

Artículo original

Evaluación del inmunoanálisis enzimático en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con coccidioidomicosis

Leyla Humbría García^{a,*}, Rosaura Hernández Valles^a, Maigualida Pérez Blanco^a, Leila García Hernández^a, Mireya Mendoza^b, Edgar Zambrano^c

^aLaboratorio de Micología, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro, estado Falcón, Venezuela; ^bLaboratorio de Micología y ^cLaboratorio de Bioquímica de Parásitos, Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela.

Recibido 15 de febrero de 2011; aceptado 7 de junio de 2011

Resumen: Este estudio evaluó el inmunoanálisis enzimático (IAE) para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con coccidioidomicosis (CDM). Se utilizaron 360 muestras de suero: 38 provenientes de pacientes con diagnóstico clínico, micológico e inmunológico de CDM, 100 de individuos sanos, 50 de pacientes sensibilizados a la coccidioidina y 172 con otras patologías, empleando dos exoantígenos de *Coccidioides* spp. La sensibilidad del IAE fue de 71,1% para ambos antígenos, con especificidad de 98% (Ag 1) y 96% (Ag 2). Los valores predictivos positivos fueron de 93,1% (Ag 1) y 87,1% (Ag 2), y negativos de 89,9% (Ag 1) y 89,7% (Ag 2), con razones de verosimilitud positiva de 35,6 (Ag 1) y 17,8 (Ag 2) y negativa de 0,3 para ambos antígenos. La potencia global del IAE se estimó en 90,6% (Ag 1) y en 89,1% (Ag 2). El índice Kappa reflejó una buena concordancia con la IDD. No se observó correspondencia entre las absorbancias detectadas por el IAE y el título de anticuerpos específicos obtenido mediante IDD en el seguimiento de pacientes con CDM. Se observaron reacciones cruzadas con las muestras de suero de pacientes con paracoccidioidomicosis e histoplasmosis. Se concluyó que el IAE puede ser una técnica útil en el diagnóstico, más no en el seguimiento de pacientes con CDM.

Palabras clave: Coccidioidomicosis, inmunoanálisis enzimático, inmunodifusión doble.

Evaluation of the enzymatic immune analysis in the diagnosis and follow-up of coccidioidomycosis patients

Abstract: This study evaluated the enzymatic immune analysis (EIA) procedure for the diagnosis and follow-up of coccidioidomycosis (CDM) patients. Three hundred and sixty (360) serum samples were studied using two exoantigens of *Coccidioides* spp.: 38 obtained from patients with clinical, mycological and immunological CDM diagnosis, 100 from healthy individuals, 50 from individuals sensitized to coccidioidine, and 172 from individuals with other pathologies. It was estimated a 71.1% of sensitivity for both antigens, with a 98% specificity (Ag 1), and 96% (Ag 2), positive predictive values of 93.1% (Ag 1) and 87.1% (Ag 2), and negative predictive values of 89.9% (Ag 1) and 89.7% (Ag 2). The positive verisimilitude rates were 35.6 (Ag 1) and 17.8 (Ag 2), and 0.3 negative verisimilitude rates for both antigens. The global potency of the EIA was estimated as 90.6% (Ag 1) and 89.1% (Ag 2). The Kappa index reflected a good concordance with the IDD. No correspondence between the absorbance detected by the EIA and the title of specific antibodies obtained through IDD was observed in the follow-up of CDM patients. Cross reactions with serum samples from paracoccidioidomycosis and histoplasmosis patients was observed. It was concluded that the EIA can be a useful technique for the diagnosis but not for the follow-up of CDM patients.

Keywords: Coccidioidomycosis, enzymatic immune analysis, double immune diffusion.

* Correspondencia:
E-mail: leyraq80@hotmail.com

Introducción

La coccidioidomicosis (CDM) es una micosis sistémica causada por dos especies de hongos dimórficos pertenecientes

al género *Coccidioides*: *Coccidioides immitis* conocido como la especie Californiana, y *Coccidioides posadasii* como la especie no Californiana. La infección en humanos, así como en varias especies de animales, se adquiere principalmente

por vía inhalatoria [1,2]. En Venezuela, las áreas endémicas de CDM se localizan en la región noroccidental del país, en las zonas áridas y semiáridas de los estados Falcón, Lara y Zulia, conocidas según la clasificación de Holdridge como zonas de “maleza desértica tropical” y “monte espinoso tropical” [3].

El diagnóstico de CDM se confirma mediante el estudio micológico, histopatológico y/o la detección de anticuerpos específicos contra *Coccidioides* spp. [4]. El estudio micológico permite demostrar la presencia del hongo en muestras clínicas, tanto al examen directo como al cultivo, sin embargo, su aislamiento puede requerir hasta 30 días, además de representar un alto riesgo de infección para el personal de laboratorio [5,6]. La detección de anticuerpos específicos contra el hongo se realiza a partir de muestras de suero u otros fluidos corporales, mediante técnicas de inmunodifusión doble (IDD), inmunoelectroforesis (IEF) y fijación de complemento (FC), entre otras; su presencia contribuye a confirmar el diagnóstico, realizar seguimiento y establecer pronóstico [5,7]. En Venezuela, la técnica de IDD, es la más utilizada porque, si bien requiere cierta capacitación del personal, es más accesible que los métodos microbiológicos y posee una sensibilidad y especificidad diagnóstica que varía entre el 65-100%, dependiendo de la calidad del antígeno utilizado [8,9]. Entre sus ventajas se pueden señalar: el montaje simultáneo de un amplio número de muestras, la verificación de la especificidad mediante la obtención de líneas de identidad y la determinación de títulos de anticuerpos, los cuales son útiles en el seguimiento durante la terapia [10,11]. Sin embargo, las variaciones en su sensibilidad y el tiempo de procesamiento (4 días o más), constituyen desventajas en su aplicación, por lo que se hace necesario investigar la utilización de otras técnicas capaces de detectar bajas concentraciones de anticuerpos y que sean suficientemente específicas para evitar falsos positivos o negativos [10,12].

La técnica de inmunoanálisis enzimático (IAE) ha sido evaluada desde la década de los años 80 para el serodiagnóstico de diversas micosis [13-15]. Los diferentes ensayos realizados con esta prueba en el diagnóstico de CDM, han reportado que es altamente sensible pero de baja especificidad [16]. La técnica puede ser cualitativa o cuantitativa, discriminar entre isotipos de inmunoglobulinas y detectar cantidades mínimas de anticuerpo, en el rango de 1 µg/mL, siendo su realización más rápida y menos laboriosa que la IDD y FC [17].

El objetivo de este estudio fue estandarizar la técnica de inmunoanálisis enzimático, y evaluar su utilidad práctica en el diagnóstico y seguimiento serológico de pacientes con CDM.

Materiales y métodos

Antígenos: Se utilizó un antígeno sintetizado a partir de un filtrado de la fase micelial de la cepa *Coccidioides* spp. 4545 (Ag 1), producido en el Laboratorio de Micología, del Instituto de Biomedicina de Caracas, Venezuela, y un

antígeno comercial preparado a partir de un filtrado de la fase micelial de *Coccidioides immitis* (Ag 2), adquirido de la casa comercial IMMY® (Immuno-Mycologics, Inc) (Lote número 2126C3).

Muestras de suero evaluadas: Se procesaron 38 muestras de suero provenientes de 10 pacientes, con diagnóstico clínico, micológico e inmunológico (realizado mediante la técnica de IDD) de CDM, recolectadas antes, durante y después de la terapia antifúngica, los cuales asistieron entre los años 2004 y 2010 al Laboratorio de Micología, adscrito al Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro, estado Falcón.

Adicionalmente se evaluaron 322 muestras de suero obtenidas de individuos negativos a CDM por IDD: 50 de personas que resultaron positivas a la intradermorreacción (IDR) con coccidioidina (con infiltrados que variaron entre 5 y 84 mm a las 48 horas), que asistieron al Laboratorio de Micología, adscrito al Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Coro, estado Falcón, entre los años 2007 y 2010; 50 de pacientes con histoplasmosis, 50 de pacientes con paracoccidioidomicosis y 15 de pacientes con esporotricosis (donadas por el Laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina de Caracas); 27 de pacientes con lupus eritematoso sistémico (donadas por el Laboratorio de Inmunohematología del Instituto de Biomedicina de Caracas); 30 de pacientes con tuberculosis (donadas por el Laboratorio de Tuberculosis del Instituto de Biomedicina de Caracas) y 100 muestras de individuos sanos (la mitad procedente del Banco de Sangre “Dr. Edmundo Piña” del Hospital Universitario “Dr. Alfredo Van Grieken” del estado Falcón y el resto del Banco Municipal de Sangre, Caracas).

Sueros controles. Para la estandarización del IAE se utilizó como control positivo el suero de un paciente con diagnóstico de CDM, con título de anticuerpos específicos 1:16 por IDD, procedente del estado Falcón, y como control negativo sueros de individuos sanos, negativos para CDM por la misma técnica. En el montaje de la IDD se utilizaron dos antisueros como controles positivos, uno adquirido de la casa comercial IMMY® (Immuno-Mycologics, Inc), constituido por suero de cabra con anticuerpos específicos contra *Coccidioides immitis* (lote número 121Hc4) y el otro, de producción nacional (donado por el Laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina, Caracas), constituido por suero de conejo con anticuerpos específicos contra *Coccidioides* spp. (Lote número 14799).

Inmunoanálisis enzimático. La cuantificación de proteínas de los antígenos a utilizar en la técnica de IAE se realizó con el estuche comercial BCA Protein Assay Kit de PIERCE®, con seroalbúmina bovina como proteína patrón, a una concentración de 2,0 mg/mL, según el micrométodo sugerido por la casa comercial.

Para la estandarización del IAE se utilizó un protocolo similar al descrito por Martins *et al* [18], estableciéndose que la concentración de antígeno a 10 µg/mL, la dilución del suero 1:200 y del conjugado 1:5000 fueron las óptimas

para el montaje de la técnica. Las diferentes muestras de suero fueron procesadas mediante el siguiente protocolo: se colocaron 100 μ L de cada antígeno (10 μ g/mL), diluido en buffer carbonato bicarbonato pH 9,6, en placas de microtitulación fondo redondo estériles (CELLSTAR®), y se incubaron durante 14 horas, a 4 °C en cámara húmeda. Cada placa fue lavada 3 veces (5 minutos cada lavado) con solución de lavado PBS (buffer fosfato salino 10 mM pH 7,3 / 1% Tween 20). Posteriormente, se añadieron a cada pozo 200 μ L de buffer de bloqueo (PBS 10 mM pH 7,3 / 0,1% Tween 20 / 5% de leche descremada en polvo) y se reincubaron las placas por hora y media a 37 °C. Luego, se descartó el buffer y se agregaron por duplicado 100 μ L de las muestras a ensayar diluidas 1:200 en buffer de bloqueo; las placas se incubaron durante una hora a 37 °C y posteriormente fueron lavadas de la manera descrita anteriormente. A cada pozo se le adicionó 100 μ L del conjugado enzimático (anti-inmunoglobulinas humanas polivalentes marcadas con peroxidasa, Sigma Chemical EE.UU.), diluido 1:5000 en buffer de bloqueo, incubándose a 37°C por 1 hora; el lavado se realizó siguiendo el protocolo del paso anterior. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de la solución reveladora (0,4 mg/ml de O-phenylenediamine dihydrochloride [Sigma Chemical EE.UU.] en 0,01 M de buffer de citrato de sodio pH 5,5 más 0,04% v/v de peróxido de hidrógeno [H₂O₂ al 30%] al momento del uso) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, procediendo a detener la reacción con 50 μ L de ácido clorhídrico 3 M. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro marca DIMA® modelo ELx800, con filtro a 490nm, y los resultados se expresaron en valores de densidad óptica (DO) [17].

El punto de corte se calculó con el promedio de las absorbancias de los 100 controles negativos, más dos desviaciones estándar. Las muestras de suero se consideraron positivas cuando los valores de DO se encontraban por encima del punto de corte y negativas si eran menores.

Inmunodifusión doble: Todas las muestras evaluadas por el IAE fueron procesadas simultáneamente por la técnica de IDD, utilizando ambos antígenos, según protocolo previamente descrito [19,20].

Análisis de datos: Se realizaron los cálculos de sensibilidad y especificidad [21], valores predictivos (VP) positivo y negativo [22], y razones de verosimilitud (RV) o cociente de probabilidades positivas y negativas [23]. La concordancia entre las pruebas diagnósticas fue determinada mediante el cálculo del índice Kappa de Cohen [24,25].

Resultados

Se estableció como punto de corte para el Ag 1 0,199 nm y para el Ag 2 0,231 nm. Los resultados obtenidos mediante el IAE reflejaron una sensibilidad de 71,1% para ambos antígenos y especificidad de 98% (Ag 1) y 96% (Ag 2), con VP positivos de 93,1% (Ag 1) y 87,1% (Ag 2) y VP negativos de 89,9% (Ag 1) y 89,7% (Ag 2). Según estos

valores, con el Ag 1 se observó una mayor probabilidad de detectar un individuo positivo que presenta la enfermedad y mejores valores predictivos, y con ambos antígenos menor probabilidad de falsos positivos. La RV positiva quedó establecida en 35,6 (Ag 1) y 17,8 (Ag 2), esto significa, que por cada 36 ó 18 pacientes positivos con CDM, habrá uno positivo por IAE que no tenga la enfermedad, respectivamente. La RV negativa fue de 0,3 para ambos antígenos.

Al evaluar la correlación entre los resultados obtenidos con ambas técnicas, se observó para ambos antígenos una concordancia de 0,9 e índice Kappa de 0,8 para el Ag 1 y 0,7 para el Ag 2, reflejando buena concordancia entre las pruebas.

En las muestras de pacientes positivos a la IDR con coccidioidina se encontró 16% (Ag 1) y 12% (Ag 2) de positividad mediante el IAE (Tabla 1). Estos resultados fueron mayores a los observados en los sueros de individuos sanos (2% y 4%, respectivamente). Con ambos antígenos, estas muestras resultaron negativas por IDD.

En el estudio de reacciones cruzadas con muestras de suero provenientes de pacientes con otras micosis, en ambas técnicas se observó mayor reactividad en los sueros de individuos con paracoccidioidomicosis (IAE: 72% y 64% con los Ag 1 y Ag 2, respectivamente; IDD: 30% Ag 1 y 14% Ag 2) e histoplasmosis (IAE: 32% Ag 1 y 42% Ag 2; IDD: 2% de positividad con ambos antígenos). En las muestras de suero de pacientes con otras patologías, se observó mayor reactividad en las muestras de pacientes con tuberculosis (IAE: 33,3% Ag 1 y 20% Ag 2; IDD: 3,3% en los sueros procesados con el Ag 2). Con ambas técnicas se evidenció que el mayor número de reacciones cruzadas ocurrieron con el Ag 1 (Tabla 1).

Para evaluar la utilidad práctica del IAE en el seguimiento de los pacientes con CDM, se seleccionaron muestras de

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos con las técnicas de inmunoanálisis enzimático e inmunodifusión doble en muestras de suero de pacientes sensibilizados a la coccidioidina y con otras patologías.

Pacientes	Inmunoanálisis enzimático				Inmunodifusión doble			
	Ag 1		Ag 2		Ag 1		Ag 2	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Sensibilizados a la coccidioidina (n=50)	8	16	6	12	0	0	0	0
Paracoccidioidomicosis (n=50)	36	72	32	64	15	30	7	14
Histoplasmosis (n=50)	16	32	21	42	1	2	1	2
Esporotricosis (n=15)	1	6,7	0	0	0	0	0	0
Tuberculosis (n=30)	10	33,3	6	20	0	0	1	3,3
Lupus (n=27)	4	14,8	1	3,7	0	0	0	0

Ag 1: *Coccidioides* spp. cepa 4545; Ag 2: *Coccidioides immitis* comercial; n: número de pacientes positivos.

suero de seis pacientes con CDM, recolectadas antes, durante y después de la terapia antifúngica. En los resultados no se observó correspondencia entre las absorbancias detectadas por el IAE y el título de anticuerpos específicos obtenido mediante IDD. En tres casos, sueros con bajos títulos de anticuerpos mediante IDD (por ejemplo 1:2 ó 1:4) resultaron negativos por IAE. Además, no se observó que los valores de absorbancia disminuyeran gradualmente a medida que el paciente avanzaba en la terapia, tal como ocurrió con los títulos de anticuerpos detectados por IDD; éste es un parámetro que permite monitorear la terapia antifúngica, en conjunto con la evaluación clínica y micológica del paciente, y la negativización de la prueba de IDD es un requisito importante para establecer el tiempo de culminación del tratamiento.

Discusión

En los últimos 60 años, la detección de anticuerpos específicos contra *Coccidioides* spp. ha sido una herramienta importante para el diagnóstico de la CDM [26-28]. Diversos autores consideran la IDD como la prueba serológica más utilizada, por ser de fácil ejecución y más accesible que los métodos microbiológicos, además de poseer una sensibilidad y especificidad que varía entre 65% y 100%, dependiendo de la calidad del antígeno empleado [8-11].

Desde el punto de vista técnico, el IAE tiene como ventaja sobre la IDD que utiliza mínimas concentraciones de antígeno (10 µg/mL) y suero problema (dilución 1:200), y los resultados se obtienen en aproximadamente 4 horas y media. Además, la lectura de los mismos no requiere de un entrenamiento riguroso, ya que ésta se realiza en un espectrofotómetro.

Se estableció el punto corte en 0,199 nm (Ag 1) y 0,231 nm (Ag 2), calculado mediante el promedio de las absorbancias de 100 sueros negativos para CDM, más dos desviaciones estándar, similar a lo reportado por otros autores [16,29]. En un estudio, utilizando un estuche comercial de IAE, se reportó como punto de corte para las muestras negativas el promedio de las absorbancias de 1000 muestras de suero negativas más dos desviaciones estándar, quedando en $\leq 0,150$; para las muestras positivas establecieron un valor de corte $\geq 0,200$ [16]. Al comparar estos puntos de corte con los establecidos en este estudio, se evidencia que el punto de corte, con el Ag 2, se encuentra por encima del valor para las muestras positivas y, el del Ag 1 por encima del punto de corte negativo de ese estudio. Estas variaciones pudieran estar relacionadas con factores inherentes a la técnica, tales como la calidad y concentración de los antígenos y reactivos empleados durante la estandarización.

La sensibilidad del IAE fue similar para ambos antígenos (71,1%) pero la especificidad varió: 98% (Ag 1) y 96% (Ag 2). Estos porcentajes son superiores a los reportados por algunos autores en el diagnóstico de CDM, quienes al utilizar un exoantígeno de *Coccidioides immitis* establecieron una sensibilidad y especificidad de 61% y 80%, respectivamente [17]. En otros estudios utilizando un kit comercial de IAE, se

ha reportado una sensibilidad entre 80-100% y especificidad entre 84,3-96% [30-32]. Estas variaciones pudieran estar relacionadas con: 1) la calidad y concentración del antígeno utilizado: mientras más purificado mejor será la sensibilidad y especificidad de la prueba; 2) la dilución de los sueros evaluados: una menor dilución de los sueros puede generar la aparición del fenómeno de prozona y por ende, la obtención de resultados falsos negativos o por el contrario, sueros con bajas concentraciones de anticuerpos pudieran no ser detectados por el IAE.

Al comparar los resultados de sensibilidad y especificidad del IAE con los de IDD (87% y 100%, respectivamente), se observa que la IAE es menos sensible, por lo tanto, la probabilidad de que esta prueba detecte a un individuo con CDM es menor. Es probable que algunos factores inherentes al montaje de la técnica de IAE pudieran influir en su menor sensibilidad, como el uso de una menor concentración del antígeno (10 µg/mL) y de sueros diluidos (1:200). Esto podría afectar el equilibrio necesario para que ocurra la reacción antígeno-anticuerpo en algunas muestras de pacientes. A pesar de lo anterior, el VP positivo obtenido en el IAE indica un 93,1% (Ag 1) y 87,1% (Ag 2) de probabilidades de que un resultado positivo corresponda a la presencia de enfermedad. Igualmente, en el caso del VP negativo, el IAE muestra un 89,9% (Ag 1) y 89,7% (Ag 2) de probabilidad de que un resultado negativo indique la ausencia de enfermedad. Como los VP son influenciados por la prevalencia de la enfermedad en la población que se estudia, se calculó la razón de verosimilitud, que establece cuanto más probable es un resultado concreto (positivo o negativo) según la presencia o no de enfermedad y este valor depende de la sensibilidad de la prueba. En este estudio se encontró una RV positiva mayor para el Ag 1 (35,6), siendo más probable el diagnóstico serológico de CDM utilizando este antígeno. En cuanto a la RV negativa, con ambos antígenos, fue bastante baja, reflejando una buena capacidad de detectar la ausencia de enfermedad. Estos parámetros, no reportados en otros estudios, son importantes para validar una prueba diagnóstica, por cuanto establecen, en función de la sensibilidad y especificidad, su utilidad práctica. Es posible que técnicas, con buenos valores de sensibilidad y especificidad, presenten RV positivas muy bajas (cerca de 1), lo cual se traduciría en una mayor ocurrencia de resultados falsos negativos.

El nivel de concordancia y el índice Kappa, determinaron una buena correlación entre el IAE y la IDD utilizando ambos antígenos. Sin embargo, el IAE ensayado en este estudio no superó a la IDD, en cuanto a sensibilidad y especificidad, por lo que se requiere la realización de más ensayos para optimizar la detección de anticuerpos específicos contra *Coccidioides* spp.

En las muestras de suero de pacientes positivos a la IDR con coccidioidina, se observó reactividad mediante IAE de 16% (Ag 1) y 12% (Ag 2), siendo negativos con la prueba de IDD. Esta reactividad ha sido reportada por otros autores, quienes al ensayar el IAE con un exoantígeno de *Coccidioides immitis* y sueros diluidos, a una concentración

más baja (1:1000), encontraron 11,5% de positividad [17]. La causa de estas reactividades pudiera relacionarse con el hecho de que la prueba no es 100% específica y por lo tanto, existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos. En este estudio, se descarta la probabilidad de asociar la reactividad detectada con la presencia de bajas concentraciones de anticuerpos, debido a que sueros con bajos títulos de anticuerpos por IDD (1:2, 1:4) resultaron negativos mediante IAE.

Con ambas técnicas, el mayor porcentaje de reacciones cruzadas se evidenció en pacientes con paracoccidiodomicosis e histoplasmosis. Las muestras procesadas con el Ag 2 mostraron menos reactividad (64% por IAE y 14% por IDD), lo que sugiere que se trata de un antígeno más purificado. Otros autores han reportado reacciones cruzadas en sueros de pacientes con paracoccidiodomicosis (100%) e histoplasmosis (50%), lo que confirma la presencia de determinantes antigénicos comunes que están siendo detectados por los anticuerpos [17]. Entre las posibles causas de estas reacciones cruzadas se ha señalado que la pared celular de *Coccidioides* spp. es compleja y entre sus principales componentes se encuentran la quitina, betaglucanos y otros polisacáridos, cuya composición varía en las diferentes fases del cultivo, así como también la presencia de 3-O-metilmanosa, un carbohidrato que sólo ha sido encontrado en tres especies bacterianas [33]. El 3-O-metilmanosa presente en el antígeno de *Coccidioides* spp. podría explicar la reacción cruzada con algunos microorganismos, tales como *Streptomyces griseus*, miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, micobacterias y otros hongos como *Malbranchea dendritica* [33-36]. Sin embargo, no se ha demostrado que la presencia de 3-O-metilmanosa se relacione con las reacciones cruzadas observadas en *Histoplasma capsulatum* o *Blastomyces dermatitidis* [33].

Otros autores señalan que la existencia de reactividad con el antígeno de *Coccidioides* spp., en muestras de suero de pacientes con histoplasmosis, blastomicosis y otras micosis, se explica por la existencia de componentes antigénicos comunes con estos hongos [32,37-39]. En un estudio utilizando un antígeno de *C. immitis* de 33 kDa, no se reportó reactividad cruzada en sueros de pacientes con otras infecciones fúngicas, lo que pudiera sugerir que este antígeno no es compartido por otras especies de hongos [18].

En las muestras de suero de pacientes con diagnóstico de tuberculosis, se observó, mediante IDD, positividad en una de ellas. Esto pudiera indicar una reacción cruzada o que este paciente pudo haber presentando las dos patologías. En un estudio realizado con la finalidad de conocer la seroprevalencia de anticuerpos contra *Coccidioides* spp., en pacientes con diagnóstico clínico inicial de tuberculosis en Ensenada, Baja California, México, se reportó una alta incidencia (39%) de anticuerpos contra *Coccidioides* spp., por lo que los autores recomiendan realizar diagnóstico diferencial con esta patología [40].

En el seguimiento terapéutico de pacientes con CDM, se

observó que los valores de absorbancia no se correspondían con los títulos de anticuerpos detectados por la IDD y tampoco se observaron variaciones en el descenso de los mismos a medida que el paciente avanzaba en la terapia, por lo tanto, al ser el IAE una técnica de resultados cualitativos, no es posible, bajo las condiciones de este estudio, utilizarla como prueba de valor pronóstico.

Según los resultados obtenidos, el IAE es menos sensible y específica que la IDD, por lo que se requiere la realización de más ensayos que conlleven a mejorar la calidad del antígeno empleado (purificar determinantes antigénicos específicos de *Coccidioides* spp.) y la optimización de las diluciones del suero que puedan garantizar la disminución de falsos positivos, falsos negativos y reacciones cruzadas, para así validar su utilidad práctica como alternativa en el diagnóstico de CDM.

Agradecimientos

A las siguientes instituciones, que aportaron parte de las muestras de suero procesadas en este estudio: Banco de Sangre "Dr. Edmundo Piña", del Hospital Universitario Dr. Alfredo Van Grieken, Coro, estado Falcón, Venezuela; Laboratorio de Tuberculosis e Inmunohematología del Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela; Laboratorio de Micología del Hospital Vargas de Caracas y Banco Municipal de Sangre, Caracas, Venezuela.

Referencias

1. Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. Nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. Mycologia. 2002; 94:73-84.
2. Negroni R. Evolución de los conocimientos sobre aspectos clínico-epidemiológicos de la Coccidiodomicosis en las Américas. Rev Argent Microbiol. 2008; 40:246-56.
3. Borelli D, Pérez M, Molina T. Coccidiodosis: un caso más en el bosque muy seco tropical. Dermat Venez. 1991; 29:119-23.
4. Canteros CE, Toranzo A, Ibarra-Camou B, David V, Carrizo SG, Santillán-Iturres A, y col. La coccidiodomicosis en Argentina, 1892-2009. Rev Argent Microbiol. 2010; 42:261-8.
5. Saubolle MA, McKellar PP, Sussland D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of Coccidiodomycosis. J Clin Microbiol. 2007; 45:26-30.
6. Stevens DA, Clemons KV, Levine HB, Pappagianis D, Baron EJ, Hamilton JR, Deresinski SC, Johnson N. Expert opinion: what to do when there is *Coccidioides* exposure in a laboratory. Clin Infect Dis. 2009; 49:919-23.
7. Crump JA, Corder JR, Menshaw NG, Barth Reller L. Development, implementation and impact of acceptability criteria for serologic tests for infectious diseases. J Clin Microbiol. 2004; 42:881-3.
8. Vargas N, Vargas MH, Molero M. Inmunodiagnóstico de las micosis sistémicas. Dermatol Venez. 1995; 33:65-82.
9. Dolande M, Reviakina V, Panizo M, Maldonado B. Diagnóstico inmunológico de las micosis sistémicas en

- pacientes con SIDA (1997-2001). Rev Soc Ven Microbiol 2002; 22:51-6.
10. Galgiani JN, Grace GM, Ludergan LL. New serologic test for early detection of Coccidioidomycosis. J Infect Dis. 1991; 163:671-4.
 11. Togashi RH, Aguiar FMB, Ferreira DB, Moura CM, Sales MTM, Rios NX. Pulmonary and extrapulmonary coccidioidomycosis: three cases in an endemic area in the state of Ceara, Brazil. J Bras Pneumol. 2009; 35:275-9.
 12. Galgiani JN, Peng T, Lewis ML, Could GA, Pappagianis D. Cerebrospinal fluid antibodies detected by ELISA against a 33-kDa antigen from spherules of *Coccidioides immitis* in patients with coccidioidal meningitis. J Infect Dis. 1996; 173:499-502.
 13. Repentigny I, Reiss E. Current trends in immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. Rev Infect Dis. 1984; 6:301-12.
 14. Cano L, Brummer E, Stevens D, Restrepo A. An evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol. 1986; 24:467-75.
 15. Pavliak V, Saundula J, Tomsirova A, Gallo J. Determination of antibodies to *Candida albicans* cell wall components by immunodiffusion, ELISA and its rapid modification. Mycoses. 1988; 31:426-32.
 16. Gade W, Ledman DW, Wethington R, Yi A. Serological responses to various *Coccidioides* antigen preparations in a new enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 1992; 30:1907-12.
 17. Tiraboschi IN, Marticorena B, Negroni R. ELISA en coccidioidomycosis humana. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1991; 33:281-5.
 18. Martins TB, Jakowski TD, Mouritsen LC, Hill HR. Comparison of commercially available enzyme immunoassay with traditional serological tests for detection of antibodies to *Coccidioides immitis*. J Clin Microbiol. 1995; 33:940-3.
 19. Oudin J. L'analyse immunochimique qualitative. Methode par diffusion des antigenes au sein de l'immunoserum precipitant gelosa. Premiere parte. Ann Inst Pasteur. 1948; 75:30-52.
 20. Ouchterlony O. Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Publishers, Inc.; 1968.
 21. Armitage P, Berry G. Estadística para la investigación biomédica. 3ª. ed. Madrid: Editorial Harcourt-Brace; 1997.
 22. Altman DG, Bland JM. Statistics Notes: Diagnostic tests 2: predictive values. BMJ. 1994; 309:102.
 23. Dujardin B, Van der Ende J, Van Gompel A, Unger JP, Van der Stuyft P. Likelihood ratios: a real improvement for clinical decision making? Eur J Epidemiol. 1994; 10:29-36.
 24. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. Educ Psychol Meas. 1960; 20:37-46.
 25. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977; 33:159-74.
 26. Smith CE, Saito MT, Beard RR, Keep RM, Clark RW, Eddie BU. Serological test in the diagnosis and prognosis of coccidioidomycosis. Am J Hyg. 1950; 52:1-21.
 27. Parish JM, Blair JE. Coccidioidomycosis. Mayo Clin Proc. 2008; 83:343-9.
 28. Ampel NM. The diagnosis of coccidioidomycosis. F1000 Medicine Reports. 2010; 2:1-4.
 29. Mondragón-González R, Méndez-Tovar LJ, Bernal-Vázquez E, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, y col. Detección de infección por *Coccidioides immitis* en zonas del estado de Coahuila, Mexico. Rev Arg Microbiol. 2005; 37:135-8.
 30. Talbot R, Burke C, Wethington R, Gade W. Comparison of classical serological methods with premier *Coccidioides* EIA during a coccidioidomycosis epidemic in Kern County, CA. Abstr. F-100, p. 515. En: Abstracts of the 92nd General Meeting of the American Society for Microbiology 1992. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 31. Wieden MA, Lundergren LL, Blum J, Howard R, Theis J, Pugh E, et al. Comparison of serologic detection of coccidioidal antibodies by immunodiffusion, premier EIA and 33 kDa spherule derived ELISA. Abstr. 19, p. 20. En: Centennial Conference on Coccidioidomycosis. 1994. Stanford University, Stanford, California.
 32. Kaufman L, Sekhon AS, Moledina N, Jalbert M, Pappagianis D. Comparative evaluation of commercial premier EIA, and microimmunodiffusion, and complement fixation tests for *Coccidioides immitis* antibodies. J Clin Microbiol. 1995; 33:618-9.
 33. Pappagianis D, Zimmer BL. Serology of Coccidioidomycosis Demosthenes. Clin Microbiol Rev. 1990; 3:247-68.
 34. Candy DJ, Baddiley J. 3-O-methyl-D-mannose from *Streptomyces griseus*. Biochem J. 1966; 98:15-8.
 35. Nimmich W. Occurrence of 3-O-methylmannose in lipopolysaccharides of *Klebsiella* and *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta. 1979; 215:189-91.
 36. Cole GT, Chinn JW, Pope LM, Starr P. Characterization and distribution of 3-O-methylmannose in *Coccidioides immitis*. En: Einstein HE, Catanzaro A, editors. Proceedings of the Fourth International Conference on Coccidioidomycosis. Washington, D.C: The National Foundation for Infectious Diseases. 1985. p.130-45.
 37. Kaufman L, Clark MJ. Value of the concomitant use of complement fixation and immunodiffusion test in the diagnosis of coccidioidomycosis. Appl Microbiol. 1974; 28: 641-3.
 38. Campbell CC, Binkley GE. Serologic diagnosis with respect to histoplasmosis, coccidioidomycosis and blastomycosis and the problem of cross reactions. J Lab Clin Med. 1953; 42: 896-906.
 39. Heiner DC. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. Pediatrics. 1958; 22: 616-27.
 40. Baptista-Rosas R, Riquelme-Pérez M, Muñoz-Salazar R, Becuar-González C, Arredondo-Ozuna C, Fernández Garza D, y col. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Coccidioides* spp. en pacientes con diagnóstico clínico inicial de tuberculosis en Ensenada, Baja California, México. Bioquímica 2009; 34: 100.