

E.L.I.S.A. EN COCCIDIOIDOMICOSIS HUMANA

Iris Nora TIRABOSCHI, B. MARTICORENA & R. NEGRONI

RESUMEN

Se realizó E.L.I.S.A. con exoantígeno de *Coccidioides immitis* para la detección de anticuerpos, en 67 sueros humanos diluïdos 1/1000, 1/2000, 1/4000 y 1/8000. De los 18 sueros de enfermos de coccidioidomycosis comprobada por examen directo, cultivo y/o histología, 5 fueron negativos, en otros 13 fueron positivos en una o varias diluciones. 3/26 sueros de personas sanas, coccidioidino positivas, fueron positivos en títulos de 1/1000 y el resto no tuvo anticuerpos detectables. No presentaron reacciones positivas ninguno de los sueros controles de personas sanas, pero sí lo hicieron 4/8 pacientes con otras micosis.

Se concluye que E.L.I.S.A. es útil para la detección de mínimas cantidades de anticuerpos o en sueros que no pueden ser procesados por fijación de complemento. No es recomendable el uso de la técnica en forma aislada por al presencia de reacciones cruzadas.

UNITERMOS: Coccidioidomycosis; E.L.I.S.A.; *Coccidioides immitis*.

INTRODUCTION

La demostración de anticuerpos a través de técnicas serológicas es útil en la práctica médica asistencial para el diagnóstico indirecto de micosis sistémica, como la coccidioidomycosis^{6, 19, 20}. La presencia de anticuerpos detectables por inmunodifusión y cuantificables por fijación de complemento, permiten establecer el diagnóstico y hacer el control evolutivo del curso de la enfermedad^{6, 19, 20}.

La técnica del enzimo inmunoensayo (E.L.I.S.A.) ha sido usada en los últimos años para el serodiagnóstico de diversas micosis profundas^{3, 16, 18, 21, 23, 26}. Es un procedimiento que permite la cuantificación del nivel de anticuerpos al igual que la fijación de complemento, pero su realización es más rápida y menos laboriosa que esta última. Es además, una alternativa más económica que el radioinmunoensayo⁹.

En un trabajo anterior, se realizó la puesta a punto de la técnica con sueros de ratones inoculados experimentalmente con *Coccidioides immitis* (C.i.)¹⁰.

Motiva la presente comunicación la experiencia realizada mediante el empleo de la técnica de E.L.I.S.A. con exoantígeno de C.i. y sueros humanos.

MATERIALES Y METODOS

1. **Antígeno:** El exoantígeno de *C.immitis*¹³ se empleó con una concentración de 20 µg/ml de proteínas. El mismo antígeno se utiliza concentrado 1000 veces para pruebas de inmunodifusión (I.D.), a razón de 20 mg de proteínas/ml y para fijación de complemento (F.C.) con una concentración proteica de 156 µg/ml.

2. **Sueros:** Todos los sueros fueron adicionados de mertiolato borato de sodio 1/10.000, fraccionados y mantenidos a -20° C hasta su procesamiento (1 semana a 3 años).

Se estudiaron:

- 18 sueros provenientes de pacientes con

coccidioidomicosis comprobada por examen micológico directo, cultivo y/o histología (Tabla nº 1).

- 26 sueros de personas coccidioidino-positivas, estudiados en área endémica de la provincia de Córdoba, por uno de nosotros (Marticorena). A todos se les practicó intradermorreacción con una dilución 1/100 del exoantígeno de C.i. y exhibieron respuestas cutáneas con infiltrados que variaron entre 10 y 40 mm a las 48 horas.

- 15 sueros de personas sanas, coccidioidino-negativas (14 niños y 1 adulto).

- 8 sueros de pacientes con otras micosis sistémicas confirmadas: paracoccidioidomicosis (2), histoplasmosis (2), aspergilosis (2) y candidiasis diseminada (2).

Toda la estandarización se realizó con los mismos sueros patrones, positivo y negativo. El negativo correspondiente a un adulto sano, coccidioidino-negativo, con I.D. y F.C. negativos para C.i. y que nunca estuvo en área endémica. El suero positivo pertenecía a un paciente con coccidioidomicosis comprobada por cultivo, con I.D. positiva y F.C. positiva 1/64 e intradermorreacción de 45 mm.

3. Conjugado: Se empleó inmunoglobulinas de conejo anti-humana, conjugadas con peroxidasa (IgA, IgG, IgM, kappa, lambda, Dako P 212), diluida 1/500 (en buffer de fosfatos isotónico 10 ml, H₂O 90 ml más 3% de leche descremada).

4. Buffers y reactivos: Se siguieron los procedimientos utilizados por BARRERA y col.¹, sustituyendo la seroalbúmina bovina por una solución de leche descremada (Molico CR), con la misma concentración proteica que la técnica original.

5. Técnica de E.L.I.S.A.: Se sensibilizaron las placas de poliéstereno (Microstrip, Eflab 04, Helsinki, Finland). con 100 µl por hoyo de antígeno diluido en buffer carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Se incubaron 18 horas, a 4°C en cámara húmeda. Luego de descartar el exceso de antígeno, se lavaron 3 veces (1 minuto cada vez) con 200 µl/hoyo de buffer de fosfatos (P.B.S., pH 7.4, 0.05% de Tween 20 y 0.3% de leche descremada). Luego se sembraron 50 µl/hoyo de los sueros diluidos 1/

1000, 1/2000, 1/4000 y 1/8000 (en P.B.S., pH 7, 0.05% Tween 20 y 3% de leche descremada). Se incubó 1 hora a 37°C. Luego se lavó, en la manera ya descrita y se sembraron 50 µl del conjugado diluido y se incubó otra hora a 37°C. Luego del lavado de las placas se agregaron 100 µl/hoyo del revelador de color constituido por: 200 µl de etilbenzotiazolin-sulfúrico (sol. preparada con 32.9 g en 1 ml de H₂O), 12 ml de buffer de citrato (ac. cítrico 0.96 g en 100 ml H₂O, pH4) y 50 µl H₂O 2 30 vol. Luego de 15 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz, la reacción se frenó con 100 µl de ac. fluorhídrico 0.1.M., pH 3.3.

Las lecturas se realizaron en valores de Densidad Optica (DO) en lector para E.L.I.S.A. (Titertik, Multiskan, Flow Lab).

Se observó que los sueros tenían distintas lecturas numéricas (de D.O.) al ser procesados en diferentes días, aunque el resto de las condiciones de la técnica se mantuvieran idénticas, por lo que al establecer una línea de corte (cut off) entre sueros positivos y negativos se desechó usar el doble del desvío standard de los sueros de controles sanos y se optó por considerar positivo (+) aquel suero cuya lectura fuera el doble del suero control negativo del día de procesamiento (por ej: suero negativo 0.300, 0.600 = +; 1,200 ++, 1,800 +++).

RESULTADOS

Los resultados están expresados en las Tablas nº 1 y nº 2.

De los 18 sueros de pacientes con coccidioidomicosis confirmada por examen directo, cultivo y/o histología, 13 mostraron reacciones positivas en una o más diluciones.

Uno de los sueros pertenecía a un paciente con S.I.D.A., y fue positivo hasta 1/2000. Este suero había sido negativo por inmunodifusión y tenía bajo título en fijación de complemento. Esto permite suponer que la técnica puede ser útil en pacientes con bajo nivel de anticuerpos. Por otro lado, tres sueros positivos por inmunodifusión no mostraron reacción en la técnica de E.L.I.S.A.

Sólo 3/26 sueros de personas coccidioidino-positivas (coccidioidomicosis infección) fueron positivos en la menor dilución, no dieron reaccio-

TABLA 1
E.L.I.S.A. para C.i. en enfermos de coccidioidomycosis

Suero nº	E.L.I.S.A.				I.D.	F.C	Diagnóstico confirmado por
	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000			
1	+++++	+++++	+++	+	Pos	1/64	Cultivo
2	+++	++	++	+	Pos	1/64	Histopatología
3	+	+	+	-	Pos	1/8	Cultivo
4	+++	++++	+	-	Pos	1/64	Cultivo
5	+	+	-	-	Pos	1/8	Cultivo
6	++	+	-	-	Pos	1/32	Directo y cultivo
7	+++	++	+	-	Pos	1/32	Histopatología
8	+++	++	+	+	Pos	1/128	Directo y cultivo
9	-	+	+	+	Pos	1/64	Histopatología
10	+++	++	++	-	Pos	1/512	Cultivo
11*	+	+	-	-	Neg	1/8	Cultivo
12	-	-	-	-	Pos	Ac	Directo
13	-	-	-	-	Neg	Ac	Histopatología
14	+++	++	++	+	Pos	Ac	Directo y cultivo
16	-	-	-	-	Neg	Ac	Directo y cultivo
17	-	+	-	-	Pos	Ac	Directo, cultivo e histopatología
18	-	-	-	-	Pos	Ac	Cultivo

Referencias: * Paciente con SIDA; ID: inmunodifusión; FC: fijación de complemento; Ac: suero anticomplementario; Pos y (+): positivo; Neg y (-): negativo

TABLA 2
E.L.I.S.A. para coccidioidomycosis en sueros controles

ELISA diluciones	PACIENTES		
	coccidioidino positivos n=26 +/total	sanos n=15 +/total	con otras micosis n=8 +/total
1/1000	3/26	0/15	4/8
1/2000	0/26	0/15	ND
1/4000	0/26	0/15	0/8
1/8000	0/26	0/15	3/8

Referencias: ND: no se hicieron las determinaciones.

nes positivas ninguno de los sueros de individuos sanos, pero si lo hicieron 4/8 de los pacientes con otras micosis: paracoccidioidomycosis 2/2, histoplasmosis 1/2, aspergilosis 1/2, y ninguna de las 2 candidiasis (los sueros positivos lo fueron hasta 1/8000).

En la dilución de sueros 1/1000 se obtuvo una sensibilidad (positivo verdadero (P.V.) x 100/P.V. + falso negativo (F.N.) del 61% y una especificidad (negativo verdadero (N.V.) x 100/N.V. + falso positivo (F.P.) del 80%.

Se tabularon también los resultados, considerando como positivo el doble del desvío estándar de los sueros controles, con lo que en la dilución 1/1000 la sensibilidad aumentaba al 82% y la especificidad disminuía al 67%. Estos valores se modificaban a partir de la positivización de 3 sueros de enfermos (aumento de sensibilidad) y de 7 coccidioidino-positivos y 3 enfermos con otras micosis (disminución de especificidad).

Por las razones expresadas en materiales y métodos se optó por otra manera de elegir la línea de corte, teniendo en cuenta, además que importaba más tener una buena especificidad.

COMENTARIOS

La técnica de E.L.I.S.A. se ha empleado en candidiasis^{12, 15, 16, 18, 22, 23, 24}, aspergilosis^{7, 8, 14, 17, 18, 26}, histoplasmosis¹¹, coccidioidomicosis^{5, 8, 21} y paracoccidioidomicosis^{3, 4, 21}, pero en la revisión bibliográfica no hemos encontrado referencias a su uso en el diagnóstico de coccidioidomicosis humana.

Luego de estandarizar cada paso de la técnica fue posible demostrar la presencia de anticuerpos en los sueros de pacientes con coccidioidomicosis en diluciones mayores a los usados en fijación de complemento, lo que permite corroborar la mayor sensibilidad de E.L.I.S.A.

E.L.I.S.A. es capaz de detectar cantidades mínimas de anticuerpos o antígeno, en el rango de 1 µg/ml^{12, 22, 23} lo que la haría útil en el diagnóstico precoz de micosis invasivas. TOLLEMAR y col.²³ consideran que la sensibilidad del E.L.I.S.A. junto con la inmunodifusión es mayor a la de los cultivos en los pacientes con trasplante renal y micosis invasivas.

En candidiasis experimental de rata la demostración de anticuerpos antimanano por E.L.I.S.A. parece ser más precoz y constante, en relación a la detección de manano por aglutinación del látex o por cromatografía¹².

De todas maneras, el empleo de E.L.I.S.A. como diagnóstico serológico de rutina requeriría de la corroboración por otras técnicas como el inmunoblotting².

CONCLUSIONES

1) La prueba de E.L.I.S.A., carece aún de la especificidad necesaria para ser utilizada como prueba diagnóstica.

2) La reacción podría ser útil para separar coccidioidomicosis en actividad de infección inactiva.

3) Es una prueba que puede ser empleada para cuantificación de anticuerpos. En este sentido resulta más simple y más económica que la fijación de complemento y puede ser utilizada en sueros anticomplementarios.

4) Las reacciones cruzadas se vieron con sueros de otras micosis.

SUMMARY

E.L.I.S.A. in human coccidioidomycosis

An E.L.I.S.A. test for antibody detection, with an exo-antigen of *Coccidioides immitis* was standardized in 67 humans sera diluted in 1/1000, 1/2000, 1/4000 and 1/8000. Eighteen sera from mycologically proved cases of coccidioidomycosis were studied: 5 were negative and 13 were positive in some dilutions. 3/26 sera of healthy persons who presented positive skin tests with coccidioidin were positive and the other 23 sera did not have positive reactions. None of the 15 sera of healthy human exhibited positive E.L.I.S.A. Serum samples of 8 patients suffering other deep mycosis were studied, 4 of them presented cross-reactions in E.L.I.S.A. tests. E.L.I.S.A. test seems to be a useful serologic technique for antibody detection in anticomplementary serum samples or when a low concentration of antibodies should be detected. As it is very sensitive, cross-reactions with other mycoses are frequent, thus the use other more specific serologic technique together E.L.I.S.A. is recommended.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la ayuda brindada por los Dres. Kantor, I., Barrera, V., Ritacco, V. y Torreá, G., del C.E.P.A.N.Z.O. Dr. Castiglia, V. del Hospital de Clínicas y a nuestros compañeros de trabajo del Departamento de Microbiología de la U.B.A.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BARRERA, L.; RITACCO, V.; ELISELE, C.; PALESCHI, A.; MONTEVERDE, A.; TORREA, G.; NEGRONI, R.; PADULA, E.; BATTAGLIA, A.; GONZALEZ, L. & KANTOR, I. - Evaluación del Enzimoimmunoensayo para el diagnóstico rápido de la tuberculosis paucibacilar del adulto. *Medicina (B. Aires)*, 49: 561-566, 1989.
2. BROUWER, J. - Detection of antibodies against *Aspergillus fumigatus* comparison between double immunodiffusion, E.L.I.S.A. and immunoblot analysis. *Int. Arch. Allergy*, 85: 244-249, 1988.
3. CANO, L.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. & RESTREPO, A. - An evaluation of the enzyme-linked immunoadsorbent assay (E.L.I.S.A.) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. med. vet. Mycology*, 24: 467-475, 1986.
4. CASTAÑED, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D. &

- STEVENS, D.A. - Impairment of cellular but not humoral immune responses in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. *Infect. Immun.*, 56: 1771-1777, 1988.
5. COLE, G.; KIRKLAND, T.; FRANCO, M.; ZHU, S.; YUAN, L.; SUN, S.H. & HEARN, V. - Immunoreactivity of a surface wall fraction produced by spherules of *Coccidioides immitis*. *Infect. Immun.*, 56: 2695-2701, 1988.
6. CONANT, N.F.; SMITH, D.T.; BAKER, R.D. & CALLAWAY, J.L. - *Manual of clinical mycology*. 3rd. ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1971.
7. DAY, M.J. & PENHALE, W.J. - Humoral immunity in disseminated *Aspergillus terreus* infection in the dog. *Vet. Microbiol.*, 16: 283-294, 1988.
8. FUJITA, S.; MATSUBARA, F. & MATSUDA, T. - Demonstration of antigenemia in patients with invasive aspergillosis by biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Lab. Clin. Med.*, 112: 464-470, 1988.
9. GEORGE, R.; LABERT, R.S.; BRUCE, M.J.; PICKERING, J.W. & WALCOTT, N.Z. - Radioimmunoassay: a sensitive screening test for histoplasmosis and blastomycosis. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 124: 407-410, 1981.
10. GIMENO, S.R. - Puesta a punto de la técnica de E.L.I.S.A. en coccidioidomycosis experimental. *Rev. argent. Micol.*, 9: 25-27, 1986.
11. GRAYBILL, J.R.; PATINO, M. & AHRENS, J. - In situ localization of *Histoplasma capsulatum* using colloidal gold immune electron microscopy. *Mycopathologia (Den Haag)*, 104: 181-188, 1988.
12. GREENFIELD, R.A.; TRUTT, D.L.; RICKARD, R.C. & ALTMILLER, D.H. - Comparison of antibody, antigen and metabolite assays in rat models of systemic and gastrointestinal candidiasis. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 409-417, 1988.
13. NEGRONI, R.; FINQUELIEVICH, J.L. & ELÍAS COSTA, M.R. - Estudio de la coccidioidomycosis experimental en ratas Wistar. *Rev. argent. Micol.*, 8: 7-11, 1985.
14. PATTERSON, T.F.; MINITER, P.; RYAN, J.L. & ANDRIOLE, U.T. - Effect of immunosuppression and amphotericin B on *Aspergillus* antigenemia in an experimental model. *J. Infect. Dis.*, 158: 415-422, 1988.
15. PAVLIAK, V. & SANDULA, J. - Cross-reactivity of pathogenic *Candida* mannans studied by enzyme-linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.) and precipitin methods. *Mycoses*, 31: 34-39, 1988.
16. PAVLIAK, V.; SAUNDULA, J.; TOMSIROVA, A. & GALLO, J. - Determination of antibodies to *Candida albicans* cell wall components by immunodiffusion, E.L.I.S.A. and its rapid modification. *Mycoses*, 31: 426-432, 1988.
17. PINON, J.M.; THIOANNES, M.; POIRRIEZ, J.; BOULANT, J. & LEPAN, H. - Enzyme-linked immunofiltration assay (E.L.I.S.A.) for the detection of IgG, IgM, IgA and IgE antibodies against *Aspergillus fumigatus*. *J. med. vet. Mycol.*, 25: 77-83, 1987.
18. REPENTIGNY, L. & REISS, E. - Current trends in immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. *Rev. infect. Dis.*, 6: 301-312, 1984.
19. RIPON, J.W. - *Medical mycology*. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3rd. ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1988.
20. RUBINSTEIN, P. & NEGRONI, R. - *Micosis broncopulmonares del adulto y del niño*. 2da. ed. Buenos Aires, Editorial Beta, 1981.
21. SERRANO, M.; de ALBORNOZ, M.B. & WRICH, M. - E.L.I.S.A. in the follow up of deep mycoses. In: I.S.H.A.M. Congress. Atlanta, 1985.
22. SUZUKI, H.; TAGUCHI, H.; MISHIMURA, R.; MIYAJI, M.; NAKAMURA, A. & NAKASIMA, H. - Studies on detection of *Candida* antigen in the sera of mice inoculated orally with *Candida albicans*. *Mycopathologia (Den Haag)*, 104: 7-17, 1988.
23. TOLLEMAR, J.; HOLMBERG, K.; RINGDEN, O. & LONNQUIST, B. - Surveillance tests for the diagnosis of invasive fungal infections in bone marrow transplant recipients. *Scand. J. Infect. Dis.*, 21: 205-212, 1989.
24. TOJO, M.; SHIBATA, N.; OJANAI, T.; MIKAMI, T.; SUZUKI, M. & SUZUKI, S. - Quantitative precipitin reaction and enzyme-linked immunosorbent assay of mannans of *Candida albicans* NIH A-207 and NIH B-792 strains compared. *Clin. Chem.*, 34: 2423-2425, 1988.
25. WACK, E.E.; DUGGER, K.O. & GALGANI, J.N. - Enzyme-linked immunosorbent assay for antigens of *Coccidioides immitis*: human sera interference corrected by acidification-heat extraction. *J. Lab. Clin. Med.*, 111: 560-565, 1988.
26. YAMAMOTO, S.; TOIDA, I.; WADA, M.; MOSOJINA, S. & KUDOU, S. - Serological diagnosis of pulmonary aspergillosis by E.L.I.S.A. *Kekkaku*, 64: 15-24, 1989.

Recebido para publicação em 09/08/1990
Aceito para publicação em 28/05/1990