



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE ELISA DE ANTICUERPOS
ANTI-*Coccidioides* EN SUEROS DE HUMANOS Y DE PERROS
DE ZONAS MEXICANAS ENDÉMICAS Y NO ENDÉMICAS DE
COCCIDIOIDOMICOSIS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

P R E S E N T A:

LIZBETH SUÁREZ LOZANO



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAURA ROSIO CASTAÑÓN OLIVARES

CIUDAD DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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:

1. Datos del alumno

Suárez
Lozano
Lizbeth
55 10 51 59 04
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
306307227

2. Datos del Tutor

Dra.
Laura Rosio
Castañon
Olivares

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Sigfrido
Sierra
Galván

4. Datos del sinodal 2

Med. Cir.
Manuel
Gutiérrez
Quiroz

5. Datos del sinodal 3

QFB
Erika
Córdova
Martínez

6. Datos del sinodal 4

Biól.
Leticia Araceli
Ruíz
González

7. Datos del trabajo escrito

Identificación mediante ELISA de anticuerpos anti-*Coccidioides* en sueros de humanos y de perros de zonas mexicanas endémicas y no endémicas de coccidioidomicosis.

44 p
2018

Dedicatoria

A mis más grandes amores:

Mis padres: Alicia y Manuel

Mis abuelitos: Ma. Del Pilar y José de Jesús

Mis hermanos: Ricardo y Dannia

Mi compañero de vida: Diego

Su amor, apoyo, comprensión y ejemplo, me han enseñado que los sueños son posibles de alcanzar. Los amo con todo mí ser.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi Máxima Casa de Estudios, de la cual me siento muy orgullosa de pertenecer: a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Ciencias y a cada uno de mis profesores que contribuyeron a mi formación personal y profesional.

Mi agradecimiento al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con clave de proyecto IN211115; ya que tuve la oportunidad de fortalecer mi desarrollo profesional y valiosas experiencias personales.

Al Dr. Gutiérrez y especialmente a Leticia A. Ruíz por su enseñanza y paciencia que me permitió el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Fausto Reyes Delgado del Hospital Veterinario UNAM-Banfield y a Raquel Muñiz, Jorge A. Luna y Saraí Estrella Sandoval de la Perrería Municipal de Ensenada por facilitarme los sueros de perros; a Amelia Pérez Mejía de la Ciudad de México, a Manuel A. Cano y a Ma. De los Ángeles Durazo del Hospital Infantil de Hermosillo y a Martín M. A. Zamora de la Clínica Familiar del ISSSTE de Hermosillo, por los sueros de humanos. Gracias a todos por los sueros que fueron indispensables para este estudio. También mi agradecimiento al Dr. Gudberto por los antígenos utilizados y al Dr. Raúl Ponce por todo el apoyo y tiempo que me dedicó en las asesorías del manejo de datos y análisis estadísticos.

Agradezco también a las personas importantes en mi vida y que siempre han estado a mi lado:

A mi amada abuelita Pili, que aunque ya no te encuentres en este plano terrenal, te llevo siempre en mi mente y en mi corazón, eres y serás por siempre mi mayor inspiración de amor y fortaleza. Gracias a mi familia: a mis padres, mis hermanos y abuelito, su amor, apoyo, comprensión y unidad es el pilar de mi vida. Diego eres mi amor y compañero de vida, gracias por estar y alentarme en todo momento, por tanta paciencia y amor que me das.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. AGENTES ETIOLÓGICOS	5
1.1.1. Clasificación taxonómica	5
1.1.2. Morfología.....	5
1.1.3. Hábitat y distribución	6
1.1.4. Factores de virulencia.....	7
1.1.5. Identificación molecular.....	8
1.2. COCCIDIOIDOMICOSIS	9
1.2.1. Cuadros clínicos	9
1.2.2. Diagnóstico.....	9
1.2.3. Tratamiento.....	10
1.2.4. Epidemiología.....	10
1.3. INMUNOLOGÍA	11
1.3.1. Serología.....	12
1.3.2. Ensayo inmunoenzimático.....	13
1.3.3. Eficacia de la prueba.....	15
2. ANTECEDENTES	178
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. JUSTIFICACIÓN.....	19
5. HIPOTESIS	20
6. OBJETIVOS	21
6.1. General	21
6.2. Particulares.....	21
7. DISEÑO Y MÉTODOS	22
7.1. Muestras de suero.....	22
7.2. Antígeno	22
7.3. Conjugado	233
7.4. Método de ELISA	233
7.5. Estandarización de ELISA	24
7.5.1. Sueros humanos.....	244
7.5.2. Sueros caninos	25
7.5.3. Puntos de corte.....	26
7.5.4. Pruebas definitivas.....	26
8. RESULTADOS	28
8.1. Diluciones óptimas sueros humanos	28
8.2. Diluciones óptimas sueros de perros	30
8.3. Puntos de corte	30
8.4. Eficacia del método de ELISA para humanos	31
8.5. Eficacia del método de ELISA para Perros.....	31
8.6. Pruebas definitivas humanos	32
8.6.1. Titulación de sueros positivos	35
8.7. Pruebas definitivas Perros	36
9. DISCUSIÓN.....	38
10. CONCLUSIONES.....	40
11. REFERENCIAS	41

INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis o fiebre del Valle de San Joaquín es una enfermedad causada por hongos ascomicetos del género *Coccidioides* con dos especies descritas: *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*, las cuales morfológicamente no presentan diferencias, sólo con técnicas moleculares se han podido diferenciar. En los libros se menciona que estos microorganismos viven en el suelo de zonas áridas e infectan al hombre y a otras especies de mamíferos por vía respiratoria mediante sus artroconidios¹

AGENTES ETIOLÓGICOS

Clasificación taxonómica²

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Eurostiomycetes

Subclase: Eurotiomycetidae

Orden: Onygenales

Familia: Onygenaceae,

Género: *Coccidioides*

Especies: *immitis*

posadasii

Morfología

Las dos especies de *Coccidioides* son hongos dimórficos, en medios de cultivo desarrollan hifas y en su forma parasitaria desarrolla una estructura conocida como esférula. El hongo crece en tres o cuatro días y lo hace en casi todos los medios de cultivo, preferentemente en Mycosel[®]. La morfología puede ser muy variable. A 25-37°C en Sabourad dextrosa agar, las colonias son húmedas, glabras, membranosas e inicialmente grises, para posteriormente producir micelio de tipo algodonoso y blanco. (Figura 4) Con el tiempo, las colonias se tornan de color marrón pálido.²⁷ Al

microscopio se observa la presencia de hifas hialinas, tabicadas y delgadas formadoras de arthroconidios.



Figura 4. Colonia blanca algodonosa de *Coccidioides* sp en agar dextrosa de Sabouraud a 25° a 5 días de crecimiento ¹⁶

La separación de los arthroconidios es mediante el proceso de rexolisis, el cual consiste en la degradación completa de la célula adyacente, diferenciándose como segmentos que se separan, produciendo células individuales. Tienen forma de barril y miden aproximadamente de 3-5 μm de tamaño. En condiciones secas, los arthroconidios son esporas muy estables, permaneciendo viables por muchos años. Como parásito, el hongo forma grandes esférulas de pared gruesa, redondas de 10-80 μm de diámetro, llenas de endosporas de 2-5 μm de tamaño.²⁷ Cuando las esférulas se rompen, las endosporas son liberadas en paquetes, y cada una de ellas es capaz de desarrollar una nueva esférula a menos que el sistema inmune del huésped o mediante tratamiento antifúngico se reprima el crecimiento del hongo.⁴

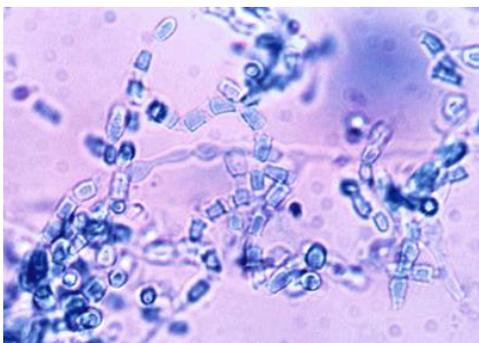


Figura 1. Hifas hialinas, tabicadas y delgadas formadoras de arthroconidios en forma de barril teñidas con azul de algodón, observado a 10x ¹⁶

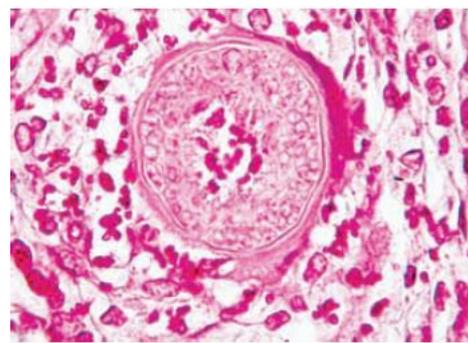


Figura 2. Corte histológico teñido con Hematoxilina-Eosina y observado a 40x, en el que se comprueba la presencia de una esférula con endosporas de *Coccidioides*.¹²

Hábitat y distribución

Estos hongos dimórficos presentan una distribución geográfica en América, generalmente en zonas caracterizadas con clima árido o semiárido. Las zonas que se consideran endémicas de EUA es la parte sur: Arizona, California, Nevada, Nuevo México, Utah y Texas. En México se distinguen tres zonas endémicas, una en la franja fronteriza norte que abarca Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, así como parte de Durango, Zacatecas y San Luis Potosí; otra zona, en el litoral del Pacífico incluye a Sonora, Sinaloa y Nayarit, y finalmente, pequeñas zonas semidesérticas en Colima, Michoacán y Guerrero. Se han descrito otras zonas endémicas de menor importancia en: Guatemala, Honduras, El Salvador, Venezuela, Paraguay, Colombia, Argentina y Brasil.⁴ El clima templado de invierno típico de las regiones endémicas proporciona las condiciones óptimas para el crecimiento del hongo, y los veranos secos y calurosos facilitan la dispersión de los arthroconidios en el aire. Sin embargo, la distribución de *Coccidioides* spp. en el suelo de dichas regiones es irregular, incluso en aquellas con una alta incidencia de infección.²³ Se ha demostrado que su hábitat también se caracteriza por suelos con altos niveles de nutrientes esenciales como hierro, calcio y magnesio. Además, hallazgos adicionales apoyan la capacidad de este hongo para crecer en casi cualquier tipo de suelo del desierto, incluidos aquellos con niveles bajos de pH; también puede tolerar temperaturas extremas del aire que van desde -40.0 a 48.8 ° C y temperaturas del suelo que van desde -6.5 a 60.5 ° C. Los factores abióticos pueden proporcionar condiciones favorables para su crecimiento; Un alto contenido orgánico en el suelo puede conducir a una mayor disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de hongos, mientras que el aumento de la salinidad y las altas temperaturas pueden disminuir la competencia con otros microorganismos. Por ejemplo, altas concentraciones de borato de sodio en el suelo pueden ser antisépticas para algunos microorganismos, pero no necesariamente a *Coccidioides* spp.²⁴

Factores virulencia

Existe evidencia que muestra que los fagocitos del hospedero son ineficientes en la eliminación de los propágulos infecciosos. La parte exterior de los arthroconidios de *Coccidioides* spp se deriva de la pared de la hifa original, la cual es una envoltura hidrófoba que puede ser una adaptación para la dispersión aérea a partir del suelo, también sirve como una protección pasiva contra la destrucción de las enzimas y

productos oxidativos liberados por las células de defensa del hospedero y, por lo tanto, contribuir a la sobrevivencia del patógeno. Otros factores incluyen su gran capacidad de reproducción; se estima que cada esférula es capaz de producir 800 endosporas en promedio, siendo cada una de ellas, una esférula potencialmente patógena y la sustancia “mucilaginosa” que envuelve a las endosporas cuando emergen de la esférula la protegen de los fagocitos del hospedero. Los procesos bioquímicos y fisiológicos también están involucrados en la virulencia, entre ellos la participación de grupos sulfidhrilo y disulfato, receptores hormonales y proteinasas tanto intra- como extracelulares (elastasas, colagenasas y ureasas entre otras).²⁷

Se ha visto que la presencia de metaloproteinasa (MEP1), secretada durante la diferenciación de la endospora, digiere un antígeno en la superficie celular del gen SOWgp e impide el reconocimiento de las endosporas cuando las células fúngicas son más vulnerables a las defensas celulares fagocíticas del huesped.⁵

Otra característica que se ha visto es la producción de amoniaco de las esférulas por la descomposición enzimática de la urea, lo que alcaliniza el pH del entorno, que propicia un ambiente idóneo para el óptimo desarrollo de *Coccidioides* spp., y favorece el desarrollo de la infección.⁶

Identificación molecular

Se han clonado y caracterizado varios genes, algunos de ellos son: beta-glucosidasa 3, septina-1, isocitrato dehidrogenasa (ICDH) mRNA, proteína disulfuro isomerasa (PDI) mRNA, aminopeptidasa mRNA, 1,3-b-glucanosiltransferasa (GEL-1) y genes de esférula.²⁷ La construcción de oligonucleótidos (*primers*) para identificar las especies de *Coccidioides* spp ha sido de gran utilidad para poder diferenciarlas. Para ello se utilizan secuencias de nucleótidos que codifican para enzimas conservadas o ARNr; sin embargo, Umeyama *et al*, a partir de una secuencia del genoma probó un par de oligos específicos que son capaces de producir un amplicón de 720 pb que corresponde a una determinada posición de nucleótidos en *C. immitis*. El mismo análisis de la secuencia de nucleótidos del ADN amplificado, reveló que el amplicón de *C. posadasii* tenía una deleción contigua de 86 pb en comparación con la de *C. immitis*, por lo tanto, una deleción contribuyó a la distinción conveniente de dos especies muy cercanas, *C. immitis* y *C. posadasii*, que previamente habían sido difíciles de distinguir³. Los análisis filogenéticos, con diversas técnicas como los polimorfismos obtenidos por nucleótidos

simples, genes y microsatélites, han detallado los principales patrones *locus*-específicos, resultados que han demostrado dos grandes grupos: *Coccidioides immitis* (Grupo II o CA) y *Coccidioides posadassi* (Grupo I o no-CA). *C. posadassi* representa genéticamente un clado monofilético recombinante divergente y que puede ser distinguido de *C. immitis* por numerosos polimorfismos en el DNA.²⁷

COCCIDIOIDOMICOSIS

Cuadros clínicos

Por la presencia en el polvo de la forma infectante y debido al mecanismo de transmisión (inhalación), la enfermedad pulmonar es la más frecuente. Sesenta por ciento de los individuos que se infectan con *Coccidioides spp.*, cursan asintomáticos, o presentan un cuadro indistinguible de una infección leve de vías respiratorias superiores. En el resto de los casos, la sintomatología aparece después de aproximadamente tres semanas de haber adquirido la infección. El cuadro clínico típico se caracteriza por la presencia de signos y síntomas generales como son fiebre, diaforesis, anorexia, artralgias acompañados de tos, expectoración y dolor pleural. La coccidioidomicosis extrapulmonar casi siempre es secundaria a la diseminación a partir de un foco primario pulmonar; se presenta en uno de cada 200 sujetos infectados. Los sitios más comúnmente afectados son las meninges, huesos, articulaciones, piel y tejidos blandos. La diseminación miliar aguda es poco frecuente y generalmente fatal. Las formas diseminadas son más frecuentes en el varón, en mujeres durante el embarazo y en sujetos inmunocomprometidos.⁹

Diagnóstico

Las manifestaciones iniciales aparecen tres o cuatro semanas después de la infección de la forma infectante. El diagnóstico se puede efectuar en muestras de expectoración, costras húmedas, secreciones de heridas de piel, material drenado por fístulas o necrosis de ganglios, así como en fragmentos de tejidos obtenidos por biopsia. La base del diagnóstico definitivo de la coccidioidomicosis constituye en el aislamiento por cultivo; el hongo se desarrolla en 3 o 4 días; sin embargo, la determinación taxonómica se hace en cultivos de 10 a 15 días de incubación, observándose colonias de color blanco. La identificación a partir del cultivo se lleva a cabo actualmente mediante el uso de una

sonda genética.²⁷ La observación e identificación microscópica de las esférulas en examen directo de muestras de tejidos o fluidos también se considera como criterio diagnóstico. Asimismo, las improntas obtenidas de las lesiones o los frotis de los fluidos se fijan y se tiñen para demostrar las estructuras fúngicas mencionadas.¹¹

Tratamiento

Como tratamiento se utiliza la anfotericina B desoxicolato, así como las formulaciones lipídicas de este antifúngico y los compuestos azólicos como el fluconazol, el itraconazol, el voriconazol y el posaconazol que han demostrado ser activos contra los hongos del género *Coccidioides*. En general la anfotericina B es la indicada en los casos más graves de esta micosis y los compuestos azólicos en las formas de evolución crónica, incluyendo la meningitis y como tratamiento de consolidación una vez superado el peligro inicial.¹³

Epidemiología

La prevalencia de infección por *Coccidioides* spp en nuestro país ha sido reportada en forma aislada, con tasas que oscilan entre 10% y 40%. Esta infección ha mostrado un aumento de su frecuencia en los últimos 10 años, particularmente en niños y en adultos mayores de 45 años, aunque la enfermedad puede afectar a individuos de cualquier edad; en niños muy pequeños y ancianos la infección es grave y frecuentemente tiene una evolución desfavorable.²⁷ Existen escasos estudios epidemiológicos recientes sobre prevalencia de esta infección en algunos estados mexicanos, sólo se tiene un registro que comprende de los años 2000 a 2014 en los cubos dinámicos de la Secretaría de Salud; se tiene un total de 661 casos egresados, donde la mayoría de casos se encuentra en Sonora con un total de 294 y 48 registrados en Baja California. Ahí mismo podemos encontrar una lista con un total de 210 casos de defunciones, la mayoría provenientes de Sonora con un total de 84 casos, seguido de Baja California con 79 y Nuevo León con 60 casos.⁸ La mayoría de los brotes de coccidioidomicosis se han visto relacionados a actividades agrícolas, expediciones arqueológicas, la industria de la construcción, exploraciones petroleras y otras en que se remueve tierra.²⁷

La enfermedad también ha sido reportada en los animales, particularmente en los equinos, en los perros, en ratones de vida silvestre, entre otros.

INMUNOLOGÍA

Una vez inhalados los artroconidios, se alojan en los alveólos pulmonares, en donde los macrófagos y neutrófilos, son la primera línea de defensa contra la infección. Los neutrófilos producen quimiotácticos que desencadenan el proceso inflamatorio produciendo mayor respuesta ante el microorganismo; también activa el sistema de complemento, los macrófagos fagocitan los artroconidios pero no pueden lissarlas, sino hasta que son activados o sensibilizados por los linfocitos TH1, lo cual sucede al recibir las señales de las sustancias quimiotácticas y las encuentren los macrófagos, para que los conviertan en células presentadoras, quienes a su vez activarán a los linfocitos B, que producirán anticuerpos específicos; así mismo activarán a los linfocitos TH2 que son fundamentales para activar las células NK específicas para combatir al hongo en su fase parasitaria. Otras células que también pueden presentarse son los eosinófilos y los mastocitos que liberan histamina e IgE en gran cantidad⁵ Esta respuesta en individuos inmunocompetentes es capaz de suprimir el progreso de la infección, autolimitándola. Por el contrario, los individuos que presentan supresión de la inmunidad mediada por linfocitos T desarrollan enfermedad pulmonar severa y frecuentemente presentan diseminación.⁹

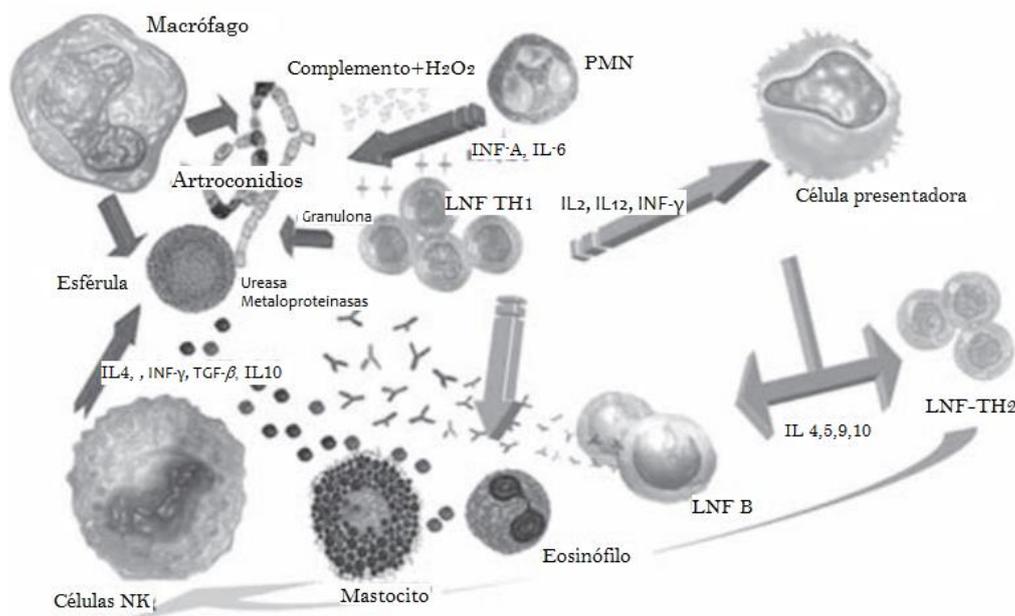


Figura 3. Proceso inmunológico que se desencadena al inhalar artroconidios de *Coccidioides spp*¹⁰

Serología

La serología es una rama de la inmunología que estudia las interacciones antígeno-anticuerpo para su aplicación en el diagnóstico clínico. Un antígeno (Ag) se define como una sustancia, generalmente una proteína, que cuando infecta un animal de sangre caliente, induce a la formación de proteínas que reaccionan específicamente con el Ag; dichas proteínas se denominan anticuerpos (Ac).⁷

Las personas que han padecido coccidiodomicosis o han estado en contacto con el hongo, habitualmente producen Ac específicos que pueden ser detectados mediante técnicas serológicas convencionales tanto en suero como en líquido cefaloraquídeo.¹¹

Los métodos serológicos estandarizados son:

- Inmunodifusión en gel de agar (ID): Utiliza un soporte de agar en el que se difunden el Ag y el Ac hasta que se ponen en contacto y dan lugar a una banda de precipitado.¹⁷
- Contraelectroforesis: Se utiliza un soporte como en la ID, sólo que a diferencia de esa técnica, se emplea una corriente eléctrica para acelerar la difusión de las moléculas. La inmunoprecipitación ocurre cuando el Ag que está en un extremo se hace migrar en el campo eléctrico a través del medio apropiado de difusión contra una corriente de Ac que migran desde el otro extremo.¹⁷
- Fijación de complemento: Se basa en que la unión Ag-Ac y formación del inmunocomplejo activa el complemento y produce complejos que lesionan membranas celulares (eritrocitos y otras células). Son pruebas que se realizan en dos fases: 1. Se incuba el suero problema con el Ag y el complemento. 2. Se añade un sistema indicador, como eritrocitos de oveja recubiertos de Ac específicos (hemolisinas). Si se lisan los eritrocitos indica que hay complemento libre que no se fijó en la 1ª reacción y, por tanto, no hay Ac en el suero.¹⁷
- Aglutinación de partículas de látex: Son pruebas de aglutinación pasiva en las que un Ag se absorbe a partículas de látex o bentonita las cuales se agrupan en presencia del Ac específico formando un agregado visible de moléculas Ag/Ac.⁷
- Inmunoensayos enzimáticos. Se basan en dos estrategias fundamentales: la específica reacción entre Ag-Ac y la detección de esta reacción usando el poder catalítico y específico de las enzimas conjugadas a un Ac o Ag.¹⁷

Ensayo inmunoenzimático

Los métodos de ELISA utilizados en serología se basan en el principio de detección de antígeno o anticuerpo. Existen diversos tipos de sistemas para su detección, pero todos los protocolos tienen en común el recubrimiento de una fase sólida en la placa de ELISA (poliestireno), con el antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac) los cuales son incubados con reactantes secundarios o terciarios acoplados con una enzima, los conjugados no unidos son removidos por lavados y luego se agrega un sustrato cromógeno o fluorogénico, y el color o la fluorescencia producida se detecta visualmente o con la ayuda de un lector de placas para ELISA.⁷ Algunos tipos de ELISA son:

Directa: Se fija al soporte el Ag, se realiza un lavado para eliminar el Ag fijado deficientemente o no fijado. Se adiciona un Ac marcado con una enzima. Un posterior lavado elimina los Ac marcados que no hayan reaccionado y al adicionar un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora, se muestra la reacción apareciendo color.¹⁴

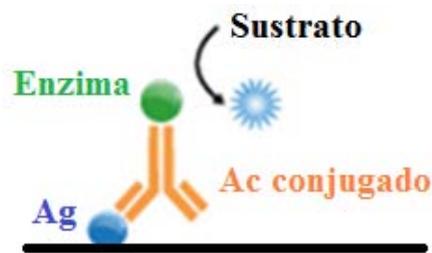


Figura 5. Esquema de ELISA Directa.

Indirecta: Se fija el Ag y se añade el suero de un paciente, procediendo a un lavado; si el suero posee anticuerpos contra ese antígeno, estos se fijan. A continuación se añaden anticuerpos dirigidos contra la IgG humana, que ha sido marcada con una enzima (anti-IgG), los cuales se unen a la IgG del suero del paciente. Al añadir un sustrato para la enzima, se produce una reacción antígeno-anticuerpo apareciendo color.¹⁴



Figura 6. Esquema de ELISA Indirecta.

Sándwich “DAS” (Double Antibody Sandwich): Se basa en fijar al soporte anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar, prosiguiendo al lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados. Al adicionar la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), si está presente el agente patógeno a diagnosticar, los anticuerpos fijados al soporte van a reaccionar con los Ag de la muestra. Tras un lavado, se adiciona un Ac específico del antígeno a detectar conjugado con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Nuevamente se recurre a otro lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado y se adiciona el sustrato sobre el que es capaz de actuar la enzima marcadora. ¹⁴



Figura 7. Esquema de ELISA Sándwich “DAS”

- Sándwich “HADAS” (Heterologous Antibody Double Antibody Sandwich): El procedimiento es exactamente el mismo que el sistema DAS, la única diferencia es que los anticuerpos marcados están conjugados con una enzima anti-

anticuerpos a los anticuerpos específicos que se utiliza para la detección del antígeno a encontrar.¹⁴



Figura 8. Esquema de ELISA Sándwich "HADAS".

Eficacia de la prueba

La eficacia es una propiedad dada por la capacidad para establecer la correlación entre el resultado y la enfermedad. Las medidas más relevantes en este caso son la sensibilidad y la especificidad. Por lo general las pruebas de monitoreo, deben ser de alta sensibilidad para poder identificar a todos los enfermos. La organización mundial de la salud (OMS), define este tipo de pruebas como "el uso de una prueba sencilla en una población saludable, para identificar a aquellos individuos que tienen alguna patología, pero que todavía no presentan síntomas". El valor que puede asumir la sensibilidad varía del 0 al 1 (100%), es decir, cuanto más alto es el valor, hay una mejor capacidad en la detección de enfermos por medio de la prueba, siendo por tanto la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga un resultado positivo. La especificidad nos indica la probabilidad de que un sujeto sano obtenga un resultado negativo. Al igual que la sensibilidad, su valor varía de 0 a 1.¹⁵ Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo), pero no en función de la verdadera condición del enfermo con respecto a la enfermedad. Para ello se recurren a los valores predictivos positivos y negativos, estimando la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo/sano. El valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en la prueba, y el valor predictivo negativo es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo (VPN) en la

prueba esté sano. Otra característica de los valores predictivos, es que dependen de la prevalencia de la enfermedad en una población. Una prueba con una sensibilidad y una especificidad dada, puede tener diferentes valores predictivos en diferentes poblaciones de pacientes con diferente prevalencia de la enfermedad. Si una prueba es utilizada en una población con un alta prevalencia de la enfermedad, la prueba en evaluación tendrá un alto VPP, por otro lado, esta misma prueba, con la misma sensibilidad y especificidad, tendrá un VPP bajo, cuando es utilizada en una población con una baja prevalencia de la enfermedad.²⁶

Tabla1. Resultados de una prueba diagnóstica

	ENFERMEDAD		Total
	Presente	Ausente	
Positivo	Verdaderos positivos a	Falsos positivos b	Positivos (a+b)
Negativo	Falsos negativos c	Verdadero negativo d	Negativos (c+d)
Total	Enfermos (a+c)	Sanos (b+d)	N (a+b+c+d)

Tabla 2. Indicadores importantes en el estudio de una prueba diagnóstica.

Indicador	Cálculo
Sensibilidad	$a / (a+c)$
Especificidad	$d / (b+d)$
Valor predictivo positivo	$a / (a+b)$
Valor predictivo negativo	$d / (c+d)$

2. ANTECEDENTES

En 2008 Durkin y cols., purificaron un antígeno específico de *Coccidioides* spp, utilizando un inmunoanálisis enzimático (IAE), probándolo en pacientes con otras micosis, obteniendo buena sensibilidad sólo en pacientes con formas severas de coccidioidomicosis y reacciones cruzadas en pacientes con otras micosis.²⁵

En 2011 Humbría y cols., evaluaron un IAE para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con coccidioidomicosis, comparándolo con un ensayo de inmunodifusión (ID). Sugirieron mejorar la calidad del antígeno y la optimización de las diluciones del suero que puedan garantizar la disminución de falsos positivos, falsos negativos y reacciones cruzadas.¹⁸

Shubitz y cols., en 2005 Realizaron un estudio para determinar la incidencia de la infección por *Coccidioides* sp entre los perros que residen en una región endémica (condados de Pima y Maricopa, Arizona) y estimar la tasa de enfermedad clínica utilizando pruebas de ID. Encontraron que los perros jóvenes que viven en el área de estudio tenían una alta probabilidad de infectarse con *Coccidioides* spp, pero pocos desarrollan la enfermedad clínica y que la prueba serológica sola es insuficiente para el diagnóstico de la enfermedad clínica ya que se superponen los títulos entre perros clínicamente infectados y lo que son positivos pero sin presentar manifestaciones clínicas de la enfermedad.²¹

Álvarez Gómez, en 2013 Evaluó la cantidad de títulos de anticuerpos anti-*Coccidioides* en sueros de perros que provenían de un área endémica (Torreón) y de otra no endémica (Distrito Federal) donde no mostró diferencia significativa en dichos títulos. Esto lo adjudicó al tipo de antígeno utilizado, las técnicas utilizadas (ID y CIE), a la inmunidad de los perros y a la procedencia de las muestras séricas de éstos.²²

Catalán y cols,. En 2014 utilizaron ELISA en muestras de ratones silvestres, resultando efectivo el método para la identificación de anticuerpos anti-*Coccidioides*, y sentó bases para estudios ecológicos de este hongo.²⁰

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se sabe que el hongo *Coccidioides* spp particularmente se encuentra al norte del país considerándolo endémico. Se tienen reportes que los humanos, perros y otros mamíferos son susceptibles a contraer la infección y desarrollar anticuerpos específicos al habitar en dichas zonas, sin embargo, se tienen pocos estudios que comparen los títulos de anticuerpos en sueros provenientes de zonas endémicas con sueros que provengan de otras zonas, en los cuales quedan ambiguos los resultados y sin concluir cuál es el impacto epidemiológico. Por tanto, es necesario realizar una investigación que ayude a discernir la importancia de los porcentajes de positividad entre zonas y así conocer si los resultados sugieren una endemidad de *Coccidioides* spp y cuál es el significado epidemiológico e importancia con el que debe tratarse este problema.

JUSTIFICACIÓN

El último dato oficial, referente a la morbilidad de coccidioidomycosis fue notificado por la Secretaría de Salud en 1994; desde entonces, en México se desconoce la frecuencia de morbilidad, mortalidad e infección por coccidioidomycosis.

Con los resultados de este estudio conoceremos:

- La frecuencia de anticuerpos contra *Coccidioides* en dos zonas consideradas endémicas de coccidioidomycosis.
- Para que la frecuencia obtenida tenga sustento epidemiológico, se comparará el resultado con el obtenido en población humana perteneciente a una zona no endémica de coccidioidomycosis
- El mismo ejercicio se desarrollará para el caso de los sueros de perros.

Por los puntos expuestos, se considera que esta investigación contribuirá con datos reales y actualizados de la situación epidemiológica de la coccidioidomycosis en nuestro país.

HIPOTESIS

Las muestras de sueros de personas y de perros que radican en zonas endémicas de coccidioidomicosis, tendrán mayor cantidad de anticuerpos que las muestras homólogas provenientes de zonas no endémicas.

OBJETIVOS

General

- Conocer la frecuencia de anticuerpos anti-*Coccidioides* en personas y perros de zonas endémicas y no endémicas de nuestro país, utilizando el método de ELISA.

Particulares

- Estandarizar el método de ELISA.
- Comparar el título de anticuerpos específicos en los diferentes tipos de poblaciones estudiadas.
- Estimar la prevalencia de infección en cuatro poblaciones distintas.

DISEÑO Y MÉTODOS

Muestras de suero

Se procesó un total de 190 sueros humanos de zona no endémica provenientes de la Ciudad de México proporcionados por un hospital particular ubicado en la zona sur de la Ciudad de México y 260 sueros de zona endémica, de los cuales 119 procedían de Ensenada, Baja California y 141 del Hospital Infantil de Hermosillo, Sonora.

Los sueros de perros estudiados tuvieron el siguiente origen: 110 de la Ciudad de México, donados por el Hospital Veterinario UNAM-Banfield y 87 de Baja California proporcionados por la Perrera Municipal de Ensenada, Baja California.

Para las pruebas en sueros humanos, se utilizaron como controles positivos, 8 sueros de pacientes diagnosticados con coccidioidomicosis por cultivo. En las pruebas de reacciones cruzadas se utilizaron 30 sueros positivos a otras micosis (12 aspergilosis y 18 histoplasmosis) proporcionados por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Como controles de los sueros de caninos, se usaron dos sueros de perro positivos a coccidioidomicosis por doble inmunodifusión (ID) proporcionados por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Como controles negativos se utilizaron 50 de los 190 sueros de personas residentes en la Ciudad de México y 25 sueros de perros de los 110 del Hospital Veterinario UNAM-Banfield.

Antígeno

Se utilizó el antígeno coccidioidina, proporcionado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), que contenía 2.9mg /mL de proteína. Se hizo una preparación de 1mg/mL la cual fue diluida obteniendo una concentración de 34µg/mL para sensibilizar las placas utilizadas para el método de ELISA.

Conjugado

Se utilizó una Anti-IgG Humana con peroxidasa en cabra de la marca Invitrogen® y una Anti-IgG Canino marca Sigma®, Aldrich.

Método de ELISA

- Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos que se sensibilizaron con una preparación de 10 µL de coccidioidina (antígeno, Ag) en 10ml de buffer de carbonatos, colocando 100 µL/ pozo.
- Se incubó por 18 horas a 4°C en refrigeración.
- Se desechó el exceso de Ag lavando tres veces (1 minuto cada vez) con 200 µL/pozo de buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4, 0.05% de Tween 20).
- Para el bloqueo de sitios inespecíficos, se colocaron 200 µL/pozo de PBS, pH 7.4 con leche descremada 5% incubando a 37°C.
- Los sueros se prepararon diluyéndolos en PBS-leche al 1% en dilución 1:200, colocando 100 µL/pozo y se incubaron media hora a 37°C
- Se desechó el exceso de reactivo lavando tres veces (1 minuto cada vez) con 200 µL/pozo de buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4, 0.05% de Tween 20).
- Se preparó una dilución a 1:4,000 de Anti-IgG humana con peroxidasa y Anti-IgG canino en PBS-leche al 1%, colocando 100 µL/pozo por media hora a 37°C.
- Se desechó el exceso de reactivo lavando tres veces (1 minuto cada vez) con 200 µL/pozo de buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4, 0.05% de Tween 20).
- El sustrato se preparó al momento, utilizando 4 mg de ortofenilendiamina en 10 mL de buffer de citratos y 10 µL de peróxido (H₂O₂) al 30%.
- Luego de 15 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz, la reacción se interrumpió con 50 µL de ácido fluorhídrico 0.1M, pH 3.3.
- Las densidades ópticas se obtuvieron con el lector de ELISA (espectofotómetro), a una longitud de 492 nm. Los resultados finales de la lectura colorimétrica se reflejaron numéricamente mediante valores de absorbancia o densidad óptica.

Estandarización de ELISA

Sueros humanos

Para establecer las diluciones óptimas de los componentes antes mencionados se probaron tres diluciones diferentes de antígeno (1:500, 1:1,000 y 1:1,500), cuatro de conjugado (1:2,000; 1:2,500; 1:3,000 y 1:4,000), una con los sueros control positivo (1:100) y dos con los sueros normales (1:100 y 1:200) (Fig. 9).

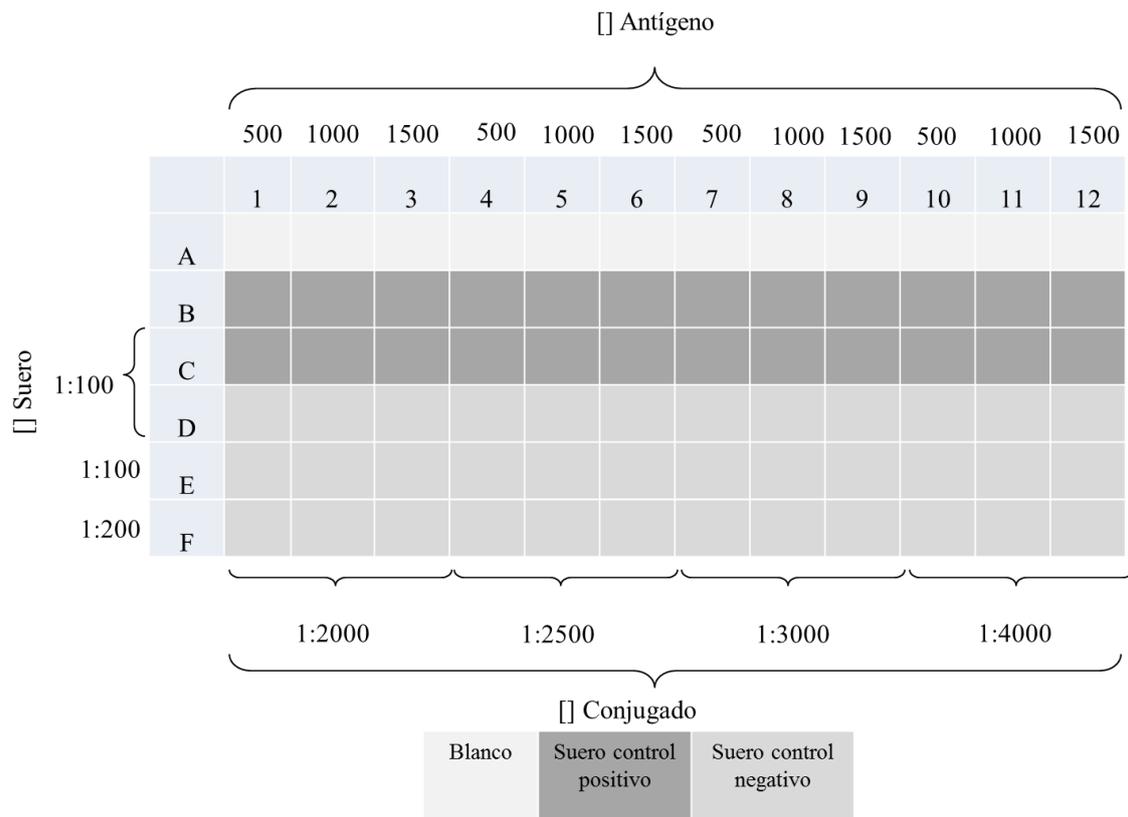


Figura 9. Modelo para establecer las diluciones óptimas del antígeno, suero y conjugado en sueros de humanos.

Una vez obtenida la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm, se observó y determinó en qué punto las lecturas se mantenían constantes.

La prueba para identificar reacciones cruzadas se diseñó como se muestra en la figura 10.

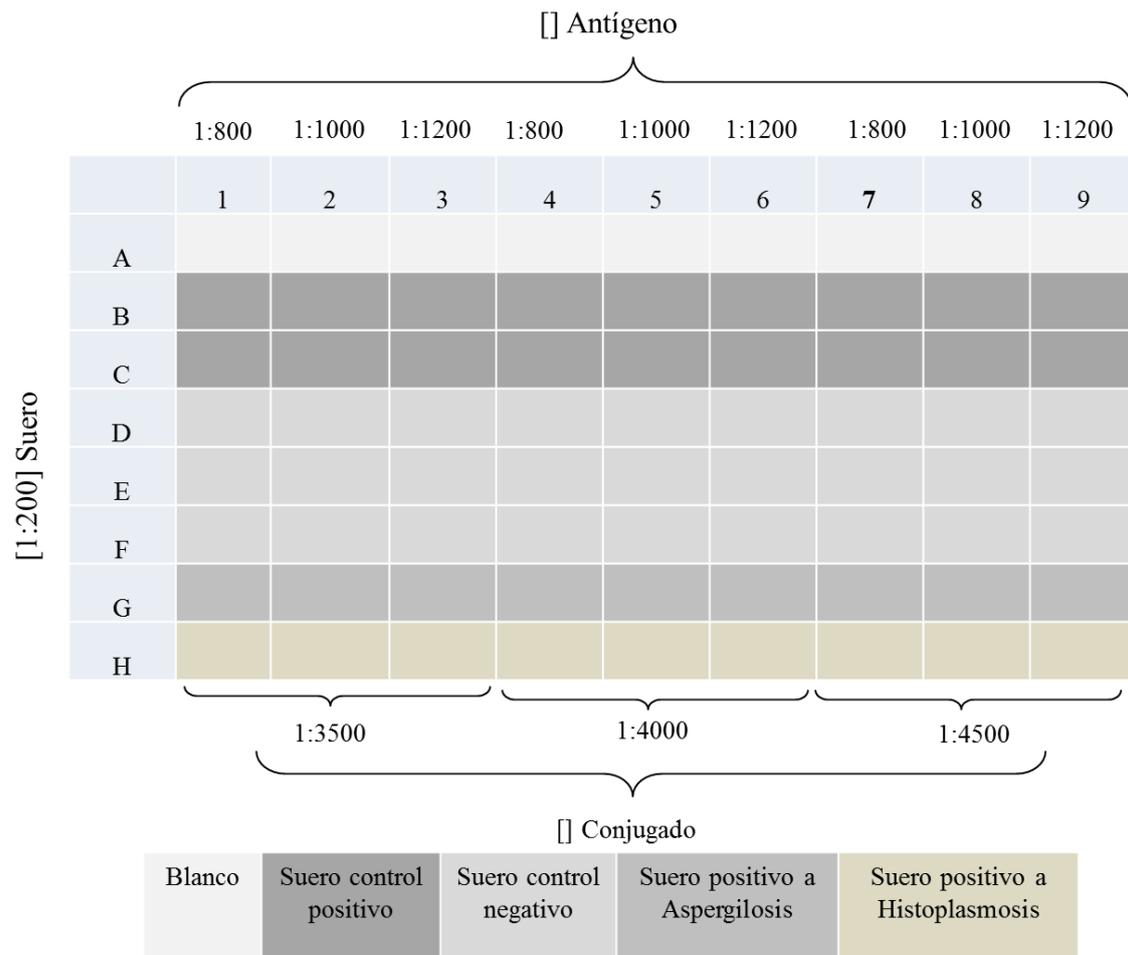


Figura 10. Modelo para la prueba de reacciones cruzadas.

Con este modelo se establecieron las diluciones donde se obtenía la densidad óptica más baja en las lecturas de los sueros con histoplasmosis y sueros normales pero que se conservaran altas en los sueros con coccidioidomicosis.

Sueros caninos

Para establecer las diluciones óptimas de los componentes en ELISA se probaron dos diluciones diferentes de antígeno (1:1,000 y 1:1,500), tres de conjugado (1:12,500; 1:25,000; 1:30,000) y dos en los sueros control positivo y normales (1:250 y 1:500) (Fig. 11).

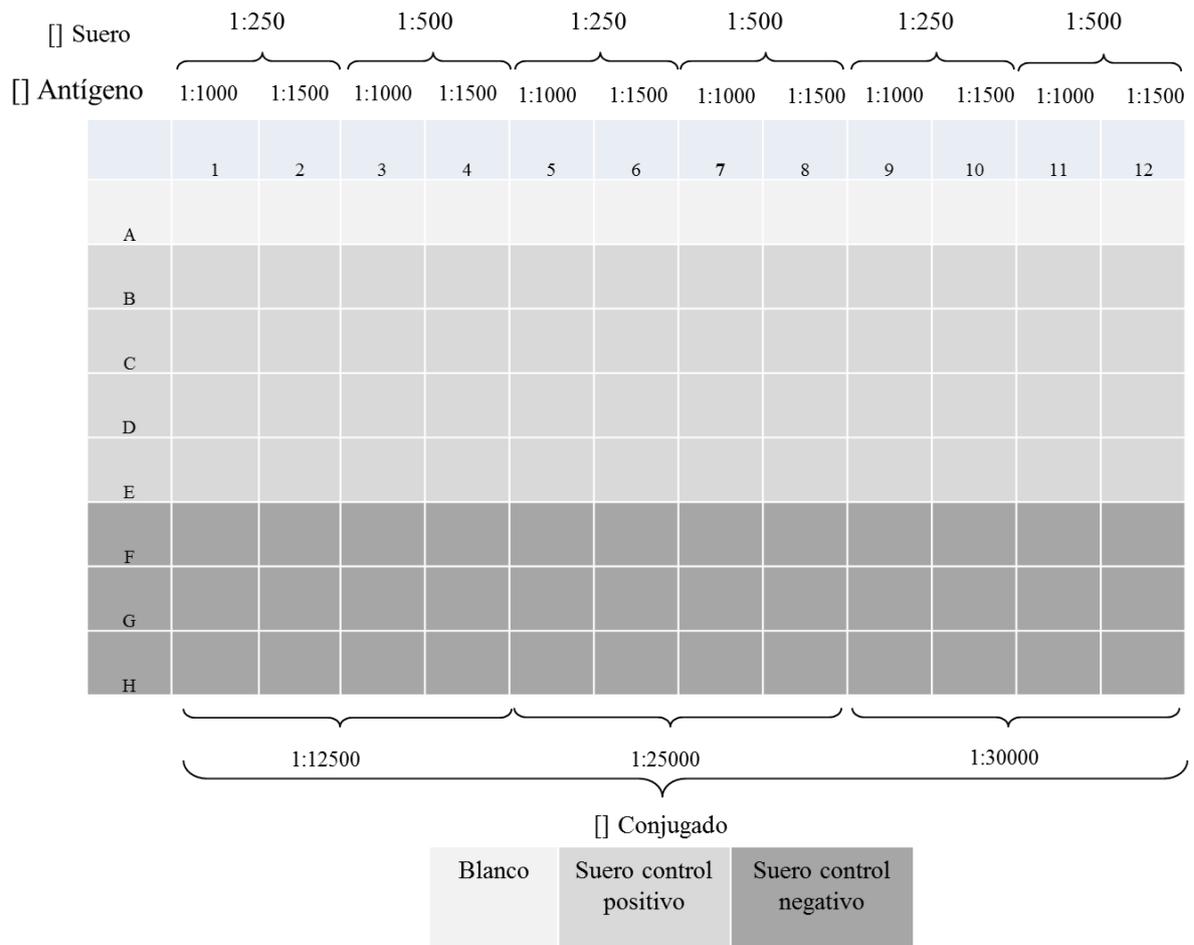


Figura 11. Modelo para establecer las diluciones óptimas del antígeno ,del suero y del conjugado en sueros de perros.

Puntos de corte

Para la obtención de los puntos de corte, se probaron los 50 sueros humanos como controles negativos, las lecturas se promediaron y se sumó el valor de la desviación estándar dos veces. De igual forma se procedió con los 25 sueros de perros controles negativos. A partir del resultado obtenido, se obtuvo el punto de corte a partir del cual se consideraron los sueros como positivos.

Pruebas definitivas

Una vez establecidas las condiciones óptimas para el funcionamiento del sistema de sueros de humanos y de perros, se analizaron las muestras de acuerdo al diseño de la figura 12.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B	B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
D	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
E	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
F	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
G	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
H	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47

Figura 12. Modelo de colocación de las muestras por duplicado en las placas de poliestireno para ELISA.

Posteriormente, se realizó una prueba por triplicado con algunos sueros positivos de ambas zonas, para conocer los títulos hasta donde todavía se mantenían como tales. Lo anterior se muestra en la figura 13.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
B												
C	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
D												
E												
F												
G												
H												

Blanco

Sueros zona no endémica

Sueros control positivo

Suero zona endémica

Figura 13. Modelo de diluciones que se hicieron a los sueros que resultaron positivos con el método de ELISA.

RESULTADOS

Diluciones óptimas sueros humanos

En este modelo se observó que la dilución de antígeno 1:1000, conjugado 1:4000 y suero 1:200, los sueros control negativo eran bajos y los sueros control positivo a coccidioidomicosis se mantenían relativamente altos a una dilución 1:100.(Fig.14)

		[] Antígeno												
		500	1000	1500	500	1000	1500	500	1000	1500	500	1000	1500	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
[] Suero	1:100	A	0.001	-0.019	-0.031	0.006	-0.01	0.001	0.023	0.009	-0.003	0.2	0.017	-0.005
		B	-0.015	-0.029	-0.027	-0.018	-0.011	-0.02	0.035	-0.015	-0.015	0.148	0.011	-0.01
		C	0.57	0.554	0.518	0.55	0.56	0.543	0.538	0.558	0.541	0.487	0.504	0.459
		D	0.892	0.585	0.335	0.557	0.579	0.356	0.577	0.539	0.305	0.444	0.4	0.22
		E	0.345	0.366	0.205	0.307	0.361	0.217	0.425	0.332	0.17	0.314	0.259	0.149
		1:200	F	0.181	0.189	0.098	0.157	0.158	0.102	0.326	0.164	0.095	0.254	0.128
			1:2000			1:2500			1:3000			1:4000		
		[] Conjugado												
		Blanco	Suero control positivo			Suero control negativo								

Figura 14. Lecturas de la placa de ELISA utilizada para probar diferentes diluciones de conjugado, antígeno, sueros control positivo y negativo.

En la siguiente prueba, para descartar reacciones cruzadas, se observó que a una dilución de Ag 1:1000, conjugado 1:4000 y sueros 1:200, las lecturas de los sueros normales bajaban, las lecturas de los sueros control positivo se mantenían altas y los sueros positivos a histoplasmosis se reducían aún más que los sueros control positivo. Los sueros positivos a aspergilosis no tuvieron reacción en lo absoluto. (Fig. 15)

		[] Antígeno								
		1:800	1:1000	1:1200	1:800	1:1000	1:1200	1:800	1:1000	1:1200
[1:200] Suero		1	2	3	4	5	6	7	8	9
	A	0.072	0.062	0.067	0.061	0.072	0.057	0.058	0.055	0.064
	B	0.601	0.591	0.614	0.569	0.56	0.445	0.611	0.281	0.24
	C	0.216	0.302	0.244	0.349	0.243	0.088	0.289	0.069	0.079
	D	0.13	0.096	0.09	0.104	0.1	0.074	0.087	0.071	0.074
	E	0.228	0.186	0.146	0.174	0.115	0.071	0.182	0.06	0.181
	F	0.266	0.218	0.195	0.074	0.138	0.08	0.192	0.086	0.099
	G	0.081	0.066	0.068	0.078	0.076	0.089	0.078	0.062	0.057
	H	0.511	0.405	0.22	0.359	0.067	0.114	0.289	0.071	0.08
		1:3500			1:4000			1:4500		
		[] Conjugado								
		Blanco	Suero control positivo	Suero control negativo	Suero positivo a Aspergilosis	Suero positivo a Histoplasmosis				

Figura 15. Modelo para establecer diluciones en las cuales se minimicen las lecturas altas para descartar reacciones cruzadas.

Diluciones óptimas para los sueros de perros

En este modelo se estableció que a una dilución de antígeno 1:1000, conjugado 1:25000 y suero 1:500, los sueros control positivo se mantenían por encima del punto de corte. (Fig.16)

[] Suero	1:250		1:500		1:250		1:500		1:250		1:500	
	1:1000	1:1500	1:1000	1:1500	1:1000	1:1500	1:1000	1:1500	1:1000	1:1500	1:1000	1:1500
[] Antígeno	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.063	0.061	0.061	0.062	0.062	0.061	0.064	0.066	0.067	0.137	0.082	0.079
B	0.426	0.407	0.406	0.363	0.563	0.530	0.570	0.533	0.549	0.524	0.503	0.570
C	0.417	0.405	0.419	0.380	0.558	0.543	0.579	0.523	0.570	0.509	0.517	0.540
D	0.109	0.085	0.083	0.089	0.114	0.104	0.127	0.110	0.098	0.110	0.093	0.071
E	0.106	0.085	0.080	0.088	0.114	0.102	0.130	0.109	0.096	0.109	0.090	0.068
F	0.089	0.075	0.083	0.077	0.088	0.085	0.096	0.088	0.096	0.091	0.087	0.092
G	0.073	0.068	0.068	0.081	0.075	0.077	0.077	0.079	0.083	0.080	0.084	0.090
H	0.076	0.072	0.070	0.067	0.085	0.075	0.081	0.078	0.091	0.080	0.100	0.085
	1:12500				1:25000				1:30000			
	[] Conjugado											
	Blanco				Suero control positivo				Suero control negativo			

Figura 16. Modelo para establecer las diluciones óptimas del antígeno, del suero y del conjugado para los sueros de perros.

Puntos de corte

Tabla.2 Valores obtenidos para establecer los puntos de corte a partir de la suma de la densidad óptica de los 50 sueros en el caso de los humanos y 25 sueros de caninos.

	Humanos	Perros
Suma D.O.	10.93	2.06
Promedio	0.2187	0.0824
Desviación Estándar	0.1115	0.0206
Punto de corte	0.44	0.12

Eficacia del método de ELISA para humanos

Tabla.3 Tabla para el análisis de la prueba de ELISA

	Enfermos	Sanos	Total
Positiva	7	4	11
Negativa	1	46	47
Total	8	50	58

Sensibilidad: 87.5%

Especificidad: 92%

Valor predictivo positivo: 63.6%

Valor predictivo negativo: 97.8%

Eficacia de la prueba de ELISA para Perros

Tabla.4 Tabla para el análisis de la prueba de ELISA

	Enfermos	Sanos	Total
Positiva	2	3	5
Negativa	0	22	22
Total	2	25	27

Sensibilidad: 100%

Especificidad: 88%

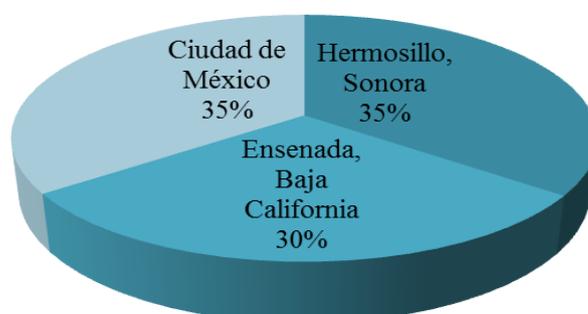
Valor predictivo positivo: 40%

Valor predictivo negativo: 100%

Pruebas definitivas en sueros de humanos

En la siguiente tabla se muestra el número total de sueros humanos que se analizaron por ciudad de origen

Distribución de los 400 sueros de humanos



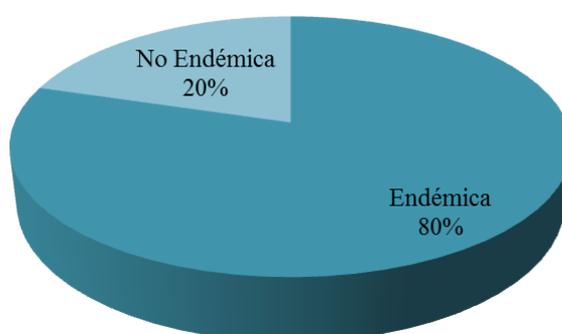
Gráfica 1. Porcentajes de muestras realizadas en cada estado de origen.

Se encontró el mayor porcentaje de positivos en Hermosillo, seguido de Ensenada y la Ciudad de México (Tabla 8). La prueba de chi-cuadrado con un valor de significancia de 0.05 muestra que en las variables zona/resultado existen diferencias significativas (Tabla 9).

Tabla.8 Frecuencias de resultados por estado de origen.

Resultado para <i>Coccidioides sp</i>	Zona endémica		Zona no endémica	Total
	Hermosillo	Ensenada	Ciudad de México	
Negativo	112	101	128	341
Positivo	29	18	12	59
Total	141	119	140	400

Distribución de los 59 sueros positivos por zonas



Gráfica 2. Porcentajes de resultados positivos por zonas.

Imágenes que muestran las placas de ELISA una vez detenida la reacción para obtener las lecturas en el espectrofotómetro.

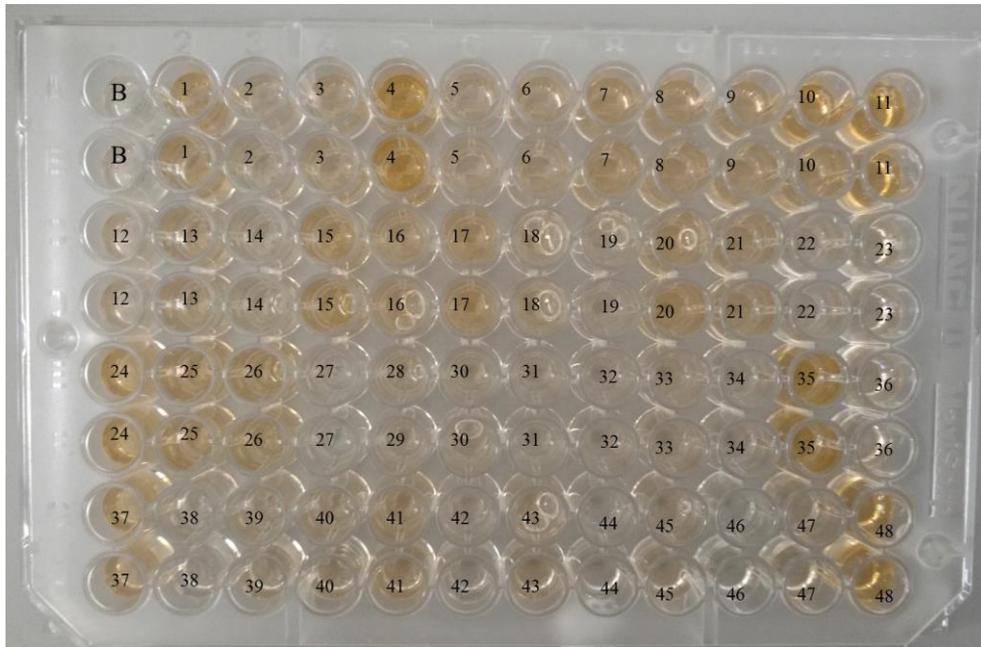


Figura 17. Placa con los sueros de zona no endémica.

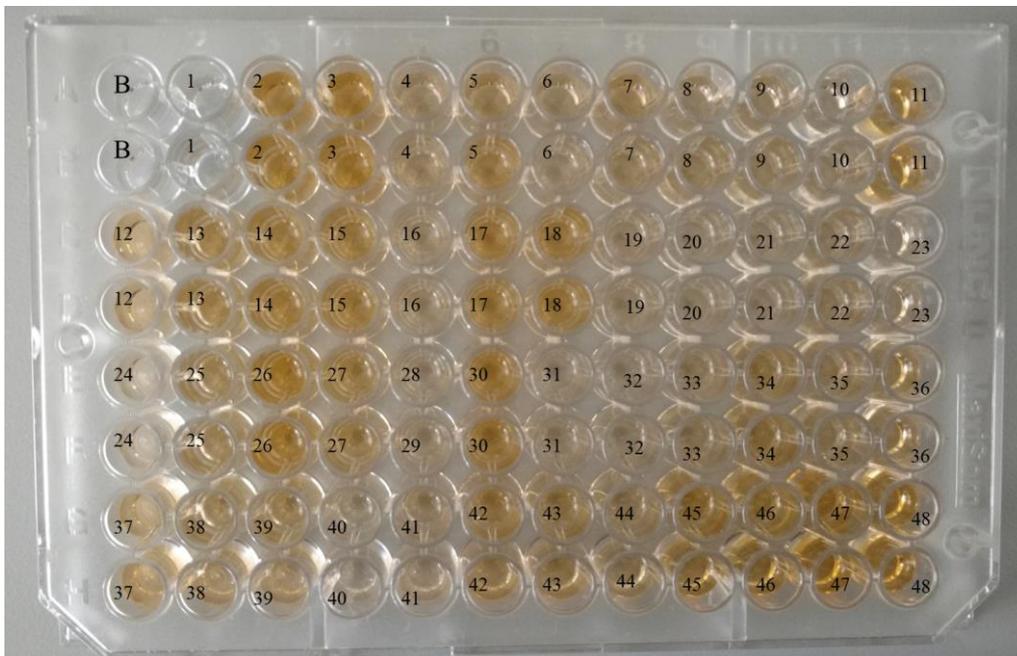
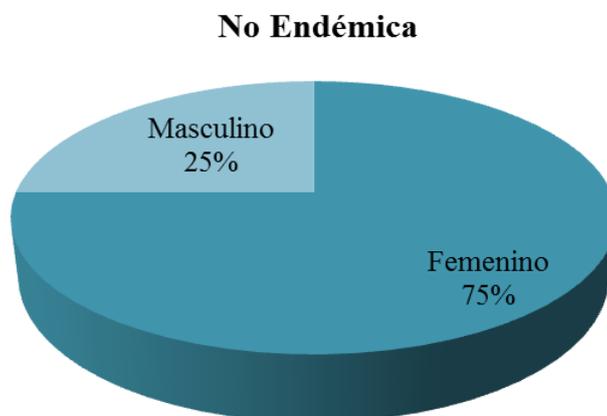
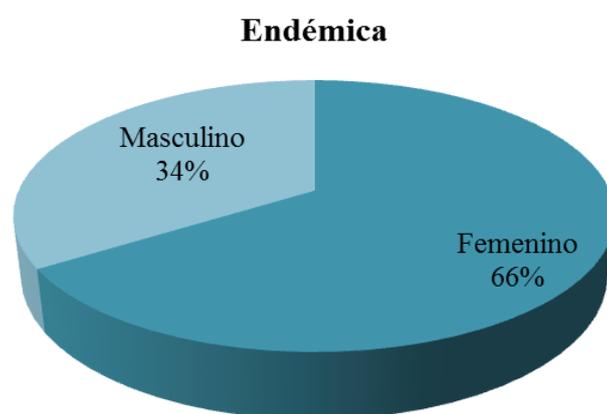


Figura 18. Placa con los sueros de zona endémica.

La prueba de chi-cuadrado con un valor de significancia de 0.05 para las variables sexo/resultado no mostró diferencias significativas en ninguna de las zonas estudiadas.



Gráfica 3. Porcentajes de los resultados positivos por diferencia de sexo en zona no endémica.



Gráfica 4. Porcentajes de los resultados positivos por diferencia de sexo zona endémica.

Para las variables edad/resultado, la prueba de chi-cuadrado con un valor de significancia de 0.05, no mostró diferencias significativas.

Tabla 13. Resultados positivos por grupos de edades.

Grupos de edad (Años)	Zona Endémica	Zona no Endémica
Niños (1-10)	14	0
Adolescentes (11-17)	13	0
Adultos (18-96)	20	12

Titulación de sueros positivos

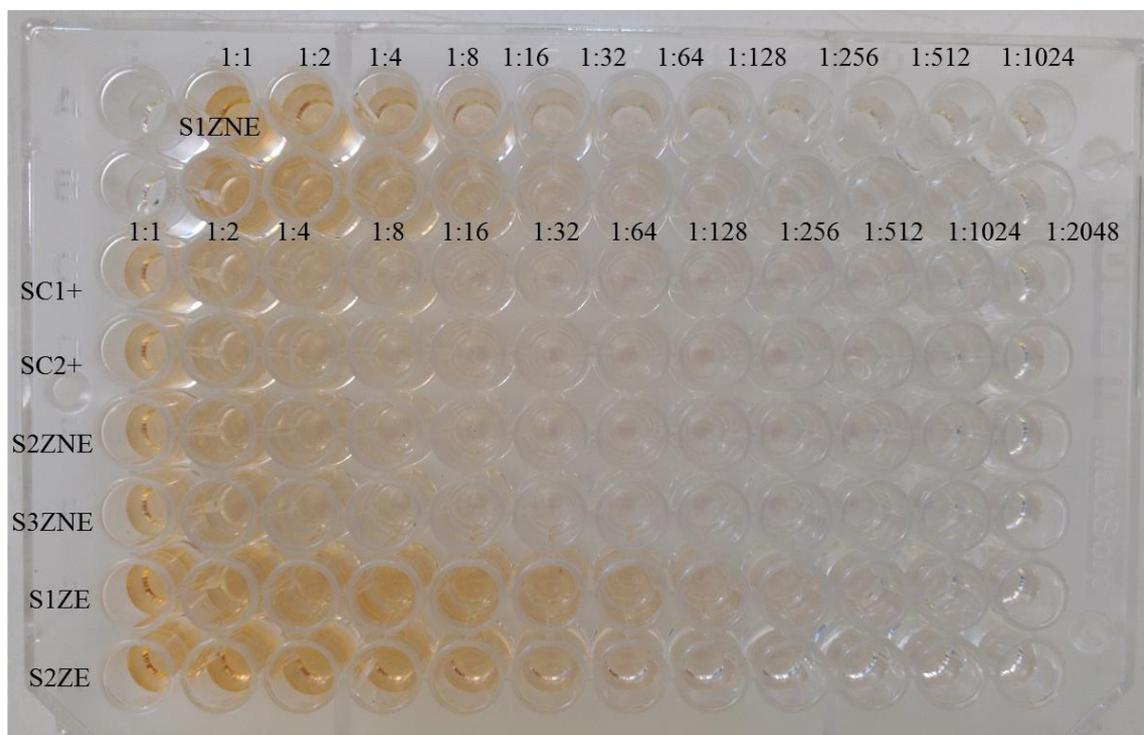


Figura 19. Placa de ELISA que muestra los títulos de los sueros, ZNE: Suero de zona no endémica, SZE: Suero de zona endémica, SC+: Suero control positivo a *Coccidioides spp.*

Tabla 9. Promedios de las densidades ópticas en las diluciones de algunos sueros que resultaron positivos de ambas zonas.

Dilución	S1ZNE	S2ZNE	S3ZNE	S1ZE	S2ZE	SC1+	SC2+
1:1	0.60	0.59	0.56	0.69	0.67	0.38	0.45
1:2	0.56	0.54	0.42	0.61	0.63	0.31	0.35
1:4	0.37	0.40	0.33	0.52	0.57	0.22	0.24
1:8	0.24	0.36	0.22	0.51	0.46	0.17	0.17
1:16	0.17	0.31	0.18	0.47	0.37	0.12	0.13
1:32	0.14	0.27	0.16	0.37	0.27	0.09	0.09

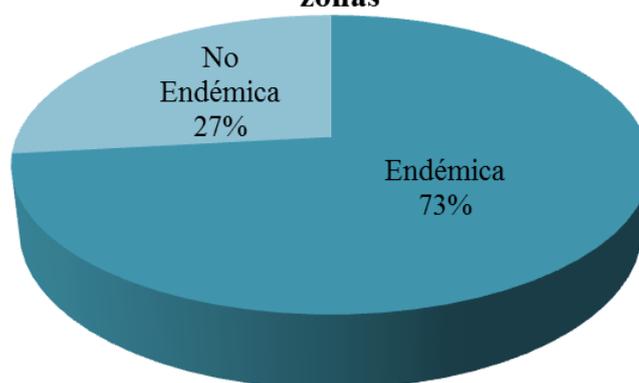
Pruebas definitivas en sueros de perros

Mediante la prueba de chi-cuadrado con un valor de significancia de 0.05, se encontró que existen diferencias significativas entre los sueros de las zonas estudiadas, teniendo más casos positivos en Ensenada.

Tabla 13. Resultados de perros por estado de origen.

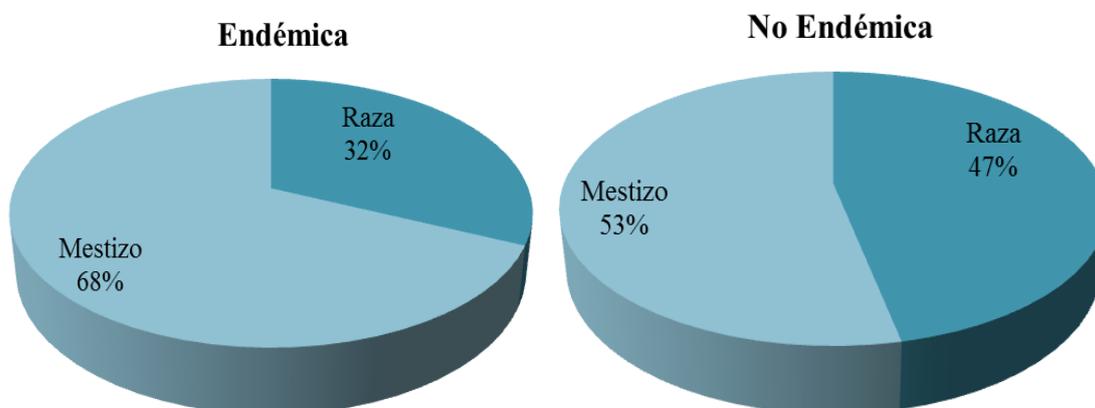
Resultado de ELISA	Ciudad y Estado de Origen		Total
	Ensenada, Baja California (Zona Endémica)	Ciudad de México (Zona no endémica)	
Negativo	46	70	116
Positivo	41	15	56
Total	87	85	173

Distribución de los 56 sueros positivos por zonas

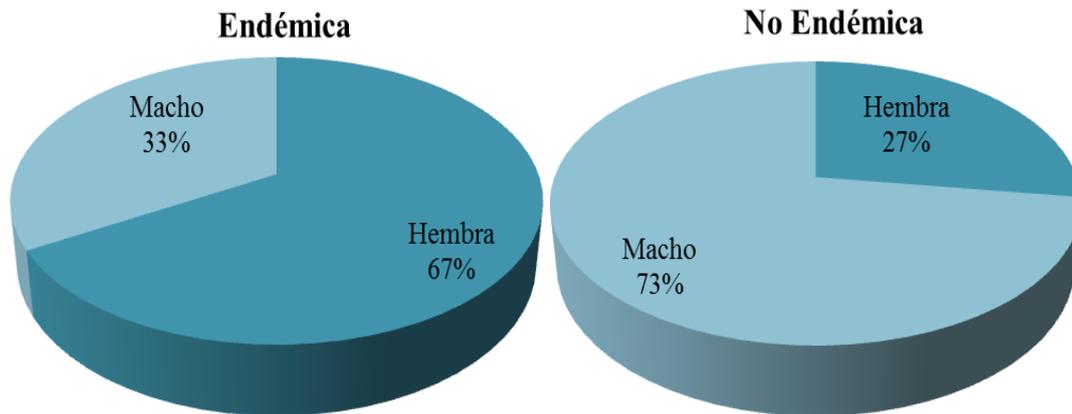


Grafica 5. Porcentajes de sueros positivos por procedencia.

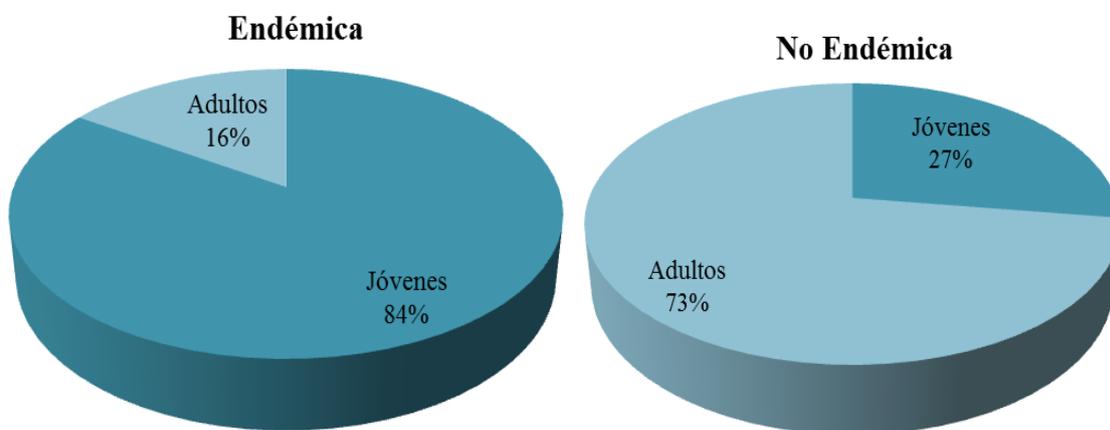
La prueba de χ^2 con un valor de significancia de 0.05 para las variables raza, sexo y edad no mostraron diferencias significativas en ninguna de las zonas.



Graficas 6 y 7. Resultados de sueros positivos por grupos de perros de acuerdo a su raza.



Grafica 8 y 9. Porcentajes de sueros de perros positivos por sexo y zona.



Grafica 10 y 11. Porcentajes de sueros de perros positivos por grupos de edad: jóvenes (de 1 mes a 4 años) y adultos (de 5 a 14 años).

Discusión

Durante la estandarización del método de ELISA se observaron variaciones en las lecturas de densidades ópticas entre sueros de humanos y de perros, utilizando los mismos parámetros de antígeno y diluciones, existiendo mayor reactividad en los sueros de humanos, lo cual indica la importancia de establecer puntos de corte para cada uno de ellos con sus propias características.

Las diferencias entre las zonas es notable al observar las placas de ELISA, ya que se apreció más color en la placa de la zona endémica (Fig.18) a comparación de la placa de zona no endémica (Fig.17). En el caso de los sueros de humanos, se encontró una diferencia significativa entre las zonas endémicas, (Hermosillo y Ensenada) con un 80%, y un 20% en la no endémica (Ciudad de México) (Gráfica 2). Sin embargo, entre zonas endémicas no se encontraron diferencias significativas. La edad y el sexo no influyeron en el resultado. En los sueros de perros el porcentaje de positivos en zona endémica es de 73% y en no endémica es de 27%, habiendo diferencias significativas al igual que en la de los humanos (Gráfica 5). La raza, sexo y edad tampoco influyeron en el resultado. (Gráficas 6 a 11).

Con la titulación de sueros positivos se pudo apreciar que los sueros de zona no endémica se mantenían positivos sólo a dos diluciones, es decir 1:2, a diferencia de los sueros de zona endémica que se mantenían a diluciones mayores, 1:8 y 1:16 (Tabla 9). Con los sueros control positivo se tuvo el inconveniente que, quizás a consecuencia de descongelarlos por tres ocasiones, se degradaron los anticuerpos presentes en el suero y por tanto no reaccionó de la misma manera que al principio del estudio. Pese a ello, con los sueros de zona endémica se pudo notar que a mayores diluciones los anticuerpos reconocibles por el antígeno de *Coccidioides* spp. Permanecen estables, pudiendo indicar que son más específicos y gracias a la sensibilidad de la prueba son detectados. Por lo contrario, los sueros de zona no endémica dejan de ser positivos ya que el antígeno no detectó anticuerpos que pudieran ser reconocidos por él, lo cual indica que probablemente no existieron Ac específicos a *Coccidioides* spp. En el caso de un suero de zona no endémica, se tiene la información que la persona de la que provenía la muestra había tenido problemas asmáticos provocados por el moho de la humedad produciéndole problemas respiratorios. A esto podría deberse la reacción positiva con

ELISA, sugiriendo que puede existir una reacción cruzada por el reconocimiento de anticuerpos que dejan de ser perceptibles o poco específico con las diluciones utilizadas..

Con la evaluación de nuestro método de ELISA se obtuvo un 87.5% de sensibilidad y un 92% de especificidad en humanos, pudiendo considerarse alta y en perros 100% de sensibilidad y 88% de especificidad, aunque, en esto hay que resaltar que fueron pocos los sueros control positivos con los que se contó para la estandarización (tabla 4), y quizá con un mayor número de sueros positivos, el margen de error disminuiría. El valor predictivo positivo, nos indica que en humanos la probabilidad de que un paciente con resultado positivo tenga la enfermedad es baja, ya que solo el 63.6% y 40% en perros podrían tener la enfermedad. Por otro lado, el valor predictivo negativo obtenido del 97.8% en humanos y del 100% en sueros de perros sugiere que las probabilidades son altas de que un paciente con resultado negativo esté sano.

Conclusiones

- Se obtuvieron mayor número de casos positivos en sueros procedentes de zonas consideradas como endémicas que en la no endémica, con cual se comprueba una posible endemidad y por tanto que la existencia de contacto con *Coccidioides* spp. por la convivencia con el reservorio natural que a su vez tiene un impacto inmunológico en los habitantes.
- En este estudio, el método de ELISA demostró ser una prueba eficiente para el monitoreo e identificación de anticuerpos anti *Coccidioides* en poblaciones humana y canina abiertas. Quizás mejorando la purificación del antígeno se pueda estandarizar este método para ser utilizado como diagnóstico.
- De acuerdo con los antecedentes, en este trabajo se logró la optimización de las diluciones del suero que ayudaron a disminuir falsos positivos, falsos negativos y reacciones cruzadas.
- Los resultados obtenidos implican dos situaciones epidemiológicas importantes:
 - 1) Alrededor del 80% de las personas que viven en área endémica de coccidioidomicosis, están inmunizadas naturalmente contra este agente.
 - 2) Es importante vigilar con regularidad a las personas inmuno-suprimidas de las áreas endémicas de coccidioidomicosis, ya que el estudio demostró que es en esos lugares en donde su contacto con el hongo es continuo y pueden desarrollar problemas que ponen en riesgo la vida del paciente.

Referencias

1. Brown, J., Benedict, K., Park, B. J., & Thompson, G. R. (2013). Coccidioidomycosis: epidemiology. *Clinical Epidemiology*, 5, 185–197.
2. Mainous III, A, Pomeroy C., (Eds). (2010). *Management of Antimicrobials in Infectious Diseases: Impact of Antibiotic Resistance*. New York, EUA. Editorial Humana Press.
3. Umeyama, T., Sano, A., Kamei, K., Niimi, M., Nishimura, K., & Uehara, Y. (2006). Novel Approach to Designing Primers for Identification and Distinction of the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR Amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1859–1862.
4. Nguyen, C., Barker, B. M., Hoover, S., Nix, D. E., Ampel, N. M., Frelinger, J. A., ... Galgiani, J. N. (2013). Recent Advances in Our Understanding of the Environmental, Epidemiological, Immunological, and Clinical Dimensions of Coccidioidomycosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 505–525.
5. Hung, C.-Y., Seshan, K. R., Yu, J.-J., Schaller, R., Xue, J., Basrur, V., ... Cole, G. T. (2005). A Metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* Contributes to Evasion of Host Detection . *Infection and Immunity*, 73(10), 6689–6703.
6. Mirbod-Donovan, F., Schaller, R., Hung, C.-Y., Xue, J., Reichard, U., & Cole, G. T. (2006). Urease Produced by *Coccidioides posadasii* Contributes to the Virulence of This Respiratory Pathogen . *Infection and Immunity*, 74(1), 504–515.
7. Ingraham J.L., Ingraham C.A., (2000) *Introduction to Microbiology*. USA, Editorial Brooks.cole.
8. Baptista R, Riquelme M, (2007), The epidemiology of coccidioidomycosis in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología* 24: 100-105

9. Laniado-Laborín, Rafael. (2006), Coccidioidomicosis: Más que una enfermedad regional, *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 19(4), 301-308
10. Moroyoqui L, Figueroa S, (2008) Coccidioidomicosis, *Medicina Interna de México*, 24(2), 125-41
11. Saubolle, M. A., McKellar, P. P., & Sussland, D. (2007). Epidemiologic, Clinical, and Diagnostic Aspects of Coccidioidomycosis, *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 26–30.
12. Negroni R., Arechavala A., Maiolo E., (2010), Coccidioidomicosis, *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 38(5):179-188
13. Fernández P., Díaz P., (2003). Pruebas diagnósticas: sensibilidad y especificidad. *Cadernos de Atención Primaria*. 10: 120-124.
14. Protocolo y Técnicas. Fundamentos y tipos de ELISAs. Recurso en línea: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf> visto el 5/03/2017.
15. Cuevas RC, Alejo MA, 2010. Sensibilidad y Especificidad de una prueba. Universidad Nacional Autónoma De México, Facultad De Psicología División De Estudios Profesionales. Recurso en línea: <http://www.psicol.unam.mx/Investigacion2/pdf/SENSIBILIDAD%20Y%20ESPECIFICIDAD.pdf> visto el 9/03/2017
16. Mould Identification: A Virtual Self Assessment. Recurso en línea: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/virtual/2008/ID2-Feb08.html> visto el 9/03/2017.

17. Calderón PR, 2007, Inmunoquímica, Universidad Nacional Autónoma De México, Instituto de Biotecnología, Recurso en línea: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>
18. Humbría GL, Hernández VR, Pérez BM, García HL, Mendoza M, Zambrano E., (2011). Evaluación del inmunoanálisis enzimático en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con coccidiodomicosis. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 31: 42-47.
19. Kirsch, E. J., Greene, R. T., Prahl, A., Rubin, S. I., Sykes, J. E., Durkin, M. M., & Wheat, L. J. (2012). Evaluation of *Coccidioides* Antigen Detection in Dogs with Coccidiodomycosis. Clinical and Vaccine Immunology, 19(3), 343–345.
20. Catalán D.J., Johnson S.M., Eaton R., Romero O., Baptista R.C., Pappagianis D., Riquelme M. (2014). Detection of coccidioidal antibodies in serum of a small rodent community in Baja California, Mexico. Fungal Biology; 118: 330-339.
21. Shubitz LE, Butkiewicz CD, Dial SM, Lindan CP. (2005). Incidence of *Coccidioides* infection among dogs residing in a region in which the organism is endemic. Journal of the American Veterinary Medical Association, 226: 1846-1850.
22. Álvarez G.A. (2013). Seroprevalencia de *Coccidioides* spp en perros de Torreón, Coahuila. (Tesis de pregrado) Facultad de Ciencias, UNAM, México.
23. Kolivras K.N., Johnson P.S., Comrie A.C., Yool S.R. (2001). Environmental variability and coccidiodomycosis (valley fever). Aerobiologia.17:31–42.
24. Fisher F.S., Bultman M.W., Johnson S.M., Pappagianis D., Zaborsky E. (2007). *Coccidioides* niches and habitat parameters in the southwestern United States: a matter of scale. Annals of the New York Academy of Sciences. 1111:47–72.

25. Durkin M., Connolly P., Kuberski T., Myers R., Kubak B.M., Bruckner D., Pegues D., Wheat L.J. Diagnosis of coccidioidomycosis with use of the Coccidioides antigen enzyme immunoassay.(2008) Clinical Infectious Diseases 15; 47(8): e69–e73
26. Donis J., (2012). Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. Avances en Biomedicina, 1 (2), 73-81
27. Méndez T., López M., Hernández H., (2012) Actualidades en micología médica. México D.F., Editorial Sefirot.