



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO  
COCCIDIOIDINA PARA INTRADERMOREACCIÓN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JESÚS ALFONSO HERNÁNDEZ NEVÁREZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

<b>PRESIDENTE:</b>	<u>ROSA MARIA RAMÍREZ GAMA</u>
<b>VOCAL:</b>	<u>ABEL GUTIÉRREZ RAMOS</u>
<b>SECRETARIO:</b>	<u>CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA</u>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<u>MISAEEL GONZÁLEZ IBARRA</u>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<u>EDUARDO BONILLA ESPINOSA</u>

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO DE MICOLOGÍA BÁSICA.  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

### **ASESOR DEL TEMA**

CONCEPCIÓN TORIELLO NÁJERA

### **SUPERVISOR TÉCNICO**

AMELIA DE LOS ÁNGELES PÉREZ MEJIA

### **SUSTENTANTE**

JESÚS ALFONSO HERNÁNDEZ NEVÁREZ

---

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Doctora Conchita Toriello, por todas sus enseñanzas y por la oportunidad y la confianza de permitirme trabajar en este proyecto de tesis rodeado de personas maravillosas y profesionales.**

**A Ame y a Horte por todo su apoyo incondicional y su invaluable ayuda a lo largo de la realización de este trabajo. Muchas Gracias por su amistad y sus palabras de aliento.**

**A mis amigos y compañeros de laboratorio Elena, David, Miguel, Israel y Caro por su amistad y ayuda.**

**A cada uno de mis profesores y maestros que han contribuido en mi formación académica, en especial, al profesor Misael González Ibarra por su calidad humana y por enseñarme en cada una de sus clases el maravilloso mundo de la Micología.**

**DEDICATORIAS**

**A Hilda y Esther; gracias por todo el amor y el cariño que me han dado, el apoyo y la confianza que me han tenido.**

**A mí Amada Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a la Facultad de Química mi segundo hogar en estos arduos y felices años, gracias por sentirme orgulloso de ser universitario.**

**"La historia de la ciencia, como la de todas las ideas humanas, es una historia de sueños irresponsables, de obstinaciones y errores. Sin embargo, la ciencia es una de las pocas actividades humanas -quizá la única- en la cual los errores son criticados sistemáticamente y muy a menudo, con el tiempo, corregidos."**

**"La verdadera ignorancia no es la ausencia de conocimientos, sino el hecho de negarse a adquirirlos."**

**Karl Popper**

**"Temer al amor es temer a la vida, y los que temen a la vida ya están medio muertos".**

**Bertrand Russell**

## ÍNDICE

	Páginas.
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	6
El desarrollo de la coccidioidina.....	6
Estandarización de la coccidioidina.....	7
Caracterización bioquímica e inmunológica del antígeno.....	9
Utilidad de la coccidioidina.....	11
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS PARTICULARES.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
Hongos.....	14
Reactivación de la virulencia de las cepas de <i>Coccidioides</i> en ratón.....	14
Antígenos de referencia.....	14
Antígenos de prueba.....	15
Medios de cultivo.....	15
Condiciones de cultivo.....	15
Obtención de coccidioidinas.....	15
Método de inmunodifusión de Ouchterlony.....	16
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	16
Determinación de proteínas y carbohidratos.....	16
Comparación de los métodos de cuantificación de proteínas.....	17
Linealidad de los métodos.....	17
Repetibilidad del método.....	17

Animales.....	18
Prueba de actividad biológica y de identidad de coccidioidina (métodos de productos biológicos MPB 005).....	18
1. Sensibilización de cobayos.....	18
2. Selección de cobayos sensibilizados.....	18
3.Preparación de las dosis de coccidioidinas para probar la potencia biológica.....	19
4.Procedimiento de prueba.....	19
5.Repetición de las pruebas.....	19
6.Análisis de datos y métodos estadísticos para la interpretación de los resultados.....	20
RESULTADOS.....	25
Examen microscópico de las cepas.....	25
Reactivación de la virulencia de las cepas.....	25
Caracterización bioquímica de las coccidioidinas.....	26
Comparación de los métodos de cuantificación de proteínas.....	27
Estimación de las proteínas y carbohidratos en los antígenos obtenidos.....	29
Prueba de actividad biológica y de identidad de la coccidioidina.....	31
Selección de cobayos sensibilizados.....	31
Resultados de las reacciones de intradermoreacción para la prueba de actividad biológica.....	32
Curvas dosis respuesta gradual de los experimentos.....	32
Resultados de los estudios de la actividad biológica de los antígenos MI-168 (prueba) y comercial (referencia).....	33
Resultados de los estudios de la actividad biológica de los antígenos EH-695 (prueba) y comercial (referencia).....	35



Pruebas para comparar la potencia de los antígenos estandarizados en diluciones y en $\mu\text{g}$ de proteína.....	37
1.Resultados de los estudios de la actividad biológica del antígeno de referencia MI-168 y de prueba EH-695.....	38
2.Resultados de los estudios de la actividad biológica del antígeno de referencia MI-168 y de prueba EH-657.....	40
3.Resultados de los estudios de la actividad biológica del antígeno de referencia MI-168 y de prueba EH-696.....	42
Análisis de varianza.....	44
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59
ÍNDICE DE TABLAS.....	64
ÍNDICE DE FIGURAS.....	65

## INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis o fiebre del Valle de San Joaquín, es una micosis sistémica producida por el hongo dimórfico *Coccidioides* spp. Hasta hace algunos años fue conocido sólo un agente etiológico: *C. immitis*. Sin embargo, en 2002, Fisher *et al.*, basados en estudios de tipificación molecular y descripción fenotípica, demostraron la existencia de dos especies, determinando que el primer agente descrito, *C. immitis*, se limita solamente al área de California en Estados Unidos, mientras que en el resto de Estados Unidos, México, Centro y Sudamérica existe otra especie denominada *C. posadasii*. Estos hongos presentan una distribución geográfica en el continente americano restringida a zonas de clima árido o semiárido, y suelos con alto contenido de sales, particularmente sulfato de calcio y boratos, pH alcalino y con vegetación escasa de tipo espinoso (Perea, *et al.*, 2003). Las áreas endémicas de esta enfermedad (Figura 1) incluyen el suroeste de los Estados Unidos, más de la mitad del territorio mexicano, algunas regiones de Centroamérica como el valle de Motagua en Guatemala, el valle de Comayagua en Honduras (Mayorga & Hernan, 1970) y en Sudamérica en Venezuela, Ecuador, Brasil y Colombia (Pappagianis & Zimmer, 1990; Wanke *et al.*, 1999).



Fig.1 Distribución geográfica de la Coccidioidomicosis (Ilustración: Margaret Shear). Modificado de Hector & Laniado-Laborin (2005).

La primera descripción de esta micosis en el mundo fue realizada en 1892 en Argentina por Posadas y confirmada por Wernicke (1892). En la República Mexicana los primeros casos fueron publicados por Cicero (1932) y Perrin en el mismo año. Dentro del periodo comprendido entre 1940 y 1967, existió un notable interés epidemiológico en esta micosis, por lo que varios estudios fueron efectuados con el objetivo de investigar la cantidad de individuos infectados por *Coccidioides* spp. Los estudios llevados a cabo por González-Ochoa, son los más sobresalientes, como la Encuesta Nacional (1961-1965), efectuada mediante la prueba de IDR con coccidioidina, con lo que se pudo definir la distribución epidemiológica en tres zonas endémicas: zona norte, del litoral del pacífico y zona central (González Ochoa, 1966). A la fecha esos datos globales nacionales no han sido renovados, pero destacan los estudios efectuados por Laniado-Laborín *et al.* (1991) en Tijuana, Baja California, Padua y Gabriel *et al.* (1999) en Torreón, Coahuila y Mondragón-González *et al.* (2005) en Coahuila.

La mayor parte de los pacientes que enferman por *Coccidioides* spp, presentan alteraciones que simulan una neumonía común o una tuberculosis (Castañeda & Laniado, 2002). Los procesos de curso agudo con infiltrados pulmonares localizados, tiene síntomas y signos semejantes a los de una neumonía bacteriana con fiebre, dolor torácico, expectoración purulenta, disnea, síndrome de condensación pulmonar e infiltrados lobulares homogéneos. A veces se presenta derrame pleural y adenomegalias en hilios pulmonares. Estos pacientes (15 % de los casos) suelen responder bien a los antifúngicos y curan rápidamente. Por el contrario, los enfermos que presentan imágenes pulmonares correspondientes a una intersticiopatía retículo-nodulillar, suelen padecer un acentuado deterioro del estado general. Su evolución clínica es muy grave, con una tasa de mortalidad del 70%, a pesar del tratamiento, durante las primeras 8 semanas. Las complicaciones fatales más comunes son el dolor en el pecho y choque séptico debido a la diseminación aguda del hongo. Las localizaciones extrapulmonares mas frecuentes son los ganglios linfáticos, huesos, hígado, bazo y sistema nervioso central. En México, la forma clínica más frecuentemente observada es la pulmonar y existe un escaso número de casos reportados con diseminación a piel y huesos; de las formas meníngeas, la gran mayoría

de los registros proceden de pacientes pediátricos (Ayala-Gaytán *et al.*, 1997). La coccidioidomicosis grave, de pronóstico frecuentemente fatal, se vincula a condiciones que producen déficit de la inmunidad mediada por células (pacientes diabéticos, mujeres embarazadas, pacientes con SIDA, etc).

Durante las primeras fases de la infección, las defensas contra el hongo son poco eficaces. Después de aproximadamente tres semanas, la inmunidad específica mediada por células, origina la formación de granulomas epitelioides compactos, con macrófagos activados, que poseen una gran capacidad fagocitaria y lítica. De esta forma, la mayor parte de las infecciones respiratorias, tanto sintomáticas como asintomáticas, son autolimitadas y de curso benigno (Pappagianis, 2001). Cerca de un 60 % de las infecciones agudas no producen síntomas y sólo es reconocida por la prueba de intradermoreacción positiva (Figura 2) a la coccidioidina o esferulina.



Fig. 2. Reacción positiva de 24 h a la intradermoreacción con coccidioidina, 35 mm de induración.

El diagnóstico de laboratorio consiste en la observación microscópica del hongo (esférulas con endosporas y ocasionalmente formas miceliales) (Muñoz *et al.*, 2004) a partir de productos patológicos del paciente. También se puede observar la morfología macro y microscópica en el cultivo de la muestra biológica en medio de Sabouraud con o sin antibióticos, aunque no se recomienda por la virulencia del hongo en su forma infectante. La serología es una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (Pappagianis, 2001).

En México, la coccidioidomicosis no es considerada una enfermedad que deba notificarse obligatoriamente por lo que actualmente no se conoce su prevalencia en los estados considerados como zonas endémicas y mucho menos en aquellas regiones que no comparten condiciones ecológicas iguales o similares a las que existen en el norte del país (Castañón Olivares *et al.*, 2004).

*Coccidioides* spp. en la naturaleza y en medios de cultivo comunes en su forma saprobia se presenta como hifas septadas las que después de 5 a 7 días de crecimiento origina una cadena de artroconidios multinucleados que son fácilmente transportados por el aire y que son la forma infectante en humanos y otros hospederos (Pappagianis & Zimmer, 1990). Cuando los artroconidios, que miden de 2.5 a 3  $\mu\text{m}$  son inhalados, y en la presencia de las células fagocíticas (Galgiani *et al.*, 1982), éstos se transforman en esférulas que al madurar se rompen y liberan endosporas que a su vez aumentan de tamaño hasta llegar a esférulas, repitiendo el ciclo. Las esférulas miden de 30 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro y pueden contener de 200 a 300 endosporas. Las endosporas miden de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 3). Converse (1955) desarrollo un medio liquido que permitió establecer los requerimientos para inducir la formación de esférulas a partir de artroconidios así como de su mantenimiento *in vitro* (Breslau & Kubota, 1964). Las esférulas se inducen a una temperatura entre 34 y 41°C y a una concentración de CO<sub>2</sub> entre el 10 al 20%, a las 72 y 96 h (Klotz 1984).



Fig. 3 Esférula con endosporas, forma parasitaria de *Coccidioides* sp., de esputo de paciente.

Los diferentes intentos para obtener una coccidioidina estandarizada descritos revelan que esta metodología es difícil y compleja. La necesidad de obtener un antígeno que posea una buena especificidad, reactividad y sensibilidad es muy importante, sobre todo porque la coccidioidina es una herramienta muy útil en estudios epidemiológicos y en nuestro país se carecen de datos recientes de la prevalencia de la coccidioidomicosis en zonas endémicas y no endémicas. Estos datos son esenciales en la actualidad debido a la frecuencia de esta micosis ha aumentado en pacientes con SIDA e inmunocomprometidos. Este trabajo se desarrolló para proponer un método para obtener y uniformar de forma sencilla y confiable la coccidioidina en microgramos de proteína en vez de diluciones del antígeno concentrado como se emplea comúnmente. Debido a que la coccidioidina es una mezcla de varios antígenos glicopéptidos, y la fracción peptídica es la responsable de la reacción de intradermoreacción; es de fundamental relevancia, estimar la concentración de proteínas en el antígeno y relacionar su concentración con la reactividad cutánea, en lugar de hacerlo por las diluciones que no proveen información concreta de su composición.



---

## ANTECEDENTES

### El desarrollo de la coccidioidina

El contacto del organismo humano con *Coccidioides* spp. puede detectarse por pruebas intradérmicas con coccidioidina (Smith *et al.*, 1948) y esferulina (Levine *et al.*, 1969) que miden la respuesta inmune mediada por células (Dodge *et al.*, 1985; Sarosi *et al.*, 1988). La reacción cutánea a la coccidioidina se vuelve positiva en pocos días en más del 90% de personas con infección primaria por lo que este antígeno representa una importante herramienta para pruebas inmunológicas y estudios epidemiológicos.

La elaboración de antígenos fúngicos con buena reactividad y especificidad son indispensables para las pruebas inmunológicas aplicadas en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades micóticas. Los antígenos crudos muestran buena reactividad en pruebas de precipitación y los diluidos en reacciones de intradermoreacción (IDR) y son ideales para estudios generales y epidemiológicos (Toriello *et al.*, 1997).

En 1914, Cooke fue el primero en usar derivados de *C. immitis* para pruebas serológicas. Este autor utilizó cultivos de micelio triturados y esférulas provenientes de lesiones humanas en una reacción de precipitación con sueros de pacientes. Davis (1924) tomó material suspendido de un cultivo de *C. immitis* de 4 semanas en agar que fue calentado a 68 °C por una hora. Este material produjo una lesión vesiculada seguida por eritema 24 h después de una inyección intracutánea en un paciente con coccidioidomicosis crónica diseminada.

Hirsch & d'Andrea (1927a, 1927b) prepararon filtrados de la fase micelial de cultivos de *C. immitis* de dos medios de cultivo diferentes. Un medio complejo (extracto de placenta) y un medio químicamente definido (lactato de amonio) usado para demostrar reacciones de pruebas cutáneas en humanos y animales con coccidioidomicosis. Examinaron este material y demostraron que podía ser precipitado por alcohol y se componía principalmente de polisacáridos con una pequeña cantidad de proteína.

De 1920 a los años cuarenta, se prepararon otras coccidioidinas de filtrados de cultivo en medios químicamente no definidos y usados en pruebas cutáneas (Beck *et al.*, 1931; Hurwitz *et al.*, 1938; Jacobson, 1928; Kessel, 1939). Stewart & Kimura (1940)



---

prepararon un filtrado coccidioidal en un medio simple sintético de cloruro de amonio-acetato de sodio incubado a 37 °C por más de 12 meses. En pruebas cutáneas se observaron reacciones dependientes de la dosis en 4 voluntarios con coccidioidomycosis después de la inyección de este material, que consistía principalmente de polisacáridos. Hassid *et al.*, (1943) cultivaron una sola cepa de *Coccidioides* a 37 °C en un medio de cultivo definido basado en el utilizado para preparar tuberculina. Después de 2 meses, se adicionó timerosal y se removió el material fúngico por filtración. El filtrado fue concentrado por ultrafiltración, solubilizado en ácido sulfúrico diluido y precipitado con alcohol etílico. Esta preparación que contenía principalmente polisacáridos, y menos de 1% de aminoácidos fue asociada con una reactividad positiva en pruebas cutáneas,

### **Estandarización de la coccidioidina**

Muchos intentos se han realizado para uniformar la coccidioidina. Estos métodos incluyen la determinación de una dosis mínima de antígeno que reaccione en cobayos (Stewart & Kimura, 1940), la comparación de una coccidioidina estandarizada en humanos (Smith *et al.*, 1948), la estandarización por contenido de nitrógeno no dializable (Wallraff 1965), la estandarización de la coccidioidina por bioensayos en cobayos (Sutton 1971), y por una caracterización inmunológica y fisicoquímica del antígeno (Kobayashi 1970).

Los primeros filtrados conocidos como coccidioidinas fueron asociados con reacciones cutáneas de hipersensibilidad de tipo retardado, pero el método de preparación y la potencia de las coccidioidinas no estaban estandarizados. Para corregir este problema, Smith *et al.* (1948) establecieron métodos para producir coccidioidina de un carácter y potencia reproducible. Esto involucró la uniformidad del medio sintético empleado para el crecimiento del hongo, así como la regulación de las condiciones bajo las cuales la coccidioidina fue preparada. Estos investigadores utilizaron un medio de cultivo definido conteniendo L-asparagina, inoculado con una suspensión de micelio e incubación durante ocho semanas. Después de ese periodo se produce la autólisis del hongo con liberación de materiales filtrables al medio de cultivo. El filtrado se esterilizó y conservó con timerosal. A fin de establecer la variación





---

antigénica se utilizaron múltiples cepas de diferentes pacientes y diversas regiones geográficas. Sin embargo, la coccidioidina autógena (material derivado del hongo infectante del mismo paciente) aparentemente no provocó una reacción diferente que las coccidioidinas derivadas de otras cepas no relacionadas. El material producido fue resistente al calor, incluso a la autoclave a 121 °C por 10 min y consistió, por peso, predominantemente de polisacáridos. A pesar del cuidado meticuloso de todas las condiciones utilizadas, se observaron variaciones en la potencia entre diferentes preparaciones o lotes. Para minimizar esto, Smith *et al.*, (1948) probó el nuevo material contra una preparación denominada lote 9, en la que se hicieron ajustes para obtener una potencia equivalente. La óptima dilución de coccidioidina para una reacción cutánea de hipersensibilidad fue determinada a 1:100 en un volumen de 0.1 ml. Muchas reacciones no se observaron cuando se utilizaron diluciones de 1:1000 y la incidencia de reacciones no específicas se incrementó al utilizar diluciones de 1:10.

Wallraff & Wilson (1965) estandarizaron los antígenos basados en análisis bioquímicos. Prepararon dos coccidioidinas por métodos diferentes y estos fueron dializados con agua destilada. En los antígenos crudos y dializados determinaron el contenido de nitrógeno (método de micro-Kjeldahl) y de carbohidratos (método de Fairbairn's modificado). Las diluciones apropiadas de los antígenos fueron inyectadas en voluntarios y en conejos sensibilizados. La comparación de coccidioidinas crudas y dializadas con respecto al contenido de nitrógeno, contenido de carbohidratos y su actividad en pruebas cutáneas demostró una pérdida de nitrógeno y carbohidratos en la diálisis de las coccidioidinas pero no perdieron su actividad en las pruebas cutáneas. Las respuestas cutáneas a las coccidioidinas dializadas muestran una correlación con el contenido de nitrógeno.

Sutton y Stanley (1971) uniformaron la coccidioidina por ensayos biológicos en cobayos sensibilizados, prepararon diluciones de una coccidioidina (UC-4) y una coccidioidina estándar (Smith's Lote 64D3). Estas se probaron por la proporción entre los diámetros obtenidos (potencia) de las reacciones cutáneas en los cobayos para obtener un estándar secundario. Este estándar secundario a su vez se comparó con cuatro coccidioidinas de prueba, que se diluyeron por un factor de dilución que es



---

proporcional a la potencia de la coccidioidina estándar, para uniformar la potencia de los antígenos. Pero no se obtuvo paralelismo entre las curvas logaritmo dosis-respuesta de los antígenos de prueba con el estándar secundario.

Por último, Kobayashi *et al.* (1970) propusieron una caracterización fisicoquímica de la coccidioidina y la histoplamina.

### **Caracterización bioquímica e inmunológica del antígeno**

Las características de los antígenos de *Coccidioides* spp. han sido estudiadas por varios investigadores. Hirsch & d' Andrea (1927) precipitaron antígenos reactivos de pruebas cutáneas procedentes de filtrados de *C. immitis* con etanol al 95%. Ellos detectaron de 20 a 40% de azúcares reductores y de 3 a 4% de nitrógeno (Hassid *et al.*, 1943). También identificaron glucosa como el mayor componente de la fracción precipitada con alcohol de la coccidioidina. Los componentes sacáridos glucosa, ácido galacturónico, y otro azúcar reductor no identificado estaban presentes en una proporción 6:1:3 respectivamente. El contenido de nitrógeno total en este material fue aproximadamente 3.2 % con 0.6% de amino nitrógeno. Sin embargo, las pruebas para proteínas (Millon, Biuret, y la precipitación por ácido tricloro acético) fueron negativas.

Subsecuentemente, Pappagianis *et al.* (1961) reportaron que la precipitación de coccidioidina con 80% de etanol producía una molécula de un peso molecular promedio de 31.7 kDa reactiva en pruebas serológicas. Este material estaba compuesto de 60 al 70 % de polisacáridos y de 3 al 4% de nitrógeno. La manosa fue el carbohidrato predominante con 90 al 98.5% de los polisacáridos, y la galactosa menor al 10%. Un tercer carbohidrato fue detectado en una muy baja concentración. El polisacárido crudo dio negativo a la prueba de Biuret, no precipitó con ácido tricloro acético, y no reaccionó con ninhidrina. La cromatografía del polisacárido crudo hidrolizado con ácido reveló la presencia de seis aminoácidos, incluyendo tirosina y metionina. Además, la prueba de Lowry *et al.*,(1951) para proteína produjo una reacción indicativa de 15 al 20 % de material péptido que se aproxima al contenido de proteína o derivados de proteínas basado en el 3 al 4 % de nitrógeno detectado.

Goldschmidt (1958) confirmó la presencia de manosa y galactosa, y determinó que el carbohidrato desconocido correspondía a la 3-O-metilmanosa.



---

Por otro lado, Toriello *et al.* (1982) realizaron un estudio sobre la composición química de la fracción polisacárida de los complejos polisacárido-proteína desproteinizados (CPPD's) de *C.immitis*, *Histoplasma capsulatum* y *Blastomyces dermatitidis* por medio de cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos y gases, y encontraron en *C. immitis*, manosa (38.6%), glucosa (47.8%) y galactosa (13.6%) además de hexosaminas en un pequeño porcentaje, confirmando los resultados anteriores.

En otro estudio, Cole *et al.* (1985) estudiaron el producto retenido de un dializado de un filtrado micelial por cromatografía de líquidos y gases. Detectaron 3-O-metilmanosa, manosa, galactosa, y glucosa en una proporción aproximada 3:10:1:10 respectivamente. Las fracciones de filtrados miceliales asociados a reacciones de hipersensibilidad cutánea de tipo retardado exhiben estos carbohidratos, así como péptidos ricos en prolina (Anderson *et al.*, 1971). Los intentos para remover la proteína de la coccidioidina resultaron en la pérdida de la hipersensibilidad cutánea de tipo retardado (Cole *et al.*, 1985). Esto sugiere que la porción proteica de la coccidioidina es la responsable de la respuesta inmune celular. Para apoyar esta hipótesis, Dugger *et al.* (1991) observaron que la actividad inmune celular *in vitro* se retiene cuando el azúcar se remueve de la esférula por lisis con tolueno. Por otro lado, una gran variedad de polisacáridos incluyendo aquellos derivados de hongos, que se han encontrado pueden modular la respuesta inmune (Tzianabos, 2000). Los datos actuales apoyan el concepto de que las proteínas son el elemento antigénico crítico en las preparaciones de *Coccidioides*, pero también un estudio extenso de los polisacáridos han mostrado la modulación de éstos en la respuesta inmune producida por este hongo.

Huppert *et al.*, (1978) en un análisis antigénico de la coccidioidina y esferulina por medio de la inmunoelectroforesis en dos dimensiones encontraron 26 antígenos en la coccidioidina y 12 en la esferulina. De éstos, 10 eran comunes en ambas preparaciones, 16 sólo aparecieron en la coccidioidina, y dos únicamente en la esferulina. En un estudio similar, utilizando histoplasmina purificada (CPP-D-histo) derivada del hongo *H. capsulatum*, se observó también en inmunoelectroforesis en dos dimensiones, tres arcos con reactividad cruzada con coccidioidina (Toriello *et al.*, 1993).



---

El componente o componentes activos de la reactividad de la prueba cutánea con *Coccidioides* spp. no han sido purificados aún, pero la evidencia preliminar sugiere que esta podría deberse a un antígeno polimérico llamado Ag 2, también conocido como antígeno rico en prolina PRA. Este antígeno es susceptible a tratamiento enzimático con manosidasa y proteasa, lo que indica que esta compuesto por una manoproteína aunque otros componentes pueden estar presentes en la pared del hongo. El Ag 2 es soluble en medio alcalino igual que el antígeno utilizado en la prueba en tubo de precipitina y además presentan perfiles cromatográficos similares, coeluyen juntos en columnas de intercambio iónico y columnas de afinidad que sugieren una asociación íntima entre estos antígenos, quizás se presenten como un complejo pero ambos antígenos poseen una composición química diferente (Cox, 1989).

### **Utilidad de la coccidioidina**

La determinación de la respuesta inmune celular con coccidioidinas ha sido usada de diferente manera. Primera, como una herramienta epidemiológica para determinar la prevalencia y la incidencia de infección por *Coccidioides* spp. en regiones geográficas definidas. Segunda, como ayuda en el pronóstico de la enfermedad.

El diagnóstico de coccidiomicosis es a menudo realizado con base en pruebas serológicas que emplean antígenos crudos preparados de filtrados o lisados de micelio o esferulas/endosporas de *Coccidioides* spp. Las pruebas serológicas actualmente usadas incluyen la inmunodifusión en tubo de precipitina (IDTP) para la detección de IgM y la inmunodifusión por fijación del complemento (IDCF) para IgG e inmunoensayos enzimáticos (EIA) para la detección de estos anticuerpos específicos (Pappagianis & Zimmer, 1990). La cuantificación de anticuerpos, principalmente IgG se lleva a cabo por la fijación del complemento o la inmunodifusión cuantitativa, y el título puede estar relacionado con la gravedad de la enfermedad (Johnson *et al.*, 1996).

Diversos estudios *in vitro* demuestran que existe una asociación clara entre la severidad clínica y la respuesta inmune celular disminuida en la coccidiomicosis humana (Catanzaro *et al.*, 1975). Smith (1948) observó, desde hace sesenta años, que la pérdida de la reactividad en la prueba cutánea con coccidioidina es frecuentemente asociada a la diseminación de la enfermedad, lo cual sigue siendo válido hasta hoy.



---

Fiese (1958) concluyó que el mantenimiento de la sensibilidad a la prueba cutánea con coccidiodina augura un buen pronóstico pero que la reactividad inicial a la prueba cutánea no necesariamente predice que la diseminación de la enfermedad no ocurrirá.



---

## OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método para obtener coccidioidina con un buen grado de reactividad, sensibilidad y especificidad, y estandarizado en microgramos de proteína en vez del comúnmente utilizado en diluciones del antígeno concentrado.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Producir coccidioidina de diversos aislados de *C. immitis* y *C. posadasii* de pacientes de México.
- Determinar y comparar la potencia de las coccidioidinas estandarizadas por el método propuesto (en microgramos de proteína/ 0.1 ml) con la potencia de la coccidioidina estandarizada en diluciones (comercial) y una coccidioidina (MI-168) producida en el laboratorio hace 12 años.
- Verificar la reactividad cutánea de las coccidioidinas en un modelo experimental de cobayos sensibilizados con los antígenos del hongo.
- Verificar que los antígenos obtenidos cumplan las especificaciones vigentes de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM).
- Producir un lote de coccidioidina que pueda ser utilizado en estudios epidemiológicos de la coccidioidomicosis en el país.



---

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Hongos

Las cepas fúngicas utilizadas en este estudio para la obtención de antígenos fueron: *C. immitis* EH-696 y *C. posadasii* EH-695 proporcionadas por la M.M.T Rocio Castañón del Laboratorio de Micología Médica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM; y la cepa EH-657 de *C. posadasii* proporcionada por la Q.B.P. Bertha Muñoz del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Las tres aisladas de pacientes con coccidiomicosis. Los hongos siempre se trabajaron en campana de seguridad biológica, nivel II A (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories).

#### **Reactivación de la virulencia de las cepas de *Coccidioides* en ratón**

A las cepas recibidas se les comprobó la pureza mediante observación microscópica, posteriormente se resembraron en medio micobiotico e incubaron a 28 °C por 7 días, al desarrollo obtenido se agregaron 3 ml de solución salina al 0.9 % estéril (SSI) con una jeringa a cada tubo y se agitó en vortex por aproximadamente 15 segundos. A partir de esta suspensión se inyectó 1 ml a cada uno de los tres ratones por vía intraperitoneal. Los ratones murieron a los 10 días de la infección. Se extrajeron el pulmón, hígado y bazo de cada ratón infectado y se sembraron muestras de cada organo en medio micobiótico (Bioxón, México). Se incubaron a 28 °C por 8 días hasta el desarrollo del hongo. Posteriormente, se realizó un examen microscópico para verificar la morfología y descartar cualquier contaminación. Los cultivos se resembraron en medio micobiótico y se incubaron a 28 °C por 10 días para todas las pruebas posteriores.

#### **Antígenos de referencia**

Se utilizaron dos antígenos de referencia. El primero correspondió al lote MI-168 de coccidioidina de la cepa de *Coccidioides immitis*. EH-49 preparada hace 10 años en el Laboratorio de Micología Básica, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, con una potencia y eficacia demostrada en estudios epidemiológicos en el Estado de Coahuila (Cid Chávez *et al.*, 2006) y una coccidioidina comercial cuya presentación es de una dilución 1:100.



---

### **Antígenos de prueba**

Las coccidioidinas de prueba usadas en este trabajo fueron obtenidas de las cepas EH-695 y EH-657 de *C. posadasii*, y EH-696 de *C. immitis*.

### **Medios de cultivo**

- Agar Micobiótico (Bioxón, México) y agar de Sabouraud con dextrosa (DIFCO) para la conservación de los hongos.
- Medio líquido sintético de Smith *et al.* (1948) para la producción de antígenos.
- Infusión de cerebro corazón (BHI) (IDG, UK); agar de Sabouraud (DIFCO, USA), agar de papa dextrosa (APD, Bioxon, México) y caldo de tioglicolato (Merck, Alemania) para las pruebas de viabilidad y control de esterilidad de los antígenos.

### **Condiciones de cultivo**

- Para la producción de los antígenos los cultivos se incubaron a 28 °C durante 2 meses.
- Para las pruebas de viabilidad de los cultivos inactivados se sembraron en BHI a 37 °C por 7 días; en Sabouraud y en agar papa dextrosa a 28 °C durante 15 días y caldo de tioglicolato a 37 °C durante 15 días
- Para la conservación de las cepas se incubaron a 28 °C hasta el desarrollo de los hongos y se guardaron en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

### **Obtención de coccidioidinas**

Los cultivos se inactivaron mediante la adición de timerosal el cual se dejó actuar a 4 °C durante 7 días después de los cuales y como medida de seguridad se realizó una prueba de viabilidad.

Una vez que se confirmó que el hongo estaba inactivo se procedió a separar la masa micelial por medio de filtración y se siguió el procedimiento reportado en Toriello *et al.* (1991). Las coccidioidinas concentradas se conservaron en congelación a -40 °C hasta su utilización.

### **Método de inmunodifusión de Ouchterlony**

Para probar la reactividad inmunológica de los antígenos obtenidos se utilizó la técnica de inmunodifusión en gel de Ouchterlony (1962) con suero hiperinmune anti-C.





---

*immitis* de conejo y de pacientes con coccidioidomicosis. Se prepararon geles con agarosa al 1% sobre portaobjetos de vidrio. En cada gel se hicieron perforaciones con la siguiente distribución 1 pozo central y 6 periféricos de 4 mm de diámetro. En el pozo central se depositó el antisuero y en los periféricos los antígenos concentrados de prueba y de referencia. Las placas se incubaron 24 h a 26 ° C y se observaron los patrones de bandas obtenidos.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Se realizó una caracterización electrofóretica de los antígenos estudiados con un gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones reductoras con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para separar e identificar los componentes de los filtrados. El SDS-PAGE se preparó con el sistema amortiguador discontinuo de Laemmli (1970). Las muestras fueron diluidas con solución salina. La electroforesis se realizó a 80 V por 3 h y 20 min. Los geles fueron teñidos con la tinción de plata Merrill et al. (1981), y azul de Coomassie. Como marcadores de pesos moleculares se utilizaron miosina (200 kDa), betagalactosidasa (116 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66.2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anhídrida carbónica (31 kDa) inhibidor de tripsina de soya (21.5 kDa), lizosima (14.4 kDa) y aprotina bovina (6.5 kDa) (Bio-Rad Richmond, Calif).

### **Determinación de proteínas y carbohidratos**

Se elaboraron 5 lotes de coccidioidinas de las cepas EH-657, EH-695 y EH-696 con el objetivo de verificar si bajo las mismas condiciones de cultivo se obtenían antígenos con cantidades de proteína y carbohidratos uniformes, pero para la realización de las pruebas de actividad biológica solo se utilizó el lote 2 de cada cepa.

A todos los lotes de antígenos se les determinaron proteínas y carbohidratos excepto al antígeno comercial debido a que por medio de los métodos empleados no es posible cuantificar la cantidad de proteínas en los antígenos diluidos y tampoco se pudo obtener el antígeno comercial concentrado. Para seleccionar el método más apropiado para determinar la cantidad de proteínas en las coccidioidinas se probaron tres métodos: el de Lowry *et al.* (1951), una modificación del método de Lowry (Lucarini & Kilikian, 1999) y el método de Bradford (1976). Los carbohidratos se determinaron por



---

quintuplicado por el método de Dubois *et al.* (1956). La determinación de proteínas se repitió diez veces por cada antígeno con el método seleccionado.

### **Comparación de los métodos de cuantificación de proteínas**

El uso del método adecuado de estimación de proteínas depende de cinco criterios de acuerdo a García-Arellano *et al.*, (1998): 1) la cantidad total de proteína presente en la muestra; 2) la concentración de la proteína, 3) la especificidad del método, 4) la presencia de otras sustancias que pudieran interferir y 5) la facilidad y reproducibilidad del método. Tomando en consideración estos criterios se seleccionó el más apropiado para determinar la cantidad total de proteína presente en los antígenos obtenidos. Se compararon la linealidad de las curvas de calibración de los tres métodos, en reproducibilidad y facilidad.

Se determinó la cantidad de proteína de los antígenos obtenidos de las cepas EH-695 y EH-657 de *Coccidioides* spp., por los tres métodos de cuantificación y se graficó el promedio de la cantidad de proteína obtenidas en cada método por cada antígeno.

### **Linealidad de los métodos**

La linealidad es la capacidad de un ensayo para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del antígeno en una muestra y se determinó construyendo las curvas de calibración de absorbancia contra concentración a partir de una solución estándar de albúmina sérica bovina (Sigma, EU). El análisis se realizó preparando tres curvas de calibración para cada método y se trabajó en el rango de concentración de 0.25 -1.4 mg /mL para el método de Bradford (1976), de 10 – 100  $\mu\text{g/ml}$  para el método de Lowry *et al.* (1951) y de 50 - 200  $\mu\text{g/ml}$  para la modificación del método de Lowry (Lucarini & Kilikian, 1999). Se midió la absorbancia de las curvas a las longitudes de onda indicadas para cada método utilizando como blanco agua milli Q en un espectrofotómetro (Beckman Modelo DU-6). Para la prueba de linealidad se hicieron gráficos de las curvas de calibración y se realizó el ajuste lineal por mínimos cuadrados de la respuesta contra la concentración y se calcularon los coeficientes de determinación y de correlación ( $R$  y  $R^2$ ), el coeficiente de variación para el factor de respuesta (CVf: absorbancia/concentración), el error relativo debido a la regresión (ERR) y el índice de confianza de la ordenada al origen (IC  $\alpha = 0.05$ ).



---

## **Repetibilidad del método**

Se prepararon dos curvas de calibración por cada método en dos días distintos (cuatro curvas en total por cada método). Se cuantificó la proteína en dos días diferentes para cada método y se calculó el coeficiente de variación para el factor de respuesta.

## **Animales**

Para reactivar la virulencia de las cepas se emplearon ratones machos entre 20 y 25 g de peso de la cepa BALB/c. Para llevar a cabo las pruebas de identidad y actividad biológica de la coccidioidina MPB 005 descritas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 2004), se emplearon cobayos albinos Hartley, hembras, entre 600 y 700 g de peso.

### **Prueba de actividad biológica y de identidad de coccidioidina (métodos de productos biológicos MPB 005, FEUM, 2004)**

#### **1. Sensibilización de cobayos**

Se sensibilizaron 20 cobayos hembra con 0.25 mL del antígeno de referencia concentrado y mezclado (1:1) con adyuvante completo de Freund (Difco, México). Se inyectó 0.5 ml de la mezcla (0.25 mL de antígeno y 0.25 mL de adyuvante) en tejido muscular profundo de la parte posterior de cada pata trasera.

#### **2. Selección de cobayos sensibilizados**

Después de un mes de la sensibilización de los cobayos, se depiló el lomo del lado derecho de cada animal para la realización de la prueba intradérmica. Se inyectó 0.1 ml de la dilución de 5 µg proteína/0.1mL del antígeno de referencia MI-168. A las 24 h se midió longitudinal y transversalmente el sitio de induración que presentó cada animal y se separaron los cobayos en tres grupos:

Grupo 1: cobayos que presentaron una reacción de 10 a 15 mm de induración.

Grupo 2: cobayos que presentaron una reacción de 15 a 20 mm de induración.

Grupo 3: cobayos que presentaron una reacción menor a 10 mm los cuales se descartaron.



---

### **3. Preparación de las dosis de coccidioidinas para probar la potencia biológica**

En un experimento se comparó el antígeno comercial (de referencia) con el antígeno MI-168, solamente en series de diluciones como especificado en la Farmacopea. En el siguiente experimento se comparó el antígeno comercial con el antígeno de prueba EH-695. Se realizaron otros experimentos donde además de la serie de diluciones, se aplicaron dosis adicionales en microgramos de proteína, 1 y 5  $\mu\text{g}$ , para cobayos del grupo 2 y dosis de 10 y 15  $\mu\text{g}$  para cobayos del grupo 1. Se empleó el antígeno MI-168 como antígeno de referencia para compararlo con los antígenos de las cepas EH-695, EH-696 y EH-657. Todos los antígenos se diluyeron con solución salina isotónica al 0.9 % estéril. Las dosis aplicadas se muestran en la tabla 1.

### **4. Procedimiento de prueba**

Una semana después de la división de los grupos de cobayos dependiendo de la reacción a la IDR de prueba con el antígeno de referencia, se depiló todo el lomo de tres cobayos del grupo 1 y tres del grupo 2. A las 24 h se inyectó al azar por vía intradérmica 0.1 ml de cada dilución de la serie 1 (Tabla 1) en los cobayos del grupo 1 y 0.1 ml de cada dilución de la serie 2 (Tabla 1) en los cobayos del grupo 2. Se inyectó a cada cobayo tanto la serie de diluciones del antígeno problema como la serie de diluciones del antígeno de referencia, dejando un espacio de 2.5 cm entre cada aplicación. Se midieron los diámetros de las induraciones a las 24 y 48 h. A partir de los primeros resultados donde se observó que los datos de induración no cambiaban entre 24 y 48 h, se midió la induración solamente a las 24 h. Los datos registrados se obtuvieron con el promedio de los diámetros longitudinal y transversal de cada induración, por ejemplo,  $12 \times 10 = 22/2 = 11$  mm induración.

El testigo positivo siempre fue el antígeno de referencia MI-168 con 5  $\mu\text{g}$  de proteína/0.1 mL. El testigo negativo fue siempre solución salina isotónica (SSI) estéril. (Tabla 2).



**Tabla 1. Series de diluciones especificadas en la Farmacopea Mexicana que se deben aplicar a cada grupo de cobayos reactivos.**

Serie de diluciones 1 Grupo de cobayos 1 10-15 mm induración	Serie de diluciones 2 Grupo de cobayos 2 15-20 mm induración
1:100	1:200
1:200	1:400
1:300	1:800
1:400	1:1600
1:800	

## **5. Repetición de las pruebas**

Las pruebas para determinar la potencia de los antígenos se repitieron cuatro veces para el antígeno de la cepa EH-695 de *C. posadasii*, y tres veces para cada uno de los antígenos de las cepas EH-696 de *C. immitis* y EH-657 de *C. posadasii*.

## **6. Análisis de datos y métodos estadísticos para la interpretación de los resultados**

La potencia de los antígenos MI-168 y EH-695 se determinó mediante el modelo de líneas paralelas que sugiere la Farmacopea Mexicana (Estadística para ensayos biológicos) para estos casos. Un factor a controlar en el diseño de las pruebas y en los análisis de las valoraciones es la variabilidad del sistema de pruebas biológicas, cuya respuesta media puede variar de un laboratorio a otro y, ocasionalmente, dentro de un mismo laboratorio. Para controlar este tipo de variación, la respuesta a un producto biológico se compara con un Estándar de Referencia USP u otro estándar apropiado siempre que sea posible. En nuestro estudio se empleó una coccidioidina comercial de la Secretaría de Salud como el estándar de referencia para compararla con los antígenos MI-168 y EH-695 y posteriormente en otras pruebas, se utilizó el antígeno MI-168 (obtenido y previamente caracterizado en el laboratorio de Micología Básica desde hace varios años) como referencia para compararlo con los antígenos EH-695, EH-657



---

y EH-696 ya que este antígeno mostró muy buenos resultados al compararlo con el antígeno comercial.

La estimación de la potencia está sujeta a errores aleatorios debido a la variabilidad de las respuestas, por lo tanto de ser posible, se debe calcular el error de los resultados para cada ensayo. Con este propósito, en la Farmacopea se describen los métodos estadísticos del diseño de las pruebas y para el cálculo de los errores de las estimaciones de la potencia.

La prueba para determinar la potencia de la coccidioidina es un ensayo de dilución, esto significa que la muestra por probar, contiene el mismo componente activo que la preparación patrón, pero en una proporción diferente de componentes activos o inertes. En tal caso, la preparación muestra puede, en teoría, derivarse a partir de la preparación patrón por dilución con componentes inertes.

Para modelar el efecto de la dilución de los antígenos en el modelo teórico, es útil transformar la relación dosis-efecto a una relación lineal como es logaritmo de la dosis-efecto.

Para estimar la potencia de los antígenos se aplicó el modelo de líneas paralelas, este modelo se basa en la relación lineal entre la respuesta y el logaritmo de la dosis. Si la preparación se diluye, cada valor del logaritmo de la dosis en la relación, disminuye una cantidad igual al logaritmo del factor de dilución, toda respuesta disminuye en una cantidad constante, es decir, la línea de regresión se desplaza hacia abajo, paralela a sí misma.

Para aplicar el modelo de líneas paralelas es indispensable cumplir con los siguientes requisitos:

- Que los diferentes tratamientos se asignen estrictamente al azar.
- Que las respuestas a cada tratamiento se distribuyan normalmente.
- Que la desviación estándar de la respuesta a cada tratamiento sea independiente de la media aritmética de la respuesta (prueba de Hartley).

Además para verificar que las pruebas cumplan con el modelo de líneas paralelas también se deben satisfacer los siguientes requisitos



- 
- Que la relación entre el logaritmo de la dosis y la respuesta pueda ser representada por una línea recta en el intervalo de las dosis ensayadas (al menos tres diluciones o tres dosis)
  - Para cualquier muestra en la prueba, la línea recta debe ser paralela a la del patrón

Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar debido a que en este diseño se considera la variabilidad intrínseca de las unidades de prueba (cobayos), y permite agrupar a las unidades de prueba con base en una fuente de variación identificable (grupos), como puede ser la diferencia en sensibilidad entre los animales. En la aplicación de los análisis estadísticos es necesario imponer las siguientes restricciones al diseño experimental de la prueba:

- Se debe usar el mismo número de dosis (al menos tres dosis) para cada preparación en la prueba.
- El factor de la dilución de los antígenos debe ser constante.
- Debe haber un número igual de unidades de prueba para cada tratamiento. En el caso de perder alguna respuesta ésta puede reemplazarse por un valor estimado por un método estadístico apropiado.

El análisis de varianza es un procedimiento estadístico que permite evaluar si un bioensayo satisface las condiciones del modelo de líneas paralelas. Con base en este se determina:

- Si la relación entre la variable respuesta y el logaritmo de la dosis es de tipo lineal (en un ensayo a tres dosis).
- Si existen desviaciones del paralelismo entre el estándar y las muestras.

La especificación de la Farmacopea para la potencia de la coccidioidina de prueba en relación con la coccidioidina de referencia es entre el 80 y 125 por ciento de lo que indica el marbete, con un intervalo de confianza (IC) de 0.95, entre 64 y 156 por ciento.

Se realizaron otros experimentos para probar los antígenos EH-695, EH-696 y EH-657 elaborados recientemente y se compararon cada uno de éstos con el antígeno



---

MI-168 utilizado como antígeno de referencia. Esto se llevó a cabo con base en los resultados de estudios epidemiológicos previos, donde el antígeno MI-168 mostró una excelente reactividad en Coahuila (Cid-Chávez *et al.*, 2006). Los resultados de las pruebas de la actividad biológica realizados en este estudio en el que se comparó el antígeno MI-168 con el antígeno comercial, demostraron que el antígeno MI-168 es más potente que el antígeno comercial. En los experimentos de comparación entre los antígenos EH-695, EH-696 y EH-657 y el de referencia MI-168, se modificó el diseño experimental para evaluar las dosis estandarizadas de los antígenos en  $\mu\text{g}$  de proteína y en diluciones. En esta modificación del diseño no se aplicaron las dosis en diluciones del antígeno de prueba y de referencia tal como esta especificado en la Farmacopea (FEUM 2004) ya que además de las diluciones establecidas, se habrían tenido que aplicar adicionalmente al menos tres dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína; una dosis baja, una dosis mediana y una alta de cada antígeno en ambos grupos de cobayos, para cumplir el modelo de líneas paralelas; y con el diseño experimental de bloques al azar; lo que implicaba administrar a cada animal demasiadas inyecciones lo que podría provocar mucho estrés a los animales. En esta modificación se aplicaron las dosis en diluciones y en microgramos de proteínas de la Tabla 2.

Análisis estadístico: Para evaluar la potencia de los antígenos en estos experimentos, se realizó la prueba *t* de Student donde se compararon los promedios de induración del antígeno de prueba y de referencia en cada una de las dosis aplicadas (diluciones o  $\mu\text{g}$  de proteína) a cada grupo de cobayos reactivos. Además se hizo un análisis de varianza donde se compararon los promedios de todos los antígenos de prueba y de referencia por cada una de las dosis aplicadas (diluciones o  $\mu\text{g}$  de proteína) a cada grupo de cobayos reactivos. Los análisis de varianza y las pruebas *t* de Student se realizaron con el programa Statgraphics® Plus Versión 5.1.





Tabla 2. Dosis administradas a los cobayos en la modificación del diseño experimental para evaluar las dosis en diluciones o  $\mu\text{g}$  de proteína de los antígenos probados.

Serie de diluciones 1 aplicadas al grupo de cobayos 1 menos reactivos	$\mu\text{g}$ de proteínas en cada una de las diluciones de cada antígeno probado				Serie de diluciones 2 aplicadas al grupo de cobayos 2 más reactivos	$\mu\text{g}$ de proteínas en cada una de las diluciones de cada antígeno probado			
	MI-168	EH-657	EH-695	EH-696		MI-168	EH-657	EH-695	EH-696
1:100	8.8	2.67	3.09	2.36	1:200	4.4	1.34	1.54	1.13
1:200	4.4	1.34	1.59	1.13	1:400	2.2	0.67	0.77	0.56
1:300	2.9	0.89	1.03	0.75	1:800	1.1	0.33	0.38	0.28
1:400	2.2	0.67	0.77	0.565	1:1600	0.55	0.16	0.19	0.14
	Dilución de cada uno de los antígenos concentrados para obtener su equivalente en $\mu\text{g}$ de proteína					Dilución de cada uno de los antígenos concentrados para obtener su equivalente en $\mu\text{g}$ de proteína			
10 $\mu\text{g}^*$	1:88	1:27	1:31	1:23	1 $\mu\text{g}^*$	1:800	1:300	1:300	1:200
15 $\mu\text{g}^*$	1:59	1:18	1:21	1:16	5 $\mu\text{g}^*$	1:176	1:53	1:65	1:47
<sup>1</sup> Testigo +					<sup>1</sup> Testigo +				
<sup>2</sup> Testigo -					<sup>2</sup> Testigo -				

\*Dosis en  $\mu\text{g}$  de proteínas adicionales a las dosis en diluciones establecidas en la Farmacopea. <sup>1</sup> Antígeno MI-168 5  $\mu\text{g}$  proteína. <sup>2</sup> Solución salina isotónica 0.9%.



---

## RESULTADOS

### Examen microscópico de las cepas

Todas las cepas sembradas para obtener las coccidioidinas presentaron el morfotipo micelial característico del hongo, con micelio delgado y septado, con arthroconidios de paredes gruesas con forma de barril de 2.5 a 4 por 3 a 6  $\mu\text{m}$  (Figura 4). Ningún cultivo mostró contaminación bacteriana u otra en los exámenes microscópicos que se realizaron.

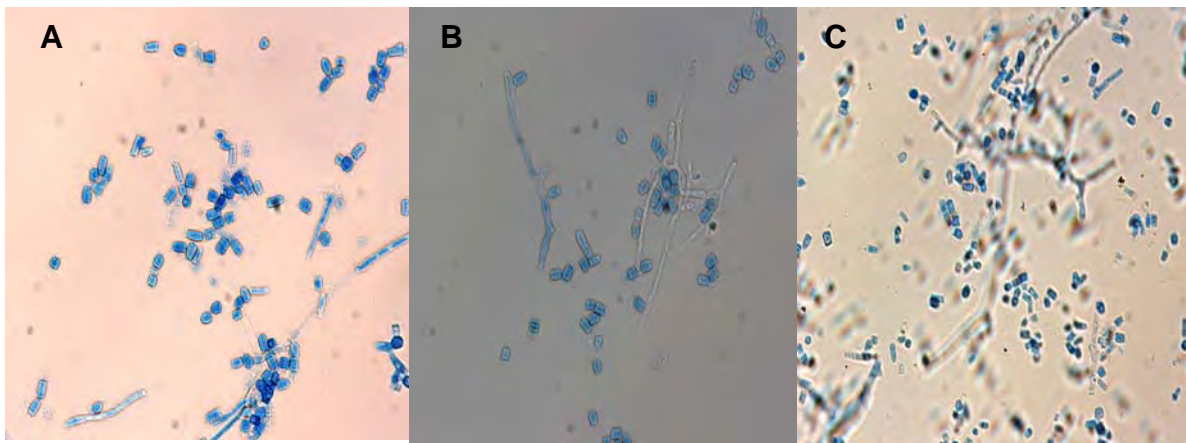


Fig.4. Microfotografías de los arthroconidios enteroártricos de las cepas estudiadas. A) *Coccidioides posadasii* EH-657, 400X. B) *Coccidioides immitis* EH-696, 400 X. C) *Coccidioides posadasii* EH-695, 100 X.

### Reactivación de la virulencia de las cepas

De todos los ratones que se infectaron (tres por cepa), todos los animales murieron a los diez días de la inoculación, y el hongo creció a partir del hígado, bazo y pulmón de cada animal. Las cepas reactivadas se sembraron, revisaron y guardaron en agar de Sabouraud y APD a 4 °C en un recipiente especial aparte, hasta su uso.

### Reactividad inmune de las coccidioidinas obtenidas

La inmunodifusión en gel de Ouchterlony se realizó con suero de pacientes con coccidiomicosis y con suero hiperinmune de conejo anti-*C. immitis*, para comprobar la reactividad de los antígenos obtenidos en todos los lotes. En la Figura 5 se observan los resultados de la inmunodifusión de los antígenos obtenidos de cada cepa estudiada en la prueba de IDR (EH-657, EH-695 y EH-696). Todos ellos formaron tres bandas de identidad con el antígeno de referencia MI-168. El antígeno comercial utilizado



solamente presentó una banda de identidad con el antígeno MI-168, la más cercana al pozo central del antisuero.



Fig. 5. Inmunodifusión de Ouchterlony de los antígenos estudiados y del antígeno MI-168 de referencia con suero de paciente con coccidioidomicosis. Las bandas se tiñeron con azul de Coomasie.

### Caracterización bioquímica de las coccidioidinas

En la Figura 6 se muestra el SDS-PAGE realizado para separar e identificar los componentes de los antígenos. Al teñir con plata se observaron nueve bandas correspondientes a 100, 79, 62, 54, 45, 40, 33, 27 y 19 kDa en todos los lotes de antígeno de las tres cepas, mientras que cuando se tiñó con azul de Coomasie solamente se observó una banda correspondiente a 40 kDa. La banda de 40 kDa aparece en las dos tinciones y en todos los antígenos.

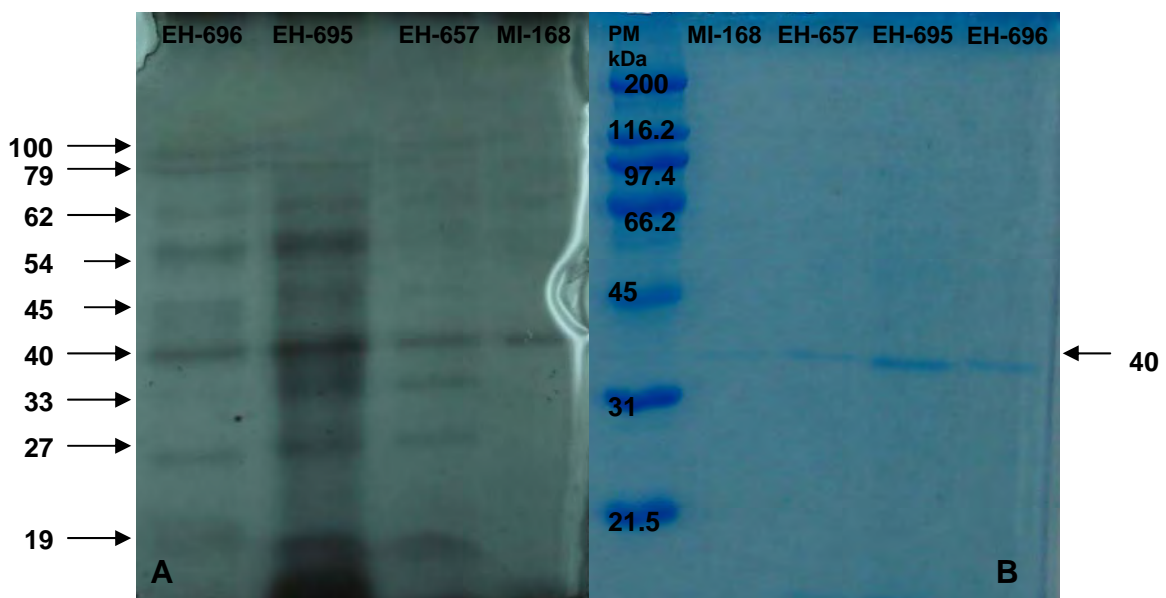


Fig.6. SDS-PAGE de los antígenos estudiados y el antígeno MI-168 de referencia. A) Tinción con plata. B) Tinción con azul de Coomasie. PM = marcadores de peso molecular



## Comparación de los métodos de cuantificación de proteínas

Debido a que la fracción peptídica de la molécula antigénica es la relevante en la prueba de intradermoreacción (Cole *et al.*, 1985; Druger, *et al.*, 1991; Papagiannis *et al.*, 1961; Toriello *et al.*, 1991; Tzianabos, 2000), antes de llevar a cabo la determinación de proteínas en los antígenos obtenidos, se hizo una comparación entre los métodos de estimación de proteínas para seleccionar el mejor para nuestras moléculas. Se ensayaron la linealidad y repetibilidad de estos métodos como se describió en la metodología.

Como se observa en la Tabla 3 y Figura 7, todos los métodos probados (Bradford, Lowry y Lowry modificado) para determinar proteínas en los antígenos fueron lineales en el propio rango de concentración, y cumplieron con los criterios de aceptación para su linealidad como son los coeficientes de correlación ( $R^2 \geq 0.98$ ) y el coeficiente de determinación ( $R \geq 0.99$ ). Sin embargo, sólo el método de Lowry modificado cumplió con los criterios establecidos para el error relativo debido a la regresión ( $ERR \leq 3\%$ ) y al coeficiente de variación del factor de respuesta ( $CVf \leq 5\%$ ). El coeficiente del factor de respuesta para evaluar la repetibilidad del método fue menor en el método de Lowry modificado.

Tabla 3. Resultados de la linealidad y repetibilidad de los métodos de determinación de proteínas.

Parámetro	Procedimiento estadístico	Resultados			Criterios de aceptación
		Bradford	Lowry	Lowry modificado	
Linealidad del método	Coeficiente de correlación ( $R^2$ )	$R^2 = 0.9904$	$R^2 = 0.9964$	$R^2 = 0.9979$	$R^2 \geq 0.99$
	Coeficiente de determinación (R)	$R = 0.9951$	$R = 0.9982$	$R = 0.9989$	$R \geq 0.98$
	Error relativo debido a la regresión (ERR)	ERR = 6.15 %	ERR = 3.9%	ERR = 2.9%	ERR $\leq$ 3%
	Coeficiente de variación del factor de respuesta (CVf)	CVf = 5.9%	CVf = 17.3%	CVf = 4.4%	CVf $\leq$ 5%
	Índice de confianza de la ordenada $\alpha = 0.05$	IC = (-0.05,0.11)	IC = (0.012, 0.064)	IC = (-0.028, 0.176)	IC incluye el 0 pasa por el origen
Repetibilidad del método	Coeficiente de variación en dos días diferentes	CV= 5.6 %	CV= 15.8 %	CV= 7.5 %	

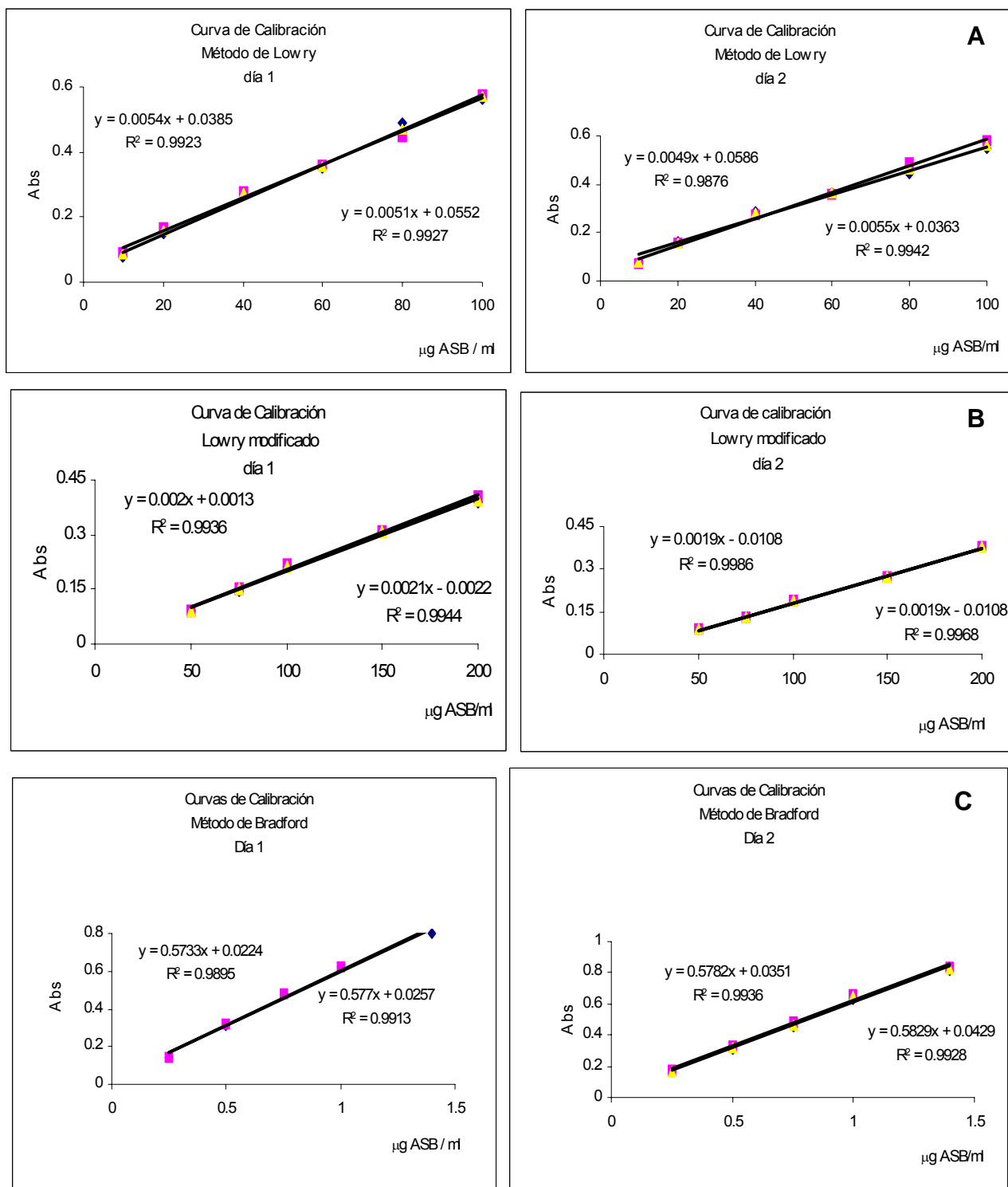


Fig. 7. Curvas de calibración de los métodos de Lowry (A), Lowry modificado (B) y Bradford (C) en dos días diferentes: 1 y 2.



En la Figura 8 se aprecia que con el método de Bradford se determina una cantidad significativamente ( $P < 0.01$ ) menor de proteínas en los antígenos, que con el método de Lowry y el de Lowry modificado.

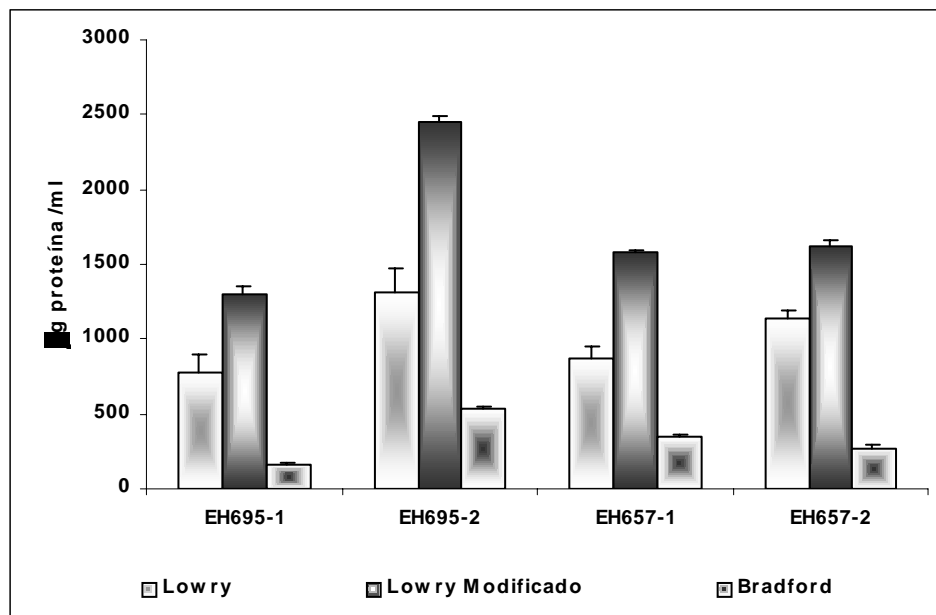


Fig. 8. Comparación de los tres métodos de determinación de proteínas en antígenos provenientes de dos cepas (EH-695 y EH-657) de *Coccidioides* spp. por duplicado.

Con base en los resultados de linealidad, repetibilidad y a la mayor cantidad estimada de proteína en las coccidioidinas se seleccionó el método de Lowry modificado para cuantificar la proteína en los antígenos estudiados en este trabajo.

### **Estimación de proteínas y carbohidratos en los antígenos obtenidos**

La determinación de proteínas y carbohidratos en los cinco lotes de antígeno de las tres cepas (Figura 9) muestran una gran variabilidad en cuanto a la concentración de proteínas y carbohidratos independientemente de las mismas condiciones de cultivo utilizadas (inóculo, periodo y temperatura de incubación, volumen del medio, etc.)

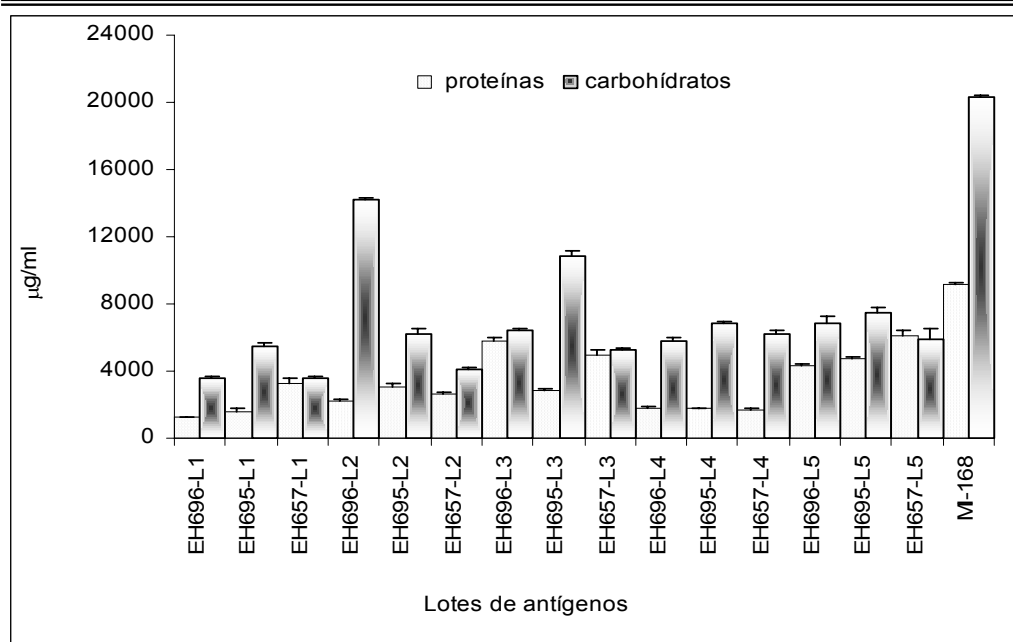


Fig. 9. Concentración de proteínas y carbohidratos en los cinco lotes de los antígenos de las cepas EH-657, EH-696, EH-695 y MI-168.(Promedio de las repeticiones de cada determinación)

La Tabla 4 presenta los resultados de las determinaciones de proteínas y carbohidratos en todos los lotes de los antígenos.

Tabla 4. Cantidad estimada de proteínas (método de Lowry modificado) y de carbohidratos (método de Dubois) en los lotes de todos los antígenos producidos.

Antígeno /Lote	Carbohidratos µg/ ml	Proteínas µg/ ml	Proporción entre carbohidratos y proteínas en los antígenos
EH-696-L1	3605	1216	3:1
EH-695-L1	5481	1626	3:1
EH-657-L1	3533	3253	1:1
*EH-696-L2	14237	2361	6:1
*EH-695-L2	6182	3093	2:1
*EH-657-L2	4120	2676	1:1
EH-696-L3	6375	5828	1:1
EH-695-L3	10841	2817	4:1
EH-657-L3	5277	4992	1:1
EH-696-L4	5832	1784	3:1
EH-695-L4	6830	1744	4:1
EH-657-L4	6209	1680	4.1
EH-696-L5	6846	4264	2:1
EH-695-L5	7482	4714	2:1
EH-657-L5	5848	6089	1:1
*MI-168	20314	8810	2:1

\* Antígenos probados en la prueba de actividad biológica.



---

## Prueba de actividad biológica y de identidad de la coccidiodina

### Selección de cobayos sensibilizados

Se utilizó un total de 60 cobayos y se sensibilizaron con el antígeno MI-168 concentrado (Figura 10). El resultado de la sensibilización) mostró que 27 cobayos (45%) presentaron una reacción de 10 a 15 mm de induración y se clasifican dentro del grupo 1 de cobayos reactivos, 24 cobayos (40 %) presentaron una reacción mayor a 15 mm de induración (se clasificaron en el grupo 2) y 9 cobayos (15 %) que presentaron una reacción menor a 10 mm de induración (pertenecen al grupo 3 de cobayos, que se desecharon) (Figura 11).



Fig. 10. Resultado de la intradermoreacción a las 24 h con coccidiodina MI-168 en cobayo sensibilizado con el antígeno concentrado.

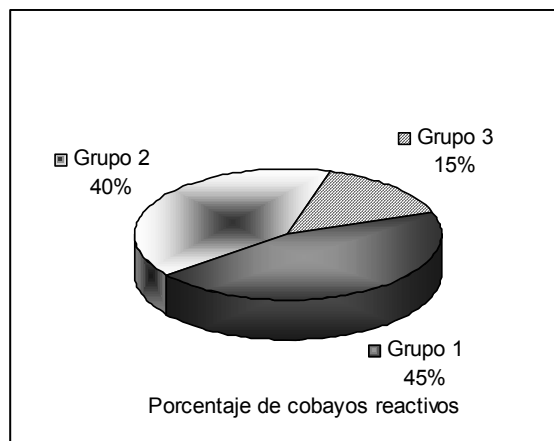


Fig. 11. Porcentaje de cobayos reactivos en la IDR con coccidiodina MI-168 para la prueba de selección de animales reactivos.





## Resultados de las reacciones de intradermoreacción para la prueba de actividad biológica.

En la Figura 12 se muestran las reacciones de intradermoreacción de la prueba de actividad biológica para comparar los antígenos MI-168 (referencia) y el antígeno EH-695, en un cobayo del grupo 2.

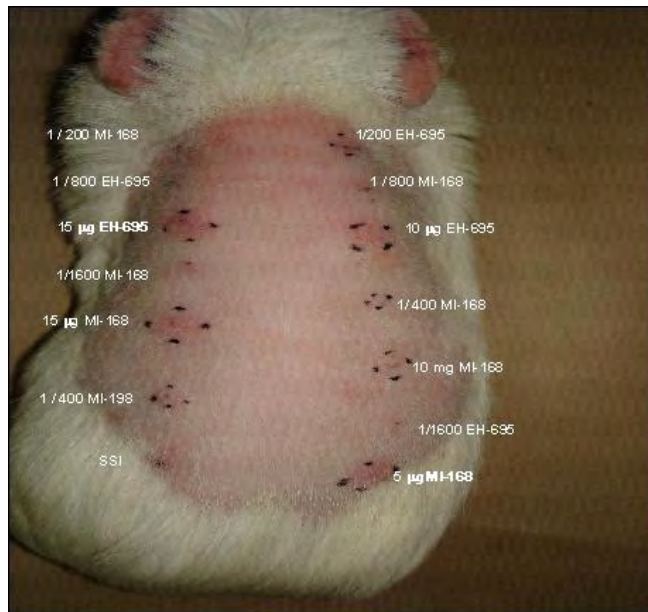


Fig.12. Prueba de actividad biológica de los antígenos de referencia MI-168 y de prueba EH-695 en un cobayo del grupo 2, serie de diluciones 2.

### Curvas dosis respuesta gradual de los experimentos

Para evaluar la potencia de las coccidioidinas y describir el efecto de las dosis aplicadas a los cobayos, tanto en series de diluciones de los antígenos como se especifica en la Farmacopea Mexicana y las dosis en µg de proteína como se propone como método de estandarización de los antígenos, se presentan las curvas log dosis-respuesta de todos los experimentos realizados para determinar la potencia de las coccidioidinas.



## Resultados de los estudios de la actividad biológica de los antígenos MI-168 (prueba) y Comercial (referencia)

En la Figura 13 se muestran las curvas logaritmo dosis-respuesta con los promedios de induración del experimento realizado. Los coeficientes de correlación ( $R^2$ ) de las curvas son mayores a 0.98 lo que indica que la respuesta es directamente proporcional a la dosis en ambos grupos de cobayos reactivos, en el grupo 1 (menos reactivos) y en el grupo 2 (más reactivos), pero los valores de las pendientes de las curvas log dosis-respuesta son diferentes en las dosis correspondiente a la serie de diluciones 2 (gráfico B). Sin embargo, en la dosis correspondiente a la serie de diluciones 1, el valor de las pendientes del antígeno comercial y del antígeno MI-168 son muy parecidos. El valor de las pendientes determina si las curvas log dosis-respuesta son paralelas entre sí.

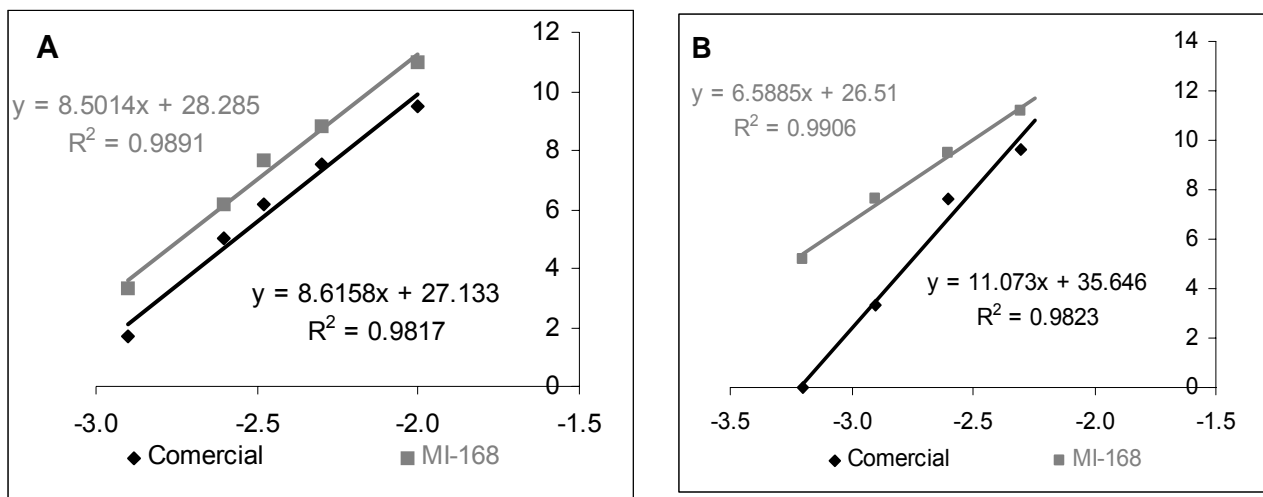


Fig. 13. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia (comercial) y el antígeno de prueba (MI-168). A) Dosis serie de diluciones 1 (grupo de cobayos 1, menos reactivo); B) Dosis serie de diluciones 2 (grupo de cobayos 2, más reactivo).

Todos los promedios de induración en la prueba de IDR del antígeno MI-168 son mayores significativamente ( $t$  de Student,  $P < 0.05$ ) que la induración del antígeno comercial en todas las diluciones de los cobayos del grupo 1, mientras que sólo las diluciones 1/400 y 1/1600 del antígeno MI-168 son significativamente mayores ( $t$  de Student,  $P < 0.05$ ) que el antígeno comercial en los cobayos del grupo 2 (Tabla 5).



Tabla 5. Comparación entre los promedios de induración de la IDR del antígeno comercial y el antígeno MI-168 por cada dilución

Antígenos comparados	Dosis aplicadas	Prueba de <i>t</i> de Student <sup>1</sup>	Prueba de Fisher para comparar varianzas <sup>2</sup>
Serie de diluciones 1 aplicadas a los cobayos menos reactivos del grupo 1			
Comercial (referencia)	1/100	t = 3.63 P = 0.02*	F = 39. P = 0.05
	1/200	t = 3.57 P = 0.02*	F = 4.0 P = 0.4
	1/300	t = 2.98 P = 0.04*	F = 6.3 P = 0.27
	1/400	t = 3.25 P = 0.03*	F = 4.3 P = 0.37
	1/800	t = 2.08 P = 0.01*	F = 3.0 P = 0.5
Serie de diluciones 2 aplicadas a los cobayos más reactivos del grupo 2			
MI-168 (prueba)	1/200	t = 2.50 P = 0.06	F = 2.33 P = 0.6
	1/400	t = 2.90 P = 0.04*	F = 1.47 P = 0.80
	1/800	t = 2.70 P = 0.05	F = 0.11 P = 0.19
	1/1600	t = 10.2 P = 0.00*	F = 0.00 P = 0.00*

<sup>1</sup>Prueba *t* de Student  $P < 0.05$  existe diferencia significativa entre los promedios de induración de cada dilución <sup>2</sup>La prueba *t* de Student se calculó de acuerdo a la homogeneidad de las varianzas. Si la *P* de la prueba de Fisher es  $\geq 0.05$  las varianzas son iguales.

La Tabla 6 muestra los resultados del análisis de varianza para determinar la validez del ensayo a tres dosis, las dosis fueron las diluciones 1/200, 1/400 y 1/800 aplicadas en los dos grupos de cobayos reactivos. Este ensayo no cumplió con el criterio de decisión en el cual las curvas logaritmo dosis-respuesta del antígeno MI-168 (prueba) y del comercial (referencia) deben de ser paralelas entre ellas. Cuando el ensayo a tres dosis del modelo de líneas paralelas no es válido, como se observó en el análisis de varianza para los antígenos comercial y MI-168 (Tabla 6), la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 30/ NF 25 2007) sugiere estimar la potencia del antígeno probado a fin de ajustar la dosis con la potencia del antígeno de referencia, de acuerdo a la concentración del marbete. De acuerdo al resultado de esta estimación el antígeno MI-168 en relación con el antígeno comercial tiene una potencia entre 111.7%-119.4% ( $\alpha = 0.05$ ), lo que concuerda con la especificación de la Farmacopea mexicana (FEUM, 2004) para la coccidioidina que es entre 80 y 125 por ciento de lo que indica el marbete y con un intervalo de confianza (IC = 0.95) entre 64 y 156 por ciento.



Tabla 6. Análisis de varianza para determinar la validez del ensayo a tres dosis para evaluar la potencia del antígeno MI-168 y comercial utilizando el modelo de líneas paralelas.

Factor Variación	Análisis de varianza					Criterio de Decisión
	GL	Suma Cuadrados	CM	F cal	F tab	
Preparaciones	1	65.34	91.84			
Regresión	1	4043.0	3812.8	1831.95	4.23	F cal ≥ Ftab El Log de la dosis tiene efecto lineal sobre la Respuesta
No-paralelismo	1	98.01	137.76	44.410	4.23	F cal <F tab Las rectas log dosis respuesta son paralelas
Regresión cuadrática	1	0.087	0.170	0.039	4.23	F cal <F tab El log de la dosis no tiene efecto cuadrático sobre la respuesta
Diferencia regresión cuadrática	1	0.087	0.587	0.039	4.23	F cal <F tab Las curvas dosis respuestas son semejantes
Error	25	0.82	2.21			

GL = grados de libertad, CM = Cuadrado medio, Fcal = F calculada, F tab = F tablas

### Resultados de los estudios de la actividad biológica de los antígenos EH-695 (prueba) y Comercial (referencia)

La Figura 14B muestra que la curva logaritmo dosis-respuesta que corresponde a las diluciones del antígeno comercial aplicadas a los cobayos del grupo 2 (más reactivos) tiene un coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) mayor a 0.98, y la curva logaritmo dosis-respuesta de este antígeno pero aplicado al grupo 1 de cobayos (menos reactivos) presenta un coeficiente de correlación lineal cercano a 0.98 (Figura 14 A). Sin embargo, la curva log dosis-respuesta del antígeno de prueba (EH-695) correspondiente a la serie de diluciones 1 aplicadas a los cobayos del grupo 1 no tiene un coeficiente de correlación de 0.98 (Figura 14 A) y la curva logaritmo dosis-respuesta correspondiente a la serie de diluciones 2 aplicadas al grupo de cobayos 2 (más reactivos) presenta un coeficiente cercano a 0.98 (Figura 14 B) lo que indica que la respuesta solo es directamente proporcional a la dosis en las curvas logaritmo dosis respuesta con coeficientes de correlación lineal iguales o muy cercanos a 0.98. Las pendientes de las curvas log dosis-respuesta calculadas por el ajuste por el método de mínimos cuadrados de los antígenos de referencia y de prueba aplicadas a los cobayos más reactivos (grupo 2) son diferentes (Figura 14 A), es decir las curvas no son paralelas entre ellas. Sin embargo, las pendientes de las curvas dosis-respuesta de los



antígenos de referencia y de prueba pero aplicados a los cobayos del grupo 1 (menos reactivos) son muy parecidas (Figura 14 B).

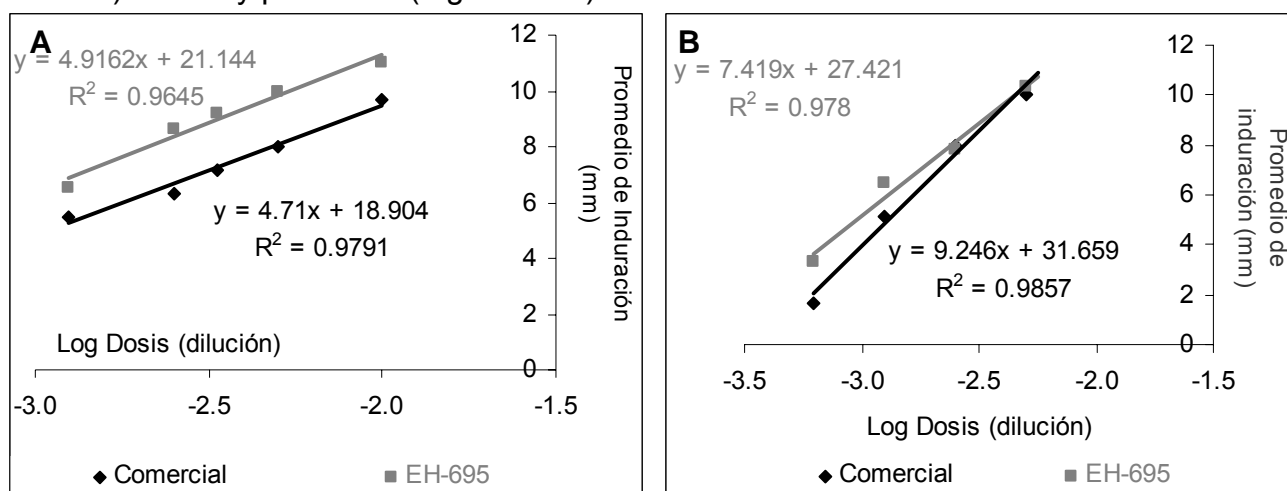


Fig. 14. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia del antígeno de referencia (comercial) y el antígeno de prueba (EH-695). A) Dosis serie de diluciones 1 (cobayos menos reactivos); B) Dosis serie de diluciones 2 (cobayos más reactivos).

La prueba *t* de Student (Tabla 7) mostró que los promedios de induración del antígeno de prueba EH-695 de las diluciones 1/200, 1/300 y 1/400 aplicadas a los cobayos del grupo 1 (menos reactivos) y solamente la dilución 1/800 de este mismo antígeno pero aplicada a los cobayos del grupo 2 (más reactivos) son mayores significativamente (*t* de Student,  $P < 0.05$ ) que los promedios del antígeno comercial.

Tabla 7. Comparación entre los promedios de induración de la IDR del antígeno comercial y EH-695 para cada dilución

Antígenos comparados	Dosis aplicadas	Prueba de <i>t</i> de Student <sup>1</sup>	Prueba de Fisher para comparar varianzas <sup>2</sup>
Serie de diluciones 1 aplicadas a los cobayos menos reactivos del grupo 1			
Comercial (referencia) y	1/100	$t = 2.21$ $P = 0.09$	$F = 12$ $P = 0.15$
	1/200	$t = 3.45$ $P = 0.02^*$	$F = 12$ $P = 0.15$
	1/300	$t = 3.21$ $P = 0.03^*$	$F = 13$ $P = 0.14$
	1/400	$t = 4.95$ $P = 0.01^*$	$F = 1.0$ $P = 1.0$
	1/800	$t = 1.09$ $P = 0.33$	$F = 2.33$ $P = 0.6$
Serie de diluciones 2 aplicadas a los cobayos más reactivos del grupo 2			
MI-168 (prueba)	1/200	$t = 0.5$ $P = 0.64$	$F = 0.33$ $P = 0.5$
	1/400	$t = -0.5$ $P = 0.64$	$F = 0.33$ $P = 0.5$
	1/800	$t = 4.0$ $P = 0.01^*$	$F = 3.0$ $P = 0.05$
	1/1600	$t = 0.7$ $P = 0.52$	$F = 1.0$ $P = 1.0$

<sup>1</sup> Prueba T de Student  $P < 0.05$  existe diferencia significativa entre los promedios de induración de cada dilución <sup>2</sup> La prueba T de Student se calculó de acuerdo a la homogeneidad de las varianzas. Si la P de la prueba de Fisher es  $\geq 0.05$  las varianzas son iguales (homogéneas).



El análisis de varianza para determinar si era válido el ensayo a tres dosis en el modelo de líneas paralelas no cumplió con el criterio de paralelismo entre las rectas logaritmo dosis-respuesta del antígeno de prueba EH-695 y del antígeno de referencia comercial (Tabla 8). Sin embargo, la estimación de la potencia del antígeno EH-695 en relación con el antígeno comercial (referencia) mostró que el antígeno EH-695 presenta una potencia mayor que el antígeno de referencia y esta potencia se encuentra dentro de la especificación de la Farmacopea (FEUM, 2004). La estimación de la potencia del antígeno EH-695 en relación con el comercial fue de 103.9 -111.8%.

Tabla 8. Análisis de varianza para determinar la validez del ensayo a tres dosis para evaluar la potencia del antígeno MI-168 y comercial utilizando el modelo de líneas paralelas.

Factor Variación	Análisis de varianza					Criterio de Decisión	
	GL	Suma Cuadrados	Cm	F cal	F tab.		
Preparaciones	1	16.67	55.01				
Regresión	1	3185.5	3301.8	2011.55	4.23	$F_{cal} \geq F_{tab.}$	Regresión
No-paralelismo	1	25.01	82.51	15.793	4.23	$F_{cal} \leq F_{tab}$	No-paralelismo
Regresión cuadrática	1	0.889	0.170	0.561	4.23	$F_{cal} < F_{tab}$	Regresión cuadrática
Diferencia regresión cuadrática	1	0.222	0.087	0.140	4.23	$F_{cal} < F_{tab}$	Diferencia regresión cuadrática
Error	25	0.78	1.583				

GL = grados de libertad, Cm = Cuadrado medio, F cal = F calculada, F tab. = F tablas.

### Pruebas para comparar la potencia de los antígenos estandarizados en diluciones y en $\mu\text{g}$ de proteína

Como se explicó en material y métodos (Págs. 17 y 18) no se calculó la potencia por el método descrito en la Farmacopea, ya que se realizó una modificación de los experimentos en los cuales se probaron los antígenos EH-695, EH-696 y EH-657 para compararlos con el antígeno de referencia MI-168. Esta modificación experimental se diseñó para evaluar las dosis de los antígenos en  $\mu\text{g}$  de proteína en vez de las dosis en diluciones. Por este motivo, la actividad biológica se evaluó comparando el promedio de induración del antígeno de prueba con el promedio de induración del antígeno de referencia para cada una de las dosis aplicadas con la prueba de  $t$  de Student. Además



se compararon cada uno de los promedios de induración de los antígenos EH-657, EH-695, EH-696 y MI-168 con un análisis de varianza por cada una de las diluciones aplicadas y por cada dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína en cada uno de los grupos de cobayos reactivos.

### 1. Resultados de los estudios de la actividad biológica del antígeno de referencia MI-168 y de prueba EH-695

La respuesta en los cobayos del grupo 1 (Figura 15) y del grupo 2 (Figura 16), muestran que las curvas logaritmo dosis-respuesta de los promedios de induración de las dosis administradas en diluciones y en  $\mu\text{g}$  de proteína poseen coeficientes de correlación ( $R^2$ ) mayores a 0.98, por lo que la respuesta es directamente proporcional a la dosis.

Cuando las dosis de los antígenos de prueba y de referencia aplicadas en los dos grupos de cobayos reactivos fueron en diluciones, los valores de las pendientes de las curvas log dosis-respuesta son diferentes (Figura 15 A y 16 A). Sin embargo, los valores de las pendientes de la curvas log dosis-respuesta son muy parecidos cuando se utilizó las dosis en  $\mu\text{g}$  de proteínas en los dos grupos de cobayos reactivos (Figura 15 B y 16 B).

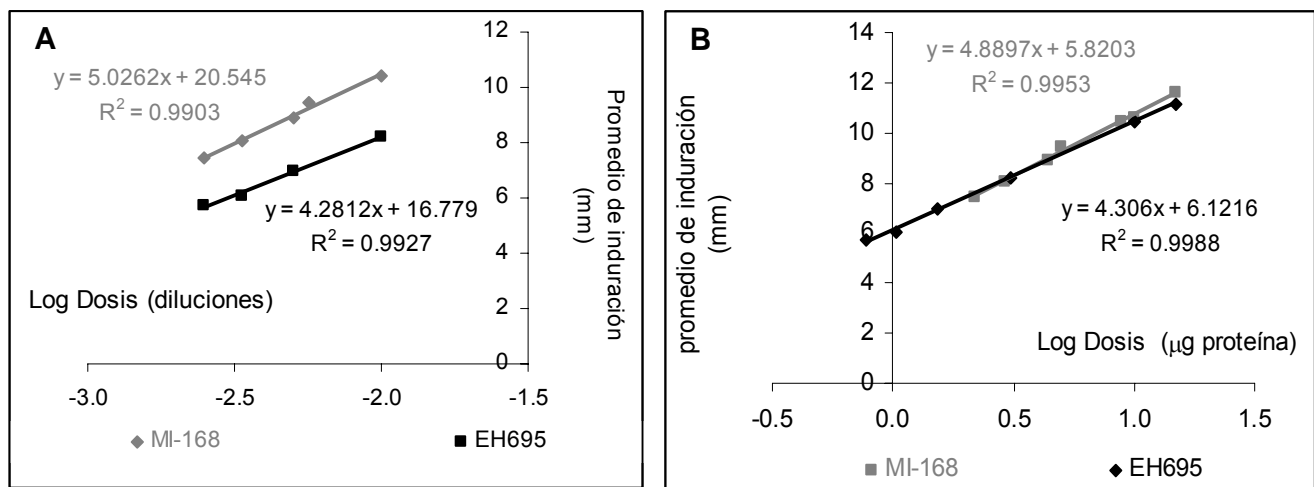


Fig. 15. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia MI-168 y el de prueba EH-695. A) Dosis serie de diluciones 1 aplicadas a cobayos del grupo 1 (menos reactivos); B) Dosis  $\mu\text{g}$  proteína aplicadas a cobayos del grupo 1.

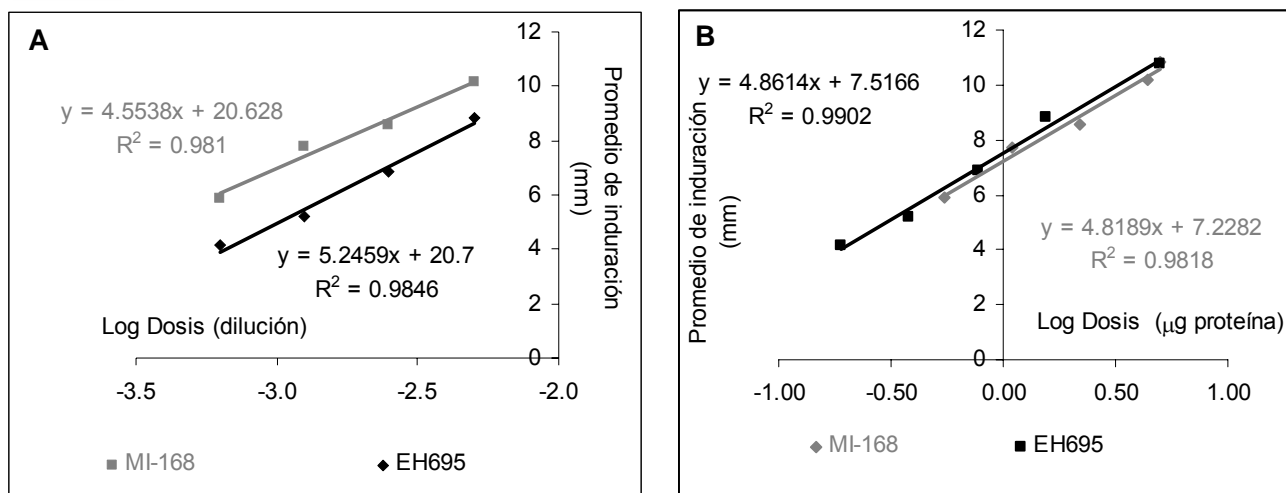


Fig. 16. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia del antígeno de referencia MI-168 y el antígeno de prueba EH-695. A) Dosis serie de diluciones 2 aplicadas a cobayos del grupo 2 (más reactivos); B) Dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína aplicadas a cobayos del grupo 2.

Los resultados de la prueba *t* de Student (Tabla 9) muestran que todas las diluciones de los promedios de induración del antígeno MI-168 (referencia) correspondientes al grupo de cobayos 1 y todas las diluciones con excepción de la dilución 1/1600 aplicadas al grupo de cobayos 2 son significativamente mayores a los promedios de induración del antígeno EH-695 (prueba). Sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de induración cuando la dosis fue aplicada en  $\mu\text{g}$  de proteína (5, 10 y 15  $\mu\text{g}$ ) en ninguno de los dos grupos de cobayos.





Tabla 9. Comparación entre los promedios de induración de la IDR del antígeno MI-168 y EH-695 para cada serie de diluciones, para la dosis en  $\mu\text{g}$  de proteínas, y en cada grupo de animales (menos y más reactivos)

Antígenos comparados	Dosis aplicadas	Prueba de T de Student <sup>1</sup>	Prueba de Fisher para comparar varianzas <sup>2</sup>
Serie de diluciones 1 (cobayos menos reactivos)			
MI-168 referencia	1/100	t = -10.2 P = 0.00*	F = 0.79 P = 0.70
	1/200	t = -5.7 P = 0.00*	F = 0.69 P = 0.54
	1/300	t = -4.9 P = 0.00*	F = 1.49 P = 0.45
	1/400	t = -5.9 P = 0.00*	F = 0.50 P = 0.20
	10 $\mu\text{g}$	t = -0.36 P = 0.72	F = 3.17 P = 0.07
	15 $\mu\text{g}$	t = -0.55 P = 0.58	F = 6.2 P = 0.00*
Serie de diluciones 2 aplicadas a los cobayos más reactivos del grupo 2			
EH-695 Prueba	1/200	t = -3.8 P = 0.01*	F = 1.57 P = 0.46
	1/400	t = -2.9 P = 0.01*	F = 0.85 P = 0.79
	1/800	t = -3.2 P = 0.00*	F = 9.38 P = 0.00*
	1/1600	t = -1.3 P = 0.19	F = 1.04 P = 0.94
	5 $\mu\text{g}$	t = -0.2 P = 0.80	F = 1.23 P = 0.73

<sup>1</sup> Prueba *t* de Student  $P < 0.05$  existe diferencia significativa entre los promedios de induración de cada dilución <sup>2</sup> La prueba *t* de Student se calculó de acuerdo a la homogeneidad de las varianzas. Si la *P* de la prueba de Fisher es  $\geq 0.05$  las varianzas son iguales.

## 2. Resultados de los estudios de la actividad biológica de los antígenos de referencia MI-168 y de prueba EH-657

La comparación entre el antígeno de prueba EH-657 y el antígeno de referencia MI-168 en los grupos de cobayos de menor reactividad (grupo 1, Figura 17 A y B) y mayor reactividad (grupo 2, Figura 18 A y B) muestran que todas las curvas logaritmo dosis-respuesta tienen coeficientes de correlación ( $R^2$ ) mayores a 0.98, i. e. la respuesta es directamente proporcional a las dosis. El valor de las pendientes de las curvas logaritmo dosis-respuesta al utilizar la dosis de los antígenos en diluciones en el grupo de cobayos 1 son muy parecidos (Figura 17 A), sin embargo el valor de las pendientes cuando las dosis en diluciones fueron aplicadas al grupo 2 de cobayos son diferentes (Figura 18 A), es decir no son paralelas. Cuando las dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína se administró al grupo de cobayos 1 (Figura 17 B) el valor de las pendientes son diferentes, pero cuando las dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína fueron aplicadas a los cobayos del grupo 2, el valor de las pendientes (Figura 18 B) es muy parecido.

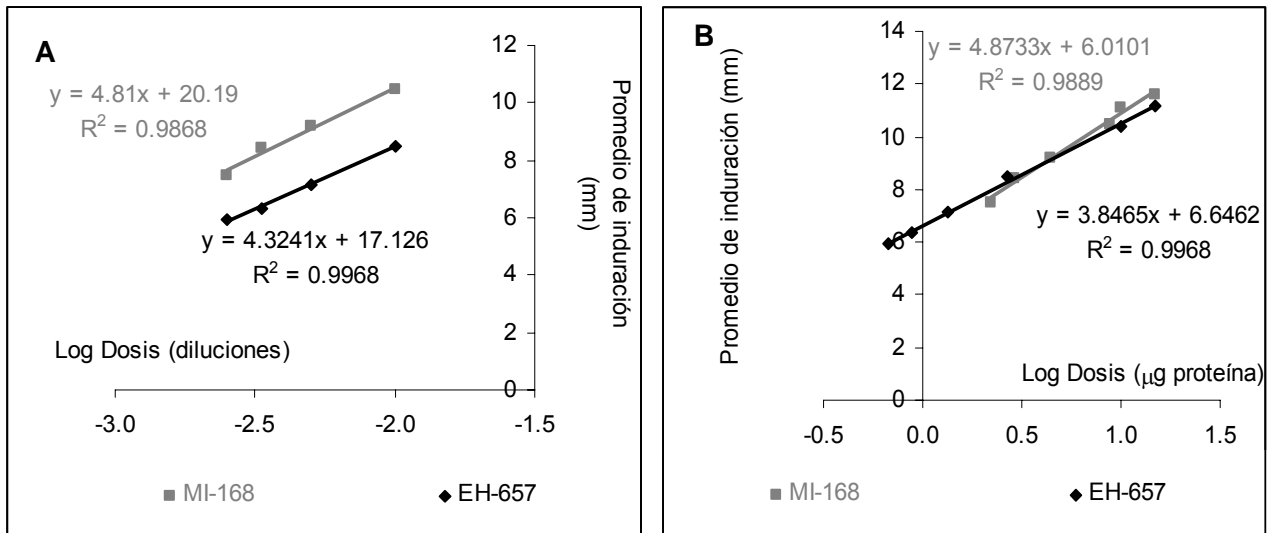


Fig. 17. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia (MI-168) con el de prueba (EH-657). A) Dosis aplicadas serie de diluciones 1 en cobayos del grupo 1 (menos reactivos); B) Dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína aplicadas a cobayos del grupo 1.

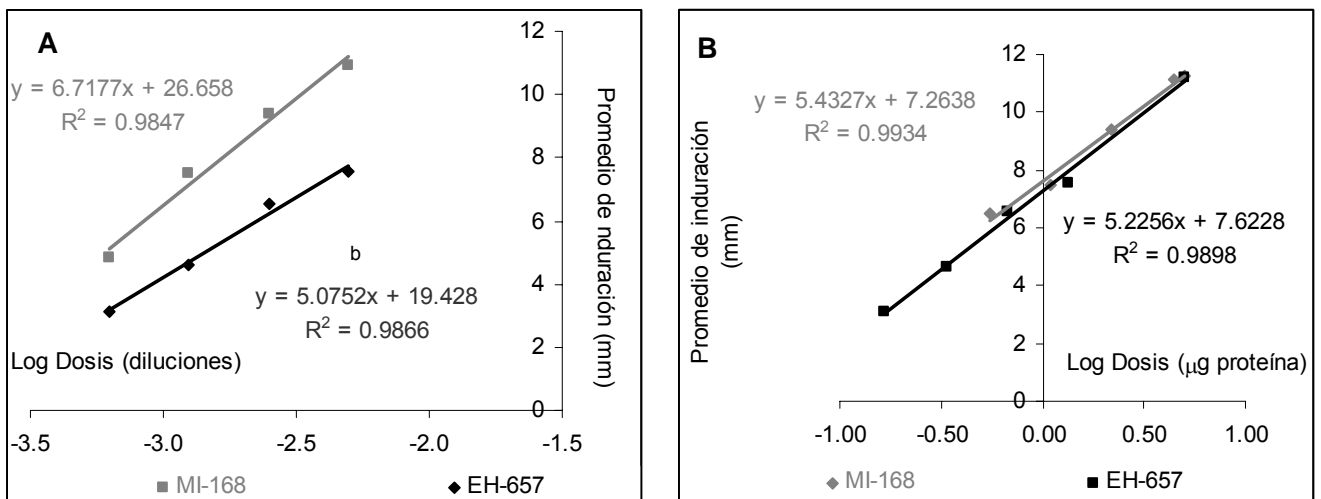


Fig. 18. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia (MI-168) con el de prueba (EH-657). A) Dosis aplicadas serie de diluciones 2 en cobayos del grupo 2 (más reactivos); B) Dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína aplicadas a cobayos del grupo 2.

Las pruebas *t* de Student (Tabla 10) muestran que los promedios de induración del antígeno MI-168 (referencia) son mayores significativamente cuando la dosis aplicada a ambos grupos de cobayos fue en diluciones, con excepción de la dilución 1/300 aplicada en los cobayos del grupo 1) y de la dilución 1/1600 aplicada en el grupo de cobayos 2 que no presentaron diferencias significativas entre los promedios de induración. No se presentó diferencia significativa entre los promedios de induración



cuando la dosis aplicada fue en  $\mu\text{g}$  de proteína en ninguno de los dos grupos de cobayos reactivos.

Tabla 10. Comparación entre los promedios de induración de la IDR del antígeno MI-168 y EH-657 para cada serie de diluciones, para la dosis en  $\mu\text{g}$  de proteínas, y en cada grupo de animales (menos y más reactivos).

Antígenos comparados	Dosis aplicadas	Prueba de T de Student <sup>1</sup>	Prueba de Fisher para comparar varianzas <sup>2</sup>
Serie de diluciones 1 aplicadas a los cobayos menos reactivos del grupo 1			
MI-168 (referencia)	1/100	t = -3.84 P = 0.00*	F = 1.78 P = 0.43
	1/200	t = -4.71 P = 0.00*	F = 1.36 P = 0.67
	1/300	t = -1.24 P = 0.23	F = 0.00 P = 0.0*
	1/400	t = -3.38 P = 0.00*	F = 0.69 P = 0.00*
	10 $\mu\text{g}$	t = -1.36 P = 0.19	F = 2.17 P = 0.29
	15 $\mu\text{g}$	t = -0.89 P = 0.38	F = 2.03 P = 0.33
Serie de diluciones 2 aplicadas a los cobayos más reactivos del grupo 2			
EH-657 (prueba)	1/200	t = -7.09 P = 0.00*	F = 1.44 P = 0.61
	1/400	t = -4.66 P = 0.00*	F = 0.44 P = 0.27
	1/800	t = -3.03 P = 0.01*	F = 7.12 P = 0.01*
	1/1600	t = -1.25 P = 0.23	F = 1.07 P = 0.92
	5 $\mu\text{g}$	t = -0.13 P = 0.89	F = 0.28 P = 0.09

<sup>1</sup> Prueba T de Student P < 0.05 existe diferencia significativa entre los promedios de induración de cada dilución <sup>2</sup> La prueba T de Student se calculó de acuerdo a la homogeneidad de las varianzas. Si la P de la prueba de Fisher es  $\geq$  0.05 las varianzas son iguales.

### 3. Resultados de los estudios de la actividad biológica de los antígenos de referencia MI-168 y de prueba EH-696.

En la comparación de las curvas log dosis-respuesta de los antígenos de prueba EH-696 con el de referencia MI-168 (Figuras 19 y 20) se muestra que todas las curvas logaritmo dosis-respuesta presentan coeficientes de correlación ( $R^2$ ) mayores o muy cercanos a 0.98 lo que muestra que la respuesta es directamente proporcional a la dosis. Los valores de las pendientes de las curvas log dosis-respuesta cuando la dosis aplicada fue en  $\mu\text{g}$  de proteína son muy parecidos en ambos grupos de cobayos reactivos (Figuras 19 B y 20 B). El valor de las pendientes cuando la dosis es aplicada en diluciones en el grupo de cobayos 2 (Figura 20 A), es muy parecida, y los valores de las pendientes son diferentes cuando se aplicó la dosis en diluciones en los cobayos del grupo uno (Figura 19 A).

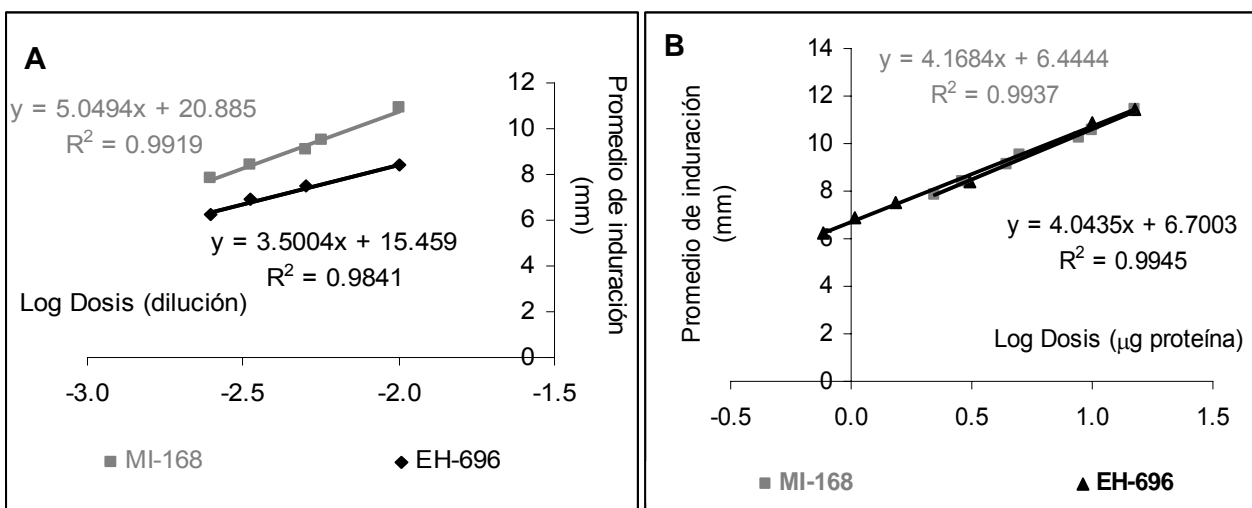


Fig.19. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia (MI-168) y el de prueba (EH-696). A) Dosis aplicadas serie de diluciones 1 en cobayos del grupo 1 (menos reactivos); B) Dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína aplicadas a cobayos del grupo 1.

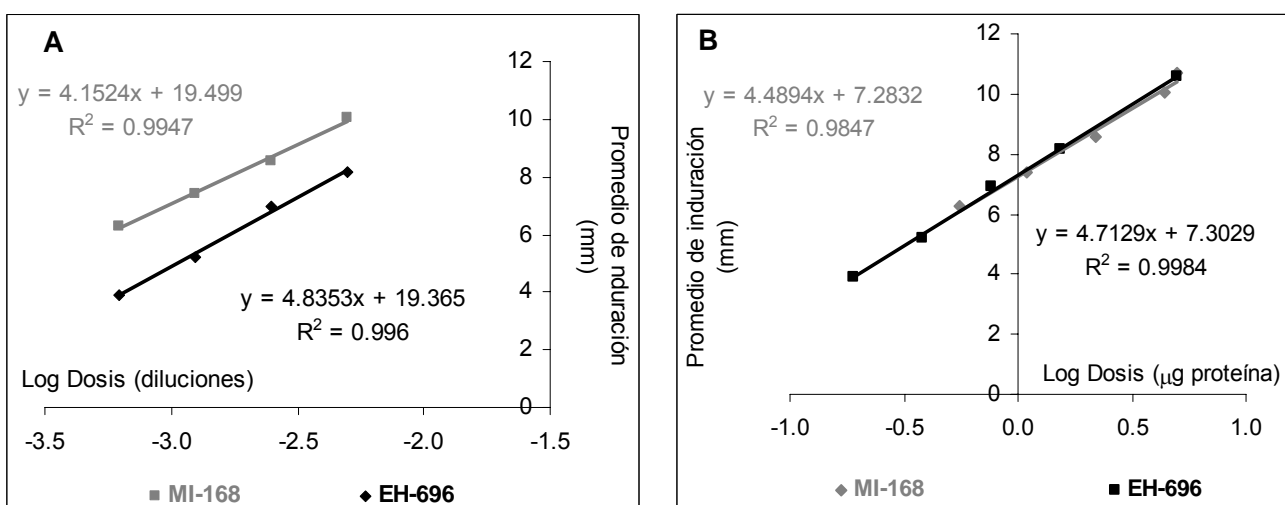


Fig. 20. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia (MI-168) y el de prueba (EH-696). A) Dosis aplicadas serie de diluciones 2 en cobayos del grupo 2 (más reactivos). B) Dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína aplicadas a cobayos del grupo 2.

La prueba  $t$  de Student (Tabla 11) muestra que se presentan diferencias significativas entre todos los promedios de induración de los antígenos de referencia y de prueba cuando las dosis aplicadas a los grupos de cobayos reactivos 1 y 2 son en diluciones, sin embargo cuando la dosis administrada es en  $\mu\text{g}$  de proteína no se presentan diferencias significativas en ningún grupo de cobayos.



Tabla 11. Comparación entre los promedios de induración de la IDR del antígeno MI-168 y EH-696 para cada serie de diluciones, para la dosis en  $\mu\text{g}$  de proteínas, y en cada grupo de animales (menos y más reactivos).

Antígenos comparados	Dosis aplicadas	Prueba de T de Student <sup>1</sup>	Prueba de Fisher para comparar varianzas <sup>2</sup>
Serie de diluciones 1 aplicadas a los cobayos menos reactivos			
MI-168 referencia	1/100	t = -7.83 P = 0.00*	F = 0.91 P = 0.90
	1/200	t = -5.63 P = 0.00*	F = 0.34 P = 0.15
	1/300	t = -4.71 P = 0.00*	F = 0.48 P = 0.33
	1/400	t = -5.14 P = 0.00*	F = 1.35 P = 0.68
	10 $\mu\text{g}$	t = 0.87 P = 0.39	F = 3.77 P = 0.08
	15 $\mu\text{g}$	t = 0.0 P = 0.99	F = 3.15 P = 0.12
Serie de diluciones 2 aplicadas a los cobayos más reactivos			
EH-696 Prueba	1/200	t = -4.17 P = 0.00*	F = 0.59 P = 0.48
	1/400	t = -4.13 P = 0.00*	F = 0.76 P = 0.70
	1/800	t = -2.91 P = 0.01*	F = 4.8 P = 0.04*
	1/1600	t = -3.04 P = 0.01*	F = 7.0 P = 0.01*
	5 $\mu\text{g}$	t = -0.29 P = 0.77	F = 0.48 P = 0.32

<sup>1</sup> Prueba t de Student P < 0.05 existe diferencia significativa entre los promedios de induración de cada dilución <sup>2</sup> La prueba t de Student se calculó de acuerdo a la homogeneidad de las varianzas. Si la P de la prueba de Fisher es  $\geq$  0.05 las varianzas son iguales.

### Análisis de Varianza

Se realizó un análisis de varianza para comparar los promedios de induración de todas las coccidioidinas preparadas de cada una de las dosis aplicadas, en diluciones y en  $\mu\text{g}$  de proteína, en cada uno de los grupos de cobayos. En la Tabla 12 se observa que se presentan diferencias estadísticamente significativas (P < 0.05) entre los promedios de induración de cada una de las coccidioidinas de la serie de diluciones 1 aplicados a los cobayos del grupo 1 menos reactivos. La Figura 21 muestra que el antígeno MI-168 elaborado hace más de 10 años es el que presenta una potencia mayor respecto a los demás antígenos en todas las diluciones aplicadas a los cobayos del grupo 1 seguido por el antígeno EH-695 elaborado recientemente.



Tabla 12. Análisis de varianza de los promedios de induración de la IDR de todos los antígenos evaluados por la prueba de actividad biológica. Serie de diluciones 1 aplicada al grupo 1 de cobayos menos reactivos.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P	Dilución
Antígenos	69.77	4	17.44	5.99	0.000*	1/100
Residuos	195.05	67	2.91			
Total	264.82	71				
Antígenos	42.36	4	10.59	5.24	0.001*	1/200
Residuos	135.35	67	2.02			
Total	177.72	71				
Antígenos	55.09	4	13.77	13.8	0.000*	1/300
Residuos	66.84	67	0.99			
Total	121.94	71				
Antígenos	23.92	4	5.98	4.29	0.004*	1/400
Residuos	93.36	67	1.39			
Total	117.28	71				

GL = grados de libertad, F de Fisher, P = probabilidad, \*P < 0.05 existe diferencia estadística significativa entre los promedios de induración por cada dilución.

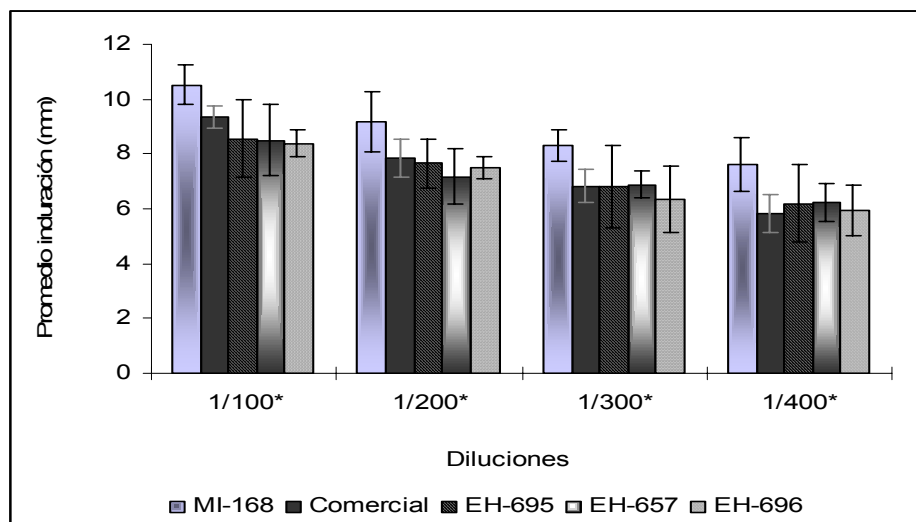


Fig. 21. Promedios de induración de todos los antígenos probados en los cobayos reactivos del grupo 1 (menos reactivos) a los cuales se les aplicó la serie de diluciones 1. \*Existe diferencia estadísticamente significativa entre cada antígeno en cada dilución probada.

La Tabla 13 muestra que existen diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre los promedios de induración de cada una de las coccidioidinas en la serie de diluciones 2 aplicados a los cobayos del grupo 2. En la Figura 22 se observó, que el antígeno MI-168 es el que presenta una potencia mayor a los demás antígenos en todas las diluciones aplicadas a los cobayos del grupo 2 seguido por el antígeno EH-695 elaborado recientemente.



Esto es, en cada grupo de cobayos cada dilución del antígeno, presenta variabilidad ( $P < 0.05$ ) entre las diferentes coccidioidinas (MI-168, EH-695, EH-657, EH-696 y comercial).

Tabla 13. Análisis de Varianza de los promedios de induración de la IDR de todos los antígenos evaluados por la prueba de actividad biológica. Serie de diluciones 2 aplicada al grupo 2 de cobayos más reactivos.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P	Dilución
Antígenos	104.6	4	26.15	18.7	0.000*	1/200
Residuos	93.677	67	1.398			
Total	198.27	71				
Antígenos	97.61	4	24.40	13.66	0.000*	1/400
Residuos	119.71	67	1.78			
Total	217.32	71				
Antígenos	165.262	4	41.31	10.93	0.000*	1/800
Residuos	253.24	67	3.78			
Total	418.5	71				
Antígenos	175.33	4	43.83	5.76	0.000*	1/1600
Residuos	509.89	67	7.61			
Total	685.22	71				

GL = grados de libertad, F de Fisher \* $P < 0.05$  existe diferencia estadística significativa entre los promedios de induración por cada dilución

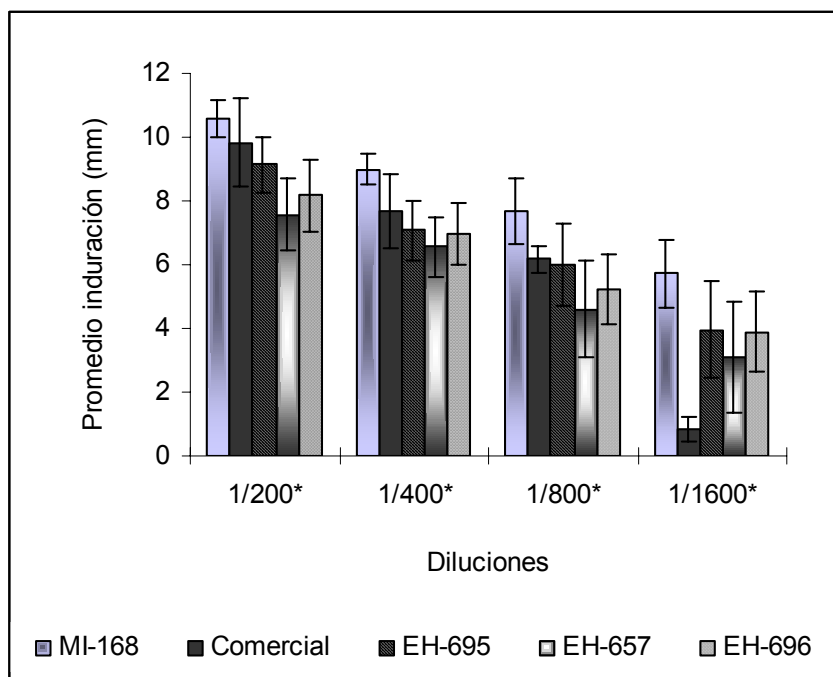


Fig. 22. Promedios de induración de cada uno de los antígenos probados en los cobayos reactivos del grupo 2 (más reactivos) a los cuales se les aplicó la serie de diluciones 2. \*Diferencia significativa entre los antígenos probados.

Sin embargo, cuando se probaron los antígenos de prueba, EH-657, EH-695, EH-696 y el antígeno MI-168 como referencia, pero las dosis aplicadas a los cobayos



del grupo 2 fueron en  $\mu\text{g}$  de proteína (0.89-1.33 y 5  $\mu\text{g}$ ) en vez de diluciones, el análisis de varianza (Tabla 14 y Figura 23) reveló que sólo se presentan diferencias significativas entre los promedios de induración en las dosis aproximadas a 1  $\mu\text{g}$  de proteína /0.1 ml.

Tabla 14. Análisis de Varianza de los promedios de induración de la IDR de todos los antígenos evaluados por la prueba de actividad biológica. Dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína aplicada al grupo 2 de cobayos más reactivos.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P	$\mu\text{g}$ proteína
Antígenos	15.79	3	5.26	3.54	0.020*	0.89-1.33
Residuos	83.35	56	1.48			
Total	99.14	59				
Antígenos	4.37	3	1.46	1.36	0.266	5
Residuos	60.30	56	1.07			
Total	64.68	59				

GL = grados de libertad, F de Fisher \*P< 0.05 existe diferencia estadística significativa entre los promedios de induración por cada dilución

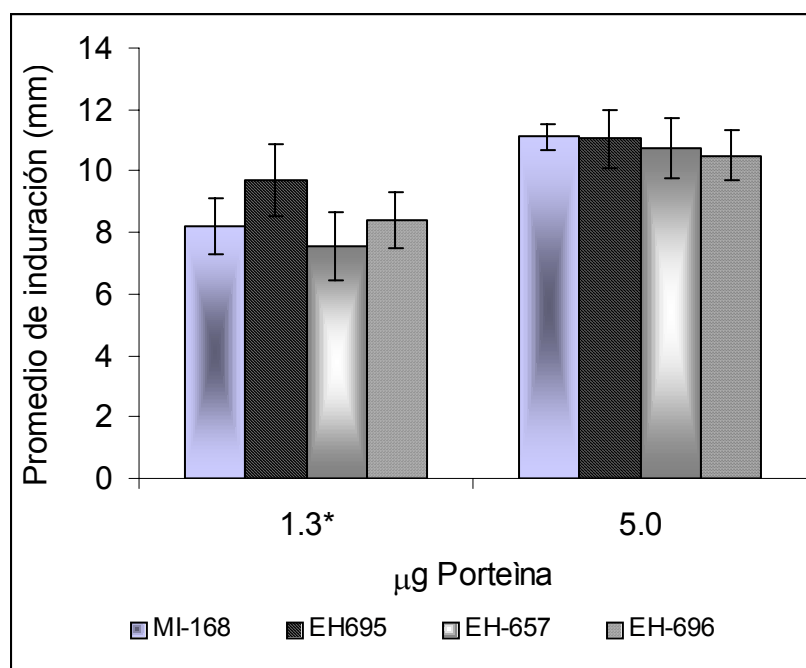


Fig. 23. Promedios de induración de todos los antígenos probados en los cobayos reactivos del grupo 2 (más reactivos) a los cuales se les aplicó las dosis de (0.89-1.3) y 5  $\mu\text{g}$  de proteína. \*Diferencias significativas entre las dosis.

En los cobayos del grupo 1 se aplicaron las dosis en proteínas correspondientes a 10 y 15  $\mu\text{g}$ . La Figura 24 y el análisis de varianza (Tabla 15) muestran que no existen





diferencias significativas entre los promedios de induración en las dosis aplicadas correspondientes a 10 y 15  $\mu\text{g}$  de proteína.

Tabla 15. Análisis de Varianza de los promedios de induración de la IDR de todos los antígenos evaluados por la prueba de actividad biológica. Dosis en  $\mu\text{g}$  de proteína aplicada al grupo 1 de cobayos menos reactivos.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	P	$\mu\text{g}$ proteína
Antígenos	4.39	3	1.46	1.11	0.351	10
Residuos	73.75	56	1.31			
Total	78.14	59				
Antígenos	3.08	3	1.02	0.43	0.728	15
Residuos	132.13	56	2.36			
Total	35.21	59				

\* GL = grados de libertad, F de Fisher. \*P< 0.05 existe diferencia estadística significativa entre los promedios de induración por cada dilución

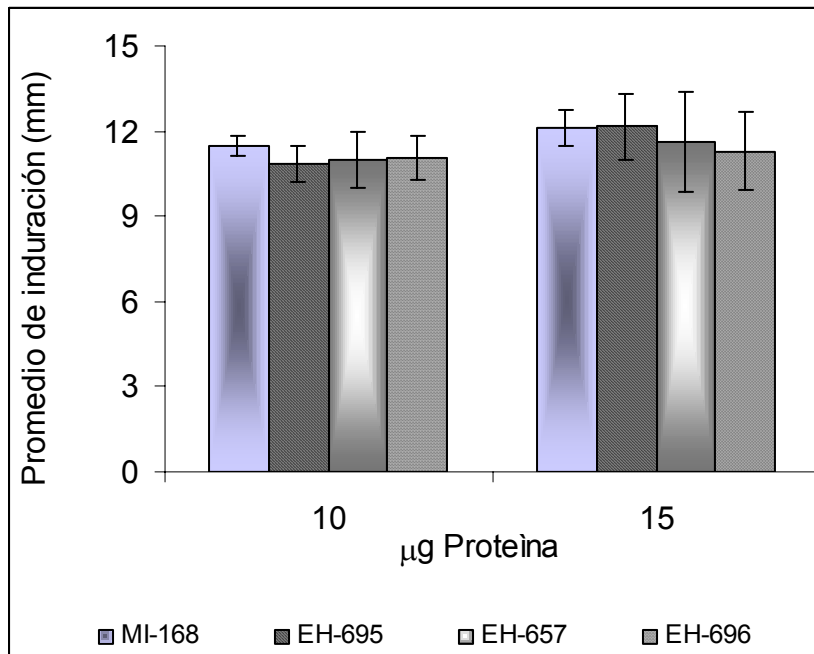


Fig. 24. Promedios de induración de todos los antígenos probados en los cobayos reactivos del grupo 1 (menos reactivos) a los cuales se les aplicó las dosis de 10 y 15  $\mu\text{g}$  de proteína. \*Diferencias significativas entre las dosis.

A diferencia de lo que sucede con las diluciones, cada concentración de coccidioidina manejada en  $\mu\text{g}$  de proteína, no presenta variabilidad entre los diferentes antígenos (MI-168, EH-695, EH-657, EH-696), con excepción del rango de 0.89 a 1.3  $\mu\text{g}$  de proteína por ser muy bajo.



---

## DISCUSIÓN

En la actualidad, la coccidioidina sigue siendo una importante herramienta para detectar el contacto con el hongo *Coccidioides* spp. y a pesar de que se han desarrollado grandes avances en las técnicas de biología molecular, para la identificación molecular y diversidad del hongo (Castañón-Olivares *et al.*, 2007; Herr *et al.*, 2007; Jewell *et al.*, 2008) y para la secuenciación y clonación de genes para producir antígenos purificados. Estas técnicas se han enfocado sobretudo a la búsqueda de una vacuna para prevenir la enfermedad y para obtener antígenos empleados en serología (Tintelnot *et al.*, 2007; Cox & Magee, 2004; Zhu *et al.*, 1996). La biología molecular es útil para caracterizar moléculas de origen proteico pero considerando que la coccidioidina es una mezcla de componentes antigénicos de origen glicoproteico no purificados, del filtrado crudo del hongo crecido en un medio químicamente definido, se requieren otras alternativas para la producción de coccidioidinas con buena reactividad, especificidad y bajo costo. Es por eso que para estandarizar la coccidioidina y como un método para el control de calidad del proceso de producción de antígenos, se requiere estimar la cantidad de proteínas y carbohidratos presentes en la mezcla antigénica. Además, como se ha discutido anteriormente, de los filtrados crudos se obtienen frecuentemente coccidioidinas con diferente reactividad biológica ya que presentan distinta cantidad de proteínas y carbohidratos bajo las mismas condiciones de elaboración.

Las especies de *Coccidioides* spp. utilizadas en este trabajo fueron identificadas morfológica y molecularmente como *C. immitis* y *C. posadasii* (referencia). Los antígenos obtenidos fueron generalmente de *C. posadasii* por ser esta especie la más frecuente en México (Castañón-Olivares *et al.*, 2007). Sin embargo, también se obtuvo una coccidioidina de *C. immitis* para efectos de comparación.

Se confirmó la virulencia de las cepas utilizadas para la producción de las coccidioidinas por la mortalidad de los ratones infectados que fue del 100%. La relevancia de la virulencia de las cepas a utilizar para obtener antígeno se debe a que en experiencias previas se ha comprobado que las cepas virulentas son las mejores productoras de antígeno (Friedman, 1956). Otra característica que debe ser investigada



---

para un buen antígeno para IDR es su reactividad inmune por lo que el antígeno original siempre se ensaya en pruebas serológicas. En este caso, al realizar la inmunodifusión de Ouchterlony con sueros de paciente con coccidioidomicosis y sueros anti-*C. immitis* de conejo se observaron de una a tres bandas de identidad con los antígenos producidos en nuestro trabajo, lo que coincide con lo reportado por Standard & Kaufman (1977).

La multiplicidad de antígenos encontrados en la coccidioidina (antígenos derivados de la fase micelial del hongo) y en la esferulina (antígenos de la fase parasitaria del hongo, denominada esférulas) de *Coccidioides* spp. (Huppert *et al.*, 1978) propició el cuestionamiento sobre el papel de estos antígenos en la respuesta de la inmunidad mediada por células en la coccidioidomicosis. Levine (1969) reportó que la esferulina tiene al menos dos componentes reactivos en las pruebas intradérmicas. La interpretación de las respuestas a la coccidioidina o esferulina es complicada, debido a la complejidad de reacciones provocadas por los múltiples antígenos que los componen, así como por la variedad de preparaciones de antígenos crudos usados por diferentes investigadores que probablemente difieren cualitativa y/o cuantitativamente en el contenido de los antígenos específicos (Cox, 1989).

Se han realizado pocos estudios sobre las fracciones antigénicas presentes en los antígenos crudos y/o en los componentes responsables de la prueba de IDR. En evidencias preliminares se sugiere que el responsable es un antígeno glicosilado polimérico conocido como antígeno 2 (Ag2) compuesto por una manoproteína y presente en la coccidioidina y esferulina (Cox, 1989). El Ag2 es uno de los dos componentes del extracto de la pared celular que es soluble en álcali y en agua (C-ASWS) que también se probó en pruebas de hipersensibilidad de tipo retardado en el cojinete plantar de ratones inmunizados con *Coccidioides* (Ward *et al.*, 1975); el otro componente es un antígeno polisacárido estable al calor que reacciona con la IgM anti-*Coccidioides* en la prueba de precipitinas en tubo capilar (Cox & Britt, 1985). El Ag2 fue clonado por Zhu *et al.* (1996) y su peso molecular es de 19.5 kDa. Dugger *et al.* (1991) desglucosiló con ácido fluorhídrico anhídrido el antígeno lisado de la esférula con tolueno (TLS) y aisló un péptido de 33 kDa, con un contenido alto en los aminoácidos prolina (17%) y treonina (15%) denominado antígeno rico en prolina (PRA)(Dugger *et*



---

*al.*, 1996). Los genes que codifican para los antígenos Ag2 y PRA tienen ácidos nucleicos idénticos y por este motivo se les conoce ahora como Ag2/PRA (Jiang *et al.* 2002).

Las proteínas extracelulares producidas durante el crecimiento de la fase parasitaria (esférulas-endosporas) y de la fase infectante (artroconidios-micelial) de *Coccidioides* sp. fueron estudiadas con SDS-PAGE y teñidas con colorante de Schiff (Zimmer & Pappagianis, 1986). Los resultados mostraron que los filtrados de cultivo crudos de la fase micelial de la cepa Silveira (ATCC 28886) y el filtrado de cultivo de una mezcla de 21 cepas revelaron 4 bandas para la cepa Silveira y 2 bandas para la mezcla de 21 cepas, con bandas comunes en 48 y 18 kDa en ambos cultivos de 120 h. En un estudio para el desarrollo de anticuerpos monoclonales, Karu *et al.* (1985) distinguió nueve proteínas en el rango de 150 a 12 kDa en filtrados de cultivos miceliales incluida la cepa Silveira. La tinción con plata mostró tres bandas comunes en todos los filtrados de 66, 53 y 16.5 kDa.

En la caracterización bioquímica de nuestros antígenos por SDS-PAGE, se evidenció la presencia de 9 fracciones con tinción de plata de 100, 79, 62, 54, 45, 40, 33, 27 y 19 kDa parecidas a los resultados tanto de Karu *et al.* (1985) como a los de Zimmer & Pappagianis (1986). Las diferencias en los pesos moleculares entre estos trabajos puede explicarse por la diversidad en los parámetros operativos de la electroforesis, como el pH, la concentración iónica, la viscosidad, la temperatura del electrolito, la concentración de proteína de las muestras y el voltaje aplicado. Por otro lado, en el SDS-PAGE de las coccidioidinas que estudiamos, se observaron las bandas de 33 y 19 kDa mencionadas por Zhu *et al.* (1996) y Dugger *et al.* (1991, 1996). Todas las fracciones encontradas fueron comunes en los antígenos de todas las cepas. La tinción de plata es más sensible que la de azul de Coomassie para las coccidioidinas debido a que con esta tinción se detecta un mayor número de fracciones antigénicas por la naturaleza glicoproteica de los antígenos.

Debido al papel preponderante de las proteínas en la prueba de IDR (Cole *et al.*, 1985; Dugger *et al.*, 1991), que es una prueba de detección de inmunidad celular (Abbas *et al.*, 2000), se probaron tres métodos de cuantificación de proteínas: el método tradicional de Lowry (1951), el de Lowry modificado (Lucarini & Kilikian, 1999) y



---

el de Bradford (1976). La diferencia entre los métodos de Lowry y Bradford, se debe a la detección de diversos aminoácidos de las proteínas de las muestras. El de Lowry, detecta sobre todo los enlaces peptídicos de las proteínas por el cobre que se reduce de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ . En cambio, el azul brillante de Coomassie G-250 del reactivo de Bradford se une a aminoácidos básicos (especialmente con arginina) y con aminoácidos aromáticos. El método de Bradford detecta péptidos pequeños y algunos aminoácidos no se unen al colorante o se unen débilmente como la histidina, lisina, tirosina, triptofano y residuos de fenilalanina. La diferencia entre el método de Lowry (1951) tradicional y el Lowry modificado (Hartree, 1972; Lucarini & Kilikian, 1999) es que en el método modificado se utilizan reactivos más concentrados que los reactivos utilizados en el de Lowry tradicional, lo que asegura un exceso de cobre que se reduce de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  formando un complejo tetradentado que en una segunda reacción reduce el reactivo de Folin Ciocalteau (fosfomolibdico-fosfotúngstico) a un heteropoli-molibdílico de un color azul más intenso debido a la mayor concentración de enlaces peptídicos detectados. En otros estudios (Ahmed, 2005; García-Arellano *et al.*, 1998) también se ha demostrado que existe una mayor variabilidad entre las concentraciones de proteína al utilizar el método de Bradford para las mismas muestras y que dependiendo del tipo de proteína también pueden variar los resultados. Al final de la comparación entre los tres métodos se seleccionó el método modificado de Lowry, porque no solamente cumplió con los criterios de aceptación para la linealidad y repetibilidad del método, sino que también permitió cuantificar una mayor cantidad de proteína en los antígenos obtenidos por lo que resultó el mejor para las coccidioidinas probadas. Estos resultados sugieren que los componentes peptídicos de las coccidioidinas obtenidas en este estudio son sobre todo moléculas compuestas de aminoácidos no aromáticos, lo que coincide con los trabajos de Anderson *et al.* (1971) que analizaron filtrados de cultivo (coccidioidinas) de la cepa Silveira de *C. immitis* (actualmente *C. posadasii*) (Fisher *et al.* 2002; Zimmermann, 1994) obteniendo moléculas ricas en el aminoácido prolina. Dugger *et al.* (1991) también encontraron en la esferulina un alto contenido de prolina cuando analizaron el contenido en aminoácidos de una apoglicoproteína de 33 kDa que correspondía al antígeno 2 de Huppert *et al.* (1978) y Cox & Britt. (1987) compartido entre la esferulina y la coccidioidina.



---

Los métodos probados no cuantifican con exactitud la cantidad total de proteína presente en los antígenos porque no hay sustancias patrón que contengan la misma estructura y composición química de los antígenos, pero si es posible obtener una estimación confiable que se utilice para relacionar una concentración estimada de proteína en las coccidioidinas con su potencia en las pruebas de actividad biológica y compararla con la potencia de las coccidioidinas estandarizadas en las diluciones más utilizadas. Finalmente, García-Arellano & Vázquez Duhalt (1998), sugieren que el mejor método es aquel que es lo suficientemente sensible para detectar las concentraciones que se tienen en las muestras problema, y que sea sencillo y rápido, por lo que en este estudio se decidió utilizar para todos los antígenos probados el método de Lowry modificado.

La estandarización de la coccidioidina comercial y algunas de investigación (Smith *et al.*, 1948; Levine *et al.*, 1973; Dodge *et al.*, 1985; Padua y Gabriel *et al.*, 1999; Velasco-Rodríguez *et al.*, 2001; Ampel, 2003) se realiza comúnmente mediante una dilución 1/100 del concentrado 1/10 del filtrado de cultivo de *Coccidioides* spp. obtenido. Las Farmacopeas Mexicana (FEUM, 2004) y estadounidense (USP 30/NF 25, 2007) en sus monografías de la coccidioidina no establecen la estimación del contenido de proteína, del nitrógeno total o de carbohidratos como pruebas de control de calidad. Sin embargo, la Guía del Comité de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) de los requerimientos técnicos para el registro de los productos farmacéuticos de consumo humano (Comunidad Europea, Estados Unidos y Japón, 1999) en el documento Q6B de las Especificaciones (Procedimientos, pruebas y criterios de aceptación para Productos Biotecnológicos-Biológicos) sugiere en los apartados de “Actividad Biológica y Cantidad”, indica la importancia de la determinación de proteínas en estos productos como pruebas de caracterización y de control de calidad, tal y como se llevó a cabo en este estudio.

Los resultados obtenidos aquí mostraron que bajo las mismas condiciones de cultivo (inóculo, volumen del medio, cepa, temperatura y periodo de incubación), además del mismo proceso de filtración, concentración y diálisis de los antígenos, se presentó una gran variabilidad de proteínas y carbohidratos en los diferentes lotes obtenidos (Figuras 8 y 9), además de que se obtienen cultivos con características



distintas como es el pigmento y la cantidad de micelio producido. Durante la elaboración de los antígenos se observó que algunos cultivos presentaban un micelio más oscuro que otros, y en los cultivos más pigmentados se cuantificó una mayor cantidad de proteínas y más bandas de precipitación en la inmunodifusión con sueros de pacientes. Se ha demostrado que los artroconidios, esférulas y endosporas de *Coccidioides posadasii* producen melanina *in vitro* e *in vivo* (Nosanchuk *et al.*, 2007). Sin embargo, no está definido el papel de la melanina en la patogenicidad de *C. posadassi* pero los antígenos pigmentados producidos en este experimento presentaron una mayor cantidad de proteína y mayor reactividad serológica que los antígenos no pigmentados.

Las pruebas de actividad biológica donde se ensayaron los antígenos MI-168 producido hace más de 10 años, y el antígeno EH-695, elaborado recientemente, y cada uno de éstos comparado con el antígeno comercial (usado como referencia) mostraron que las respuestas son directamente proporcionales a las dosis administradas ya que las curvas log dosis-respuesta, presentaron coeficientes de correlación ( $R^2$ ) mayores o muy cercanos a 0.98. Además, las pruebas *t* de Student mostraron que las diferencias entre la mayoría de los promedios de induración de cada una de las diluciones aplicadas en ambos grupos de cobayos reactivos del antígeno de prueba MI-168 y comercial son significativas ( $P < 0.05$ ) y también se encontraron diferencias significativas entre todos los promedios de induración de cada una de las diluciones aplicadas entre el antígeno de prueba EH-695 y el comercial. Estos resultados sugieren que los antígenos de prueba MI-168 y EH-695 y el antígeno comercial tienen cantidades diferentes del principio activo responsable de la IDR, por lo cual se presentan estas diferencias significativas entre cada una de la mayoría de las diluciones aplicadas.

Los análisis de varianza para comprobar la validez de los ensayos para determinar la potencia del antígeno de prueba en relación con el antígeno comercial en el modelo de líneas paralelas no cumplió con el criterio de validez de paralelismo entre las rectas log dosis-respuesta de los antígenos MI-168 y comercial ni tampoco entre las rectas de los antígenos EH-695 y comercial. Sin embargo, de todas formas se estimó la potencia y los antígenos MI-168 y EH-695 son más potentes que el antígeno comercial,



---

y esta potencia se encuentra dentro de las especificaciones señaladas en la Farmacopea (FEUM 2004) para la coccidioidina.

Cabe destacar que el modelo de líneas paralelas sólo es útil cuando las diluciones se realizan a partir de antígenos obtenidos por procesos de elaboración homogéneos que tengan la misma cantidad de la o las fracciones antigénicas responsables de la prueba de IDR, ya que si las diluciones se realizan a partir de antígenos crudos con diferente cantidad de fracciones antigénicas, las curvas log dosis-respuesta no se desplazarán paralelamente entre sí en cada dilución. La falta de paralelismo entre las rectas de los antígenos de prueba y de referencia se observó frecuentemente, y a pesar de las condiciones de proceso de elaboración de antígenos que se llevó con las mismas condiciones, se obtuvieron antígenos con cantidades distintas de proteínas y carbohidratos. Además, todos los antígenos analizados por la prueba de actividad biológica provienen de diferentes cepas y algunas comparaciones se hicieron entre antígenos de diferente especie (EH-696 y comercial son de *C. immitis* y EH-695, EH-657 y MI-168 de *C. posadasii*).

Los resultados obtenidos en la comparación de los dos métodos de estandarización de los antígenos tanto en microgramos de proteína como en diluciones mostraron que todas las curvas logaritmo dosis-respuesta de los experimentos son lineales ya que todas presentan coeficientes de correlación ( $R^2$ ) mayores o muy cercanos a 0.98. Esto indica que las respuestas (induración) son proporcionales a las dosis administradas en los rangos de las dosis aplicadas ya sean en diluciones o en microgramos de proteínas en todos los antígenos probados.

Las pendientes por el ajuste por mínimos cuadrados de las curvas logaritmo dosis-respuesta describen si las rectas de los antígenos de prueba y de referencia son paralelas entre si. Los resultados de las pendientes muestran que en la mayoría de las curvas logaritmo dosis-respuesta cuando la dosis administrada es en diluciones las pendientes son diferentes, pero cuando la dosis aplicada es en microgramos de proteína, las pendientes de las líneas son muy semejantes y casi todas se sobreponen. Esto indica que al utilizar diluciones la mezcla compleja de fracciones que componen los antígenos no es homogénea, mientras que al utilizar el antígeno en  $\mu\text{g}$  de proteína,





---

se cuantifica por lo menos, una fracción, la proteica de la mezcla compleja, lo que permite comparar de mejor forma para obtener resultados uniformes.

Las curvas logaritmo dosis-respuesta de los experimentos muestran que todos los promedios de induración del antígeno MI-168 fueron mayores a todos los otros antígenos, tanto en diluciones como en  $\mu\text{g}$  de proteína, en ambos grupos de cobayos reactivos. Esta diferencia en reactividad, puede deberse a que el antígeno MI-168 tiene una mayor cantidad de proteína respecto a los otros antígenos, ya que se ha demostrado que la reactividad en la prueba de IDR es debida a la fracción proteica del antígeno (Cole *et al.*, 1985; Dugger *et al.*, 1991).

Las pruebas *t* de Student y el análisis de varianza mostraron que existen diferencias significativas en los promedios de induración de la IDR con el antígeno en diluciones, independientemente de las cinco coccidioidinas usadas. Sin embargo, cuando la dosis aplicada en la IDR es en microgramos de proteína no hay diferencias significativas entre los promedios de induración entre las coccidioidinas comparadas. Estos resultados confirman que al utilizar diluciones de los antígenos en la IDR se pone de manifiesto la heterogeneidad de las coccidioidinas elaboradas, y esta variabilidad disminuye al estandarizar la coccidioidina en microgramos de proteína.

Por último, el antígeno MI-168 es un antígeno de efectividad comprobada a pesar de que fue elaborado hace más de 10 años y durante este tiempo el antígeno crudo de donde se originan las diluciones se ha conservado en congelación a  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estos datos sugieren que la molécula responsable de la IDR es muy estable ya que los resultados de las pruebas de actividad biológica muestran que en todas las comparaciones que se hicieron, ya sea como antígeno de referencia o como antígeno de prueba los promedios de induración en las IDR siempre fueron mayores que los otros antígenos cuando la dosis aplicada fue en diluciones, lo que muestra que este antígeno posee una cantidad mayor de la o las fracciones glicopeptídicas responsables de la IDR que los otros antígenos probados. La estabilidad de los antígenos de *Coccidioides sp.* ya ha sido probada y confirma los resultados obtenidos, ya que en un estudio realizado por Ampel *et al.* (2006) reveló que una coccidioidina comercial guardada por más de 25 años



---

conservó su potencia y su especificidad al ser probada en pruebas cutáneas en individuos con coccidioidomicosis activa procedentes de zonas endémicas.

Los resultados aquí obtenidos muestran que la coccidioidina de la cepa EH-695 de *C posadasii* sería una herramienta útil para el estudio epidemiológico de coccidioidomicosis en nuestro país.



---

## CONCLUSIONES

- Las pruebas de actividad biológica revelaron que la estandarización de los antígenos en microgramos de proteína es más adecuada que la de diluciones.
- El diseño experimental propuesto en la Farmacopea de las series de diluciones que se aplican a los grupos de cobayos (Tabla 1) debería de modificarse para que la dilución 1/100 que es la que comúnmente se emplea en las pruebas de IDR no sólo sea aplicada en los cobayos del grupo 1 (menos reactivos) si no que también se debería aplicar en los cobayos del grupo 2 (más reactivos) para evaluar su potencia en animales más sensibles.
- Se sugiere modificar el esquema de las diluciones que se aplican a los grupos de cobayos planteado por la FEUM (Tabla 1), y solo aplicar la serie de diluciones 1/100, 1/200 y 1/400 en ambos grupos de cobayos y excluir del esquema de la FEUM las diluciones 1/300 de la serie 1 y la 1/800 y 1/1600 de la serie 2, a fin de disminuir el número de IDR aplicadas a los animales.
- Se sugiere utilizar la coccidioidina de la cepa EH-695 de *C posadasii*



## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cellular and Molecular Immunology. Saunders, Philadelphia.
- Ahmed H. 2005. Principles and Reaction of Protein Extraction Purification and Characterization. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Ampel NM, Hector RF, Lindan CP, Rutherford GW. 2006. An achived lot of coccidioidin induces specific coccidioidal delayed-type hypersensitivity and correlates with in vitro assays of coccidioidal cellular immune response. *Mycopathologia* 161: 67-72.
- Ampel NM. 2003. Measurement of cellular immunity in human coccidioidomycosis. *Mycopathologia* 156:247-263.
- Anderson KL, Wheat RW, Conant NF. 1971. Fractionation and composition studies of skin test-active components of sensitins from *Coccidioides immitis*. *Appl Microbiol* 22: 294-299.
- Ayala-Gaytán JJ, Condarco-Cortés BA, Pérez-Zuno JA, Moreno-Guevara P. 1997 El fluconazol en la coccidioidomycosis meníngea. *Rev Invest Clin* 49: 205-8.
- Beck MD, Traum J, Harington ES. 1931. Coccidioidal granuloma: occurrence in animals: reference to skin tests. *J Am Vet* 78: 490-499.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breslau AM, Kubota MY. 1964. Continuous *in vitro* cultivation of spherules of *Coccidioides immitis*. *J Bacteriol* 87:468-472.
- Castañeda GR, Laniado LR. 2002 Coexistencia de tuberculosis y coccidioidomycosis. Presentación de dos casos clínicos. *Rev Inst Nal Enf Resp.* 15: 98-101.
- Castañón Olivares LR, Aroch Calderón A, Bazán Mora E, Córdova Martínez E. 2004. Coccidioidomycosis y su escaso conocimiento en nuestro país. *Rev Fac Med UNAM* 47:145-148.
- Castañón Olivares LR, Guereña-Elizalde D, González-Martínez MR, Licea-Navarro AF, González-González GM, Aroch Calderón A. 2007. Molecular identification of *Coccidioides* isolates from Mexican Patients. *Ann NY Acad Sci* 1111: 326-335.
- Catanzaro A, Spitler LE, Moser KM. 1975. Cellular immune response in coccidioidomycosis. *Cell Immunol* 15: 360-371.
- Centers for Disease Control and Prevention and the Nacional Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 5<sup>th</sup> ed. Washington, DC: US Gov Printing Office, 2007.
- Cicero RE. 1932. El Granuloma coccidioidal. *Gac Med Mex* 63: 139.
- Cid Chavez DM, Gonzalez-Carrillo LE, Munguia-Palmerin E, Garcia-Salcedo JJ, Gonzalez-Martinez MR. 2006. Coccidioidina en la población rural de la Comarca Lagunera. XXXI Congreso de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Monterrey, Nuevo León. Julio 12-15. p. S-50.
- Cole GT, Chin JW, Pope LM, Starr P. 1985. Characterization and distribution of 3-O-methylmannose in *Coccidioides immitis*. In: Einstein HE, Catanzaro A (eds.). *Proceedings of the Fourth International Conference on Coccidioidomycosis*. The National Foundation for Infectious Diseases, Washington, D.C. pp. 130-145.
- Converse JL. 1955. Growth of spherules of *Coccidioides immitis* in a chemically defined liquid medium. *Proc Soc Exp Biol Med* 90:709-711.
- Cooke JV. 1914. Immunity tests in coccidioidal granuloma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 12:35.
- Cox RA, Britt LA. 1985. Antigenic heterogeneity of an alkali-soluble, water-soluble cell wall extract of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 50: 365-369.



- Cox RA, Britt LA. 1987. Antigenic Identity of Biologically Active Antigens in Coccidioidin and Spherulin. *Infect Immun* 55: 2590-2596.
- Cox RA. 1989. Antigenic structure of *Coccidioides immitis*. *Immunol Ser.* 7: 133-170.
- Cox RA, Magee DM. 2004 Coccidioidomycosis: Host response and vaccine development. *Clin Microbiol Rev* 17: 804-839.
- Davis DJ. 1924. Coccidioidal granuloma with certain serologic and experimental observations. *Arch Dermatol Syphil* 9:577-587.
- Dodge RR, Lebowitz MD, Barbee R, Burrows B. 1985. Estimates of *C. immitis* by skin test reactivity in an endemic community. *Am J Publ Health* 75:863-865.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
- Dugger KO, Galgiani JN, Ampel NM, Sun SH, Magee DM, Harrison J, *et al.* 1991. An immunoreactive apoglycoprotein purified from *Coccidioides immitis*. *Infect Immun.* 59: 2245-2251.
- Dugger KO, Villareal KM, Ngyuen A, Zimmermann CR, Law JH, Galgiani JN. 1996. Cloning and sequence analysis of the cDNA for a protein from *Coccidioides immitis* with immunogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 485-489.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). 2004. Octava Edición. Volumen II. Estadística para Ensayos Biológicos. pp 2249-2269.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). 2004. Octava Edición. Volumen II. Métodos de Productos Biológicos MPB 005. Prueba de Actividad Biológica y de Identidad de Coccidioidina. p. 2151.
- Farmacopea de los Estados Unidos de América. 2007. Trigésima Revisión/ Formulario Nacional, Vigésima Quinta Edición. Volumen I. (USP 30/ NF 25). Pruebas Biológicas (111). Diseño y Análisis de Valoraciones Biológicas. p. 138.
- Fiese, M. J., 1958. Coccidioidomycosis. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. 2002. Molecular and phenotype description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-Californian population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 94:73-84.
- Friedman L, Smith CE, Roessler WG, Berman RJ. 1956. The virulence and infectivity of twenty-seven strains of *Coccidioides immitis*. *Am J Hyg* 64:198-210.
- Galgiani JN, Hayden R, Payne RM. 1982. Leukocyte effects on the dimorphism of *Coccidioides immitis*. *J Infect Dis* 146:56-63.
- Garcia-Arellano H, Vazquez-Duhalt R. 1988. Cuantificación de proteínas: una revisión. *Biotecnología* 3: 77-88.
- Goldschmidt E. 1958. Composition of an extracellular polysaccharide fraction produced by *Coccidioides immitis*. *Bacteriol Proc* p.127.
- González-Ochoa A. 1966. La coccidioidomycosis en México. *Rev Invest Salud Publ* 26: 245-262.
- Guideline of the International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. 1999. Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products Q6B. ICH Harmonised Tripartite Current *Step 4* version dated 10 March 1999. p 2-7. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA432.pdf>.
- Hartree EF. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48: 422-427.
- Hassid WZ, EE Baker, McCread RM. 1943. An immunologically active polysaccharide produced by *Coccidioides immitis*. *J Biol Chem* 149:303-311.
- Hector RF, Laniado-Laborin R. 2005. Coccidioidomycosis A fungal disease of the Americas. *PLoS Medicine* 2(1):e2. [http://medicine.plosjournals.org/archive/15491676/2/1/pdf/10.1371\\_journal.pmed.0020002-S.pdf](http://medicine.plosjournals.org/archive/15491676/2/1/pdf/10.1371_journal.pmed.0020002-S.pdf).



- Hedges E, Miller S. 1990. Coccidioidomycosis: Office diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 41:1499-1506
- Herr RA, Hung CY, Cole GT. 2007. Evaluation of two homologous proline-rich proteins of *Coccidioides posadasii* as candidate vaccines against coccidioidomycosis. *Infect Immun*. 75:5777-5787.
- Hirsch EF, d'Andrea D. 1927a. Sensitization of guinea pigs with broth culture filtrates and with killed mycelium of *Coccidioides immitis*. *J Infect Dis*. 40:638-640.
- Hirsch EF, d'Andrea D. 1927b. The specific substance of *Coccidioides immitis*. *J Infect Dis*. 40:634-637.
- Huppert M, Spratt NS, Vukovich KR, Sun SH, Rice EH. 1978. Antigenic analysis of coccidioidin and spherulin determined by two-dimensional electrophoresis. *Infect Immun*. 20:541-551.
- Hurwitz S, Young JE, Eddie BV. 1938. *Coccidioides immitis* intradermal skin reaction; preliminary report of 449 cases. *Calif West Med*. 48:87-89.
- Jacobson HP. 1928. Coccidioidal granuloma: specific allergic cutaneous reaction; experimental and clinical observations. *Arch Dermatol Syphil* 18:562-567.
- Jewell K, Cheshier R, Cage GD. 2008. Genetic diversity among clinical *Coccidioides* spp. isolates in Arizona. *Med Mycol* 46: 449-455.
- Jiang CD, Magee DM, Ivey FD, Cox RA. 2002. Role of signal sequence in vaccine-induced protection against experimental coccidioidomycosis. *Infect Immun* 70: 3539-3545.
- Johnson MS, Zimmermann RC y Pappagianis D. 1996. Use of a recombinant *Coccidioides immitis* complement fixation antigen-chitinase in conventional serological assays. *J Clin Microbiol* 34: 3160-3164.
- Karu AE, Gennevois DJP, Hoffman JW, Levine HB. 1985. Preliminary characterization of monoclonal antibodies to *Coccidioides immitis* antigens. In: Einstein EH, Catanzaro A. (eds.). *Proceedings of the Fourth International Symposium on Coccidioidomycosis*. National Foundation for Infectious Disease, Washington, D.C. p. 227-238.
- Kessel JF. 1939. The coccidioidin skin test. *Am J Trop Med* 19:199-204.
- Klotz, SA, Drutz DJ, Huppert M, Sun SH, DeMarsh PL. 1984. The critical role of CO<sub>2</sub> in the morphogenesis of *Coccidioides immitis* in cell-free subcutaneous chambers. *J Infect Dis* 150:127-134.
- Kobayashi GS, Pappagianis D. 1970. Preparation and Standardization of antigens of *Histoplasma capsulatum* and *Coccidioides immitis*. *Mycopathologia*. 41: 139-153.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- Laniado-Laborín R, Cárdenas-Moreno R, Álvarez-Cerro M. 1991. Tijuana: zona endémica de infección por *Coccidioides immitis*. *Salud Pub Mex*. 33: 235-9.
- Levine HB, Cobb JM, Scalarone GM. 1969. Spherule coccidioidin in delayed dermal sensitivity reactions of experimental animals. *Sabouraudia* 7:20-32.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lucarini AC, Kilikian BV. 1999. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. *Biotech Techniques* 13: 149-154.
- Mayorga PR, Hernan E. 1970. Coccidioidomycosis in México and Central America. *Mycopathol Mycol Appl* 40:13-23.
- Merril CR, Dunau ML, Goldman D. 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polysacrylamide gels. *Anal Biochem* 110: 201-207.
- Mondragón-González R, Méndez-Tovar LJ, Bernal-Vázquez E, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Ríos-Rosas C, Contreras-Pérez C, Anides-Fonseca AE. 2005. Detección de infección por *Coccidioides immitis* en



- zonas del estado de Coahuila, México. *Revista Argentina de Microbiología*. 37:135-138.
- Muñoz B, Castañón LR, Calderón I, Vázquez ME, Manjarrez ME. 2004 Parasitic mycelial forms of *Coccidioides* species in Mexican patients. *J Clin Microbiol* 42:1247-1249
- Nosanchuk JD, Jieh-Juen Yu, Chiung-Yu Hung, Casadevall A, Cole GT. 2007. *Coccidioides posadasii* produces melanin *in vitro* and during infection. *Fungal Genet Biol*. 44:517-520.
- Ouchterlony O. 1962. Difusión in gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy* 6: 30-36.
- Padua y Gabriel A, Martínez-Ordaz VA, Velasco-Rodríguez VM, Lazo-Sáenz JG, Cicero R. 1999. Prevalence of skin reactivity to coccidioidin and associated risks factors in subjects living in a northern city of Mexico. *Arch Med Res*. 30: 388-92.
- Pappagianis D. 2001. *Coccidioides immitis*. In: Ajello L, Hay RJ. *Microbiol infect* vol 4. 9<sup>th</sup> Ed. Oxford University Press, New York. pp. 357-73.
- Pappagianis D, Zimmer BL. 1990. Serology of coccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 3:247-268.
- Pappagianis D, Putman EW, Kobayashi GS. 1961. Polysaccharide of *Coccidioides immitis*. *J Bacteriol* 82: 714-723.
- Perea S, Patterson TF. 2003. Endemic Mycoses. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds.). *Clinical Mycology*. Elsevier Science, Philadelphia. pp. 352-69.
- Perrin TG. 1932. Un caso de granulomatosis coccidioidal. Demostración de *Coccidioides immitis*. *Gac Med Mex* 63:158.
- Posadas A. 1892. Un nuevo caso de micosis fungoidea con psorospermias. *An Circ Med Argent* 15:585-597.
- Sarosi GA, Catanzaro A, Daniel TM, Davies SF. 1988. Clinical usefulness of skin testing in Histoplasmosis, Coccidioidomycosis and Blastomycosis. *Am Rev Resp Dis*. 138: 1081-2.
- Smith CE, Whiting EG, Baker EE, Rosenberger HG, Beard R, Saito MT. 1948. The use of coccidioidin. *Am Rev Tuberc* 57: 330-360.
- Standard PG, Kaufman L. 1977. Immunological Procedure for the rapid and specific identification of *Coccidioides immitis* cultures. *J Clin Microbiol* 5:149-153.
- Stewart RA, Kimura F. 1940. Studies in the skin test for coccidioidal infection. *J Infect Dis* 66:212-217.
- Sutton A, Stanley M. 1971. Standardization of Coccidioidin by Bioassay in Guinea Pigs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 136: 257-259.
- Tintelnot K, De Hoog GS, Antweiler E, Losert H; Seibold M; Brandt MA; A. H. G. Gerrits Van Den Ende, Fisher MC. 2007. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med Mycol*. 45:385-93.
- Toriello C, Arjona-Rosado LC, Díaz-Gómez ML, Taylor ML. 1991. Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. *Mycoses* 34: 133-140.
- Toriello C, Jiménez-Montiel JA, Reyes-Montes MR, Taylor ML. 1993. Two-dimensional immunoelectrophoresis of histoplasmin and a purified polysaccharide-protein antigen of *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathologia* 122:7-13.
- Toriello C, Reyes-Montes MR, Taylor ML. 1997. Producción de antígenos fúngicos autóctonos en el inmunodiagnóstico de micosis en México. *Rev Invest Clin* 49:501-505.
- Toriello C, Rosas JL, Reyes-Montes MR, Taylor ML. 1982 Biochemical studies of polisaccharide protein antigen from fungi causing systemic mycosis. Baxter M, (Ed.). *Proceedings VIII Congress ISHAM*, Massey University, Palmerston North, Nueva Zelandia. pp 220-224.



- 
- Tzianabos AO. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev* 13: 523-533.
- Velasco-Rodríguez VM, Martínez-Ordaz VA, Padua y Gabriel A, Lazo-Sáenz JG, Cicero-Sabido R. 2001. Utilidad de la prueba cutánea a la coccidioidina en personas con diabetes mellitus tipo 2 en una zona endémica. *Rev Invest Clín* 53 3: 223-227.
- Wallraff EB, Wilson SA. 1965. Skin-test activity of dialyzed coccidioidins. *Amer Rev Resp Dis* 92: 121.
- Wanke BM, Lazera PC, Monteiro FC, Lima MJ, Leal PL, Ferreira Filho L, Kaufman R, Pinner W, Ajello L. 1999. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's northeastern state of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. *Mycopathologia* 148:57-67.
- Ward ER, Cox RA, Schmitt A, Huppert M, Sun H. 1975. Delayed-type hypersensitivity responses to a cell wall fraction of the mycelial phase of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 12: 1093-1097.
- Wernicke R. 1892. Ueber einen Protozoenbefund bei Mycosis fungoides. *Zentbl. Bakteriol.* 12:859-861.
- Zhu Y, Yang Ch, Magee DM, Cox RA. 1996. *Coccidioides immitis* Antigen 2: analysis of gene and protein. *Gene*. 181:121-125.
- Zimmermann CR, Snedker CJ, Pappagianis D. 1994. Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 32:3040-3042.
- Zimmer BL, Pappagianis D. 1986. Comparison of immunoblot analyses of spherule-endospore-phase extracellular protein and mycelial-phase antigen of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun.* 53: 64-70.





---

ÍNDICE DE TABLAS	Páginas
Tabla 1. Serie de diluciones especificadas en la FEUM.....	20
Tabla 2. Dosis administradas a los cobayos en la modificación del diseño experimental.....	24
Tabla 3. Resultados de la linealidad y repetibilidad de los métodos de determinación de proteínas.....	27
Tabla 4. Cantidad estimada de proteínas y de carbohidratos en los lotes de todos los antígenos producidos.....	30
Tabla 5. Comparación entre los promedios de induración de la IDR del antígeno comercial y el antígeno MI-168.....	34
Tabla 6. Análisis de varianza para determinar la validez del ensayo para evaluar la potencia del antígeno MI-168 y comercial.....	35
Tabla 7. Comparación entre los promedios de induración de la IDR del antígeno comercial y el antígeno MI-168.....	36
Tabla 8. Análisis de varianza para determinar la validez del ensayo para evaluar la potencia del antígeno EH-695 y comercial.....	37
Tabla 9. Comparación entre los promedios de induración de la IDR del antígeno MI-168 y EH-695 serie de diluciones y $\mu\text{g}$ de proteínas.....	40
Tabla 10. Comparación entre los promedios de induración de la IDR del antígeno MI-168 y EH-657 serie de diluciones y $\mu\text{g}$ de proteínas.....	42
Tabla 11. Comparación entre los promedios de induración de la IDR del antígeno MI-168 y EH-696 serie de diluciones y $\mu\text{g}$ de proteínas.....	44
Tabla 12. Análisis de varianza de los promedios de induración de la IDR de todos los antígenos. Serie de diluciones 1 aplicada al grupo 1 de cobayos.....	45
Tabla 13. Análisis de varianza de los promedios de induración de la IDR de todos los antígenos. Serie de diluciones 2 aplicada al grupo 2 de cobayos.....	46
Tabla 14. Análisis de Varianza de los promedios de induración de la IDR de todos los antígenos. Dosis en $\mu\text{g}$ de proteína aplicada al grupo 2 de cobayos.....	47
Tabla 15. Análisis de Varianza de los promedios de induración de la IDR de todos los antígenos. Dosis en $\mu\text{g}$ de proteína aplicada al grupo 1 de cobayos.....	48



---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Páginas

Fig. 1. Distribución geográfica de la coccidioidomicosis.....	1
Fig. 2. Reacción positiva a la intradermoreacción con coccidioidina.....	3
Fig. 3. Esférula con endosporas, forma parasitaria de <i>Coccidioides</i> sp.....	4
Fig. 4. Microfotografías de los artroconidios enteroártricos de las cepas estudiadas.....	25
Fig. 5. Inmunodifusión de Ouchterlony de los antígenos.....	26
Fig. 6. SDS-PAGE de los antígenos.....	26
Fig. 7. Curvas de calibración de los métodos de determinación de proteínas.....	28
Fig. 8. Comparación de los tres métodos de determinación de proteínas en antígenos.....	29
Fig. 9. Promedio de la concentración de proteínas y carbohidratos en los cinco lotes de los antígenos.....	30
Fig. 10. Resultado de la intradermoreacción a las 24 h con coccidioidina.....	31
Fig. 11. Porcentaje de cobayos reactivos en la IDR con coccidioidina MI-168 para la prueba de selección de animales reactivos.....	31
Fig. 12. Prueba de actividad biológica de los antígenos de referencia Mi-168 y de prueba EH-695.....	32
Fig. 13. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia del antígeno comercial y MI-168.....	33
Fig. 14. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia del antígeno comercial y EH-695.....	36
Fig. 15. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia MI-168 y de prueba EH-695 Dosis: serie de diluciones 1 y en $\mu\text{g}$ proteína aplicadas a	



---

cobayos del grupo 1.....	38
Fig. 16. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia MI-168 y de prueba EH-695. Dosis: serie de diluciones 2 y en $\mu\text{g}$ proteína aplicadas a cobayos del grupo 2.....	39
Fig. 17. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia MI-168 y de prueba EH-657. Dosis: serie de diluciones 1 y en $\mu\text{g}$ proteína aplicadas a cobayos del grupo 1.....	41
Fig. 18. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia MI-168 y de prueba EH-657. Dosis: serie de diluciones 2 y en $\mu\text{g}$ proteína aplicadas a cobayos del grupo 2.....	41
Fig. 19. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia MI-168 y de prueba EH-696. Dosis: serie de diluciones 1 y en $\mu\text{g}$ proteína aplicadas a cobayos del grupo 1.....	43
Fig. 20. Curvas log dosis-respuesta para comparar la potencia entre el antígeno de referencia MI-168 y de prueba EH-696. Dosis: serie de diluciones 2 y en $\mu\text{g}$ proteína aplicadas a cobayos del grupo 2.....	43
Fig. 21. Promedios de induración de todos los antígenos probados en los cobayos reactivos del grupo 1 a los cuales se les aplicó la serie de diluciones 1.....	45
Fig. 22. Promedios de induración de todos los antígenos probados en los cobayos reactivos del grupo 2 a los cuales se les aplicó la serie de diluciones 2.....	46
Fig. 23. Promedios de induración de todos los antígenos probados en los cobayos reactivos del grupo 2 a los cuales se les aplicó las dosis de (0.89-1.3) y 5 $\mu\text{g}$ de proteína.....	47
Fig. 24. Promedios de induración de todos los antígenos probados en los cobayos reactivos del grupo 1 a los cuales se les aplicó las dosis de 10 y 15 $\mu\text{g}$ de proteína.....	48