

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS FUNGICOS CRUDOS PRODUCIDOS
CON CEPAS GUATEMALTECAS DE *H. capsulatum* PARA SER UTILIZADOS EN
LA PRUEBA DE ELISA

INFORME DE TESIS
PRESENTADO POR

ANA GRACIELA CARDONA ALMENGOR

PARA OPTAR AL TITULO DE
QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, octubre del 2002

DL
06
T(605)

JUNTA DIRECTIVA

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

DECANO:	M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
SECRETARIA:	Licda. Jannette Magaly Sandoval de Cardona
VOCAL I:	Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo
VOCAL II:	Lic. Juan Francisco Pérez Sabino
VOCAL III:	Dr. Federico Adolfo Richter Martínez
VOCAL IV:	Br. Jorge José García Polo
VOCAL V:	Br. Liza Leonor Carranza Jui

DEDICO ESTA TESIS

A DIOS

Por permitirme estar en este día, dándome la oportunidad de alcanzar esta meta y por ser la fortaleza de mi vida.

A MIS PADRES

Miguel Angel

Delfina

Por los esfuerzos realizados que permitieron mi formación, por su amor y confianza incondicional, a ellos con amor profundo y agradecimiento, les ofrezco este pequeño tributo.

A MIS HERMANOS

Luis Miguel

José Luis

Por su amor y compañía.

A MI FAMILIA

Por el cariño de toda una vida.

A MI NOVIO

Fernando

Por su amor, comprensión y apoyo.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

AGRADECIMIENTOS

Licda. María Luisa García de López, por su asesoría y orientación, las cuales hicieron posible esta investigación.

Licda. Heidi Logemann y Licda. María del Carmen Bran, por el tiempo que amablemente dedicaron a la revisión de esta investigación.

Al personal del Departamento de Microbiología, Servicio de Micología, Lamir y Dirección de Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por su colaboración durante el desarrollo de esta tesis.

Al Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB-, por su financiamiento en la compra de materiales y reactivos.

A mis compañeras, Claudia Martínez, Betsaida Vides, Claudia Soto, Karla Ozuna, Claudia Figueroa, por su cariño y apoyo, que me han brindado.

II. INTRODUCCION

Guatemala es un país que por sus condiciones ecológicas, favorece el desarrollo de una gran variedad de hongos, incluyendo los agentes causales de micosis profundas, siendo las más importantes: coccidioidomicosis e histoplasmosis (1).

Los hongos causales de las micosis profundas se caracterizan por la producción de cuadros pulmonares primarios, es decir que el foco de infección se encuentra a nivel pulmonar, causando signos y síntomas característicos a una infección de las vías respiratorias bajas; a partir de los cuales puede diseminarse al resto del cuerpo y producir lesiones granulomatosas.

Estos hongos viven como saprófitos en la naturaleza (suelo y materia orgánica) y debido a sus requerimientos nutricionales específicos están limitados a ciertas regiones geográficas, conocidas como áreas endémicas, las que se encuentran distribuidas en el Continente Americano (2).

La histoplasmosis es considerada como la micosis profunda más importante del mundo y la de mayor trascendencia en el Continente Americano. Se distribuye ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales (3) y es una de las principales micosis relacionadas a procesos inmunosupresivos (4). Es una enfermedad infecciosa causada por inhalación de esporas de un hongo llamado *H. capsulatum*; afecta principalmente a los pulmones y sus síntomas son muy variables (5). Casi siempre es sintomática o asintomática, aunque el uno por ciento determina síntomas clínicos de neumonía aguda, seguidos excepcionalmente de enfermedad diseminada progresiva (6).

Su agente etiológico crece principalmente en áreas contaminadas por los excrementos de murciélagos y pájaros; por lo que excursionistas, agricultores, jardineros, exploradores de cuevas, restauradores de edificios históricos o abandonados y constructores se encuentran expuestos a esta micosis (5).

El diagnóstico micológico se basa en la observación y/o aislamiento del agente causal de material clínico. No obstante, en estos procedimientos es muy difícil de obtener un buen aislamiento, además que se requiere de mucho tiempo (3 semanas ó más), por lo que es necesario contar con pruebas serológicas, para que orienten a un diagnóstico rápido (7).

En Guatemala, actualmente en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, se ha logrado producir antígenos fúngicos a partir de cepas aisladas de pacientes guatemaltecos, ya que al obtenerse localmente estos antígenos detectan mejor los anticuerpos circulantes en los pacientes que sufren de estas micosis profundas en un área geográfica específica, estableciendo así dos pruebas serológicas cualitativas, la Inmunodifusión (ID) y la Precipitación en Tubo (PT) (7).

Sin embargo, para el diagnóstico, es importante contar con una prueba cuantitativa, que proporcione una mayor orientación en el diagnóstico del paciente. Por lo que en el presente trabajo, se considero la purificación de antígenos crudos de *H. capsulatum* producidos localmente para ser usados en la prueba de ELISA, que es una prueba cuantitativa con mayor sensibilidad y el menor grado de reacciones cruzadas, para el diagnóstico de la histoplasmosis.

En el presente trabajo se realizó la prueba de ELISA usando el antígeno purificado de *H. capsulatum* a cuatro grupos constituidos por muestras de pacientes con serología positiva para histoplasmosis y coccidioidomicosis, pacientes con infecciones pulmonares diferentes a las micosis profundas, pacientes con cultivo positivo para histoplasmosis y un grupo control con personas aparentemente sanas, cuyos resultados se compararon con la prueba de inmunodifusión, para determinar la efectividad de los antígenos purificados. La concordancia de la pruebas se evaluó con una prueba de Kappa.

III ANTECEDENTES

A. Histoplasmosis

1. Definición

La histoplasmosis es una infección micótica intracelular del sistema reticuloendotelial causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, que existe como moho en el suelo y como levadura en los tejidos del hospedero (8).

Esta enfermedad también es conocida como **enfermedad de Darling, citomicosis reticuloendotelial, enfermedad de las cuevas y enfermedad del Valle de Ohio** (6).

La infección se inicia después de la inhalación de conidios del microorganismo, lo cual resulta en una gran variedad de manifestaciones clínicas. Aproximadamente el 95% de los casos son asintomáticos, subclínicos o benignos por completo. Sólo el 5% de los casos presenta una enfermedad pulmonar crónica progresiva ó una enfermedad aguda fulminante (8).

El agente etiológico se ha encontrado prácticamente en todas las áreas habitadas de la tierra en las que se ha buscado (9). Se le encuentra circunscrito a cavernas, túneles y casas abandonadas, donde existe guano de murciélago o excretas de aves que contienen los micronutrientes utilizados para su desarrollo (3). La manipulación del material contaminado hacen que las pequeñas esporas de *H. capsulatum* se hagan volátiles o aerolice. Una vez volátiles, las esporas pueden ser fácilmente transportadas por corrientes de viento a grandes distancias, por lo que es probable que el viento sea el agente de diseminación más importante (5).

El hongo es un ascomyceto heterotálico, cuyo estado teleomorfo es *Ajellomyces capsulatus*, el cual se clasifica dentro de la familia *Arthrodermataceae*, orden Onygenales de los Ascomycotina (9).

2. Historia

Al parecer, en la actualidad la histoplasmosis es una de las enfermedades infecciosas más comunes del mundo. No obstante, son muchos los aspectos de esta enfermedad y de su agente que aún continúan siendo un enigma (9).

En 1905, el patólogo recién nombrado del Hospital Ancon, en la Zona del Canal, Samuel Taylor Darling, practicó la necropsia a un paciente negro de la Martinica. El paciente había muerto de una infección agobiante con grandes lesiones que se asemejaban a tuberculosis. Sin embargo, en el examen microscópico de las lesiones, se encontraron cuerpos redondos intracelulares. Darling creyó que los microorganismos que encontró en su paciente eran protozoarios, debido a su tamaño y sus características de coloración. Los encontró en histiocitos que se asemejaban a plasmidios y parecían tener cápsula, por lo cual inventó el nombre de *Histoplasma capsulatum* para denominarlos (9,10).

En 1944, Amos Christie se encontraba confuso con las calcificaciones de los pulmones en personas con prueba de tuberculina negativa; comenzó a hacer pruebas cutáneas con un extracto de la fase micélica del hongo, una **histoplasmina**.

Ahora, el mundo entero ha tomado conciencia de la enfermedad y la histoplasmosis se ha hecho famosa (9,10).

3. Estudios realizados en Guatemala

Los primeros estudios realizados en Guatemala utilizando la prueba intradérmica con histoplasmina (prueba de hipersensibilidad tardía), fueron los de Castañeda y Fonseca en 1949 (11) y posteriormente los de Bonnatti en 1973, todos tendientes a establecer la zona endémica de esta enfermedad en nuestro país (12). A través de ellos se pudo determinar una alta reactividad cutánea a la histoplasmina en Quiriguá, Escuintla, Tiquisate, Amatitlán, Mazatenango, Antigua Guatemala, Izabal Jalapa, Jutiapa y Alta Verapaz (en orden descendente) (2,11).

El aislamiento del hongo del ambiente ha sido posible en varias oportunidades: en 1972 en un siguán de Senahú, Alta Verapaz por Mayorga y Camey (11); el segundo en un arriate del parque central de la ciudad de Escuintla por Fratti en 1976 (13); Izaguirre lo aisló de las Cuevas de Lanquín en 1983 (14).

En 1987 Leytán, produjo el antígeno de *H. capsulatum* y lo evaluó por medio de la prueba de Inmunodifusión, para contar con un diagnóstico para esta micosis (15); luego en 1989, García, Logemann y Vásquez, realizaron la estandarización y producción de antígenos y antisueros para el diagnóstico de micosis profundas en el laboratorio de Micología de la Facultad de CC.QQ y Farmacia (1). En 1994, Illescas, ampliando la implementación de nuevas pruebas para el diagnóstico de la histoplasmosis, realizó la prueba de Fijación de Complemento, la cual no fue posible de implementar, debido a lo difícil de su manejo y sobre todo que es muy engorrosa (2).

4. Etiología

Habitualmente se considera que el *H. capsulatum* es un moho de crecimiento lento a temperatura ambiente, requiriendo 2 a 4 semanas para que aparezcan las colonias; sin embargo, ocasionalmente puede verse crecimiento en menos de 1 semana si hay una gran concentración de microorganismos en la muestra (16). En agar Sabouraud incubado a temperatura ambiente, se desarrolla colonias algodonosas de color blanco o bronceado con grandes conidios esféricos de pared gruesa de 8 a 14 μm ., que por lo general tienen proyecciones semejantes a dedos (conidios tuberculosos) o microconidios de 2 a 4 μm . ó ambos (17). Puede haber variaciones en el aspecto de los cultivos, según la cepa, el medio usado para el cultivo y las condiciones ambientales durante la incubación (16).

Microscópicamente, la forma de moho presenta delicadas hifas tabicadas de 1-2 μm . de diámetro. Más comúnmente, se ven grandes macroconidias esféricas o piriformes de 8-14 μm . de diámetro, inicialmente con una pared externa lisa (16).

Con una incubación prolongada, las macroconidias se vuelven rugosas o tuberculadas, produciéndose la clásica forma diagnóstica. En cultivos primarios, las macroconidias pueden alinearse en cadenas (16).

La conversión a la forma de levadura puede ser difícil y puede requerir varios pasajes con intervalos de 3 días (16).

5. Epidemiología

El agente etiológico de la histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, crece en suelos con un alto contenido de nitrógeno, sobre todo en áreas contaminadas por los excrementos de murciélagos y pájaros (especialmente pollos) (5), por ejemplo, las pértigas de los gallineros de estornino y de mirlos, en cuevas (18) y áreas concurridas como parques e incluso patios de colegio (6). Las aves no están infectadas ni son portadoras del hongo; su excremento simplemente proporciona condiciones óptimas de cultivo para crecimiento, aunque los murciélagos sufren la infección natural(17).

Se han descrito múltiples epidemias de histoplasmosis respiratoria en medios que albergan el hongo, como consecuencia de actividades como la exploración de cuevas (espeleología), la demolición de edificios antiguos para renovar el aspecto urbano, la limpieza de gallineros y la instalación de campamentos (5).

La histoplasmosis está ampliamente distribuida en las zonas templadas, tropicales y subtropicales del mundo (3). Es una de las micosis profundas más común en el norte, centro y sur de América. Entre ellas, existen regiones hiperendémicas como las regiones de Ohio y del valle de Mississippi en Estados Unidos (18,19). No obstante, existen sitios dispersos, a menudo aislados con elevado predominio de la enfermedad en todas partes del mundo. Estos incluyen el sur de México, el norte de Panamá, Honduras, Nicaragua, Venezuela y en Guatemala se han encontrado en la ciudad capital, Alta Verapaz, Escuintla, Mazatenango é Izabal (9,11,20).

También se han descrito casos de histoplasmosis en los países de Africa, Australia y partes del oriente de Asia, en particular India y Malasia (8).

6. Manifestaciones Clínicas

La gran mayoría de las personas infectadas son asintomáticas (no tienen efectos aparentes de enfermedad) o presentan síntomas tan leves que no requieren atención médica (5).

Se estima que cuando al menos el 95% de todos los casos primarios de histoplasmosis no son atribuibles a una sintomatología específica. Se pueden apreciar

calcificaciones múltiples en pulmones de pacientes que viven en áreas endémicas y esos pacientes no presentan una historia con síntomas apreciables (21).

La histoplasmosis afecta principalmente los pulmones. Al parecer, las esporas al ser inhaladas se convierten dentro de los macrófagos alveolares, en la fase parasitaria del hongo, o sea, las levaduras, reproduciéndose en el interior de los fagocitos del hospedero y permitiendo el establecimiento de la infección (3).

Si aparecen los síntomas, es generalmente en el plazo de 5 a 18 días después de la exposición, con un promedio de 10 días (18). Los signos y síntomas de compromiso pulmonar, habitualmente están ausentes incluso en pacientes que más tarde muestran áreas de calcificación en la radiografía de tórax (22). Las infecciones sintomáticas pueden presentar las características de una influenza leve, con una combinación de síntomas que incluyen decaimiento, fiebre, dolor de pecho, tos seca o no productiva, dolor de cabeza, pérdida de apetito, disnea, dolores musculares y de articulaciones, escalofríos y ronquera; con frecuencia duran de uno a cuatro días (5,23). Las infecciones moderadas, toman un aspecto de neumonía atípica con fiebre, tos y dolor torácico ligero de 5 a 15 días de duración (22); y la forma grave se presenta con lesiones cavitarias o tumorales encapsuladas (3).

a. Formas clínicas de histoplasmosis

- **Histoplasmosis pulmonar aguda:** es causada por una inoculación fuerte de *H. capsulatum*, en un hospedero sano. Esta forma ocurre con frecuencia en epidemias, resultando en fiebre, postración, hipoxia e infiltraciones pulmonares (24).

Esta infección puede durar de una semana a seis meses, pero casi nunca es mortal; sin embargo dependiendo de las condiciones del paciente y la evolución de la infección podría llegar a ser mortal (22).

- **Histoplasmosis pulmonar crónica:** Esta es una infección oportunista que se desarrolla en personas con un defecto estructural en el pulmón (enfisema) (24).

Es muy frecuente en los pacientes de edad avanzada con una afección pulmonar obstructiva crónica (25); el *H. capsulatum* escapa a los mecanismos de defensa habituales, como consecuencia de los defectos estructurales del pulmón y determina

lesiones progresiva y destructivas similares a la tuberculosis (6,26), y que puede empeorar a través de los meses o años (5). Clínicamente, la histoplasmosis crónica parece limitarse de modo principal a los pulmones, aunque puede afectar cualquier órgano en la etapa terminal (22).

- **Histoplasmosis diseminada:** esta es la forma más severa y rara, que involucra la invasión del hongo a otros órganos fuera de los pulmones, como los son bazo, hígado, los nódulos linfáticos, la médula ósea o el cerebro (5,18). Esta es una infección oportunista que se desarrolla en los individuos que tienen en cierta medida un defecto en la inmunidad celular, con frecuencia no definido (27). Entre el grupo de mayor riesgo son las personas que padecen de SIDA o cáncer y las personas que están recibiendo quimioterapia, terapia con altas dosis de esteroides por tiempo prolongado o terapia con otras drogas inmunosupresoras (5). La histoplasmosis diseminada es una enfermedad del sistema fagocitario mononuclear y la gravedad de las manifestaciones de esta enfermedad depende del grado en que los macrófagos permitan la parasitación (28).

1) Histoplasmosis diseminada en niños: esta es la forma de histoplasmosis diseminada de desarrollo más rápido y con frecuencia mortal. Los macrófagos se encuentran en un número mayor del normal y son aglomerados con células de levadura (6).

Los pacientes se encuentran comprendidos entre 1 - 14 años, aunque la mayoría son lactantes de menos de un año.

Suelen presentar un síndrome subagudo febril por 4 meses acompañado por anorexia, pérdida de peso, hepatomegalia, o/y esplenomegalia. En los pulmones se presentan infiltraciones nodulares. El curso total termina por causar la muerte en 2 a 10 semanas, si no se administra el tratamiento (29).

2) Histoplasmosis diseminada progresiva en pacientes con SIDA: incidencia de histoplasmosis entre los pacientes VIH positivos varía de una región a otra en dependencia de la endemidad de cada región (30).

Por ejemplo, en Indianapolis se reporta que hasta el 30% de los infectados por el VIH padecen esta micosis, mientras que en Dallas, Texas, sólo se reporta entre 4 y 5%, y en Cuba se presenta en el 4.2% (31).

La histoplasmosis diseminada progresiva en estos pacientes suele presentarse como el resultado de una infección primaria o de una reactivación de una infección anterior. Los signos y síntomas más comunes son la fiebre, hepatomegalia, pérdida de peso, anorexia, y anemia (30).

No es sorprendente que el factor predisponente para el desarrollo de la histoplasmosis diseminada progresiva en estos pacientes, se deba a la destrucción profunda de los mecanismos de inmunidad celular, que se crea con la infección de VIH (32).

La forma de presentación de la histoplasmosis diseminada progresiva en estos pacientes no es específica y es semejante a muchas otras infecciones oportunistas que se presentan como complicación de la infección por VIH.

La asociación entre la histoplasmosis y el SIDA seguramente irá en aumento, particularmente en las zonas donde la histoplasmosis es endémica (30).

3) Histoplasmosis cutánea primaria: se inicia como consecuencia de un traumatismo y presencia de lesión en el sitio de inoculación (22).

Esta enfermedad es muy rara, pero es una entidad de la que se informa de manera periódica. lo regular es el resultado de la inyección inadvertida de material contaminado como puede suceder en un accidente de laboratorio o durante una necropsia. Las lesiones involucionan y se alivian de manera espontánea después de muy pocos meses (9).

De vez en cuando las personas que tiene una infección primaria contraen una urticaria distintiva. Las urticarias más comunes son la eritema multiforme (manchas rojas que se pueden poner claras en el centro después de varios días y que empiezan en las piernas y los brazos y se extienden al centro del cuerpo) y la eritema nodosum (protuberancias o chinchones rojos, levemente molestos, generalmente sobre las espinillas y/o sobre los antebrazos) (18).

7. Respuesta Inmune

La elevada resistencia natural a la infección por *H. capsulatum*, se comprueba por el hecho de que la gran mayoría de las personas infectadas, sólo hay pocas que presentan algunos síntomas y la enfermedad se resuelve pronto (9).

a. Resistencia natural

En la respuesta inmune natural se observa que los polimorfonucleares tienen una actividad lítica por medio de su metabolismo oxidativo, donde las levaduras de *H. capsulatum* son eliminadas in vitro por una combinación de H_2O_2 , yodo y hierro ferroso, o por H_2O_2 , yodo y peroxidasa; además la acción de los polimorfonucleares sobre *H. capsulatum* está mediada por un mecanismo no-oxidativo. Diferentes estudios han demostrado que los principales componentes de los neutrófilos que participan en la actividad antimicrobiana por la vía no-oxidativa son las hidrolasas lisosomales y los péptidos catiónicos, que residen en los gránulos azurófilos, siendo los péptidos catiónicos los componentes de los neutrófilos conocidos como defensinas. La infección intracelular de *H. capsulatum* también puede ser detenida por los fagocitos mononucleares, a través de la eliminación del parásito de su medio ambiente interno (33).

b. Resistencia adquirida

• Inmunidad Humoral

Las concentraciones de las principales clases de inmunoglobulinas en el suero han sido cuantitativas en pacientes con varias manifestaciones de histoplasmosis(34).

En general, la IgM se eleva en la histoplasmosis temprana, aguda o regresiva y retorna relativamente a sus valores normales en la crónica. Los niveles de IgG en el suero se encuentran elevados en pacientes con histoplasmosis activa, aunque en investigaciones recientes, los niveles de IgG de los pacientes son comparables a algunas personas sanas. La IgA en el suero también se eleva en la histoplasmosis, particularmente en pacientes con histoplasmosis pulmonar

crónica. En un estudio, se reporta que la IgE se incrementa en la histoplasmosis activa, pero en otro estudio las concentraciones de IgE están en la mayor parte con rango de concentraciones de personas normales (34).

Los anticuerpos con mayor especificidad contra el hongo causal de la histoplasmosis son los de tipo IgM, IgG e IgA (34).

- **Inmunidad Celular**

En la inmunidad celular las infecciones por *H. capsulatum* tiene una gran actividad estimulando la proliferación masiva de linfocitos T, sus linfoquinas y los factores de activación e inhibición de macrófagos (MAF y MIF, respectivamente) (34).

La respuesta fuerte de la supresión de los linfocitos T en *H. capsulatum* está marcada en la enfermedad progresiva y diseminada. Además la acción de los linfocitos en la inmunidad celular es poder activar los macrófagos para inhibir el crecimiento intracelular de *H. capsulatum* (34).

La función de los macrófagos es participar en la inmunidad celular en el hospedero como defensa contra el hongo. Ellos inicialmente sirven como una protección en el ambiente del patógeno *H. capsulatum* en su forma primaria y su diseminación al pulmón a otros órganos. En la inducción de la inmunidad mediada por células, la actividad citosina de los macrófagos destruyen las levaduras y así salen del hospedero (35).

Se establece que la función eficaz de los linfocitos T, en la inmunidad celular es crucial para la defensa del hospedero en la histoplasmosis (34).

El mecanismo preciso del efecto de las células T en la resistencia del hospedero in vivo para *H. capsulatum* aún se desconoce. Sin embargo la activación inmunológica de los macrófagos por la inmunidad de los linfocitos T puede proveer un giro en los eventos de la inmunidad adquirida para este hongo (34).

Se han realizado estudios para determinar la naturaleza de la participación en la respuesta de la inmunidad celular del antígeno H de *H. capsulatum*, que es uno de los principales antígenos de este hongo, determinando que la inoculación con el antígeno H no protege contra la introducción subletal o letal de las levaduras.

Así el antígeno H estimula una respuesta en la inmunidad celular pero no induce una protección contra *H. capsulatum* (36).

8. Diagnóstico

Se basa en la historia clínica del paciente, sobre todo es muy importante establecer si ha visitado áreas endémicas o lugares que se encuentran contaminados por los excrementos de murciélagos o pájaros y el análisis de laboratorio.

a. Tipos de muestras

Espujo, lavados bronquiales, líquido cefalorraquídeo, sangre, médula ósea, orina, biopsias de tejidos afectados y raspados en lesiones cutáneas (8).

b. Examen microscópico

Es difícil descubrir en forma directa al microorganismo en el espujo. El procedimiento con KOH es negativo en la histoplasmosis (9).

Uno de los métodos más sencillos es la observación de las células levaduriformes en coloraciones preparadas en extensiones de sangre periférica (30).

En biopsias de tejido o aspirados de médula ósea, es posible ver al microscopio, células de levadura ovals dentro de macrófagos (37).

La observación microscópica de las biopsias de las lesiones de piel pueden ser igualmente de utilidad; sin embargo, se considera que la sensibilidad de las coloraciones comunes para el diagnóstico de histoplasmosis diseminada es aproximadamente del 43% (30).

Las coloraciones preferidas son las de PAS, metenamina de plata de Gomori, Gram (8,30) y Giemsa o Wright, siendo la de Giemsa superior (9).

c. Cultivo

Las muestras se cultivan a 37°C en agar sangre glucosa-cisteína, agar Sabouraud a temperatura ambiente (17), en agar Sabouraud con antibióticos y agar Sabouraud más cloranfenicol a 25°C (11). Los cultivos deben incubarse durante tres semanas o más (17).

Las muestras clínicas también pueden ser inoculadas en agar Dextrosa Sabouraud y agar infusión cerebro corazón suplementado con 5 % de sangre de carnero (8).

El cultivo en la histoplasmosis diseminada puede llegar a tener una sensibilidad del 92% (30).

El cultivo de *H. capsulatum* es un proceso extremadamente lento en pacientes con una alta carga parasitaria, tal como ocurre en la mayoría de pacientes con SIDA, en los cuales los resultados pueden estar disponibles en 2 semanas; en otros el hongo puede demorar hasta 6 semanas para crecer (30).

Los cultivos de esputo son útiles para el diagnóstico de la histoplasmosis pulmonar crónica, aunque suelen ser negativos en los casos de enfermedad aguda y autolimitada (6).

Los cultivos de sangre o médula ósea en pacientes con alteraciones inmunológicas y la enfermedad diseminada dan resultados positivos en más del 75% de los casos (6).

El medio de Smith y Goodman, es recomendado como el mejor para asilar el microorganismo empleando material demasiado contaminado o esputo que contiene numerosas células de levadura de *Candida albicans* (9).

Otro material patológico, como las muestras de biopsia, punciones esternas, arpirados, etc., también se pueden cultivarse en agar-sangre o agar Sabouraud, deben conservarse alrededor de seis a doce semanas (6,9).

d. Serología

Los procedimientos serológicos son de suma importancia en la identificación de *H. capsulatum* (38), ya que evidencia la naturaleza micótica del proceso infeccioso.

1) Prueba cutánea

La exposición pasada o presente al hongo por lo regular confiere reactividad a largo plazo a la prueba cutánea con histoplasmina.

Esta prueba carece de utilidad diagnóstica y puede resultar confusa en algunos casos, debido a las propiedades inmunogénicas de la histoplasmina. Como consecuencia de las pruebas cutáneas con este reactivo (respuesta anamnésica), los títulos serológicos se elevan en un porcentaje significativo de la población hipersensible (6,9).

Por lo general, la prueba cutánea se hace positiva dentro de las dos semanas siguientes a la exposición y persiste así durante largos períodos de tiempo. Sin una nueva exposición al hongo, se considera que su sensibilidad se desvanece en la mayoría de los pacientes en diez años o más. Las personas expuestas de manera continua a los microconidios o las que los albergan en forma latente, pero aún viables, mantienen reactividad (39).

2) Precipitación en tubo (PT)

La prueba de Precipitación en Tubo, es una prueba cualitativa, que se efectúa en una serie de tubos, con diferentes concentraciones de anticuerpos específicos, a los cuales se les añade una cantidad constante de antígeno (40). Es una prueba sencilla, sensible, específica (7) y que es positiva en una fase temprana de la enfermedad, alrededor de 2-5 semanas después de la infección, e indica la presencia de anticuerpos de tipo IgM, pero al cabo de unos meses la prueba ya no persiste positiva, por tal razón no posee un valor pronóstico (2).

3) Aglutinación en Látex (AL)

La Aglutinación en Látex detecta anticuerpos de tipo IgM y es positiva alrededor de 2 a 3 semanas después de una infección primaria (34). En general, es una prueba mucho menos confiable que la de Fijación de complemento (FC). En pacientes con histoplasmosis crónica los sueros pueden ser negativos. Se consideran positivos los títulos de $\geq 1:16$ y constituyen una firme evidencia de infección aguda o reciente. Las reacciones cutáneas antes de efectuar la prueba pueden elevar considerablemente el título.

Las reacciones de Aglutinación en Látex positivas deben ser confirmadas por medio del título de la prueba de Fijación de Complemento. Pueden producirse reacciones cruzadas con otras micosis (41).

4) Inmunodifusión (ID)

La Inmunodifusión (ID) es una prueba útil en la detección de anticuerpos para el diagnóstico de histoplasmosis especialmente en pacientes inmunocompetentes (8).

Se vuelve positiva a la tercera o cuarta semana después de la infección. Para esta prueba los sueros de pacientes con histoplasmosis comprobada presentan una o dos bandas

Las reacciones falsos-positivos en esta prueba se dan en pacientes con otras enfermedades micóticas, personas que recientemente se han hecho la prueba cutánea con histoplasmina y personas con enfermedades no micóticas (34).

La prueba de Fijación de Complemento es la más usada a menudo para la detección de anticuerpos de *H. capsulatum* (44).

6) Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA)

Para muchos pacientes, la detección de la respuesta de anticuerpos por las pruebas de Inmunodifusión o Fijación de Complemento su uso es limitado (45), ya que en muchos pacientes puedan dar resultados falsos-negativos, como en pacientes que quedan títulos de anticuerpos elevados durante meses o incluso años después de una exitosa terapia y en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales los títulos de anticuerpos pueden estar bajos o ausentes (19).

La prueba de ELISA se ha comprobado que es método específico y provee un gran significado en las pruebas de diagnóstico para la histoplasmosis y que permite seguir la evolución clínica del paciente durante la terapia (30). Esta prueba ha permitido duplicar la sensibilidad de las pruebas serológicas clásicas, principalmente en los enfermos con histoplasmosis asociada al SIDA, presentando una sensibilidad arriba del 71% (46) y se ha comparado con el Radioinmunoensayo (RIA), que es método que posee una sensibilidad aproximada del 90%, pero esta prueba requiere de un equipo sofisticado, además del uso de radioisótopos por lo que su disponibilidad es reducida en muchos laboratorios (47).

La prueba de ELISA es una prueba que presenta una sensibilidad similar al RIA, que no requiere de un equipo sofisticado y que resulta accesible en la mayoría de laboratorios, por lo que constituye un análisis selectivo y sensible para detectar anticuerpos de *H. capsulatum* (47). Además la prueba de ELISA posee una sensibilidad del 97% y una especificidad de 84% para detectar anticuerpos tipo IgG (48).

9. Tratamiento

En forma esencial todos los casos de histoplasmosis, cuando el paciente no tiene alguna enfermedad principal, o cuando el inóculo es insuficiente, la enfermedad se resuelve sin incidentes notables (5). Incluso en infecciones primarias moderadamente graves, el

reposo en cama y las medidas de sostén son suficientes para obtener la resolución de la enfermedad (9), pero en la histoplasmosis diseminada es fatal si no se recibe tratamiento, incluso cuando se recibe (5).

La anfotericina B en dosis total baja (150 a 500 mg) ha proporcionado excelentes resultados en la afección pulmonar aguda (19), también se puede obtener una respuesta favorable con itraconazol por 6 semanas (49). Para la enfermedad diseminada en niños, se recomienda dosis inferiores de 7.2 mg/Kg./día de itraconazol, durante un período de 3 a 12 meses, según la respuesta del paciente (29). El itraconazol es seguro y efectivo en la terapia de histoplasmosis diseminada no tan severa en pacientes con SIDA, ofreciendo una alternativa en lugar de la anfotericina B en muchos casos. Pacientes con una severidad moderada o una histoplasmosis severa podría ser primero tratado con anfotericina B y puede cambiarse por itraconazol después de haber alcanzado un progreso clínico (50). El Ketoconazol, es considerado como agente alternativo para el tratamiento de pacientes con histoplasmosis leve o moderada (51).

En la histoplasmosis crónica se puede utilizar la anfotericina B y el Ketoconazol, sin embargo las recaídas ocurren entre un período de 1 a 18 meses después de la suspensión del tratamiento (25).

10. Pronóstico

Excepto en ataques localizados con inhalación de gran número de esporas, la histoplasmosis primaria aguda es casi siempre un proceso benigno del cual el paciente se recupera rápidamente; sin necesidad de la administración terapéutica. La infección progresiva diseminada es fatal en un 80 a 90% de los casos (5).

11. Prevención

La mejor forma de prevenir la exposición a las esporas de *H. capsulatum* es evitar aquellas situaciones donde materiales contaminados puedan hacerse volátiles y las esporas puedan ser subsecuentemente inhaladas. Esto es especialmente importante para aquellas personas con depresión del sistema inmune (5).

Los desinfectantes han sido usados ocasionalmente para tratar el suelo y la acumulación de guano de murciélago o pájaros, cuando la remoción ha sido imposible, o como una precaución antes de iniciar el proceso de remoción (5).

Las soluciones de formaldehído son los únicos desinfectantes que han probado ser efectivos para descontaminar suelos que contienen *H. capsulatum*. Dado que las consecuencias para la salud de la exposición pueden ser potencialmente graves, este químico debe ser manejado solamente por personas que saben como aplicarlo en forma segura (5).

Algunos expertos recomiendan que las personas que viven en las regiones donde la histoplasmosis es común que tomen itraconazol como prevención, en caso de estar infectados con el VIH o teniendo un recuento bajo de las células T (18).

B. Antígenos de *Histoplasma capsulatum*

1. Antígeno

Los antígenos fúngicos tienen buena reactividad y especificidad siendo esenciales para el inmunodiagnóstico de las micosis sistémicas (52).

Desde hace varias décadas, se ha estado trabajando en la búsqueda de los antígenos de *H. capsulatum* dirigiéndose a la adquisición de preparaciones capaces de detectar el espectro completo de respuestas inmunes que produce. Se ha observado que este antígeno, puede presentar reacciones cruzadas con otros antígenos de hongos patógenos, en determinadas pruebas serológicas. También se ha visto que las variaciones antigénicas pueden resultar de las diferentes condiciones de cultivo (15).

Los antígenos usados para las pruebas serológicas, son filtrados de cultivo, los cuales incluyen productos de degradación de las células metabolizadas o componentes hidrolíticos de las células mismas; otro tipo de antígeno usado consiste de células intactas o purificadas (paredes celulares) (15).

2. Antígeno Crudo

La histoplasmina es un antígeno obtenido del filtrado de un caldo nutritivo donde se desarrolla *H. capsulatum*; siendo por lo tanto un antígeno metabólico (53).

Los problemas del uso de los filtrados son la irregularidad de la potencia antigénica producida y por lo tanto las reacciones cruzadas con otras infecciones fúngicas, por ello es importante purificar el antígeno (53).

Los antígenos crudos tienen buena reactividad en pruebas de menor sensibilidad como la Contraelectroforesis, , Inmunodifusión y en pruebas cutáneas; además por reaccionar en pruebas de fácil manejo y rápida detección, estos antígenos son ideales para estudios de tipo general y epidemiológicos (52).

3. Antígeno Purificado

La estructura antigénica de *H. capsulatum* ha sido ampliamente estudiada. De los trabajos publicados hasta la fecha quizás el único que presenta un antígeno con buen grado de especificidad para *H. capsulatum*, es el de Heiner, quien aisló de la histoplasmina bruta dos fracciones antigénicas específicas denominadas antígeno H y el antígeno M, que son una mezcla de proteínas y carbohidratos, siendo la fracción proteica la parte más importante para estos antígenos (44).

Aunque, estos antígenos son relativamente específicos, se hallan sujetos a una serie de variaciones que hasta el momento no ha sido posible controlar.

En estudios posteriores se ha establecido que las fracciones antigénicas de *H. capsulatum*, por hallarse parcialmente purificadas, contienen proporciones variables de proteínas, polisacáridos y que el componente celular con mayor característica antigénica en estos y otros microorganismos es la pared celular, constituida principalmente por polisacáridos y glicoproteínas (54).

La purificación de los antígenos es un proceso que sirve para establecer con más precisión el diagnóstico de las micosis profundas y se basa en una técnica de precipitación y digestión de proteínas, en la cual se busca eliminar el mayor número de proteínas no específicas o contaminantes, para que finalmente, queden solo las proteínas que están unidas a los polisacáridos, que se consideran las más específicas para cada antígeno (52).

Así Taylor et al, en un estudio sobre *H. capsulatum* aislaron un complejo polisacárido proteína (CPP), compuesto principalmente de glucosa (54%), manosa (43.2%) y galactosa (2.8%), que demostró una buena especificidad en Inmunodifusión en Gel, observando que por la acción de la enzima β -glucosidasa hubo pérdida de la actividad del

antígeno cuando se uso en la prueba de Inmunodifusión, en tanto que con calor y una enzima proteolítica pronasa, no se alteró la actividad del mismo (42).

Los antígenos purificados presenta buena reactividad en las pruebas de inmunodiagnóstico, teniendo un menor grado de reacciones cruzadas, especialmente en métodos de alta sensibilidad como la prueba de ELISA, por lo que se consideran útiles para pruebas de pronóstico y diagnóstico (52,55).

C. Análisis Inmunoenzimático

La especificidad de los anticuerpos es tal que el factor limitante en la mayor parte de las reacciones inmunológicas explicadas hasta ahora no es la especificidad, sino la sensibilidad. Debido a su exquisita sensibilidad el Análisis Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) es una de las técnicas inmunológicas usadas con mayor amplitud. Este método emplea enzimas, como ligandos para las moléculas de los anticuerpos (56).

Actualmente la palabra ELISA podría definirse como un ensayo específico, conjugado con enzimas, o simplemente podría denominarse Análisis Inmunoenzimático (EIA).

Este Análisis Inmunoenzimático es un procedimiento específico y sensible hasta nanogramos. La sensibilidad del sistema se puede aumentar hasta picogramos, utilizando cofactores para las enzimas, sustratos fluorescentes o luminiscentes (40).

La unión covalente de enzimas a las moléculas de anticuerpos produce una herramienta inmunológica que posee alta especificidad y alta sensibilidad. La técnica de ELISA, utiliza los anticuerpos a los que se han enlazado covalentemente las enzimas, de modo que quedan sin alteración las propiedades catalíticas de la enzima y la especificidad del anticuerpo. Las enzimas enlazadas, típicamente, incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina y galactosidasa, todas las cuales catalizan reacciones cuyos productos son de color y se pueden determinar en cantidades muy pequeñas (40,56).

Entre los criterios más importantes para escoger una enzima están: pureza, gran actividad específica, estabilidad y ausencia habitual en los fluidos biológicos en estudio (40).

Se han desarrollado dos metodologías básicas de ELISA, una para la detección de antígenos (ELISA directo) y la otra para anticuerpos (ELISA indirecto).

En el método de ELISA directo, el antígeno queda atrapado entre dos capas de anticuerpos, si el antígeno (partículas virales) está presente en la muestra, quedará atrapado por los sitios de fijación del antígeno sobre el anticuerpo (56).

En el sistema de Análisis Inmunoenzimático Indirecto, los antígenos pueden estar absorbidos en perlas, tubos o microplacas de fondo plano, de poliestireno o polivinilo (los cuales están disponibles comercialmente). El procedimiento se basa en interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y el plástico; se ha considerado que la máxima cantidad de proteínas que se une en un pozo de una microplaca, es de 1 ug y de 4-5 ug a tubos de poliestireno de 12 x 75 nm. Un exceso de estas proteínas puede provocar su desprendimiento con los lavados y puede disminuir la sensibilidad.

Para recubrir superficies de plástico, las proteínas solubles se disuelven en un amortiguador alcalino. La utilización de detergentes no iónicos, como el Tween 20 y Triton X-100, o proteínas no relacionadas, como gelatina o albúmina sérica bovina, disminuyen las interacciones inespecíficas (40).

En la primera parte del procedimiento la muestra problema (suero) se incuba con el antígeno inmovilizado a una fase sólida, los anticuerpos no dirigidos al antígeno en cuestión son removidos con lavados de soluciones amortiguadoras; posteriormente se adicionan anticuerpos dirigidos contra inmunoglobulinas humanas y conjugadas a enzima, finalmente se adiciona el sustrato y la intensidad de color será directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el antígeno presente en la muestra problema (56).

Actualmente se lleva a cabo la conjugación de enzimas con anticuerpos, por medio de anticuerpos policlonales, pero en el futuro se utilizarán anticuerpos monoclonales (40).

IV. JUSTIFICACION

Es posible, que la baja frecuencia de la histoplasmosis en Guatemala, se deba a un diagnóstico inadecuado, por no contar con métodos sensibles para su detección; por lo que en el Servicio de Micología de la Facultad de CC.QQ y Farmacia, se inició la producción sistemática de los antígenos fúngicos de cepas aisladas de pacientes guatemaltecos, obteniendo así un antígeno crudo la histoplasmina; con lo que se implementaron dos pruebas: la Inmunodifusión (ID) y la Precipitación en Tubo Capilar (PT), con lo que fue posible detectar más casos y establecer una situación más real de las micosis profundas en nuestro país. Estas pruebas han demostrado ser sensibles, específicas, fáciles de realizar y de bajo costo; sin embargo por ser pruebas cualitativas no permiten darle seguimiento a los pacientes. También se cuenta con la prueba de Fijación de Complemento (FC) pero esta presenta el inconveniente de la anticomplementaridad de los antisueros y sobre todo que es muy engorrosa, aunque el principal problema de estas pruebas son las reacciones cruzadas con las demás micosis.

Por lo que se considera importante contar con un criterio más que ayude en el diagnóstico y pronóstico de la histoplasmosis, lo que se lograría estableciendo la prueba de ELISA, utilizando antígenos purificados producidos localmente. También se cuenta con la ventaja que es una prueba cuantitativa y capaz de detectar títulos bajos de anticuerpos.

V. OBJETIVOS

A. General

Comprobar la reactividad del antígeno purificado de *Histoplasma capsulatum*, utilizando la prueba de ELISA.

B. Específicos

- Optimizar las condiciones de la purificación del antígeno crudo de *Histoplasma capsulatum*, en el Servicio de Micología.
- Purificar los antígenos de *Histoplasma. capsulatum* crudos producidos a partir de cepas guatemaltecas.
- Detectar la presencia de anticuerpos de anti-*Histoplasma capsulatum*, en diferentes grupos de muestras de pacientes, utilizando antígeno purificado y la prueba de ELISA.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de Trabajo

El universo de trabajo esta formado por los antígenos crudos de *H. capsulatum* producidos en el Servicio de Micología de la Facultad de CC.QQ y Farmacia, y por los pacientes con enfermedades pulmonares de diferentes instituciones hospitalarias(generales y privadas), que se presentan en el Servicio de Micología.

Los antígenos crudos son obtenidos de las cepas guatemaltecas *H. capsulatum* H.1.14.97 de origen humano obtenido de una biopsia de ganglio supraclavicular y las muestras están constituidas por los sueros de 62 pacientes con micosis profundas como histoplasmosis y coccidioidomicosis, con enfermedades pulmonares no micóticas como tuberculosis, y suero de 25 personas aparentemente sanas.

B. Recursos Humanos

Autora: Ana Graciela Cardona Almengor

Asesora: Licda. María Luisa García de López. Responsable del área de Inmunodiagnóstico del Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

C. Materiales

1. Reactivos

- Agar Sabouraud
- Medio de Smith
- Timerosal
- Fenol
- Glicerina
- Cloruro de Sodio

- Azida de Sodio
- Agua Desmineralizada
- Cloroformo
- Etanol
- Agarosa
- Sulfato de Cobre
- Hidróxido de Sodio
- Pronasa
- Albúmina
- Conjugado de Fosfatasa Alcalina Anti-IgG Humana
- Cloruro de Potasio
- Tartrato de Sodio y Potasio
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Butanol
- Tween 20
- P- nitrofenilfosfato
- H_2SO_4
- NaN_3
- Na_2CO_3
- KH_2PO_4
- $Na_2 HPO_4 \cdot 12H_2O$
- Glicina
- Acetona Anhidra
- $NaHCO_3$

2. **Equipo**

- Campana de Flujo Laminar
- Refrigeradora
- Congelador
- Centrífuga
- Centrífuga refrigerada

- Incubadora
- Potenciómetro
- Bomba de Vacío
- Estufa
- Balanza Analítica
- Autoclave
- Lector de ELISA
- Espectrofotómetro
- Pipeta automáticas
- Trípode
- Mechero
- Cámara de Quebec
- Lámpara de Luz
- Equipo de Ultrafiltración (UHP)

3. Cristalería

- Tubos de vidrio con tapón de rosca
- Matraces
- Vasos de precipitación
- Probetas
- Pipetas volumétricas
- Quitazatos
- Cajas de Petri
- Balones aforados
- Embudos
- Portaobjetos
- Tubos de Vidrio
- Embudos Buchner
- Ampollas de decantación o embudo de separación

4. Otros

- Asas
- Pipetas pasteur
- Jeringas
- Placas de micropozos para ELISA
- Incinerador
- Gradillas
- Mascarillas
- Guantes
- Batas
- Papel parafilm
- Papel Craft
- Papel Filtro No.1 y No.41
- Membranas de acetato de celulosa 0.22 y 0.45
- Membranas para diálisis
- Algodón
- Tubos de reacción o viales de 1.5 ml.
- Papel mayordomo
- Papel parafinado

5. Antigenos y Controles

- **Antígenos**

Obtenidos de cepas aisladas de pacientes guatemaltecos, diagnosticados en el Servicio de Micología de la Facultad de CC. QQ y Farmacia.

- *Histoplasma capsulatum* cepa H.1.14.97 (crudo).
- *Coccidioides immitis* cepa C.1.17.87 (crudo).

- **Controles positivos**

- Antisueros anti- *H. capsulatum* producidos en conejos conservados en el bioterio de la Facultad de CC. QQ y Farmacia.

D. Métodos

1. Hongos

El hongo utilizado en este estudio fue *Histoplasma capsulatum* cepa H.1.14.97, aislada de un paciente guatemalteco, del cual se produjo el antígeno crudo.

Las cepas fueron sembradas masivamente y conservadas en tubos con agar Sabouraud. Después de tres semanas de incubación a 25°C, se confirmó su morfología por observación microscópica, inoculando el hongo en matraces de 1000 ml conteniendo 250 ml de medio semi-sintético de Smith.

Luego de inoculado el hongo en medio de Smith se incubó durante 2 meses con agitación ocasional a temperatura ambiente y en oscuridad. Al cabo de este tiempo se confirmó su morfología característica comprobando que **no** hubiera ninguna contaminación y se inactivó agregando a los cultivos una solución de timerosal al 1% durante 2 semanas, agitándolo ocasionalmente para homogenizar el timerosal en el medio. Posteriormente se realizó una prueba de viabilidad del microorganismo, inoculando el contenido de cada matraz en el medio de Sabouraud, incubando a 25°C por 15 días, al cabo de los cuales, habiendo comprobado que ya no era viable, se procedió a obtener el antígeno crudo.

2. Obtención del Antígeno Crudo

Se separó la masa micelial por medio de filtración en papel filtro No.1; si se considera necesario se puede pasar en papel filtro No.41, para eliminar aún más las partículas que quedan sobrantes de la masa micelial; posteriormente se continuo con la filtración en membranas de acetato de celulosa de 0.45 y 0.22, utilizando un soporte de Millipore. Finalmente se ultrafiltró y dializó con el sistema UHP, usando membranas PM 10,000 concentrando a un volumen final de 10X (esto indica que el volumen final obtenido es reducido a la décima parte de su volumen inicial).

3. Inmunodifusión (ID)

Se basó en la técnica de Ouchterlony (57), modificado por Toriello et al.

a. Materiales y Reactivos

- **Solución Adhesiva:** se mezclaron 0.2 g. de agar, 1 ml. de glicerina y 200 ml. de agua destilada en un vaso de precipitación. Se calentó sin llegar a punto de ebullición, sumergiendo en la solución los portaobjetos previamente lavados y secos, unas dos veces (dos baños). Se secaron y guardaron (esta solución les dió un aspecto opaco, como suciedad a los portaobjetos).
- **Agarosa:** se mezclaron 7.5 g. de glicina, 0.9 g. de cloruro de sodio, 0.1 g. de azida de sodio, 1.0 g. de agarosa y 100 ml. de agua destilada en un matraz. Se calentó y disolvió la solución hasta que ebulló. NO se debe autoclavar. Se viertieron 4.5 ml. de la agarosa en un portaobjeto previamente impregnado con solución adhesiva. Si no se utiliza toda se puede alicuotar en tubos de vidrio con rosca, y se conservan en refrigeración.

b. Procedimiento

- Los portaobjetos con solución adhesiva se colocaron en una superficie plana y se les agregó 4.5 ml. del gel de agarosa licuado en baño de maría y se dejó solidificar a 4°C durante 12 - 24 horas o como mínimo 2 horas, en refrigeración.
- Se perforó la lámina con el gel de agarosa, siguiendo un patrón que contiene 7 pozos, en forma de roseta, en el pozo superior e inferior se colocaron los controles positivos, y en el centro se colocó el antígeno del hongo, quedando los pozos de los lados para las muestras.
- Se colocó un control negativo por roseta.
- Luego se colocaron en una cámara húmeda, a temperatura ambiente.
- Se realizó lecturas a las 24, 48 y 72 horas, con luz indirecta observando si había formación de bandas. (Ver anexo No.4)

4. Aislamiento del Complejo Polisacárido-Proteína (CPP)

El CPP de *Histoplasma capsulatum*, fue obtenido a partir del antígeno crudo de *H. capsulatum*, con potencia establecida por la prueba de Inmunodifusión, utilizando los controles positivos respectivos. Se basó en la técnica de Kirby (58), modificada por Taylor y Bojalil (53).

a. Materiales y Reactivos

- **Fenol líquido (licuado):** se licuó el fenol a 65°C en baño de maría, la cantidad aproximada a utilizar.
Luego se agregó un volumen aproximado de agua al fenol licuado, se agitó y se dejó que se separen las fases, conservando en refrigeración. Se agitó antes de usarlo.
- **Etanol al 95%:** se colocó en un recipiente 95 ml. de etanol puro con 5 ml. de agua destilada.
- **Acetona Anhidra:** se utilizó sulfato de sodio anhidro, con acetona. También se puede saturar la acetona con cloruro de calcio y antes de usarla filtrar en papel filtro No.1 estéril.

b. Procedimiento

- A 10 ml. de antígeno crudo de *H. capsulatum* se añadió 15 ml. de fenol líquido, incubando a 56°C por una hora con agitación ocasional en un tubo cónico estéril.
- Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 rpm. en una centrífuga refrigerada, durante 20 minutos (se observaron dos fases divididas por un anillo blanco).

- Se separó cuidadosamente la fase superior al anillo y se mezcló enseguida con 3 volúmenes de etanol al 96% y adicionando 2 gotas de acetato de sodio al 1% para acelerar la precipitación.
- La mezcla se dejó a 4°C durante 24 horas.
- Se centrifugó el tubo a 5000 rpm. durante 20 min. en una centrífuga refrigerada, descartando el sobrenadante y disolviéndolo con solución salina estéril con un volumen conocido (5 ml.) y 3 volúmenes de etanol al 96% (15 ml.). Se centrifugó por 20 min. a 5000 rpm. repitiendo el procedimiento 2 veces más.
- El precipitado final se disolvió en solución salina estéril y se agregó a una membrana de diálisis, que excluya moléculas menores de 10 KD. Se dializó con agua destilada estéril durante dos días a temperatura ambiente, cambiando el agua dos veces al día.
- Se pasó la solución de la membrana a un tubo cónico estéril y se centrifugó a 5000 rpm. por 20 min. Se separó el precipitado y se secó con acetona anhidra en volúmenes iguales; almacenando a -20°C hasta su utilización.
- Al finalizar este procedimiento se cuantificaron las proteínas, por el método de Lowry (59).

5. Determinación de Proteínas

Se basó en el método de Lowry y colaboradores (59).

a. Procedimiento

- Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N. (2 grs. Na_2CO_3 + 100 ml. agua destilada + 0.4 grs NaOH). **Solución A**

- CuSO_4 0.5 % (0.5 grs. CuSO_4 + 100 ml. agua destilada) se mezcló con volúmenes iguales de tartrato de sodio y potasio al 1% (1 gr. de tartrato de Na y K + 100 ml. agua destilada), se mezclaron antes de uso. **Solución B**
- 50 ml. de **Solución A** con 1 ml. de **Solución B** (500 ul. CuSO_4 0.5 % + 500 ul. tartrato de sodio y potasio al 1%), se preparó antes del uso. **Solución C**
- 1 ml. de Folin-Ciocalteu con 2 ml. de agua destilada dió una solución ácida 1 N.
- Se preparó una solución estándar de albúmina sérica bovina 1000 ug/ml. (10 mg. albúmina/10 ml. de agua destilada).
- Se realizaron lecturas a una longitud de onda de 750 nm .

b. Curva de Calibración.

Tubo	Solución Albúmina	H ₂ O	Solución C		Folin-Ciocalteu		Conc. Proteínas (ug/ml)
1	-	1.0ml.	1ml.		0.1ml.		0
2	0.1ml.	0.9ml.	1ml.		0.1ml.		10
3	0.2ml.	0.8ml.	1ml.		0.1ml.		20
4	0.4ml.	0.6ml.	1ml.	Mezclar en vortex e incubar 10 min. En refrigeración.	0.1ml.	Mezclar en vortex e incubar 30 min. a T° amb. en obscuridad.	40
5	0.6ml.	0.4ml.	1ml.		0.1ml.		60
6	0.8ml.	0.2ml.	1ml.		0.1ml.		80
7	1.0ml.	-	1ml.		0.1ml.		100
Muestras	1.0ml.	1.0ml.	1.0ml.		0.1ml.		?

- Las muestras son diluidas 1:10 y 1:100

6. Tratamiento del CPP con Pronasa y Sevag

Se basó en la técnica de Kirby (58), modificada por Taylor y Bojalil (53).

a. Procedimiento

- Se agregaron 25 ug. de Pronasa por cada 500 ug. de proteína del CPP y se incubó a 37°C por una semana adicionando la enzima diariamente a la mitad de la cantidad usada el día anterior y agregando 2 gotas diarias de tolueno para evitar la contaminación.
- Se detuvo el tratamiento enzimático al séptimo día por medio de congelación.
- Luego se siguió con el método de Sevag para completar el tratamiento de desproteinización.
- Se mezcló 10 partes del CPP tratado con pronasa con 50 partes del reactivo de Sevag (preparado con 9 partes de cloroformo + una parte de butanol).
- Se colocó la mezcla en un embudo de separación, agitando fuertemente y refrigerando de 10 a 15 min.
- Se separó la fase acuosa y se dializó en membrana de diálisis durante 24 horas, cambiando el agua 4 o 5 veces.
- Se precipitó el complejo desproteinizado obtenido (CPPD-Histo) con etanol al 96% y acetato de sodio al 1%.
- Se probó la reactividad del CPPD-Histo, por medio de la prueba de Inmunodifusión.
- Luego el complejo desproteinizado se almacenó a -20°C hasta su utilización.

7. Ensayo Inmunoenzimático.

Se basó por el método de Voller et al (60).

a. Materiales y Reactivos

- Placas para micro ELISA (polivinilo) Dinotech No.1-220-24

- **Amortiguador de recubrimiento (pH 9.6):** se mezclaron 1.59 g. de Na_2CO_3 , 2.93 g. NaHCO_3 y 1000 ml. de H_2O destilada en un erlenmeyer y se guardó a temperatura ambiente en un máximo de dos semanas.
- **Buffer Salino de Fosfatos -PBS- (pH 7.2-7.4):** se mezclaron 8 g. de NaCl , 8.62 g. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.48 g. de KH_2PO_4 y 1000 ml. H_2O destilada en un erlenmeyer y se guardó en refrigeración.
- **PBS-Tween (solución de lavado):** se mezcló 0.5 ml. de Tween 20 con 1000 ml. de PBS.
- **PBS-Tween-Albúmina sérica Bovina (ASB):** se mezcló 2 g. de ASB con 100 ml. de PBS-Tween. (se puede usar 0.5 g. de leche descremada en lugar de ASB).
- **Anti- IgG humana, conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma No. A1543):** la dilución fue determinada por titulación del ensayo. Se almacenó de 2-8°C.
- **Set de tabletas de p-Nitrofenilfosfato -pNPP- (Sigma No. N1891):** este set está formado por tabletas de p-nitrofenilfosfato y de Tris buffer, que se deben mezclar conjuntamente; estas tabletas deben ser almacenadas a temperaturas por debajo de los 0°C. Antes de su preparación se llevaron a temperatura ambiente y solamente se usaron las tabletas necesarias para el ensayo. Se abrió una tableta de pNPP (empaquete color plateado) y una de Tris buffer (empaquete color dorado) y se colocó en un frasco apropiado, conteniendo 5 ml. de agua destilada, se mezcló hasta que se disolvieron. Teniéndose cuidado de no tocar con las manos las tabletas.
- **NaOH 3N:** usado como solución básica para detener la reacción.

b. Procedimiento

- Se realizó una dilución 1:1,280 del CPPD de *H. capsulatum* en amortiguador de recubrimiento (buffer de carbonatos).

- Se agregó 50 ul. del CPPD diluido en cada pozo de reacción a utilizar y se colocaron las placas en una cámara húmeda.
- Se dejó en refrigeración por 24 hrs. De 4⁰C -- 8⁰C.
- Después de las 24 hrs. se lavó cada uno de los pozos 3 veces con la solución de lavado PBS-Tween. El antígeno se puede colectar o desechar, dependiendo de que tan valioso sea.
- Se bloquearon los sitios que quedaron libres para incorporar proteína, con la adición de PBS-Tween-ASB (50 ul/pozo). Se dejó una hora a temperatura ambiente (se puede acelerar en la refrigeradora a 30 min.).
- Se desechó la solución y se lavó dos veces con PBS-Tween, dejándolo en contacto con la placa por 2 min. para cada lavado.
- Se realizó una dilución 1:80 de las muestras de suero a analizar con PBS pH 7.2.
- Se agregó 50 ul. de cada muestra diluida en cada uno de los pozos, a excepción del pozo que sirvió como blanco y en donde se agregó 50 ul de PBS pH 7.2.
- Se incubó por 1 hora a 37°C en cámara húmeda.
- Después de la hora de incubación se lavó los pozos 5 veces con solución de lavado (PBS-Tween) y se dejó 1 min. para cada lavado.
- Se agregó 50 ul. de Anti-IgG humana Conjugada con Fosfatasa Alcalina diluido 1:1,000 con PBS pH 7.2.
- Se incubó 1 hr. a 37°C en cámara húmeda.

- Se Lavaron los pozos 5 veces con solución de lavado (PBS-Tween) y se dejó 1 min. por cada lavado.
- Se agregó 50 ul. de pNPP en cada pozo en una concentración de 5 mg/ml en Tris buffer.
- Se incubó por 30 min. a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- Se agregó 100 ul. de NaOH 3N y leyó a 405 nm.

E. Diseño de la Investigación

Se realizó un estudio a nivel descriptivo a 4 grupos de muestras provenientes de pacientes con las siguientes características:

1. 25 Sueros de pacientes con serología positiva (ID, PT ó ambos) para histoplasmosis y coccidioidomicosis.
2. 5 Sueros de pacientes con cultivo o biopsia positivo y serología positiva para histoplasmosis.
3. 32 Sueros de pacientes con infecciones pulmonares diferentes a las micosis profundas.
Ej. Neumonías bacterianas, tuberculosis confirmadas, etc.
4. 25 Sueros de personas aparentemente sanas, sin ninguna sintomatología de micosis, ni de ninguna infección pulmonar.

Para comprobar la eficiencia del antígeno purificado se realizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) a los cuatro grupos anteriores, comparando sus

resultados con los ya obtenidos por Inmunodifusión, Precipitación en Tubo, cultivo o biopsia. La concordancia de las pruebas se evaluó con una prueba de Kappa.

El tamaño de la muestra fue a conveniencia, ya que se trabajó únicamente con las muestras existentes en el Servicio de Micología de la Facultad de CC.QQ y Farmacia, que han sido recolectadas desde 1991 hasta la fecha y que reunieron las características antes mencionadas, excepto al grupo de personas aparentemente sanas.

VII. RESULTADOS

A. Purificación del antígeno crudo de *H. capsulatum*

El antígeno crudo de *H. capsulatum* fue obtenido de la cepa guatemalteca H.1.14.97, la cual fue sembrada en el medio semi-sintético de Smith, en donde la parte líquida se ultrafiltró y concentró a 10X.

Su reactividad se comprobó realizando la prueba de Inmunodifusión, de donde se mostró reactivo, utilizando como control suero de un paciente con cultivo positivo a *H. capsulatum*.

Posteriormente 14 ml. de antígeno crudo fueron sometidos al proceso de la purificación, iniciando con la precipitación de proteínas con fenol líquido, donde se obtuvo 8.8 ml de antígeno con una cantidad de 1,078.05 $\mu\text{g/ml}$. de proteínas.

La desproteínización del antígeno se realizó por medio del tratamiento con pronasa, donde se utilizó 0.0005 grs. de pronasa en el primer día y 0.0003 grs. en el segundo día, en base a la concentración de proteínas. Finalmente a través del tratamiento con el reactivo de Sevag, se obtuvo 2.2 ml. de antígeno purificado.

B. Prueba de ELISA

Una vez obtenido el antígeno purificado (Complejo Polisacárido- Proteína Desproteínizado) se procedió a utilizarlo en la prueba de ELISA, donde se determinó después de varios ensayos, que la mejor dilución del antígeno purificado es de 1:1,280 y de las muestras es de 1:80.

Posteriormente al establecer las diluciones adecuadas, se procedió a realizar el ensayo a los cuatro grupos de estudio utilizando el antígeno purificado de *H. capsulatum*, estableciendo el punto de corte de 0.807, obteniendo así los siguientes resultados:

Grupo No. 1 (a):

Muestras de Pacientes con Histoplasmosis con ID positiva

Resultados	No. muestras	Porcentaje
Positivas	11	85
Negativas	2	15
Total	13	100

ID: Inmunodifusión

Grupo No. 1 (b):

Muestras de Pacientes con Coccidioidomicosis con ID positiva

Resultados	No. muestras	Porcentaje
Positivas	7	58
Negativas	5	42
Total	12	100

Grupo No. 2

Muestras de Pacientes con Histoplasmosis con Cultivo e ID positiva

Resultados	No. muestras	Porcentaje
Positivas	4	80
Negativas	1	20
Total	5	100

Grupo No. 3

Muestras de Pacientes con Infecciones Pulmonares no Micóticas, con ID negativa para Micosis Profundas

Resultados	No. muestras	Porcentaje
Positivas	12	37
Negativas	20	63
Total	32	100

Grupo No. 4

Muestras de Personas Aparentemente Sanas, con ID negativa para Micosis Profundas

Resultados	No. muestras	Porcentaje
Positivas	5	20
Negativas	20	80
Total	25	100

Los resultados anteriores obtenidos en la prueba de ELISA se compararon con los resultados obtenidos en la prueba de Inmunodifusión (ID), estableciéndose una tabla de contingencia 2 X 2 para determinar los índices estadísticos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y prevalencia evaluando la concordancia entre ambas pruebas con una prueba de Kappa.

INMUNODIFUSION

	Positivos	Negativos
Positivos	15	24
ELISA		
Negativos	3	45

- Verdaderos Positivos: 15
- Falsos Positivos: 24
- Falsos Negativos: 3
- Verdaderos Negativos: 45

Con base de los datos anteriores, se realizaron los cálculos para los índices estadísticos y la prueba de Kappa (Ver anexo No.5), determinando los siguientes resultados:

- Sensibilidad: 83 %
- Especificidad: 65 %
- Valor Predictivo Positivo: 38 %
- Valor Predictivo Negativo: 94 %
- Prevalencia: 21 %
- Prueba de Kappa: 0.36

Según los criterios de Landis y Koch el valor de 0.36 en la prueba de Kappa corresponde a un grado de concordancia **regular**, entre la prueba de ELISA y la prueba de Inmunodifusión.

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

El objetivo principal de esta investigación fue detectar la presencia de anticuerpos anti-*H. capsulatum* en la prueba de ELISA utilizando el antígeno purificado de *Histoplasma capsulatum* producido localmente, logrando así comprobar su reactividad.

Se conoce que el componente celular con mayor característica antigénica en *H. capsulatum* es la pared celular, constituida principalmente por polisacáridos y glicoproteínas, por lo que se considera que las fracciones antigénicas de *H. capsulatum*, al hallarse parcialmente purificadas, contienen proporciones variables de proteínas y polisacáridos (53).

Durante el aislamiento del Complejo Polisacárido-Proteína Desproteínizado (antígeno purificado), se presentó el inconveniente que la centrifuga refrigerada que se utilizó no alcanzaba las 5,000 rpm, ni los 4°C estipulados por la técnica, por lo que la centrifugación fue de 3,900 rpm y a una temperatura que estuvo variando entre 13° C y 18°C; por lo que fue necesario adecuar la técnica de purificación a las condiciones del laboratorio de Micología.

Para la obtención del antígeno purificado, fue necesario realizar varias veces el proceso de purificación, ya que la primera vez no se llevo a cabo el tratamiento con la enzima pronasa, debido que en la precipitación de proteínas no se obtuvo la cantidad suficiente para agregar dicha enzima, ya que se perdió una buena cantidad de antígeno crudo, por errores y mala interpretación del procedimiento. En la segunda vez se logró producir el antígeno purificado, pero este al utilizarlo en la prueba de ELISA, no presentó ninguna reactividad, ya que no se observó ninguna reacción de coloración con las diferentes muestras, posiblemente se debió a un exceso de la enzima pronasa, por lo que se estableció que solo se agregaría por 2 días, al realizar el tratamiento.

El antígeno purificado obtenido, se utilizó en la prueba de ELISA, presentando reactividad, por consiguiente se procedió a diluir el antígeno, ya que se observó que sin diluir reaccionaba con los diferentes grupos de muestras, produciendo coloración intensa al final del ensayo.

Se realizaron varios ensayos con diferentes diluciones del antígeno purificado, 1:10, 1:100, 1:250, 1:1,000; pero aún presentaban coloraciones intensas, pero también se considero que la muestras necesitaban ser diluidas. Se procedió a realizar un último

ensayo para determinar la dilución adecuada tanto del antígeno purificado como de las muestras. El ensayo fue realizado con dos muestras, una muestra de suero de un paciente verdaderamente positivo de histoplasmosis, confirmado por medio de cultivo y con serología positiva en la prueba de Inmunodifusión; la otra muestra fue de una persona aparentemente sana, con serología negativa y sin antecedentes respiratorios; determinando que la dilución más adecuada del antígeno fue de 1:1,280 y de las muestras fue de 1:80, observándose que con estas diluciones fue posible diferenciar una reacción positiva de una negativa.

En la investigación no fue posible comparar los resultados obtenidos en la prueba de ELISA con los del estándar de oro, que eran las muestras con cultivo positivo para *Histoplasma capsulatum*, ya que eran muy pocas (5 muestras), por lo que se comparó con la prueba de Inmunodifusión, utilizando la prueba de Kappa para determinar el grado de concordancia entre ambas pruebas, ya que se puede aplicar contando con un estándar de oro o no.

Según los resultados obtenidos por medio de los índices estadísticos, se determinó que la prueba de ELISA, posee una buena sensibilidad (83%), ya que se obtuvo un buen porcentaje de verdaderos positivos entre las muestras de pacientes con histoplasmosis, aunque la especificidad fue baja (65%), debido que se presentó un alto grado de reacciones cruzadas, principalmente con las muestras de coccidioidomicosis, lo que es muy común entre ambas enfermedades micóticas. En estudios realizados en México con esta misma técnica, se estableció que los antígenos purificados presentaban un menor grado de reactividad cruzada, aunque no lograron eliminar totalmente dichas reacciones cruzadas (42).

Se ha demostrado que la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas están sujetas a la calidad de los antígenos fúngicos usados, por lo que es importante usar antígenos producidos a partir de cepas autóctonas, ya que detectan mejor los anticuerpos circulantes en los pacientes que padecen estas micosis profundas en un área geográfica específica. En Cuba la prueba de ELISA presentó una sensibilidad menor del 50% en un estudio sobre la histoplasmosis diseminada progresiva en pacientes con SIDA, utilizando antígenos de cepas nativas (30). En Canadá la prueba de ELISA comercial, presenta una sensibilidad del 97% y una especificidad del 84% para detectar anticuerpos tipo IgG (48).

Otro inconveniente que se presentó en este estudio, fue que las muestras positivas para coccidioidomicosis, al igual que las muestras de tuberculosis positivas, muchas de éstas muestras llevaban algunos años almacenadas, presentando turbidez y precipitación, lo cual puede provocar resultados falsos en la prueba de ELISA. Aunque estas muestras no se encontraban en las condiciones más óptimas, se utilizaron debido a lo difícil de su obtención.

El valor predictivo positivo de la prueba de ELISA, fue bastante bajo (38%), esto se debió principalmente a la gran cantidad de falsos positivos debido a las reacciones cruzadas con los sueros de coccidioidomicosis; esto también se vio afectado por el bajo porcentaje de prevalencia, ya que no se contó con una buena cantidad de muestras con histoplasmosis.

El valor predictivo negativo, fue excelente dando un porcentaje sumamente alto (94%), lo que nos indica que las muestras verdaderamente negativas, se podrían considerar negativas.

A pesar que se obtuvo un alto porcentaje de falsos positivos, se logró detectar anticuerpos anti-*H. capsulatum* comprobando la reactividad del antígeno purificado en la prueba de ELISA, la que es una prueba bastante útil, que podría complementar a la prueba de Inmunodifusión, contando así con un criterio más que ayude al diagnóstico y pronóstico de los pacientes, además que se tiene la ventaja de que es una prueba cuantitativa y capaz de detectar niveles bajos de anticuerpos, por lo que es importante seguir trabajando en su implementación, especialmente en la producción del antígeno sobre todo en la histoplasmosis que es la micosis profunda más frecuente en Guatemala y que ha tomado importancia por el síndrome VIH/SIDA.

Por último es importante hacer ver que en esta investigación sólo se compararon dos pruebas serológicas, ELISA e Inmunodifusión, por lo que los resultados no pueden generalizarse y sólo pueden aplicarse a éste estudio (61).

IX. CONCLUSIONES

- A. Se comprobó la reactividad del antígeno purificado detectando anticuerpos anti-*H. capsulatum*, en la prueba de ELISA.
- B. Se optimizó las condiciones de la purificación del antígeno crudo de *Histoplasma capsulatum* en el Servicio de Micología.
- C. Se purificaron los antígenos crudos de *Histoplasma capsulatum* producidos a partir de cepas guatemaltecas.
- D. El rendimiento del antígeno purificado fue considerado bajo, por lo que es necesario una mayor cantidad de antígeno crudo para purificar.
- E. La prueba de ELISA, realizada con antígeno purificado de *Histoplasma capsulatum* presentó una sensibilidad del 83%, una especificidad del 65%, valor predictivo positivo del 38% y un valor predictivo negativo de 94%.
- F. Las muestras de pacientes con coccidioidomicosis confirmada presentaron reacciones cruzadas con el antígeno purificado de *Histoplasma capsulatum*.
- G. La prueba de ELISA se puede complementar con la prueba de Inmunodifusión para un mejor diagnóstico y pronóstico.

X. RECOMENDACIONES

- A. Producir una cantidad suficiente de antígeno metabólico crudo, para así obtener una buena cantidad de antígeno purificado, ya que el rendimiento del mismo es bajo.

- B. Realizar muestras seriadas con los antígenos purificados de *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*, en la prueba de ELISA, para poder determinar a través de los títulos más altos si se trata de histoplasmosis o una coccidioidomicosis, excluyendo así las reacciones cruzadas.

- C. Mantener en condiciones óptimas las muestras evitando la contaminación bacteriana, descongelamientos frecuentes y utilizar un buen método de preservación, que no interfiera con las metodologías.

- D. Adquirir el equipo adecuado para la prueba de ELISA, como lavador y lector de microplacas, para que se pueda realizar frecuentemente en el laboratorio de Micología.

XI. REFERENCIAS

1. García ML, Logemann H, Vásquez T, Producción y estandarización de antígenos y antisueros fúngicos para el diagnóstico de micosis sistémicas. Rev Cient Fac C.C.Q.Q. y Farmacia. IIQB. USAC. 1989;7:11-12.
2. Illescas M. Inmunodiagnóstico de micosis profundas: Prueba de fijación de complemento. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 43p.
3. Taylor, ML. Histoplasmosis en Morelos: enfoque inmunológico y biológico. México: Universidad Nacional Autónoma, 1994. 11p.
4. Taylor ML, et al. Histoplasmosis en México; aportaciones inmunológicas y molecular sobre su epidemiología. Ciencia y Desarrollo. 1997;23:58-63.
5. Centers for Disease control and Prevention. Histoplasmosis: Protecting workers at risk. USA: DHHS (NIOSH) Publication No.97-146. 1997.
6. Murray PR, Drew WL, Thompson JH, Microbiología Médica. España: Mosby/Doyma Libros, 1995. X+725p. (p.323-329).
7. García ML, Illescas M, Determinación de la sensibilidad y especificidad de la inmunodifusión y la fijación de complemento, utilizando antígenos producidos en el Servicio de Micología. Rev Cient Fac C.C.Q.Q. y Farmacia. IIQB. USAC. 1991;10:34-39.
8. Richardson MD, Warnock DW, Fungal Infection: Diagnosis and Management. London: Blackwell Scientific Publications. 1993.

9. Rippon JW. Tratado de Micología Médica. 3 ed. México: Interamericana, 1990. VIII+855p. (p.411-450).
10. Riley HD. The history of histoplasmosis. Med Assoc. 1983;76:31-40.
11. Logemann HE Manual Práctico de Micología Médica. Guatemala: Universidad de San Carlos (Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1995. 227p. (95-102).
12. Bonatti E. Reactividad cutánea a la histoplasmosis en varios grupos etarios de dos ciudades de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1973. 40p.
13. Fratti OI. Reactividad cutánea y aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del suelo en la ciudad de Escuintla. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1976. 32p.
14. Izaguirre T. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del suelo de Alta Verapaz. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1983. 63p.
15. Leytán AD. Diagnóstico serológico de histoplasmosis por inmunodifusión. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1987. 63p.
16. Koneman EW, Roberts GD, Micología Práctica de Laboratorio. 3 ed. Argentina: Médica Panamericana, 1994. 221p. (p.31-171).
17. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Microbiología Médica. 15 ed. México: EL Manual Moderno, 1995. X+807p. (670-672).
18. Corti ME, et al. Histoplasmosis. AIDS Patient care STDS 2000;14(3):149-154.

19. Gómez BL, et al. Detection of the 70-kilodalton *H. capsulatum* antigen in serum of histoplasmosis patients: correlation between antigenemia and therapy during follow-up. *J Clin Microbiol* 1999;37(3):675-680.
20. Leytán RL. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del suelo de la ciudad capital de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1991. 52p.
21. Starr JC, Hahn HH, Wheat LJ, An early manifestation of acute histoplasmosis. *Chest* 1984;86:269-270.
22. Tierney LM, et al. Diagnóstico Clínico y Tratamiento. 29 ed. México: El Manual Moderno, 1994. 1483p. (p.1242-1243).
23. Gonzáles T, et al. Histoplasmosis. *Rev Fac Med UNAM* 1998;41:12-15.
24. Bradsher RW. Histoplasmosis and Blastomycosis. *Clin Infect Dis* 1996;2:102-111.
25. Capone D, et al. Chronic pulmonary histoplasmosis in the state of Río de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia* 1999;145(2):75-79.
26. Hahn Y. Primary, chronic and disseminated histoplasmosis. *J Clinical Microbiology* 2000;38(8):3827-3829.
27. Wheat LJ. Diagnosis and management of histoplasmosis. *Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8(5):480-490.
28. Taylor ML, et al. Relationships between pathogenesis and immune regulation mechanisms in histoplasmosis: a hypothetical approach. *Rev Infect Dis* 1984;6:775-782.

29. Tobon AM, et al. Disseminated histoplasmosis in children: the role of itraconazole therapy. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15(11):1002-1008.
30. Fernández CM, et al. Histoplasmosis diseminada progresiva en pacientes con SIDA. *Rev Cub Med Trop* 1996;48(3):163-166.
31. Pérez J, et al. HIV infection in Cuba. *AIDS HIV Infect* 1993;8:1-9.
32. Johnson PC, Sarosi GA, Progressive disseminated histoplasmosis in patients with AIDS. *Advances Res Ther* 1994;4(1):15-21.
33. Taylor ML, Duarte E, Estrategias del *Histoplasma capsulatum* para evadir los mecanismos citocidas de los fagocitos. *Rev Invest Clin* 1995;47:499-506.
34. Cox R. Immunology of the fungal diseases. Texas: CRC. Press Inc, 1989. 256p. (p.200-211).
35. Newman SL. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *Trends Microbiol* 1999;7(2):67-71.
36. Deepe GS, Durose GG, Immunobiological activity of recombinant H antigen from *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 1995;63(8):3151-3157.
37. Levinson WE, Jawetz E, Microbiología e Inmunología. México: EL Manual Moderno, 1992. 712p. (p.369-371).
38. Hamilton AJ. Serodiagnosis of histoplasmosis, paraccocidioidomycoses and *Penicilliosis marneffeii*; current status and future trends. *Med Mycol* 1998;36(6):351-364.
39. Wheat J, et al. The diagnostic laboratory tests for histoplasmosis. *Ann Intern Med* 1982;97:680-685.

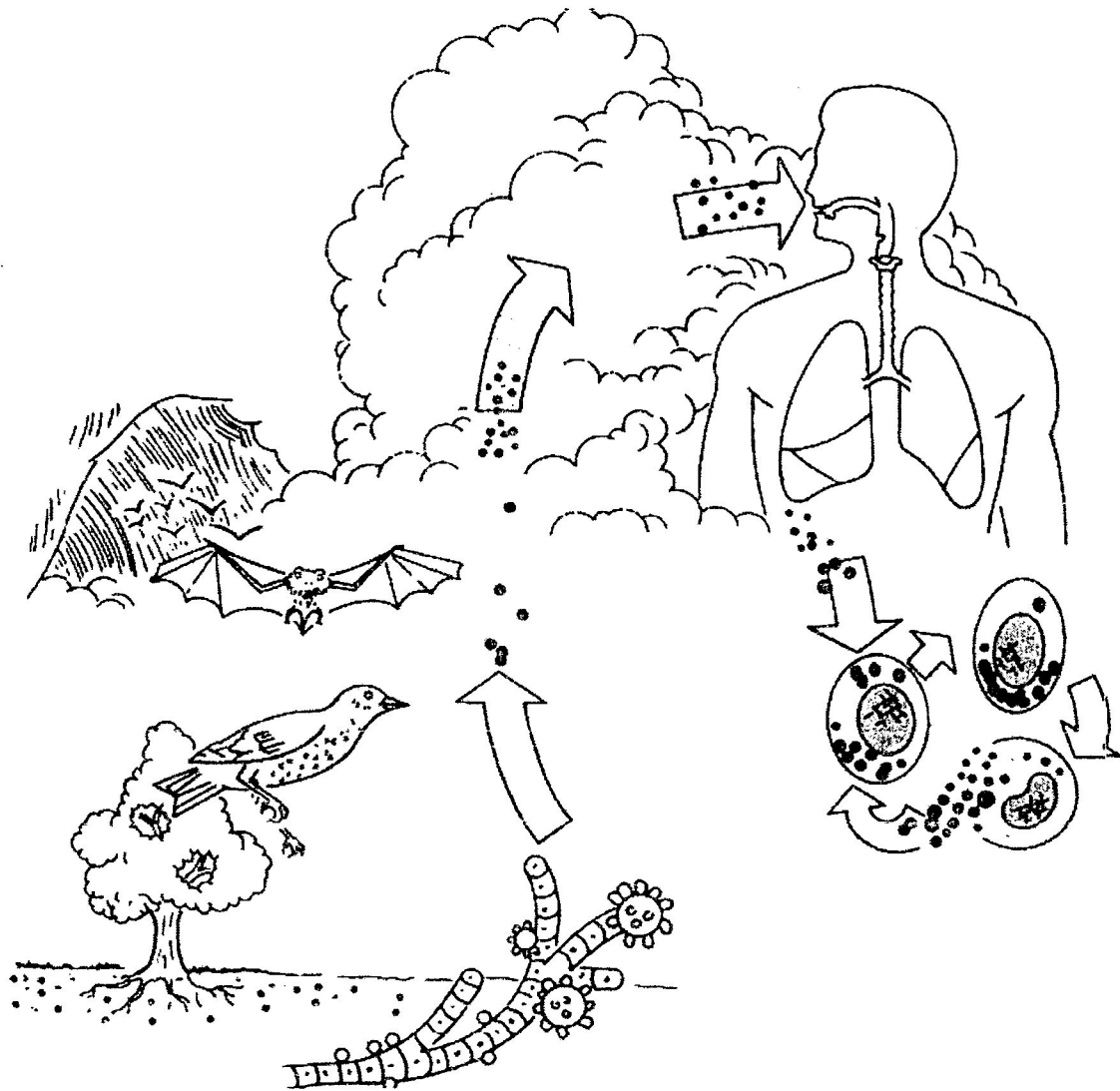
40. Hicks JJ, Díaz JC, Bioquímica e Inmunología. México: Universidad Nacional Autónoma (Facultad de Medicina), 1988. VII+569p. (p.540-553).
41. Tietz NW. Guía Clínica de Pruebas de Laboratorio. México: Médica Panamericana, 1992. 712p. (p. 670-671).
42. Jiménez JA. Caracterización bioquímica de hongos causantes de micosis profundas: análisis inmunológico. México: Universidad Nacional Autónoma, (tesis de graduación, Facultad de Medicina, División de Postgrado) 1988. 33p.
43. George R, Lambert R, Significance of serum antibodies to *H. capsulatum* in endemic areas. South Med J 1984;7(2):161-163.
44. George RB. Micosis pulmonares: revisión conceptual y terapéutica. Actualizaciones. Rev Med 1990;3:5-7.
45. Gómez BL, et al. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. J Clin Microbiol 1997;35(10):2618-2622.
46. Negroni R, Euguchi K, Arechavala A, Estudios serológicos para la determinación de anticuerpos y antígenos en fluidos orgánicos de pacientes afectados por histoplasmosis asociados al HIV. Rev Invest Clin 1997;50(5):301-5.
47. George R, Lambert R, Evaluation of enzyme immunoassay as a rapid screening test for histoplasmosis and blastomycoses. Am Rev Respir Dis 1987;136:316-319.
48. Sekhon AS, et al. Comparative evaluation of the premier enzyme immunoassay, micro-immunodiffusion and complement fixation tests for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* antibodies. Mycoses 1994;37(9-10):313-316.

49. Van C, et al. Acute pulmonary histoplasmosis as an imported disease. *Ned tijdschr Geneesk* 1997;141(25):1242-1244.
50. Wheat J, et al. Itraconazole treatment of disseminated histoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome . AIDS Clinical Trial Group. *Am J Med* 1995;98(4):336-342.
51. National institute of allergy and infectious diseases mycoses study group. Treatment of blastomycosis and histoplasmosis with ketoconazole: results of prospective randomized clinical trial. *Ann Intern Med* 1985;103(6):861-872.
52. Toriello C, Reyes MR, Taylor ML, Production of fungal antigens from local strains for the immunodiagnosis of mycoses in Mexico. *Rev Invest Clin* 1997;49(6):501-505.
53. Taylor ML, Bojalil L, Inmunología de la histoplasmosis: aislamiento de un complejo polisacárido-proteína con actividad inmuno-específica a partir de *H. capsulatum*. *Arch Invest Med* 1977;8:91-102.
54. Toriello C, et al. Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. *Mycoses* 1991;34:133-140.
55. Toriello C, et al. Two-dimensional immunoelectrophoresis of histoplasmin and purified polysaccharide-protein antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathologia* 1993;122:7-13.
56. Broch T, Madigan M, *Microbiología*. 6 ed. México: Hispanoamericana, 1993. X+956p. (p.482-485).
57. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* 1962;6:30-36.

58. Kirby KS. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *J Bio* 1956;64:405.
59. Lowry OH, et al. Protein measurement with the folin reagent. *J Bio Chem* 1951;193:265-275.
60. Voller A, et al. *Bulletin WHO*. 1976 (p.53-55).
61. Joo R. Análisis estadístico a seguir en la comparación de métodos diagnósticos cualitativos en la Escuela de Química Biológica. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1998.60p.

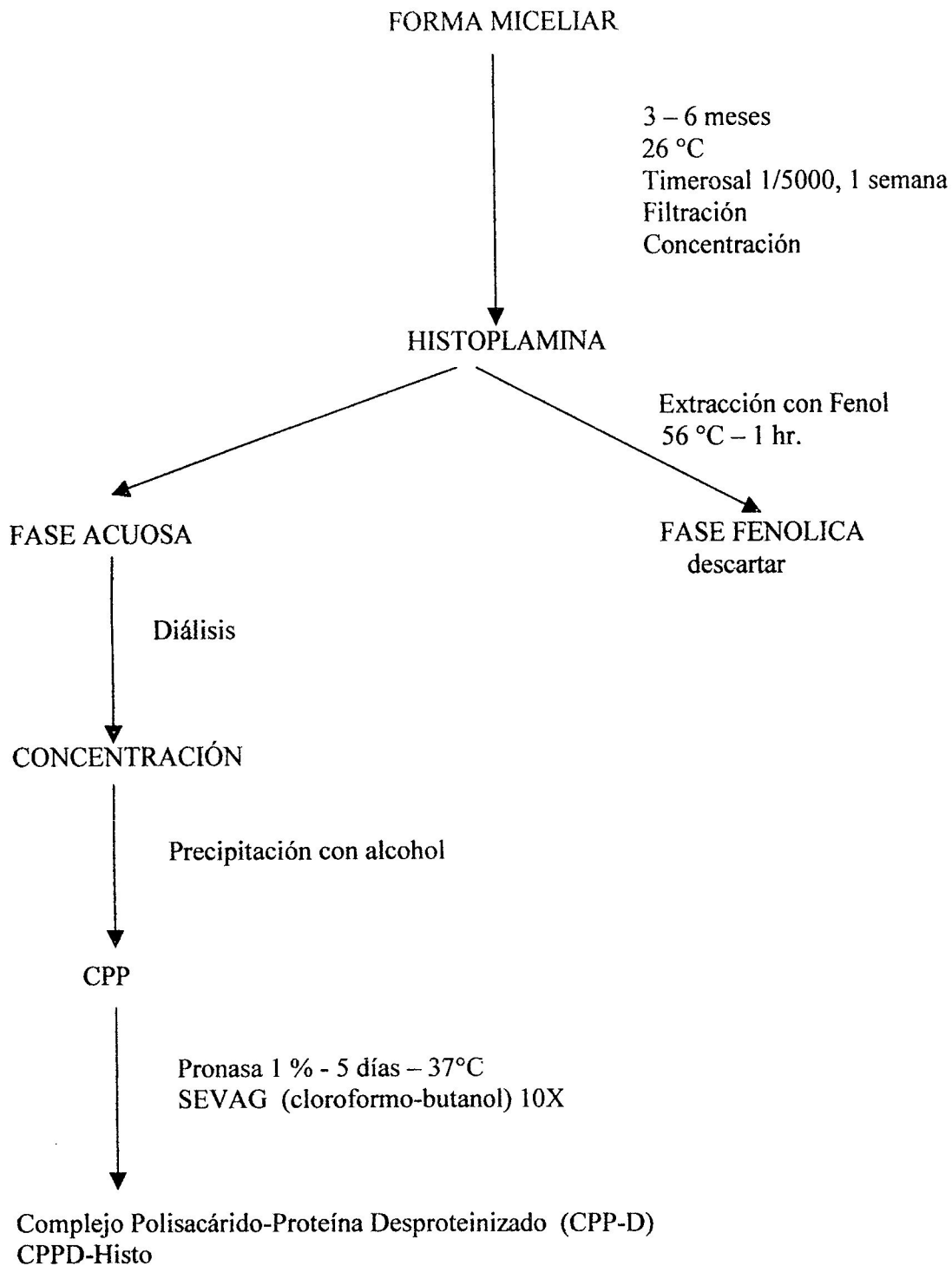
XII. ANEXOS

ANEXO No. 1



Esquema de la historia natural de los ciclos saprofiticos y parasitarios de *Histoplasma capsulatum*.

ANEXO No. 2



Esquema de aislamiento del complejo polisacárido-proteína desproteínizado (CPP-D).

ANEXO No. 3

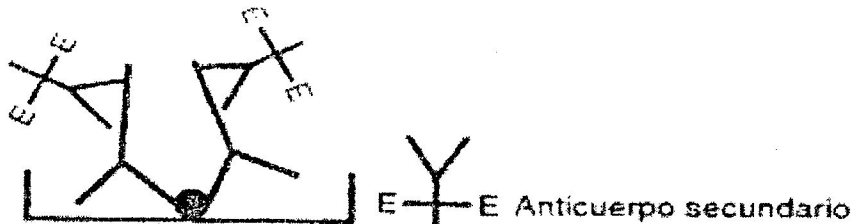


1. El antígeno se fija al pozo microtitulador

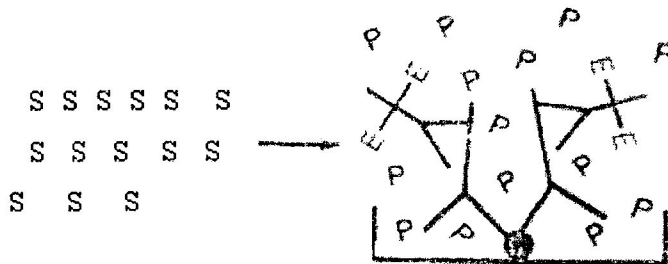


2. El anticuerpo del suero se adiciona; se lava

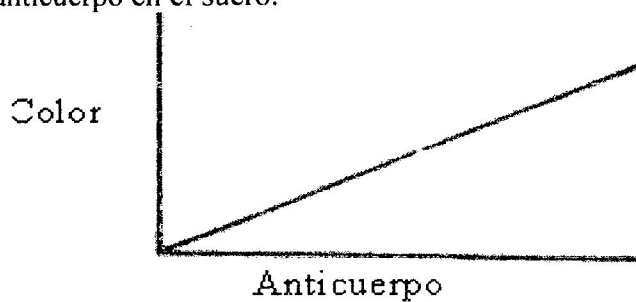
Emparedado de cara abierta



3. Se adiciona el anticuerpo antihumano, inmunoglobulina marcado con enzima (E); se lava

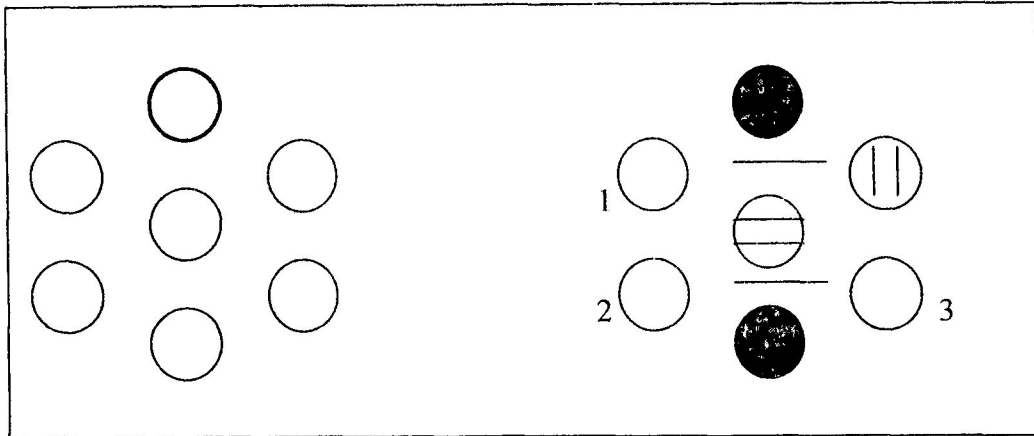








4. Se adiciona el sustrato a la enzima (S). El color formado (P) es proporcional a la cantidad del anticuerpo en el suero.



ELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos.

ANEXO No. 4



-  Control positivo
-  Antígeno
-  Control negativo
-  Muestra No. 1
-  Muestra No. 2
-  Muestra No. 3

Prueba de Inmunodifusión en Gel

ANEXO No. 5

Cálculos Estadísticos

Sensibilidad:	$\frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{total de enfermos}}$	X	100
Especificidad:	$\frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{total de personas sanas}}$	X	100
Valor Predictivo Positivo:	$\frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{total de muestras positivas}}$	X	100
Valor Predictivo Negativo:	$\frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{total de muestras negativas}}$	X	100
Prevalencia:	$\frac{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}}{\text{total de muestras}}$	X	100

Prueba de Kappa

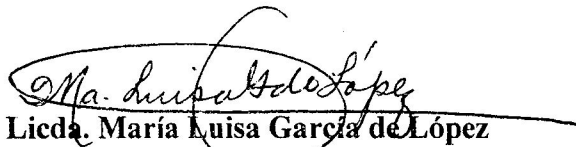
$$\frac{4 (ad - bc) - (b - c)}{(2a + b + c) \times (2d + b + c)}$$

- a: verdaderos positivos
- b: falsos positivos
- c: falsos negativos
- d: verdaderos negativos



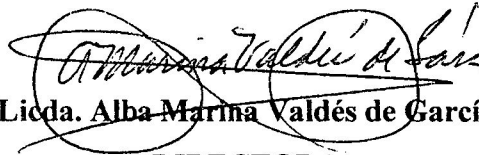
Ana Graciela Cardona Almengor

TESISTA



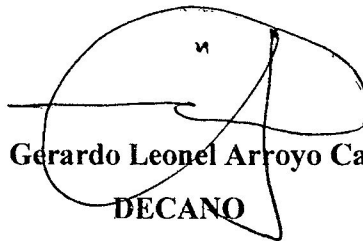
Licda. Maria Luisa Garcia de Lopez

ASESORA



Licda. Alba Marina Valdes de Garcia

DIRECTORA



M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalan

DECANO