

## INMUNODIAGNÓSTICO DE LAS MICOSIS SISTÉMICAS

Dra. Nieves Vargas de Caminos\*

Dr. Hernán Vargas Montiel\*

Lic. Maritza Molero\*

Vargas de Caminos N, Vargas H, Molero M. Inmunodiagnóstico de las Micosis Sistémicas. Derm Venez 1995; 33: 65-82

### RESUMEN

En la Unidad de Micología Médica del Hospital Universitario de Maracaibo se evaluaron 1.982 pacientes, entre Junio de 1984 y Octubre de 1994. Se les practicó estudio micológico (Examen directo, cultivo y/o histopatología), así como pruebas inmunodiagnósticas: *Inmunodifusión (I.D.)*, *Inmunolectroforesis (I.E.F.)* y *Agglutinación del látex (A.L.)*. Esta última se utilizó para diagnosticar criptococosis, con el *Crypto-Test*®. Se consiguieron 340 casos positivos (11,7%): 151 pacientes con Histoplasmosis (44,4%), 46 candidiasis (13,5%), 41 cromomicosis (12,0%), 25 paracoccidioidosis (7,3%), 20 coccidioidosis (5,9%), 19 criptococosis (5,6%), 17 aspergilosis (5,0%), 8 micetomas y 8 zigomicosis (2,3% cada una); 4 actinomicosis (1,2%) y 1 esporotricosis (0,3). El estudio micológico resultó positivo en 22,3% de las histoplasmosis, 67,7% de las candidiasis, 67,7% de las paracoccidioidosis, 73,0% de las coccidioidosis, 93,3% de las criptococosis y 73,3% de las aspergilosis. El inmunodiagnóstico resultó positivo en el 98,6% de las histoplasmosis, 94,1 % de las aspergilosis y en el 100% de las candidiasis, paracoccidioidosis, coccidioidosis y criptococosis. La mayor parte de los pacientes provenían de los Municipios foráneos del Zulia y de los Estados vecinos (52,0% de las paracoccidioidosis venían de los Estados andinos y 32,0% de Falcón, de donde también provenían el 40,0% de las coccidioidosis). El 51,7% eran hombres y el 48,3% mujeres. Todos los pacientes con paracoccidioidosis eran hombres y 88,8% trabajaban en el campo. Clínicamente la mayoría presentó sintomatología pulmonar, con la excepción de la criptococosis en donde predominó la afectación del S.N.C. (92,9%). El 60% de los pacientes con aspergilosis presentaron tuberculosis pulmonar previamente. *Se comprobó que el inmunodiagnóstico es sencillo, eficaz y la utilización de antígenos específicos y sueros de referencia hizo más confiable el estudio. Además, la población zuliana pudo acceder por primera vez a un medio diagnóstico micológico seguro de muy bajo costo.*

### ABSTRACT

From June, 1984 to October 1994 we evaluated 2982 patients to rule out systemic, with 340 positive diagnosis (11.7%): Both mycologic and immunodiagnosis were used. The former comprised direct examination, culture and/or histopathology. Immunodiffusion, Immunolectroforesis and Latex Agglutination (Crypto-Test®) were also used. We diagnosed 151 histoplasmosis (44.4%), 46 candidiasis (13.5%), 41 chromomycosis (12.0%), paracoccidioidosis (7.3%), 20 coccidioidosis (5.9%), 19 cryptococcosis (5.6%), 17 aspergillosis (5.0%), 8 mycetomas and 8 zigomycosis (2.3% each one); 4 actinomycosis (1.2%) and 1 sporotrichosis (0.3). Mycologic examination yielded positive in 22.3% of histoplasmosis, 67.7% of candidiasis and paracoccidioidosis, 73.0% of coccidioidosis, 73.3% of aspergillosis and 97.3% of cryptococcosis, whereas Immunodiagnosis was positive in 94.1% of aspergillosis, 98.6% of histoplasmosis and 100% of coccidioidomycosis, paracoccidioidomycosis, candidiasis and cryptococcosis. 51.7% were men and most patients came from rural areas and worked in agriculture related jobs. Pulmonary symptoms were common, but in cryptococcosis, C.N.S. disease appeared in 92.9% of patients. In aspergillosis, 60% had previous tuberculosis. I. D., I. E. F. and L.A. proved to be reliable methods of diagnosis, particularly when with specific antigens and reference sera

\* Escuela de Medicina - Cátedra de Patología Tropical  
Unidad de Micología Médica del Hospital Universitario de  
Maracaibo. Universidad del Zulia

## INTRODUCCION

Las Micosis son infecciones producidas por hongos microscópicos y se las ha llamado así desde las descripciones originales de Virchow, en 1856. Ellas ocupan un lugar más que destacado dentro de la patología médica, particularmente en la patología tropical y han sido objeto, durante las últimas décadas, de investigaciones para determinar sus características clínicas, epidemiológicas, diagnósticas y terapéuticas.

En la clasificación de los seres vivos, modificada por Whittaker en 1969,<sup>102</sup> los hongos han sido incluidos en el Reino *Fungi*, en el cual, a su vez, se incluyen las algas del género *Protothecay* los líquenes. Son seres vivos con una doble pared envolvente, gruesa y refringente (*eucarióticos*), que contiene una serie de compuestos fibrilares (quitina en su mayor parte), o compuestos amorfos, como los polímeros de manosa (*mannan*), los cuales están encajados en la malla fibrilar o superpuestos a ella. Generalmente no presentan flagelos. En el protoplasma se consiguen mitocondrias, ribosomas de 80 S, y centríolas de diferentes substancias, que transforman por fermentación, procedimiento fundamental para los hongos, ya que no poseen clorofila. El núcleo es esférico o elíptico, de doble membrana porosa, con una red de cromalina compacta, a veces laxa, que se organiza en cromosomas durante la división.

Su habitat es terrícola o acuático, o bien proliferan a expensas del huésped que parasitan. Si se alimentan de substancias muertas se denominan *Saprófitos* si es de tejidos vivos, *Parásitos*. La gran mayoría viven como saprófitos, incluidos muchos de los hongos patógenos para el humano, denominados *facultativos* por esa capacidad de vivir indistintamente con parásitos o como saprófitos. Son aeróbicos y se pueden reproducir en forma sexuada y asexuada. Los hongos patógenos pueden encontrarse en forma filamentosa (mohos) o en forma de levadura. Algunos, como el *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* y *Paracoccidioides*, son hongos *dimorfos*, es

decir, son capaces de crecer en forma de moho a la temperatura ambiente o como levaduras a 37°C. En el caso especial de *C immitis*, cuando se lo cultiva en medios especiales, o a temperaturas de 37°C, o en los tejidos, se ha observado que evoluciona adoptando formas esféricas y produciendo endosporos.<sup>9,30,76.</sup>

Cuando un hongo llega a parasitar al humano, aparecen las infecciones micóticas, las cuales han sido clasificadas, tanto clínica como histopatológicamente, en *Micosis Superficiales y Profundas*, estando estas últimas a su vez subdivididas en *Localizadas y Sistémicas*. Se han descrito casos de micosis profundas en prácticamente todo el mundo, pero su distribución en América Latina es mayor<sup>1,8,20,32</sup> ya que muchos de los hongos capaces de producir micosis tienen su habitat en las zonas tropicales e intertropicales, localización que corresponde a la de Venezuela, en donde se ha logrado determinar utilizando pruebas intradérmicas, que las zonas endémicas están diseminadas en todo el país.<sup>8,20,22,64,77,94</sup> Las micosis profundas han sido confundidas frecuentemente con una variada gama de enfermedades de diferente naturaleza, debido a su capacidad de producir lesiones en muchos órganos, observándose que adoptan diferentes formas de presentación clínica:<sup>3,16,23,44,45</sup>

- a) **Manifestaciones típicas** de una infección micótica, como ocurre son las lesiones verrugosas o en placas escamocostrosas de las cromomycosis y las lesiones húmedas, eritematosas, con leucopústulas satélites, de la *Candidiasis*, etc.
- b) **Sintomatología similar a la de otros padecimientos**, como las lesiones miliares pulmonares que produce la histoplasmosis, que llegan a ser confundidas con tuberculosis, y
- c) **La forma asintomática**, subclínica, que constituye la situación más frecuente. La infección por estos hongos puede dejar una lesión perfectamente limitada, inaparente, o invasiones generalizadas, si el pa-

ciente presenta deterioro de su sistema inmunológico, y también puede ocurrir que no quede ninguna lesión residual.<sup>7,12,59,92</sup>

Se requieren diversos factores, extrínsecos e intrínsecos, para que se establezca el parasitismo de un hongo, porque normalmente los individuos sanos presentan una resistencia elevada a infectarse, particularmente si su epidermis y mucosas están intactas. Los hongos pueden infectar cualquier tejido corporal, con diferentes grados de afectación, siempre en relación a la respuesta de defensa inmunológica del huésped infectado.<sup>53,63</sup> Existen básicamente dos barreras fisiológicas que impiden el crecimiento de los hongos en los tejidos: la **temperatura corporal y el potencial de óxido-reducción tisular**.<sup>76</sup> Esto se explica porque los hongos evolucionan mejor a las temperaturas menores del medio ambiente y porque el sistema enzimático del hongo funciona eficientemente con los substratos de materia no viviente del cual se alimentan. Adicionalmente, existen las barreras inmunodiagnósticas celulares naturales que impiden la proliferación del hongo.<sup>49</sup> Esta situación ha llevado a algunos autores a pensar que las infecciones micóticas son en realidad "*infecciones oportunistas*", que sólo aparecen si el huésped presenta algún grado de insuficiencia inmunológica o si es invadido masiva y reiteradamente por un hongo.<sup>63</sup> En relación con este aspecto, se debe tomar en cuenta la virulencia del hongo, pues algunos de ellos tienen un grado de virulencia menor, como *Cryptococcus*, *Aspergillus*, los cuales, para poder producir infecciones, requieren que el huésped presente algún grado de inmunosupresión.<sup>75,92</sup> Así, el mecanismo básico de infección estaría dado por la *capacidad que pueda tener el hongo para adaptarse al ambiente tisular adverso*. Esta capacidad sería elevada para aquellos hongos llamados "*patógenos*": crecerían como hongos miceliales a la temperatura ambiente y evolucionarían a un estado morfológico diferente, con membranas, estructura de carbohidratos y agregados de A.R.N. distintos, que los harían susceptibles de ser fagocitados por los macrófagos. Durante este proceso, el individuo desa-

rolla la respuesta inmunológica, bien mediante la formación de anticuerpos, o por inmunidad celular, la cual parece ser la forma más eficaz de defensa. La defensa mediante anticuerpos no es suficiente y esto parece quedar demostrado al analizar las formas de infección por hongos que presentan los pacientes con inmunosupresión por defecto de los **linfocitos T**, en los cuales son relativamente frecuentes las micosis, en oposición a lo que ocurre cuando existe un defecto de **linfocitos B**, en donde se observan menos micosis.<sup>5,18,30,40,44,81,82</sup>

La evaluación adecuada de la clínica y epidemiología de las micosis profundas, aunada a otros estudios, como los radiológicos, pueden orientar hacia el diagnóstico más o menos preciso de una micosis, pero esto debe ser confirmado demostrando la presencia del hongo con exámenes directos o por cultivos. Estos, lamentablemente no siempre pueden evidenciar al agente causal, aun cuando dichos estudios se repitan varias veces. Es por eso que el inmunodiagnóstico se ha constituido en un grupo de exámenes importantes, por la especificidad de las reacciones inmunodiagnósticas para los diferentes hongos,<sup>11,26,29,37,43,50,55,58,101,112</sup>

Estos estudios serológicos se han venido utilizando en micología desde hace varios años,<sup>28,48,51,56,74,103</sup> pero siempre se ha presentado el problema de que los antígenos utilizados en los diferentes laboratorios no han sido estandarizados, porque son producidos de diferentes maneras: se sabe que varias de las especies de los hongos patógenos existen en la naturaleza en la fase evolutiva micelial, que es diferente a su correspondiente fase tisularpatógena, no sólo en la morfología, sino también en la composición bioquímica y antigénica del hongo, lo que trae como consecuencia que los antígenos de la fase micelial sean distintos a los de otras fases,<sup>19,27,31,37,46,68,83</sup> Debido a la mayor facilidad de cultivar in vitro la fase micelial, los antígenos preparados a partir de esta fase, son usados más ampliamente, tanto clínica como experimentalmente. Estos hechos pudieran determinar las variaciones estadísticas de las publicaciones en donde se ha intentado anali-

zar el valor diagnóstico de la serología para hongos.

Los estudios serológicos, desarrollados en las últimas décadas, se basan en el hecho de que los antígenos fúngicos son capaces de estimular la producción de anticuerpos, tanto en el humano como en los animales infectados. Estos anticuerpos aparecen en el suero de los pacientes y su determinación depende de varios factores, tales como el tipo de técnica empleada, la naturaleza del antígeno y la utilización o no de sueros de referencia, los que facilitan la caracterización de las reacciones específicas. Estos antígenos pueden ser estructurales, provenientes de cada una de las estructuras celulares del hongo, los cuales no son difusibles. Otros antígenos resultan de la actividad metabólica del hongo en el medio en donde crecen y son obtenidos por el filtrado y concentración del caldo de cultivo. De esta manera, se obtienen varios complejos antigénicos que en su composición presentan: a) Antígenos específicos del hongo del cual provienen y b) Fracciones antigénicas comunes a otros hongos patógenos y no patógenos.<sup>40,87</sup> Por esto, se hace necesario evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo mediante técnicas inmunodiagnósticas, utilizando sueros de referencia conocidos, que permiten conseguir una mayor especificidad de la reacción. Ente las que más se utilizan están: a) **Pruebas de Aglutinación**; b) **Técnicas de Inmunofluorescencia** (I.F.); c) **Pruebas inmunoenzimáticas (E.L.I.S.A.)**; d) **Fijación del Complemento (F.C.)** (todas éstas y utilizando antígenos estructurales); e) **Las Pruebas de Precipitación:** Inmunodifusión (I.D.), Inmunolectroforesis (I.E.F.); Contraelectroforesis (C.I.E.F.), (en las cuales se usan antígenos solubles); y f) **Radioinmunoanálisis (R.I.A.)**.<sup>21,26,28,42,43,55,58,60,62,67,73,86,100</sup>

Estas pruebas pueden ser usadas con otros líquidos biológicos, como el líquido cefalorraquídeo, pleural, sinovial, peritoneal, etc. Los antígenos circulantes también pueden ser demostrados precozmente en dichos líquidos, como ocurre con el L.C.R. en la criptococosis,<sup>86</sup> e incluso también en muestras de orina.<sup>5,104</sup>

Una revisión de la literatura nos permite afirmar que el inmunodiagnóstico pueden proporcionar una evidencia más temprana de infección micótica, por lo que la correlación de clínica sugestiva de micosis y resultados serológicos positivos, confirman el diagnóstico.<sup>5,7,10,12,15,41,42</sup>

**La Reacción de Fijación del Complemento** es una técnica compleja, que a lo largo de los años se ha constituido en el test de referencia de muchos laboratorios de serología para hongos. Es una prueba que necesita antígenos bien normalizados y su ejecución debe realizarla un personal entrenado adecuadamente en la metodología e interpretación de los resultados, los cuales, además, se ven afectados por las frecuentes reacciones cruzadas, por lo que la interpretación de los resultados está sujeta a criterios que estén en estrecha correlación con las manifestaciones clínicas. Su utilidad se ve limitada a laboratorios especializados.<sup>61,66</sup>

Las técnicas de **Inmunofluorescencia** son útiles, están dotadas de una especificidad elevada, pero requieren equipos costosos y entrenamiento especializado.<sup>62,73</sup>

Las pruebas de **Agglutinación de Látex (A.L.)** y las técnicas de **Inmunodifusión (I.D.)**, son sencillas y pueden ser adaptadas como procedimientos de rutina. Tienen la particularidad de ser bastante específicas, de alto valor diagnóstico y permiten detectar antígenos y anticuerpos. Pueden ocurrir reacciones cruzadas, pero dependen principalmente del tipo de preparación antigénica y de los componentes usados en la reacción.<sup>35,39</sup> En nuestro laboratorio hemos implementado la variante de I.D. Semicuantitativa (I.D.S.C.), utilizada en el control de pacientes con micosis serológicamente positivas.<sup>14,19,96</sup>

En comparación con la F.C., la I.D. resulta una prueba más sensible, pero menos específica, por lo que se aconseja utilizar las dos simultáneamente. Las reacciones cruzadas que pudieran observarse con la I.D. pueden evitarse utilizando paralelamente antígenos, de diferentes hongos y sueros de referen-

cia conocidos, ya que las diferencias de títulos y de bandas de precipitación obtenidas, serán más evidentes y definidas en la banda de precipitación del antígeno específico.<sup>17,24,56,105.</sup>

**Lainmunelectroforesis (I.E.F.)** es una prueba de gran aplicación en el diagnóstico de las micosis, dotada de alta especificidad, pero es menos sensible que la I.D., aunque al emplearse sueros previamente concentrados, los porcentajes de positividad de las dos se hacen equivalentes. El análisis e interpretación de los resultados de la I.E.F. requieren que las condiciones del estudio sean mantenidas dentro de límites muy estrechos (p.e.: constitución del gel, el pH, la solución tampón, la duración e intensidad de la corriente, etc.).

En nuestro laboratorio hemos anexado a los medios diagnósticos de rutina, las técnicas serológicas de Inmunodifusión e Inmunelectroforesis, utilizando antígenos preparados a partir de cultivos de **Aspergillus**, **Coccidioides immitis**, **Sporothrix schenckii**, **Histoplasma capsulatum**, **Paracoccidioides brasiliensis** y **Candida albicans**, además de la Aglutinación del Látex para el antígeno capsular del **Cryptococcus neoformans**.

Es evidente que la especificidad de los antígenos es determinante en la confiabilidad de las pruebas. Por eso, el antígeno ideal para efectuar estos estudios inmunológicos, debería cumplir con los siguientes requisitos: a) Preparación fácil; b) Conservación prolongada; c) Especificidad elevada; d) Resultados reproducibles y e) Util tanto para la fijación del complemento<sup>33</sup> como para la precipitación en agar. Debido a características que las diferencian, nos referiremos a lo aspectos inmunodiagnósticos de cada micosis por separado.

**Histoplasmosis:** Muchas veces el primer indicio de histoplasmosis es una serología positiva, bien sea por F.C., I.D. o A.L., usadas aisladamente o en conjunto. La F.C. es importante, pues no sólo sirve como diagnóstico sino que también tiene valor pronóstico. De los antígenos disponibles, unos proceden de suspensiones de levaduras y otro es

extraído de formas miceliales (*Histoplasmina*). Con la I.D. han sido identificadas dos fracciones antigénicas, "W y "H", específicas para *H. capsulatum*.<sup>69</sup> Las bandas de precipitación "M" pueden observarse en un 75% de los pacientes con histoplasmosis aguda y crónica, así como en casos curados y como consecuencia de la intradermorreacción. Esta banda ocurre más frecuentemente y perdura por más tiempo que la "H", la cual se ve en casos activos y progresivos. Aun cuando generalmente se presenta en conjunto con la "M", se han descrito casos en los que la "H" aparece sola. Otros componentes antigénicos aislados con comunes a otros hongos y originan reacciones cruzadas, por lo que se aconseja utilizar sueros conocidos y la I.E.F. La A.L. es positiva frecuentemente en casos agudos y se negativiza en los crónicos.<sup>2</sup>

Se han podido observar que los niveles de anticuerpos fijadores de complemento, precipitantes y aglutinantes de antígeno de *H. capsulatum* se elevan después de la aplicación de la intradermorreacción con *histoplasmina*, por lo cual debe extraerse la muestra antes de la prueba. Si el individuo no está sensibilizado, no ocurre respuesta serológica luego del uso de la *histoplasmina*.<sup>9,76</sup>

**Candidiasis.** La A.L., I.D. y C.i.E.F. son pruebas de valor diagnóstico en candidiasis, no así la F.C., que produce respuestas positivas en personas sanas o en casos de candidiasis sin afectación sistémica. La I.D. y la C.I.E.F. presentan resultados comparables, así como la A.L., y en algunos estudios se han detectado positivities del 88% para I.D. y 90% para A.L.<sup>42,70</sup> Esta presenta reacciones cruzadas con criptococosis y tuberculosis. Los resultados serológicos están muy ligados a los antígenos empleados, pudiéndose utilizar antígenos provenientes de la membrana celular, ricos en mannan, otros extraídos del citoplasma o por filtrados proteicos de cultivos.<sup>46</sup> También se han obtenido antígenos a partir de los protoplastos de los túbulos germinales de **C. albicans**,<sup>51,63</sup> Todos ellos con una alta especificidad para los anticuerpos de los pacientes con candidiasis sistémica masiva.

**Coccidioidosis.** Los antígenos provienen de cultivos miceliales, lisados y extraídos con tolueno (*Coccidioidina*), en donde se han encontrado hasta 4 antígenos diferentes, siendo uno de ellos el responsable de la reacción de F.C. y de la I.D. y los otros de la aglutinación del látex. Además de la *coccidioidina*, se consigue la *Esferulina* (antígeno proveniente de la fase de esporangios),<sup>43</sup> la cual se ha utilizado en la F.C. con una sensibilidad igual a la *coccidioidina*, aunque con menor especificidad. Las reacciones cruzadas pueden alcanzar hasta un 20% con *coccidioidina* y un 48% con *esferulina*. Ambas, la F.C. y la I.D. se correlacionan, por lo que títulos bajos en la F.C. deben ser corroborados mediante la I.D., que usada con sueros de referencia que contengan el antígeno "F", específico para este hongo, disminuyen el factor error. La serología negativa no excluye el diagnóstico, pues cerca de un 25% de los pacientes con meningitis por coccidioidosis presentan una F.C. negativa en el L.C.R. y el suero de pacientes con lesiones cavitarias pulmonares usualmente es negativo.<sup>43,56</sup>

**Paracoccidioidosis.** La I.D. y la F.C. son útiles en el diagnóstico y evolución terapéutica de las infecciones por *P. brasiliensis*.<sup>32</sup> La I.D. es bastante específica, se logran buenos resultados, especialmente si se usan sueros de referencia (positividades de hasta un 94%).<sup>64</sup> En la I.E.F. se utilizan antígenos provenientes de filtrados de cultivo, uno de los cuales (antígeno "E-2") es específico de *P. brasiliensis* y es responsable de la banda "E" observada.

**Aspergilosis.** La I.D. es de gran valor diagnóstico en todas las formas clínicas. Se utiliza un extracto antigénico obtenido de la mezcla de varias especies (*A. fumigatus*, *A. niger* y *A. terreus*).<sup>27</sup> Se ha observado que la especie más implicada es el *A. fumigatus*. Las reacciones positivas alcanzan a un 90% en los casos de aspergilosis masiva y un 70% en los casos de aspergilosis broncopulmonar alérgica. El diagnóstico debe complementarse con el aislamiento del hongo en el esputo y por la radiología pulmonar.<sup>75</sup> Cuando se utilizan sueros de referencia, la I.D. es prácticamente específica en el 100% de los casos, pero

algunos autores aconsejan complementarla con la I.E.F., ya que con ésta se han observado bandas más específicas para *A. fumigatus*.

**Criptococosis.** Se emplean técnicas que detectan tanto anticuerpos como antígenos del *C. neoformans*, los cuales no sólo tienen valor diagnóstico sino también pronóstico, como la Inmunofluorescencia Indirecta (i.F.i.), A.T. y la A.L. las cuales detectan el antígeno capsular.<sup>6</sup> Esta última es la prueba más utilizada por su especificidad, siendo útil para detectar infecciones meníngeas, en L.C.R., en donde se han reportado positivities del 99% de los casos. En infecciones pulmonares su valor diagnóstico es menor. La A.L., en particular, en forma cuantitativa, se usa como parámetro para seguir la evolución de los pacientes.

**Esporotricosis.** La serología es muy importante para los casos extracutáneos o sistémicos, particularmente la Aglutinación en Tubos (A.T.) y la Aglutinación con Látex (A.I.). En nuestro país no se han descrito formas extracutáneas, pero si se ha aislado el *S. schenckii*. Se han conseguido reacciones positivas en 60% de los casos cutáneos y 100% en las lesiones extracutáneas.<sup>5</sup> En la I.E.F. se han conseguido visualizar bandas específicas, una de las cuales se ha denominado "S". En nuestra casuística sólo hemos conseguido un caso con esta afección.

En el presente estudio mostramos la evaluación inmunodiagnóstica realizada en los pacientes referidos por padecimientos presuntamente de origen micótico, los cuales fueron atendidos en la Unidad de Micología Médica del Hospital Universitario de Maracaibo, desde 1984 hasta 1994.

## MATERIALES Y METODOS

En la Unidad de Micología Médica del Hospital Universitario de Maracaibo, entre Junio de 1984 y Octubre de 1994, fueron evaluados 2982 pacientes, remitidos para que les fueran practicados estudios diagnósticos serológicos y

micológicos, por sospecharse clínicamente que presentaban una infección micótica profunda. Las muestras provenían indistintamente de pacientes hospitalizados o ambulatorios, tanto del Estado Zulia como de Estados vecinos (Falcón, Lara Trujillo y Mérida). La mayor parte de las muestras procesadas correspondieron a sueros de los pacientes a estudiar. A todos los pacientes se les efectuó una historia clínica completa, en donde se incluyeron los datos de filiación, los antecedentes epidemiológicos, clínicos, radiológicos y cualquier otro examen de interés, así como una descripción de la evolución de la enfermedad. Una gran parte de los pacientes remitidos a nuestra Unidad presentaban afectación pulmonar, tanto por clínica como por radiología, bien como manifestación aislada o aunada a síndromes febriles, adenopatías, alteraciones cutáneas, visceromegalia o síndromes meníngeos. Estos últimos resultaron asociados usualmente a criptococosis.

El procedimiento utilizado en nuestro laboratorio para el inmunodiagnóstico de micosis profundas, localizadas o sistémicas, siguió un protocolo establecido, que incluye:

a) Toma de muestra de los especímenes sospechosos, tales como sangre, L.C.R., líquidos pleural, peritoneal, articular, pericárdico, etc. Estas muestras fueron tomadas asépticamente, para evitar su contaminación. Se depositaron en un tubo estéril y se remitieron con prontitud al laboratorio. En el caso de la sangre, se extrajeron 10 ml como mínimo, obtenida por venopunción y depositada en un vial sin anticoagulante. Al suero extraído se le añadió una gota de solución azida al 0,01% por cada 3 a 5 ml, o solución de merthiolate al 0,5%, como preservativos y luego se conservó refrigerado a 4° C por un tiempo mayor de 7 días. El L.C.R. fue obtenido de los pacientes con sospecha de meningitis micótica, en una cantidad no menor de 3 ml. Se centrifugó a 3000 R.P.M. por 10 minutos. Con el sedimento se efectuó un examen directo, coloreándolo con tinta china. Otra parte del se

dimento se utilizó para ser sembrada en medio de Sabouraud, infusión de cerebrocorazón-agar (I.C.C.A.) y lactrimel, incubando a 37° C y a temperatura ambiente. Luego se efectuó el inmunodiagnóstico, utilizando el sobrenadante del L.C.R. Este procedimiento también se siguió para los otros líquidos biológicos a estudiar, teniendo la precaución de no agregar ningún aditivo antes de realizar el examen directo y el cultivo.

Cuando se sospechó que la histoplasmosis estuviera comprometiendo la médula ósea, se tomaron 0,5 ml de ésta, por aspirado con jeringa heparinizada y se realizó un frotis coloreado con Giemsa y Grocott. Posteriormente se sembró la otra porción de la muestra.

b) Procedimientos inmunodiagnósticos: Para el estudio se utilizaron la inmunodifusión, Inmunodifusión semicuantitativa, Inmunoelectroforesis y la Aglutinación con partículas de Látex.

### Antígenos Utilizados:

En las pruebas de precipitación se usaron antígenos donados gentilmente por el "Instituto de Biomedicina del Hospital Vargas", mediante la colaboración de la Dra. María de Albornoz, como parte de una investigación nacional incluida en el programa de Estudio de las Micosis en Venezuela, la cual forma parte nuestra Unidad. Estos antígenos son obtenidos de la fase micelial de *H. capsulatum*, *S. schenckii*, *P. brasiliensis*, *C. immitis*, *C. albicans* y *Aspergillus*. Como es necesario utilizar antígenos hidrosolubles para estas pruebas, éstos se consiguieron, en general, filtrando y concentrando el caldo en donde habían crecido las cepas de las especies patógenas, seleccionadas convenientemente. Los extractos obtenidos de esos cultivos son liofilizados, para una mejor conservación y así poder determinarlos con mayor exactitud.">

El análisis de los extractos antigénicos fue una etapa obligatoria para la

estandarización y se efectuó por medios inmunológicos y químicos. Para el uso diagnóstico se escogieron los preparados que tuvieran una cantidad mínima de inmunógenos y que contuvieran entre ellos a los antígenos específicos identificados para el hongo en cuestión.

**Inmunodifusión:** Es una prueba de selección cualitativa. El método para la realización de la I.D. que utilizamos en nuestro laboratorio,<sup>30,95</sup> es el que se ha usado convencionalmente para este tipo de prueba.<sup>66 1011</sup> El procedimiento es el siguiente:

- I. Se toma una lámina de vidrio de 75 x 25 x 1,5 mm, se numera y se le coloca horizontalmente.
- II. Se le agrega un revestimiento de 4 ml de agarosa al 1%, en buffer veronal, previamente fundida en baño María.
- III. Se deja enfriar la agarosa para que se solidifique a temperatura ambiente y luego se coloca a 4° C Durante 30 minutos en cámara húmeda, debiendo ser utilizadas antes de las 24 horas.
- IV. Se perforan los hoyuelos apropiados, en número de seis, de 4 mm de diámetro, dispuestos en forma hexagonal, con 3 mm de distancia entre ellos y con respecto a un séptimo hoyuelo dispuesto en el centro, el cual es de 1 mm de diámetro. A cada lámina portaobjeto se le practican 3 grupos de hoyuelos como los descritos, según una plantilla ad hoc.
- V. Se aspira el gel sobrante de los orificios con el auxilio de una pipeta.
- VI. Utilizando tubos capilares y dos de las laminillas de vidrio, se colocan los sueros de referencia en los hoyuelos 1 y 4 hasta que estos queden cubiertos, utilizando el siguiente esquema:
  - a) Suero control de *Aspergillus*: Serie I, hoyuelos 1 y 4.
  - b) Suero control *Coccidioides*: Serie II, hoyuelos 1 y 4.

- c) Suero control *Sporothrix*: Serie III, hoyuelos 1 y 4
- d) Suero control *Histoplasma*: Serie IV, hoyuelos 1 y 4.
- e) Suero control *Paracoccidioides*: Serie V, hoyuelos 1 y 4.
- f) Suero control *Candida albicans*: Serie VI, hoyuelos 1 y 4.

VII. Colocar seguidamente en los hoyuelos N° 2 de todas las seis series el suero del primer paciente. Repetir con los sueros de otros pacientes en los correspondientes hoyuelos 3, 5 y 6 de todas las series.

VIII. Agregar al hoyuelo central (N° 7), de todas las series, los siguientes antígenos:

- a) Serie: *Aspergillus*
- b) Serie II: *Coccidioides immitis*.
- c) Serie 11 1: *Sporothri schenckii*.
- d) Serie IV: *Histoplasma capsulatum*.
- e) Serie V: *Paracoccidioides brasiliensis*.
- f) Serie VI: *Candida albicans*.

IX. Se procede a llevar un control escrito de las características de cada caso reactivo en particular.

X. Las láminas se guardan en cámara húmeda durante 24 horas, a temperatura ambiente y luego durante 24 horas a 4° C, en cuyo momento se realiza una lectura preliminar, que también se anota. En caso de un resultado sospechoso de ser positivo, se puede hacer un informe provisional.

XI. Luego, se sumergen las láminas en solución de citrato de sodio al 5% durante 90 minutos, para eliminar las bandas inespecíficas.

XII. Se realizan varios lavados con solución salina durante otras 24 horas, luego de lo cual se dejan secar.

XIII. Se procede a la tinción de las láminas sumergiéndolas durante 10 minutos en el colorante de Amidoschwarz. Se lavan con agua destilada y luego con solución decolorante, 10

a 15 minutos, hasta que se logra una buena resolución.

XIV. Finalmente, se realiza la lectura definitiva.

**Inmunodifusión Semicuantitativa (I.D.S.C.):** Se emplean los mismos antígenos que para la I.D. Se usa en pacientes con I.D. positiva, como elemento de ayuda en el control de la evolución de dichos pacientes. La técnica es similar a la descrita para el I.D.,<sup>91</sup> variando en lo siguiente:

Se coloca en el hoyuelo N° 1 el suero problema sin diluir y en los N° 2, 3, 4, 5 y 6, el suero diluido a 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32. En el hoyo central se coloca después el antígeno específico. El resto del procedimiento se continúa igual al de la I.D.<sup>11</sup>

**Inmunoelectroforesis:** Con esta técnica se ha logrado identificar la localización de los antígenos específicos de la mayoría de los hongos patógenos, y sirve para corroborar la "banda de identidad" de la I.D., por medio de la localización de la banda. Es un procedimiento en el cual la difusión de los reactivos inmunológicos es precedida por la separación electroforética de diferentes componentes proteicos del preparado antigénico. La metodología usada consistió en:<sup>32,108</sup>

- I. Se utilizan láminas de vidrio que, al igual que en la I.D., se cubren de agarosa al 1%.
- II. Se corta el gel utilizando la plantilla.
- III. Se extrae la agarosa de los hoyuelos del antígeno, mediante aspiración, pero no se aspira en este momento el gel de las hendiduras.
- IV. Se llenan las cámaras de migración para electroforesis con tampón barbital (Veronal), al 0,1 molar con pH 8,2.
- V. Rápidamente se colocan en los hoyuelos las soluciones de antígenos, se intercalan puentes de papel de filtro entre el gel y el tampón y se colocan las láminas en la cámara

de electroforesis. Se conecta la corriente, controlando con el voltímetro que se establezca una diferencia de potencial de 20 voltios para cada lámina.

- VI. Al cabo de 90 minutos de electroforesis se desconecta la corriente.
- VII. Se extrae el gel de las hendiduras y se agregan los sueros problemas y simultáneamente se monta una lámina con suero control.
- VIII. Se incuban las láminas en cámara durante 24 horas, a temperatura ambiente y posteriormente a 4° C durante 48 horas.
- IX. Por último, se procede como en los pasos XI al XIV de la técnica del I.D.

#### **Aglutinación con partículas de Látex**

**(A.L.):** Es una prueba sencilla y rápida, que se basa en la detección de antígenos circulantes, utilizando partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos contra dichos antígenos. En nuestro laboratorio, esa técnica se usó para el diagnóstico de la criptococosis, empleando un equipo adquirido en el comercio (*CryptoTest*) Microbiological Associates, Waltham, Ma, U.S.A.). En esta prueba, el antígeno capsular soluble del *C. neoformans*, presente en suero, L.C.R. u orina, es aglutinado por las partículas de látex que están recubiertas con anticuerpo antipolisacárido de *Cryptococcus*, preparado en conejos. El procedimiento técnico consistió en :4,86

- I. Las muestras, particularmente el L.C.R., fueron inactivadas a 56° C durante 30 minutos y luego diluidas 1:10 en solución de buffer glicina.
- II. En dos áreas circulares paralelas de una lámina de vidrio se agregó a cada una 1 gota de L.C.R. sin diluir y otros dos círculos para los se agregó 1 gota de L.C.R. diluido al 1:10.
- III. Seguidamente se agregó, tanto al L.C.R. sin diluir como al diluido, una gota de suero anticryptococcus y de igual manera, una gota de suero normal de conejo.

IV. Simultáneamente se montaron los controles de antígenos para baja y alta concentración, el control de antiglobulina y el control negativo con suero anticryptococcus y suero normal de conejo.

V. Se mezclaron todos los reactivos, usando un rotador serológico a 160 RPM, durante 5 minutos y se procedió a realizar las lecturas con lámpara de luz blanca y reportando de acuerdo a los siguientes parámetros:

VI. Negativo: Ni el L.C.R. diluido como el sin diluir mostraron aglutinamiento con el suero anticryptococcus.

VII. Positivo: El L.C.R. diluido y sin diluir mostraron signos de aglutinación con el suero anticryptococcus, pero no con el suero normal de conejo.

VIII. Cuando se encontró positividad, se efectuaron diluciones del L.C.R., en tubos, comenzando por 1:10 hasta 1:620 o más, si fuera necesario y cada dilución fue procesada siguiendo el procedimiento descrito. El título de la muestra estuvo dado por la más alta dilución que mostrara una aglutinación entre 2+ y 3+.

#### **Interpretación de la metodología:**

La I.D., es una prueba de selección cualitativa en la cual el antígeno y el anticuerpo difunden espontáneamente en el gel y su interacción se demuestra por la aparición de una banda de precipitación en el gel, la cual representa un complejo antígeno anticuerpo. La especificidad de la prueba se incrementa si se utilizan sueros de referencia, ya que así se pueden obtener bandas de precipitación específicas que pueden ser "bandas de identidad total" de "identidad parcial" y de "no identidad." Una reacción de identidad está dada por una fusión completa de los extremos de las bandas precipitantes del suero de referencia y del suero del paciente. Esta reacción constituye una prueba positiva y pone en evidencia que el paciente posee anticuerpos específicos para el antígeno fúngico de un hongo en particular

Una prueba de identidad parcial ocurre cuando los anticuerpos del suero del paciente reaccionan en una forma incompleta con los antígenos del hongo y la banda de precipitación no logra fusionarse con la del suero de referencia, lo cual ocurre por la existencia de fracciones antigénicas comunes a varios hongos, que reaccionan parcialmente con los anticuerpos del suero de referencia. Esta reacción no debe ser interpretada como positiva, pero debe tomarse en cuenta para realizar otras pruebas complementarias como la I.E.F., F.C., E.L.I.S.A., etc. El resultado es de no identidad cuando las bandas de precipitación se entrecruzan, porque la muestra del paciente presenta anticuerpos que pueden reaccionar con uno de los múltiples componentes no específicos del antígeno de referencia. Constituye una prueba negativa.

Con las técnicas utilizadas, I.D. e I.E.F., se puede observar que en Histoplasmosis, la banda "M", que demuestra infección previa o muy reciente, es la que más se observa. Esta, característicamente, se sitúa más cerca del antígeno, en oposición a la banda "H", que se sitúa distal al antígeno, tiene una mayor longitud y representa una infección activa.<sup>66</sup>

En candidiasis se pueden llegar a producir desde una hasta siete bandas, siendo encontradas más frecuentemente las bandas "A" y "B" en candidiasis sistémicas.<sup>42</sup>

Con respecto al *C. immitis*, se han descrito cuatro fracciones antigénicas en las diferentes cepas del hongo, pudiendo estas cepas contener todas las fracciones, ninguna fracción o combinaciones de estos antígenos. En la I.D. se detectan como líneas independientes o dobles. La banda "F", producida por el antígeno 2, es la identificada más frecuentemente en la I.E.F.<sup>48</sup>

En el suero de los pacientes con Paracoccidioidosis se pueden observar de una a tres bandas de precipitación en la I.D., definiéndose el mayor número de ellas en pacientes con afectación pulmonar o diseminada. Se han identificado varias bandas de preci-

pitación, como la "A", la "E" y la banda "I". En la I.E.F. se ha podido demostrar el antígeno E-2, el cual es responsable de la formación de la banda "E", de localización catódica y específica de la enfermedad.<sup>32</sup>

En la I.D. para la detección de anticuerpos de la Aspergilosis, se utiliza inicialmente la mezcla de antígenos de varias especies de *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, *terrus*, *flavus*) y en una segunda etapa, si la primera I.D. resulta positiva se hace reaccionar el suero problema con el antígeno de cada especie por separado. En la I.E.F. se observan múltiples bandas, principalmente contra *A. fumigatus*, en donde se han podido reconocer las bandas "C" y "J".<sup>65</sup>

Si en la I.D. se demuestran anticuerpos precipitantes contra *S. schenckii*, estos deben ser corroborados por la I.E.F., en donde la visualización de la banda "S" comprueba la especificidad del antígeno.<sup>15</sup> De una manera general, a toda muestra positiva a la I.D., debe practicarse la correspondiente I.E.F., usando los antígenos con los cuales se reaccionó. Cuando la clínica del paciente orienta hacia determinada micosis, se procesa al mismo tiempo la I.D. y la I.E.F.

## RESULTADOS

Para este estudio se evaluaron en nuestra Unidad Micología Médica 2.982 pacientes, de quienes 340 (11,7%), presentaron diagnósticos positivos para alguna de las micosis estudiadas (Tabla 1). Aun cuando en los primeros años

del estudio ocurrió un aumento progresivo en el número de las muestras procesadas, con un máximo de 480 en 1987, en los años subsiguientes ocurrió un descenso en el número de pacientes.

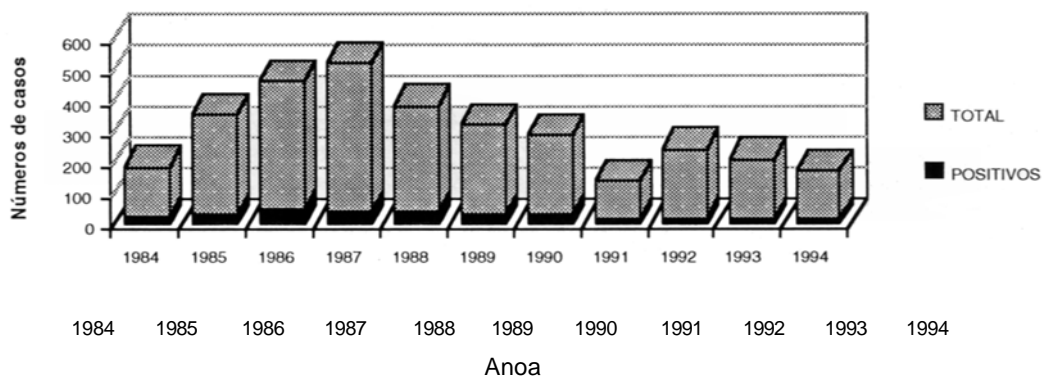
Los porcentajes de positividad se mantuvieron más o menos estables a lo lar-

TABLA Nº 1

Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas Muestra procesadas y muestras positivas 1984-1994 Unidad de Micología Médica H.U.M.			
Año	Muestras procesadas	Muestras positivas	Porcentaje
1984	162	27	16,7%
1985	325	34	10,5%
1986	413	52	12,6%
1987	480	44	9,2%
1988	345	43	12,5%
1989	290	35	12,9%
1990	256	35	13,7%
1991	128	16	12,5%
1992	226	21	9,7%
1993	197	16	9,1%
1994	160	17	10,6%
TOTAL	2.982	340	11,7%
F. de I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.			

GRAFICO Nº1

Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas. Muestra procesadas y muestras positivas 1984-1994



F. de I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.



**Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas**  
**Muestra procesadas por micosis y por año. 1984-1994**  
**Unidad de Micología Médica H.U.M.**

Año	H.c	C.a.	Cr	P.b.	C.i.	C.n.	Asp	Mic	Am	Act	Esp
1984	10	-	5	3	6	2	1	1	-	-	-
1985	13	12	2	4	-	1	-	1	1	-	-
1986	25	10	1	4	5	3	2	-	-	1	-
1987	22	4	4	1	3	2	6	1	-	2	-
1988	18	7	2	4	3	3	4	1	1	-	-
1989	16	2	3	3	2	3	3	1	1	-	1
1990	18	6	3	2	-	4	1	1	-	-	-
1991	4	1	5	-	1	-	-	2	2	1	-
1992	9	-	9	1	-	-	-	1	1	-	-
1993	7	1	7	1	-	-	-	-	-	-	-
1994	9	3	-	2	-	1	-	-	2	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>151</b>	<b>46</b>	<b>41</b>	<b>25</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>17</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>1</b>

F. de I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.

go de estos años, variando de un máximo de 16,7% el primer años o un mínimo de 9,1 % en 1993 (ver Gráfico N° 1).

La Tabla 2 muestra el número de casos que correspondieron a cada micosis en particular:

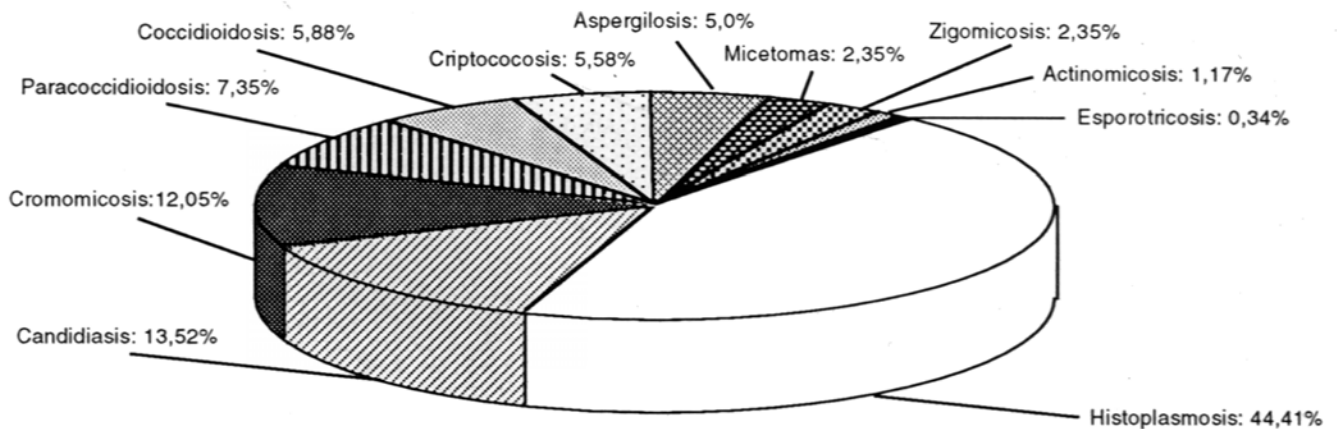
Es evidente que la micosis diagnosticada más frecuentemente fue la Histoplasmosis, con 151 casos (44,41 %) (ver Gráfico N° 2). Luego *Candidiasis* con 46 casos (13,52%); *Cromomicosis*, 41 (12,05%); *Paracoccidíoidosis*, 25 (7,35%); *Coccidiodosis*, 20 (5,88%)

*Criptococosis*, 19 (5,58%); *Aspergilosis*, 17 (5,0); *Micetomas* y *Zigomicosis*, 8 casos cada una (2,35%); 4 *Actinomicosis* (1,17%) y 1 de *Esporotricosis* (0,34%).

La comparación general entre las pruebas diagnósticas empleadas aparece en

**GRAFICO N° 2**

**Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas. Distribución porcentual de casos positivos. 1984-1994**  
**Unidad de Micología Médica H.U.M.**



F. de I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.

la Tabla N° 3. El diagnóstico micológico incluyó el examen directo, cultivo y/o biopsia de las muestras obtenidas. Para el Inmunodiagnóstico se utilizaron las pruebas de precipitación (I.D. e I. E.F.) y la prueba del látex cuando se trataba de criptococosis (*Crypto-Test*).

Encontramos que en los pacientes con histoplasmosis, el inmunodiagnóstico se realizó en el 98,6% de las muestras procesadas, mientras que el micológico sólo resultó positivo en el 22,3% de las muestras.

En el resto de las micosis, para el inmunodiagnóstico los resultados positivos fueron de 100% para *Candidiasis*, *Paracoccidioidosis*, *Zigomicosis* y *Criptococosis*, mientras que para *aspergilosis* fue del 94,1%. Las positividades al micológico oscilaron entre el 22,3% en *Histoplasmosis* hasta 97,3% en *Criptococosis*. Como complemento importante, el análisis de las muestras estudiadas para cada tipo de micosis aparece en las Tablas 4 al 9.

Con respecto a la *Histoplasmosis* (ver Tabla N° 4), se evaluaron 77 muestras para directo y cultivo. De ellas, 65 resultaron negativas (84,41%) y 12 positivas (15,59%). En el estudio biopsico de 8 muestras, 7 fueron positivas (87,5% y una negativa (12,5%). De los 151 sueros procesados, 149 resultaron positivos a la I.D. e I.E.F. (98,67%). También resultaron positivas al inmunodiagnóstico 2 muestras de L.C.R.

En la Tabla N° 5 se evalúan los procedimientos en *Candidiasis*, con 20 muestras positivas al micológico y al estudio biopsico (57,7%) y 10 negativas (42,3). Las 43 muestras sometidas a la I.D. e I.E.F. resultaron positivas.

En la Tabla N° 6 se aprecian los resultados en *Paracoccidioidosis*: 12 muestras examinadas al directo y 10 al cultivo resultaron positivas. Las 8 biopsias examinadas fueron positivas, así como todas las muestras serológicas, 25 en total.

Con respecto a *coccidioidosis* (ver Tabla N° 7), de 9 muestras examinadas al directo, 5 resultaron positivas (55,5%) y 4 negativas (44,5%). Al cultivo, 6 de di-

TABLA N° 3						
Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas Muestra positivas según tipos de diagnóstico. 1984-1994 Unidad de Micología Médica H.U.M.						
Agente Causal	Diagnóstico Micológico			Inmunodiagnóstico		
	Total de muestras	Directo, cultivo biopsias	%	Total de muestras	Presipita. o látex	
H.c	85	19	22,3	151	149	98,6
C.a.	31	21	67,7	43	43	100
P.b.	34	23	67,6	25	25	100
C. i.	26	19	73,0	21	21	100
C.n.	37	36	97,3	15	15	100
Asp.	15	11	73,3	17	16	94,1
H.c. = H/ capsulatum		C.a. = C. albicans		P.b. = P.		
C.i. = C. immitis		C.n. = C. neoformans		As. = Aspergillus		
F. de I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.						

TABLA N° 4								
Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas Diagnóstico micológico e Inmunodiagnóstico en 151 pacientes con Histoplasmosis según tipos de muestras analizadas. 1984-1994 Unidad de Micología Médica H.U.M.								
Muestra	Diagnóstico Micológico						Inmuno diagnóstico	
	Directo		Cultivo		Histopat.		Posit.	Neg.
	Posit.	Neg.	Posit	Neg.	Posit.	Neg.		
Espuito	1	11	2	10				
Bronquios	2	15	2	15	2	1		
Médula Oseá	1	3	1	3	1	0		
L. C. R.	1	4	0	4			2	0
Mucosas	1	0	1	0				
Ganglio					3	0		
Hígado					1	0		
Suero							147	2
TOTAL	6	33	6	32	7	1	149	2
F. de I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.								

chas muestras fueron positivas (66,6%) 3 negativas (33,3%). Todas las 8 biopsias examinadas fueron positivas.

Al inmunodiagnóstico, también todos los y 20 analizados resultaron positivos, así como una muestra de L.C.R.

TABLA N° 5								
Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas Diagnóstico micológico e Inmunodiagnóstico en 25 pacientes con Candidiasis extracutánea según tipos de muestras analizadas. 1984-1994 Unidad de Micología Médica H.U.M.								
Muestra	Diagnóstico Micológico						Inmuno diagnóstico	
	Directo		Cultivo		Histopat.			
	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.
Espuito	1	3	1	3				
Bronquios	4	1	4	1				
Mucosa	2	0	2	0				
Líqu. Pericard.	0	1	0	1				
L. C. R.	3	0	3	0				
Riñón					1	0		
Suero							43	0
TOTAL	10	5	10	5	1	0	43	0

F. de l.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.

TABLA N° 6								
Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas Diagnóstico micológico e Inmunodiagnóstico en 25 pacientes con Paracoccidiodomicosis según tipos de muestras analizadas. 1984-1994 Unidad de Micología Médica H.U.M.								
Muestra	Diagnóstico Micológico						Inmuno- diagnóstico	
	Directo		Cultivo		Histopat.			
	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.
Espuito	2	0	1	1				
Bronquios	2	1	1	2	4			
Piel/Mucosa	7	0	3	0	3	0		
Ganglio					1	0		
Líqu. Sinovial	1	0	1	0				
Suero							25	0
TOTAL	10	5	10	5	1	0	43	0

F. de l.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.

La Tabla N° 8 se muestran los resultados en *Criptococosis*. Todos los casos se diagnosticaron por examen mico-

lógico, aunque de las 37 muestras procesadas en conjunto una resultó negativa. El *Crypto-Tests* sólo se pudo efectuar

en 9 pacientes, resultando todos ellos positivos. En 3 de estos pacientes también se consiguió positivo el estudio del suero.

En el análisis de la *Aspergilosis* (ver Tabla N° 9), se observa que el *A. niger* sólo se consiguió en 2 oportunidades. En uno de los casos, se trataba de una lesión nasal y la biopsia fue el único medio para poder diagnosticar al paciente. En otro caso fue detectado por serología. Los demás diagnósticos correspondieron a *A. fumigatus* y *A. flavus*. Se examinaron 7 muestras al directo, 4 de las cuales fueron positivas (57,1%). En los cultivos, 6 positivos (85,7%) y 1 negativo (14,3%). Con el inmunodiagnóstico se consiguieron 8 casos positivos para *A. fumigatus*, 7 para *A. flavus* y 1 positivo y 1 falso negativo para *A. niger*. En los positivos se observaron de 1 a 20 bandas de precipitación.

El análisis de la procedencia de los pacientes con alguna de las micosis estudiadas se aprecia en la Tabla 10:

El 40,0% de los pacientes con *Coccidiodosis* y el 32,0% con *Paracoccidiodosis* venían de los Estados andinos.

La distribución por sexo se ve en la Tabla N° 11. Es evidente el predominio del sexo masculino en *Coccidiodosis* (75,0%), *Aspergilosis* (76,5%) y *Criptococosis* (68,5%). La relación entre sexo e *Histoplasmosis* resultó menos significativa, mientras que en *Candidiasis* ocurrió un predominio del sexo femenino (69,7%). Hay que destacar también que todos los pacientes con *Paracoccidiodosis* fueron del sexo masculino.

Referente a las ocupaciones de los pacientes se observó que hubo una mayor incidencia de *candidiasis* en mujeres con oficios hogareños (66,7%). Las labores del campo fueron una actividad frecuentemente observada en *candidiasis* (39,1%), *coccidiodosis* (38,9%) y *aspergilosis* (33,3%), pero resultó mucho más importante en *paracoccidiodosis*, en donde el 88,8% de los pacientes estaban relacionados con actividades agrícolas.

En cuanto a las manifestaciones clínicas, se observó que la mayor parte de la sintomatología correspondió a la patología pulmonar, exceptuando la *criptococosis*, en donde las manifestaciones neurológicas prevalecieron (92,2%). La afectación pulmonar ocurrió en el 60,5% de las *histoplasmosis*, 53,3% de las *paracoccidioidosis*, 45,5% de las *coccidioidosis*, 87,9% de las *candidiasis* y 93,7% de las *aspergilosis*. Es de hacer notar que el 60% de los pacientes con *aspergilosis* tenían antecedentes de tuberculosis. La *criptococosis* pulmonar sólo se observó en una paciente inmunodeprimida. En todas las micosis se pudo apreciar que la fiebre apareció como síntoma relevante en pocas ocasiones, aun cuando resultó el motivo de consulta en 2 casos de *Coccidioidosis* y 1 de *Paracoccidioidosis*. En 4 oportunidades, se descubrió *Histoplasmosis* en mujeres que resultaron por eritema nodoso. Se observó alteración cutánea en *Paracoccidioidosis* (33,3%) y *Coccidioidosis* (18,2%).

#### DISCUSION

La aplicación de las técnicas de inmunodiagnóstico en el estudio de la micosis profundas ha devenido en un instrumento muy útil, particularmente en los últimos años,<sup>5,57</sup> cuando ha sido posible fijar normas adecuadas para su uso, ya que desafortunadamente se venía observando una gran variabilidad en los resultados, que dependía de los diferentes métodos utilizados y de que los antígenos no estaban preparados, ni con el mismo grado de purificación ni tampoco estaban debidamente normalizados, por lo que ocurrían, con relativa frecuencia, reacciones cruzadas.<sup>21,33,39,105</sup> Estas limitaciones al inmunodiagnóstico han sido el motivo de la dedicación de numerosos centros a la búsqueda de los componentes antigénicos específicos de cada uno de los hongos patógenos, lo cual ha servido para que las pruebas utilizadas sean confiables.<sup>15,36,42,54,58,85</sup> Un ejemplo a resaltar es el de la *Histoplasmosis*, cuando se creó el **Estudio para los Procedimientos y Reactivos en Histoplas-**

TABLA N° 7								
Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas Diagnóstico mitológico e Inmunodiagnóstico en 20 pacientes con Coccidioidosis según tipos de muestras analizadas. 1984-1994 Unidad de Micología Médica H.U.M.								
Muestra	Diagnóstico Mitológico						Inmunodiagnóstico	
	Directo		Cultivo		Histopat.			
	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.	Posit. 1	Neg.
Espuito	0	3	1	2				
Bronquios	3	0	2	1	2	0		
Piel/Mucosa	2	0	2	0	5	0		
L. C. R.	0		1	0	1	0	1	
Suero							20	0
TOTAL	5	4	6	3	8	0	21	0

F. de I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.

TABLA N° 8								
Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas Diagnóstico mitológico e Inmunodiagnóstico en 19 pacientes con Cryptococosis según tipos de muestras analizadas. 1984-1994 Unidad de Micología Médica H.U.M.								
Muestra	Diagnóstico Mitológico						Inmunodiagnóstico	
	Directo		Cultivo		Histopat.			
	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.
Espuito	1	0	1	0	1	0	12	0
L. C. R.	17	0	16	1	1	0	3	0
Suero								
TOTAL	18	0	17	1	1	1	15	0

F. de I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.

**mosis** de la Organización Mundial de la Salud, que permitió establecer las normas que deben seguirse para la aceptación de sueros de referencia y han caracterizado los antígenos demostrables con las bandas "M" y "H", usando la I.D. como método diagnóstico, único método aprobado hasta ahora por la O.M.S.<sup>33,68,69</sup> La "International Society

**for Human and Animal Mycology"**, bajo la coordinación de A. Restrepo, ha estado evaluando los métodos diagnósticos usados en *paracoccidioidosis*.<sup>19,31,37,73,74</sup> Para las otras micosis, existe suficiente información que permite, en los casos de *S. schenckii*, *C. immitis* y *Aspergillus*, contar con una normalización a corto plazo, usando

TABLA Nº 9								
Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas Diagnóstico micológico e Inmunodiagnóstico en 17 pacientes con Aspergilosis según tipos de muestras analizadas. 1984-1994 Unidad de Micología Médica H.U.M.								
Muestra	Diagnóstico Micológico						Inmuno diagnóstico	
	Directo		Cultivo		Histopat.			
	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.	Posit.	Neg.	Posit..	Neg.
A. fumigatus							8	0
Esputo	1	2	3	0				
Bronquios	1	0	1	0				
A. flavus							7	0
Esputo	0	1	0	1				
Bronquios	1	0	1	0				
A. niger							1	1
Lesión nasal	1	0	1	0	1	0	25	0
TOTAL	4	3	6	1	1	0	16	1

F. de I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.

rísticas epidemiológicas, clínicas y diagnósticas de las micosis más frecuentemente encontradas, logros éstos debidos a la introducción de un protocolo unificado en el cual se le ha dado relevancia a la historia clínica, con énfasis particular en la epidemiología, así como una batería de exámenes micológicos e inmunodiagnósticos, de valor reconocido.<sup>14,61,90,97,99</sup>

La aplicación nacional de estos, protocolos y programas de estudio ha resultado un incremento significativo del volumen de pacientes diagnosticados con precisión. En algunas áreas, en donde en 30 años sólo se habían podido comprobar 23 casos de Paracoccidioidosis, durante el primer año de implementación del inmunodiagnóstico y del estudio micológico, ya se habían diagnosticado 19 casos.<sup>6</sup> En otro reporte de 10 años con tan solo 4 casos comprobados (3 Paracoccidioidosis y 1 Coccidioidosis), al primer año de instaurarse la Unidad de Micología y a se habían diagnosticado 15 pacientes.<sup>80</sup>

cualquiera de las variedades de inmunodiagnóstico.<sup>15,26,42,58</sup> La opinión es que el método probablemente más adecuado, en los momento actuales, es la inmunodifusión,<sup>17,55,70,100</sup> pero teniendo en cuenta que estos métodos complementan a la clínica, a la evaluación epidemiológica y a otros estudios auxiliares.<sup>7,10,12,23,59</sup>

En Venezuela se ha estado trabajando intensamente durante los últimos años para conocer la realidad de la problemática de las micosis profundas. Este interés permitió crear un sistema nacional de **Estudio de las Micosis en Venezuela**, con la participación activa de **Grupos de Trabajo**, 8 en total, lo que ha contribuido a determinar las caracte-

Durante los primeros años de funcionamiento de nuestra Unidad, se observó una tendencia progresivamente creciente de casos evaluados, hasta 1987, luego de lo cual ocurrió un descenso en los siguientes años. Esto se debe a que la metodología implementada por la Unidad fue recibida favorablemente por el gremio médico y mientras más se difundía su capacidad diagnóstica, mayor era la afluencia de paciente. Sin em-

TABLA Nº 10						
Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas Distribución porcentual de los sitios de procedencia. 1984-1994 Unidad de Micología Médica H.U.M.						
Procedencia	Histoplas.	Candidia.	Paracocci.	Coccidioi	Criptococ.	Aspergilo
Zulia	88,7	81,0	8,0	40,0	94,7	64,0
Falcón	3,9	15,0	32,0	40,0		11,7
Andes	3,9		52,0			11,7
Lara	1,3	2,0	4,0	5,0		
Otros	2,0	2,0	4,0	15,0	5,3	11,7

F. de I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.

**TABLA Nº 11**

**Inmunodiagnóstico de Micosis Profundas.  
Distribución por sexo y etiología 1984-1994  
Unidad de Micología Médica H.U.M.**

Micosis	Hombres		Mujeres	
	Nº	%	Nº	%
Histoplasmosis	93	61,5	58	38,5
Candidiasis	17	36,9	29	63,1
Paracoccidio.	25	199		
Coccidioidosis	15	75,0	5	25,0
Criptococosis	13	68,5	6	31,5
Aspergilosis	13	76,5	4	23,5

F. de. I.: Archivos de la Unidad de Micología del H.U.M.

bargo, las paralizaciones periódicas de los servicios médicos, que durante los últimos años hemos tenido en el país, han disminuido ostensiblemente el volumen de consultas, no así los porcentajes de diagnósticos positivos por año, que han permanecido estables, con la excepción del primer año, cuando se aplicaron criterios de selección más estrictos para los casos a evaluar, lo que incidió en un porcentaje de positividad mayor (16,7% en 1984 y 11,24% en promedio en los restantes años).

En nuestra casuística, los casos diagnosticados por I.D. e I.E.F. superaron a los diagnósticos micológicos en casi todas las micosis incluidas en el trabajo, debido posiblemente al grado de dificultad en la obtención del material para el examen micológico, en comparación con la facilidad de obtener muestras de suero del paciente. Hubo una excepción en los pacientes con *Criptococosis*, de los cuales se obtuvieron muestras en todos y se les realizó el diagnóstico por el estudio micológico en todos menos uno de los casos. La dificultad de obtener muestras apropiadas para el examen micológico tomó un carácter de mayor importancia en *Histoplasmosis*, en donde se procesaron 77 muestras para el examen micológico, de los cuales 22 correspondieron a esputo, con sólo 3 casos positivos. En estos casos, el examen micológico se dificulta debido a

que siendo la patología pulmonar la más frecuente, la muestra no es fácil de lograr y cuando se obtiene, (esputo, lavado bronquial), se contamina con facilidad, lo cual es un impedimento para el crecimiento del hongo en el cultivo. La mayoría de las muestras para el micológico examinadas buscando *Histoplasmosis* se contaminaron, por lo que el 87,7% resultaron negativas. Además, como el *H. capsulatum* tiene un tamaño muy pequeño y requiere de coloraciones especiales, su visualización no es fácil al microscopio. Otros factores que incidieron en el número menor de muestras para el examen micológico, fueron los diferentes sitios de procedencia de los pacientes, ya que la mayoría provenían de Municipios foráneos del Estado Zulia, así como de fuera del Estado y el hecho de que en un gran número de pacientes, la única muestra que pudo ser obtenida fue el suero o L.C.R. para el inmunodiagnóstico.

Aun cuando los otros hongos de mayor tamaño son más fáciles de demostrar con el estudio micológico, no deja de ser el inmunodiagnóstico un complemento adecuado y confiable.<sup>29</sup> De nuestros datos se desprende que en las micosis en donde hubo casos sin diagnosticar por el estudio micológico, como ocurrió en *Histoplasmosis*, *Candidiasis*, *Coccidioidosis* y *Aspergilosis*, se obtuvo para esas cuatro micosis, un por-

centaje mayor de positividad con la I.D. e I.E.F.: 98,6% para *histoplasmosis*, 94,1% para *aspergilosis* y 100% para *candidiasis*, *paracoccidioidosis* y *coccidioidosis*. Los nueve pacientes con *Criptococosis* evaluados con *Crypto-Test* resultaron todos positivos, cifras éstas similares a las obtenidas en otros trabajos.<sup>4 86</sup> En el campo de la micología, estos estudios han permitido el diagnóstico de micosis profundas en casos donde la lesión interna no es accesible fácilmente para el estudio micológico o histopatológico, los cuales eran los medios más comunes de los que se disponía anteriormente. El inmunodiagnóstico cobra una importancia mayor cuando se trata de meningitis, en donde con el estudio del L.C.R., a veces es difícil discernir si se trata de un proceso viral, bacteriano o micótico. En estos casos, evidenciar la micosis mediante estas pruebas es crucial para instalar la terapia adecuada.<sup>65,96</sup> Siempre se debe insistir en el examen micológico para poder aislar el agente causal. Una situación similar ocurre en aquellos pacientes inmunosuprimidos crónicamente, en donde una evolución clínica tórpida puede enmascarar a una micosis y el inmunodiagnóstico puede resolver la situación.

En nuestra Unidad, la *histoplasmosis* resultó la micosis profunda diagnosticada con más frecuencia (44,7%), lo que concuerda con encuestas epidemiológicas realizadas.<sup>8,25,78</sup> El inmunodiagnóstico permitió comprobar *histoplasmosis* en 97 de 98 pacientes evaluados por serología (98,9%). Se consiguió que la mayoría de los casos presentaban una sola banda de precipitación "M", lo cual ha sido observado por otros autores.<sup>12,69,87</sup> En los tres casos en donde se identificaron conjuntamente bandas "H" y "M", se comprobó que presentaban *histoplasmosis aguda*, con manifestaciones pulmonares y síndrome febril prolongado, lo cual se corresponde con otros reportes.<sup>9,12,23,89</sup> El caso que resultó negativo correspondió a un individuo asintomático, intervenido por una lesión calcificada pulmonar, que resultó *histoplasmosis* en el estudio histopatológico. La serología practicada posteriormente resultó negativa. Este falso negativo probablemente se debió

a que se trataba de una lesión antigua, residual, así como también es posible que existiera una respuesta inmune inadecuada al antígeno fúngico por la calcificación del granuloma pulmonar. Se han descrito falsos positivos con el inmunodiagnóstico para *Histoplasmosis* en casos de tuberculosis.<sup>35</sup> En 2 de nuestros pacientes con tuberculosis, la serología y el micológico confirmaron el diagnóstico de *Histoplasmosis*. Otros de los pacientes, un niño sin compromiso inmunológico conocido, presentó osteomielitis por *Histoplasmosis* en la articulación coxofemoral, la cual, como otras patologías óseas y articulares, es una forma poco frecuente de presentación,<sup>7,45</sup> al igual que la afectación del S.N.C., que usualmente se consigue bajo la forma de meningitis.<sup>16,71,91</sup>

Los casos con diagnóstico de *Candidiasis* fueron aquellos incluidos dentro de la variedad clínica de *Candidiasis extracutánea*. En ésta, el número de muestras micológicas procesadas fue de 11 (33,3%) de todos los casos), de las cuales el 63,6% resultaron positivas. Al inmunodiagnóstico, de los 4 casos con bandas "A" y "B", 2 correspondieron a lesiones mucosas de faringe y esófago, con 6 meses de evolución del cuadro. Los otros 2 casos presentaban manifestaciones clínicas y radiológicas de patología pulmonar. Todos los pacientes resultaron positivos al inmunodiagnóstico, incluso un caso con *Candidiasis masiva* (una paciente con leucosis aguda), en oposición con algunos hallazgos negativos en pacientes con cáncer concomitante.<sup>36,41</sup> Esta micosis afectó mayoritariamente a las mujeres, particularmente a aquellas que desempeñaban labores en el hogar, es decir, que aparentemente no presentaban un factor de riesgo en particular, lo que pudiera significar, como se ha descrito previamente, que la *Candidiasis* se hizo sistémica como una infección oportunística,<sup>18,53,76</sup> ya que no se pudo demostrar que en el grupo de pacientes hubieran casos con factores de riesgo evidenciables, como se ha descrito en algunos estudios.<sup>B<sup>2</sup></sup> En el inmunodiagnóstico de la *Candidiasis*, al igual que con las demás micosis, se han implementado con los años diferentes técnicas que persiguen una mayor especificidad en los

resultados. Esto se ha hecho intentando purificarlos antígenos, extrayéndolos del citoplasma o del protoplasto germinativo<sup>45,79</sup> y normalizando reactivos y métodos.<sup>42,51,67</sup>

La *Paracoccidioidosis* se consiguió en el 7,35% de todos los casos. La mitad de los pacientes diagnosticados provenían del Estado Falcón, en donde es relativamente frecuente esta micosis,<sup>80</sup> al igual que en el centro del país.<sup>6,10</sup> En nuestros pacientes, el diagnóstico micológico resultó positivo en él 67,6% de las muestras procesadas, tanto al directo como al cultivo e histopatología. Cuando las muestras que se evalúan son las de piel y mucosas, en donde el *P. brasiliensis* se aísla de paracoccidioidosis en la micosis que más afecta a los varones adultos que realizan labores propias del campo.<sup>6,7,79</sup> lo cual se evidenció en nuestro trabajo. La manifestación clínica más frecuente fue la patología pulmonar. El inmunodiagnóstico en nuestros pacientes fue lo suficientemente sensible como para que diera resultados positivos en el 100% de los casos.

La *Coccidioidosis* se diagnosticó en nuestro estudio en 20 pacientes (5,88% de todos los casos). La mayor parte de los pacientes presentaba patología pulmonar, lo cual es bastante común.<sup>72,76</sup> Sólo un caso presentó meningitis, descrito en otro trabajo.<sup>96</sup> De los ocho pacientes diagnosticados por histopatología, uno era un transplantado renal en terapia inmunosupresora y otro resultó una *Coccidioidosis con* invasión masiva a prácticamente todos los órganos. Es posible que, en este caso hubiera ocurrido un estado de inmunosupresión que facilitara tal grado de difusión de la infección, como ha sido descrito en algunos pacientes.

En *Criptococosis* se han conseguido excelentes resultados con el inmunodiagnóstico, especialmente cuando se trata de afectación del S.N.C. Pudimos comprobar que en todos los casos se evidenció el examen micológico la presencia del *C. neoformans*. El *Crypto-Test* se le practicó a nueve pacientes, resultando todos ellos positivos. La demostración del antígeno capsular es la

prueba más específica en *Criptococosis* cerebral y en la forma diseminada.<sup>93</sup> La sensibilidad del inmunodiagnóstico tiende a disminuir cuando se trata de afectación fuera del S.N.C., como ocurre en la forma pulmonar.<sup>76</sup> La prueba del látex tiene también valor pronóstico cuando se toma en cuenta la evolución de las diluciones del I.C.R. o suero examinados. Aún con estos resultados favorables, se siguen intentando otras alternativas, como la detección de metabolitos antigénicos de los cultivos del hongo, lo que permitiría obviar los falsos positivos observados en pacientes con artritis reumatoidea severa, por la interferencia que se presenta al formarse los complejos antígeno-anticuerpo, que entorpecen la prueba.<sup>55</sup>

Para la evaluación inmunodiagnóstica de la *Aspergilosis* se utilizaron 4 antígenos, producidos por los *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*. Así, con un solo preparado se podían descartar las 4 especies y otras que tuvieran afinidad con alguno permitía orientar el diagnóstico con mayor precisión hacia una forma clínica en particular, circunstancia comprobada en otros trabajos.<sup>27,47,58,60</sup> Por otro lado, se ha comprobado que una disminución del número de bandas habla en favor de una evolución satisfactoria,<sup>28</sup> por lo que estas pruebas constituyen también un recurso para evaluar el tratamiento de estos casos. En uno de los pacientes con *Aspergilosis*, el serodiagnóstico resultó negativo. Se trataba de un paciente con una tumoración nasal bien encapsulada, por lo que es posible que no hubiera estimulado una respuesta inmune del paciente. De los 15 casos con *Aspergilosis*, pudimos comprobar que en 10 de ellos existían antecedentes de tuberculosis pulmonar, lo cual es una situación que se reporta en otros trabajos.<sup>75</sup> La explicación de este hecho consiste en que en el paciente con tuberculosis se crean lesiones desvitalizadas, adoptando frecuentemente la forma clínica de *aspergiloma*. Este factor condicionante es importante, puesto que el *Aspergillus* es un hongo típicamente oportunístico, con una virulencia escasa. En el paciente citado, el diagnóstico se pudo realizar sólo mediante el estudio histopatológico. Por otro lado, el inmunodiagnóstico en

*Aspergilosis* no ha logrado superar el problema de las reacciones cruzadas, que ocurren ocasionalmente, así como la baja capacidad de detectar anticuerpos en los pacientes inmunocomprometidos, quienes resultan ser los más afectados de *Aspergilosis* invasiva. Sin embargo, se ha comprobado con el tiempo que la I.D. resulta el método sencillo más efectivo para diagnosticar esta micosis.

Hay que tener presente que existen varias situaciones en las que se pueden dar falsas interpretaciones a los resultados del inmunodiagnóstico. Algunos de estos factores son: a) La presencia ocasional de niveles elevados de anticuerpos contra el hongo, aún varios años después de haberse autolimitado la lesión, que se manifiestan con serologías positivas en los protocolos de estudio de pacientes con otras afecciones no micóticas y que pueden sugerir erróneamente que se trata, por ejemplo, de una *histoplasmosis activa*. Estos falsos positivos deben ser sometidos a otras pruebas que determinen más específicamente el diagnóstico. b) Pueden obtenerse resultados falsos negativos en pacientes inmunosuprimidos severamente. c) En las infecciones del inicio reciente, en donde el predominio de la respuesta inmunológica es a IgM. Pueden ocurrir falsos negativos ya que la I.D. y la I.E.F. detectan específicamente a la IgG. d) se utilizan antígenos inespecíficos sin normalizar, pueden ocurrir resultados falsos positivos, particularmente en fases tempranas de la enfermedad.<sup>35,53</sup> Otros factores de error pueden ser: e) Concentración inadecuada del gel de soporte. f) Alteración del pH de las soluciones tampón y g) Contaminación de los antígenos o sueros utilizados.<sup>30</sup>

Las reacciones cruzadas que se consiguieron al inmunodiagnóstico correspondieron a casos por *Histoplasma* y *Candidida*, cuyos antígenos pueden producir bandas en otras micosis, particularmente *Candidiasis* y *Aspergilosis*. Esta situación, que se presentó a la I.D., fue obviada con la I.E.F., con la que se pudo evidenciar el antígeno específico.

El futuro de la micología médica se vislumbra ligado estrechamente a la posibilidad de curación de las micosis y al

diagnóstico preciso de ellas. Mientras se desarrollan nuevas técnicas para este fin, el inmunodiagnóstico seguirá teniendo vigencia.

## CONCLUSIONES

1. La creación de los Grupos de Trabajo para el estudio de las micosis en Venezuela ha permitido unificar criterios respecto al enfoque clínico, epidemiológico y diagnóstico de estas afecciones.
2. El protocolo de estudios micológicos y de inmunodiagnóstico empleado resultó muy efectivo particularmente, inmunolectroforesis y la aglutinación del látex, con las que se obtuvieron resultados positivos en casi todos los pacientes.
3. Las pruebas de inmunoprecipitación usadas mostraron varios aspectos resaltantes por las que merecen ser recomendadas:
  - 3.1 Técnica sencilla.
  - 3.2 Reactivos y antígenos muy específicos.
  - 3.3 Fácil adquisición de los materiales necesarios.
  - 3.4 Ampio margen diagnóstico para varios tipos de micosis.
  - 3.5 Fácil implementación de las técnicas en laboratorios regionales con bajo volumen de pacientes, como ocurre en algunas zonas endémicas.
  - 3.6 Resultados confiables cuando se usa en varios líquidos corporales.
  - 3.7 Muy fácil como parte de los estudios a realizar en lesiones del Sistema Nervioso Central.
  - 3.8 Las muestras pueden ser evaluadas con un mayor número de antígenos.
4. La metodología usada en muestra unidad permite:
  - 4.1 Ahorrar antígenos.
  - 4.2 Utilizar sueros de referencia para una mayor especificidad en la observación de las bandas de identidad.
  - 4.3 La aplicación de la Inmunodifusión Semicuantitativa, lo que facilita el control de los pacientes.

5. La obtención de la historia clínica y la realización de los estudios micológicos de inmunodiagnóstico permiten obtener un conocimiento más completo de la sintomatología, epidemiología y diagnóstico de las micosis, que ha servido de base para la difusión del conocimiento micológico en Venezuela.

## REFERENCIAS

1. Aiello L. "Observations on the epidemiology of histoplasmosis". Memorias del IV Congreso Venezolano de Tisiología y Neumonología. 1959: 231-237, Valencia, Venezuela.
2. Alford R, and Goodwind R. "Patterns of immune response in chronic pulmonary histoplasmosis". The Journal of Infections Diseases. 1972; 125 (3): 269-275.
3. Alvarez M, Alborno B, Torres D, Villanueva E. "Eritema nodoso y micosis". Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela. 1986; II (6): 25-26.
4. Amesty de Valbuena A, Bracho S, Ramos M, Lina R. "Prueba de aglutinación con partículas de Látex para la investigación de *Cryptococcus neoformans* en L.C.R.". Universidad del Zulia, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis (Tesis de Grado). 1982.
5. Arechavala AI, Robles AM, Bianchi MH, Taborda A. "Value of direct and indirect diagnostic methods in systemic mycoses associated with AIDS". Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 1993, Mar-Apr. 35 (2): 163-169.
6. Arenas M. Paracoccidiodosis en el Estado Carabobo". Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela. 1985; 1 (2): 11.
7. Arreaza F, Lehenhart J, Mizrachí R, Tapia G. "Correlación entre las pruebas serológicas para diagnóstico de micosis profundas y radiografías del tórax". Revista de la Fundación José Ma. Vargas. 1986: 68-77.
8. Baldó J, Campins H, Páez A. "Histoplasmosis en Venezuela" Mycopathologia. 1961; 15: 177-216.
9. Bastardo de Alborno M. "Lecciones de Micología Médica". Imprenta del M.S.A.S. 1979. Caracas, Venezuela.
10. Bastardo de Alborno M, Cabral N. "Paracoccidiodomicosis: Estudio clínico en 40 pacientes". Archivos del Hospital Vargas. 1976; 23 (5-6): 5-22.
11. Bastardo de Alborno M, Mendoza M, Villanueva E, Ríos R. "Uso de la técnica de la Electrosinéresis en el diagnóstico de *Cryptococcus*". Comunicación preliminar". Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela. 1986; 11 (6): 16-17.
12. Bastardo de Alborno M, Vargas H, Mirb A. "Relación entre la clínica y diagnóstico inmunológico en histoplasmosis, paracoccidiodomicosis y coccidiodomicosis". Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela. 1986; 11 (6): 23-24.
13. Bastardo de Alborno M, Villanueva E. "Resultado del empleo de las técnicas de inmunoprecipitación en la orientación diagnóstica de las micosis profundas". Der-



- matología Venezolana 1984; XXIV, 20 (3y4): 32-43.
14. Bastardo de Albornoz M, Villanueva E. "Las técnicas inmunológicas en el diagnóstico de las micosis profundas". *Ciencia y Tecnología de Venezuela*. 1985; 2 (1): 211-221.
  15. Bastardo de Albornoz M, Villanueva E, Torres E. "Application of Immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporothricosis". *Mycopathologia* 1984; 85: 177-183.
  16. Bastardo de Albornoz M, Villanueva E, Mendoza E, Torres E. "Diagnóstico serológico de las meningitis fúngicas., Comunicación de 10 casos de meningitis por *Histoplasma capsulatum*". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela*. 1987; 3 (3): 20-21.
  17. Bauman D, Smith C. "Comparison of immunodiffusion and complement fixation test in the diagnosis of histoplasmosis". *J Clin Microbiology* 1975; 2 (2): 77-80.
  18. Bellanti J.: Mecanismos de Inmunidad contra enfermedades micóticas". *Inmunología*. 1981: 376-384. Editorial Nueva Editorial Iberoamericana, México.
  19. Blumer S, Jalbert M, Kaufman L. "Rapid and reliable method for production of a specific Paracoccidioides brasiliensis Immunodiffusion test antigen". *J Clin Microbiology*. 1984; 19 (3): 404-407.
  20. Borelli D. "Prevalence of systemic mycosis in Latin America". *Proceedings of the International Symposium on Mycosis*. 1970: 28-38. Editorial Pan American Health Organization.
  21. Brouwer J. "Detection of antibodies against *Aspergillus fumigatus*: Comparison between double immunodiffusion, E.L.I.S.A. and immunoblot analysis". *International Arch Allergy Immunology* 1988; 85 (2): 244-249.
  22. Campins H. "Coccidioidomycosis in Venezuela". *Coccidioidomycosis*. 1967:279-286. Editorial University of Arizona Press. Tucson, Arizona, U.S.A.
  23. Campins H. "Frecuencia y peculiaridades de las micosis profundas en habitantes de Venezuela con radiología del tórax normal". *Gaceta Médica de Caracas* 1984; 92 (1, 2, 3).
  24. Cano L, Restrepo A. "Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1987; 29 (5): 276-283.
  25. Casas, R. "Encuesta epidemiológica con histoplasmina y coccidioidina realizada en la ciudad de Maracaibo". *Kasmera* 1965; 2 (1): 105-121.
  26. Catanzaro A, Fratauer F. "Detection of serum antibodies in coccidioidomycosis by solid-phase radioimmunoassay". *J Infec Dis* 1983; 147 (1): 32-39.
  27. Chaparras S, Kaufman L, Kim S, McLaughlin D. "Characterization of antigens from *Aspergillus fumigatus*". *American Review of Respiratory Disease* 1980; 122: 647-650.
  28. Coleman R, Kaufman L. "Use of Immunodiffusion test in the serodiagnosis of aspergillosis". *Applied Microbiology* 1972; 23 (2): 301-308.
  29. Cox R. "Serodiagnosis of fungal diseases". *Clinical Immunology Newsletter* 1985; 6 (2): 17-22.
  30. Da Silva Lacaz C, Porto E, Costa Martins E. "Micología Médica". 1984. Editorial Sarvier. Sao Paulo, Brasil.
  31. De Camargo Z. "Production of Paracoccidioides brasiliensis exoantigens for Immunodiffusion test". *J Clin Microbiology* 1988; 26 (10): 2147-2151.
  32. Del Negro G, Da Silva Lacaz C, Fiorillo A. "Paracoccidioidomycose, Blastomycosem sulamericana". *Diagnostico Imunologico* 1982. Editorial de Sao Paulo, Brasil.
  33. De Repentigny L. "Standardization of reagents and test in immunodiagnosis of mycosis: Overview of problem". *Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*, 1988. Editor: Josep M Torres R. Prous Science Pub. Barcelona, España.
  34. Di Salvo A. "Identification of mycotic pathogens using antisera to exoantigens". *Clin Immunology, News letter*. 1985; 6 (2): 24-29.
  35. Di Salvo A, Corbett D. "Apparent false positive histoplasmin latex agglutination test in patients with tuberculosis". *J Clin Microbiology* 1976; 3 (3): 306-308.
  36. Di Salvo A. "Histoplasma capsulatum serology" (Letter). *J. Clin Microbiology* 1986; 24 (5): 905.
  37. Ferreira-Cruz MF, Castro B, Wanke B. "Producao e padronizacao dos antígenos de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum*, *A. fumigatus* para uso no imunodiagnóstico". *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1985; 80: 301-305.
  38. Gregg F, Wu B, Armstrong D. "Immunodiffusion and agglutination test for *Candida albicans* in patients with neoplastic disease: inconsistent correlation of results with invasive infection". *J Inf Dos*. 1977; 135 (3): 349-357.
  39. Fink J, Barbosiak J, Scribner G. "Variability of extracts used in immunoprecipitin test". *J Allergy and Clin Immunology*. 1977; 60 (4): 238-244.
  40. Fromtling RA, Shadomy H. "Immunity in cryptococcosis. An overview". *Mycopathologia* 1982; 77: 183-190.
  41. Gentry L, McNitt T, Kaufman L. "Use and value of serologic test for the diagnosis of systemic candidiasis in cancer patients. A prospective study of 146 patients". *Current Microbiology* 1978; 1: 239-242.
  42. Glew RH. "Serologic test in the diagnosis of systemic candidiasis. Enhanced diagnostic accuracy with cross immunoelectrophoresis". *Am Med*. 1978; 64: 586.
  43. Graham A, Ryan K. "Counterimmunoelectrophoresis employing coccidioidin in serologic testing for coccidioidomycosis". *Am Clin Pathol*. 1980; 73 (4): 574-577.
  44. Grayhill JR. "Histoplasmosis and AIDS" *J Inf Dis*. 1988; 158 (3): 623-636.
  45. Herrera J, Bastardo M, Crespo A, Torres E, Serrano N: "Lesiones óseas y articulares por hongos". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela*. 1986; 2 (6): 22.
  46. Holliday M. "A modified cytoplasmic antigen of *Candida albicans* for serodiagnosis of systemic candidiasis". *J Immunological Methods*. 1979; 31: 71-78.
  47. Holmberg K, Berdichewsky M, Young L. "Serologic Immunodiagnosis of invasive aspergillosis". *J Inf Dis*. 1980; 141 (5): 656-664.
  48. Huppert M, Bailey J. "The use of Immunodiffusion test in coccidioidomycosis" *Am J Clin Pathol*. 1985; 44 (3): 364-368.
  49. Zeppone C, Bridón DaGraca D, Angluster J, Celuta A, Lopez Silva C. "Detection of cellular immunity with the soluble antigen of the fungus *sporothrix schenckii* in the systemic form of the disease". *Mycopathologia*. 1992; 131:139141.
  50. Johnson JE, Jeffery B, Huppert M. "Evaluation of five commercially available Immunodiffusion kits and *Histoplasma capsulatum*". *J Clin Microbiology*. 1984; 20: 530-532.
  51. Yoshimoto K, Uesaka I. "Assessment of germ tube dispersion activity of serum from experimental candidiasis: A new procedure for serodiagnosis". *Infection and Immunity*. 1974; 9 (5): 788-793.
  52. Kaur J, Myers AM. "Homosexuality, steroid therapy and histoplasmosis". *Ann Int Med*. 1983; 99: 567.
  53. Kirkpatrick C. "Host factors in defense against fungal infections". *Am J Med*. 1984; 77 (4): 1-12.
  54. Kaufman L. "Experience in the standardization of histoplasmosis Immunological test and reagents". *X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*. 1988: 269-277. Editor Josep Torres. Editorial J.R. Prous Science Pub. Barcelona, España.
  55. Kaufman L. "Serodiagnosis of fungal diseases". *Manual of Clinical Immunology*. 1980. Editores NR. Rose y H. Freidman. Editorial American Society for Microbiology Pub.
  56. Kaufman L, Clark M. "Value of the concomitant use of complement fixation and immunodiffusion test in the diagnosis of coccidioidomycosis". *Applied Microbiology*. 1974; 28: 641-643.
  57. MacKenzie DWR, Murphy J. "New trends in immunology of mycoses". *X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*. 1988: 23-26. Editor: Josep Torres. Editorial J.R. Prous Science Pub. Barcelona, España.
  58. MacKenzie DWR, Wilson EV, Hearn VM. "Standardisation of *Aspergillus* serodiagnostic reagents an procedures". *X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*. 1988: 268-283. Editor: Josep M Torres. Editorial J.R. Prous Science Pub. Barcelona, España.
  59. Márquez S, Dillon N, Franco M, Habermann M, Lastoria J, Stolf H, Marcondes J, Grizzo W, Silva N, Carvariani M, Curi P. "Paracoccidioidomycosis: A comparative study of the evolutionary serologic clinical and radiologic results for patients treated with Ketoconazole or Amphotericin plus sulfonamides". *Mycopathologia*. 1985; 89:1923.
  60. Mishra K, Falkenberg S, Noel Masihi. "Efficacy of enzyme-linked immunosorbent assay in serodiagnosis of aspergillosis". *J Clin Microbiology*. 1983; 17 (4) 708-710.
  61. Molero de Lara M, Vargas H, Vargas de Caminos N, Mesa L, Rodríguez de Valero S. "Micosis profundas: Casuística del Servicio de Micología del Hospital Universitario de Maracaibo, Julio de 1985 a Junio de 1986". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela*. 1986; 2 (6): 35.
  62. Mota F, Franco M. "Observacoes sobre apesquisa de anticorpos IgM anti-Paracoccidioides brasiliensis por imunofluorescencia no soro de pacientes com paracoccidioidomycose". *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1979; 21 (2): 82-89.
  63. Murzi H, Contreras C. "Paracoccidioidomycosis en el Estado Táchira". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela*. 1987; 3 (7): 18.

64. Nan Scott E, Kaufman L, Brown A, Muchmore H. "Serologic studies in the diagnosis and management of meningitis due to *Sporothrix schenckii*". *New Eng Med.* 1987; 317 (15): 935-940.
65. Murphy J. "Mechanisms of Natural Resistance to human pathogenic fungi" *Annual Reviews of Microbiology.* 1991; 45: 509-538.
66. Organización Panamericana de la Salud. "Manual de procedimientos estandarizados para el serodiagnóstico de las micosis profundas. Parte I: Pruebas de inmunodifusión en agar". Ed. Departamento de Promoción y Coordinación de Investigaciones. 1972. Washington, D.C., U.S.A.
67. Pauliak V. "Determination of antibodies to *Candida albicans* cell wall components by Immunodiffusion. ELISA and its rapid modification". *Mycoses.* 1988; 31 (8): 426-432.
68. Pine L. "Histoplasma antigens: Their production, purification and uses". *Contribución to Microbiology and Immunology.* 1977; 3: 138168.
69. Pine L, Green J, Gross H, Malcolm G, Knox H. "Purified histoplasminreagents or the identification of H and M antigens and homologous antibodies by Immunodiffusion or complement fixation test". *Mycopathologia* 1985; 91: 3940.
70. Platenkamp GJ, Van Duin AM, Porcius JC, Schouten HJA, Zondervan PE, Michel MF. "Diagnosis of invasive Candidiasis in patients with and without signs of immune deficiency: A comparison of six detection methods in human serum". *J Clin Pathol* 1987; 40: 11621167.
71. Plouffe YF, Fass RJ. "Histoplasma meningitis: diagnostic value of cerebrospinal fluid serology". *Ann Int Med* 1980; 11: 370-376.
72. Quintero M, Padilla R, Laguna X, Sánchez de Mirta, Mirta J. "Estudio inmunoepidemiológico y radiológico de la coccidioidomycosis en habitantes de Paraguaná". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1987; 3 (3): 1112.
73. Restrepo A, Moncada L. "Indirect fluorescent antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion test for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis". *Applied Microbiology;* 24: 404-407.
74. Restrepo AM, Moncada L. "Serologic procedures in the diagnosis of paracoccidioidomycosis". *Proceedings: International Symposium on Mycosis.* 1970. N°205. Editorial: Scientific Publications, Pan American Health Organization.
75. Retamal C, Diaz C, Salamanca L. "Aspergilosis pulmonar en Chile: Enfoque inmunológico". *Boletín Micológico.* 1984; 2: 11-16.
76. Rippon JW. "Medical Micology. The pathologic fungus and the pathogenic actinomycetes". Editorial WB Saunders. 1982. 2da. Ed. Philadelphia, U.S.A.
77. Rodríguez de Valero S. "Encuesta epidemiológica con Paracoccidioidina y coccidioidina en una población indígena". *Kasmera* 1986; 14 (1-4): 96-110.
78. Rodríguez de Valero S, Molero de Lara M, Vargas de Caminos N, Mesa L, Vargas H. "Encuesta epidemiológica con histoplasmina en población infantil de Zipayare, Estado Zulia". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1986; 2 (2): 34.
79. Rodolfo S, Gómez H. "Las micosis en el Estado Monagas. Paracoccidioidomycosis". *Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1987; 3 (8): 19-20.
80. Sánchez de Mirt, Mirt A. "Las Micosis profundas en el Estado Falcón". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1985; 1 (2): 9.
81. Small CB, Klein RS, Freidland GH. "Community acquired opportunistic infections and defective cellular Immunity in heterosexual drug abuser and homosexual men". *Am J Med.* 1983; 74: 433-440.
82. Smith J. "Germling protoplast antigens of *Gandida albicans* in the serodiagnosis of invasive candidiasis". *J Inf. Dis.* 1986; 153 (1): 146-150.
83. Standart P, Kaufman L. "Specific Immunological test for the rapid identification of members of the genus histoplasma". *J clin Microbiology.* 1976; 3 (2): 191-199.
84. Shinakay Y, Segurado C, Pinto P, Nicodemo AC, Sato M, Duarte A, DelNegro C, Hutzler R, Shirona M, Neto Y. "Immunodeficiency secondary to juvenile paracoccidiomycosis: Associated infections". *Mycopathology.* 1992; 120: 23-28.
85. Stockman L, Roberts GD. "Specificity of the latex test for cryptococcal antigen: A rapid simple method for limiting interference factors". *J clin Microbiology.* 1982; 16: 965-967.
86. Sweet G, Cimpich R, Sweet D. "Antibodies in Histoplasmosis detected by use of yeast and micelial antigens in Immunodiffusion and electroimmunodiffusion". *Am Rev Respiratory Dis.* 1979; 120: 441-449.
87. Talbot G, Weiner M, Gerson S, Provencher M, Hurwitz S. "Serodiagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy: Validation of the *Aspergillus fumigatus* antigen radioimmunoassay". *J Inf Dis.* 1987; 155 (1): 12-27.
88. Sposto MR, Mendes-Giannini MJ, Moraes RA, Franco FC, Scully C. "Paracoccidioidomycosis manifesting ad oral lessons: Clinical cytological and serological investigation". *J Oral Pat Med.* 1994; 23 (2): 85-87.
89. Torres Y, Cuervo C, Albornoz M. "Histoplasmosis y paracoccidioidosis infantil". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1987; 3 (3): 19-20.
90. Valderrama T, Santiago A. "Micosis profundas: Resumen de la casuística de la Sección de Micología del Departamento de Bioanálisis del Hospital Universitario de Caracas. Lapso 1984-1988". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1989; 4 y 5 (12, 13): 22-27.
91. Vargas de Caminos H, Vargas H, Moleno de Lara M, Antúnez A, Urdaneta N, Guerrero E. "Meningitis por *Histoplasma capsulatum*". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1987; 3 (3): 13.
92. Vargas de Caminos H, Vargas H, Moleno de Lara M, Mesa L, Valero S. "Criptococosis pulmonar en una paciente inmunosuprimida". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1986; 2 (6): 38.
93. Vargas de Caminos H, Vargas H, Moleno de Lara M, Mesa L, Valero S. "Meningitis por *Cryptococcus neoformans*: Presentación de dos casos". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1986; 2 (4): 21-22.
94. Vargas H, Albornoz M, Urdaneta C. "Estudio epidemiológico del caserío Culebra (Alto Orinoco)". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1987; 3 (7): 15.
95. Vargas H, Moleno de Lara M. "La prueba de inmunodifusión con sueros de referencia en el estudio de las micosis profundas. Técnicas". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1985; 1 (3): 22-24.
96. Vargas H, Moleno de Lara M, Vargas de Caminos N, Rodríguez de Valero S, Mesa L. "Técnicas de Inmunodifusión cuantitativa (I.D.S.C.) en minotoreo de micosis profundas sistémicas". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1985; 1 (3): 24-27.
97. Vargas H, Moleno de Lara M, Vargas de Caminos N, Rodríguez de Valero S, Mesa L. "Casuística del Servicio de Micología del Hospital Universitario en el lapso de Junio 1984 a Junio 1985". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1985; 1 (3): 13-14.
98. Vargas H, Vargas de Caminos N, Moleno de Lara M, Rodríguez de Valero S, Mesa L, Bernal J. "Meningitis or Coccidioides immitis. Presentación de un caso". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1985; 1 (3): 16-17.
99. Vargas H, Vargas de Caminos N, Moleno de Lara M. "Micosis profundas. Resultados obtenidos en el lapso Junio 1984 a Marzo 1987". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1987; 3 (8): 18.
100. Villalba E. "Técnicas serológicas para detectar anticuerpos en pacientes con Cromomicosis por *C. carrioni*". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1988; 3 (3): 25.
101. Villalba E, Torres A, Yegres J, Caleiras E, González R. "Detection of circulating antibodies in patients affected by chromoblatomycosis by *Cladosporium carrioni* using double immunodiffusion". *Mycopathologia.* 1988; 199 (1): 17-19.
102. Villalba E, Yegres J. "Comparación de las técnicas de contra! rnmunoel electroforesis e inmunodifusión para la detección de anticuerpos en pacientes afectados por cromomicosis". *Boletín Informativo Las Micosis en Venezuela.* 1987; 3 (3): 25.
103. Walter J. "The significance of antibodies in chronic histoplasmosis by immunoelectrophoretic and complement fixation test". *Am Rev Resp Dis.* 1969; 99: 50-58.
104. Wheat L, Kohler R, Tewari R. "Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in urine specimens". *New Eng J Med.* 1986; 314 (2): 83-89.
105. Wheat J, French M, Kamel S, Tewari R. "Evaluation of cross-reaction in *Histoplasma capsulatum* serologic test". *J clin Microbiology.* 1986; 123 (3): 493-499.
106. Wieden M, Galgiani J, Pappagianis D. "Comparison of immunodiffusion techniques with standard complement fixation assay for quantitation of coccidioidal antibodies". *J Clin Microbiology* 1983; 18 (3): 529-534
107. Whitaker RH. "New concepts of kingdoms of organism". *Science* 1969; 163: 150-160.
108. Yarzabal L. "Pruebas de inmunoprecipitación para el diagnóstico de las micosis profundas" (Folleto). Editorial Centro Panamericano de Investigaciones y Adiestramiento en Lepra y Enfermedades Tropicales. Caracas, Venezuela.