

PRODUCCION Y ESTANDARIZACION DE ANTIGENOS Y ANTISUEROS FUNGICOS PARA EL DIAGNOSTICO DE MICOSIS SISTEMICAS

■ María L. García de López,
Heidi Logemann y Teresa M. Vásquez.

OBJETIVOS:

1. General: Producir y estandarizar antígenos y antisueros fúngicos para ser utilizados en el diagnóstico de micosis sistémicas importantes en Guatemala, como coccidioidomicosis, histoplasmosis y candidiasis.
2. Específicos: Producir antígeno metabólico y antisuero a partir de *Coccidioides immitis*.
Producir antígeno citoplásmico y metabólico de *Cándida albicans*.
Producir anti suero anti *C. albicans*.
Montar y estandarizar las técnicas de Lowry para determinación de proteínas y de Fenol-sulfúrico para determinación de carbohidratos.
Medir reactividad de los antígenos y antisueros fúngicos obtenidos por medio de la prueba de inmunodifusión directa.
Medir la reactividad de la candidina obtenida metabólicamente, en reactores humanos.

ANTECEDENTES

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. (2)

La sintomatología del proceso pulmonar que causan, es muy similar al que se da en la tuberculosis, por lo que el diagnóstico diferencial estará dado únicamente por procedimientos de laboratorio, el cual se basa en la observación y/o aislamiento del agente causal de material clínico. Sin embargo, en un 30% de los casos, no es posible el aislamiento, por lo que se necesita de pruebas serológicas para la confirmación, ya que estas han probado ser sensibles y específicas. (3)

El problema que presenta el uso de la serología, es que los antígenos y antisueros son difíciles de conseguir en nuestro medio, y su costo es elevado. (4)

El laboratorio de Micología, a través del servicio que presta, ha diagnosticado casos de histoplasmosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis y otras, por lo que se hace necesaria la obtención de antígenos y antisueros fúngicos, usando para ello cepas guatemaltecas y las técnicas recomendadas por la CDC. (3) Esto permitirá que una vez estandarizadas las pruebas, sea posible detectar más casos que los diagnosticados hasta el momento. Además, se podrán realizar estudios seroepidemiológicos, para establecer la situación real de las micosis sistémicas en nuestro país.

Las infecciones causadas por hongos "oportunistas", los que poseen baja virulencia y algunos de ellos son comensales del humano, como *C. albicans*, han cobrado mucha importancia en los últimos años, ya que la incidencia de estas infecciones se da a la par del uso de antibióticos, inmunosupresores y otros procedimientos que disminuyen la respuesta inmune del hospedero. Además, con el apareamiento de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, ha aumentado el porcentaje de micosis sistémicas en nuestro país. (1,5,7)

DESARROLLO

Para alcanzar los objetivos antes planteados, se ha contado con la asesoría de la Dra. Conchita Toriello, quien es docente e investigadora

en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de México (UNAM).

Debido a que *Coccidioides immitis* se había trabajado anteriormente, se decidió obtener primero los antígenos de los mismos (dos cepas diferentes). Las técnicas utilizadas para la obtención de la coccidioidina, son las recomendadas por el CDC de Atlanta. (3)

Se procedió a confirmar dos cepas obtenidas de pacientes guatemaltecos, las cuales se denominaron T. Escobar y L. pulmón para diferenciarlas. Se inocularon ratones maduros de ambos sexos para lograr la identificación respectiva de cepas. El siguiente paso fue inocular medio de Smith (3) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 meses en oscuridad. Transcurridos 16 días se descartaron los medios inoculados con la cepa L. pulmón y uno de T. Escobar, por estar contaminados. Quedó solamente un medio inoculado con cepa T. Escobar sin contaminación, pero con poco crecimiento, por lo que se revisó la técnica para encontrar el error y se volvió a preparar el medio para inocular. Los resultados obtenidos fueron iguales. Durante el mes de abril y mayo, se filtró y esterilizó el antígeno de *Coccidioides immitis* de la cepa T. Escobar, por medio de filtro Millipore y membranas con poros 0.65 y 0.45 de diámetro. No se pudo concentrar por no contar con el equipo necesario. Se le agradeció al INCAP la donación de las membranas para filtrar con Millipore. El antígeno se mantuvo en refrigeración hasta el 5 de junio cuando la responsable del proyecto viajó a México para realizar un entrenamiento sobre "Técnicas básicas para la obtención y producción de antígenos fúngicos".

Dicho entrenamiento, estuvo a cargo de la Dra. Conchita Toriello. Allí fue posible concentrar el antígeno de *Coccidioides immitis*. Fue posible obtener además el antígeno de *P. brasiliensis*. De cepas guatemaltecas, se obtuvieron antígenos metabólico y citoplásmico de *Cándida albicans* todos ellos habiendo sido concentrados en dicho laboratorio, se colocaron en alícuotas para ser debidamente transportados a Guatemala.

Durante el período julio-agosto, se procedió a estandarizar las técnicas para la determinación de proteínas y carbohidratos, con reactivos donados por la Dra. Conchita Toriello. Estas técnicas no han sido estandarizadas hasta la fecha, ya que el único espectrofotómetro con que contamos es con el del Depto. de Bioquímica, y éste se encuentra en muy mal estado, arrojando resultados erróneos.

Para seguir con la investigación y en vista de que el antígeno de *Coccidioides immitis* que se obtuvo anteriormente fue muy escaso, se procedió a inocular más medio de Smith, con algunas modificaciones recomendadas por la Dra. Conchita Toriello, y el crecimiento de ambas cepas ha sido satisfactorio. Los antígenos de ambas cepas serán procesados durante la semana del 29 de agosto al 2 de septiembre, para ser utilizados en la sensibilización de 4 conejos, para la obtención de suero hiperinmune anti *Coccidioides immitis*, ya que se ha establecido que se obtiene mejor respuesta inmune utilizando antígeno metabólico de *Coccidioides immitis*. (6)

Además de estar trabajando con *Coccidioides immitis*, se han hecho pruebas de inmunodifusión para detectar anticuerpos anti-*Cándida*, usando sueros control y sueros de pacientes con diagnóstico de candidiasis sistémica, pero los resultados han sido negativos.

CONCLUSIONES

1. En el laboratorio de Micología de la Facultad de C.C. Q.Q. y Farmacia, es posible producir y obtener antígenos fúngicos para el diagnóstico de micosis sistémicas, siempre que se cuente con el material y equipo necesarios.
2. Los objetivos han sido parcialmente alcanzados debido a las limitaciones de material y equipo que actualmente existen en el laboratorio de Micología para la producción de antígenos.
3. La asesoría y colaboración de la Dra. Conchita Toriello, ha sido determinante para el avance de la presente investigación.