

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



INMUNODIAGNOSTICO DE MICOSIS PROFUNDAS:  
PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR  
MONICA ILLESCAS AZURDIA

PARA OPTAR AL TITULO DE  
QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, enero de 1994

D.L.  
06  
7(1475)

JUNTA DIRECTIVA

- |            |  |
|------------|--|
| DECANO     | Lic. Clemencia Gálvez de Avila             |
| SECRETARIO | Lic. José Francisco Monterroso S.          |
| VOCAL I    | Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar            |
| VOCAL II   | Lic. Thelma Esperanza Alvarado de Gallardo |
| VOCAL III  | Lic. Miguel Orlando Garza Sagastume        |
| VOCAL IV   | Br. Marvin Estuardo Jimenez Bojorquez      |
| VOCAL V    | Br. Sergio Arturo Almengor Corzo           |

ACTO QUE DEDICO A

DIOS		Por ser el creador de todo el universo y las ciencias exactas
VIRGEN MARIA		Por ser mi guía con su infinita bondad y fortaleza.
MIS PADRES	Rosa Azurdia S. Roberto Illescas P	Por su esfuerzo y dedicación
MI HIJO	Roberto Antonio Illescas	Por ser la luz que guía mi esfuerzo.
MIS HERMANOS	Dr. Jorge Gómez Azurdia Lic. Carolina Illescas Azurdia	Por su apoyo
MI CUÑADA	Sonia B. de Gómez	Con aprecio
MIS SOBRINOS	Sonia Pamela Gómez B Jorge Raúl Gómez B	Con cariño
MIS ABUELITOS		
MI FAMILIA TODA		

DEDICO ESTA TESIS A

GUATEMALA

LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

MI ASESORA

Lic. María Luisa G. de López Por su comprensión

MIS CATEDRATICOS

especialmente a

Lic. Clemencia de Avila

Por su confianza en mí,

Lic. Heidi E. Logemann

MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS

especialmente a

Lic. Rosita Leytán

Por su amistad y apoyo,

Lic. Oscar Gómez

sinceros

### MIS AGRADECIMIENTOS A

La Lic. María Luisa García Masaya de López y, especialmente, al Lic. Frederick Trent, que por su asesoría y conocimientos hicieron posible este trabajo de tesis.

La Lic. Ivonne Somerkamp, Lic. Vivian Matta, Lic. Heidi Logemann y al Lic. Federico Nave por la revisión, a conciencia, de éste trabajo.

El personal del Departamento de Microbiología y Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, además a la Lic. Carolina Richter del Ministerio de Energía y Minas por haberme permitido utilizar su equipo y área de trabajo.

Lucy Santis de Martínez, Lesbia Corzo y Maritza Melchor por su valiosa ayuda.

Todas las personas que en una u otra forma hicieron posible la realización del presente trabajo de investigación.

## I. RESUMEN

En el presente trabajo se implementó y estandarizó la técnica de Fijación de Complemento (FC), con los antígenos y antisueros de dos hongos patógenos *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*, producidos en el servicios Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Para la estandarización se contó con reactivos comerciales de alta calidad, dando títulos de trabajos altos. La primer fase consta de la titulación de los reactivos implicados en la prueba diagnóstica; éstos son: la Hemolisina, el complemento y los antígenos fúngicos. De los antígenos fúngicos se esperaba títulos mayores a los observados, Coccidioidina 1:8 e Histoplasmina 1:16.

Ya con los títulos de trabajo, la hemolisina con 1:4000 , el complemento 1:600 y los antígenos mencionados anteriormente, se procedió a la segunda fase con pacientes aparentemente sanos de un área endémica tanto de histoplasmosis (Escuintla) como coccidioidomicosis (Zacapa), pacientes con tuberculosis confirmada y con micosis profundas (éstos últimos diagnosticados en el Servicio de Micología). Al mismo tiempo, se compararon los resultados obtenidos de FC con los de la prueba de Inmunodifusión en gel de agar (ID) realizada simultáneamente. Al ser utilizados los sueros se observó contaminación bacteriana; probablemente provocada por los continuos congelamientos y descongelamientos a los que fueron sometidos. De esta forma se alteran las pruebas funcionales de la Fijación de Complemento, dando falsos positivos.

Se obtuvo un paciente positivo con la histoplasmina en ambas pruebas, ID y FC. De igual manera ocurrió con la coccidioidina, obteniéndose sólo un paciente positivo.

## II. INTRODUCCION

En Guatemala, se encuentra una amplia variedad de regiones, que incluyen la seca, de calor intenso y vegetación xerófila localizada en el Valle del Río Motagua, que es favorable al desarrollo de *Coccidioides immitis* <sup>(1,2)</sup>; y la región tropical-húmeda de abundante vegetación, que se localiza en los departamentos de Alta Verapaz y Escuintla, de donde en varias ocasiones ha sido aislado *Histoplasma capsulatum* <sup>(3,4)</sup>.

Estos dos hongos son dimórficos y los agentes causales de dos micosis profundas, que producen síntomas similares a los de una infección por *Mycobacterium tuberculosis* <sup>(5,6)</sup>.

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 <sup>(7)</sup>.

En Guatemala, los principales agentes causales de estas micosis son: *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Paracoccidioides brasiliensis*, los que 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 <sup>(8)</sup>.

Estos hongos crecen en el suelo produciendo micelio y conidias. En áreas endémicas las personas adquieren la infección a través de las vías respiratorias. Al ser inhaladas las conidias, crecen y sufren una transformación morfológica debido a cambios metabólicos formando levaduras (fase levaduriforme). Aunque la mayoría de personas no desarrollan síntomas, éstos pueden ser leves, graves o mortales al progresar <sup>(8)</sup>.

El diagnóstico micológico de estas enfermedades puede realizarse por examen directo, histología y/o cultivo que permita confirmar la presencia del hongo causal. En estos procedimientos es muy difícil obtener el agente causal, por lo que es necesario contar con pruebas serológicas que orienten al diagnóstico y brinden apoyo en el seguimiento de los pacientes <sup>(9-11)</sup>.

Actualmente, en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, se realiza el inmunodiagnóstico de estas micosis con antígenos producidos localmente y utilizando la inmunodifusión (ID) que es una prueba cualitativa, sencilla, económica, sensible y específica. Sin embargo, para el diagnóstico se hace necesaria una prueba cuantitativa que sirva de ayuda al médico para el pronóstico y evolución de los pacientes con tratamiento. Estas condiciones las ofrece la prueba de Fijación de Complemento (FC) <sup>(11,12)</sup>.

El presente trabajo estableció el diagnóstico serológico cuantitativo de estas micosis, utilizando la técnica de Fijación de Complemento con los antígenos producidos a partir de cepas propias, aisladas de pacientes con histoplasmosis y coccidioidomicosis.

El estudio se realizó en tres grupos constituidos por pacientes sanos de las áreas endémicas de cada micosis mencionada, pacientes con tuberculosis confirmada por cultivo y pacientes a los que se les ha diagnosticado histoplasmosis o coccidioidomicosis en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

De modo que se estableció que la prueba de Fijación de Complemento es complementaria a la prueba de Inmunodifusión, en el diagnóstico de micosis profundas.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Coccidioidomicosis

Es una enfermedad que se manifiesta como una infección primaria, residual benigna y diseminada, dependiendo del estado inmunológico del paciente expuesto al hongo causal, **Coccidioides immitis**. Este hongo es probablemente el más virulento de los hongos patógenos para el hombre. La mayoría de veces, los casos ocurren entre reclutas militares, trabajadores migratorios o agricultores de las áreas endémicas <sup>(8,13,14)</sup>.

El hongo causal es dimórfico, presenta fase micelial y levaduriforme dependiendo del medio ambiente en el que se encuentre. En los tejidos se presenta en fase esférula o levaduriforme <sup>(15)</sup>. La esférulas que contienen gran cantidad de endosporas, al ser inhaladas germinan a nivel pulmonar y se rompen, liberando las endosporas. Cada una de estas últimas tiene la capacidad de desarrollarse en una nueva esférula <sup>(3,16)</sup>. El hábitat natural de la fase saprofítica o micelial es el suelo donde se desarrolla el micelio blanco algodonoso. Al microscopio se observa micelio septado con artroconidias características en forma rectangular o de barril <sup>(17-19)</sup>.

Este hongo tiene requerimientos nutricionales mínimos por lo que se desarrolla muy bien en regiones áridas o semiáridas que presenten escasa vegetación de tipo xerófito, suelo alcalino y rico en sales minerales, clima templado a cálido y con una temperatura que varíe de los 15 a 42 °C, libre de heladas severas y donde el verano es seco y polvoriento, con escasa precipitación pluvial <sup>(13,17,20)</sup>.

Las áreas endémicas se localizan en Argentina, California, Honduras, México, Nicaragua y en Guatemala, en la región conocida como Valle del Río Motagua que comprende los departamentos de Izabal, El Progreso y Zacapa <sup>(13,20,21)</sup>.

#### 1. Estudios realizados en Guatemala

En nuestro país se han realizado varios estudios sobre coccidioidomicosis desde un poco antes de mediados de siglo. Andrade (1945), realizó un estudio sobre la reactividad dérmica con coccidioidina en la ciudad de Guatemala, encontrando un 0.5% de positividad. La mitad de casos provenían de los departamentos de Zacapa y Chiquimula, área que actualmente se conoce como endémica. Este estudio dio la base para localizar una región potencialmente endémica de coccidioidomicosis <sup>(20)</sup>. Mayorga (1971), describió el área endémica de coccidioidomicosis en el Valle del Río Motagua en base a la ecología de la región <sup>(21)</sup>; luego David (1977), realizó una encuesta epidemiológica en el oriente del país, donde obtuvo un 20.8 % de positividad a la coccidioidina en Usumatlán, Zacapa; confirmando la zona como endémica de coccidioidomicosis

dada la alta reactividad encontrada (22). Con la intención de aislar el hongo del área endémica, Enríquez (1978) realizó un análisis químico, físico y microbiológico del suelo del área y encontró algunas de las características ecológicas necesarias para el crecimiento de este hongo, distribuidas en toda el área, tales como aridez, salinidad, pH adecuado, poca vegetación, etc, pero no logró el aislamiento del hongo (23). Por otra parte Muñoz (1983), logró el aislamiento fortuito de *C. immitis* en una toalla de una barbería en el departamento de Totonicapán, área endémica de *Trichophyton schoenleinii* (4).

La producción de antígenos fúngicos en nuestro país la inició Pérez (1984) quien preparó antígeno metabólico y miceliar de *C. immitis* para ser utilizado en serología. Al ser aplicado a pacientes tuberculosos se obtuvo 1% de positividad en la prueba de inmunodifusión. Tanto el antígeno metabólico como miceliar fueron de baja potencia por lo que no se emplearon para pruebas diagnósticas (15).

Estudiantes de la carrera de Química Biológica (1989) realizaron un nuevo intento de aislar *C. immitis* en Usumatlán, Zacapa, donde existe una reactividad cutánea a la coccidioidina de 20.8%. No se tuvo éxito en el aislamiento, ya que las condiciones ecológicas han cambiado el hábitat del suelo debido al aumento de las áreas cultivadas y el paso del hombre (24). Lo anterior hizo necesario actualizar la epidemiología de *C. immitis* en varios de los municipios del departamento de Zacapa, por lo que Gómez (1991), realizó una encuesta epidemiológica en ese departamento aplicando 1002 pruebas de coccidioidina a niños escolares, encontrando que la mayor reactividad se encuentra en el municipio de Usumatlán (32.41%) (25). Este dato correlaciona muy bien con lo reportado por David (20.8%) y corrobora el área como endémica de coccidioidomicosis (22).

Desde 1987 a la fecha, se producen los antígenos de *Histoplasma capsulatum* y *C. immitis* sistemáticamente en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, a fin de mantener el servicio para pacientes de centros asistenciales que solicitan el diagnóstico de micosis profundas. Este diagnóstico se realiza por medio de dos pruebas cualitativas como son: Precipitación en Tubo (PT) que detecta anticuerpos de tipo IgM e Inmunodifusión en Gel (ID) que detecta anticuerpos de tipo IgG (26).

## 2. Respuesta inmune

La personas que residen en la región endémica de coccidioidomicosis presentan respuesta inmune natural y primaria contra el hongo causal. El mecanismo incluye fagocitos del tipo de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y mononucleares y la activación de la vía alterna del complemento por los derivados fúngicos (14).

Al ingresar una artroconidia al sistema respiratorio entra en juego la línea de los polimorfonucleares, los que por quimiotactismo al hongo lo fagocitan. Se pueden adherir a las esférulas, formando

paquetes celulares. Al romperse las estérulas sueltan endosporas que son resistentes a la fagocitosis por su matriz fibrilar y su tamaño, pero con el tiempo pueden llegar a ser sensibles a los polimorfonucleares (1,14).

Los macrófagos mononucleares y las células asesinas naturales no inhiben el crecimiento del hongo, los linfocitos T al contrario, evitan el crecimiento de las artroconidias y endosporas, y no actúan en la citotoxicidad fúngica (14).

El hongo causal tiene alta inmunogenicidad. En la inmunidad humoral los anticuerpos directos contra este hongo son de tipo IgM, IgG, IgA e IgE, de los cuales los IgM e IgG son importantes en el serodiagnóstico (precipitinas, inmunodifusión, fijación de complemento, etc), ya que prevalecen sobre los demás (1,14).

En pacientes con infección primaria no diseminada, una semana después de aparecer los síntomas, se producen las precipitinas tipo IgM, seguidas por los anticuerpos fijadores del complemento de la familia IgG, los que se detectan en el 9% de los pacientes. El 53% de estos pacientes tienen precipitinas detectables los que al correr el tiempo bajan en niveles gradualmente. Después de 5 meses, sólo el 10% de los pacientes tienen precipitinas detectables y se les puede cuantificar los anticuerpos fijadores del complemento. En el 90% de los pacientes con infección primaria pueden detectarse aproximadamente 7 meses después de implantada la enfermedad los anticuerpos fijadores del complemento (14,26,27).

En la infección diseminada se puede encontrar pacientes con respuesta inmune disminuida, de tal forma que las precipitinas no se detectan y los anticuerpos fijadores del complemento pueden encontrarse en niveles bajos (28-31).

### 3. Diagnóstico

En el área endémica de coccidioidomicosis este diagnóstico debe tomarse en cuenta para diferenciarlo de cualquier enfermedad inespecífica, ya que los signos y síntomas son vagos e inespecíficos (1,3,32).

Las muestras que se pueden utilizar para las pruebas serológicas son: suero, líquido cefalorraquídeo, líquidos pleural, ascítico y articular; éstos deben ser recolectados asépticamente, sin hemólisis y sin anticoagulante. El suero se debe preservar con timerosal, el cual impide el crecimiento bacteriano, ya que este último inhibe la actividad del complemento (26,32-34).

El diagnóstico micológico se lleva a cabo por los siguientes exámenes:

a) **Examen directo:** se realiza una preparación en fresco del material biológico obtenido y se

coloca entre cubre y portaobjetos con hidróxido de sodio o potasio del 10%, para digerir el material queratoide no deseado (12,18).

Microscópicamente se observa una estructura esférica de paredes gruesas, sin gemaciones, de 20-60  $\mu\text{m}$  de diámetro, llena de pequeñas endosporas de 2-5  $\mu\text{m}$  de diámetro (17,18).

- b) **Histología:** para evidenciar las estructuras fúngicas en tejido luego de los cortes respectivos y su tinción con Hematoxilina-eosina, se procede a utilizar tinciones especiales como: plata-metenammina de Gomori para *C. immitis* (1,35).
- c) **Cultivo:** además de las pruebas anteriores es necesario poner de manifiesto el hongo causal por medio del cultivo del material biológico. Para ello se usa los medios de Sabouraud o Sabouraud adicionado de cicloheximida y clorantfenicol e incubando de 28-30 °C alrededor de 15 días. Si la infección es causada por *C. immitis* se observa una colonia membranosa, húmeda de micelio aéreo algodonoso blanco, pero con la edad se torna de color pardo. Microscópicamente se observan hifas en forma de raqueta tabicada, cadenas de artoconidias rectangulares, elipsoidales o de barril de 2.5 - 3 por 3 - 4  $\mu\text{m}$  de tamaño (3,12,35). Para obtener la fase parasítica del hongo, se utiliza el medio de Converse, que se incuba a 37 °C en agitación constante, o inoculando animales de experimentación (18).
- d) **Serología:** en la mayoría de los casos no se tiene éxito con los procedimientos anteriores, por lo que la serología es de gran ayuda, ya que evidencia la naturaleza micótica del proceso infeccioso. Presenta importantes aplicaciones en el seguimiento de los pacientes y las pruebas cuantitativas permiten la evolución, pronóstico y seguimiento de los pacientes (32,35).

La prueba de precipitación en tubo (PT) permite la detección temprana de precipitinas en las que se detectan los anticuerpos de tipo IgM. La inmunodifusión simple (ID), detecta los anticuerpos de tipo IgG y estos resultados son comparables con la prueba FC. Esta última es el método cuantitativo por excelencia, es complicada en su desarrollo pero de gran ayuda en el diagnóstico y pronóstico de la coccidioidomicosis. La ID se vuelve positiva casi al mismo tiempo que la FC. El pronóstico de la evolución del paciente se define con la aparición o desaparición, con el tiempo, de la banda específica (F) en la prueba de ID correlacionada con los títulos en FC. Adicionalmente se utilizan las pruebas de aglutinación de partículas de latex y la inmunofluorescencia (29,36-39). La sensibilidad y especificidad de los métodos se determinan por el porcentaje de reacciones cruzadas con histoplasmina y paracoccidioidina (33).

Las reacciones cruzadas con la FC han sido observadas en pacientes con histoplasmosis activa, blastomicosis con títulos mayores a 1:128, pero no en criptococosis. También han sido utilizadas en diferentes condiciones no micóticas como en pacientes con tuberculosis, neumonía neumocócica,

empiema estafilocócico, cáncer pulmonar, etc., mostrando títulos bajos como de 1:2 y 1:8 (1,12,33).

## B. Histoplasmosis

Esta infección es producida al inhalar las esporas del hongo causal, *Histoplasma capsulatum*, las cuales germinan en los espacios alveolares, atacando preferencialmente el sistema fagocítico mononuclear (6,40). La infección puede ser localizada o diseminada dependiendo del estado inmunológico del paciente. Puede ser asintomática o subclínica ya que se presenta en pacientes con calcificaciones pulmonares (8,14).

El hábitat natural de la fase saprofitica de este hongo está caracterizado por un alto contenido de fósforo y nitrógeno, como el encontrado en el suelo mezclado con guano de murciélago, excretas de aves, etc. ya que éstas proporcionan el pH adecuado que oscila entre 5-10, siendo el óptimo de 5-7. Por lo regular, se encuentran en cuevas inexploradas, minas abandonadas, graneros y silos. El clima apropiado para su desarrollo es el tropical-húmedo con abundante vegetación (10,41-44). Esta fase crece como micelio blanco o pardo con macroaleurosporas esféricas, con proyecciones digitiformes y de superficie lisa o espiculada (6,10).

Aunque es un hongo de distribución cosmopolita, es el más importante y de mayor trascendencia en el continente americano ya que prefiere las condiciones antes mencionadas. Se ha aislado en países como: Africa, Burna, Camboya, Estados Unidos, Honduras, India, Indonesia, México, Nicaragua, Panamá, Tailandia, Venezuela y en Guatemala se ha encontrado en las regiones de Alta Verapaz, Escuintla y en la ciudad capital (5,22,45).

### 1. Estudios realizados en Guatemala

A manera de establecer el área endémica de la enfermedad, Bonnatti (1973), realizó estudios epidemiológicos en las zonas urbanas de la ciudad de Guatemala y Escuintla, demostrando la alta incidencia de los reactores a la histoplasmina en estas dos regiones (44). Así mismo, Fratti (1976) confirmó los estudios de Bonnatti al encontrar una alta reactividad cutánea a la histoplasmina en los residentes de Escuintla y al aislar *H. capsulatum* del suelo del parque de Escuintla donde se encuentra un hábitat adecuado para el mismo (con excretas de paloma, golondrinas y otras aves) (45). Siguiendo con estos estudios Izaguirre (1983), aisló el hongo de las grutas de San Agustín Lanquín, Alta Verapaz, donde se obtuvo una alta reactividad cutánea a la histoplasmina (10). Para poder contar con el diagnóstico de esta micosis, Leytán (1987), produjo el antígeno de *H. capsulatum* y lo evaluó por medio de la prueba de inmunodifusión (40).

Haciendo un intento por establecer si la ciudad capital de Guatemala es área endémica de histoplasmosis, Leytán (1991), logró el aislamiento de dos cepas de *H. capsulatum* del suelo en dos localidades de la ciudad de Guatemala, estas dos cepas fueron distintas entre sí, una es albina

y la otra con pigmento oscuro al dorso. De tal manera se puede considerar que el área muestreada (Avenida de la Reforma, Zona 10 y Ruta 6, Zona 4) es región endémica a esta micosis (46).

## 2. Respuesta inmune

En la respuesta inmune natural se observa que los polimorfonucleares tienen una actividad lítica por medio de su metabolismo oxidativo y no oxidativo (enzimático). Por su parte, los macrófagos mononucleares son muy activos, y se observa que este hongo puede activar las dos vías del complemento, tanto la clásica como la alterna. En la inmunidad celular las infecciones por este hongo tienen una gran actividad blastogénica estimulando la proliferación masiva de linfocitos T, sus linfoquinas y los factores de activación e inhibición de macrófagos (MAF y MIF, respectivamente).

Aunque una segunda infección por este hongo se puede contar como muy rara, se cuenta con inmunidad adquirida. Los anticuerpos con mayor especificidad contra el hongo causal de histoplasmosis son los de tipo IgM, IgG e IgA. Los niveles de IgM aumentan en infecciones tempranas, agudas o regresivas y los de IgG aumentan en infecciones activas. Además, se elevan los niveles de IgA en infecciones pulmonares crónicas y los de IgE en infecciones activas (14).

## 3. Diagnóstico

A esta enfermedad se le deben aplicar los mismos criterios que los observados con la coccidioidomicosis (8,31).

El diagnóstico micológico se lleva a cabo por los siguientes exámenes:

a) **Examen directo:** Se realiza una preparación en fresco del material obtenido, la cual no es adecuada para la demostración del hongo causal (8,31). Este hongo se caracteriza por presentar levaduras globulares de paredes gruesas y multigemaciones. Este procedimiento se utiliza como primera línea de diferenciación con otros hongos sistémicos (8,18).

b) **Histología:** Para evidenciar las levaduras multigemantes en tejido luego de los cortes respectivos, se procede a utilizar tinciones especiales como: las de Wilson, plata-metenammina de Gomory, Giemsa, Wright, Gram y PAS para *H. capsulatum* (3,35).

c) **Cultivo:** Ya que es difícil observar el hongo en el examen directo se trata de ponerlo de manifiesto al cultivar el material biológico obtenido, para ello se utilizan los medios de Sabouraud, Sabouraud adicionado de cicloheximida y cloranfenicol, Tripticasa Soya con 5% de sangre de conejo, Agar Papa Glucosa, con incubación a 28 °C durante 15 días. Al final de este período se observan colonias con micelio algodonoso o aterciopelado y con la edad su centro puede tornarse

café. Microscópicamente, se observan macroaleurosporas de paredes gruesas, multigemantes (3,8,47).

Para obtener la fase levaduriforme se pueden utilizar los medios de Agar Trypticosa Soya con 5% de sangre de conejo, Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI) con 5% de sangre de carnero, Agar con 2% de glucosa incubado a 37°C aeróbicamente por una semana, además de inoculación en ratones (47).

**d) Serología:** En muchos casos con los procedimientos anteriores no se tiene éxito, por lo que la serología es de gran ayuda en el diagnóstico de estas micosis (9,10,44).

Actualmente la prueba serológica más utilizada es la ID por ser simple, sensible, específica y barata. Para esta prueba los sueros de pacientes con histoplasmosis comprobada presentan una o dos bandas de precipitación, denominadas H y M. La banda que más se aproxima al sitio del antígeno se denomina M y es signo de infección activa, crónica, progresiva o que la persona fue inmunizada cutáneamente o son residentes del área endémica. La banda más cercana al antisuero se denomina H, la cual es indicativa de infección activa, reciente o que se ha realizado prueba intradérmica (IDR) recientemente (14,39).

La prueba de FC es muy útil en el diagnóstico de la histoplasmosis ya que cuantifica los anticuerpos de los pacientes en el proceso infeccioso. La técnica es muy complicada por sus múltiples procedimientos preliminares, por lo que no es rutinaria.

Al utilizarse el antígeno de *H. capsulatum* obtenido de su fase miceliar esta prueba tiene una mayor sensibilidad y permite evidenciar una histoplasmosis, al encontrar títulos de 1:8 se debe sospechar fuertemente de infección mientras que títulos mayores a 1:16 evidencian la infección, tanto que títulos mayores o iguales a 1:32 junto a bandas de precipitación específicas en ID correlacionan muy bien con el diagnóstico certero de histoplasmosis. Entre otras pruebas se han utilizado además, la aglutinación de partículas de latex y hemaglutinación (30,48-50).

### **C. Pruebas serológicas**

#### **1. Inmunodifusión (ID)**

La técnica de ID se utiliza para el diagnóstico de varias enfermedades por ser sensible, específica, sencilla y de bajo costo además de ser fácil de implementar (40).

Esta técnica consiste en la reacción de un antígeno soluble y su antisuero (homólogo) difundido por un gel de agar, de manera que al alcanzar las concentraciones óptimas entre ambos reactivos, precipitan formando bandas de identidad características de cada enfermedad. Puede detectar

cantidades de antígeno o antisuero de 50 - 200 ug/ml (11,51-53).

Sus desventajas son: los efectos de prozona, reacciones cruzadas y el hecho de ser sólo cualitativa; por esta razón no permite hacer el pronóstico a los pacientes (51).

## 2. Fijación de Complemento (FC)

La técnica de Fijación de Complemento se utiliza como otra prueba diagnóstica de rutina para varias enfermedades. Tiene la ventaja de ser muy sensible ya que mide pequeñas cantidades de antígeno (menos de un microgramo) o de anticuerpo (14,51).

Esta técnica consiste en hacer reaccionar un antígeno soluble con el anticuerpo para que se fije el complemento, de manera que cuando se añade el sistema indicador de hemáties sensibilizados; el grado de lisis observada será proporcional a la cantidad del complemento restante en el sobrenadante (53-55).

Además, esta técnica puede hacerse semicuantitativa al titular el suero problema para determinar la dilución más baja, de esta forma es posible indicar el estadio de la enfermedad con los cambios de títulos en regresión o progresión (7,27,52).

Entre sus desventajas está que no es una medida absoluta del total de los isotipos de anticuerpos, ya que sólo detecta cierto tipo (IgG1, IgG2 e IgM). Pero la principal desventaja es la obtención de reacciones cruzadas entre coccidiodomicosis, blastomicosis, paracoccidiodomicosis, tuberculosis y otras enfermedades. Aunque para reducir este error se realizan estudios entre los cuales se puede citar el realizado por Pine y colaboradores (52) donde se usa histoplasmina en caliente para reducir su reacción cruzada con *C. immitis* (52,56,57).

Por otra parte, es una técnica difícil debido al número de reactivos utilizados, ya que cada uno debe ser titulado y controlado por separado y evaluado cada vez que se corra la prueba. Debe tomarse en cuenta que los resultados no son interpretables si los controles no trabajan adecuadamente (58).

La fallas más frecuentes son: anticomplementariedad de los sueros y pérdida de la actividad del complemento (58).

## IV. JUSTIFICACIONES

En Guatemala, las micosis causadas por *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis* son poco conocidas, los signos y síntomas de los pacientes infectados con estos hongos son muy inespecíficos y similares a los producidos por tuberculosis, de tal forma que frecuentemente reciben tratamientos inadecuados, que contribuyen al deterioro y muerte de los pacientes.

El médico al sospechar micosis, envía al laboratorio muestras del material biológico extraído para su estudio. Generalmente se utiliza el esputo del cual es difícil aislar a los agentes de estas micosis. Muestras como cepillados bronquiales y biopsias de bronquio o pulmón son métodos más agresivos que requieren de equipo hospitalario. Por lo anterior se ha profundizado en el diagnóstico serológico de estas micosis y para tal efecto en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia se ha logrado instituir dos pruebas cualitativas: la inmunodifusión simple y la precipitación en tubo, utilizando los antígenos producidos localmente a partir de cepas autóctonas. Estas pruebas cualitativas son de gran ayuda en el diagnóstico rápido y específico de estas enfermedades, pero para el seguimiento y evaluación de los pacientes es necesario contar con una prueba cuantitativa como lo es la fijación de complemento, la que además detecta menores cantidades de anticuerpos y junto a las pruebas anteriores contribuirá a mejorar el inmunodiagnóstico de las micosis sistémicas en Guatemala.

## V. OBJETIVOS

### A. GENERAL

Complementar el diagnóstico de las infecciones producidas por **Histoplasma capsulatum** y **Coccidioides immitis** por medio de la técnica de Fijación de Complemento, en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

### B. ESPECIFICOS

1. Implementar la prueba de Fijación de Complemento, usando la histoplasmina y coccidioidina producidas localmente y sus respectivos antisueros.
2. Estandarizar la prueba de Fijación de Complemento en las condiciones de laboratorio local.
3. Comparar los resultados obtenidos con los de la técnica de inmunodifusión.

## VI. HIPOTESIS

A. La prueba de Fijación de Complemento es complementaria a la Inmunodifusión en el diagnóstico de las micosis causadas por **Histoplasma capsulatum** y **Coccidioides immitis**, usando antígenos y anticuerpos fúngicos producidos de cepas guatemaltecas y en las condiciones que presenta la implementación en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

B. Existe correlación entre los títulos de la prueba de fijación de complemento y las bandas obtenidas con la prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de histoplasmosis y coccidioidomicosis

## VII. MATERIALES Y METODOS

### A. Universo de trabajo

El universo de trabajo está formado por pacientes con enfermedades pulmonares en las áreas endémicas a histoplasmosis y coccidioidomicosis de la República de Guatemala; localizadas en Escuintla y Zacapa, respectivamente.

La muestra estuvo representada por 83 pacientes sospechosos o no sospechosos de padecer una micosis profunda. Fueron divididos en tres grupos elegidos a conveniencia, los que permitieron evidenciar las reacciones cruzadas en la técnica fijación de complemento.

### B. Recursos

#### 1. Humanos

Autora: Mónica Illescas Azurdia

Asesora: Licda. María Luisa García Masaya. Encargada del Area de Inmunodiagnóstico del Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

#### 2. Institucionales:

- a. Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, instalaciones, reactivos, materiales y equipo.
- b. Departamento de Oncocercosis del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria, donación de placas de microtitulación.
- c. Sanatorio antituberculoso "San Vicente", sueros de pacientes con tuberculosis confirmada.
- d. Docentes de departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma de México -UNAM-, asesoría y algunos reactivos a utilizar.
- e. Lic. Oscar Gómez del laboratorio Macrolab de Zacapa, por 25 sueros de pacientes aparentemente sanos de esa localidad.
- f. Personal del Hospital Nacional de Escuintla, por la donación de muestras de sangre, de pacientes aparentemente sanos.
- g. Dr. Roberto Maselli, Jefe del Laboratorio Multidisciplinario de la Facultas de Medicina de la USAC.
- h. Lic. Frederick Trent del Laboratorio La Esperanza, por la donación de sangre de carnero y el préstamo de hemolisina y complemento.

### 3. Físicos

#### a. Reactivos: (grado reactivo o equivalente)

- Solución de gelatina-agua
- Solución stock de cloruros de magnesio y calcio
- Diluyente stock veronal bufferado
- Diluyente de trabajo veronal
- Suspensión de glóbulos rojos de conejo al 2.8 %
- Hemolisina
- Complemento de cobayo, fresco
- Antígenos fúngicos de **Histoplasma capsulatum** lote 1992 y **Coccidioides immitis** lote 1989 producidos en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC
- Antisueros producidos en conejas contra **H. capsulatum** y **C. immitis** obtenidos en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la USAC
- Sueros control de pacientes positivos de micosis confirmadas
- Glicerina
- Agar, agarosa o agar noble
- Azida de sodio
- Cloruro de sodio
- Buffer stock
- Fenol al 5 %
- Acido clorhídrico
- Na-5,5-diethylbarbiturato (barbital sódico)
- Agua destilada

#### b. Equipo

- Refrigeradora a 4 °C
- Congelador -20 °C
- Centrífuga
- Reloj o cronómetro
- Incubadora a 37 °C
- Vibrador mecánico
- Baño de maría a 37 y 56 °C
- Potenciómetro
- Bomba de vacío
- Lámpara (luz directa e indirecta)
- Pipetas automáticas multicanales y sencillas

### **c. Materiales**

- Termómetros (para baño de maría, refrigeradora y congelador)
- Gradilla con tubos de ensayo
- Tubos de centrifuga de 10 y 30 ml.
- Pipetas serológicas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm o tubos serológicos
- Cristalería (cilindros, frascos volumétricos y erlenmeyers)
- Láminas cuadradas y portaobjetos
- Cajas de petri grandes
- Lámparas con luz directa e indirecta
- Perforador de pozos para ID
- Pipetas pasteur
- Tubos capilares sin heparina
- Gasa
- Papel filtro
- Placas de microtitulación con fondo en "U"

## **4. PROCEDIMIENTO:**

### **a. Fijación de complemento**

#### **1) SOLUCION DE AGUA-GELATINA**

- a) Colocar 100 ml de agua destilada y 1 gramo de gelatina en un erlenmeyer con tapón de rosca.
- b) Llevar la solución a ebullición y permitir que la solución se enfríe a temperatura ambiente.
- c) Añadir 700 ml de agua destilada al erlenmeyery marcarlo con el nombre de la solución y fecha de preparación. Almacenar en la refrigeraadora a 4°C

La solución de gelatina no se usó después de una semana de almacenada.

#### **2) SOLUCION STOCK DE CLORUROS DE MAGNESIO Y CALCIO**

(una solución de cloruro de magnesio 1M y de cloruro de calcio 0.3M.)

- a) Colocar 20.3 gr de cloruro de magnesio hexahidratado y 4.4 gr de cloruro de calcio dihidratado en un erlenmeyer de 250 ml.
- b) Agregar agua destilada para un volumen total de 100 ml.
- c) Mezclar por rotación y almacenar a 4 °C.

#### **3) DILUYENTE STOCK DE BUFFER VERONAL**

- a) En un recipiente volumétrico de 2 litros colocar 1,500 ml de agua destilada, 83 gr de NaCl

- 10.19 gr de barbital sódico. Mezclar por rotación hasta que se disolvieran los solutos
- b) Agregar 34.58 ml de HCl 1N y 5 ml de solución stock de cloruros. Mezclar por rotación.
  - c) Completar el volumen a 2 litros y mezclar por inversión bastantes veces. Almacenar la solución a 4 °C.
  - d) Verificar el pH: Hacer una dilución 1:5 con agua destilada. El pH debe estar entre 7.3 y 7.4, de lo contrario se debe hacer un diluyente nuevo.

#### 4) DILUYENTE VERONAL BUFFERADO DE TRABAJO (VBD)

Esta dilución se hace el mismo día que se utiliza.

- a) Colocar 200 ml de solución stock de buffer en un recipiente volumétrico de 1 litro y llenar hasta la marca con solución de gelatina, mezclando por inversión bastantes veces.
- b) Verificar que el pH esté entre 7.3 y 7.4.
- c) Marcar el recipiente con nombre y fecha de preparación. Almacenar a 4 °C.

#### 5) LAVADO DE ERITROCITOS DE CARNERO

- a) Filtrar las células preservadas en dos láminas de gasa a un tubo de centrifuga cónico graduado.  
Llenarlo a 15 ml con VBD frío.
- b) Centrifugar a 2,000 rpm por 5 min y remover el sobrenadante por succión. Repetir el lavado 3 veces.
- c) Observar si el sobrenadante tiene color. Si es así, descartar las células y regresar al paso a.
- d) Resuspender las células en 10 ml de VBD frío y centrifugar a 2,000 rpm por 10 min.
- e) Hacer la suspensión al 1.4%.

#### 6) ESTANDARIZACION DEL METODO DE SUSPENSION DE ERITROCITOS AL 1.4%

- a) Colocar 34.7 ml de VBD para cada 0.5 ml de la paquete de eritrocitos en un erlenmeyer .
- b) Rotar el erlenmeyer para asegurar el homogenizado de la suspensión.
- c) Revizar la suspensión si realmente está a 1.4%. Pipetear 7 ml de la suspensión en un tubo de centrifuga de 10 ml, a 2,000 rpm durante 10 min.
- d) Leer el volumen del paquete celular:
  - i. si es de 0.1 ml la suspensión es correcta, devolver los 7 ml al recipiente.
  - ii. si el volumen es mayor o menor de 0.1 ml, ver el paso e.
- e) Para corregir se usa la fórmula:

$$\text{Volumen corregido} = \frac{\text{Lectura actual}}{\text{Lectura corregida}} \times \left( \text{Volumen Original de suspensión celular} - 7 \text{ ml} \right)$$

- f) Volumen corregido menor del existente ver i.  
volumen corregido mayor del existente ver g.
- g) Volumen de VBD a añadir = Vol. corregido - Vol existente y añadir VBD frío calculado a la suspensión de eritrocitos. Rotar el erlenmeyer para asegurar el homogenizado de la suspensión.
- h) Regresar al paso c para asegurar la dilución.
- i) Volumen de VBD retirado = Vol. existente - Vol corregido. Remover el volumen de VBD calculado.
- j) Regresar al paso d para revisar la dilución.

## 7) TITULACION DE HEMOLISINA

Realizarlo cada vez que se va a utilizar o con un nuevo lote.

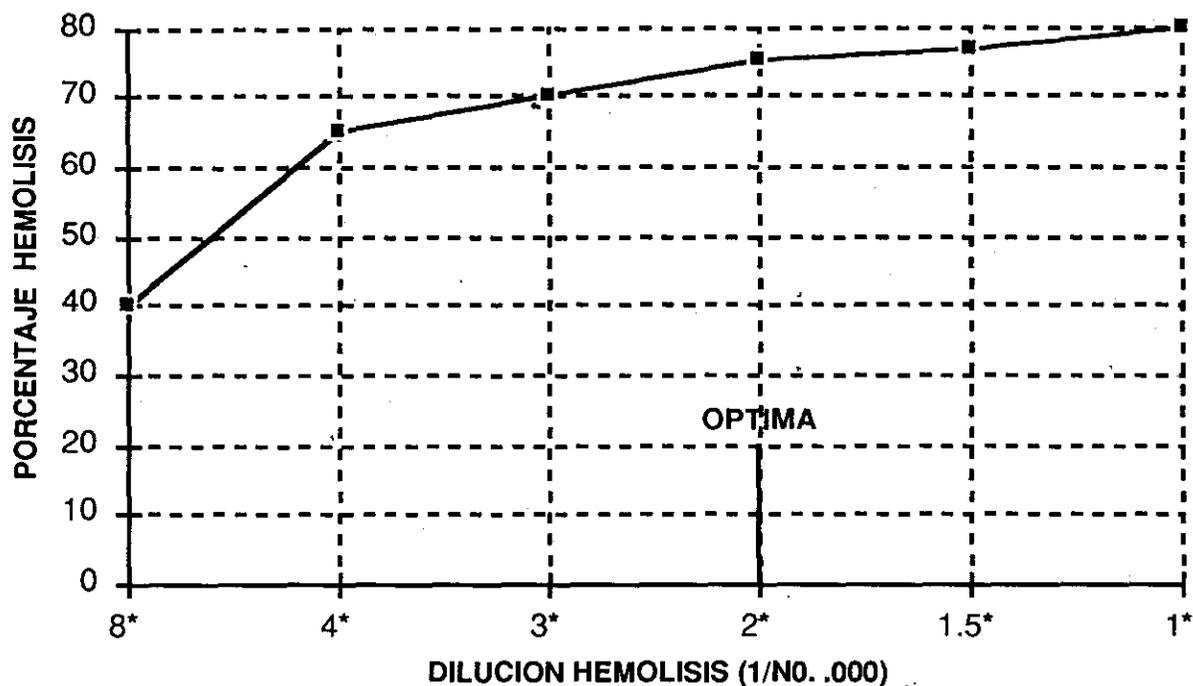
- a) Preparar la dilución stock de hemolisina de 1:100.  
Colocar 98 ml de VBD frío y 2 ml de hemolisina glicerinizada en un erlenmeyer, mezclar por rotación y almacenar a 4 °C.
- b) Dilución 1:1000 y subsiguientes.
  - i. Rotular 13 tubo de 15 x 125 mm con las diluciones que se muestran en la tabla I.
  - ii. Colocar las cantidades necesarias de VBD frío y hemolisina 1:100 como se indica en la tabla I.

Tabla I: Preparación de diluciones subsiguientes de Hemolisina:

Dilución final	ml de VBD	1 ml de Hemolisina de
1:1000	9.0	1:100
1:1500	0.5	1:1000
1:2000	1.0	1:1000
1:2500	1.5	1:1000
1:3000	2.0	1:1000
1:4000	3.0	1:1000
1:5000	4.0	1:1000
1:6000	1.0	1:3000
1:7000	6.0	1:1000
1:8000	1.0	1:4000
1:10000	1.0	1:5000
1:12000	1.0	1:6000

- c) Preparar la solución de Complemento (C') de 1:100.
- Medir 9.9 ml de VBD frío y colocarlo en un erlenmeyer. Sobre éste gotear 0.1 ml de C' concentrado.
  - Mezclar por rotación suavemente y colocar la dilución en la refrigeradora por 20 min. (estabilidad de 2 horas), en lo que espera se siguió con d) i -iii.
- d) Preparación de células sensibilizadas para titulación de hemolisina.
- Colocar 13 tubos de 13 x 100 mm en gradilla, rotularlos con las diluciones de la tabla I.
  - Añadir 1 ml de suspensión de eritrocitos al 1.4% a cada tubo y 1 ml de cada dilución en el tubo correspondiente, despacio y con rotación constante.
  - Agitar la gradilla y colocar en baño de maría a 37 °C por 15 min. para sensibilizar las células.  
En el transcurso del tiempo continuar con e) i.
- e) Preparar la titulación de hemolisina
- Marcar 13 tubos serológicos (13 x 100 mm), como se hizo en d 1).
  - A cada tubo colocar 0.4 ml de VBD frío, 0.4 ml de C' al 1:100' agitar la gradilla y agregar 0.2 ml de células sensibilizadas, por dilución a su respectivo tubo.
  - Agitar cada tubo. e incubar en baño de maría 37 °C por una hora, a los 30 min agitar unavez.  
En este tiempo preparar los estándares de colores (Paso 9)).
- f) Determinación de dilución de hemolisina necesarios para sensibilización de células al 1.4%.
- Centrifugar los tubos a 2,000 rpm durante 5 min y compararlos con los estándares de color.  
Si un tubo iguala un estándar, leer y anotar el % de hemólisis.  
Si no le da a ningún estándar, interpolar 5% y anotar la lectura.
  - Plotear en papel aritmético, dibujar las líneas de unión de puntos. Examinar en la curva el Plateau" ( que es el nivel en que la cantidad de hemólisis no crece en porcentaje).
  - Tomar la segunda dilución en Plateau como dilución a usar para la sensibilización de células.

Titulación de la hemolisina:



NOTA: El C' comercial de 1:400 generalmente comprende una hemólisis de 30 a 80 % para sensibilizar óptimamente las células como muestra la figura anterior. Para obtener el porcentaje correcto de hemólisis con baja actividad de C' puede ser necesario el uso de la dilución 1:300, para la titulación con un C' potente es necesario la dilución 1:500. Para hacer la gráfica: colocar 0 en la parte izquierda del eje X y se coloca las diluciones de menor a mayor (última dilución 1:1000). De tal manera que las diluciones representan fracciones de la gráfica. Ejemplo: m 1:500 = 2/3, 1:2000 = 1/2, 1:3000 = 1/3, 1:4000 = 1/4 y 1:8000 = 1/8. (En el papel aritmético de 20x20 de pulgada, usando 6 pulgadas para colocar 1:1000). En Y va el porcentaje de hemólisis.

## 9) PREPARACION DE ESTANDARES DE COLOR DE HEMOGLOBINA

- a) Preparación de solución de hemoglobina.
  - i. Colocar 1 ml de suspensión de eritrocitos al 1.4 % y 7 ml de agua destilada a un tubo de 15 x 125 mm, mezclar para lisar las células.
  - ii. Añadir 2 ml de solución buffer stock al tubo. Agitar la solución de hemoglobina y apartar hasta que se necesite.

- b) Preparación de la suspensión de 1.4 %:
  - i. Colocar 1 ml de la suspensión de 1.4% y 9 ml de VBD frío a un tubo de 15 x 125 mm.
  - ii. Agitar la suspensión y colocar aparte rotulada.
- c) Preparación de estándares de color:
  - i. Marcar 11 tubos serológicos con porcentaje de hemólisis como se muestra en la tabla II, al tubo 0 colocarle la fecha y hora.

Tabla II Preparación de los estándares de color de hemoglobina

Reactivos	Porcentajes de Hemólisis										
Porcentajes	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Soln de Hb	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Células 0.28%	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0

- ii. Colocar las cantidades indicadas en la tabla II de cada reactivo en el tubo correspondiente, agitar la gradilla.
- iii. Centrifugar a 2,000 rpm por 5 min y colocarlos sin agitar a 4 °C hasta necesitarlos.

## 10) TITULACION DE COMPLEMENTO

- a) Preparar C' al 1:150
  - i. Colocar 14.9 ml de VBD frío y gotear 0.1 ml de C' (frío) en recipiente
  - ii. Agitar suavemente y dejar la dilución en la refrigeradora por 20 min.
- b) Preparar 7 ml de células sensibilizadas:
  - i. Colocar 3.5 ml de suspensión de eritrocitos al 1.4% y 3.5 ml de la dilución óptima de hemolisina a un tubo de 13 x100 mm.
  - ii. Agitar con movimiento rápido e incubar en baño de maría a 37 °C durante 20 min. En este tiempo seguir en c) i.
- c) Preparar de la titulación de C':
  - i. Marcar 12 tubos de 13 x 100 mm.
  - ii. Agregar el VBD y el C' en las cantidades indicadas en Tabla III y agitar la gradilla.
  - iii. Añadir 0.5 ml de células sensibilizadas a cada tubo, agitar la gradilla y colocar en baño de maría a 37 °C durante 15 min.

- iv. Al pasar este tiempo, resuspender las células no lisadas y devolver al baño de maría por otros 15 min para totalizar 30 min.

Tabla III: Cantidades de reactivos utilizados para la titulación del complemento

TUBO												
Reactivos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
VBD	0.61	0.59	0.57	0.56	0.55	0.54	0.53	0.52	0.51	0.49	0.46	0.45
C' en 1:150	0.14	0.16	0.18	0.18	0.20	0.21	0.22	0.23	0.24	0.26	0.28	0.30
VBD	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Células Sensibilizadas	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

- d) Leer el porcentaje de hemólisis
  - i. Centrifugar los tubos a 2,000 rpm por 5 min.
  - ii. Leer y anotar los resultados al comparar con los estándares de hemoglobina, si no coinciden interpolar 5%
  
- e) Determinar el volumen de C' que produce el 50 % de hemólisis
  - i. Tomar como resultado el leído por comparación con los estándares de color.
  - ii. Si no se encuentra con los estándares e interpolación utilizar la tabla IV, para ver los factores de conversión, los cuales servirán para ser sustituidos en la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Factor para \% de hemólisis}}{\text{ml de C' 1:150 que dio el \% de hemólisis}} = \frac{\text{Factor para el 50\% de hemólisis}}{\text{X ml de la dilución 1:150 que da el 50 \% de hemólisis}}$$

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
 Biblioteca Central

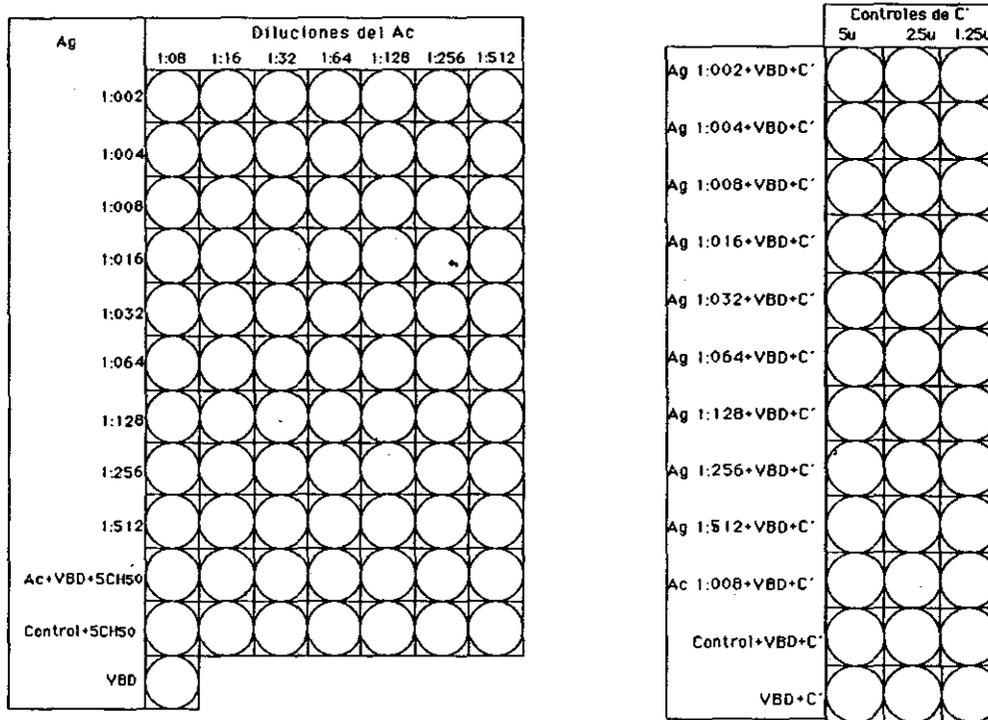
Tabla IV: Factores de conversión para el porcentaje de hemólisis

% de hemólisis	Factor	Hemólisis	Factor
20	0.758	55	1.041
25	0.803	60	1.084
30	0.844	65	1.132
35	0.844	70	1.185
40	0.922	75	1.246
45	0.961	80	1.320
50	1.000		

## 11) TITULACION DE ANTIGENO

- a) Dilución inicial del antisuero en 1:2
  - i. En un tubo serológico colocar 4 ml de VBD y 4 ml de antisuero, mezclar con pipeta.
  - ii. Para inactivar el suero en baño de maría a 56 °C por 30 min (los tubos deben estar tapados).  
En este tiempo puede continuar con b) i.
  
- b) Preparación de diluciones de suero
  - i. Marcar 6 tubos serológicos para replicar la dilución maestra del antisuero de 1:4 a 1:2048, 7 tubos para replicar la dilución del antígeno 1:2 a 1:512 y un tubo para antígeno positivo en su dilución óptima.
  - ii. Colocar 3 ml de VBD frío a cada tubo de dilución del anticuerpo (Ac).
  - iii. Preparar una dilución 1:4 a partir de la 1:2 que está inactivada y fría, añadir 3 ml de VBD frío a la dilución 1:2 en el tubo 1:4; seguir con los demás tubos hasta una dilución 1:2048, mezclar con pipeta.

Figura No. 1: Esquema del acomodo de los tubos para la titulación del antígeno



c) Diluciones de Antígeno (Ag)

- i. Colocar 3 ml de VBD a cada tubo de los tubos de dilución del antígeno.
- ii. Preparar una dilución inicial de 1:2 con 3 ml de VBD al tubo para 1:2 y continuar con las diluciones subsiguientes.

d) Preparar titulación de antígeno

- i. Colocar 0.2 ml de la dilución inicial del suero a cada tubo de control de C', 0.2 ml de suero diluido a los tubos y controles, 0.2 ml de antígeno a los tubos incluyendo C'- antígeno, 0.2 ml de dilución óptima del antígeno a l tubo correspondiente , VBD frío y células control (ver figura siguiente).
- ii. Agitar todos los tubos y dejar reposar 15 min a temperatura ambiente.



células sensibilizadas a todos los tubos de la titulación de antígenos y agitar la gradilla.

- v. Incubar a 37 °C en baño de maría durante 30 min.
  - vi. Preparar las hojas de informes como se ve en la figura No. 1.
- g) Determinar la dilución óptima del antígeno
- i. Examinar cada tubo para lisis incompleta. Si los tubos no muestran lisis completa, centrifugar a 2,000 rpm durante 5 min.
  - ii. Leer y se anotar los porcentaje de hemólisis de los C' controles usando los estándares de color. Interpolar cerca de 5%.
  - iii. Comparar las lecturas de C' control con la tabla V; para determinar si son aceptables. Si la lectura de los controles no son aceptables omitir los resultados.

Tabla V: Porcentaje de hemólisis en controles de C', en titulación de Ag

Tipos de Control	5u C'H <sub>50</sub>	2.5u C'H <sub>50</sub>	1.25u C'H <sub>50</sub>
Antígeno	100	85-100	0-75
VBD	100	90-100	40-75
Suero	100	90-100	0-75

- iv. Leer y anotar los resultados de todos los tubos y dibujar una línea entre 30% de hemólisis, aproximado a los puntos finales de cada dilución de antígeno. Interpolar lo necesario. La línea no debe ser dibujada entre ninguna dilución de antígeno anticomplementaria (AC).
- v. Seleccionar así la dilución que da la mayor cantidad de fijación, sólo la mejor dilución del antígeno (la dilución da los títulos mayores con cantidades de suero específicas).
  - si dos diluciones de antígeno dan reacciones de fijación idénticas con la curva, seleccionar la de mayor fijación a la derecha de la curva.
  - si dos diluciones de antígeno dan reacciones de fijación idénticas, seleccionar la dilución más baja.

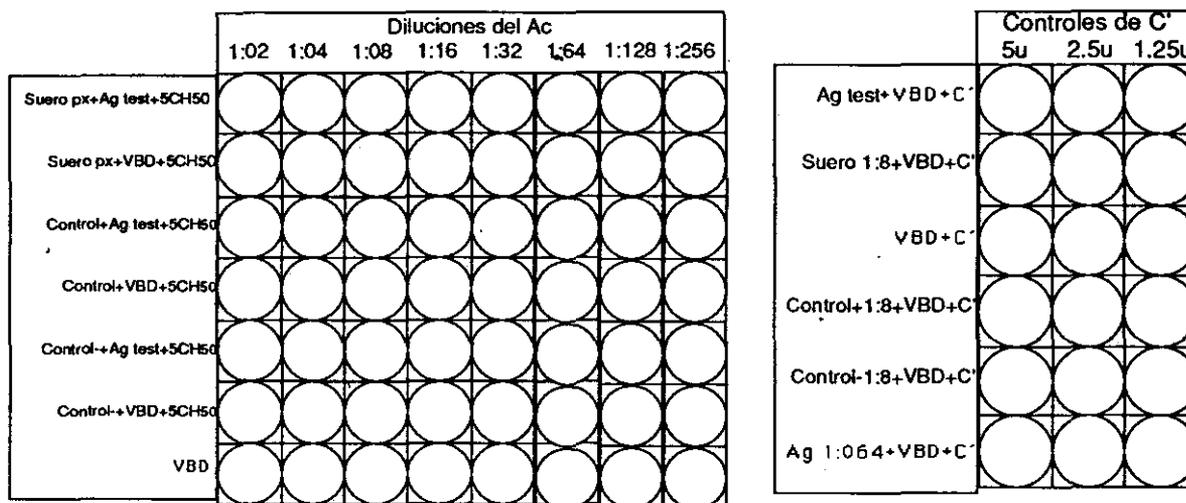
## 12) TEST DIAGNOSTICO (Micro-método)

- a) Preparar dilución del suero 1:2

**Nota:** Títulos de 1:2 y 1:4 pueden ser significativos en el diagnóstico de coccidioidomicosis.

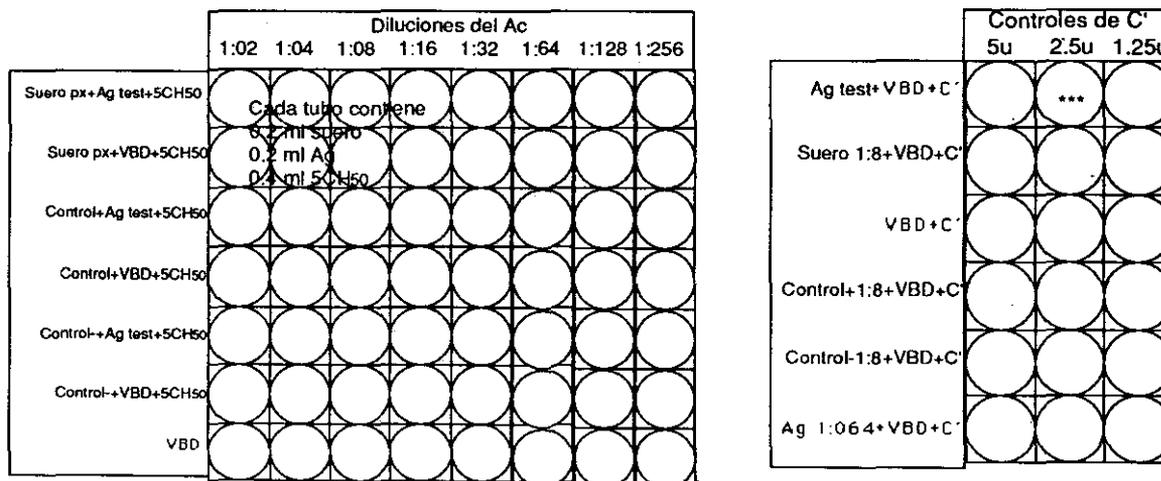
- i. Colocar 1.5 ml de VBD frío a 3 tubos de 13 x 100 mm y 1.5 ml de suero desconocido al No. 1, de suero control al No. 2 y suero negativo al No. 3, agitar con pipeta.
  - ii. Inactivar los suero durante 30 min a 56 °C en baño de maría.
- Se continua con b) i. y c) i.

Figura No. 3: Esquema del acomodo de los tubos para la prueba diagnóstica



- b) Preparar diluciones de suero:
  - i. Al cumplir los 30 min la dilución 1:2, colocar 0.025 ml de VBD frío a cada pozo que con la dilución 1:2.
  - ii. Después de enfriarse la dilución 1:2, colocar 0.05 ml de esta diluciones en el pozo correspondiente según la figura anterior.
  - iii. Tomar 0.025 ml de cada dilución 1:2 y se transferir al pozo de dilución 1:4. Mezclar durante 4 segundos. continuar hasta la dilución 1:256.

Figura No. 4: Cantidades de reactivos que se debe utilizar para la prueba diagnóstica



\*\*\* Para 5u = Suero 0.2 ml VBD 0.2 ml C' 0.4 ml

2.5u = Suero 0.2 ml VBD 0.4 ml C' 0.2 ml

1.25u = Suero 0.2 ml VBD 0.5 C' 0.1 ml

c) Colocar el test diagnóstico

Añadir 0.025 ml de dilución 1:2 de suero de paciente a cada control de C' (el control de C' puede ser omitido en la rutina), el control positivo y el control negativo.

d) Preparar las diluciones de antígenos (Inmediatamente antes del uso)

- i. Determinar el volumen de antígeno requerido; multiplicar el número de pozos por 0.025. Añadiendo un exceso por pipeteo.
- ii. Preparar cada antígeno test a la dilución óptima determinada durante la titulación de antígeno en tubos, usando VBD frío, mezclar con pipeta.
- iii. Añadir el antígeno diluido óptimamente y el VBD frío en los volúmenes mostrados en la figura No. 4. Y agitar las placas

e) Preparar el C' diluido

- i. Determinar el volumen requerido de C' diluido por la prueba: multiplicar el número de pozos por 0.05 ml, añadir exceso por pipeteo. Y calcular los volúmenes de VBD y C' necesarios para dilución de C' conteniendo 5C'H50 determinada en la titulación de C' en tubos.

Vol en ml de C' conc = Vol en ml deseado/ Recíproco de dilución de C' óptima.

Ejemplo:

Vol necesario = 40 ml / 13.3 = 0.3 ml

se puede usar 0.3 ml de C' + 39.7 ml de diluyente.

- ii. Colocar el VBD frío calculado en frasco y añadir el C' calculado por gotas, mezclar suavemente para evitar espuma. Dejar reposar el C' diluido en baño de hielo en la refrigeradora durante 20 min.
  - iii. Preparar una dilución 1:2 del C' diluido, conteniendo 5C'H50 en 50 ml.
    - Determinar el volumen de la dilución necesaria al multiplicar el números de pozos por 2.5 unidades control en la prueba por 0.05 ml. Añadir exceso por pipeteo.
    - Calcular el volumen de VBD y C' necesarios para la dilución de 1:2.
    - Añadir el C' diluido (conteniendo 5C'H50 en 0.05 ml) goteado al VBD calculado.
    - Mezclar suavemente para evitar espuma.
  - iv. Preparar el mismo volumen de dilución 1:2 para 1.25 unidades control.
- f) Agregar C' a la prueba
- i. Añadir 0.05 ml de C' diluido conteniendo 5C'H50 a cada pozo y a cada 5 unidades de pozo

- C' control. Mezclando inmediatamente.
- ii. Añadir 0.05 ml de dilución 1:2 de C' a cada pozo de 2.5 unidades de C' control y lo mismo con la dilución 1:4 de C' a los pozos de 1.25 unidades de C' control.
  - iii. Incubar en la refrigeradora de 4 a 6 °C durante 15 a 18 horas.  
Al día siguiente continuar con g) i.
- g) Preparar las células sensibilizadas
- i. Determinar el volumen de células sensibilizadas necesarias para la prueba: multiplicar el total de pozos en la prueba por 0.025 ml y agregar un exceso por pipeteo.
  - ii. Colocar la mitad del volumen de células sensibilizadas, de eritrocitos homogenizados y añadir un volumen igual de dilución óptima de hemolisina con rotación rápida.
  - iii. Incubar las células durante 20 min a 37,°C en baño de maría. Sacar las placas de la refrigeradora. Tomar las células del baño de maría en el tiempo estipulado y añadir 0.025 ml de células sensibilizadas a cada pozo.
  - iv. Continuar agitando las placas hasta que se resuspendieron las células. Taparlas con papel wrap transparente de 75 mm o celofán. Colocar en la incubadora a 37°C durante 30 min.
- i) Leer y anotar los resultados
- i. Preparar los estándares de color de 0, 30, 50, 70, 90 y 100 %. y las hojas adecuadas para la anotación de los resultados.
  - ii. Extraer las placas de la incubadora . Dejarlas en la refrigeradora durante 2 a 3 horas, para la sedimentación de las células.
  - iii. Leer y anotar los controles de C' por comparación de los estándares de color.  
Comparar las lecturas de C' control con la tabla VII para ver si son aceptables, si no lo son descartar los resultados y repetir el procedimiento (si VBD o C'-Ag son inaceptables repetir, si es un suero 1:2 colocarlo como AC)

Tabla VI: Límites aceptables de porcentajes de hemolisis en C' controles

5 C' H 50			
Tipos de control	5 u	2.5 u	1.25 u
Antígeno	100	85 - 100	0 - 50
VBD	100	90 - 100	30 - 50
Suero	75 - 100		

- iv. Al ser C' control aceptables, leer y anotar los porcentajes de hemólisis de cada pozo.

## b. INMUNODIFUSION

- 1) Preparar la solución adhesiva: colocar 2 gr de agar, 20 ml de glicerina y 200 ml de agua destilada en un recipiente para hervir. Llevar a ebullición la mezcla. Sumergir las láminas previamente lavadas y secas. Dejarlas secar de manera que se les ve opacas a trasluz.
- 2) Preparar el gel de agar al 1%: En un recipiente colocar 7.5 gr de glicina, 0.9 gr de cloruro de sodio, 0.01 gr de azida de sodio, 1 gr de agar y 100 ml agua destilada, llevar a ebullición esta mezcla. Antes que se enfríe y solidifique colocar 7.5 ml de la misma en los portaobjetos con solución adhesiva.  
Dejar reposar en cámara húmeda en la refrigeradora durante 24 horas. Perforar los pozos y utilizar las láminas.  
**NOTA:** No se debe dejar más de una semana las láminas en la refrigeradora. Para ésto se pueden hacer tubos dispensables luego de ser licuados.
- 3) Prueba diagnóstica: Seguir un patrón que contiene 6 pozos, en forma de roseta, donde en el pozo superior se colocó el control positivo y en el inferior el negativo, quedando 4 pozos disponibles donde se coloca los sueros de los pacientes. En el pozo del centro depositar el antígeno homólogo al control. Dejar reposar a temperatura ambiente y en cámara húmeda durante 48 horas. Haciendo lecturas cada 24 horas, con luz indirecta.

## 5. DISEÑO DE LA INVESTIGACION

Se realizó un estudio descriptivo con 83 individuos que fueron elegidos a conveniencia, no se recolectaron las muestra al azar en la República de Guatemala sino que se muestreó en áreas endémicas y a personas a quienes se les ha diagnosticado histoplasmosis y coccidioidomicosis, para establecer cualquier tipo de error o reacción cruzada con éstos y la técnica de Fijación de Complemento.

Los 83 sueros fueron obtenidos de la siguiente manera:

Grupo A: 24 pacientes sanos de cada área endémica de histoplasmosis y coccidioidomicosis, para un total de 48

Grupo B: 24 sueros de pacientes tuberculosos confirmados, sin ningún tipo de micosis.

Grupo D: 10 sueros de pacientes con las histoplasmosis y 1 con coccidioidomicosis.

Para el antígeno de *H. capsulatum* fueron 25, distribuidos de la siguiente manera:

Grupo A: 6 pacientes sanos de cada área endémica de histoplasmosis y coccidioidomicosis.

Grupo B: 6 pacientes tuberculosos confirmados.

Grupo C: 7 pacientes con histoplasmosis.

Este estudio fue doble ciego, a manera de establecer los falsos positivos y negativos que pueda

presentarse en la prueba. De igual manera se vería la sensibilidad y especificidad por medio de una tabla de dos por dos y se haría una comparación con la técnica de ID al utilizar la prueba de Kappa interclase. Lo cual no se pudo cumplir en su totalidad por problemas encontrados en el transcurso de la investigación; los cuales se indican en la discusión de resultados.

## 6. INTERPRETACION DE RESULTADOS

La interpretación de los resultados se hace en función del diagnóstico que se esté realizando.

De tal manera que para el diagnóstico de coccidioidomycosis, utilizando el antígeno de *C. immitis*; una dilución 1:4 evidencia que la persona ha tenido algún tipo de contacto con el hongo, y mayores o iguales a 1:8 representa una infección como tal. Pero en personas residentes de área endémica se puede tomar como sospechoso de infección desde un título de 1:2. Por otro lado, con el antígeno de *H. capsulatum*, empleado en el diagnóstico de histoplasmosis, se tiene que una dilución 1:8 es para evidenciar el contacto con el hongo y mayor o igual a 1:16 la infección; siempre y cuando el antígeno no sea derivado de la fase levaduriforme ya que éste provoca mayor cantidad de reacciones cruzadas e inespecíficas, que el antígeno derivado de la fase micelial (59).

A manera de soporte del diagnóstico debe correlacionarse el resultado de FC con el de ID; así que pacientes con una reacción en FC con diluciones desde 1:2 a 1:8, con cualquiera de los antígenos anteriormente mencionados y que produzcan bandas de identidad en ID permitirá confirmar el diagnóstico de la misma y con estos resultados se podrá evaluar el pronóstico del paciente (60).

## VIII. RESULTADOS

La prueba de Fijación de Complemento (FC) requiere un proceso o fase preliminar de titulación de los reactivos principales, tales como la hemolisina, el complemento y los antígenos; por lo que deben estar en óptimas condiciones.

Los reactivos utilizados en esta investigación llenaron los requisitos de alta calidad y potencia. Obteniéndose los siguientes títulos de trabajo a un 50% de hemólisis:

TABLA VII : Títulos a un 50% de hemólisis

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

Al realizar la estandarización de los antígenos se utilizó gran cantidad de ellos, de manera que los lotes de antígenos disponibles para la implementación y estandarización de la FC disminuyeron notablemente. En el caso de la Histoplasmina se trabajaron únicamente 25 sueros de pacientes distribuidos de la siguiente manera:

7 pacientes con histoplasmosis (diagnosticados 3 por PT, 4 por ID y de estos hay 3 cepas del hongo causal)

6 pacientes con tuberculosis confirmada por cultivo.

6 pacientes sanos de Escuintla

6 pacientes sanos de Zacapa.

De estos sueros el 85 % estaban contaminados con bacterias.

No así la coccidioidina, donde se utilizaron los 83 pacientes del banco de sueros, distribuidos así:

24 pacientes con tuberculosis confirmada por cultivo

24 pacientes de Escuintla

24 pacientes de Zacapa

10 pacientes con histoplasmosis (Diagnosticados 3 por PT, 7 por ID y de estos hay 3 cepas del hongo causal)

1 paciente con coccidioidomicosis (Diagnosticado por ID).

El 90 % de los sueros utilizados estaban contaminados por bacterias.

Con los títulos preestablecidos se procedió a realizar la prueba diagnóstica de FC en micrométodo. Donde se obtuvo los siguientes resultados:

TABLA VIII: Resultados de FC micrométodo

CRITERIO	COCCIDIOIDINA		HISTOPLASMINA	
	No.	%	No.	%
POSITIVO	34	40.96	15	60
NEGATIVO	49	* 59.04	10	40
TOTAL	83	100.00	25	100

Los títulos de los resultados positivos con FC fueron:

TABLA IX: Títulos de sueros positivos con FC

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

ND No hay dato dilución no significativa

\* Pacientes con ID positiva a cada antígeno señalado en el encabezado.

Resultados obtenidos con Inmunodifusión (ID):

TABLA XI: Resultados de ID.

CRITERIO	COCCIDIOIDINA		HISTOPLASMINA	
	No.	%	No.	%
POSITIVO	1	1.20	1	4
NEGATIVO	82	98.80	24	96
TOTAL	83	100.00	25	100

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

El objetivo principal de esta investigación fue el de complementar el diagnóstico de las infecciones producidas por *H. capsulatum* y *C. immitis* por medio de la implementación y estandarización de la prueba de Fijación de Complemento (FC), utilizando antígenos fúngicos y sus respectivos antisueros producidos en el Servicio de Micología, en condiciones de laboratorio local. Para lo cual se contó con la hemolisina comercial (Sigma) y el complemento fresco de cobayo, extraído por punción cardíaca al animal, un día antes de ser utilizado, según sugirió Toriello (Toriello C, comunicación personal). En la práctica, del cobayo se puede extraer un máximo de 3 ml de sangre sin matarlo, obteniéndose así aproximadamente 1.5 ml de suero, lo cual se comprobó al hacerlo así en esta investigación. Este al ser titulado dió una dilución de trabajo de 1:69 lo que indicó que se necesitaba por lo menos 45 ml de sangre para realizar toda la investigación. Además, el complemento fresco del suero de cobayo se destruye con facilidad, de manera que al ser utilizado después de 3 días de extraído no se obtienen resultados satisfactorios (Toriello C, comunicación personal). Tomando en cuenta lo anterior, se optó por utilizar el complemento de cobayo comercial (Shering), conjuntamente con la hemolisina comercial (Shering), ya que la hemolisina Sigma perdió su potencia por almacenamiento.

En manual de laboratorio del CDC de Atlanta se indica que la hemolisina se debe fenolizar para ser utilizada, sin embargo en la presente investigación ésta precipitó al ser congelada, observándose turbidez y disminución considerable de la potencia de la misma <sup>(61)</sup>; de tal manera que se procedió a prescindir del fenol, obteniéndose resultados satisfactorios.

Una vez estandarizados la hemolisina y el complemento a un 50 % de hemólisis, fue posible titular la histoplasmina y la coccidioidina, preparadas en el Servicio de Micología, las que mostraron títulos más bajos que los esperados (Toriello C, comunicación personal). Esto probablemente se deba a que se trata de antígenos crudos, los cuales no han sido sometidos a procedimientos químicos o naturales para purificación de las proteínas propias y/o específicas de cada hongo. Según estudios realizados por Toriello et.al los antígenos purificados han mostrado una mayor sensibilidad comparado con los antígenos crudos. Además, recomienda estandarizar la concentración protéica de los mismos para evitar la utilización de antígenos pobres en proteínas los cuales provocan la variación en los títulos cuando se realiza el diagnóstico de los pacientes (62,63, Toriello C, comunicación personal). Los antígenos utilizados tienen alto contenido de proteínas pero no fueron estandarizados a una concentración definida para ser utilizados con FC (Histoplasmina 1992 de 12, 430 Ug/ ml) y Coccidioidina 1989 de 19, 047 Ug/ ml)

Al haber obtenido los títulos de trabajo se procedió a trabajar con las muestras almacenadas a -20°C, tanto con ID como con FC para comparar posteriormente los resultados.

Al trabajar con los sueros se observó que en general, a pesar de haber sido tratados con thimerosal como preservante, se contaminaron con bacterias, lo que disminuyó casi un 80 a 90 %, de las muestras. Esto dió lugar además, a un mayor porcentaje de falsos positivos, ya que el complemento es destruido y/o utilizado por las mismas bacterias, inhibiendo su actividad, a manera de volver los sueros AC (anticomplementarios); de tal forma que la reacción de hemólisis observada, fue provocada

por las bacterias que utilizaron los eritrocitos positivizando de esta forma la prueba (28,30,31,58, Trent F, comunicación personal). Además, de la contaminación bacteriana, otros factores que eventualmente pueden alterar las pruebas funcionales de la FC son: todas las sustancias extrañas (por lo que la cristalería y placas de microtitulación deben estar extremadamente limpias o ser nuevas), como otros complejos antígeno-anticuerpo que se formen en el sistema, la heparina, los agentes quelantes y las inmunoglobulinas agregadas, como en el caso del mieloma múltiple (51,66). Lo anterior impidió hacer inferencias estadísticas. Aún conociendo las consecuencias de trabajar con muestras contaminadas, se consideró que por ser un trabajo de estandarización del método de FC era importante trabajar con las muestras tal y como se encontraban para poder tener experiencia de los resultados obtenidos con todo tipo de sueros.

Con la prueba de inmunodifusión (ID), la cual se realizó simultáneamente a la de FC, en la mayoría de los pacientes diagnosticados con anterioridad, en el Servicio de Micología por medio de ID, no se observaron bandas de identidad, con lo que se confirmó la disminución o pérdida de los anticuerpos precipitantes (IgG) en los sueros control, como consecuencia probablemente al congelamiento y descongelamiento continuos a los que fueron sometidos.

Además se tiene que el 85% de los sueros que dieron positiva la prueba de FC con coccidioidina estaban contaminados con bacterias dando así falsos positivos. Al igual que el 80% de los sueros positivos en la prueba de FC con histoplasmina. Esto se puede evidenciar con los sueros a los que se les realizó las pruebas con ambos antígenos y que dieron los dos positivo.

Los resultados obtenidos en esta investigación no están acordes con las experiencias realizadas en el Servicio de Micología, las que han sido satisfactorias en el área práctica con la ID (26). A su vez la literatura indica que el resultado de las dos técnicas, no es reemplazatorio; sino complementario para el diagnóstico y pronóstico del paciente en estudio (62-3).

## X. CONCLUSIONES

- A. Los antígenos y antisueros de *C. immitis* e *H. capsulatum*, producidos localmente presentan títulos bajos con la prueba de Fijación de Complemento.
- B. La prueba de Fijación de Complemento es posible realizarla en las condiciones que presenta el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- C. Para realizar la prueba de Fijación de Complemento en las condiciones del Servicio de Micología deben utilizarse el Complemento y la Hemolisina comerciales (Schering) y esta última sin fenolizar; ya que el fenol precipita al ser almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- D. La contaminación bacteriana provoca anticomplementariedad de sueros resultando falsos positivos.

## XI. RECOMENDACIONES

- A. Producir un complejo purificado de proteínas para cada antígeno.
- B. Utilizar sueros frescos o sin contaminación bacteriana, por lo que es necesario alicuotarlos para evitar el descongelamiento continuo.
- C. Realizar pruebas de la técnica de Fijación de Complemento con pacientes tanto con histoplasmosis como con coccidioidomicosis, para obtener experiencia; antes de hacer diagnósticos definitivos a pacientes nuevos.
- D. Debe utilizarse el complemento comercial hasta contar con un lote grande de cobayos, a los cuales se les debe de alimentar con forraje fresco y verde, para poder obtener una cantidad considerable de suero.
- E. Utilizar las dos técnicas, Inmunodifusión y Fijación de Complemento, en el mismo paciente para evaluarlo tanto en el diagnóstico como el pronóstico del mismo y obtener muestras seriadas durante el tratamiento y post tratamiento.
- F. Estandarizar la concentración protéica de los antígenos previo a ser utilizados en Fijación de Complemento, a una concentración de proteínas determinada por medio de pruebas previas.
- G. Evitar el uso del fenol al 5% al diluir la hemolisina glicerinizada 1:100, a manera de sustituir los 4 ml de fenol por VBD frío.

## XII. REFERENCIAS

1. Pérez E. Coccidioidomicosis en Guatemala. Guatemala: Imprenta Universitaria, 1971. 98p. (p. 25 - 60).
2. Mayorga R. Areas endémicas de Coccidioidomicosis en Guatemala. Guatemala: Resúmenes del Congreso Centroamericano de Microbiología. Doc. Tec. 1971. 289p. (p. 15-35).
3. Zaid P. Prueba de coccidioidina e histoplasmina en la población de la Villa de Tiquisate y sus alrededores. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1988. 69p.
4. Muñoz C. Aislamiento de *T. schoenleinii* del ambiente de Totonicapán y algunos factores que favorecen o inhiben su crecimiento. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1983. 60p.
5. Mayorga R, Camey L, Rendón J. Histoplasmosis en Guatemala. Res Con Nac Med 1971; 1: 19 - 23.
6. Medoff G, et. al. Morphogenesis and Pathogenesis of *H. capsulatum*. Inf Imm 1987; 6: 1355- 1358.
7. Jiménez J A. Caracterización bioquímica de hongos causantes de micosis profundas; Análisis inmunológico. México: Universidad Autónoma de México -UNAM-, (tesis de graduación, Facultad de Medicina), 1988. 33p.
8. Rippon JW. Medical Mycology. 2a. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1982. 587 p.
9. Maresca B, et. al. Role of cistein in regulation of morphology and mitochondrial activity in the dimorphic fungi. Proc Natl Acad Scien Microb, 1981; 7: 4596-4600.
10. Izaguirre T. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del suelo de Alta Verapaz. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1983. 63p.
11. Standard P, Kaufmann L. Specific immunological test for the rapid identification of the members of the genus *Histoplasma*. J Clin Microbiol 1976; 3:191-199.
12. Kobayashi GS, Pappagianis D. Preparation and standarization of antigens of *H. capsulatum* and *C. immitis*. Mycopath et Mycol Appl 1970; 41: 139-153p.

13. Ajello L. Comparative ecology of respiratory micotic disease agents. Rev Bac 1967; 31: 6-24p.
14. Cox R. Immunology of the fungal diseases. San Antonio, Texas: CRC Press Inc, 1989. 256p. (p.165 - 226).
15. Pérez A. Preparación, evaluación y estandarización de antígenos de *Coccidioides immitis* para el diagnóstico serológico por inmunodifusión. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1984. 50p.
16. George RB. Micosis Pulmonares; Revisión conceptual y terapéutica. Actualizaciones. Rev Med 1990; 3:5-7.
17. Rytel MW, Mogabgab WJ. Manual de Enfermedades infecciosas. México: Interamericana, 1989. XVI+546p. (p. 312-4).
18. Conant NF, et. al. Micología. México: Interamericana, 1972: XI + 592 p. (p. 134-69).
19. Zapater RC. Micología Médica. México: El Ateneo, 1981. X + 260 p. (p.162-9).
20. Andrade M. Investigaciones de la coccidioidomicosis en la capital de Guatemala por medio de intradermoreacciones a la coccidioidina. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de Graduación, Facultad de Medicina) 1945, 35p.
21. Mayorga R. Coccidioidomycosis in Central America. Proc 2nd Coccidioidomycosis Symp Arizona: University of Arizona Press, 1967; 450. (p 287-90)
22. David E. Encuesta epidemiológica sobre reactividad a la coccidioidina en el oriente de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1977. 36p.
23. Enríquez S. Aislamiento de *Coccidioides immitis* del suelo de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1978. 50p.
24. Leytán R, et. al. Aislamiento de *Coccidioides immitis* del suelo de Usumatlán, Zacapa. Guatemala: III Semana Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Doc. Tec. 1989. 92p.
25. Gómez O. Actualización epidemiológica sobre la intrademoreacción con coccidioidina en algunos municipios del departamento de Zacapa. Guatemala: Unersidad de San Carlos de

- Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1991. 54p.
26. García M. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la Inmunodifusión (ID) y la Fijación de Complemento (FC) utilizando antígenos producidos en el Servicio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala: Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1991. 8p.
  27. Kaufman L. Serodiagnosis of fungal disease. *Manual Clin Immun* 1975, 3: 363-81.
  28. Smith CE, et. al. Serological test in the diagnosis and prognosis of coccidioidomycosis. *Am J Hyp* 1950, 52: 1-21.
  29. Smith CE, Saito MT, Simons SA. Pattern of 39,500 serologic test in coccidioidomycosis. *J Am Med Assoc* 1956, 160: 546-552.
  30. Palmer DE, et. al. Serodiagnosis of micotic disease. Atlanta: American Lecture Series, 1977. XII + 191 p.
  31. Ruppert M. Serology of coccidioidomycosis. *Mycopath et Micol Appl* 1970; 41: 107-113.
  32. Jawetz E. *Microbiología Médica*. México: Interamericana, 1979. 650p. (p.310-5).
  33. Rose W, Friedman H, Fasshey J. *Manual of clinical laboratory immunology*. 3a. ed Washington: Mosby, 1986. 1563 p.
  34. Fox H. *Epidemiología; el hombre y la enfermedad*. México: La Prensa Médica Mexicana, 1970. 371p.
  35. Border G, Border N. Morphologic der gewebformen von erregen viszerale mycosies. *Mykosen* 1973; 16: 142-52.
  36. Mayorga R. Algunas consideraciones sobre las micosis pulmonares en México. *Patol* 1974, 12:63-78.
  37. Henry JB, Tood SD. *Clinical diagnosis and megment by laboratory methods*. 16a. ed. Atlanta: Saunders. Vol 2, vol 2, 1979. 2100 p. (p.1661-1730).
  38. Emmons C, et. al. *Medical Mycology*. 3a ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977. 592p. (p.164-84).

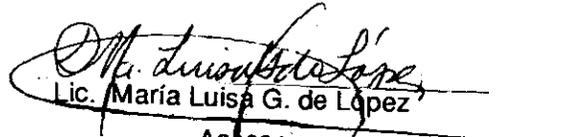
39. Organización Panamericana de la Salud. Manual of standardized serodiagnostic procedures for systemic mycoses. Part I: Agar immunodiffusion test. Washington: Public Health Service, 1972. 14 p.
40. Leytán AD. Diagnóstico serológico de histoplasmosis por inmunodifusión. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1987. 63p.
41. Kestler JE. Estudio comparativo entre Histo-test y macroinmunodifusión para el diagnóstico de histoplasmosis. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1982. 39p.
42. Davis D, et. al. Tratado de microbiología. 3a. ed. Barcelona: Salvat, 1977. 1007 p.
43. Salazar S. Algunas consideraciones sobre las micosis pulmonares en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1977. 38p.
44. Bonnatti E. Reactividad cutánea a la histoplasmina 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.
45. Fratti O. Reactividad cutánea y aislamiento de *H. capsulatum* del suelo del departamento de Escuintla. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1976. 32p.
46. Leytán RL. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* del suelo de la Ciudad de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1991. 52 p.
47. Negroni P. Histoplasmosis. Illinois: Charles C. Thomas, 1965. X+190p.
48. Green JH, Pine L. Preparation of H and M antigens of *H. capsulatum* free of heterologous antigens. *Current Microbiol* 1985, 112: 209-216.
49. Jacobson E, Stephen S. Revaluation of diagnostic *Histoplasma*. *Serologic Am J Med Scien* 1981; 282:143-151.
50. Baumann D, Smith D. Comparison of immunodiffusion and Fixation of Complement test in the diagnosis of histoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1975, 2: 77-80.

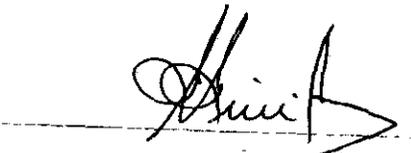
51. Fudenberg H, et. al. Manual de Inmunología Clínica. 2a. ed. Soto. A. trad. México: El manual moderno, 1980. 876p. (p. 639 - 43).
52. Hudson L, Hay FC. Inmunología práctica. Barcelona: Jims, 1979. 326 p.
53. Bennett C. Serología clínica. Buenos Aires: Panamericana, 1976. 544p.
54. Carpenter P. Immunology and Serology. Illinois: Saunder, 1956. VIII + 3351 p.
55. Roitt I, Brastoff J, Male D. Immunology. New York: Mosby, 1986. VII+103p.
56. Pine L, Fears MB, Malcolm GB.; Heated histoplasmin as a control for non-especificity in the CF test for histoplasmosis. Sabouraudia 1983; 21: 233-237.
57. Wheat J, et. al. Evaluation of cross-reactions in H. capsulatum serologic test. J. Clin Microb 1986; 3: 493 - 499.
58. Restrepo A. Procedimiento serológico en la paracoccidioidomicosis. Medellín, Colombia: Adelantos Microb Enferm Infec 1984; 3: 1183-211.
59. Organización Panamericana de la Salud. Manual of standarized serodiagnostic procedures for systemic mycoses. Part II: Complement Fixation. Washington:Public Health Service, 1974. 17 p.
60. Ajello, L. et. al. Laboratory manual for medical mycology. CDC, Atlanta, 1966.
61. U. S. Department of Health, Education and Welfare. Standarized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Micro test. Public Health Monograph No. 74. 1968. 34p.
62. Toriello L. et al Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. Mycoses, 1991; 34: 133-40.
63. Taylor ML. et. al. Retrospective sserological study of histoplasmosis in Mexico. Mycoses 1993, 36: 25-30.
66. Lynch M. et. al. Métodos de laboratorio. 2a. ed. Folch R. trad. México: Interamericana, 1987. 1522p (994).

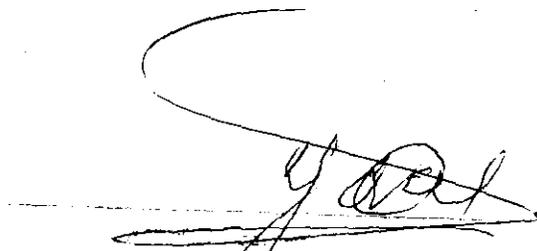
## INDICE

Contenido	Pags
I. Resumen .....	01
II. Introducción .....	02
III. Antecedentes.....	04
A. Coccidioidomicosis.....	04
1. Estudios realizados en Guatemala .....	04
2. Respuesta inmune.....	05
3. Diagnóstico.....	06
B. Histoplasmosis .....	08
1. Estudios realizados en Guatemala .....	08
2. Respuesta inmune.....	09
3. Diagnóstico.....	09
C. Pruebas serológicas.....	10
1. Inmunodifusión .....	10
2. Fijación de Complemento .....	11
IV. Justificaciones .....	12
V. Objetivo .....	13
VI. Hipotesis.....	14
VII. Materiales y Métodos.....	15
VIII. Resultados .....	33
IX. Discusión de Resultados .....	35
X. Conclusiones .....	37
XI. Recomendaciones.....	38
XI. Referencias .....	39

  
Br. Mónica Illescas Azurdia  
Autor

  
Lic. María Luisa G. de López  
Asesor

  
Lic. Gustavo Gini Aguilera  
Director

  
Lic. Clemencia Galvez de Avila  
Decano

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central