

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



SUB - DIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
DE POST - GRADO

**"METODO INMUNOENZIMATICO PARA INVESTIGAR ANTIGENOS
DE CANDIDA ALBICANS"**



TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS,
ESPECIALIDAD: MICROBIOLOGIA MEDICA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRESENTA

MARTA ALICIA SANCHEZ DE LA BARQUERA RAMOS

MONTERREY, N. L.
FEBRERO DE 1988

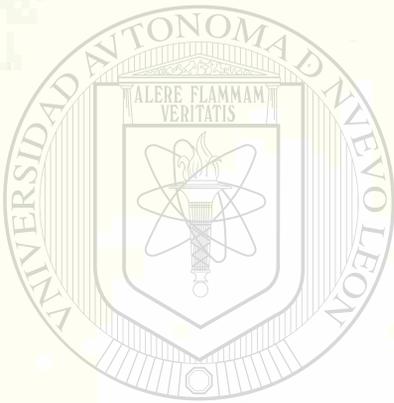
1
Tesis



TM
CR
33
4.1



1080071410



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



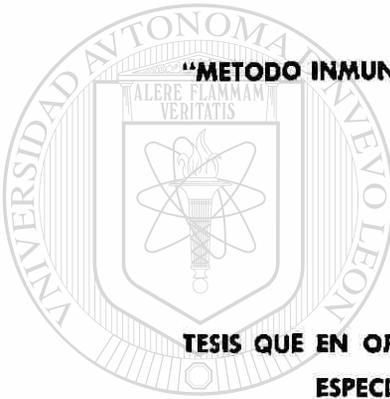
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**SUB - DIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS
DE POST - GRADO**

**"METODO INMUNOENZIMATICO PARA INVESTIGAR ANTIGENOS
DE CANDIDA ALBICANS"**



**TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS,
ESPECIALIDAD: MICROBIOLOGIA MEDICA**

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PRESENTA

MARTA ALICIA SANCHEZ DE LA BARQUERA RAMOS

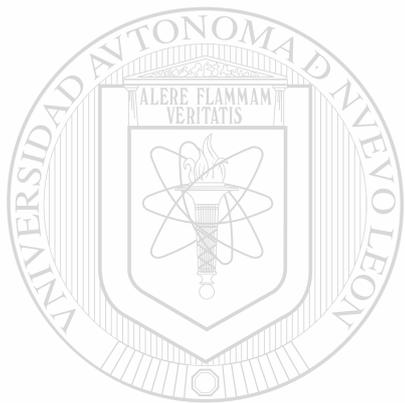


BIBLIOTECA

MONTERREY, N. L.

FEBRERO DE 1988

TM
QR201
.06
B3



UANL

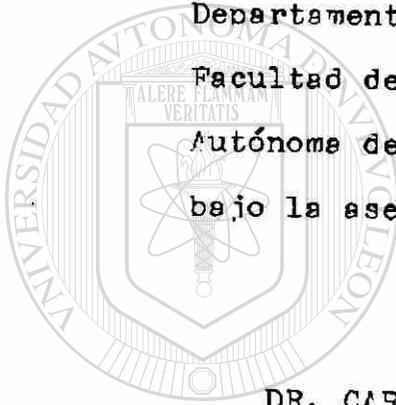
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



El presente trabajo se desarrolló en el
Departamento de Microbiología de la
Facultad de Medicina de la Universidad
Autónoma de San Luis Potosí
bajo la asesoría del



DR. CARLOS GARIBOCHO SANDOVAL

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A la memoria de mis padres:

SR. VICENTE SANCHEZ DE LA BARQUERA

SRA. JUANA MA. RAMOS DE SANCHEZ DE LA BARQUERA

Que forjaron en mí, el deseo de superación, la tenacidad para conseguirlo y la humildad para reconocer mis errores.

Con inmenso amor:

A mi esposo ALVARO GLORIA MARIN y a mi hija

DIANA ABIGAIL

Por su apoyo, paciencia y comprensión.

Cariñosamente a mis hermanos:

JORGE

ROSA MARIA

ENRIQUE

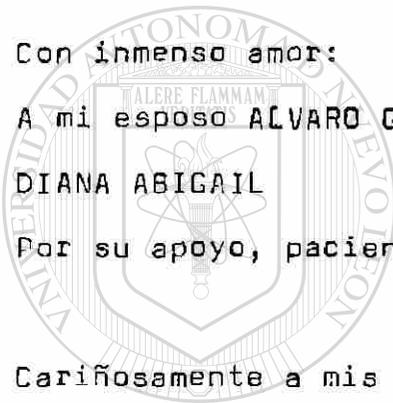
LILIA

RICARDO

LUIS HUMBERTO

ALFONSO

PATRICIA



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina
de la U.A.N.L. y de la U.A.S.L.P.

Con agradecimiento.

A mi asesor:

DR. CARLOS GARROCHO SANDOVAL

Por sus valiosos consejos y su entusiasmo en el desarrollo
de éste estudio.

A la O.F.B.

MA. GUADALUPE OBREGON RAMOS

Por su amistad y apoyo.

A mis compañeros:

Con gratitud y cariño.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Y un reconocimiento especial a:

M.C. ALICIA SUAREZ SEMOUR

DR. MANUEL RODRIGUEZ QUINTANILLA

DR. RICARDO FUIBRERA INFANTE

Por su valiosa colaboración para la realización de éste
trabajo.

INDICE

INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	19
RESULTADOS	39
DISCUSION	47
RESUMEN	55
BIBLIOGRAFIA	56

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



INTRODUCCION-

La candidiasis es una infección aguda o subaguda, en la que el hongo puede producir lesiones en boca, vagina, piel, uñas, bronquios, pulmones y, en ocasiones, septicemia, endocarditis o meningitis (11). Candida albicans es una levadura imperfecta, que en la actualidad se considera pleomórfica. Su distribución es mundial y se encuentra comúnmente en 10% (21) al 22% de los individuos sanos como comensal del tracto digestivo, de la cavidad oral en 42.9% (54), en vagina de mujeres sanas, del 15% (21) al 20.7% (54) y en la orina, en un 10% (21). Es el agente etiológico mas común de infección micótica oportunista en pacientes de alto riesgo (57).

En los últimos años se ha reconocido que las infecciones sistémicas por Candida han llegado a ser una causa importante de morbi-mortalidad entre los pacientes hospitalizados (33), en quienes la colonización por éste germen es mas elevada que en la población general (21).

La candidiasis diseminada o invasiva es una enfermedad cada vez mas frecuente, poco diagnosticada y casi siempre fatal. Sus cifras de mortalidad varían entre 60 y 80% (22), pero disminuyen de manera significativa con la instalación

oportuna del tratamiento antimicótico (27). Solo un 15 a 40% de pacientes con evidencia postmortem de candidiasis diseminada alcanzan a recibir tratamiento premortem (21). Esto hace implícita, por lo tanto, la necesidad de un diagnóstico también oportuno.

Ocurre como complicación grave en pacientes inmunosuprimidos, receptores de trasplantes, con enfermedades mieloproliferativas (sobre todo leucemia), con tumores sólidos, sometidos a tratamientos antimicrobianos prolongados, diabéticos, con quemaduras extensas o con alimentación parenteral, entre otros (1,19,20,33,43,45,60). Sin embargo, Young (62) ha reportado que la mayoría de los pacientes con candidiasis sistémica no presentan enfermedades mieloproliferativas y que no habían recibido tratamiento inmunosupresor, aunque sí encontró relación con la presencia de alguna enfermedad subyacente.

Entre los pacientes leucémicos, la incidencia de 7% en los años de 1954 a 1959 se incrementó al 35% en el período de 1963 a 1975 (21,37). Myerowitz et al estudiaron casos de Candidiasis sistémica probada por autopsia entre 1963 y 1975, y encontraron una elevación de 1.1 a 6.8 casos por año durante los últimos 4 años y medio de su investigación (43).

Se ha reportado que un 15 hasta un 53% de pacientes — con leucemia desarrollan infección por Candida (5,13,41). La muerte en éstos enfermos se relaciona con infecciones en general en el 54% (41). El 60 al 85% de los casos no se diagnostican a tiempo (22).

Hasta 1974 la mayoría de los diagnósticos confirmatorios se basaban en métodos histológicos mediante biopsia o necropsia (62).

Las dificultades para establecer un diagnóstico oportuno ante-mortem derivan de varios factores:

a) Insuficiente caracterización clínica de la enfermedad — (43,60).

b) El hábitat endógeno del hongo, la alta frecuencia con que Candida coloniza las membranas mucosas de pacientes debilitados y la marcada variación en especies de Candida aisladas de diferentes sitios del mismo paciente, lo que hace confusa la interpretación de los cultivos (22,33,43).

c) Los cultivos son muchas veces negativos en presencia de la enfermedad. Solo en 39 a 44% de los pacientes con candidiasis diseminada el hemocultivo resulta positivo y —

solo del 66 al 87% son reportados entemortem (21,43,62).

d) Las pruebas cutáneas con candidina no diagnostican la enfermedad aguda. Tienen una alta incidencia de positividad en individuos sanos y tambien son posibles las reacciones anérgicas (45,60).

Se han publicado informes discrepantes e incluso contradictorios sobre la sensibilidad de las pruebas serológicas para detectar anticuerpos anti-Candida albicans (19,20,24, 37,45,57). A ese respecto, pueden hacerse las siguientes consideraciones:

a) Estas pruebas no han demostrado valor diagnóstico en huéspedes inmunosuprimidos y solo ayudan cuando está intacto el sistema inmune, lo que con frecuencia excluye los pacientes cancerosos o inmunocomprometidos por otras circunstancias (1,19,33). En los pacientes inmunosuprimidos se detectan títulos menores, con un incremento en las reacciones falsas negativas; además, no tienen valor diagnóstico para diferenciar a los pacientes colonizados de aquellos con enfermedad invasiva (19,20,24,25,35).

b) Los anticuerpos aparecen tardíamente en el curso de la

infección (33).

c) La especificidad de éstas técnicas es baja. algunos investigadores piensan que tiene significancia diagnóstica el detectar aglutininas en el suero de los pacientes: otros creen que ésta información posee un valor dudoso (19,44). La sensibilidad de éstas pruebas es muy variable (7 a 94%) (19,37).

d) En un estudio, el título de anticuerpos aglutinantes no sirvió como indicador para candidiasis sistémica (19). No se han encontrado anticuerpos hasta en 18 al 24% de pacientes leucémicos aún en presencia de candidiasis (19, 37).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

e) Los anticuerpos aglutinantes se encuentran hasta en 89% de individuos aparentemente sanos y las reacciones cruzadas con otros hongos y bacterias son comunes. Las reacciones falsas positivas van del 0 al 15% con falsas negativas en un 2% (22, 24, 45, 57).

f) La sola presencia de anticuerpos no es indicativa de infección por Candida, aunque la elevación en el título puede ser una señal temprana de infección severa. Por otra parte, se han demostrado anticuerpos a concentración ele-

vada en el suero de individuos normales (19,24,37,57).

g) En otro estudio cooperativo entre 6 laboratorios, se utilizaron tres métodos de uso común (difusión en agar, aglutinación de células completas y aglutinación de látex) y seis de elección, uno por cada laboratorio. Se reportaron grandes variaciones, tanto en sensibilidad como en especificidad, con algunos métodos, debido a la interrelación de una serie de factores:

1. Diferentes condiciones ambientales para el crecimiento.
2. Métodos de disrupción celular.
3. Variación antigénica de cepa a cepa.
4. Factores de dilución.
5. Diferentes condiciones de pruebas (38).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

h) El seguimiento de la cinética de las respuestas de anticuerpos antimanano y anti-antígeno citoplásmico de Candida albicans en conejos y humanos, se ha encontrado que la inoculación de conejos con células completas muertas por calentamiento, despiertan una respuesta de anticuerpos antimanano a los 5 - 14 días posteriores a la inyección. Cuando se administró manano, la respuesta de anticuerpos antimanano ocurrió a los 3 - 8 días posteriores y la inoculación de antígeno citoplásmico produjo anticuerpos anti-citoplásmicos a los 5 - 7 días. Las respuestas inmu-

nológicas en humanos y conejos fué muy similar (28).

Así, entre las razones que impiden interpretar sdecuadamente las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos, podemos incluir:

1. Individuos que tienen títulos importantes de aglutininas y precipitinas, aún sin evidencia de candidiasis diseminada.
2. Individuos con enfermedad diseminada, pero que son anérgicos.
3. Falta de reactivos estandarizados para las pruebas (44, 45).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4. Frecuente incapacidad de los pacientes inmunocomprometidos o muy debilitados y, para producir respuestas detectables (19,24,44).

Entre las características clínicas que apoyen el diagnóstico de candidiasis diseminada se han propuesto los siguientes criterios (dos o mas):

- 1) Hemocultivos positivos repetidos en varios días en pacientes con sospecha clínica o signos de septicemias.

- 2) Hallazgos fundoscópicos de endoftalmitis candidiásica.
- 3) Evidencia patológica post-mortem de endocarditis sobre una válvula prostética.
- 4) Signos de peritonitis con cultivos positivos de Candida albicans en el líquido de paracentesis.
- 5) Trocultivos positivos repetidos (24).

Entre las manifestaciones clínicas periféricas de candidiasis sistémica se encuentran: miocarditis, endoftalmitis, osteomielitis, artritis hematógena, esofagitis, lesiones cutáneas macronodulares, meningitis, endocarditis, peritonitis y neumonía (15, 17, 55). En estudios de autopsia se han encontrado afectados con mayor frecuencia el riñón y el miocardio (15, 50).

Otro camino para el diagnóstico en la candidiasis sistémica es el de buscar antígenos de Candida en el suero de pacientes infectados. Las ventajas de éste enfoque serían:

- a) La positividad de las pruebas no requiere de la respuesta inmune del huésped.

- b) Presumiblemente, solo los pacientes con enfermedad diseminada pueden tener antígenos en el suero a títulos importantes.
- c) La antixenemia puede detectarse aún cuando esté instalado ya el tratamiento antimicótico (44).
- d) La detección y cuantificación de antígenos en suero humano requieren usualmente de pruebas muy sensibles, debido a que se encuentran en la muestra en concentraciones muy bajas.

De acuerdo con informes recientes, se ha detectado antixenemia mediante el uso de una gran variedad de métodos: contratrainmunolectroforesis, cromatografía de gases en fase líquida, inhibición de hemaglutinación, radioinmunoensayo, etc. (2, 21, 31, 39, 40, 44, 49, 60).

Verkering usó un método de contratrainmunolectroforesis en 48 pacientes inmunocomprometidos y con cultivos positivos para Candida, y detectó el antígeno en 13 enfermos, 8 de los cuales se demostró que tenían enfermedad sistémica (31).

Miller empleó cromatografía gas-líquido e identificó picos anormales en pacientes con candidemia, pero su método —

no se puede aplicar en nuestros laboratorios (31,40).

Weiner y Vount emplearon una técnica de inhibición de hemaglutinación. En su estudio, 6 de 19 pacientes con candidiasis invasiva fueron positivos tempranamente en el curso de la infección, lo que representa el 30% de positividad. sin embargo, la sensibilidad fue baja (60). Meunier también utilizó una prueba de inhibición de hemaglutinación pasiva y fué capaz de detectar pequeñas cantidades de manano en 19 de 32 pacientes (39).

Poor et al utilizaron un radioinmunoensayo de fase sólida, e identificaron antigenemia en 70.4% de ratones infectados, aún con hemocultivos negativos. En otra revisión con esta técnica se detectó antigenemia en 12 de 19 pacientes con candidiasis probada (2,44).

También se han encontrado manosa, arabinitol, manano y creatinina séricas como marcadores de la enfermedad. Aunque tales marcadores estaban elevados en algunos de los animales, solo el manano sérico fué específico en el modelo con conejos inmunosuprimidos (49).

Más recientemente se ha evaluado un sistema de búsqueda de Candida (CAND-TEC), que detecta antígenos proteicos de —

Candida albicans, stellatoidea, tropicalis y parapsilosis.

Su sensibilidad es del 71%, con una especificidad del 98% (21).

Warren, en 1977, fue el primero en emplear experimentalmente ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) para detectar antígenos de Candida en animales, aunque no correlacionó los títulos encontrados con la letalidad de la enfermedad experimental (59).

En modelos animales (conejos), los títulos determinados por ELISA correlacionaron con la extensión de la infección y la presencia de un título elevado predijo la muerte. Esta técnica fue positiva aún en presencia de hemocultivos negativos (27).

Se desarrolló después una variante inmunoenzimática de doble sandwich para la investigación del antígeno manano en suero. El ensayo estableció la presencia de antigenemia dentro de las primeras 24 horas en todas las ratas infectadas y persistió hasta su muerte. La sensibilidad de éste método fue de 1 ng/ml en buffer, pero en suero humano común fue 1000 veces menos sensible (33).

Con un método similar, Araji utilizó como antígeno un

extracto citoplásmico de C. albicans y encontró que en 7 pacientes con la enfermedad probada, todos presentaban concentraciones altas de éste antígeno. El nivel promedio de antigenemia fue de 1,200 ng/ml, y la prueba se consideró positiva a partir de 125 ng/ml (1).

Se han comparado éstas dos variantes de técnicas inmunoenzimáticas (método de sandwich y método de inhibición) y se prefiere generalmente la primera, porque la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de manano (48). Sin embargo, Seegal empleó inhibición de ELISA y reportó un rango de inhibición del 22 al 56% en pacientes con candidiasis probada por autopsia (53).

En endocarditis experimental en conejos, se detectó antigenemia por C. albicans en el 75% de los animales enfermos y en ninguno de los controles (52).

Entre las desventajas de ELISA para identificar antígenos de Candida están las siguientes:

1. Riesgo de que la alta prevalencia de anticuerpos en poblaciones humanas normales influye negativamente sobre la sensibilidad de éstos inmunoensayos, al secuestrar moléculas circulantes del antígeno. No obstante, el calentamiento previo del suero disocia éstos complejos antígeno-anticuerpo (1,33,48).

2. La antigenemia puede ser un fenómeno intermitente o temprano, que no se presente en todos los individuos en fase avanzada de la enfermedad. La infección profunda por Candida, sin candidemia documentada, ocurre en 28 a 54% de los pacientes y lo contrario, candidemia transitoria sin evidencia de enfermedad sistémica, también sucede (33, 60).

3. La posible participación de mecanismos para depurar los antígenos circulantes, cuya eficiencia en ocasiones puede exceder a la tasa de producción de éstas moléculas (1).

4. Se han suscitado también algunas controversias en el reconocimiento de la inmunoespecificidad de los antígenos de C. albicans que han sido preparados por métodos diferentes (4).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La pared celular de los hongos es una estructura compleja, compuesta en gran parte de polisacáridos. Los polisacáridos cristalinos (quitina y glucano) constituyen la porción esquelética de la pared, mientras que los polisacáridos amorfos y los complejos de proteína-polisacárido forman parte de la matriz (18).

El componente antigénico mayor de la pared celular de

C. albicans, llamado manano, es un polímero con múltiples ramificaciones, compuesto de cadenas cortas de manosa unidas por enlaces glucosídicos alfa-1,2 y en sus ramificaciones por enlaces alfa-1,6. El glucano (polímero de D-glucosa con enlaces glucosídicos beta-1,3 y beta-1,6) y el manano constituyen el complejo carbohidrato primario de la matriz de la pared celular de C. albicans (36).

El análisis químico de los componentes solubles de C. albicans ha revelado complejos de cantidades variables de proteínas o péptidos, glucosa o manosa (12). El estudio químico de los carbohidratos muestra que consisten casi exclusivamente de manosa (96% en el manano purificado y 92% en paredes celulares). El manano es responsable de las reacciones de aglutinación e inmunofluorescencia. Las porciones de hexosa o heptosa con enlaces glucosídicos alfa-1,2 han sido reconocidas como determinantes antigénicos y están contenidas en las cadenas laterales. Las diferencias serológicas que existen entre una cepa y otra se apoyan en las distintas longitudes de éstos determinantes (36,54).

La estimación de la masa de la pared celular varía del 15 al 30% del peso seco (54). Candida albicans tiene por lo menos dos grupos serológicos antigénicamente diferentes, A y B. El serotipo A es antigénicamente muy similar a C. tropicalis.

-lis, aunque ésta última no posee el antígeno 7 (29,42,56).

Los serotipos A y B comparten los antígenos 1, 4 y 5, pero la especificidad antigénica reside en el factor 6, que solo se encuentra en el tipo A. Los antígenos encontrados "in vivo" durante la infección con un serotipo particular pueden ser bien detectados con anticuerpos contra el serotipo y pobremente por anticuerpos contra serotipos diferentes (46).

La localización de los antígenos en células de varias especies de Candida rotas mecánicamente fue estudiada en 1963. Se produjeron y aplicaron antisueros monoespecíficos para identificar a los miembros del género Candida. Se encontraron los antígenos 1 al 3 en la pared celular y los antígenos termolábiles a, b, c y 5 en el citoplasma. Los antígenos del 4 al 9 se ubicaron tanto en la pared como en el citoplasma (29).

La estructura antigénica de C. albicans también ha sido analizada por electroforesis cruzada y se han demostrado 68 antígenos solubles en agua, lo que demuestra la complejidad antigénica de ésta levadura (4).

Se ha reconocido un antígeno, denominado antígeno 47kD

con un peso molecular de 47,000, que comparte epítopes con otros antígenos candidiásicos. La reacción cruzada entre estos epítopes comunes explicaría el porque los anticuerpos monoclonales en el ratón reconocen mas de una banda de precipitación (7). Además, debido a los antígenos comunes la absorción cruzada para la purificación de los factores del suero puede dar lugar a una disminución en el título de anticuerpos (42).

Los antígenos producidos "in vivo" pueden tener diferentes epítopes que los inducidos por blastoconidias "in vitro". Sin embargo, los determinantes antigénicos específicos del serotipo A de Candida albicans están presentes en los antígenos circulantes durante la infección (47). Se ha establecido que los polisacáridos termoestables contribuyen a la antigenemia, aunque no se descarta la posibilidad de que otros antígenos puedan circular "in vivo".

Los antígenos liberados durante la infección por un serotipo específico pueden ser detectados por anticuerpos contra el mismo serotipo y pobremente, si acaso, por anticuerpos contra un serotipo diferente. De acuerdo con las formas antigénicas de las especies de Candida mencionadas con anterioridad, el antisuero contra el serotipo A puede identificar antígenos del serotipo B, a menos que los antígenos solu

-bles B tengan una composición diferente a los presentes en la superficie celular A, o bien que los antígenos liberados durante la infección se encuentren disminuidos en sus factores comunes 1, 4, y 5 y enriquecidos en factor 13b u otro -- factor no reconocido aún (46).

Recientemente, con la producción de anticuerpos monoclonales aglutinantes, Miyakawa (42) propone el siguiente esquema para las fórmulas antisépticas de C. albicans y especies relacionadas:

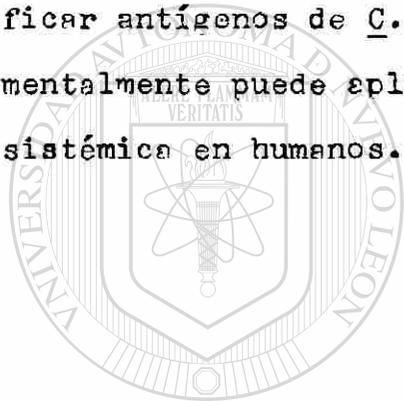
ESPECIE	ANTIGENOS
<u>C. albicans</u> A	1, 4, 5, 6, 7
<u>C. albicans</u> B	1, 4, 5, 13b
<u>C. tropicalis</u>	1, 4, 5, 6
<u>C. guilliermondii</u>	1, 4, 9
<u>C. krusei</u>	1, 5, 11
<u>C. parapsilosis</u>	1, 5, 13, 13b
<u>C. pseudotropicalis</u>	1, 8

Modificado según Kemp (20).

Las paredes celulares producen una respuesta de tipo --
monoclonal en el ratón, lo que sugiere que contienen un-

antígeno que es, con relación a éste animal, timo- indepen-
diente (42). En contraste, en los humanos la formación de in-
munoglobulinas como respuesta a la inyección de manano es ti-
mo-dependiente (47).

Pensemos que una técnica inmunoenzimática de fácil a-
plicación en nuestros laboratorios para identificar y cuanti-
ficar antígenos de C. albicans en conejos infectados experi-
mentalmente puede aplicarse en el diagnóstico de candidiasis
sistémica en humanos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MATERIAL Y METODOS

1. PREPARACION DEL ANTIGENO DE CANDIDA ALBICANS.

Se utilizó una cepa de Candida albicans donada gentilmente por el Q.B.P. Alejandro Garza Osuna, del Departamento de Microbiología de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La identificación de especie se llevó a cabo de acuerdo con la metodología previamente descrita (26). Se sembraron placas con agar Saboraud al 4% y se incubaron a 37 grados C por 48 - 72 horas, para obtener cultivos en fase de crecimiento levaduriforme (10,19,54). Se aplicó una adaptación del método de Filice para la preparación del antígeno soluble (19).

El material de las colonias se colectó con hisopo de algodón estéril y se lavó tres veces con formol salino al 0.5%. Se colectaron 20 ml de suspensión celular que fue resuspendida a una concentración del 50% en formol salino y se fraccionaron por ruptura celular en un aparato sonificador (Branson Sonic Power Company, modelo B - 30) durante 3 horas a 300 watts, para producir la disrupción de la mayoría de las esporas de acuerdo con monitoreo microscópico.

La suspensión así obtenida se calentó en baño de tempe-

temperatura constante a 62 grados C durante 20 min. para atenuar la virulencia. Para comprobar la esterilización de las levaduras se hicieron resiembras en agar Saboraud y se incubaron a 37 grados C durante 48 a 72 horas.

Posteriormente la mezcla celular se centrifugó a 23,500 \times por una hora a 4 grados C. El sobrenadante se separó y se mantuvo en refrigeración a -70 grados C en alícuotas para ser empleado como antígeno.

Se hicieron las siguientes determinaciones en el material así obtenido: presencia de polisacárido (Molish, Benedict), proteínas (Lowry) (34), glucosa (orto-toluidina), carbohidratos totales (Folin Wu) y manosa (diferencia entre carbohidratos totales y glucosa) (40).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

2. PRODUCCION Y SEPARACION DE ANTICUERPOS. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se inocularon 6 conejos de 1.5 a 3 \times gs de peso por vía subcutánea con un volúmen de 2 ml de una mezcla a partes iguales de adyuvante completo de Freund y del antígeno producido por nosotros. Esta inyección fue seguida de inoculaciones semanales con la misma dosis pero con adyuvante incompleto de Freund, de acuerdo al esquema de inmunización descrito previamente (27) y que se ilustra en la tabla 1.

TABLA 1
 ESQUEMA DE INMUNIZACIONES A CONEJOS
 CON ANTIGENO DE Candida albicans.

SECUENCIA DE INOCULACIONES	DOZIS DE ANTIGENO	VIA DE INOCULACION	SITIO DE INOCULACION
Primera semana	2 ml antígeno con adyuvante completo de Freund	Subcutánea	Dorso
Segunda semana	1 ml antígeno con adyuvante incompleto de Freund	Subcutánea	Dorso
Tercera semana	1 ml antígeno con adyuvante incompleto de Freund	Subcutánea	Dorso
Cuarta semana	1 ml antígeno con adyuvante incompleto de Freund	Intravenosa	Vena marginal

Se inoculó un carnero con dos dosis simultáneas de 3.5 ml de antígeno con adyuvante completo. El animal recibió — luego 4 inyecciones semanales dobles con la misma dosis, pero con adyuvante incompleto de Freund por vía intramuscular. El esquema de inmunización del carnero se presenta en la tabla 2.

Se sangraron los conejos de la vena marginal de la oreja, antes de cada una de las inoculaciones subsecuentes y se titularon por inmunodifusión en portaobjetos. Se siguió una conducta similar con el carnero, del que se tomaron muestras de sangre de la vena yugular interna. En ambos casos usamos el antígeno preparado por nosotros.

El procedimiento que se aplicó para la separación de anticuerpos fué el mismo para los conejos y el carnero. Se siguió la técnica descrita por Voller et al (58).

El suero se diluyó 1:5 con buffer salino de fosfatos — (PBS) pH 7.4 se añadió sulfato de amonio 3.6 M con pH 7.0, — gota a gota y se mantuvo en agitación durante una hora. Se centrifugó a 11,000 g en una centrífuga Servall SS-34 durante 15 minutos a 4 grados C.

Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspen

TABLA 2

ESQUEMA DE INMUNIZACION DE CARNERO CON
ANTIGENO DE Candida albicans

SECUCNCIA DE INOCULACIONES	DCSIS DE ANTIGENO	VIA DE INOCULACION	SI'JO DE INOCULACION
Primera semana	2 inoculaciones de 3.5 ml de antígeno con adyuvante completo de Freund	Intramuscular	Ambos glúteos
Segunda semana	2 inoculaciones de 1 ml de antígeno con adyuvante incompleto de Freund	Intramuscular	Ambos glúteos
Tercera semana	2 inoculaciones de 1 ml de antígeno con adyuvante incompleto de Freund	Intramuscular	Ambos glúteos
Cuarta semana	1 inoculación de 1 ml de antígeno con adyuvante incompleto de Freund	Intravenosa	Cuello

dió y se lavó con sulfato de amonio 2 M. Las gammaglobulinas precipitadas se reconstituyeron a la mitad del volumen original del suero con agua destilada y se dializaron contra cloruro de sodio 0.85% durante 24 horas, con el fin de remover todo el sulfato de amonio. Se utilizó cloruro de bario 0.01 M para comprobar la eliminación del sulfato de amonio, el que, de estar presente en el líquido dializante, reacciona con el cloruro de bario formando un precipitado blanco.

Se determinó la concentración de proteínas tanto en las muestras de los conejos como en las del carnero, por el método de Lowry (34).

3. CONJUGADO ANTI IgG DE CONEJO.

El conjugado antigammaglobulina de conejo con fosfatasa alcalina fue obtenido comercialmente (Sigma Chemical Company). En estudios previos no se encontraron diferencias cuantitativas con el uso de ésta enzima y con el de peroxidasa, salvo que los conjugados con peroxidasa continúan el desarrollo de color después de la adición de hidróxido de sodio (3, 6).

4. DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES, TEMPERATURAS Y TIEMPOS DE INCUBACION OPTIMOS DEL CONJUGADO, ANTIGENO Y ANTICUERPOS.

4.1 Determinación de la concentración óptima del conjugado.

- a) Se cubrió una hilera de 12 pozos (Immulon II, Dynatech) - con 0.2 ml en cada uno de una dilución de anticuerpos de conejo (0.25 mg/ml de proteína), usando como diluyente buffer de carbonatos pH 9.6 .
- b) Se incubaron en cámara húmeda a 37 grados C durante toda la noche con el objeto de que el anticuerpo se adsorbiese a la superficie de poliestireno.
- c) Se lavaron los pozos con PBS-Tween, pH 7.4 durante tres - minutos en tres ocasiones.
- d) Se hicieron diluciones del conjugado en PBS-Tween pH 7.4 para ajustar las concentraciones siguientes: 1:800, [®] 1:1000, 1:200 y 1:1600. Se llenaron los pozos por triplicado con 0.2 ml de cada una.
- e) Se incubaron a 4 grados C toda la noche en cámara húmeda.
- f) Se lavaron igual que como se dice en el inciso c).
- g) El sustrato (p-Nitrofenil fosfato disodio, Sigma Chemical Company) fué disuelto en buffer alcalino pH 9.8 para-

obtener una concentración de 1 mg/ml. De ésta dilución se añadieron 0.2 ml a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

h) Se detuvo la reacción al añadir 0.05 ml de hidróxido de sodio 3 M.

i) El contenido de cada pozo fue transferido a tubos con 1.8 ml de hidróxido de sodio 3 M y se tomaron las lecturas en un espectrofotómetro (Perkin Elmer) a 405 nm de absorbancia (9).

j) Se determinó la dilución óptima del conjugado de acuerdo con la mayor dilución capaz de producir color amarillo visualmente y de acuerdo a la densidad óptica.

4.2 Determinación de la concentración óptima del antígeno.

a) Se hicieron diluciones del antígeno en buffer de carbonatos pH 9.6 para obtener las siguientes concentraciones: 1.0, 50, 100 y 500 microgramos de proteína /ml.

b) Se añadieron 0.2 ml de cada una de las diluciones a los pozos por triplicado.

- c) Se incubaron a 37 grados C en cámara húmeda durante 24 horas para adsorber el antígeno a la superficie de poliestireno.
- d) Se lavó la placa con 0.2 ml por pozo con PBS-Tween pH 7.4 durante tres minutos en tres ocasiones.
- e) Se añadieron 0.2 ml por pozo de una solución de anticuerpos producidos en conejos (0.25 mg de proteína/ml).
- f) Se incubó a 37 grados C durante 2 horas.
- g) Se lavaron los pozos igual que en el paso d).
- h) Se añadieron 0.2 ml del conjugado diluido 1:1000 (concentración óptima).
- i) Se incubó a 37 grados C por 24 horas en cámara húmeda.
- j) Se lavó como en el inciso d).
- k) Se añadieron 0.2 ml por pozo del substrato (1 mg/ml en solución buffer alcalina, pH 9.8).
- l) Se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 min.

- m) Se transfirió el contenido de cada pozo a tubos con hidróxido de sodio 3 M, para detener la reacción y llevar la lectura en el espectrofotómetro.
- n) Se tomó como óptima la menor concentración de antígeno capaz de producir color por observación visual y, desde el punto de vista espectrofotométrico, la que estuvo mas cerca al cero de densidad óptica.

4.3 Determinación de la concentración óptima de los anticuerpos producidos en conejos.

- a) Los anticuerpos producidos en el carnero se ajustaron a una concentración de 0.25 mg de proteína/ml en buffer de carbonatos, pH 9.6 . De ésta solución se añadieron 0.2 ml por pozo y se incubaron a 37 grados C durante toda la noche.
- b) Se lavó la placa con 0.2 ml por pozo de PBS-Tween durante tres minutos por tres veces.
- c) Se añadieron 0.2 ml en cada pozo de la dilución óptima del antígeno de C. albicans (100 microgramos/ml).
- d) Se incubó a 37 grados C por 2 horas.

- e) Se hicieron diferentes diluciones de la solución de anticuerpos producidos en conejos en buffer de carbonatos pH 9.6 para obtener concentraciones de 0.25, 0.50, 1.0 y 2.0 mg/ml de proteína.
- f) De cada dilución, se añadieron por triplicado 0.2 ml por pozo y se incubaron a 37 grados C toda la noche.
- g) Se lavó igual que en el inciso b).
- h) Se añadieron 0.2 ml del conjugado a una dilución óptima - (1:1000) y se incubó a 37 grados C toda la noche en cámara húmeda.
- i) Se lavó como en el paso b).
- j) Se añadieron 0.2 ml de sustrato (1 mg/ml) en solución — buffer alcalina, pH 9.8 .
- k) Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- l) El contenido de los pozos fue transferido a tubos con — 1.8 ml cada uno de hidróxido de sodio 3M para tomar las lecturas en espectrofotómetro.

m) Se determinó como óptima la menor concentración de anticuerpo capaz de producir color y menor densidad óptica por encima de cero.

4.4 Determinación de la concentración óptima de los anticuerpos producidos en el carnero.

a) Se hicieron diluciones de la solución de anticuerpos de carnero en buffer de carbonatos pH 9.6 para obtener concentraciones de 0.125, 0.25, 0.50 y 1.0 mg de proteína/ml. Se cubrió una hilera de 12 pozos con cada una de las diluciones por triplicado con 0.2 ml cada una.

b) Se incubó la placa a 37 grados C toda la noche.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

c) Se lavó con 0.2 ml por pozo con PBS-Tween durante tres minutos en tres ocasiones.

d) Se añadieron 0.2 ml por pozo de antígeno a concentración óptima (100 microgramos/ml) y se incubó a 37 grados C por 2 horas.

e) Se lavó igual que en el paso c).

f) Se añadieron 0.2 ml por pozo de una dilución óptima de an

anticuerpos producidos en conejos (0.25 mg/ml) y se incubaron a 37 grados C toda la noche.

g) Se lavó igual que en paso c).

h) Se añadieron 0.2 ml por pozo del conjugado a una dilución 1:1000 en buffer PBS-Tween pH 7.4 y se incubó la placa a 37 grados C en cámara húmeda toda la noche.

i) Se lavó como en el inciso c).

j) Se añadieron 0.2 ml del sustrato por pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

k) El contenido de cada pozo fue transferido a tubos con 1.8 ml de hidróxido de sodio 3 M para detener la reacción y tomar las lecturas en el espectrofotómetro.

l) Se consideró como concentración óptima la menor concentración de anticuerpos capaz de dar lugar a la producción de color y menor densidad óptica por arriba de cero.

4.5 Determinación de las temperaturas y tiempos óptimos de incubación del antígeno, anticuerpos (producidos en

carnero y en conejos) y conjugado.

Se probaron diferentes combinaciones de reactivos, tiempo y temperatura, cambiando solo una de las condiciones de la prueba en cada vez, para determinar una técnica óptima, de la siguiente manera:

- a) Temperaturas de incubación. 37, 4 y 22 grados C.
- b) Tiempos de incubación del antígeno. 30 minutos, 1 y 2 horas.
- c) Tiempos de incubación de los anticuerpos producidos en conejos: 2, 3, 4, y 18 horas.
- d) Tiempos de incubación de los anticuerpos producidos en carnero: 2, 3, 4 y 18 horas.
- e) Tiempos de incubación del conjugado: 1, 2 y 3 horas (o1).

5. TÉCNICA ELISA DE TIPO SANDWICH

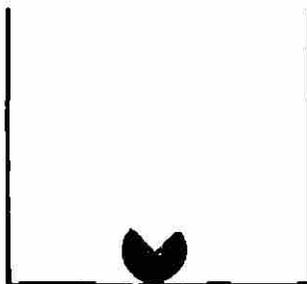
Un anticuerpo específico (producido en carnero) es adsorbido sobre una superficie sólida de poliestireno. Se añe-

-de la muestra de suero y si está presente el antígeno, se une al anticuerpo de carnero previamente adsorbido. Al agregar un segundo anticuerpo específico (producido en conejos) se fija al antígeno (Figura 1). La adición de un tercer anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (antigamaglobulina de conejo) forma un "sandwich" de antígeno entre dos anticuerpos, con un tercer anticuerpo a su vez unido al último. El substrato es degradado por acción enzimática y produce un color amarillo que puede ser visible por simple observación o bien mediante espectrofotometría (6, 14, 30, 51, 58).

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

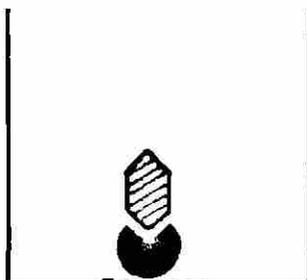
- a) Se sensibilizó una placa con 0.2 ml por pozo de una solución de anticuerpos anti-Candida albicans, producidos en carnero, en buffer de carbonatos pH 9.6 (concentración 0.12 mg/ml). Se incubó 2 horas a 37 grados C.
- b) Se lavó la placa con 0.2 ml de PBS-Tween pH 7.4 en cada pozo; se dejó reposar tres minutos y se evacuó el contenido de la placa invirtiéndola y agitándola vigorosamente. Este procedimiento se efectuó en tres ocasiones.
- c) Se incubó la placa a 37 grados C durante 30 minutos con -

1.- ANTICUERPO (PRODUCIDO EN CARNERO) ADSORBIDO A LA PLACA



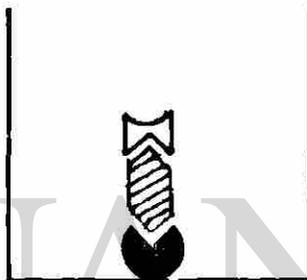
LAVADO

2.- SUERO PROBLEMA QUE CONTIENE EL ANTIGENO



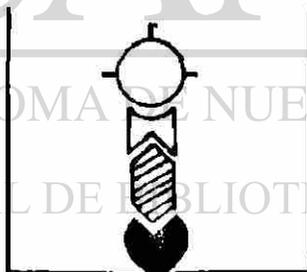
LAVADO

3.- ANTICUERPO (PRODUCIDO EN CONEJO)



LAVADO

4.- ANTIGAMAGLOBULINA DE CONEJO MARCADA CON ENZIMA



LAVADO

5.- SUBSTRATO ENZIMATICO

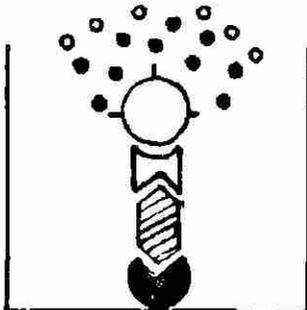


FIGURA 1. METODO DE TRIPLE SANDWICH EN MICROPLACA ELISA PARA LA DETECCION Y MEDICION DE ANTIGENOS (58).

0.2 ml de la muestra de suero a probar, previamente sometida a calentamiento (56 grados C durante 30 minutos) para disociar los complejos antígeno-anticuerpo presentes - (27,48,52).

d) Se repitió el paso b).

e) Se agregaron 0.2 ml de la solución de anticuerpos anti---
Candida albicans (producidos en conejos) en cada pozo --
(0.25 mg/ml). Se incubó a 37 grados C durante 3 horas.

f) Se repitió el inciso b).

g) Se agregó 0.2 ml por pozo del conjugado (dilución 1:1000)
y se incubó la placa durante 2 horas a 37 grados C.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

h) Se lavó igual que en el inciso b).

i) Se añadieron 0.2 ml del sustrato diluido (1 mg/ml) a cada pozo y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos para que se efectuara la reacción enzima-sustrato.

j) Se detuvo la reacción al transferir el contenido de cada pozo a tubos con 1.8 ml de NaOH 3 M.

k) Los tiempos de incubación, las temperaturas y las concentraciones empleadas fueron los determinados como óptimos para ésta técnica.

l) Como controles de referencia se utilizaron los siguientes: antígeno de Candida albicans preparado por el procedimiento descrito anteriormente, a una dilución de 100 microgramos/ml como control positivo.

Como control negativo se usó suero de conejo normal. Cada-determinación se hizo por triplicado.

m) Se determinó la positividad de la prueba por observación visual de la producción de color, así como por las lecturas en el espectrofotómetro.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

6. INVESTIGACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA TÉCNICA.

Se prepararon una serie de diluciones del antígeno a -- partir de una concentración de 370 microgramos/ml. El antígeno fue disuelto en suero de conejo normal y en buffer de carbonatos pH 9.6. Cada dilución con una cantidad conocida de antígeno se ensayó por triplicado y los controles negativos se estudiaron por sextuplicado. Se llevó a cabo la técnica ELISA de triple sandwich descrita anteriormente y se prepa--

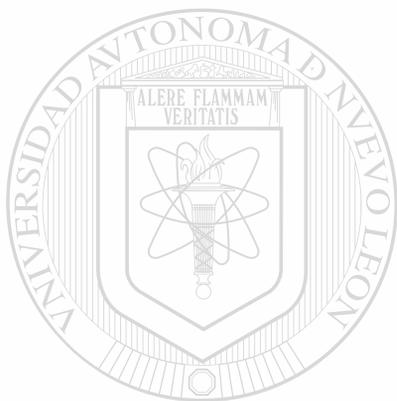
-ró una curva de calibración (8,32).

7. CANDIDIASIS SISTEMICA EXPERIMENTAL EN CONEJOS.

Se utilizaron en total diez conejos de 1.5 a 3.0 kg de peso, de los cuales uno sirvió de control no inoculado. Después de ajustar la dosis de 10^7 millones de levaduras por ml se ensayó su inoculación en la vena marginal de la oreja -- (49), que pudo conseguirse satisfactoriamente solo en tres de ellos. La dosis fue cuantificada a partir de un cultivo de C. albicans de 18 horas de incubación en caldo Saboraud a 37 grados C y posteriormente por dilución en placas. Cada animal se sangró por punción intracardiaca antes de la inyección de las levaduras y después diariamente durante 10 días o menos en caso de muerte. A los conejos que murieron se les hicieron estudios histológicos de riñón, hígado, bazo y corazón, para confirmar el diagnóstico y valorar la cuantificación de antigenemia por ELISA triple sandwich.

8. DETECCION DE ANTIGENOS EN SUEROS DE CONEJOS CON CANDI - DIASIS SISTEMICA EXPERIMENTAL POR MEDIO DE LA TECNICA ELISA (TRIPLE SANDWICH).

Los sueros de los conejos infectados y no infectados se sometieron al proceso de calentamiento descrito anteriormente, para disociar los complejos antígeno-anticuerpo circulantes y facilitar la detección de antígenos. Los sueros así obtenidos se procesaron por la técnica ELISA de triple sandwich.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS.

1. CARACTERISTICAS DEL ANTIGENO DE CANDIDA ALBICANS.

El calentamiento a 62 grados C durante 20 minutos (44) -
fué suficiente para lograr la esterilización de las formas -
vegetativas.

Las determinaciones hechas sobre éste material dieron --
los siguientes resultados: Prueba de Benedict, negativa; --
prueba de Molish, positiva. Esto nos indica la presencia de --
polisacáridos. La concentración de proteínas fue de 0.370 mg
/ml; la de glucosa (orto-toluidina), 30 mg%; la de carbohi --
dratos totales (Folin Wu), 57.6 mg% y la de manosa, 27.6 --
mg%.

2. PRODUCCION Y SEPARACION DE ANTICUERPOS ANTI-CANDIDA ALBICANS.

a) Anticuerpos producidos en carnero.

El carnero inmunizado (de acuerdo al esquema descrito en-
la sección de Material y Métodos) presentó al final de la
cuarta semana un título de 1:4, por lo que se continuaron
las inoculaciones durante 4 semanas más.

A la octava semana se obtuvo un título de 1:16 (ver tabla 3). Se colectaron 14.6 ml en total de suero.

b) Anticuerpos producidos en conejos:

De los tres conejos inmunizados, solo uno resultó buen --
respondedor ante el antígeno. Al final de la cuarta sema--
na encontramos un título de 1:4, por lo que continuamos--
las inmunizaciones hasta la octava semana, sin encontrar--
variación en el título. Los otros dos conejos respondi--
eron pobremente al antígeno y se obtuvo positividad por in--
munodifusión únicamente en los sueros sin diluir (tabla -
4). Se colectaron 13.4 ml de suero en total.

Después de obtenerse las inmunoglobulinas de los sueros
de carnero y de conejo (título 1:4), se les determinó la con--
centración de proteínas, que fue de 30.88 y 12.65 mg/ml res--
pectivamente.

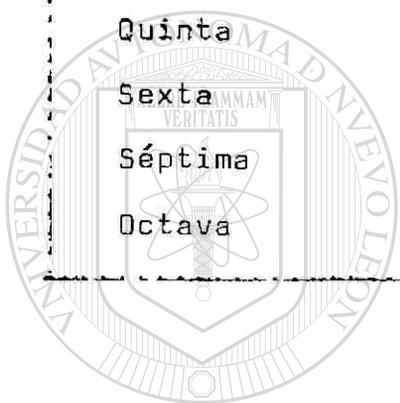
3. CONJUGADO ANTI-IgG DE CONEJO.

Las especificaciones comerciales de éste material in --
cluían una concentración de 0.65 mg/ml de conjugado, para --
trabajar a una dilución de 1:1000.

TABLA 3

TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-CANDIDA ALBICANS
EN SUERO DE CARROERO INMUNIZADO

SEMANAS POSTERIORES A LAS INOCULACIONES	TITULO DE ANTICUERPOS POR INMUNODIFLSION
Cuarta	1 : 4
Quinta	1 : 8
Sexta	1 : 16
Séptima	1 : 16
Octava	1 : 16



UANL

TABLA 4

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-CANDIDA ALBICANS

EN SUERO DE CONEJOS INMUNIZADOS

SEMANAS POSTERIORES A LAS INOCULACIONES	TITULO DE ANTICUERPOS POR INMUNODIFLSION
Cuarta	1 : 4
Quinta	1 : 4
Sexta	1 : 4
Séptima	1 : 4
Octava	1 : 4

4. DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES, TEMPERATURAS Y TIEMPOS DE INCUBACION OPTIMOS DEL CONJUGADO, ANTICENO Y ANTICUERPOS.

Después de estandarizar todos los reactivos, se hicieron las determinaciones de acuerdo a los procedimientos señalados en la metodología. Se obtuvieron las siguientes concentraciones y diluciones óptimas:

4.1 Determinación de la concentración óptima del conjugado:

La dilución óptima del conjugado fue de 1:1000.

4.2 Determinación de la concentración óptima del antígeno:

La concentración óptima del antígeno fue de 100 microgramos/ml.

4.3 Determinación de la concentración óptima de los anticuerpos producidos en conejos:

La concentración óptima de los anticuerpos producidos en conejos fue de 0.25 mg/ml.

4.4 Determinación de la concentración óptima de los anticuerpos producidos en el carnero:

La concentración óptima de los anticuerpos producidos en el carnero fue 0.12 mg/ml.

4.5 Determinación de las temperaturas y tiempos óptimos de incubación del antígeno, anticuerpos (producidos en carnero y en conejos) y conjugado:

Las temperaturas y tiempos de incubación óptimos se investigaron por separado:

- a. Conjugado: 37 grados C durante 2 horas.
- b. Antígeno: 37 grados C (o bien 4 grados C) durante 30 minutos.
- c. Anticuerpos de carnero: 37 grados C durante 2 horas.
- d. Anticuerpos de conejo: 37 grados C durante 3 horas.

5. TECNICA ELISA DE TIPO SANDWICH.

La técnica fué de fácil manejo en el laboratorio. La producción de color amarillo brillante al ser degradado el sustrato por acción enzimática pudo precisarse mediante observación visual simple, pero además se tomaron lecturas de densidad óptica por espectrofotometría. La técnica se comple

-tó en un lapso máximo de 8 horas.

6. INVESTIGACION DE LA SENSIBILIDAD DE LA TECNICA.

A partir de una concentración de 370 mcg/ml del antígeno se hicieron diluciones dobles, que contenían, respectivamente, 185, 92.5 y 37 mcg/ml. Las lecturas en el espectrofotómetro permitieron preparar la curva de calibración. Bajo las condiciones óptimas descritas, la técnica de triple sandwich pudo identificar hasta 35 mcg/ml de proteína.

7. CANDIDIASIS SISTEMICA EXPERIMENTAL EN CONEJOS.

Uno de los conejos infectados sobrevivió y se le tomaron muestras de suero diariamente durante 10 días. Otro murió al tercer día de la inoculación. El último murió al noveno día, con evidencia histopatológica de candidiasis sistémica.

Con tinción de hematoxilina y eosina se demostraron múltiples microabscesos renales y hepáticos. Se encontró alteración de la arquitectura normal de éstos órganos y abundantes neutrófilos mezclados con blastoconidias típicas y pseudohifas de *C. albicans*. Los abscesos renales se presentaron en el intersticio de la corteza renal. Todas las células micóticas se tiñeron intensamente con metenammina de plata (Gomori)

y muy pobremente con hematoxilina y eosina.

8. DETECCIÓN DE ANTIGENOS EN SUEROS DE CONEJOS CON CANDIDIASIS SISTEMICA EXPERIMENTAL.

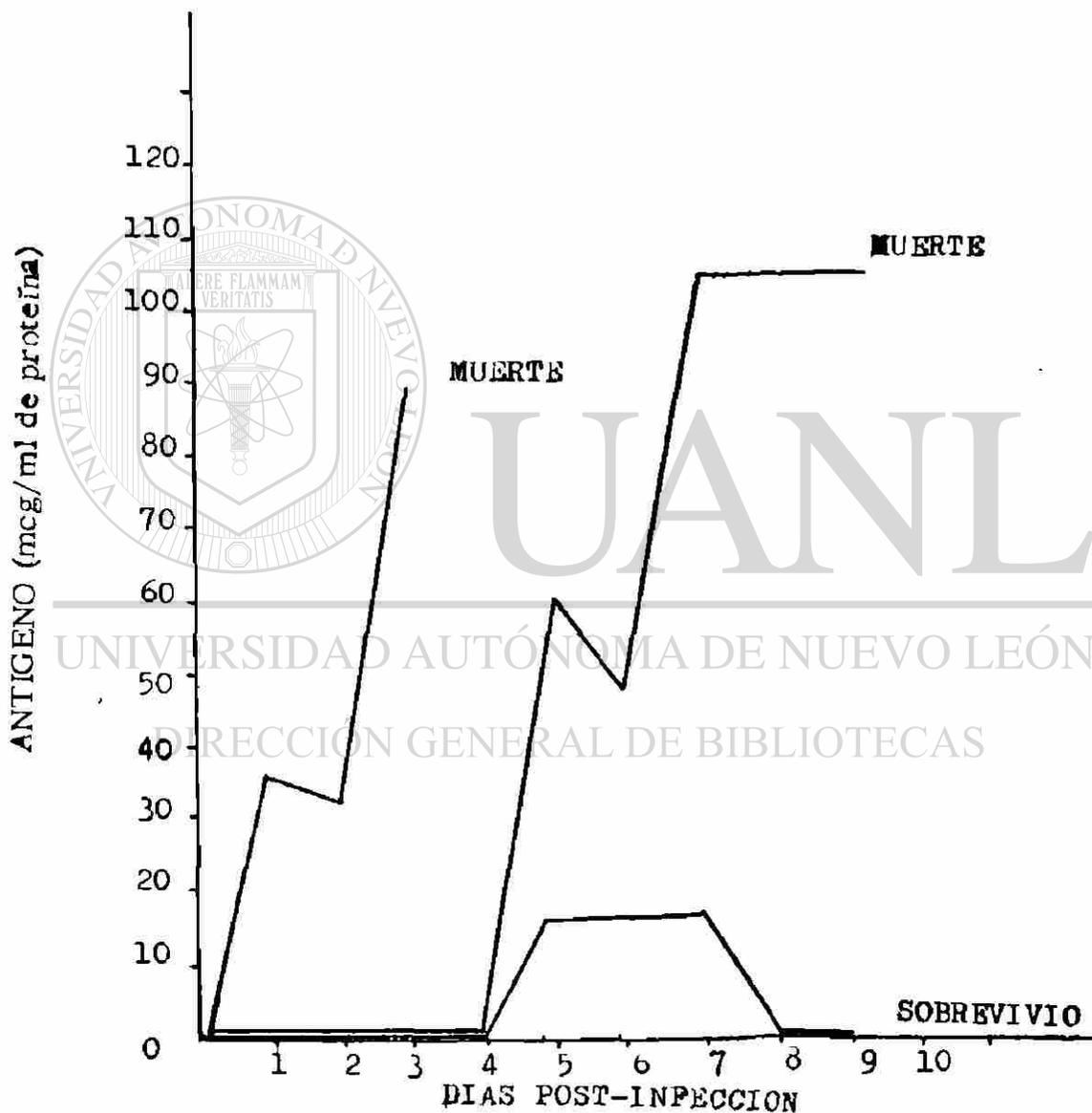
Uno de los conejos infectados mostró elevación de su nivel de antígeno a partir del día 4, para incrementarse hasta 106 microgramos/ml en el día 7 post-inoculación, dos días antes de su muerte. Las concentraciones de antígeno soluble de *Candida albicans* en los sueros de los conejos infectados y en el de un control no infectado se presentan en la figura 2.

Otro de los conejos infectados tuvo una concentración de 37 microgramos/ml al día siguiente de la inoculación y presentó un nivel de antigenemia máximo (90 microgramos/ml) antes de su muerte en el tercer día.

Uno de los conejos infectados sobrevivió y sus determinaciones de antigenemia fueron negativas, salvo una ligera elevación entre los 5 y 7 días después de la infección.

FIGURA 2

EVOLUCION DE LOS NIVELES DE ANTIGENOS EN SUEROS DE CONEJOS CON INFECCION EXPERIMENTAL POR Candida albicans



DISCUSION:

Se han evaluado varias pruebas serológicas para su aplicación en el apoyo diagnóstico de candidiasis sistémica, pero, en general, los resultados obtenidos con ellas pueden calificarse hasta ahora de confusos (19).

Hemos tratado de implementar una técnica inmunoenzimática de triple sandwich para detectar antígenos solubles de *Candida albicans* en suero. Esta prueba debe ser de fácil aplicación en nuestros laboratorios.

Una de las principales limitaciones para la utilización de las técnicas serológicas deriva de la complejidad antigénica de las especies del género *Candida*. El antígeno preparado para éste estudio es un extracto crudo de paredes celulares, soluble, que contiene grandes cantidades de polisacáridos con un 3% de proteínas (36). La concentración de nuestro antígeno en solución se determinó midiendo la cantidad de proteínas/ml, dado que no fué posible cuantificarle directamente el manano. Sin embargo, encontramos niveles de manosa, glucosa y proteína similares a los que se han obtenido a partir del análisis de manano purificado y de preparaciones en solución de paredes celulares fragmentadas, por lo que creemos que éste enfoque resulta justificado (36,54).

Nuestra técnica mostró una sensibilidad que nos ha permitido detectar hasta 35 mcg/ml de proteína. Otros investiga

-dores han encontrado sensibilidades desde 0.1 a 1000 ng/ml, pero se basaron en cantidades de manano/ml y no de proteínas /ml (27,33).

El uso de éstos extractos crudos se justifica, dado que la obtención de preparaciones altamente purificadas de paredes celulares es laboriosa por la frecuente persistencia de contaminantes citoplásmicos, aún después de lavados repetidos (16,23). Además, el manano es el antígeno predominante en los extractos crudos de pared (y probablemente en la pared celular intacta) y se ha establecido que los anticuerpos que se producen en respuesta a la inmunización con células completas (muertas por calentamiento) o con extractos crudos de paredes celulares, están dirigidos primariamente contra la porción de manoproteínas (16,56). En ratones inmunizados con células completas muertas por calor, los anticuerpos monoclonales obtenidos a partir del cultivo de sus tejidos son específicos contra el manano de la pared celular (36,42).

Otra de las dificultades en la preparación de antígenos de *Candida albicans* deriva del dimorfismo en el crecimiento del germen:

Un estudio comparativo de la pared celular en las formas micelial y de levadura (blastosporas) de *C. albicans*, re

Se observó una similitud cualitativa, aunque con variaciones cuantitativas considerables. No obstante, la composición química de las blastosporas fué constante a pesar de haberse cultivado a temperaturas y sobre medios diferentes (10). El total de glucano y manoproteínas no varía con la morfología del crecimiento, pero la quitina fué cuatro veces mayor en la forma de tubos germinales. Esta última forma es influenciada por la fase en la que se encuentre el crecimiento del organismo y por las diferencias entre cepas. Las células de levadura producen una sustancia termoestable y dializable que suprime la transición de levadura a micelio; éste efecto inhibitorio es mayor en presencia de cobalto. Las proteínas específicas de las formas levadura-micelio no se han identificado con certeza, aunque ambos tipos de morfología han demostrado ser definitivamente patógenos (54). En la preparación de nuestro antígeno, el cultivo se incubó a 37 grados C (19).

La producción de anticuerpos anti-*Candida albicans* en el conejo fué satisfactoria a partir de la sexta semana (título 1 :16) post-inoculación. Sin embargo, de los conejos inoculados solo uno fué capaz de producir un título máximo de 1 :4 desde la cuarta semana, debido tal vez a que la respuesta de los conejos a la administración de antígenos de *C. albicans* es más heterogénea que la de otros animales (28).

En la investigación de las concentraciones óptimas de los diferentes reactivos, para el conjugado se encontró una dilución óptima de 1 :1000, que corresponde a la misma dilución sugerida por el fabricante (Sigma). Nuestra concentración óptima para los anticuerpos producidos en el carnero (120 mcg/ml) fué muy parecida a la utilizada por otros autores (49,59). En contraste, la concentración óptima de los anticuerpos producidos en los conejos (250 mcg/ml) resultó mas alta que la empleada en otras investigaciones (33,48,49,59).

Las temperaturas y tiempos óptimos de incubación de los anticuerpos anti-*Candida albicans* producidos en el carnero y en los conejos, fueron similares a los reportados en otras investigaciones que utilizaron técnicas inmunoenzimáticas (1,27,49,52,59). Estos parámetros, para nuestro antígeno, fueron iguales a los publicados por Bliss (48). Las condiciones óptimas de incubación para nuestro conjugado (37 grados C durante dos horas) concuerdan con los obtenidos por otros autores (1,37).

Completamos nuestra técnica en un tiempo de 8 horas. Aunque éste lapso es un poco mayor que los encontrados en otras investigaciones, hay que tomar en cuenta que el tiempo se prolonga debido al empleo de dos anticuerpos (producidos en carnero y en conejos) para obtener la variante inmunoenzi-

-mática de triple sandwich (6,33,48,49,51,59).

Una posible desventaja para la detección de antígenos por ELISA es la presencia de complejos antígeno-anticuerpo en la circulación. En varios estudios se sugiere que este riesgo puede ser eliminado al someterse los sueros a diversos métodos de extracción (1,27,33,37,48,52,53). Nosotros elegimos la extracción por calor. Se ha probado que este tratamiento de las muestras antes de su análisis por ELISA disocia tales complejos y disminuye la frecuencia de reacciones falsas positivas (14,27).

Se requiere de la presencia intravenosa de un billón de organismos para producir una concentración de maneno de mas de 100 ng/ml en conejos. El humano tal vez pueda necesitar mas de 10 billones de gérmenes circulantes para lograr la misma concentración antigénica (28). La detección de antígenos en nuestro modelo con animales no fué uniforme, aunque las concentraciones observadas correlacionaron razonablemente bien con la magnitud de la infección y con el riesgo de muerte. Los antígenos pudieron demostrarse después de solo unos cuantos días de la inoculación de la dosis infectante. Aunque a uno de los conejos, que murió al tercer día con antígenos elevados, no se le encontró evidencia histopatológica de la enfermedad, cabe la posibilidad de que la causa de-

la muerte haya derivado de complicaciones de la punción intracardíaca.

En el animal no infectado la investigación de antígenos fué sistemáticamente negativa. Otro de los animales sobrevivió mas de 10 días post-infección, prácticamente sin antigenemia, salvo entre los días 5 a 8, cuando fué posible encontrarle concentraciones bajas del antígeno. Esto pudo haberse debido a:

1) diferencias en la capacidad del sistema retículo-endotelial para "digerir" o depurar los antígenos circulantes, lo que resultaría en bajos niveles o incluso en ausencia de ellos, aunque la infección sea severa. Entre 95 y 99% del menano inoculado fué removido del suero en las primeras 24 horas posteriores a la inyección en todos los animales probados por Jones (1980). Se piensa que los anticuerpos anti-menano no son esenciales para éste fenómeno y que el mecanismo de "aclaramiento" se satura entre mas menano se administre (28).

2) diferencias genéticas entre los conejos y en los patrones de acción de sus defensas.

Cuando C. albicans atraviesa la capa epitelial, la respuesta inicial del huésped es una reacción inflamatoria neutrofílica y monocítica. El hongo no es lisado directamente -

por los anticuerpos, cuya actividad protectora parece asociarse con un fenómeno de fagocitosis por neutrófilos, mediado por complemento, opsonización y fagocitosis monocítica (54).

Se requiere de la presencia y acción de componentes opsonínicos del suero para el ataque de los neutrófilos a las células de levadura, pero no contra las pseudohifas. El daño a las formas filamentosas ocurre por interacción directa de la superficie celular con los neutrófilos, cuyo sistema de micloperoxidase altera a la célula micótica antes y aún cuando no ocurra la ingestión. Las propiedades quimiotéticas de las diferentes formas (levaduras-micelio) hacia las células fagocíticas son también distintas. Además, *Candida albicans* posee la capacidad de producir tubos germinales dentro de las células fagocíticas y de escapar así a la muerte intracelular (54).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Entre los pacientes con alto riesgo de hacer candidiasis sistémica, a los que parecen leucemia y a los que han recibido tratamiento quimioterapéutico inmunosupresor (por cáncer metastásico o recepción de trasplantes) se les han encontrado alteraciones en la habilidad candidicida de sus neutrófilos (15).

La técnica evaluada por nosotros presentó resultados sa
tisfactorios para la detección de antígenos de Candida albi-
cans en sangre, lo que parece sugerir que su utilización co-
mo recurso diagnóstico en la candidiasis sistémica merece e-
valuarse mediante otros estudios que se lleven a cabo más a-
delante. La posibilidad de que un método de ELISA triple ---
sandwich llegue a ser objeto de un uso amplio por los labo--
ratorios modestos de análisis clínicos de nuestro medio que-
da aparentemente abierta.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN:

Obtuvimos en nuestro laboratorio un antígeno soluble a partir de paredes celulares de Candida albicans. Se inmunizaron conejos y un carnero para la producción de anticuerpos específicos.

Se estandarizaron en forma cualitativa y cuantitativa los diferentes reactivos para determinar las condiciones óptimas de trabajo de un modelo de técnica ELISA de triple sandwich. Esta técnica fué utilizada para detectar antígenos en conejos con candidiasis sistémica experimental, y permitió demostrar en dos de ellos concentraciones elevadas. En uno de los conejos se encontró correlación de los niveles de antígenos con los hallazgos histopatológicos de infección obtenidos post-mortem. Se discute la complejidad antigénica[®] de Candida albicans y otras especies del género. La técnica ELISA de triple sandwich fué de fácil manejo y se completa en un tiempo menor de 8 horas.

BIBLIOGRAFIA:

1. Araj G. F., Hopper R.L., Chesnut S., Fainstein V., and Bodey G. P. Diagnostic value of the Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detection of Candida albicans cytoplasmic-antigen in sera of cancer patients. J. Clin. Microbiol. 16:46-52, 1982.
2. Armstrong D., Bailey J., Bennet J. et al. Summary of a workshop on serodiagnosis of systemic mycoses. J. Infect. Dis. 146:570-574, 1982.
3. Avrameas, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. Immunochemistry, 5:43-52, 1969.
4. Axelsen N.H. Antigen-antibody crossed-electrophoresis (Laurell) applied to the study of the antigen structure of Candida albicans. Infect. Immun. 4:525-527, 1971.

5. Bodey G.F., Rodríguez V., Chang H.Y., Narboni G. Fever and infection in leukemic patients. A study of 494 consecutive patients. Cancer 41:1610-1622, 1978.
6. Bullock S.L., Walls K.W. Evaluation of some of the parameters of the enzyme-linked immunospecific assay. J. Infect. Dis. Supl. 136:279-285, 1977.
7. Burnie J.P., Matthews R., Featherbe D., Tabaqchali S. 47 kD antigen of Candida albicans. Lancet 1155, 1985.
8. Cañedo D.L., García R.H., Méndez R.I. Principios de Investigación médica. Ed. DIF 395-396, 1977.
9. Clem T.R., Yolken R.H. Practical colorimeter for direct measurement of microplates in enzyme immunoassay systems. J. Clin. Microbiol. 7:55-58, 1978.

10. Chattaaway F.W. and Holmes M.R. Cell wall composition of mycelial and blastospore forms of Candida albicans. J. - Gen. Microbiol. 51:357-376, 1968.
11. Conant N.F., Tillerson R.D., Baker and Callaway J.L. Can- didiasis. Micrología. 3a.Ed. Interamericana,252-282, 1972.
12. Cutler J. E., Friedman L., Milner K.C. Biological and -- chemical characterization of toxic substances from Candi- da albicans. Infect. Immunol. 6:616-627, 1972.
13. Degregorio M.V., Lee V.M.F., Linker C.A., Jacobs R.A., - Ries C.A. Fungal infections in patients with acute leu - kemia. Am. J. Med. 73:543-548, 1982.
14. Doskeland S.A., Berdal B.P. Bacterial antigen detection- in body fluids: methods for rapid antigen concentration- and reduction of nonspecific reactions. J. Clin. Micro - biol. 11:380-384, 1980.
15. Edwards J.E., Lehrer R.I., Stiehm E.R., Fischer T.J., -- Young L.S. Severe candidal infections. Clinical perspec- tive, immune defense mechanisms and current concepts of- therapy. Ann. Intern. Med. 89:91-106, 1978.
16. Evans E.G.V. Diagnosis of systemic fungal infections. Re- cent advances in infection. Ed. 55-75, 1978.
17. Evans E.G.V., Richardson M.D., Odds F.C., Holland K.T. Relevance of antigenicity of Candida albicans growth pha- ses to diagnosis of systemic candidiasis. Br. J. Med. 4:86-87, 1973.

18. Farkas V. Biosynthesis of cell walls of fungi. *Microbiol. Rev.* 43:117-144, 1979.
19. Filice F., Armstrong D. Immunodiffusion and agglutination tests for Candida in patients with neoplastic disease: inconsistent correlation of results with invasive infections. *J. Infect. Dis.* 135:349-357, 1977.
20. Frisk A. Serological aspects of candidiasis. *Curr. Therapeut. Res.* 22:46-50, 1977.
21. Fung J.C., Donta S.T., Tilton R.C. Candida detection system (Cand-tec) to differentiate between Candida albicans colonization and disease. *J. Clin. Microbiol.* 24 542-547, 1986.
22. Gaines J.D., Remington J.S. Diagnosis of deep infection with Candida. *Arch. Intern. Med.* 132:699-702, 1973.

23. García M.C., Villanueva J.R. Preparation of cells walls of yeast. *Can. J. Microbiol.* 9:141-142, 1963.
24. Glew R.H., Buckley H.P., Rosen H.M., Mosllering R.C., -- Fischer J.E. Serological tests in the diagnosis of systemic candidiasis: enhanced diagnostic accuracy with ---- crossed immunoelectrophoresis. *Am. J. Med.* 64:586-591, 1978.
25. Greenfield R.A., Bussey M.J., Stephens J.L., Jones J.M. Serial enzyme-linked immunosorbent assays for antibody to Candida antigens during induction chemotherapy for - acute leukemia. *J. Infect. Dis.* 148:275-283, 1983.

26. Haley L.D., Trangel J., Coyla M.B. Practical methods for culture and identification of fungi in the clinical Microbiology laboratory. Cumitech No. 11, ASM., 1980.
27. Harding S.A., Brody J.P., Normansell D.E. Antigenemia detected by enzyme-linked immunosorbent assay in rabbits with systemic candidiasis. J. Lab. Clin. Med. 95:959-966, 1980.
28. Jones J.M. Kinetics of antibody responses to cell wall mannan and a major cytoplasmic antigen of Candida albicans in rabbits and humans. J. Lab. Clin. Med. 96:845-860, 1980.
29. Kemp G., Solotorovsky M. Localization of antigens in mechanically disrupted cells of certain species of the genera Candida and Torulopsis. J. Immunol. 93:305-314, 1964.
30. Kenny G.E., Dunsmoor C.L. Principles, problems and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 17:655-665, 1983.
31. Kerkerling T.M. et al. Detection of Candida antigenemia by counterimmunoelectrophoresis in patients with invasive candidiasis. J. Infect. Dis. 140:659-664, 1979.
32. Krieg A.F., Gambino R., Galen R.S. Why are clinical laboratory tests performed? When are they valid? J.A.M.A. 233: 76-78, 1975.

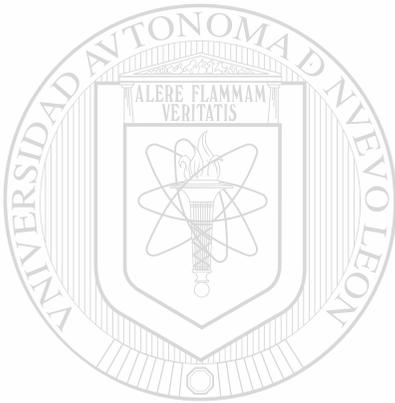
33. Lew M.A., Siber G.R., Donahue and Maierca. Enhanced detection with an enzyme-linked immunosorbent assay of Candida mannan in antibody-containing serum after heat extractions. J. Infect. Dis. 145:45-56, 1982.
34. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.
35. Marier R., Andriole V.T. Usefulness of serial antibody determinations in diagnosis of candidiasis as measured by discontinuous counterimmunoelectrophoresis using HS antigen. J. Clin. Microbiol. 8:15-22, 1978.
36. Meister H., Heymer E., Schafer H., Haferkamp O. Role of Candida albicans in granulomatous tissue reactions. I. In vitro degradation of C. albicans and immunospecificity by split products. II. In vitro degradation of C. albicans in hepatic macrophages of mice. J. Infect. Dis. 135:224-242, 1977.
37. Meckstroth K.L., Reiss E., Keller J.W. and Kauffman. Detection of antibodies and antigenemia in patients leukemic with candidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Infect. Dis. 144:24-32, 1981.
38. Merz V.G., Evans G.L., Shadomy S., Anderson S., Kauffman L., Kozin P.J., Mackenzie D.L., Protzman L.P., Remington J.S. Laboratory evaluation of serological tests for systemic candidiasis: a cooperative study. J. Clin. Microbiol. 5:596-603, 1977.

39. Peunier-Carpenter F., Armstrong D. Candida anticenemia, as detected by passive hemagglutination inhibition, in patients with disseminated candidiasis or Candida colonization. J. Clin. Microbiol. 13:10-14, 1981.
40. Miller G.G., Witwer M.L., Braude A., Davis C.E. Rapid identification of Candida albicans septicemia in man by gas-liquid chromatography. J. Clin. Invest. 54:1235-1240, 1974.
41. Mirsky H.F., Cuttner J. Fungal infection in acute leukemia. Cancer 30:348-352, 1972.
42. Miyakawa Y., Kagaya K., Fukazawa Y., Soe G. Production and characterization of agglutinating monoclonal antibodies against predominant antigenic factors for Candida albicans. J. Clin. Microbiol. 23:881-886, 1986.
43. Myerowitz R.L., Pazin G.J., Allen C.M. Disseminated candidiasis, changes in incidence, underlying disease and pathology. Am. J. Clin. Pathol. 68:29-38, 1977.
44. Poor A.H., Cutler J.E. Partially purified antibodies used in a solid phase radioimmunoassay for detecting candidal antigenemia. J. Clin. Microbiol. 9:362-368, 1979.
45. Freisler H.D., Hasenclever H.F., Levitan A.A., Hencerson E.S. Serological diagnosis of disseminated candidiasis in patients with acute leukemia. Ann. Inter. Med. 70: 19-30, 1969.
46. Reis E., Kuykendall R.J., Kauffman L. Anticemia in rabbits infected with Candida albicans serotype 3: detection by enzyme-linked immunoassay and preliminary characterization of the antigen. J. Med. Vet. Mycol. 24:259-269, 1986.

47. Reiss E., Repentigny L., Kuykendall R.J., Carter A.W., Galindo R., Auger P., Bragg S.L., Kauffman L. Monoclonal antibodies against Candida tropicalis mannan: antigen detection by enzyme immunoassay and immunofluorescence. J. Clin. Microbiol. 24:796-802, 1986.
48. Reiss E., Stockman L., Kuykendal R.J., Smith S.J. Dissociation of mannan-serum complexes and detection of Candida albicans mannan by enzyme immunoassay variations. Clin. Chem. 28:306-310, 1981.
49. Repentigny L., Kuykendall R.J., Chandler F.W., Broderson J.R., Reiss E. Comparison of serum mannan, arabinitol, and mannose in experimental disseminated candidiasis. J. Clin. Microbiol. 19:804-812, 1984.
50. Rose H.D., Varkey B. Deep mycotic infection in the hospitalized adult: a study of 123 patients. Medicine. 54: 499-507, 1975.
51. Scharpe S.L., Cooreman W.M., Blomme V.J., Laekeman G.M.® Quantitative enzyme immunoassay: current status. Clin. Chem. 22:733-738, 1976.
52. Scheld W.M., Brown R.S., Harding S.A., Sande M.A. Detection of circulating antigen in experimental Candida albicans endocarditis by an enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol, 12:679-683, 1980.
53. Segal E., Berg R.A., Pizzo P.A., Bennet J.E. Detection of Candida antigen in sera of patients with candidiasis by an enzyme-linked immunosorbent assay inhibition technique. J. Clin. Microbiol. 10:116-118, 1979.

54. Shepherd M.G., Foulter R.T.M., Sullivan F.A. Candida albicans: biology, genetics and pathogenicity. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:579-614, 1985.
55. Singer C., Kaplan M.H., Armstrong C. Bacteriemia and fungemia complicating neoplastic disease. A study of 364 cases. *Am. J. Med.* 62:731-742, 1977.
56. Summers D.F., Grollman A.P., Hasenclever H.F. Polysaccharide antigens of Candida cell wall. *J. Immunol.* 92:491-499, 1963.
57. Taschdjian C.L., Kozzinn F.J., Cuesta M.B., Toni E.F. Serodiagnosis of candidal infections. *Am. J. Clin. Pathol.* 57:195-205, 1972.
58. Voller A., Bidwell P., Bartlett A. Enzyme-linked immunosorbent assay. *American Society for Immunology. Jap.* 45:359-371, 1980.
-
59. Warren R.C., Bartlett A., Bidwell D.F., Richardson M.D., Voller A., White L.D. Diagnosis of invasive candidosis - by enzyme immunoassay of serum antigen. *Br. J. Med.* 1:1183-1185, 1977.
60. Weiner M.H., Yount W.J. Mannan antigenemia in the diagnosis of the invasive Candida infections. *J. Clin. Invest.* 58:1045-1053, 1976.
61. Yolken R.H., Leister F.J. Investigation of enzyme immunoassay time courses: development of rapid assay systems. *J. Clin. Microbiol.* 13:738-741, 1981.

62. Young R.C., Bennett J.E., Geelhoed G.W., Levine A.S.
Fungemia with compromised host resistance. A study of
70 cases. Ann. Intern. Med. 80:605-612, 1974.

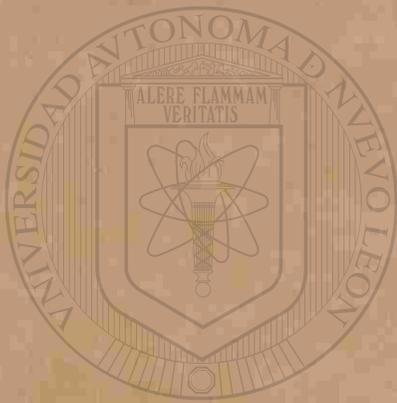


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®