios del país nos ha permitido adquirir una idea bastante precisa de cómo interpretar los resultados de estas pruebas empleando antígenos fabricados en nuestro laboratorio.

MATERIALES Y METODOS

Antígenos:

Los antígenos fueron hechos usando diferentes técnicas a partir de cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* (12), *Histoplasma capsulatum* (4), *Coccidioides immitis* (3), *Sporothrix schenckii* (1), *Aspergillus* sp (*fumigatus*, *flavus*, *niger*, *terreus*) (3) y *Candida albicans* (serotipo A) (10). Una vez obtenido el tiempo de crecimiento estipulado por los diferentes procedimientos, todos los antígenos fueron dializados, liofilizados y estandarizados (3, 9).

Técnicas:

Se emplearon la inmunodifusión (ID) y la inmunoelectroforésis (IEF) (7). El soporte utilizado en ambos casos fue la agarosa, el tampón usado en la preparación de la agarosa, en la corrida de la IEF y en las diluciones de los antígenos fue el veronal Ph.8.2, f.i:0.1.

El esquema en la IEF consistió en una ranura de 2mm. de ancho; el orificio donde se deposita el antígeno tiene 2mm. de diámetro y está situado a una distancia de 5mm. del suero. El voltaje empleado en la corrida fue de 20 v, durante 90 minutos a 4° C.

Una vez colocados los sueros y los antígenos en sus correspondientes sitios (ID) o de haber efectuado la electroforésis del antígeno y puesto el suero en la ranura (IEF), las láminas se colocan en cámara húmeda por un período de 48 horas a 4°C. Se continúa con el proceso sumergiéndolas en solución de citrato de Na al 5% . Posteriormente se hace el lavado en solución salina para finalmente secarlas y teñirlas con Amidoschwarz (3).

Todo suero que origina líneas de precipitación en la ID es pasado a la IEF con los antígenos con los cuales reaccionó. Cuando la clínica

del paciente orienta hacia determinada micosis, se procesa al mismo tiempo la ID y la IEF.

Sueros:

La mayoría de los sueros proceden de pacientes con lesiones pulmonares, ganglionares y/o cutáneas. Se guardan a -20°C hasta el momento de su estudio.

RESULTADOS.

En los 750 sueros visualizamos anticuerpos circulantes en 143 casos (19%). La reacción antígeno-anticuerpo se puso de manifiesto originando diferentes bandas que atribuimos al tipo de antígeno empleado y a la reacción del huésped. Los anticuerpos más frecuentes encontrados fueron los producidos por los antígenos del *P. brasiliensis* (46%), *H. capsulatum* (28%), *S. schenckii* (13%), *Aspergillus sp.* (9%) y *C. immitis* (3%) (Tabla 1). Para mayor claridad expondremos los resultados obtenidos en cada micosis.

TABLA 1. Anticuerpos precipitantes visualizados en 750 sueros mediante el uso de la ID e IEF

ANTIGENOS	ANTICUERPOS VISUALIZADOS
<i>P. brasiliensis</i>	66
<i>H. capsulatum</i>	41
<i>S. schenckii</i>	18
<i>Aspergillus sp.</i>	13
<i>C. immitis</i>	5
TOTAL SUEROS:	750 143(19%)

Paracoccidioidomicosis:

En un total de 68 casos de paracoccidioidomicosis comprobados por cultivos obtuvimos bandas de precipitación en la ID en 66 sueros, de éstos, 36 originaron 1 banda, 22 dos y 8 dieron tres bandas. Al mismo tiempo 12 de estos sueros reaccionarios con el *H. capsulatum* y 9 con otros antígenos; 2 sueros de casos de paracoccidioidomicosis cutánea fueron negativos (2).

En la IEF todos dieron arcos de precipitación localizados hacia el lado catódico de la lámina, de estos 34 dieron también arcos anódicos; conjuntamente 12 produjeron arcos de precipitación contra el antígeno del *H. capsulatum*. Los dos sueros procedentes de los casos cutáneos fueron negativos (Fig. 1, 2, 3, 4).

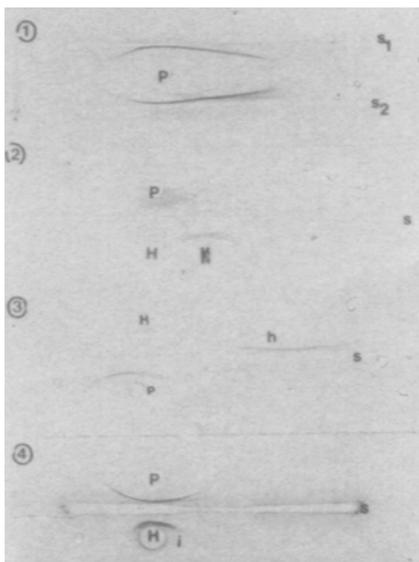


Fig.1-4. Diversas formas de reaccionar los sueros de pacientes de paracoccidioidomicosis con los antígenos de *P. brasiliensis* y *H. capsulatum* en la IEF. 1 arco catódico (S1) catódicos y anódicos (S2); 2, 3, 4 arcos contra el antígeno del-*P. brasiliensis* y *H. capsulatum*, (M, h,i =inespect'fico) P =antígeno del *P. brasiliensis*, H =antígeno del *H. capsulatum*, S =sueros.

Histoplasmosis:

Del total de los sueros estudiados, 41 mostraron bandas de precipitación. En la ID en 33 casos solo se observó 1 banda, mientras que en 5 se visualizaron dos bandas; en 3 sueros observamos bandas de precipitación contra otros antígenos, siendo las más nítidas las originadas contra el *P. brasiliensis* y el *C. immitis*.

Pasados a la IEF, en 24 sueros se vió la presencia del arco M; en un solo caso se apreció unicamente el arco H. En 4 obtuvimos el arco M y H; conjuntamente en 3 oportunidades fueron visualizados arcos catódicos y anódicos contra el *P. brasiliensis*.

Por otro lado 7 sueros positivos en la ID dan líneas inespecíficas (16) o fueron negativos en la IEF. En 6 sueros con ID negativa se continuó el estudio en la IEF por el cuadro clínico del paciente visualizándose en 3 de ellos la línea M en la IEF. El estudio de los pacientes solo permitió el aislamiento del hongo en 4 casos, mientras que en 1 caso diagnosticado por cultivo (niño de 6 meses) la serología fue negativa (Fig. 5, 6, 7, 8).

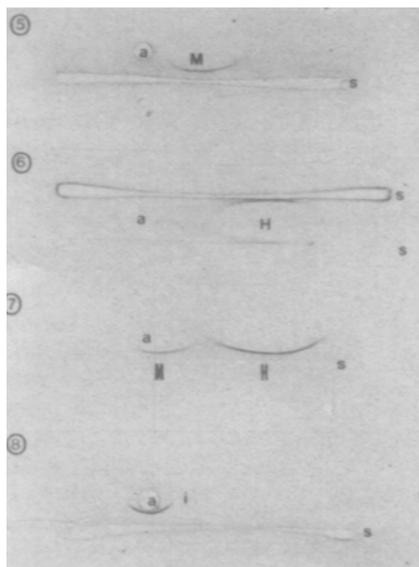


Fig.5-8- Reacciones de los sueros de los pacientes con anticuerpos precipitantes contra el antígeno de *H. capsulatum*: 5 arco M; 6 arco H; 7-arcos M, H; 8 reacción inespecífica (i); a. antígenos, S =sueros.

En tres casos de meningitis en niños se visualizaron en el L.C.R., anticuerpos precipitantes contra el antígeno de este hongo. En todos los casos fué confirmado el diagnóstico por aislamiento del hongo del L.C.R.

Aspergilosis:

Un total de 13 sueros dieron líneas de precipitación contra el "pool" de *Aspergillus* (*fumigatus*, *flavus*, *terreus*, *niger*). En una segunda etapa al pasar estos sueros contra el antígeno de cada especie por separado, 5 dieron mayor número de líneas de precipitación contra el antígeno del *A. fumigatus*, 4 contra *A. flavus*, 1 contra *A. niger* y 3 fueron negativos.

En la IEF, 4 dieron múltiples arcos contra el *A. fumigatus* entre los cuales se evidenciaron los arcos C y J (3), un suero dió arcos inespecíficos. Contra los restantes antígenos (*flavus* y *niger*) siempre obtuvimos arcos anódicos, 4 sueros fueron negativos (Fig. 9, 10). Los cuatro casos de diagnóstico serológico de aspergiloma por *A. fumigatus* fueron comprobados por histología.

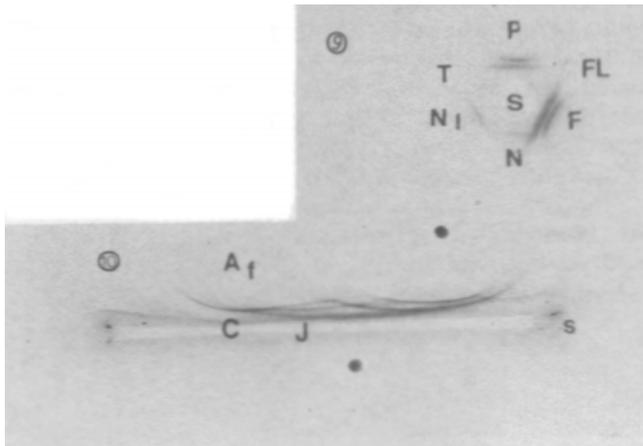


Fig 9-10 Sueros de pacientes contra diferentes especies del género *Aspergillus*; 9 resultado de la ID usando el "pool" de *Aspergillus*, y cada antígeno por separado (P: pool, F; *fumigatus*, N: *niger*, Ni: *nidulans*, T: *terreus*) 10, IEF un suero de aspergilosis por A, *fumigatus* y el antígeno homólogo, obsérvese los arcos C y J específicos de esta especie..

Coccidioidomycosis:

Contra el antígeno de este hongo 5 sueros dieron bandas de precipitación, de las cuales 3 originaron líneas de identidad con el suero de referencia contra el *C. immitis* (División de Micología C.D.C., Atlanta, U.S.A.). Un caso de coccidioidomycosis localizada comprobada por cultivo, no dió bandas de precipitación contra el antígeno homólogo.

Esporotricosis:

Se obtuvieron bandas de precipitación en 11 sueros procedentes de 18 casos de esporotricosis cutánea comprobados por cultivo, la IEF dió arcos de precipitación en dos sueros negativos en la ID. En esta última técnica se visualizó en todos los casos positivos el arco S (1).

En 5 sueros procedentes de lesiones pulmonares obtuvimos en la ID varias bandas de precipitación. En la IEF se observó un arco S de mayor amplitud (Fig. 11).

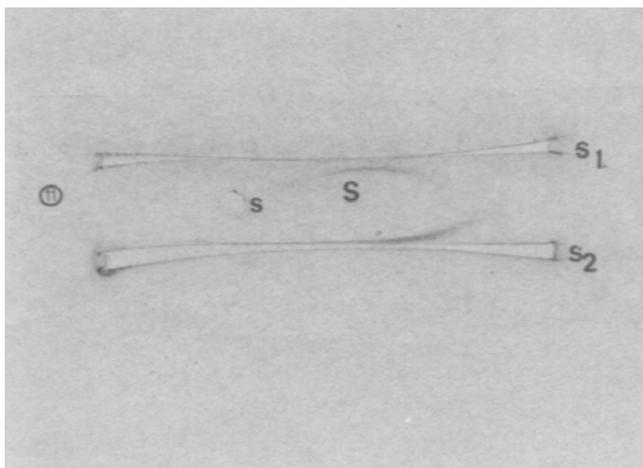


Fig. 11. Arcos de precipitación (s) visualizados en la IEF en casos de esporotricosis cutánea (S1) y en sueros de pacientes con lesiones pulmonares y anticuerpos precipitantes contra el *S. schenckii* (S2).

Candidiasis:

El estudio serológico de estos casos se ha iniciado recientemente. Los resultados obtenidos hasta el presente parecen indicar ausencia de anticuerpos precipitantes en casos de candidiasis cutánea y presencia de las bandas A y B (5) en las localizaciones profundas (paciente de candidiasis renal).

DISCUSION.

La ID parece representar la técnica ideal para la orientación del diagnóstico de las micosis profundas. Debido a la sencillez de su ejecución, puede ser montada en laboratorios de rutina en las áreas rurales del país donde se encuentra la población de mayor riesgo de contraer estas enfermedades. El esquema que usamos permite el estudio de un suero contra 6 antígenos diferentes, esta constituye una gran ventaja pues las localizaciones internas de los hongos patógenos no tienen una clínica definida que permita al médico hacer un diagnóstico preciso.

Sin embargo, no siempre los resultados de la ID traducen una orientación correcta, es sabido que en lesiones muy localizadas, enfermedades incipientes o en pacientes inmunodeprimidos, no hay suficientes anticuerpos circulantes para ser visualizados con esta técnica. Por otra parte el hecho de trabajar con antígenos que no son totalmente es-

pecíficos hace que sea necesario continuar el estudio con el empleo de sueros de referencia o con la IEF, para tener la seguridad de que los anticuerpos visualizados fueron originados por antígenos específicos. Es muy importante insistir en que todo suero o paciente venga acompañado de una historia completa, (estudio pulmonar, datos epidemiológicos, etc.) de manera de saber cómo manejar el caso, ya sea combinando varias técnicas, aplicando pruebas intradérmicas, indicando exámenes especiales, etc., lo cual aligerará el proceso haciendo al mismo tiempo que la orientación obtenida se acerque más al diagnóstico correcto.

El empleo de la IEF como complemento de la ID nos permite por un lado identificar si la reacción antígeno-anticuerpo visualizada en la ID es específica y por ser más resolutive, captará anticuerpos donde la ID no lo hizo. Otra ventaja que tiene es que al hacerla en forma seriada el aumento o disminución de sus arcos da idea de la evolución del paciente (Fig. 12). El hecho de usar los mismos antígenos para ambas técnicas simplifica la elaboración de éstos. La coloración de las láminas en la ID e IEF evita que pasen desapercibidas reacciones muy débiles.

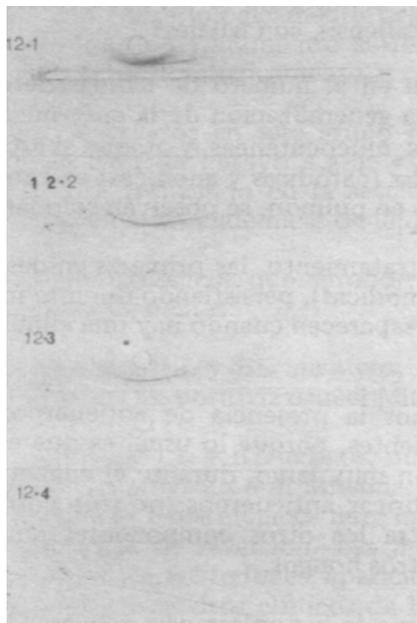


Fig. 12.- Seguimiento de un paciente de paracoccidiodomicosis con la IEF, obsérvese la disminución de los arcos de precipitación hasta su completa desaparición.

La micosis que manejamos con mayor seguridad es la paracoccidiodomicosis, las frecuentes lesiones que aparecen en las mucosas y piel nos permite aislar el hongo y estar seguros de la especificidad de la reacción, sin embargo, queda por determinar el grado de sensibilidad de estos procedimientos ya que lo importante sería detectar los casos incipientes evitando así las secuelas de la fibrosis pulmonar y cutánea post-tratamiento, que origina esta enfermedad, y posiblemente se acortaría el tiempo de tratamiento.

La presencia de arcos catódicos entre los cuales debe encontrarse el E2 considerado específico del *P.brasiliensis* (15) refuerza más los resultados de la ID, sin embargo hemos observado en sueros de casos de leishmaniasis difusa, hanseniasis y lupus eritematoso sistémico, arcos catódicos en la IEF, pero no nos fué posible hacer un estudio exhaustivo de estos pacientes para descartar una lesión de paracoccidiodomicosis que pudiera estar originando estos anticuerpos.

La presencia de los antígenos M y H específicos del *H.capsulatum* (14) en sueros de pacientes con paracoccidiodomicosis diagnosticados por cultivo plantea un interrogante: se trata de infecciones dobles en un mismo paciente, posibilidad factible en nuestro medio, al superponerse la epidemiología de estas dos micosis o como lo sustenta RESTREPO (13), el antígeno M del *H.capsulatum* y el productor de la banda 3 del *P.brasiliensis*, son iguales?

La variación en el número de bandas detectadas en el IEF la relacionamos con la generalización de la enfermedad, así en casos con lesiones pulmonares, mucocutáneas, y ataque al estado general, observamos múltiples bandas (catódicas y anódicas) en cambio en casos aparentemente localizados en pulmón, se observan solo la(s) catódica(s).

Durante el tratamiento, las primeras en desaparecer son las bandas inespecíficas (anódicas), persistiendo durante más tiempo la(s) catódica(s) las cuales desaparecen cuando hay una eliminación total del hongo en el organismo.

Interpretamos la presencia de anticuerpos inespecíficos en el suero de estos pacientes, porque lo usual es que estos casos tengan un tiempo de evolución muy largo, durante el cual el organismo ha tenido oportunidad de fabricar anticuerpos, no solo contra el antígeno(s) específico sino, contra los otros componentes antigénicos del *P.brasiliensis* comunes a otros hongos.

Con relación a la histoplasmosis, sabemos la dificultad que existe para aislar el *H.capsulatum* del pulmón, localización más frecuente de este hongo, sin embargo la presencia de una o dos bandas en la ID que en la IEF son identificadas como arcos M y/o H en suero de pacientes con una sintomatología compatible con esta micosis y la reacción positiva a la Histoplasmina en los casos que cursan con buen estado general permiten hacer el diagnóstico de esta micosis.

La IEF al ser más resolutive ha permitido orientar el diagnóstico donde la ID había sido negativa. La presencia de arcos catódicos contra el antígeno del *P. brasiliensis* en suero de pacientes con histoplasmosis, plantea la misma situación comentada en párrafos anteriores.

Con respecto al diagnóstico de la aspergilosis, consideramos muy útil el uso de la mezcla de los 4 antígenos de los agentes etiológicos más comunes de esta micosis pues permite descartar con el empleo de un solo preparado 4 agentes etiológicos diferentes, y captar otras especies que tengan afinidad con uno de los empleados. Reacciones inespecíficas en la ID con el uso de estos antígenos, han sido ya comunicados (6).

En el diagnóstico de la coccidioidomicosis en nuestro país, tiene un papel importante la epidemiología de esta micosis principalmente en lo que se refiere a la distribución geográfica del *C. immitis* ya que si el paciente no procede de zonas endémicas casi se descarta una coccidioidomicosis, situación que comprobamos una vez más en este estudio al demostrar que un caso con ID y fijación de complemento positiva, procedente de otra área del país se trataba de reacciones inespecíficas al no dar línea de identidad con el suero de referencia y tener una respuesta negativa a la Coccidioidina.

La inclusión del antígeno metabólico hecho a partir de la forma filamentosa del *S. schenckii* en este estudio, permitió poner en evidencia que éste es más sensible y específico que el fabricado a partir de la forma levaduriforme al captar 60% de los casos de la forma cutánea de esta enfermedad.

La visualización del arco S en la IEF en todos los casos en los cuales se observaron anticuerpos precipitantes en la ID parece corroborar que esta fracción antigénica podría ser específica del *S. schenckii* (1).

La presencia de anticuerpos precipitantes contra el *S. schenckii* en pacientes con lesiones pulmonares nos orientan hacia la existencia de lesiones extracutáneas de esporotricosis, cuya etiología aún no ha sido confirmada por el cultivo del hongo en nuestro medio (10).

Es indudable la gran utilidad de estas técnicas en la orientación diagnóstica de estas enfermedades, pero creemos también que si el médico no está familiarizado con las diferentes modalidades que pueden presentarse y la persona que las hace no tiene conocimiento clínico de la enfermedad pueden haber interpretaciones erróneas, por lo tanto se debe hacer un esfuerzo en dar una orientación lo más precisa posible cuando se entrega el resultado y exigir a la vez una historia completa del caso, previa a la realización de estos estudios.

También es muy importante el control serológico de estos pacientes: trimestral el primer año, semestral el segundo año y anual por tiempo indefinido; esta es la única manera de formar nuestro propio criterio sobre el valor de estos estudios como métodos eficaces para seguir el desarrollo de la enfermedad y hacer un tratamiento de acuerdo a la evolución del caso.

Solo será con el trabajo en conjunto de diferentes especialistas (médico, mitólogo, dermatólogo, neumonólogo, inmunólogo, bioanalista, etc.) como podrá llegarse a un total conocimiento de estas enfermedades, y a un diagnóstico correcto de las mismas.

SUMMARY.

Using immunoprecipitation techniques (ID and IEF) we studied 750 sera from patients with pulmonary, lymphnode and/or cutaneous lesions and 143 (19%) of them gave positive reactions. The serum from paracoccidioidomycosis cases gave precipitation bands in 66 of the 68 (46%) diagnosed by culture. In the IEF, we saw simultaneously antibodies towards *H.capsulatum* in 12 of these sera. With the *H.capsulatum* antigen we obtained precipitating antibodies in 41 (28%) of the sera, with greater resolution with IEF. Using a pool of antigens in aspergillosis (ID) followed by the use of each species separately we could obtain a more precise diagnosis, which was corroborated by the IEF in the case of *A.fumigatus*, against these antigens we obtain precipitations bands in 13 (9%) sera. The 5 (3%) cases suspicious of coccidioidomycosis were managed through ID and identity lines with reference sera. In cutaneous sporothrychosis we found antibodies in 11 (13%) sera from the 18 cases studied, always saw S arc in the IEF. The positive results obtained in 5 sera from pulmonary lesions are still being studied.

The used of immunoprecipitation techniques shows once more that they are important for diagnostic orientation in deep mycoses. Nevertheless due to the fact of working with antigens not completely specific and the diverse forms of reacting of the host, it is very important that this kind of study be used together with a very complete clinical case history of the patient and that its results be, as far as possible corroborated by the final diagnosis of the case. It is also necessary that physician be knowledgeable on the possibilities and limitations of these techniques, since they can originate erroneous interpretations.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Albornoz, M.B. de , Villanueva, E. y Torres, E.D. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous forms of sporothricosis. *Mycopathologia*. 85; 177-183, 1984.
 - 2.- Albornoz, M.B. de., y Fuenmayor, F. Paracoccidioidomycosis cutánea. *Rev. Inst. Med. Trop. de Sao Paulo*. 25(20): 82-86, Marzo - Abril, 1983.
 - 3.- Biguet, J., Tran Van Ky, P., y Andrieu, S. L'analyse immunoelectrophoretique des structures antigeniques fongiques. Repercussion d'ordre taxonomique et diagnostique. *Bull. de la Soc. de Nancy de Pharmacie*. 71: 6-25, 1965.
 - 4.- Busey, J.F., Y Hinton, P.F. Precipitins in histoplasmosis. *Am. Rev. of Resp. Dis.* 92: 637-639, 1965.
 - 5.- Capron, A., Vernes, A., Fruit, J., y Douvry, F. Le diadnostique immunologique des candidoses. Evaluation de deux techniques: immunoelectrophorese et immunofluorescencia. *Sciences Medicales*. 4(5): 463-471, 1973.
 - 6.- Coleman, R.M., y Kaufman, L. Use of immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis. *App. Microb.* 23(2): 301-308, 1972.
 - 7.- Crowle, A.J. *Immunodiffusion*. Academic Press, 1973.
 - 8.- Huppert, M., y Bayley, J.W. The use of immunodiffusion test in the coccidioidomycosis. *Am. Jour, Clin. Path.* 44: 364-368, 1965.
 - 9.- Huppert, M. Standarization of immunological reagents. *International Symposium of Mycoses*. Pan American Health Organization, Scientific Publication N° 205, Washington. D.C. 1970.
 - 10.- Murzi, H, y Albornoz, M.B. de, Esporotricosis pulmonar. *Rev. Tis. y Neum Vol. XXI*, Nros. 1 y 2: 79-87, Abril - Octubre, 1982.
 - 11.- Palmer, D, F., Kaufman, L., Kaplan, W., y Cavallaro, J.J. *Serodiagnosis of mycotic diseases*. Charles C. Thomas, Publisher, 1977.
 - 12.- Restrepo, M.A. Serological comparation of the two morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Inf. and Imm.* 2(3): 268-273, 1970.
 - 13.- Restrepo, M.A. y Moncada, L.H. Characterization of the precipitins bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. *App. Microb.* 28: 138-144, 1974.
 - 14.- Standar, P.G., y Kaufman, L. Specific immunological test for the rapid identification of members of the genus *Histoplasma*. *Jour. of Clin. Microb.* 3(2): 191-199, 1976.
 - 15.- Yarzabal, L.A. Anticuerpos Precipitantes específicos de la blastomycosis sudamericana, revelados por inmunoelectroforésis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 15(5): 230-237, 1971.
 - 16.- Walter, J.E. The significance of antibodies in chronic histoplasmosis by immunoelectrophoretic and complement fixation test. *Am. Rev. of Resp. Dis.* 99: 50-58, 1966.
- (*) Sección de Micología, Universidad Central de Venezuela, Instituto Nacional de Dermatología. Centro Panamericano para Investigación y Adiestramiento en Lepra y Enfermedades Tropicales PAHO, O.M.S. Apartado 4043, Caracas 1010, Venezuela.