

RELACION ENTRE LA PRUEBA INTRADERMICA DE HISTOPLASMINA Y LOS NIVELES DE ANTICUERPOS DETECTABLES POR ELISA E INMUNODIFUSION

Carlos M. FERNANDEZ-ANDREU (1), Ana Margarita CADRE-RATON (2), Gerardo MARTINEZ MACIHN (1),
Alina LLOP HERNANDEZ (1) & Miguel SUAREZ HERNANDEZ (3)

RESUMEN

Se realizó un estudio prospectivo en 40 trabajadores de una granja avícola (grupo 1) considerados con riesgo de exposición a *Histoplasma capsulatum*, agente etiológico de la histoplasmosis, y en 16 individuos sin riesgo profesional de exposición a dicho agente (grupo 2). En ambos grupos se aplicó la prueba intradérmica de histoplasmina y se obtuvo el suero antes de su aplicación y a los 30 y 180 días después de realizada dicha prueba. Se determinó el nivel de anticuerpos anti-*H. capsulatum* mediante las técnicas de ELISA e inmunodifusión doble. En los dos grupos de población estudiados la aplicación intradérmica de histoplasmina, aún en los casos en que la respuesta fue positiva, no constituyó un estímulo antigénico suficiente para provocar un aumento en los niveles de anticuerpos anti-*H. capsulatum* detectables por las técnicas serológicas empleadas. Los resultados obtenidos contribuyen a la mejor interpretación de la prueba de ELISA en el diagnóstico de la histoplasmosis.

UNTERMOS: Histoplasmina; Intradermorreacción; ELISA; *Histoplasma capsulatum*.

INTRODUCCION

La prueba intradérmica de histoplasmina ha resultado de gran valor epidemiológico en el estudio de las áreas endémicas de histoplasmosis^{1, 9, 13, 14, 15}. La respuesta a esta prueba es una reacción de hipersensibilidad retardada que se hace presente entre los 15 y 40 días siguientes al contacto con *Histoplasma capsulatum* y puede mantenerse positiva durante años. La positividad a esta prueba indica sensibilización previa al agente etiológico, pero no discrimina entre infección actual o pasada, por lo que su valor diagnóstico es limitado^{1, 6, 9}. Uno de sus inconvenientes es la capacidad de inducir la formación de anticuerpos específicos, detectables a través de diferentes técnicas serológicas, particularmente la formación de la banda M en pruebas de inmunoprecipitación^{6, 20}.

Las aplicaciones de los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) en el diagnóstico de la histoplasmosis son relativamente recientes y limitadas^{2, 4, 10, 12, 17}. Hasta el momento no se ha valorado su posibilidad de discriminar entre los niveles de anticuerpos específicos anti-*H. capsulatum* en enfermos y en individuos expuestos (histoplasmina-positivos). Teniendo en cuenta estos antecedentes, además de la existencia de casos reportados de histoplasmosis en la provincia de Ciego de Avila, en la región central de Cuba^{5, 18} y de cifras de reactivos a la histoplasmina hasta del 28,8% en grupos de población seleccionados¹⁹, hemos estudiado la influencia que pudiera tener la aplicación intradérmica de histoplasmina en los títulos de anticuerpos detectables por ELISA como forma de evaluar el valor diagnóstico de esta prueba serológica.

(1) Laboratorio de Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), La Habana, Cuba.

(2) Hospital Provincial "Antonio Luaces Iraola" de Ciego de Avila, Cuba.

(3) Centro Provincial de Higiene y Epidemiología, Ciego de Avila, Cuba.

Dirección para correspondencia: Carlos M. Fernández Andreu, Laboratorio de Micología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" (IPK), Apdo Postal 601, Marianao 13, La Habana, Cuba. FAX 53-7-215957.

MATERIAL Y METODO

Grupos de Estudio:

Grupo 1: 40 trabajadores de una granja avícola en la provincia de Ciego de Avila, considerados con riesgo de exposición a *H. capsulatum*.

Grupo 2: 16 trabajadores y estudiantes del Hospital Provincial de Ciego de Avila que no presentaban antecedentes de exposición al hongo y considerados sin riesgo profesional.

A cada individuo se le realizó una extracción de sangre por punción venosa para la obtención del suero, previo a la aplicación intradérmica de la histoplasmina.

La prueba de histoplasmina fue realizada al total de individuos (Grupos 1 y 2) mediante la inoculación intradérmica de 0,1 ml de histoplasmina (Instituto Pasteur, Lote 81) en la cara anterior del antebrazo derecho. La inoculación se realizó en todos los casos por el mismo técnico, previo entrenamiento. Se consideró que una prueba estaba bien realizada por la formación inmediata de un habón en el punto de inoculación. La lectura se realizó a las 48 horas y se consideraron positivas aquellas induraciones de 5mm o más^{1,9}.

Se obtuvieron muestras de sueros (Grupos 1 y 2) a los 30 y 180 días de administrada la histoplasmina, siguiendo la técnica mencionada para la primera muestra. Todos los sueros fueron conservados en tubos estériles a -20°C.

Se empleó un sistema micro-ELISA indirecto previamente estandarizado utilizando un antígeno metabólico de *H. capsulatum* y sueros controles; fueron considerados positivos aquellos sueros con una densidad óptica (D. O.) superior a 0,4⁴.

La inmunodifusión doble (IDD) se llevó a cabo según la técnica descrita por YARZABAL. Se consideró positiva la aparición de bandas de identidad al comparar con el suero control positivo²¹.

Análisis estadístico: Se realizó un análisis de la varianza para observaciones repetidas controlando el efecto de riesgo de exposición, resultado de la prueba de histoplasmina, la interacción de ambos efectos y el cambio en el tiempo de los valores de ELISA. También se aplicó el test Chi Cuadrado y como medida de resumen los promedios y desviaciones estándar.

RESULTADOS

En el Grupo 1, siete individuos resultaron reactivos a la prueba intradérmica de histoplasmina (17,5%), mientras que en el grupo 2, la positividad fue 12,5% (dos casos positivos); los diámetros de induración de las pruebas realizadas aparecen resumidos en la tabla 1.

Tabla 1
Reacciones cutáneas expresadas en diámetros de induración leídos a las 48 horas.

Diámetro (mm)	Grupo I (%) (n=40)	Grupo II (%) (n=16)
0	25 (62,5)	10 (62,5)
1-2	4 (10,0)	3 (18,7)
3-4	4 (10,0)	1 (6,2)
5-6	5 (12,5)	2 (12,5)
7-8	2 (5,0)	0

En la figura 1 se presentan los valores promedios de D. O. en las tres determinaciones de anticuerpos realizados en los sueros de ambos grupos mediante ELISA. Como se puede apreciar, estos valores se mantienen en un rango entre 0,19 y 0,26, sin variación significativa en el tiempo. Se observa una pequeña disminución en valores absolutos de D. O. en el grupo sin riesgo de exposición con respecto al grupo con riesgo, sin significación estadística.

Al hacer un análisis de los valores promedios de D. O. (Figura 2) obtenidos en las tres determinaciones realizadas por ELISA en los individuos con prueba intradérmica positiva y negativa (en ambos grupos), se puede apreciar que éstos oscilaron entre 0,19 y 0,26 y no se mostraron diferencias estadísticamente significativas ni tampoco se observaron variaciones significativas en el tiempo.

Tanto en el Grupo 1 como en el 2 la aplicación de una prueba intradérmica de histoplasmina no produjo respuesta humoral detectable por la técnica de ELISA.

En las determinaciones de anticuerpos mediante la inmunodifusión doble (IDD) en las muestras de sueros obtenidas antes y después de la aplicación de histoplasmina, tampoco se encontraron bandas de precipitación específicas.

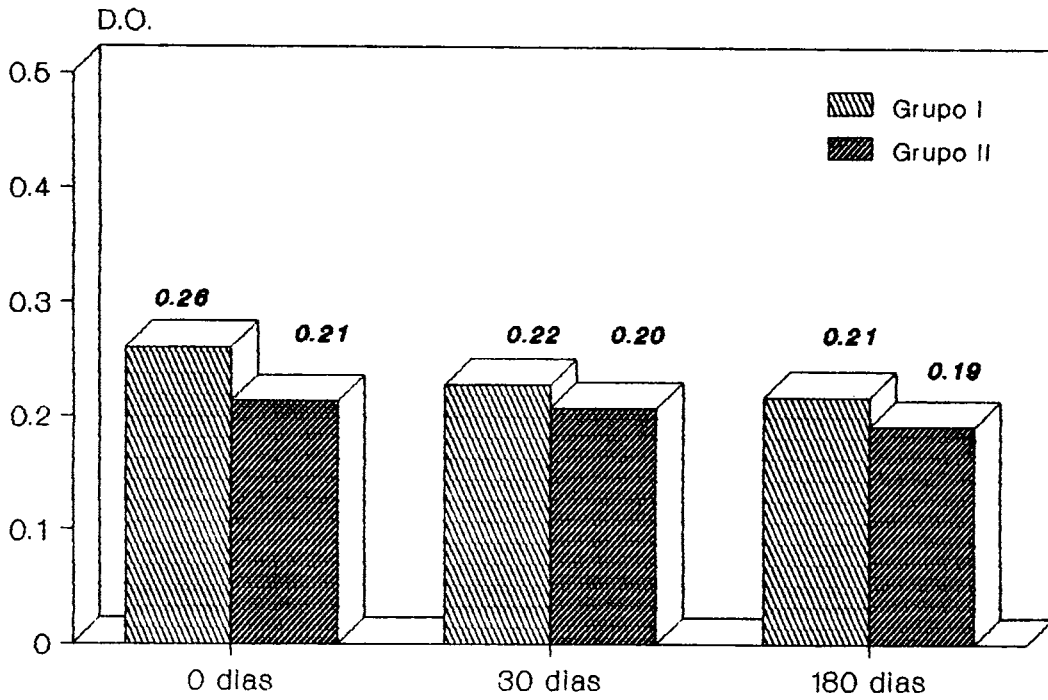


Fig. 1 - Valores de D. O. en los grupos de estudio mediante ELISA.

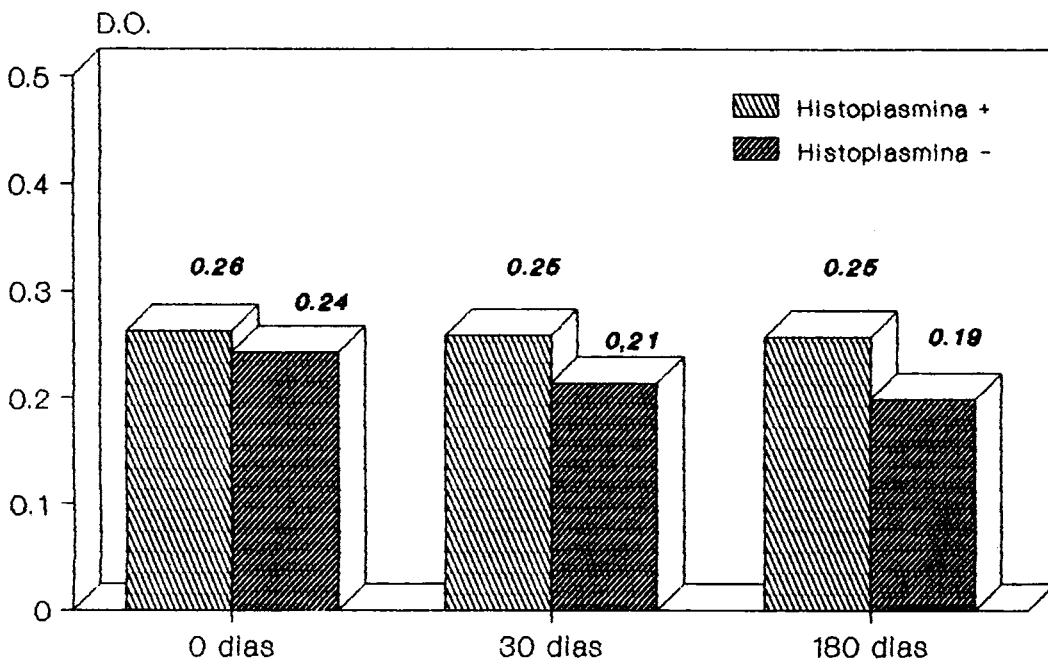


Fig. 2 - Valores de D.O. (ELISA) en los casos histoplasmina positivos y negativos.

DISCUSION

Resulta conocido que *H. capsulatum* puede aislarse con frecuencia de las excretas de aves domésticas, especialmente gallinas, por lo que los trabajadores del grupo 1 pueden considerarse con riesgo profesional de exposición^{1,9,14}. Generalmente, la prueba intradérmica de histoplasmina se considera positiva cuando a las 48 horas se aprecia una induración con un diámetro igual o mayor de 5 mm. Sin embargo, para algunos autores este valor puede ser superior o inferior, en dependencia de la calidad del antígeno utilizado y su estandarización previa¹⁵.

Contrariamente a lo que se debía esperar, no existió diferencia estadísticamente significativa entre la positividad a la histoplasmina en ambos grupos. Pudiera haber influido en esto el ritmo de trabajo en esta granja, que no permite la acumulación de las heces de gallinas, evitando que se creen las condiciones propicias para la proliferación de *H. capsulatum*. Por otra parte, el tiempo de trabajo en la granja avícola de los individuos del estudio pudiera haber influido en este resultado, pues el 75% de los trabajadores del grupo 1 habían permanecido por un período de menos de un año laborando en ésta, y de ellos, el 46% era del grupo de mayor riesgo por trabajar directamente con las aves. El hallazgo de casos positivos a la prueba de histoplasmina en dos individuos sin exposición profesional actual, pudiera estar relacionado con las características de esta provincia, eminentemente rural, por lo que la no exposición a *H. capsulatum* resulta difícil de precisar.

SUAREZ et al. obtuvieron un 28,8% de positividad entre trabajadores de granjas avícolas de la misma provincia¹⁹. Esta diferencia con respecto al 17,5% obtenido por nosotros pudiera estar relacionada con la cantidad de trabajadores encuestados (392 en el estudio realizado por dichos autores), y quizás también por el tiempo que llevaban trabajando en esta actividad.

La calidad de la histoplasmina es también un elemento muy importante a tener en consideración al evaluar los resultados de las encuestas realizadas en diferentes países; el tipo de histoplasmina utilizada en este estudio fue una más purificada que la utilizada por SUAREZ et al.. Debido a la complejidad antigénica de *H. capsulatum* y a la no uniformidad en su elaboración, no todos los extractos histoplasminicos que se utilizan tienen la misma calidad, por lo que la potencia antigénica de cada lote debe ser probada previamente en

animales infectados y en humanos con reactividad cutánea conocida, ya que hasta el momento no existen criterios físico-químicos para su evaluación¹⁶.

La no aparición de banda M en la IDD de la primera muestra de suero de los casos con prueba de histoplasmina positiva nos indica un contacto previo, aunque no reciente, con *H. capsulatum*, ya que mientras la respuesta celular puede permanecer positiva de por vida, generalmente los anticuerpos formados desaparecen antes de los tres años después de la infección; lo anterior confirma el valor de la prueba de histoplasmina en estudios epidemiológicos^{9,20}.

En trabajos realizados por KAUFMAN, después de la aplicación de la histoplasmina, sólo se encontraron bandas M en el 12% de individuos procedentes de áreas endémicas, sin enfermedad pulmonar, los cuales habían mostrado una intradermoreacción positiva. Sin embargo, el mismo autor demuestra que estos resultados pueden variar según el tipo de histoplasmina utilizada⁷. Por otra parte, KLITE encontró un 34% de sueros con banda M en 32 personas con respuesta positiva a la histoplasmina. Con el uso de otras técnicas serológicas (fijación del complemento y hemaglutinación) también se han detectado anticuerpos específicos en algunos individuos que habían sido positivos a la histoplasmina^{3,8,11}.

Ha sido señalado por otros autores que una única dosis de histoplasmina no produce respuesta humoral en individuos no sensibilizados, por lo que era de esperar que los casos histoplasmina-negativos, fueran también negativos en las pruebas serológicas realizadas^{6,16}. No ha sido precisado el tiempo en que demoran en aparecer los anticuerpos inducidos por la prueba de histoplasmina, ni tampoco el tiempo en que permanecen los niveles elevados en el suero. Según CAMPBELL & HILL, pueden aparecer entre cinco días y un mes después de realizada la prueba cutánea y mantenerse en niveles elevados en el suero al menos por tres meses³.

El análisis de estos resultados permite señalar que en ambos grupos la aplicación de la prueba intradérmica de histoplasmina no produjo variación en los niveles de anticuerpos detectables por ELISA e IDD.

No se encontró en la literatura consultada otros estudios relacionados con la utilización de ELISA en grupos de riesgo, ni tampoco ha sido señalada anteriormente la posible influencia de una prueba de histoplasmina en los niveles de anticuerpos anti-*H.*

capsulatum detectados por ELISA. El presente estudio puede contribuir a la mejor interpretación de los resultados obtenidos mediante esta técnica serológica y confirma el valor de las pruebas serológicas en el diagnóstico y pronóstico de la histoplasmosis pero no para estudios epidemiológicos.

SUMMARY

Relationship between histoplasmin skin test and *Histoplasma capsulatum* antibody levels detected by ELISA and immunodiffusion tests.

A prospective study was carried out in two groups of individuals: a group 1 (n=40) included workers from a poultry farm, with potencial occupational risk of exposure to *Histoplasma capsulatum*, etiologic agent of histoplasmosis, and a group 2 (n=16), persons without occupational risk of exposure to the agent. Histoplasmin skin test was performed in both groups, and three sera were obtained from each individual: 1) before skin test was done, 2) 30 days after, and 3) 180 days after it. In both groups the histoplasmin skin test, even when the test was positive, was not a sufficient antigenic booster to provoke an increase in the *H. capsulatum* antibody levels capable to be detected by the serologic tests used (ELISA and Double Immunodiffusion). These results contribute to improve the interpretation of ELISA test values in the diagnosis of histoplasmosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BONIFAZ, A. - *Micología medica básica*. México, Méndez Cervantes, 1990. p. 235-246.
2. BOYER, J. M. & SCALARONE, G. M. - The use of Histolyn-CYL in an enzyme immunoassay to detect *Histoplasma capsulatum* antibodies. *Sabouraudia*, 21: 303-315, 1983.
3. CAMPBELL, C. C. & HILL, G. B. - Further studies on the development of complement fixing antibodies and precipitins in healthy histoplasmin-sensitive persons following a single histoplasmin skin test. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 90: 927-934, 1964.
4. FERNANDEZ ANDREU, C. M.; MARTINEZ MACHIN, G.; FERNANDEZ LLANES, R. & LLOP IHERNANDEZ, A. - Detección de anticuerpos anti-*Histoplasma capsulatum* mediante la técnica de ELISA. Estudio preliminar. *Rev. cuba. Med. trop.*, 44, 1992 (En prensa).
5. GONZALEZ MENCAL, I.; SUAREZ HERNANDEZ, M.; GALLEGOS MACHADO, M.; HERNANDEZ MONTOYA, N. & COTELO ALFONSO, A. - Presentación de dos casos de histoplasmosis pulmonar. *Rev. cuba. Hig. Epidem.*, 23: 282-287, 1985.
6. KAUFMAN, L. - Laboratory methods for the diagnosis and confirmation of systemic mycoses. *Clin. Infect. Dis.*, 14(S1): 23-29, 1992.
7. KAUFMAN, L.; TERRY, R. T.; SCHUBERT, J. D. & MACLAUGHLIN, D. - Effects of a single histoplasmin skin test on the serological diagnosis of histoplasmosis. *J. Bact.*, 94: 798-803, 1967.
8. KLITE, P. D. - The interpretation of agar gel precipitin reactions in histoplasmosis. *J. Lab. clin. Med.*, 66: 770-787, 1965.
9. LACAZ, C. S.; PORTO, E. & COSTA MARTINS, J. E. - *Micología médica*. 8. ed. São Paulo, Sarvier, 1991.
10. LAMBERT, R. S. & GEORGE, R. B. - Evaluation of enzyme immunoassay as a rapid screening test for histoplasmosis and blastomycosis. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 136: 316-319, 1987.
11. McDEARMAN, S. & YOUNG, J. - The development of positive serologic test with *Histoplasma capsulatum* antigens following single histoplasmin skin test. *Amer. J. clin. Path.*, 34: 434-438, 1960.
12. MAIGA, Y. I.; MARJOLET, M. & MOREL, D. - Intérêt et limites des méthodes sérologiques: électrosynérèse, ELISA pour l'étude de la prévalence de l'histoplasmosis au Mali. *Bull. Soc. Path. exot.*, 78: 585-593, 1985.
13. MARESCA, B.; ALI, A. I.; KOBAYASHI, G. S. & SACCO, M. - Incidence of histoplasmin skin test reactivity in Somalia: an epidemiological study. *Mycopathologia (Den Haag)*, 98: 77-81, 1987.
14. MARTINEZ RAMIREZ, A.; GARCIA DE ALBA GARCIA, J. E. & GONZALEZ MENDOZA, A. - Algunas consideraciones epidemiológicas en torno a dos casos de histoplasmosis. *Infectología*, 7: 319-323, 1987.
15. NAIFF, R. D.; BARRETT, T. V.; ARIAS, J. R. & NAIFF, M. F. - Encuesta epidemiológica de histoplasmosis, paracoccidioidomicosis y leishmaniasis mediante pruebas cutáneas. *Bol. Ofic. sanit. panamer.* 104: 35-50, 1988.
16. NEGRONI, P. - Inmunología de las micosis. In: MARGNI, R. A. - *Inmunología e inmunquímica. Fundamento*. La Habana, Ed. Revolucionaria, 1982. p. 340-362.
17. SHARMA, A.; JOHRI, B. N. & SIIRINIWAS - An enzyme immunoassay for yeast an mycelial phase-specific antibodies in histoplasmosis. *J. Immunol. Meth.*, 50: 115-121, 1982.
18. SUAREZ HERNANDEZ, M.; DIAZ RODRIGUEZ, J.; PINON, J. L. et al. - Histoplasmosis. Presentación de tres casos en la provincia de Ciego de Avila. *Rev. cuba. Hig. Epidem.*, 23: 407-412, 1985.
19. SUAREZ HERNANDEZ, M.; FERNANDEZ ANDREU, C. M.; ESTRADA ORTIZ, A. & CISNEROS DESPAIGNE, E. - Reactividad a la histoplasmina en trabajadores de granjas avícolas en la provincia de Ciego de Avila, Cuba. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 34: 329-333, 1992.
20. WHEAT, L. J. - Histoplasmosis in Indianapolis. *Clin. Infect. Dis.*, 14(S1): 91-99, 1992.
21. YARZABAL, L. - Pruebas de inmunoprecipitación para el diagnóstico de las micosis profundas. Caracas, CEPIALET SAS, OPS/OMS, 1978. p. 10-15.