



Preparación y estudio de un exoantígeno de la fase levaduriforme de *Histoplasma capsulatum* para reacciones serológicas

Ricardo Negroni^{1,3}, Cristina Iovannitti², Alicia Irene Arechavala¹, Susana Carnovale² y Kumiko Euguchi³

¹Unidad de Micología del Hospital Francisco Javier Muñoz y Cátedra de Inmunología; ²Dpto. de Microbiología, Centro de Micología, Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, y ³Facultad de Medicina, Universidad del Salvador

Resumen

El propósito de este estudio fue determinar la utilidad de un exoantígeno de la forma de levadura del *Histoplasma capsulatum* para reacciones serológicas. Procuramos también establecer sus características químicas. Fueron empleadas tres cepas autóctonas, pertenecientes a la colección del Centro de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, que fueron mantenidas en su forma de levadura por repiques semanales en agar caldo glucosado al 2%, incubados a 37°C.

Después de una semana de incubación, las células fúngicas fueron suspendidas en agua destilada estéril adicionada de mertiolato borato de sodio y fenilmetilsulfonilfluoruro a la concentración final de 1/5000. Esta suspensión se dejó a temperatura ambiente durante 72 h y el sobrenadante fue liofilizado. Se determinó la concentración total de proteínas y polisacáridos. En las pruebas de inmunodifusión se utilizó el antígeno con una concentración de proteínas de 1,4 mg/ml.

El exoantígeno mostró siete bandas en la corrida electroforética en poliacrilamida, pero sólo dos de ellas mostraron actividad antigénica en la inmunotransferencia con una mezcla de sueros de pacientes con histoplasmosis. Los pesos moleculares de estas dos proteínas antigénicas fueron de 97 y 66 kDa respectivamente. Se preparó una γ -globulina de conejo anti-*H. capsulatum* para ser empleada como control positivo en las reacciones serológicas. Se produjeron en total diez lotes del antígeno para determinar su reproducibilidad y la capacidad antigénica de los mismos fue estudiada mediante pruebas de inmunodifusión en gel de agar (ID) y contraelectroforesis (CIE) usando muestras séricas de 20 hámsters inoculados experimentalmente por vía intracardíaca con la forma de levadura de *H. capsulatum*. Todos los sueros obtenidos después de la tercera semana de la infección dieron resultados positivos con los diez lotes del antígeno.

Se estudiaron cincuenta sueros de pacientes con histoplasmosis por medio de reacciones ID, CIE y fijación de complemento (FC), comparando los resultados con una histoplasmina patrón. En los pacientes VIH negativos se observaron 7/7 (100 %) reacciones positivas con el exoantígeno en las tres pruebas serológicas, en tanto que la histoplasmina proporcionó 5/7 resultados positivos (71,4 %). Las reacciones de CIE y FC fueron las más sensibles en los enfermos VIH positivos, presentaron 15/43 (34,8 %) resultados positivos con el exoantígeno y 7/43 con la histoplasmina (13,9 %). Se examinaron además 10 sueros de cada una de las siguientes micosis: paracoccidioidomicosis, aspergilosis y candidiasis empleando la prueba de ID para comprobar reacciones cruzadas. No se observó ninguna prueba positiva. El exoantígeno de la fase levaduriforme resultó más sensible que la histoplasmina e igualmente específico.

Histoplasmosis, Antígenos, Reacciones serológicas, Histoplasmina.

Dirección para correspondencia:

Dr. Ricardo Negroni
Juncal 3475 - 4º C, 1425 Buenos Aires, Argentina
Fax: +54 1 508 3705

Aceptado para publicación el 12 de noviembre de 1998

Preparation and study of an exoantigen of *Histoplasma capsulatum* for serological reactions

Summary

The aim of this study was to determine the usefulness of a yeast-phase exo-antigen of *Histoplasma capsulatum* in standard serologic reactions.

Three native strains of *H. capsulatum* which belong to Mycology Center collection were employed. They were maintained in their yeast-phase by weekly subcultures in 2 % dextrose broth agar at 37°C. After one week incubation yeast cells were suspended in distilled water containing thimerosal and phenylmethyl sulfonyl fluoride at a concentration of 1:5000. This suspension was left at room temperature for 72 h, then the supernatant was separated by centrifugation and it was lyophilized.

Proteins and polysaccharides concentrations were determined. Immunodiffusion (ID) tests were carried out with an antigenic dilution containing 1.4 mg/mL of proteins.

This exo-antigen was submitted to SDS-PAGE. Seven protein fractions were detected but only two of them showed antigenic activity against a pool of positive human sera; the molecular weights of these two proteins were 97 kDa and 66 kDa respectively. A metabolic antigen from the mycelial phase of *H. capsulatum* was used as control. A rabbit gammaglobulin anti-*H. capsulatum* was prepared and employed as positive control in serologic reactions.

The antigenic capacity of ten batches of this exo-antigen was studied by ID and counterimmunoelectrophoresis (CIE) tests using serum samples of 20 hamsters experimentally infected by intracardiac inoculation of the yeast-phase of *H. capsulatum*. All tests presented positive results after three weeks of the infection. Fifty sera from patients suffering progressive histoplasmosis were analyzed: ID, CIE and complement fixation (CF) tests were performed in all cases. HIV negative patients presented 7/7 (100 %) positive reactions with the yeast-phase exo-antigen and 5/7 (71,4 %) with histoplasmin. In HIV positive patients CIE and CF were the most sensitive serologic tests, they gave positive results in 15/43 cases (34.8 %) with the yeast-phase exo-antigen and in 7/43 cases (13.9 %) with histoplasmin. Sera from 10 patients with paracoccidioidomycosis, aspergillosis and candidiasis respectively were studied by ID with the aim of detecting serologic cross reactions. No cross reaction was detected in these serum samples. This yeast-phase exo-antigen of *H. capsulatum* is more sensitive than and equally as specific as control histoplasmin.

Key words

La histoplasmosis es una micosis sistémica endémica producida por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. Es una afección de distribución geográfica amplia con mayor incidencia en América y África. La mayor parte de las infecciones son asintomáticas o benignas y autorresolutivas. Las formas clínicas progresivas se producen como consecuencia de fallas de la inmunidad mediada por células o por las alteraciones graves de la estructura pulmonar observadas en la enfermedad obstructiva broncopulmonar crónica [1].

Las reacciones serológicas son un importante procedimiento de diagnóstico de las formas pulmonares crónicas progresivas y diseminadas crónicas de histoplasmosis. Las técnicas usualmente empleadas son la inmunodifusión en gel de agar (ID) y la fijación del complemento, para su realización se utiliza un antígeno metabólico de la forma micelial de *H. capsulatum*, llamado histoplasmina [2,3].

Las formas diseminadas agudas y subagudas de histoplasmosis se asocian con frecuencia al sida en las áreas geográficas en las que esta micosis es endémica [4]. En estos pacientes, las reacciones serológicas, antes mencionadas, para buscar anticuerpos sólo dan resultados positivos en menos del 25 % de los casos [4,5].

En los estudios anteriores pudimos comprobar que los antígenos obtenidos de la forma de levadura de *H. capsulatum* eran más sensibles para la detección de pruebas cutáneas y también podrían ser empleados en reacciones serológicas [6].

El propósito de este estudio es preparar y estandarizar un exoantígeno de la forma de levadura de *H. capsulatum* y comprobar si es útil para las pruebas serológicas habitualmente empleadas para el diagnóstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del antígeno. Se emplearon tres cepas de *H. capsulatum* var. *capsulatum*, de aislamiento reciente y mantenidas en su forma de levadura mediante repiques semanales en agar-caldo glucosado al 2 % e incubados a 37°C.

Dichas cepas se sembraron en el mismo medio y se incubaron a 37°C durante siete días. Después de este lapso, las colonias fueron suspendidas en agua destilada con 1/5000 de mertiolato-borato de sodio e igual concentración de fenil-metil-sulfonil fluoruro (el desarrollo de cuatro tubos de ensayo fue suspendido en aproximadamente 10 ml de la solución). Esta suspensión fue dejada a temperatura ambiente durante 72 h, seguidamente se separaron las células fúngicas por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue guardado a -20°C. Los sobrenadantes de varios lotes se liofilizaron y fueron resuspendidos en agua destilada en un volumen 25 veces menor que el original. Se prepararon hasta el presente 10 lotes de antígeno a fin de comprobar si sus propiedades se reproducían.

Preparación del antisuero de conejo. Fueron inmunizados dos conejos New Zeland de 2,5 kg de peso con un antígeno constituido por una suspensión de levaduras de las cepas de *H. capsulatum* empleadas en la elaboración del reactivo anterior.

Se preparó una suspensión de levaduras equivalente al nº 2 de la escala de Mc Farland en solución salina isotónica estéril con 0,3 % de fenol. Dicha suspensión fue calentada al 62°C durante 1 h en tres oportunidades. Se comprobó la muerte de las células fúngicas por cultivos en agar caldo de carne glucosado al 2 %, incubados a 37°C.

Este inmunógeno fue aplicado por vía subcutánea con coadyuvante de Freund y luego por vía venosa. Una vez demostrada la producción de anticuerpos, se sangraron los conejos a blanco y se procedió a separar las gammaglobulinas del suero de acuerdo a la técnica propuesta por Palmer y cols. [7]. La solución de gammaglobulina obtenida se ajustó a una concentración de proteínas totales de 4 g/dl y fue utilizada como antisuero patrón.

Infección experimental en hámsters. Fueron infectados 20 animales, de aproximadamente 100 g de peso, por vía intracardíaca con la fase levaduriforme de *H. capsulatum*, siguiendo el procedimiento propuesto en un trabajo anterior [8]. Dichos animales fueron sangrados por punción cardíaca, cada 48 h durante la primera semana y luego una vez por semana durante cuatro semanas. Tres animales murieron antes de finalizar la experiencia. Las muestras de suero fueron guardadas a -20°C y se las utilizó para la demostración de anticuerpos.

Estudio químico del antígeno. La concentración de proteínas totales de este antígeno fue determinada en un equipo "Autoanalyzer VP Abbott" y cada lote fue ajustado a una concentración 5,5 g/l. También se determinó el contenido de polisacáridos utilizando el mismo sistema y estableció que los lotes presentaban alrededor de 5,6 g/l.

El exoantígeno fue sometido a una corrida electroforética en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo la técnica de Laemmli [9]. Este reactivo fue disuelto en buffer Tris con ácido clorhídrico, fuerza iónica 0,5 M, pH 6,8, contenía 10 % de SDS, 10 % de glicerol y 0,5 % de 2-mercaptoetanol. Esta solución fue calentada 95°C durante 5 min. En la columna de corrida electroforética se colocaron 20 µl del antígeno y en otra columna igual volumen de una solución estándar de control de pesos moleculares con un rango de 14,4 a 97,4 kDa (Bio-Rad Laboratories, EEUU). La corrida electroforética se llevó a cabo con una diferencia de potencial de 200 V y durante 2 h, se utilizó un equipo "Mini-Protean II" (Bio Rad) Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Se separaron mediante este procedimiento siete fracciones proteicas. A continuación se llevó a cabo la inmunotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa, utilizando un equipo "Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer cell" (Bio Rad) y fueron incubados con un pool de sueros humanos de pacientes con histoplasmosis confirmada micológicamente. Para el análisis de inmunoblot se usó un antisuero de conejo anti-IgG humana marcado con peroxidasa (Bio-Rad).

Técnicas serológicas utilizadas. Las pruebas de inmunodifusión en gel de agar y contraelectroforesis se llevaron a cabo de acuerdo a las técnicas propuestas por Zaror y cols. [10]. La fijación de complemento se realizó por el micrométodo preconizado por la OMS [11].

En las técnicas de inmunoprecipitación en medios gelosados el antígeno fue utilizado en la concentración de 1,4 g/L de proteínas y para la fijación de complemento se empleó una dilución 1:64 de esta concentración del antígeno.

Antígeno control. Se utilizó como antígeno control un reactivo metabólico que se obtuvo de la forma micelial

de *H. capsulatum* (histoplasmina) de acuerdo a la técnica propuesta por Kaufman y cols. [12]. Este antígeno presentó las bandas H y M en las reacciones de inmunodifusión con la γ -globulina de conejo anti-*H. capsulatum*.

Muestras de sueros empleados. Se utilizaron sueros de 20 hámsters experimentalmente infectados con *H. capsulatum*, 50 muestras de suero de pacientes con histoplasmosis progresiva (7 enfermos VIH- y 43 VIH+) y 10 sueros de enfermos que padecían una de las siguientes micosis: paracoccidioidomicosis, aspergilosis y candidiasis. Todos estos especímenes fueron guardados a -20°C hasta el momento de su empleo e inactivados a 56°C durante 30 min.

RESULTADOS

Pruebas de capacidad antigénica. Todos los sueros obtenidos de hámsters después de los 21 días de la infección mostraron bandas de inmunodifusión positiva frente a los 10 lotes del exoantígeno de forma de levadura con una concentración de proteínas de 1,4 mg/ml.

Fracciones con actividad antigénica. La prueba de inmunotransferencia mostró dos fracciones proteicas con actividad antigénica, cuyos pesos moleculares fueron de 97 y 66 kDa respectivamente.

Características químicas y antigénicas de los diez lotes de antígenos. Como ya fue señalado todos los lotes preparados, después de ser liofilizados, fueron suspendidos en agua destilada y ajustados a una concentración estándar de proteínas de 5,5 mg/ml. Con la γ -globulina de conejo anti-*H. capsulatum* se comprobó que todos los lotes preparados presentaron reacciones de identidad con las dos fracciones antigénicas principales.

Resultados de las pruebas serológicas con los sueros humanos. Los resultados obtenidos con los 50 sueros de pacientes con histoplasmosis están resumidos en la tabla 1.

Las pruebas de inmunodifusión en gel de agar y contraelectroforesis con 30 sueros de pacientes que presentaron paracoccidioidomicosis, aspergilosis o candidiasis, no exhibieron bandas de precipitación.

Tabla 1. Resultados de las pruebas serológicas en pacientes con histoplasmosis progresiva.

Pacientes	nº de casos	Exo-antígeno			Histoplasmina		
		Reacciones positivas			Reacciones positivas		
		ID	CIE	PFC	ID	CIE	PFC
HIV negativos	7	7	7	7	5	5	5
HIV positivos	43	6	15	15	3	7	7
Total	50	13	22	22	8	12	12

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La histoplasmosis es la segunda micosis potencialmente fatal asociada al sida en la República Argentina. Esta infección fúngica se presenta habitualmente con las manifestaciones clínicas que son propias de las infecciones graves de evolución aguda o subaguda: fiebre, pérdida de peso, astenia, anemia, hepatosplenomegalia, etc. En Sudamérica las lesiones cutáneas y mucosas son observadas en más del 75 % de los casos [4]. El diagnóstico de la histoplasmosis se hace, frecuentemente, por el examen microscópico del material obtenido por escarificación de las lesiones de piel o mucosas [5]. Sin embargo, aproximadamente el 20 % de los enfermos no presenta estos

focos de infección fácilmente abordables y el diagnóstico debe ser realizado a través de los hemocultivos por las técnicas de lisis-centrifugación. Aunque este procedimiento es bastante sensible, requiere habitualmente alrededor de 10 a 20 días de incubación para presentar colonias identificables, período muy prolongado para afecciones de curso agudo [13,14].

Otro procedimiento utilizado ha sido la detección de un antígeno glucoproteico específico en muestras de orina o suero, por técnicas de radioinmunoensayo y ELISA doble sandwich, la primera de estas técnicas es costosa y aún se carece de equipos comerciales para la segunda [15,16].

Las pruebas serológicas habitualmente utilizadas en el diagnóstico de la histoplasmosis, mediante la demostración de anticuerpos, dan resultados positivos en menos del 25 % de los casos asociados al sida [5].

Las razones antes señaladas demuestran la necesidad de mejorar el rendimiento de las pruebas serológicas, tanto para la búsqueda anticuerpos como de antígenos específicos. En este primer paso procuramos caracterizar y estudiar las propiedades antigénicas de un preparado obtenido de la forma de levadura de *H. capsulatum*. El exoantígeno obtenido demostró ser más sensible que la histoplasmina hasta ahora utilizada y conserva la misma especificidad. De las reacciones serológicas clásicas, la CIE y la FC fueron las pruebas más sensibles con ambos antígenos. En ellas el exoantígeno levaduriforme presentó 34,8 % de resultados positivos contra 13,9 % de la histo-

plasma, cuando se estudiaron sueros de pacientes con sida y 100 % de pruebas positivas contra 71,4 % en sueros de pacientes de histoplasmosis VIH-.

Este exoantígeno es fácil de preparar, su estandarización química mediante el dosaje de proteínas totales, permitió la obtención de diez lotes con características semejantes y los estudios de inmunotransferencia demostraron la presencia de sólo dos fracciones con actividad antigénica específica, cuyos pesos moleculares aproximados fueron de 66 y 97 kDa respectivamente.

La sensibilidad de las pruebas serológicas clásicas es aún muy baja para los enfermos HIV+, pero las características de este exoantígeno de fase levaduriforme hace presumir que será útil para su empleo en reacciones de mayor sensibilidad como el ELISA.

En un estudio reciente Gómez y colaboradores han comprobado la utilidad de una reacción de ELISA de inhibición para la detección de un antígeno específico de *H. capsulatum* de 69 a 70 kDa, mediante el empleo de un antisero monoclonal de ratones. La sensibilidad general de esta técnica fue de 71,4 %, su especificidad fue del 98 % con los sueros normales de personas residentes en área endémica y del 85,4 % con los sueros de enfermos portadores de micosis crónicas [17]. Este procedimiento, bastante más complejo que el empleado por nosotros en este estudio, tiene buenas perspectivas de poder ser utilizado como procedimiento rutinario en un futuro próximo.

References

1. Negroni Briz R. Histoplasmosis. En: Torres Rodríguez JM, Del Palacio-Herranz A, Guarro-Artigas J, Negroni-Briz R, Pereiro-Miguens M. (Eds). Micología Médica. Masson, Barcelona, 1993: 247-261.
2. Negroni R, Negroni P, Bachmann AE. Algunos aspectos inmunológicos de la histoplasmosis humana en la Argentina. Dermatología I.L.A. 1967; 9: 41-48.
3. Negroni R, Iovannitti C, Robles AM. Estudio de las reacciones serológicas cruzadas entre antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. Rev Asoc Microbiol 1976; 8: 68-73.
4. Negroni R, Robles AM, Arechavala A, Taborda A. Histoplasmosis diseminada en pacientes con SIDA, su evolución y tratamiento. Rev Arg Micol 1991; 15: 5-12.
5. Arechavala A, Robles AM, Negroni R, Bianchi M, Taborda A. Valor de los métodos directos e indirectos de diagnóstico en las micosis sistémicas asociadas al SIDA. Rev Inst Med trop Sao Paulo 1993; 35: 163-169.
6. Negroni R, Elías Costa MR, Golferá H, Arechavala A. Estudio de dos antígenos de la fase levaduriforme del *Histoplasma capsulatum* para pruebas cutáneas. Sabouraudia 1979; 17: 155-161.
7. Palmer DF, Kaufman L, Kaplan W, Cavallaro JJ. Serodiagnosis of mycotic diseases. American Lecture Series. Thomas Books, Springfield, 1977: 103-106.
8. Iovannitti C, Negroni R, Finkelievich JL, Bava AJ. Histoplasmosis experimental del hamster. Rev Arg Micol 1988; 11: 7-11.
9. Elías Costa MRI de. Obtención de un nuevo antígeno del *Coccidioides immitis* y desarrollo de un modelo experimental de enfermedad en ratas Wistar. Tesis Doctoral. Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Buenos Aires. U.B.A. 1995.
10. Zaror L, Robles AM, Negroni R. Pruebas de inmunodifusión en medios gelosados con el agregado de polietilenglicol 6000 para el serodiagnóstico de las micosis. Rev Asoc Arg Microbiol 1978; 10: 61-64.
11. Manual of standardized serodiagnostic procedures for systemic mycosis. Part II: Complement fixation test. Pan American Health Organization, Washington, DC, 1974.
12. Kaufman L. Serology of systemic fungus diseases. Public Health Reports 1966; 81: 177-185.
13. Negroni R, Robles AM, Arechavala A. Histoplasmosis progresiva estudio en un lapso de 10 años. Rev Arg Micol 1994; 17: 14-21.
14. Bianchi M, Negroni R. Estudio comparativo de dos sistemas de hemocultivos en micosis sistémicas asociadas al SIDA. Rev Arg Micol 1992; 15: 5-10.
15. Wheat L J, Kohler RB, Tewari RP. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *H. capsulatum* antigen in serum and urine specimens. N Engl J Med 1986; 314: 83-88.
16. Durkin MM, Connolly PA, Wheat LJ. Comparison of radiomunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum* antigen. J Clin Microbiol 1997; 35: 2252-2255.
17. Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz BL, Robledo MA, Restrepo A, Hay RJ. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. J Clin Microbiol 1997; 35: 2618-2622.