



**RIDUNAJ**  
Repositorio Institucional  
Digital UNAJ



Universidad Nacional  
**ARTURO JAURETCHE**

## Tesinas de Grado

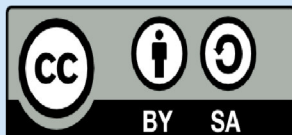
Leguizamón, Camila Daiana

“Desarrollo de un reactivo para la detección de anticuerpos anti-Histoplasma Capsulatum, por aglutinación con partículas de látex”

2023

*Instituto: Ciencias de la Salud*

*Carrera: Bioquímica*



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.  
Atribución – Compartir igual 4.0  
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Leguizamón, C. D. (2023). *Desarrollo de un reactivo para la detección de anticuerpos anti-Histoplasma Capsulatum, por aglutinación con partículas de látex* [Tesis de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ

<https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>



## *Instituto de Ciencias de la Salud*

### *Carrera: Bioquímica*

*“Desarrollo de un reactivo para la detección de anticuerpos anti-Histoplasma capsulatum, por aglutinación con partículas de látex”*

- Alumna: Leguizamón Camila Daiana (Legajo N°: 12305)
- Directora: Bioquímica Alicia Cristina Trovero, Magister en Microbiología molecular. Instituto Nacional de Producción de Biológicos, A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbran”.
- Co-directora: Bioquímica Laura Marta Pestana, Docente de Micología clínica, Bioquímica, ICS, UNAJ.
- Lugar de trabajo: Servicio Antígenos y Antiseros, Departamento Reactivos de Diagnóstico, Instituto Nacional de Producción de Biológicos, A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbran”.
- Fecha de entrega: 27 de abril 2023

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todo el equipo del Servicio Antígenos y Antisueros del INSTITUTO NACIONAL DE PRODUCCION DE BIOLOGICOS, ANLIS “Dr Carlos G. Malbran”, por brindarme el espacio para poder realizar mi trabajo final en estos 6 meses de trabajo.

A Ximena, técnica en Bioterio, Mariana y Flavia, del servicio de micología, que me ayudaron desinteresadamente y que me enseñaron todo lo necesario para poder realizar procedimientos claves de este trabajo.

Especialmente quiero agradecer a mi directora Alicia Trovero, que se puso al mando de este hermoso proyecto del cual me siento parte y feliz de poder aportar mi granito de arena, sin ella y sin su apoyo incondicional nada hubiese sido posible. A mi co-directora Laura Pestana, quien desde el comienzo se interesó y me apoyo en este trabajo brindándome todo su conocimiento en el área de micología.

A la Universidad pública, gracias por cumplir nuestros sueños. A mis compañeros de cursadas, gracias por ser parte y por luchar por un mismo sueño. Me llevo amigos para siempre. A todos los docentes que fueron parte de mi formación, que nos brindaron todos sus conocimientos y nos incentivaron a llegar a la meta.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a toda mi FAMILIA y AMIGOS, especialmente a mi Mama, mi Papa, mis hermanas, mi pareja, por creer en mí, por su confianza, por su apoyo y por alentarme a seguir a pesar de mis inseguridades y mis estados emocionales. A mis viejitos, mi tata y mi abue, que, desde el cielo, me cuidaron, me guiaron y me dieron la sabiduría para poder llegar hasta acá, sé que están orgullosos de mí. Los amo.

Finalizando, como mujer de ciencia y creyente en Dios, agradezco a él y recordando a mis abuelos, que decían: “Dios da la sabiduría para que el hombre transforme lo malo en bueno para ayudar al prójimo” y así cito: *Proverbios 2:5,7 ...*

“Solo dios puede hacerte sabio, solo dios puede darte conocimiento y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia, el provee de solida sabiduría a los rectos”.

## RESUMEN

Las micosis endémicas pueden ser difíciles de diagnosticar y la interpretación precisa de los datos de laboratorio es importante para garantizar el tratamiento más adecuado para los pacientes. Aunque el diagnóstico definitivo de histoplasmosis, una de las micosis endémicas más frecuentes en el mundo, se logra mediante el diagnóstico directo realizado por observación micro y/o macroscópica de *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*), la evidencia serológica de esta infección fúngica es importante ya que el aislamiento de los agentes etiológicos requiere mucho tiempo y tiene baja sensibilidad.

Se han utilizado una variedad de inmunoensayos para detectar anticuerpos específicos contra *H. capsulatum*. La técnica más aplicada para la detección de anticuerpos es la inmunodifusión utilizando antígenos crudos “histoplasmina” con una sensibilidad del 70 al 100 % y una especificidad del 100 %, según la forma clínica, como así también la fijación del complemento.

Estas técnicas utilizadas hoy en día insumen aproximadamente 96hs y un diagnóstico presuntivo de 2-3 semanas, por lo que en este trabajo se buscó desarrollar un reactivo para detectar anticuerpos de histoplasma por aglutinación con partículas de látex, que nos brinde resultados inmediatos a diferencia de la inmunodifusión, y para que más adelante este reactivo sea utilizado con sueros humanos en el ámbito hospitalario y los profesionales nos puedan brindar un diagnóstico y tratamiento más rápido, ya que cuanto más se retrase el tratamiento mayor es la mortalidad de la infección por *H. capsulatum*.

El objetivo de este trabajo es estudiar los distintos componentes proteicos de la histoplasmina y la inmunoreactividad con diferentes antisueros homólogos y heterólogos, y optimizar las condiciones para la preparación del reactivo de látex para así evaluar la especificidad y sensibilidad analítica. Cabe destacar que este trabajo aportó los primeros datos para lograr el desarrollo del reactivo para ser utilizado en el inmunodiagnóstico de histoplasmosis, el cual es un proyecto del Servicio Antígenos y Antisueros-INPB-ANLIS.

Para la producción de este reactivo de látex, a partir de cultivos líquidos de *Histoplasma capsulatum* inactivados, se obtuvo la histoplasmina por técnicas de centrifugación, filtración, concentración y diálisis. Se cuantificó las proteínas por el método de Lowry y se caracterizaron por SDS-PAGE. Luego obtuvimos anticuerpos policlonales en conejo contra

la histoplasmina mediante la inmunización de los mismos y se evaluó la reactividad mediante técnicas como inmunodifusión, dot blot, western blot y aglutinación con partículas de látex. Las partículas de látex de poliestireno de tamaño uniforme de 0.8  $\mu\text{m}$  fueron sensibilizadas con la histoplasmina por adsorción pasiva. Para ello se emplearon diferentes concentraciones de la histoplasmina, 0.05, 0.02 y 0.01 mg/mg de látex y se ensayaron diferentes condiciones de pH, buffer glicina pH 8 y buffer acetato pH 4.8. Se eligió la mejor condición en cuanto a mayor eficiencia de adsorción y a mayor capacidad de aglutinación con antiseros homólogos y se evaluó las reacciones cruzadas con antiseros de conejo específicos a otras micosis (*Coccidioides posadasii*, *Paracoccidioides sp.*, *Aspergillus sp.*). Por último, se comparó la aglutinación de látex con la inmunodifusión.

## INDICE

<b>1-INTRODUCCION.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1-Justificación e importancia del tema seleccionado .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2-Marco teórico .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1- Histoplasmosis / Manifestaciones clínicas.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2-Datos epidemiológicos.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.3-<i>Histoplasma capsulatum</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.4-Patogenia.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.5-Histoplasmina .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.6-Métodos de diagnóstico.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3-Conceptos de inmunología empleados en este trabajo .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.1- Antígenos .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2- Anticuerpos.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3- Inmunización / Obtención de antisueros.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.4- Interacción Antígeno-Anticuerpo.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.5- Reactividad cruzada .....</b>	<b>19</b>
<b>1.4-Técnicas inmunoquímicas y químicas utilizadas en este trabajo .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.1- Cuantificación de proteínas por Lowry .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.2- Inmunodifusión radial doble (IDR).....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.3- Dot blot.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.4- SDS-page .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.5- Western blot .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4.6- Aglutinación en partículas de látex .....</b>	<b>24</b>
<b>2- OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1-Objetivos Generales.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2-Objetivos Específicos .....</b>	<b>26</b>
<b>3-MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1- Producción de histoplasmina .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.1-Cultivo.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.2- Obtención y estandarización de la histoplasmina .....</b>	<b>29</b>

<b>3.2- Producción de antisuero anti-histoplasmina .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.1- Inmunización de conejos .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2-Obtencion y estandarización del antisuero.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3-Inmunodifusion radial doble (IDR).....</b>	<b>35</b>
<b>3.4-Determinacion de proteínas por Lowry.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5-Dot Blot .....</b>	<b>39</b>
<b>3.6-Characterizacion de la histoplasmina .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6.1-SDS-page.....</b>	<b>41</b>
<b>3.6.2-Western Blot.....</b>	<b>42</b>
<b>3.7-Desarrollo del reactivo de látex .....</b>	<b>44</b>
<b>3.7.1-Sensibilizacion de las partículas de látex .....</b>	<b>44</b>
<b>3.7.2-Ensayos de aglutinación .....</b>	<b>46</b>
<b>4-RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1-Produccion de histoplasmina .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.1- Estandarización de histoplasmina por IDR.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2-Produccion de antisuero anti-histoplasmina .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2.1-Estandarizacion del antisuero anti-histoplasmina .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3-Determinacion de proteínas por Lowry.....</b>	<b>54</b>
<b>4.4-Dot Blot .....</b>	<b>57</b>
<b>4.5-Characterizacion de histoplasmina .....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.1-SDS-page .....</b>	<b>59</b>
<b>4.5.2-Western Blot .....</b>	<b>61</b>
<b>4.6-Produccion del reactivo de látex.....</b>	<b>63</b>
<b>4.6.1-Sensibilizacion de partículas de látex.....</b>	<b>63</b>
<b>4.6.2-Ensayos de aglutinación .....</b>	<b>65</b>
<b>5-CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>6- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>7-ANEXOS .....</b>	<b>78</b>

# **1-INTRODUCCION**

## **1.1-Justificación e importancia del tema seleccionado**

La histoplasmosis (HP), producida por el hongo *Histoplasma capsulatum*, es una micosis sistémica desatendida y la de mayor incidencia entre las micosis endémicas de Argentina. *H. capsulatum* es térmicamente dimórfico. El hongo es principalmente un mohó en el medio ambiente, que se comporta como un organismo saprofito en suelos enriquecidos con materia orgánica. La primoinfección, que se inicia por inhalación de conidios y fragmentos hifales que *Histoplasma capsulatum* produce en la naturaleza, puede pasar inadvertida o provocar un cuadro respiratorio agudo/subagudo. En pacientes inmunocomprometidos puede evolucionar a formas diseminadas graves con compromiso pulmonar y multisistémico con altas tasas de letalidad de no mediar tratamiento oportuno (Guimarães y col, 2006). La HP debe ser diferenciada de tuberculosis, otras micosis, neumonías bacterianas y virales, entre otras, por lo que el diagnóstico rápido y preciso es importante para instaurar una terapia específica dado que el diagnóstico definitivo se realiza por la observación microscópica de levaduras intracelulares, lo que requiere un observador experimentado, y por el aislamiento e identificación de *Histoplasma capsulatum* desde cultivos, lo que requiere entre 7 y 60 días. Por estos motivos, consideramos y creemos importante, que una técnica más rápida, precisa, económica y fácil como una aglutinación con partículas de látex puede ayudar en el inmunodiagnóstico de HP, por lo que en el presente trabajo se desarrolló y se evaluó un reactivo de látex que permite detectar los anticuerpos específicos.

## **1.2-Marco teórico**

### **1.2.1- Histoplasmosis / Manifestaciones clínicas**

La histoplasmosis humana se debe a dos variedades del patógeno, *Histoplasma capsulatum* var. *Capsulatum*, agente causal de la histoplasmosis clásica o americana, e *Histoplasma capsulatum* var. *Duboisii*, menos común, es la causa etiológica de la histoplasmosis africana.

La histoplasmosis americana es una micosis sistémica que afecta el sistema reticuloendotelial (fagocítico-mononuclear). Se origina por el hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, presente en excretas de murciélagos y algunas aves (Arenas, R. 2014). Se adquiere por inhalación y por lo general es asintomática en áreas endémicas. En 95% de los afectados es subclínica o benigna, y en una proporción baja, pulmonar progresiva o cutánea

crónica; se hallan levaduras pequeñas en los histiocitos (Guimarães y col, 2006). La histoplasmosis africana se caracteriza por lesiones granulomatosas o supurativas, principalmente cutáneas, subcutáneas u óseas; se encuentran levaduras grandes en las células gigantes (Arenas, R. 2014).

La enfermedad se divide en tres categorías clínicas: pulmonar aguda, pulmonar crónica y diseminada (Arenas, R. 2014):

Infección pulmonar aguda: El 90 % de los casos cursan de forma asintomática o presentan una enfermedad que se manifiesta con fiebre, escalofríos, cefalea, tos seca, dolor torácico pleurítico o subesternal, malestar y mialgia. Los síntomas aparecen de 3 a 18 días después de la exposición, y en muchas personas estos desaparecen en 2 o 3 semanas espontáneamente, aunque el cuadro de decaimiento y fatiga persiste más tiempo. Esta cura parcialmente dejando como secuelas áreas múltiples de calcificación en el parénquima pulmonar y en los ganglios linfáticos regionales, o cura completamente sin lesiones cicatrizables visibles. En las personas inmunodeprimidas, con exposición intensa, las manifestaciones respiratorias tienden a ser más graves.

Infección pulmonar crónica: La histoplasmosis pulmonar crónica puede simular la tuberculosis pulmonar crónica en cuanto a síntomas y manifestaciones radiográficas. Se presenta como un cuadro granulomatoso crónico que no solo afecta los pulmones, sino también otros órganos del sistema monocítico fagocitario. Los síntomas incluyen fatiga, fiebre, anorexia, astenia y pérdida de peso. Los síntomas respiratorios incluyen tos, sobre todo productiva, hemoptisis y disnea.

Infección diseminada: La histoplasmosis diseminada ha aumentado su incidencia en los pacientes con alteraciones de la inmunidad mediada por células. Presentan en la gran mayoría de los casos un curso fulminante, con falla multiorgánica y muerte. Predominan la fiebre, los escalofríos, el malestar, la pérdida de peso, la hepatoesplenomegalia y las linfadenopatías periféricas.

### **1.2.2-Datos epidemiológicos**

La histoplasmosis es una micosis cosmopolita con áreas de endemidad particularmente alta. En América del Norte, las regiones endémicas se encuentran en el medio oeste y sureste de

los Estados Unidos, En América Latina, las áreas más prevalentes se encuentran en Venezuela, Ecuador, Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. En Brasil, las áreas endémicas están ubicadas en las partes del Medio Oeste y Sudeste del país, donde la prevalencia oscila entre 4,4 y 63,1 % y entre 3,0 y 93,2 %, respectivamente. Generalmente, las condiciones ambientales presentes en áreas de alta endemividad son un clima moderado con humedad constante (Guimarães y col, 2006).

Se presenta en todos los grupos étnicos; antes de la pubertad afecta a ambos sexos por igual; en adultos predomina en varones, con una proporción de 3:1. La mayoría de los pacientes es del sexo masculino, caucásica y de más de 50 años de edad. No existe relación con la ocupación, sino con la exposición, pero se ha considerado un factor de riesgo ocupacional en mineros, arqueólogos, espeleólogos, guías de turistas, visitantes de sitios naturales, ingenieros, topógrafos, guaneros y exploradores de cavernas (Arenas, R. 2014).

### ***1.2.3-Histoplasma capsulatum***

Es un hongo dimorfo, porque pasa de una forma micelial a una levaduriforme y viceversa, con fase saprofítica micelial que produce macroconidios de naturaleza polisacárida y que vive sobre todo en climas tropicales y subtropicales. *H. capsulatum* es micelial a 25°C donde crece con hifas hialinas que tienen macroconidios tuberculados y microconidios esféricos, piriformes o en forma de cigarro de paredes lisas que varían en tamaño de 2 µm a 6 µm de diámetro. A 37°C, predominan las formas de levadura que generalmente son células ovoides de paredes gruesas. La fase filamentosa o saprofítica se presenta en medios pobres de nutrientes, de 25 a 28 °C, y la levaduriforme en medios ricos y a temperatura de 35 a 37 °C (Berliner MD, 1973; Edwards MR, 1960; Garrison RG, 1977; Pino L, 1960).

*H. capsulatum* puede habitar en el suelo y detritus vegetal, pero en especial se ha aislado del guano proveniente de murciélagos, aves domésticas como gallinas, pavos, gansos, o bien de aves migratorias, en especial de estorninos (*Sturnus vulgaris*), por lo que es posible encontrar el hongo en granjas y bosques. La temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 30°C, a una humedad relativa entre 70 y 90%, con una preferencia sobre suelos calizos. En general el hongo se desarrolla en fuentes con alto contenido de nitrógeno y fósforo; prefiere poca luz para su reproducción y un ambiente húmedo. Se ha demostrado que el hongo puede aislarse de murciélagos aparentemente sanos, en especial de pulmones e intestino, donde provoca

histoplasmosis asintomática; esto explica por qué el guano contiene *H. capsulatum*, que al quedar en el ambiente se hace dimórfico, dando la fase filamentosa o infectante; de manera que este animal se considera vector indirecto que mantiene la enfermedad (Bonifaz, A. 2012).

Se puede cultivar en agar BHI sangre A 37°C y en agar sabouraud a 25°C. En agar sangre incubado a 37°C, las colonias se muestran, de aspecto de levadura; variando de blanco a crema en aspecto y color que se semejan las colonias de estafilococo aureus. El aislamiento del hongo se puede lograr en medios especiales, como el agar Sabouraud, luego de la incubación a 25°C durante 6 a 12 semanas (Guimarães y col, 2006). Está compuesto de pequeñas células ovales. En agar Sabouraud y glucosa a la temperatura ambiente, presenta forma algodonosa al principio blanca, pero que se torna café con el tiempo. Los cultivos jóvenes muestran ramificaciones e hifas-septadas. Las esporas miden 2.5µm, son blandas, de formas redondas o piriformes, sobre pedículos cortos. Cultivos más viejos tienen esporas más grandes, de 8 a 20 micras, redondas o piriformes, con una cubierta delgada con proyecciones digitales (Borjes EP, 1959).

#### **1.2.4-Patogenia**

La infección por *H. capsulatum* generalmente ocurre por la inhalación de microconidios por parte del huésped, se depositan en los alvéolos y se convierten rápidamente en una forma de levadura parasitaria en los tejidos. Esta germinación y conversión puede ocurrir antes o después de la ingestión por los macrófagos pulmonares (Allendoerfer y col, 1997; Couto y col, 1994). Los conidios y las levaduras son ingeridos por macrófagos y células reticuloendoteliales donde el organismo puede sobrevivir dentro de los fagolisosomas (Allendoerfer y col, 1997). Una vez dentro del macrófago, la levadura se multiplica y viaja a los ganglios linfáticos hiliares y mediastínicos donde accede a la circulación sanguínea para diseminarse a varios órganos (Wheat LJ, 2003). La manifestación clínica de la histoplasmosis varía desde una infección asintomática hasta una histoplasmosis diseminada. Estas manifestaciones dependen principalmente de la magnitud de la exposición, es decir, la cantidad de partículas fúngicas inhaladas, el estado inmunológico del huésped y la virulencia de la cepa infecciosa, lo que indica que los factores ambientales y genéticos controlan la manifestación de la enfermedad (Goodwin RA, 1981). Además, en el contexto de pacientes inmunocomprometidos graves, como las personas con SIDA, las cepas de *H. capsulatum* que

antes no se consideraban virulentas han podido causar enfermedades fatales (Wheat y col, 1990; Davies y col, 1978).

La respuesta inmunitaria aparece en un término de 2 a 4 semanas; durante la primo-infección es posible que se lleve a cabo una diseminación “silenciosa”, sobre todo a ganglios linfáticos y bazo. Una vez que se presenta el primo-contacto, la mayoría de los pacientes (95%) sana en forma espontánea y sólo mantienen respuesta inmunológica a la IDR (respuesta intradérmica al antígeno polisacárido: histoplasmina); en pocas ocasiones se observan radiológicamente focos de calcificación en pulmones, bazo y ganglios linfáticos (Bonifaz, A. 2012).

### **1.2.5-Histoplasmina**

La histoplasmina es el extracto antigénico obtenido del cultivo micelial de *H. capsulatum* (Guimarães y col, 2006). Los principales componentes de la histoplasmina a los que se producen respuestas de anticuerpos son los antígenos C, M y H. El antígeno C es un carbohidrato (galactomanano) que es en gran parte responsable de las reacciones cruzadas observadas con otras especies de hongos (Azuma y col, 1974). El antígeno M es una catalasa, con una actividad que podría proteger las formas de levadura de los mecanismos fungicidas oxidativos y el antígeno H es una  $\beta$ -glucosidasa que contiene epítomos proteicos específicos de especie y epítomos glucosídicos; estos últimos están unidos al núcleo peptídico y probablemente pertenecen al tipo de glicano alto en manosa (Hamilton y col, 1990). Debido a su mayor especificidad para *H. capsulatum*, los anticuerpos contra el antígeno M y H son particularmente útiles en el diagnóstico (Azuma y col, 1974). El análisis inmunoquímico del antígeno M indicó que es una glicoproteína con una masa molecular de 70 a 94 kDa y un punto isoeléctrico de 4,7 y el antígeno H es una glicoproteína donde los carbohidratos constituyen entre el 10 y el 30% del antígeno cuya masa molecular es de 108 a 120 kDa determinado por electroforesis y 144 kDa determinado por cromatografía de tamiz molecular y su punto isoeléctrico 4.5 (Fisher KL, Woods JP, 2000)

### **1.2.6-Métodos de diagnóstico**

Aunque las manifestaciones clínicas de la histoplasmosis están bien descritas, el diagnóstico de histoplasmosis no se puede lograr basándose únicamente en la información clínica, ya que existe una superposición significativa de la histoplasmosis con otras enfermedades. Por

ejemplo, la histoplasmosis aguda leve es similar a diversas infecciones virales del tracto respiratorio. Las manifestaciones pulmonares de enfermedad más agresiva con infiltrados pulmonares y linfadenopatía hiliar se superponen con infecciones por otros hongos dimórficos o *Mycobacterium tuberculosis*. El diagnóstico definitivo requiere, el aislamiento de *H. capsulatum* en medios de cultivo específicos lo que lleva mucho tiempo, por lo general un mínimo de 15 días y carecen de sensibilidad, o la visualización de la forma de levadura en el examen directo de muestras clínicas utilizando técnicas específicas de tinción fúngica, lo que conlleva menos tiempo, pero también es insensible ya que puede dar resultados confusos, dado a que las estructuras de *H. capsulatum* visualizadas microscópicamente pueden confundirse con estructuras de otros patógenos fúngicos. También, dependiendo del material procesado para estas aplicaciones, algunos contaminantes pueden crecer más que *H. capsulatum*, lo que complica el diagnóstico (Guimarães y col, 2006). Además, para los cultivos del hongo en su forma micelial, se requiere de un nivel 3 de bioseguridad y cabina de seguridad biológica, y no todos los laboratorios cuentan estos requerimientos, por lo que se hace necesario desarrollar otras técnicas de diagnóstico.

Dadas estas dificultades, se han desarrollado otras técnicas para complementar el cultivo y el examen microscópico que incorporan información clínica y serológica. Estas pruebas de laboratorio tienen la ventaja de un tiempo de respuesta más corto y una especificidad y sensibilidad razonables, las cuales se basan en la detección de anticuerpos específicos y/o antígenos (Kauffman CA, 2007; Wheat LJ, 2003).

En todo el mundo, los métodos de detección de anticuerpos son las principales herramientas actualmente en uso para el diagnóstico sin cultivo de histoplasmosis dada su disponibilidad general y su rápido tiempo de respuesta cuyo diagnóstico serológico se centra en la identificación de anticuerpos anti-H y anti-M. Las dos metodologías de rutina son la fijación del complemento y la inmunodifusión, debido a la conveniencia, disponibilidad y precisión de estos ensayos. Sin embargo, estos métodos no deben utilizarse en pacientes con la forma diseminada de histoplasmosis en vista del aumento de resultados falsos negativos. Además, se producen reacciones serológicas cruzadas a antígenos similares a *Histoplasma* en pacientes infectados con otros patógenos fúngicos comunes (Braz J, 2006).

La fijación del complemento (FC) es una prueba inmunológica que busca detectar y medir la presencia de anticuerpos fijadores de complemento específicos contra el hongo, presentes en el suero o en el líquido cefalorraquídeo de los individuos infectados. Para realizar esta prueba se utilizan antígenos obtenidos tanto de la forma de micelio (histoplasmina) como de la levadura (completa). Los títulos de anticuerpos entre 1:8 y 1:16 son considerados sugestivos de un posible contacto con el hongo; mientras que títulos mayores a 1:32 se consideran indicativos de una histoplasmosis activa (Muñoz y col, 2010).

La prueba de inmunodifusión (ID) en gel-agar permite identificar dos bandas de precipitado, denominadas H y M, que corresponden al reconocimiento de anticuerpos específicos contra tales antígenos presentes en el suero de pacientes con histoplasmosis. Los antígenos H y M son glicoproteínas que suelen ser liberadas en cultivos de ambas formas, micelial y levaduriforme. El antígeno H tiene homología con una  $\beta$ -glucosidasa y; se detecta hasta en el 10% de los casos y cuando está presente indica una infección activa. El antígeno M tiene homología con una catalasa y se identifica en el suero de aproximadamente 80% de los pacientes; sin embargo, la ID no permite diferenciar una infección reciente de una pasada, dado que los anticuerpos contra este antígeno pueden persistir por meses y, hasta años, después de la primo-infección. La sensibilidad y la especificidad de ambas pruebas en la determinación de anticuerpos contra *H. capsulatum* dependen de la forma clínica de la micosis. Es así como se ha reportado que la FC y la ID son positivas aproximadamente entre el 90-100% de los pacientes con histoplasmosis pulmonar crónica, y entre el 70-80% de los pacientes con histoplasmosis diseminada. Aunque la prueba de FC presenta una sensibilidad más alta en comparación con la ID, esta última es mucho más específica independientemente de la forma clínica de la histoplasmosis (Muñoz y col, 2010). Ambas técnicas presentan algunas limitaciones, entre las que se mencionan:

- Requerimiento de 2 a 6 semanas para que un individuo produzca anticuerpos después de haber estado expuesto al hongo (Muñoz y col, 2010).
- En pacientes inmunosuprimidos, especialmente aquellos con sida, se presentan niveles de sensibilidad muy bajos debido a la disminución en la producción de anticuerpos que caracteriza este síndrome (Muñoz y col, 2010).

- Algunos resultados positivos pueden deberse a infecciones anteriores y sugerir, incorrectamente, una histoplasmosis activa en pacientes con otra infección (los anticuerpos anti-precipitina M se mantienen hasta por dos años) (Muñoz y col, 2010).
- Pueden ocurrir reacciones cruzadas en el 40% de los pacientes con otras micosis tales como *paracoccidioidomycosis*, *coccidioidomycosis* y *aspergilosis* (Muñoz y col, 2010).

Recientemente, la biología molecular ha permitido introducir nuevas herramientas que han sido utilizadas para la detección e identificación de *H. capsulatum*, una de ellas es la PCR anidada que se caracteriza por sus altos niveles de sensibilidad y especificidad. Estas técnicas moleculares han permitido realizar análisis evolutivos, estudios de diversidad genética y un sinnúmero de estudios de epidemiología molecular, a partir de los cuales se ha logrado recopilar información valiosa sobre la variabilidad genética de este microorganismo (Muñoz y col, 2010). Para estas nuevas herramientas, la mayoría de los laboratorios, no están equipados para utilizar estas técnicas moleculares.

### **1.3-Conceptos de inmunología empleados en este trabajo**

Para la caracterización antigénica de la histoplasmina, fue necesario evaluar interacciones antígeno-anticuerpo, a través de técnicas inmunológicas como la inmunodifusión, dot blot, western-blot y aglutinación con partículas de látex, como así también fue necesario obtener antiseros, para evaluar la reactividad de los mismos con la histoplasmina y con otros hongos. Para introducirnos en el tema a continuación se resumen algunos conceptos básicos de inmunología y, en la sección 1.4, los fundamentos de dichas técnicas.

#### **1.3.1- Antígenos**

Los antígenos se definen como moléculas “extrañas” (que no pertenecen a nuestro organismo) que interactúan con el receptor de inmunoglobulina de las células B o con el receptor de célula T cuando se encuentra en forma de complejo con MHC (complejo mayor de histocompatibilidad), por eso hoy se considera antigénica a toda molécula capaz de unirse de manera específica a los receptores del linfocito B (Ig; BCR) o del linfocito T (TCR). No todos los antígenos son capaces de inducir la producción de anticuerpos, es por eso que a los antígenos que pueden desencadenar una respuesta inmunitaria humoral (producción de anticuerpos) se los denomina moléculas INMUNOGENICAS o INMUNOGENOS.

La inmunogenicidad de una sustancia depende de:

- La alteridad o disparidad estructural con el huésped
- El tamaño molecular
- La composición y complejidad química
- La capacidad de ser procesada y presentada a un linfocito T
- El genotipo del huésped o receptor (MHC)
- La dosis inoculada
- La vía de ingreso del inmunógeno

Un inmunógeno se compone de epítomos, que son las regiones con actividad inmunitaria que se unen a receptores de membrana específicos de antígeno en los linfocitos (TCR) o anticuerpos secretados (BCR). Los epítomos pueden involucrar una secuencia lineal y continua de aminoácidos (epítomos lineales o continuos), o pueden involucrar aminoácidos presentes en localizaciones distantes en la secuencia primaria, pero cercanos en la conformación tridimensional de la molécula (epítomos discontinuos o conformacionales) (Janeway's immunobiology, 2017).

### **1.3.2- Anticuerpos**

Los anticuerpos constituyen un componente esencial de la inmunidad adaptativa. Con ellos se combate a los patógenos que se replican en los espacios extracelulares, que presentan un estadio extracelular o que se diseminan a través del espacio extracelular. Las células plasmáticas secretan moléculas de anticuerpo solubles con idéntica especificidad de antígeno a la del receptor de superficie de la célula B original. Las moléculas de anticuerpo tienen dos funciones, unión a antígeno y mediación de funciones efectoras. La unión a antígeno es realizada por las porciones amino terminal, y las funciones efectoras por las regiones carboxilo terminales. Además de fijar antígeno, los anticuerpos participan en una extensa gama de otras actividades biológicas. Cuando se considera la función del anticuerpo en las defensas contra una enfermedad, es importante recordar que los anticuerpos casi nunca destruyen o eliminan patógenos con sólo unirse a ellos. Para que sean eficaces contra los microorganismos, los anticuerpos no sólo deben reconocer antígeno, sino también deben activar reacciones (funciones efectoras) que tienen como resultado la eliminación del antígeno y la muerte del patógeno. Si bien las regiones variables del anticuerpo son los únicos

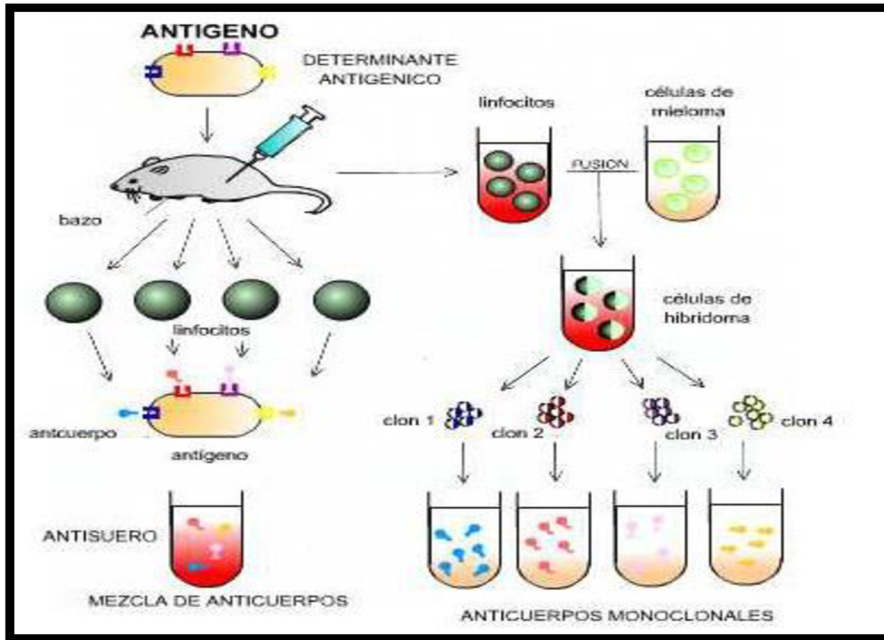
agentes de unión a antígenos, la región constante de la cadena pesada tiene a su cargo una diversidad de interacciones colaboradoras con otras proteínas, células y tejidos, que dan por resultado las funciones efectoras de la reacción humoral (Kuby immunobiology, 2007).

Las moléculas de anticuerpo tienen una estructura común de cuatro cadenas peptídicas. Esta estructura se integra con dos cadenas ligeras (L) idénticas, consistentes en polipéptidos de unos 22 000 Da, y dos cadenas pesadas (H) polipéptidos más grandes de unos 55 000 Da o más. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro y por interacciones no covalentes, como puentes salinos, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas, para formar un heterodímero (H-L). Las dos combinaciones idénticas de cadena pesada y ligera (H-L) están unidas entre sí por interacciones no covalentes similares y por puentes disulfuro para formar la estructura de anticuerpo básica de cuatro cadenas (Janeway's immunobiology, 2017).

### **1.3.3- Inmunización / Obtención de antisueros**

La inmunización es una estimulación deliberada de la respuesta inmune de un huésped. La inmunización activa supone la administración de antígenos o adyuvantes inmunológicos. La inmunización pasiva supone la administración de sueros inmunes, linfocitos o el trasplante de tejido productor de células inmunocompetentes, como el timo o médula ósea (Kuby immunobiology, 2007). Para obtener un antisuero, suero que contiene anticuerpos específicos, ya sean monoclonales o policlonales, se emplean planes de inoculaciones sucesivas o única inoculación de inmunógeno en el huésped, cuyo huésped puede ser un ratón, conejo, cabra, caballo o un humano.

En el presente trabajo, el antisuero que se desarrolló, es un antisuero policlonal de conejo, dado que su obtención es más fácil, económica y se obtienen anticuerpos de alta afinidad, a diferencia de los monoclonales cuya obtención es más difícil y costosa (*ver figura 1*). Cada inmunógeno experimental muestra una curva de dosis-respuesta particular, que se determina al medir la reacción inmunitaria a diferentes dosis y distintas vías de administración.



**Figura 1: Obtención de anticuerpos policlonales (izquierda) y anticuerpos monoclonales (derecha) (Janeway's immunobiology, 2017).**

Por lo general, los inmunógenos experimentales se administran por vía parenteral, es decir, por otras vías distintas de la oral. Las vías de administración más comunes son: la intravenosa (IV), dentro de una vena; intradérmica (ID), dentro de la piel; subcutánea (SC), debajo de la piel; intramuscular (IM), en un músculo; intraperitoneal (IP), dentro de la cavidad peritoneal. La vía de administración influye en alto grado en los órganos y poblaciones celulares inmunitarias que intervienen en la respuesta. El antígeno suministrado por vía intravenosa se traslada primero al bazo, mientras que el que ingresa por vía subcutánea pasa primero a los ganglios linfáticos locales (Kuby immunobiology, 2007). Algunos inmunógenos experimentales suelen prepararse con sustancias que, cuando se mezclan e inyectan con un antígeno, aumentan la inmunogenicidad de dicho antígeno, estas sustancias se denominan ADYUVANTES (*ver figura 2*). Los adyuvantes se emplean con frecuencia para reforzar la reacción inmunitaria cuando un antígeno tiene inmunogenicidad baja o sólo se dispone de cantidades pequeñas de él. Se desconoce el modo preciso en que los adyuvantes acentúan la reacción inmunitaria, pero en la actualidad se sabe que algunos de los adyuvantes conocidos como polirribonucleótidos sintéticos y lipopolisacáridos bacterianos son ligandos de los receptores tipo Toll presentes en la superficie de células dendríticas y macrófagos y por lo tanto estimulan las inmunorreacciones a través de la activación del sistema inmunitario

innato (Janeway's immunobiology, 2017). En general, los adyuvantes ejercen efectos como, prolongación de la persistencia del antígeno, intensificación de señales coestimuladoras, aumento de la inflamación local o estimulación de la proliferación inespecífica de linfocitos

Nombre del adyuvante	Composición	Mecanismo de acción
Adyuvante de Freund incompleto	Emulsión de aceite en agua	Liberación tardía de antígeno; incremento de la captación por macrófagos
Adyuvante de Freund completo	Emulsión de aceite en agua con micobacterias muertas	Liberación tardía de antígeno; captación aumentada por macrófagos; inducción de coestimuladores en macrófagos
Adyuvante de Freund con MDP	Emulsión de aceite en agua con muramildipéptido (MDP), un constituyente de micobacterias	Similar al adyuvante de Freund completo
Alumbre (hidróxido de aluminio)	Gel de hidróxido de aluminio	Liberación tardía de antígeno; incremento de la captación por macrófagos
Alumbre + <i>Bordetella pertussis</i>	Gel de hidróxido de aluminio con <i>B. pertussis</i> muertas	Liberación tardía de antígeno; captación aumentada por macrófagos; inducción de coestimuladores
Complejos estimuladores de inmunidad (ISCOM)	Matriz de Quil A que contiene proteínas víricas	Lleva antígeno al citosol; permite la inducción de células T citotóxicas

Figura 2: Composición y mecanismos de acción de diferentes tipos de adyuvantes (Janeway's immunobiology, 2017)

### 1.3.4- Interacción Antígeno-Anticuerpo

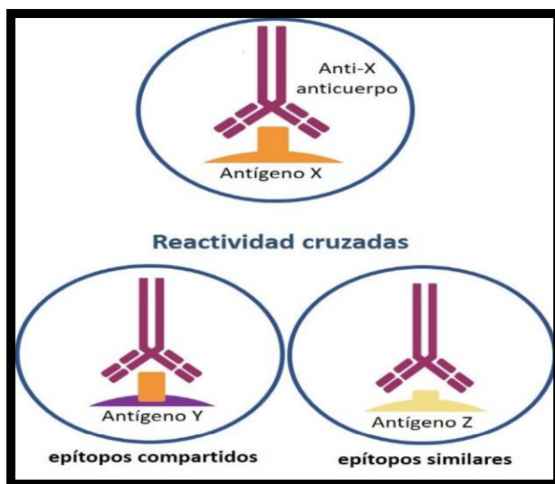
La interacción antígeno-anticuerpo es una relación bimolecular parecida a la interacción enzima-sustrato, con una diferencia importante, que no conduce a una alteración química irreversible en el anticuerpo ni en el antígeno. La relación entre un anticuerpo y un antígeno incluye varias interacciones no covalentes entre el determinante antigénico, o epítopo, del antígeno y el dominio de región variable (VH/VL) de la molécula del anticuerpo. Las interacciones no covalentes que forman la base de la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas e interacciones de van der Waals. Puesto que estas interacciones son débiles a nivel individual (comparadas con un enlace covalente), se necesita un gran número de ellas para formar una interacción Ag-Ab potente (Fainboim-Geffner, 2011). La fuerza combinada de las interacciones no covalentes entre un sitio de unión de antígeno único en un anticuerpo y un epítopo único en un antígeno es la afinidad del anticuerpo por ese epítopo. Los anticuerpos de afinidad baja

unen antígeno de manera débil y tienden a disociarse con facilidad, en tanto que los de afinidad alta unen antígeno con más firmeza y la unión se mantiene por más tiempo (Janeway's immunobiology, 2017).

Las reacciones Antígeno-Anticuerpo se utilizan para detectar Ag o Ac, medir la magnitud de la respuesta inmunitaria humoral e identificar moléculas de interés médico o biológico. En la interacción in vitro de un antígeno con un anticuerpo se distinguen dos etapas, la interacción primaria no visualizable y la interacción secundaria, que sigue a la anterior y se caracteriza por la aparición de un fenómeno visible al introducir algún indicador que permita valorar la interacción primaria. Estos indicadores, conocidos como marcadores, se unen a antígenos o anticuerpos por unión covalente y van a permitir el revelado de la reacción. (Fainboim-Geffner, 2011).

### 1.3.5- Reactividad cruzada

Aunque las reacciones antígeno-anticuerpo son muy específicas, en algunos casos el anticuerpo estimulado por un antígeno puede reaccionar en forma cruzada con un antígeno no relacionado. Una reacción cruzada se da cuando un anticuerpo tiene la capacidad de reconocer epítomos (Ag) distintos al antígeno que lo generó. Esta reactividad cruzada ocurre si dos antígenos diferentes comparten un epítomo idéntico o muy similar (*ver figura 3*). En el último caso la afinidad del anticuerpo por el epítomo de reacción cruzada suele ser menor que para el epítomo original (Fainboim-Geffner, 2011).



**Figura 3: Representación gráfica de reactividad cruzada (<https://microbionotes.com/antigen-antibody-reaction>)**

## **1.4-Técnicas inmunoquímicas y químicas utilizadas en este trabajo**

### **1.4.1- Cuantificación de proteínas por Lowry**

Por el método de Lowry se procede a la determinación de la concentración total de proteína en una muestra. El principio del método se basa en la utilización de una mezcla que contiene molibdato, tungstato y ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sufre una reducción cuando reacciona con proteínas, en la presencia del catalizador cobre (II). Esto produce un compuesto con absorción máxima a 750 nm. Esta reducción ocurre directamente a través de las cadenas laterales de algunos aminoácidos (tirosina, triptófano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuyen con cuatro electrones, o a través de la eliminación de dos electrones de cada unidad tetrapeptídica de las proteínas, que es facilitada por la formación del quelato entre el cobre (II) y las proteínas. De este modo, el método de Lowry envuelve dos reacciones químicas. La primera reacción es la reducción del ión cobre (II) en condiciones alcalinas (básicas), formando un complejo con enlaces peptídicos, denominado reacción de Biuret. La segunda reacción envuelve la reducción del reagente Folin-Ciocalteu por el complejo cobre-enlace peptídico, causando un cambio en la coloración de la solución para azul. Por espectrofotometría pueden leerse las muestras tratadas con este método entre 650 a 750 nm. La cantidad de proteína puede ser estimada utilizando una curva estándar con otra proteína, es decir, cuya concentración sea conocida como la albúmina bovina sérica.

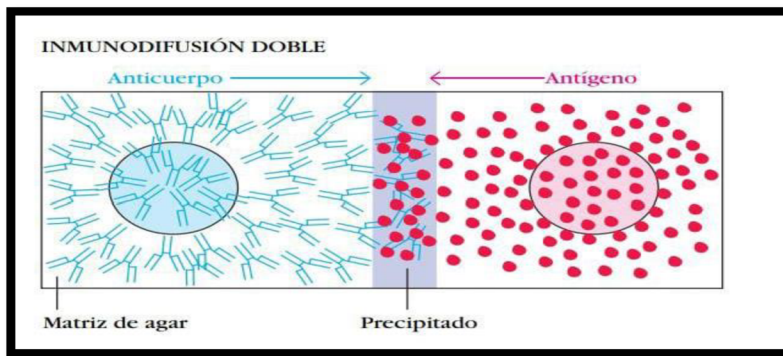
La principal ventaja del método de Lowry es su alta sensibilidad. El método de Lowry es más sensible que la determinación UV y también más sensible que el método de Biuret. Algunas desventajas son el tiempo de la reacción y la incompatibilidad con detergentes y agentes reductores.

### **1.4.2- Inmunodifusión radial doble (IDR)**

La inmunodifusión radial es una técnica de análisis inmunológico que se utiliza para detectar la cantidad de anticuerpos que hay en el suero de un individuo. La técnica de inmunodifusión radial es lenta y poco sensible ya que necesita mucha cantidad de anticuerpos o antígeno para que se formen complejos. Existen dos tipos de reacciones de inmunodifusión para determinar las concentraciones relativas de anticuerpos o antígenos, comparar antígenos o determinar la pureza relativa de una preparación de antígeno. Éstos son la inmunodifusión radial simple

(método de Mancini) y la inmunodifusión radial doble (método de Ouchterlony), ambos se efectúan en un medio semisólido como el agar (Kuby inmunobiology, 2007).

En el presente trabajo la técnica de inmunodifusión utilizada, es la del método de Ouchterlony, donde tanto el antígeno como el anticuerpo se difunden radialmente desde los fosos uno hacia el otro y por tanto se establece un gradiente de concentración. Conforme la equivalencia se alcanza, se produce una línea visible de precipitación, una línea de precipitina (ver figura 4) (Kuby inmunobiology, 2007).



**Figura 4:** Esquema inmunodifusión radial doble (Kuby inmunobiology, 2007).

La inmunodifusión radial doble constituye un método muy completo ya que nos permite obtener más información que los otros tipos de inmunodifusión ya que la posibilidad de hacer varios pocillos en una misma placa permite obtener información sobre similitud de los antígenos reaccionantes. Esta técnica consiste en colocar en una placa de Petri agar 1.5% al cual luego de solidificar se le realizan perforación en forma de pocillos a distancia conveniente y en dichas perforaciones se colocan pequeñas cantidades de antígeno y anticuerpo, donde en este caso estos difunden en forma radial a partir del pocillo generando bandas de precipitación cuyas características de dichas bandas dependen de varios factores como:

- Cuando las concentraciones colocadas en los pocillos estén cerca de la equivalencia la banda se formará a la mitad de distancia entre ellos.
- La concavidad de la banda estará hacia el lado del pocillo donde se halla colocado el reactivo de mayor peso molecular.

- La banda será recta (sin concavidad) cuando los pesos moleculares de ambos reactivos sean semejantes.

### **1.4.3- Dot blot**

Es una técnica de biología molecular que se utiliza para detectar proteínas o ácidos nucleicos. Es simplificación de los métodos Northern blot, Southern blot o Western blot. En un dot blot las biomoléculas para ser detectadas no son separadas por cromatografía o electroforesis, sino que se coloca una gota que contiene la molécula para ser detectada directamente sobre una membrana (nitrocelulosa para proteínas) para luego ser detectadas por sondas de nucleótidos (northern blot y southern blot) o anticuerpos (para un western blot). La técnica ofrece importantes ahorros en tiempo. Sin embargo, no ofrece información sobre el tamaño de la biomolécula blanco. Además, si dos moléculas de diferentes tamaños son detectadas, se seguirá viendo como un solo punto. Por lo tanto, el dot blot sólo puede confirmar la presencia o ausencia de una biomolécula.

### **1.4.4- SDS-page**

El SDS (sodium dodecyl sulfate) es un detergente aniónico, que cuando se une a las proteínas, las desnaturaliza de manera que rompe las interacciones hidrofóbicas y eliminan sus estructuras secundarias y terciarias, otorgándoles una carga neta negativa, permitiendo así separar proteínas de acuerdo a su peso molecular. Aproximadamente, se une una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos. La carga nativa original de la molécula proteica en presencia de SDS está completamente enmascarada por la carga negativa del SDS.

La electroforesis en geles de poliacrilamida es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas. La técnica permite separar moléculas cargadas y con diferencias en movilidad cuando se las somete a la acción de un campo eléctrico (*ver figura 5*). La electroforesis se lleva a cabo sobre un soporte inerte, generalmente sobre geles de poliacrilamida (PAGE). Para la visualización de las proteínas se utilizan diferentes métodos de tinción, siendo el más habitual el azul de Coomassie. En la SDS-PAGE, la separación electroforética es en función del tamaño (masa molecular), lo que permite determinar el peso molecular de las proteínas. Para ello se compara la movilidad electroforética ( $R_f$ ) de la proteína de peso molecular desconocido con el de proteínas de

referencia de peso molecular conocido. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo (-) al ánodo (+) a una velocidad relacionada con su peso molecular. Además del SDS, se emplean otros agentes desnaturizantes como el 2-mercaptoetanol que reduce los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH).

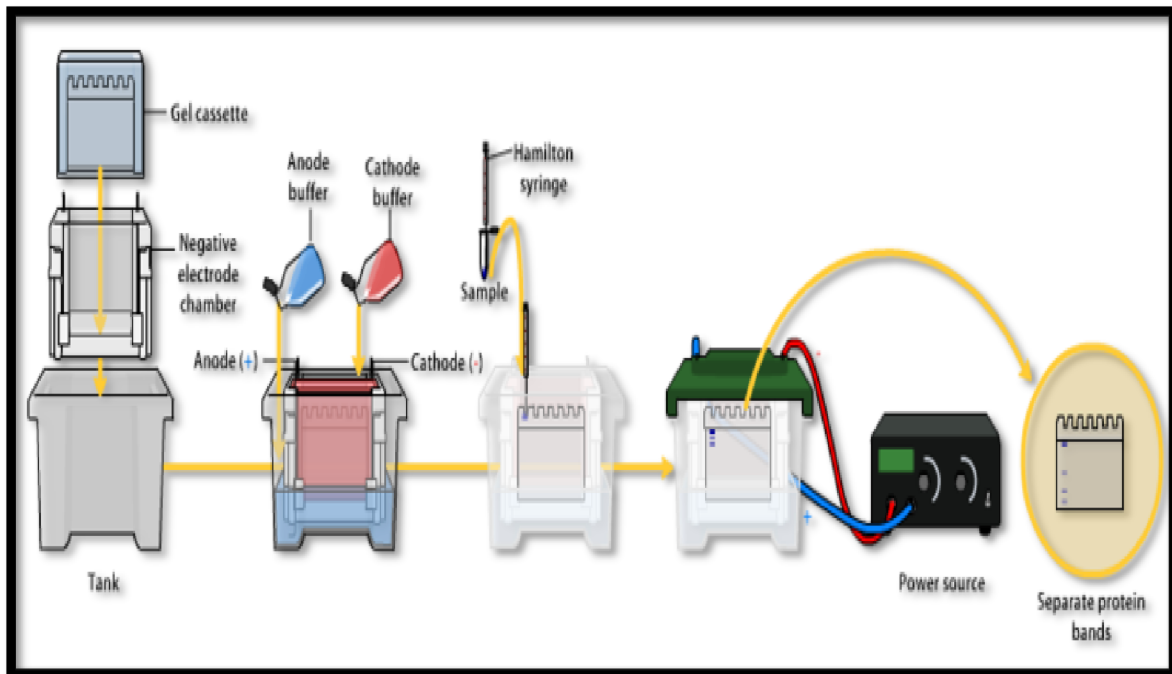


Figura 5: Diagrama Electroforesis (<https://www.esraa.edu.iq/modules/lect/lect/9231-10.pdf>)

#### 1.4.5- Western blot

En el Western blot, una mezcla de proteínas se separa por medios electroforéticos en un gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Las bandas de proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante electroforesis, y las bandas individuales de proteína se identifican al inundar la membrana de nitrocelulosa con anticuerpo policlonal o monoclonal radio-marcado o unido a enzimas específicas para la proteína de interés. Los complejos Ag-Ab, que se forman en la banda que contiene la proteína reconocida por el anticuerpo, pueden visualizarse de diversos modos. Tras la unión del conjugado de enzima y anticuerpo, la adición de un sustrato cromógeno que produce un producto de color intenso e insoluble origina la aparición de una banda de color en el sitio del antígeno blanco (*ver figura 6*).

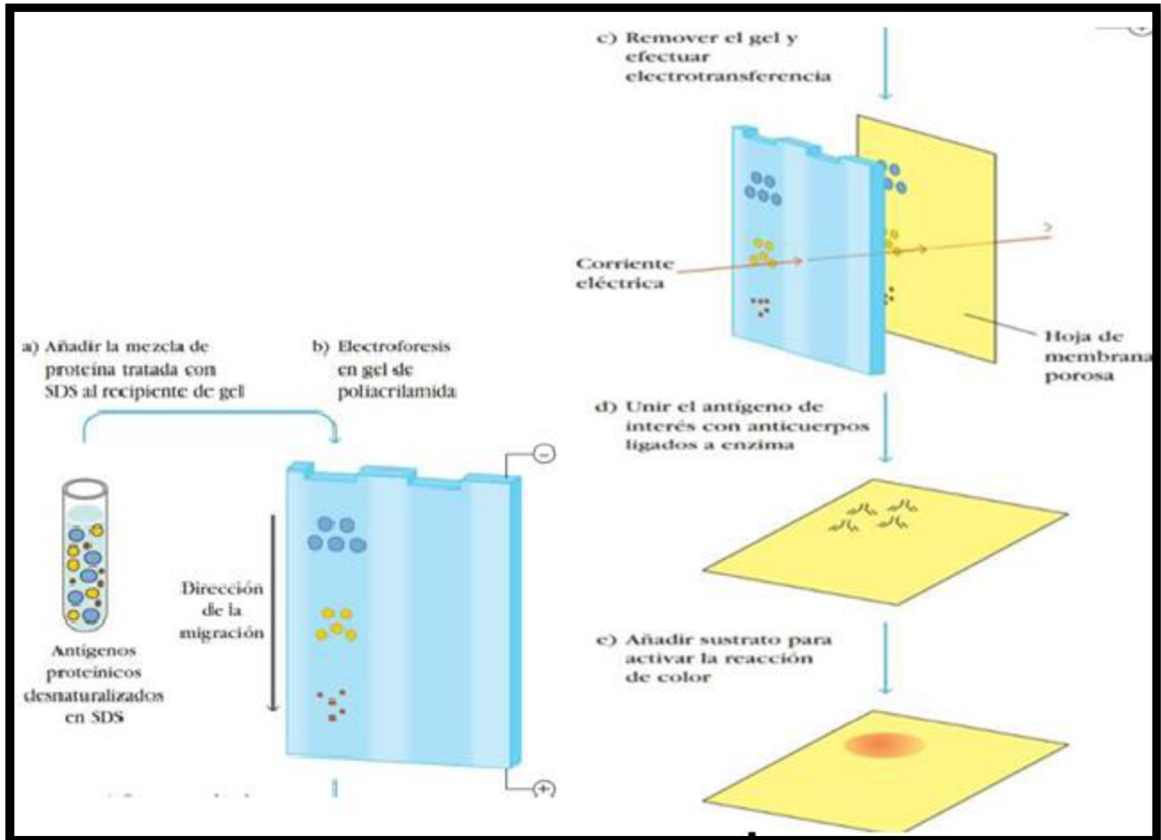
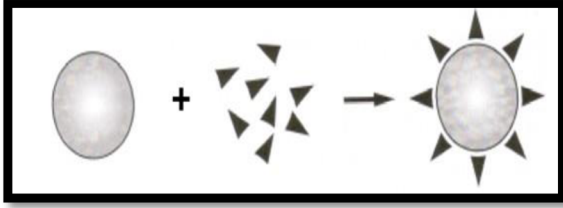


Figura 6: Diagrama de Western blot (Kuby inmunobiology, 2007).

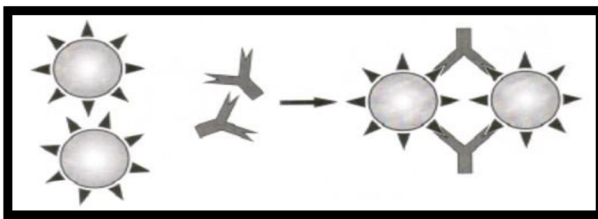
#### 1.4.6- Aglutinación en partículas de látex

Las reacciones de aglutinación se utilizan para la detección de anticuerpos empleando antígeno en estado particulado. También es útil para la detección de antígenos. Los principios que la rigen son los mismos que para precipitación, pero con la diferencia que las reacciones de aglutinación son más sensibles que las de precipitación. Son técnicas poco costosas, requieren poco materiales y son rápidas. Es una herramienta útil en el laboratorio de inmunología para la detección y hallazgo de diferentes patologías. En las aglutinaciones directas el antígeno es por sí mismo particulado, por lo que no requiere fijación a soportes inertes, donde dicho antígeno es aglutinado directamente por los anticuerpos, siendo una aglutinación rápida en placas y lenta en tubos o microplacas. En las aglutinaciones indirectas los antígenos solubles se unen a glóbulos rojos o partículas inertes como el poliestireno, látex de manera covalente (ver figura 7A) o también pueden utilizarse bacterias como soporte (*Micrococcus lysodeikticus*), dichas aglutinaciones suelen ser rápidas en placas y lentas en tubos o microplacas.



**Figura 7A:** Esquema de sensibilización con partículas de látex. El círculo representa una partícula de látex y los triángulos los antígenos. (<https://slideplayer.es/slide/7580300/tecnicas-de-aglutinacion>)

En la aglutinación con partículas de látex la interacción entre el anticuerpo anti-x proveniente de un suero y el antígeno “x” particulado, unido de manera covalente o no covalente a una partícula de látex, resulta en un agrupamiento visible llamado aglutinación (ver figura 7B), que suele verse como una malla de precipitación o una especie de grumos (ver figura 8). Los anticuerpos que producen estas reacciones se denominan aglutininas. Las reacciones de aglutinación son similares en principio a las reacciones de precipitación porque dependen del enlace cruzado de antígenos polivalentes. Del mismo modo en que un exceso de anticuerpo inhibe las reacciones de precipitación, este exceso también puede inhibir las reacciones de aglutinación; tal inhibición se denomina efecto prozona, el cual para ver si este existe o no se debe diluir la muestra y en el caso que haya aglutinación en la muestra diluida, pero en la muestra pura (más concentrada) no, se puede decir que hay presencia de efecto prozona.



**Figura 7B:** Esquema de aglutinación (<https://slideplayer.es/slide/7580300/tecnicas-de-aglutinacion>)



**Figura 8:** Anillo negro izquierdo representa una aglutinación en partículas de látex positiva para proteína C reactiva (PCR) y el anillo negro derecho representa una aglutinación negativa (<https://www.clikisalud.net/salud-general-prueba-aglutinacion-latex>).

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1-Objetivos Generales**

- Capacitarme y entrenarme en el desarrollo de técnicas microbiológicas, bioquímicas e inmunoquímicas básicas.
- Capacitarme en la obtención de antisueros policlonales de conejo.
- Desarrollar un reactivo de látex para la detección de anticuerpos de *H. capsulatum*

### **2.2-Objetivos Específicos**

- Obtener, caracterizar y optimizar preparaciones antigénicas nativas de *Histoplasma capsulatum* (histoplasmina) para utilizar en la detección de anticuerpos.
- Obtener anticuerpos policlonales en conejo.
- Evaluar la inmunoreactividad de la histoplasmina con el antisuero obtenido por diferentes técnicas.
- Evaluar la presencia de reacciones cruzadas con otros hongos.
- Determinar la condición óptima de adsorción de la histoplasmina a partículas de látex de 0.8  $\mu\text{m}$ .
- Comparar la metodología de aglutinación en partículas de látex con la inmunodifusión.

## **3-MATERIALES Y METODOS**

### **3.1- Producción de histoplasmina**

La producción del antígeno de *Histoplasma capsulatum* (histoplasmina) se realizó en el Servicio Micosis Profundas del Departamento de Micología del INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS (INEI)-. ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”

#### **3.1.1-Cultivo**

Para el cultivo se seleccionó una cepa antigénica de *Histoplasma capsulatum* (Dmic 206238) en fase micelial conservada en aceite, perteneciente a la colección de cultivos del departamento de Micología, mantenida en refrigerador del laboratorio BSL3 (Laboratorio de seguridad biológica nivel 3) de la UOCCB (Unidad Operativa Centro de Contención biológica), cuya cepa fue caracterizada por métodos microbiológicos y moleculares (secuenciación de ADN) y registrada en Registro de cepas antigénicas (RG-MI-158).

Debido a que *H. capsulatum* es un microorganismo perteneciente al Grupo de riesgo 3, lo que requiere manejo en Nivel de Bioseguridad 3 y CSB (Cabina de Seguridad Biológica) clase II-A2, sólo los profesionales y técnicos autorizados del Servicio de Micología están autorizados a trabajar con los cultivos, por lo que mi rol hasta la inactivación del cultivo fue aprender y tomar nota de cada paso.

#### **Materiales**

- Tubos de vidrio 13 mm x150 mm con tapa a rosca
- Erlenmeyer de polipropileno estéril de 1000 ml con malla plástica en su interior
- Ansa de gancho
- Pipeta de 25 ml estéril.
- CSB II. Microscopio
- Incubador regulado a 28 °C. Refrigerador 2-8° C

#### **Activación de la cepa antigénica**

Se cultivó en agar GYE (Glucosa - Extracto de levadura) la cepa antigénica seleccionada (Dmic 206238) de la siguiente manera:

1) Se retiró el aceite y con un ansa de gancho esterilizada en incinerador se cortaron 2 fragmentos de aprox. 0.1 cm x 0.1 cm y se colocaron en un tubo con agar GYE en bisel por duplicado (2 tubos en total). El aceite retirado se volvió a colocar en el tubo original y se guardó nuevamente en el cepario. Se dejaron incubar los 2 tubos a 28 °C durante 15 días.

2) Al cabo de los 15 días se observó desarrollo fúngico y se seleccionó el tubo que presento mayor desarrollo y a partir de él se volvió a subcultivar por duplicado de igual manera que el paso 1. Nuevamente se procedió a incubar a 28 °C durante 10 días.

3) Luego de los 10 días se observó crecimiento fúngico y nuevamente se repitió el paso anterior subcultivando 2 tubos desde el repique anterior con mayor crecimiento. En total se realizaron 4 repiques más.

4) El ultimo repique se dejó incubar a 28 °C por 25 días, dentro de ese lapso de tiempo se observó si el micelio cubrió el 80% de la superficie del agar para que se considere Cepa Activada. Al pasar los 25 días, se consideró la cepa activada.

5) Una vez activada la cepa antigénica, en CSB II se realizó el control de pureza e identidad del cultivo, donde se realizó un disgregado con LFAA (Lactofenol azul de algodón) del tubo del último repique que presento mejor desarrollo y se observó al microscopio óptico con aumento final de 400X. Este control fue aprobado según los criterios establecidos por el servicio de micología, que nos permiten ver si el cultivo corresponde con las características de *H. capsulatum* y no de otros hongos.

### **Preparación del cultivo en medio liquido**

En CSB II se extrajo de uno de los últimos repiques, el que tiene mejor desarrollo, 5 porciones de entre 1 y 3 mm<sup>2</sup> de micelio utilizando el ansa de gancho y se colocaron en 500 ml de caldo Asparagina esteril contenidos en un Erlenmeyer con una malla plástica en su interior (los trozos de micelio se colocaron por encima de la malla, en la superficie del caldo). Se dejó incubar a 28° durante 3 meses en cultivo estático. Al pasar los 3 meses, se realizó en CSB II otro control de pureza e identidad del cultivo liquido con LFAA, resultando satisfactorio.

### **Inactivación del cultivo**

En CSB II se le agrego al cultivo líquido, 10 ml de Thimerosal 1% (solución de Merthiolate), y se agito manualmente por rotación en sentido y en contrasentido de las agujas del reloj. Se dejó reposar en refrigerador durante 48 h para inactivar el cultivo fúngico. Luego de 48 h de reposo en CSB II, se tomaron tres trozos de micelio en suspensión y se sembraron cada uno en un tubo de Agar Sabouraud y se dejó incubar 14 días a 28°. El Erlenmeyer con el cultivo fúngico “inactivo” se guardó nuevamente en el refrigerador hasta obtener resultados de inactivación. Según los criterios de aceptación de inactivación del cultivo (*ver anexo 1*), luego de los 14 días, se consideró que el cultivo esta inactivado, el mismo fue retirado de la UOCCB para continuar su procesamiento.

### **3.1.2- Obtención y estandarización de la histoplasmina**

#### **Materiales**

- CSB II. Bomba de vacío unida a kitasato trampa.
- Embudo de Büchner estéril. Kitasato de 1000 ml estéril.
- Papel de filtro para separación sólido/líquido (Whatman #40).
- Unidades filtrantes de poro 0.45 y 0.22 µm, con receptáculo de 500 mL.
- Botellas de vidrio de 100 ml estériles, con tapón de goma.
- Tubos cónicos de 15ml, recipiente plástico con tapa, micropipeta p200
- Vortex. Freezer -18 °C o menos temperatura.

#### **Obtención del antígeno crudo**

El antígeno crudo se obtuvo por 3 etapas de filtración:

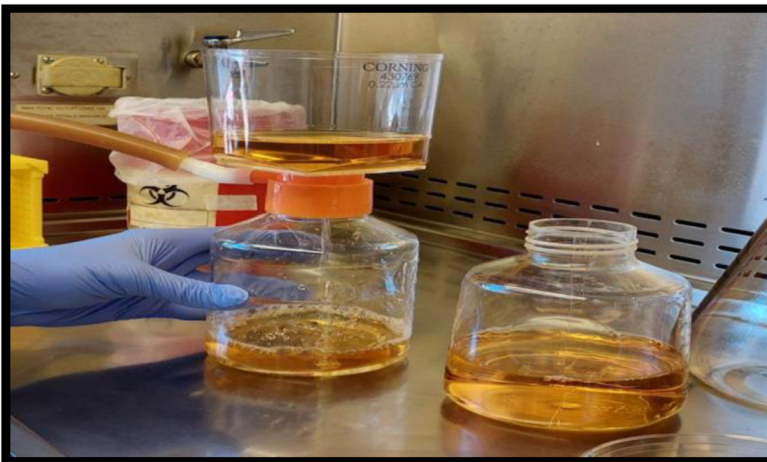
Filtrado I: En CSB II se separó la masa micelial del medio líquido filtrando con bomba de vacío. El volumen total del cultivo se colocó sobre un embudo de Büchner que contiene un papel de filtro, conectado a un kitasato y este a su vez, a una bomba de vacío acoplada a un kitasato trampa (*ver figura 9*). Se encendió la bomba de vacío para realizar el filtrado, y luego se conservó.



**Figura 9: Sistema para realizar el primer filtrado**

**Filtrado II:** En CSB II se filtró el primer filtrado a través de una unidad filtrante estéril con filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y receptor de 500 ml, uniendo esta unidad a una bomba de vacío acoplada a un kitasato trampa (ver figura 10).

**Filtrado III:** En CSB II a través de una unidad filtrante de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro y receptor de 500 ml, se filtró el segundo filtrado de igual manera que el filtrado II (ver figura 10). Luego se conservó este tercer filtrado en refrigerador, y se rotulo como “Antígeno Crudo de *Histoplasma capsulatum*”.

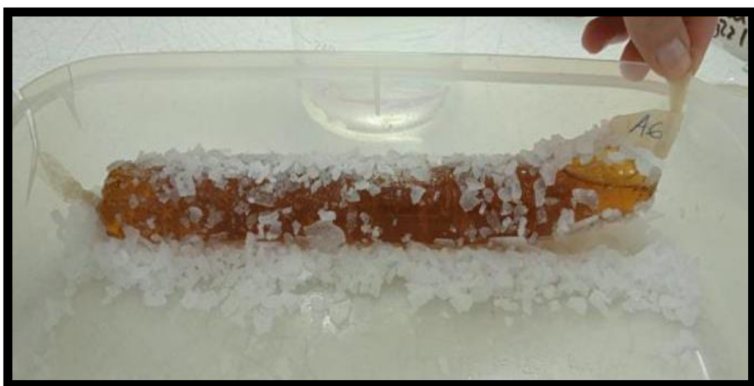


**Figura 10: Sistema para realizar el segundo y tercer filtrado**

### **Concentración del antígeno crudo**

Ya en la mesada, se cortó un trozo de membrana de diálisis de aprox. 30 cm cada 100 ml de antígeno crudo, y se hidrato según las especificaciones del fabricante.

Se anudo uno de los extremos y se volcó el antígeno crudo dentro de la membrana de diálisis hidratada con pipeta Pasteur. Luego, se anudo el otro extremo y se colocó la membrana que contiene el antígeno en un recipiente plástico con tapa. Por último, se cubrió con PEG 8000 (polietilenglicol) para que se concentre el antígeno (*ver figura 11*) y se incubó en refrigerador controlando cada una hora la exudación, hasta que el contenido de la membrana haya llegado a un volumen de aproximadamente 1/4 del volumen original (o menor). En este caso fue necesario descartar el exudado y se tuvo que agregar más PEG 8000. Se dejó incubando toda la noche en el refrigerador.



***Figura 11: Concentración del antígeno en membrana de diálisis con PEG 8000***

Al día siguiente se enjuagaron todas las paredes de la membrana con agua destilada estéril y se retiró el líquido retenido con una pipeta Pasteur estéril. Se trasvasó el contenido a una botella de vidrio de 100 ml con tapón de goma y se agregó thimerosal 1% (solución de merthiolate) como conservante a razón de 1ml (20 gotas) cada 50 ml de antígeno. Se etiquetó el recipiente y se conservó en refrigerador hasta la estandarización.

### **Estandarización del antígeno**

Se realizó la estandarización del antígeno mediante la técnica de inmunodifusión radial doble (*ver sección 3.3*), cuya estandarización conlleva las siguientes etapas:

1) **Titulación:** Se realizaron diluciones del antígeno concentrado en agua destilada, 1/2, 1/4, 1/8, más el antígeno concentrado, enfrentándolo con antiseros anti-histoplasmina producidos en el servicio. La titulación busca identidad y calidad de banda en las distintas diluciones, por ende, se seleccionó la mejor banda nítida, la cual representó la dilución de uso (DU).

2) Especificación analítica: Se probó si el Antígeno en DU y concentrado muestra reacciones cruzadas frente a antisueros de otros hongos.

3) Verificación final: Se probó si el antígeno en la dilución de uso produce bandas frente a antisuero anti-histoplasmina comercial.

### **3.2- Producción de antisuero anti-histoplasmina**

El procedimiento de inmunización y sangría se desarrolló dentro del Bioterio de Experimentación del INPB, mientras que el procesamiento de la sangre, la obtención del antisuero y su estandarización se realizó en el Servicio Antígenos y Antisueros.

#### **3.2.1- Inmunización de conejos**

El conejo es una especie animal elegida para la obtención de antisueros policlonales de alta especificidad y bajas reacciones cruzadas, donde durante el esquema de inmunización, a partir de una dosis con el antígeno, el sistema inmune del animal comenzará a desarrollar anticuerpos, a los cuales se evaluará su reactividad y su título mediante IDR. Es importante aclarar que en el caso del antígeno de *H. capsulatum*, se inoculara una única dosis de inmunogeno y si no se hallan anticuerpos se inoculara un refuerzo, pero con Adyuvante incompleto de Freund.

El procedimiento de punción cardiaca fue ejecutado por la Técnica en Bioterio del servicio de antígenos y antisueros del INPB, donde mi rol fue presenciar la práctica, asistir y colaborar con dicho procedimiento.

#### **Materiales**

- Conejos New Zealand (Son conejos sanos, libres de zoonosis y de patógenos específicos, que deben pesar entre 2,5 y 3,5 kg)
- Jeringas estériles. Aguja 25G, 21G, 16G
- Probetas de vidrio de 100 ml estériles. Tubos tipo Eppendorf
- Drogas anestésicas: Ketamina HCl (100 mg/ml)
- Cepo de inmovilización. Cepo de sangría.
- Microcentrífuga. Velocidad mínima de trabajo 7.000 rpm.

### **Procedimiento:**

- 1) En primer lugar, se preparó el inmunogeno: una emulsión de 2 ml compuesta por 1 ml exoantígeno de cultivo líquido micelial de *H. capsulatum* filtrado, concentrado con PEG y estandarizado por IDR (histoplasmina LOTE 2022/2) y 1 ml de Adyuvante completo de Freund (*ver figura 2*).
- 2) Luego se inocularon los 2 ml vía intradérmica con una aguja 25G en 10 puntos del lomo rasurado del animal, previamente desinfectada la zona con alcohol 96%.
- 3) Inmediatamente luego de la inoculación, se inyectaron vía intradérmica 0,5 ml de vacuna de Bordetella pertussis con jeringa de 1 ml y aguja 25G en el muslo del animal, para estimular el sistema inmune.
- 4) Luego de 1 mes, se realizó la primera exploratriz, en la que se extrajo 2 ml de sangre de la arteria central de la oreja del animal con aguja 21G (*ver figura 12*). Se transfirieron los 2ml a un tubo tipo Eppendorf estéril. Se procedió a centrifugar en microcentrífuga a 10.000 rpm por 10 minutos y se separó el suero del coágulo, recuperando el sobrenadante.

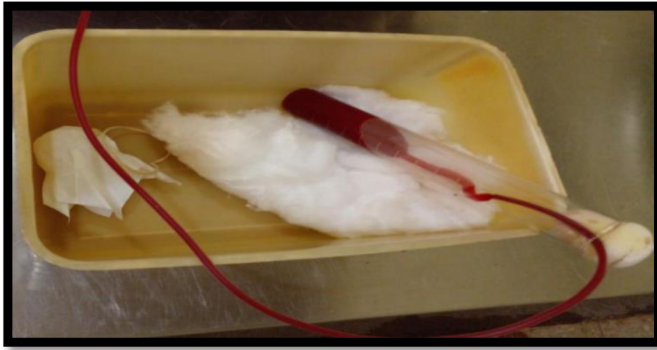


***Figura 12: Extracción de sangre de la arteria de la oreja del animal***

- 5) Se buscó la presencia de anticuerpos específicos en el suero obtenido por IDR usando histoplasmina INM. Estos fueron detectados con un título 1/2, cuyo título se consideró aceptable para proceder al sangrado a blanco del animal.

El sangrado a blanco del animal se llevó a cabo por punción cardíaca, previa anestesia con ketamina HCl 35-50 mg/kg por vía intramuscular empleando aguja 25G. El animal fue

sujetado a un cepo de sangría a través de sus extremidades. Con aguja 16G conectada a un prolongador (vía de suero) que finaliza en una probeta de 100 ml estéril con tapón de algodón y gasa, se procedió a la punción cardiaca colectando la sangre en la probeta (*ver figura 13*) hasta que la presión sanguínea decaiga.



*Figura 13: Sistema para recolectar la sangre por punción cardiaca*

Aproximadamente se obtuvo un volumen total de sangre de 80ml (la cantidad varía en cada animal).

### **3.2.2-Obtención y estandarización del antisuero**

Ya en el laboratorio, se procedió a colocar la probeta con la sangre obtenida en estufa a 37° durante 2. Luego se separó el coágulo y se recuperó el sobrenadante (suero) en un tubo de vidrio con tapa a rosca estéril de 50 ml. Se realizó el control de esterilidad del suero en el que no se observó crecimiento de ningún organismo, por lo que se continuó con el proceso. Se procedió a centrifugar el suero durante 40 minutos a 10.000 rpm en centrífuga refrigerada, se recuperó el sobrenadante y se filtró con membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  recolectando el filtrado en un frasco schott de 50ml. Aproximadamente se obtuvo 40ml de suero del conejo. Se agregó glicerina fenicada como conservante (5 gotitas) y se guardó en refrigerador hasta el momento de la estandarización.

Para la estandarización del antisuero se utilizó la técnica de IDR (*ver sección 3.3*), que al igual que para la estandarización del antígeno, se realizaron 3 etapas: titulación, en la que se prepararon diluciones 1/2 1/4 y 1/8 del antisuero más el suero sin diluir y se enfrentaron con la histoplasmina elaborada y estandarizada para determinar la DU; especificación analítica, en la que se enfrentó el antisuero elaborado con antígenos de otros hongos y del mismo

hongo; verificación final, en la que se verifico y comparo la reactividad del antisuero elaborado con sueros y antígenos comerciales del mismo hongo.

### 3.3-Inmunodifusion radial doble (IDR)

#### Materiales:

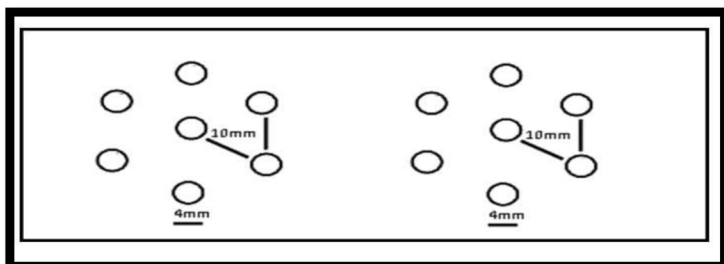
- Portaobjeto de 25 x 76 mm.
- Cortador de gel de agar de siete hoyos. Aguja para retirar los cilindros de gel
- Micropipeta p20
- Cámara húmeda. Heladera 2-8°. Estufa de 25-28°. Estufa 37-50°
- Mechero con recipiente para calentar agua (baño maría)
- Pincel plano. Recipiente plástico tipo cubeta. Papel de filtro

Para realizar la IDR, primero se prepararon todas las soluciones a utilizar, las cuales son: agarosa al 1% en agua destilada, agar fenolizado 1% pH= 6,3-6,4, solución decolorante, solución colorante de coomassie blue R-250, solución citratada, solución fisiológica (*ver anexo 2*)

#### Procedimiento:

- 1) Se colocaron los portaobjetos previamente desengrasados con alcohol-acetona en una bandeja y con un pincel se distribuyó uniformemente la agarosa aún fundida sobre la cara expuesta de los portaobjetos. Se colocó la bandeja con los vidrios a 25° protegidas del polvo y la humedad por 24 h.
- 2) Luego de 24 h, se fundió el agar fenolizado a baño maría hasta observar el agar en fase líquida, sin que llegue a ebullición, y se dejó enfriar hasta los 60°-65°.
- 3) Los portaobjetos con la pre cubierta hacia arriba se colocaron sobre una superficie plana y sobre el mismo se añadieron 3 ml de agar fenolizado fundido, para que el espesor de la capa de agar oscile entre 1,2 a 1,6 mm, ya que si el gel es demasiado delgado las líneas son tenues y confusas y si es muy grueso (2 mm o más) el número de bandas inespecíficas o dudosas aumenta porque no se puede disolver en los lavados. Se dejó solidificar por 1 h en heladera en cámara húmeda.

4) Se cortó el gel agar con la matriz de 7 pocillos y se retiraron los cilindros de gel con una aguja sin dañar las paredes (ya que si no se genera una difusión desigual y las bandas adquieren formas caprichosas y difíciles de interpretar), como puede verse en la siguiente figura:



**Figura 14: Esquema de perforación del gel agar para la IDR**

5) Se identificó la posición y la ubicación de sueros y antígenos que se van a utilizar y con micropipeta se llenaron los pocillos con 20  $\mu$ l de antisuero y/o antígeno según la IDR a realizar. (se realizaron 3 IDR para la estandarización del antígeno y 3 para la estandarización del antisuero). Es importante no sobrellenar los pocillos y revisar que no queden burbujas de aire, si las hay, deben eliminarse con un palillo de madera o tips.

6) Se colocaron las placas en cámara húmeda, sobre una superficie nivelada, en estufa entre 25 y 28° durante 72 h. Luego de transcurridas las 72h, se cubrieron las láminas de inmunodifusión con solución citratada en un recipiente plástico tipo cubeta durante 90 min para disolver bandas inespecíficas.

7) Se retiró la solución citratada y se realizaron 3 lavados de 2 h cada uno con solución fisiológica. Se retiró la solución fisiológica y se sumergieron las láminas en agua destilada durante 10 min. Se retiró el agua de la cubeta, dejando los pocillos de las láminas hidratados y se cubrió con papel de filtro “Whatman # 1” humedecido en agua destilada.

8) Se colocaron las láminas en una bandeja y se dejaron secar en estufa entre 37 y 50° durante una noche. Una vez las láminas secas, se colocaron en un recipiente con agua destilada durante 5 min para humedecer el papel de filtro y retirarlo.

9) Se añadió a las láminas la solución colorante durante 10 min. Por último, se añadió la solución decolorante hasta observar una buena visualización de las bandas (color azul).

Este procedimiento fue realizado de igual manera para cada una de las IDR que se llevaron a cabo, tanto para la estandarización del antígeno como para la estandarización del antisuero (titulación, especificación analítica, verificación final) con la diferencia que, dependiendo del objetivo de la IDR, se inoculo en diferentes posiciones de los pocillos, antígeno o antisuero.

### 3.4-Determinacion de proteínas por Lowry

#### **Materiales:**

- Reactivo de micro Lowry sigma. Patrón de albumina. Reactivo de fenol de Folin & Ciocalteu. Agua purificada
- Tubos de vidrio, gradillas, cubetas. Micropipetas
- Vortex CK-Lab. Espectrofotómetro BIO-RAD SmartSpec™ Plus

#### **Procedimiento para la curva de calibración:**

1) Se diluyo el patrón sigma de albumina, 2mg en 5ml de agua destilada, llevando a una concentración final de 0.4mg/ml. A partir de la concentración del patrón sigma, se calcularon los volúmenes (ul) que se deben medir para preparar la curva de calibración.

2) Luego se prepararon las soluciones y reactivos necesarios para realizar el ensayo, reactivo de Lowry y reactivo de Folin & Ciocalteu (*ver anexo 3*).

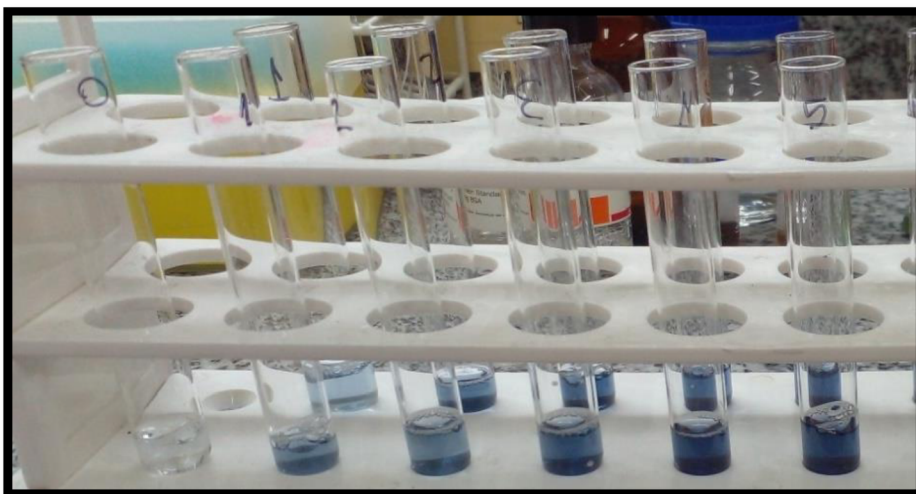
3) Para la curva de calibración se tomaron 11 tubos de vidrio y se cargaron en ellos los correspondientes volúmenes de agua y patrón de albumina para llegar a la concentración deseada como se muestra en la siguiente tabla:

TUBOS	Cc: (ug/ml)	Vol. Patrón (ul)	Vol. Agua d.(ul)	Vol. Final(ul)
0 (blanco)(x1)	0	0	500	500
1 (x2)	50	62.5	437	500
2 (x2)	100	125	375	500
3 (x2)	200	250	250	500
4 (x2)	300	375	125	500
5 (x2)	400	500	0	500

***Tabla 1: Volúmenes de patrón y agua de cada tubo para la curva de calibración.***

4) Se homogenizaron cada uno de los tubos con vortex, y se agregaron 500ul de reactivo de lowry a todos los tubos (Tubos estándar, y el blanco). Se homogenizo con vortex y se dejó reposar 20 min.

5) Con vortex y de manera rápida e inmediata, se agregó a cada tubo 250ul de reactivo de folin, y se dejó reposando para que desarrolle color durante 30 min como se muestra en la siguiente imagen:



**Figura 15:** De izquierda a derecha, se representan los tubos de menor a mayor concentración de albumina. Puede observarse el color azul característico de la reacción de folin cuando hay proteína en la muestra. También puede verse el aumento de la intensidad del color a medida que la concentración es mayor.

6) Se transfirieron las soluciones a cubetas y se midió la absorbancia de los tubos frente al blanco a una longitud de onda entre 750 nm, con espectrofotómetro BIO-RAD SmartSpec™ Plus.

### **Muestras:**

Las muestras que fueron medidas por lowry se hicieron por duplicado. Primero se midió la concentración de proteínas en una muestra con dilución (en agua purificada) 1/10 de la histoplasmina LOTE 2022/2 que fue concentrada con PEG y estandarizada por IDR, con el fin de determinar la cantidad de histoplasmina que se obtuvo del cultivo liquido de *H. capsulatum*.

Luego se procedió a medir la concentración de proteínas en una muestra de dilución 1/5 de histoplasmina, que previamente fue lavada con PBS en tubo AMICON MILLIPORE de 30kda, que se utilizó para la producción del reactivo de látex, la cual proviene de la histoplasmina concentrada con PEG y estandarizada por IDR, LOTE 2022/2.

Una vez preparadas las muestras se continuo con el procedimiento como se menciona en los puntos 4) 5) y 6). Para cada una de las muestras se construyó una curva de calibración dado que se midieron en días diferentes, siguiendo el mismo procedimiento antes mencionado.

### 3.5-Dot Blot

La técnica inmunoquímica Dot Blot, se utilizó para evaluar la reactividad del antígeno elaborado (histoplasmina LOTE 2022/2) con el antisuero producido (antisuero LOTE 2022/2) ya que solo se había probado dicha reactividad por IDR. Por ende, se procedió a evaluar el título de antisuero por dot blot, y las reacciones cruzadas con otros hongos, para poder comparar los resultados con la IDR y las aglutinaciones.

#### **Materiales:**

- Membrana de nitrocelulosa
- Placa con 8 calles
- Micropipetas p20, p200 y p1000
- Incubador con agitación orbital a 37° C (Barnstead/Lab-line Max<sup>q</sup> 4000)

Para realizar el Dot Blot se necesitaron las siguientes soluciones y reactivos: PBS (buffer fosfato salino), PBS-albumina, histoplasmina (LOTE 2022/2), anticuerpo primario (antisuero anti-histoplasmina LOTE 2022/2), anticuerpo secundario (anticuerpo anti-Ig de conejo conjugado con peroxidasa) y solución reveladora (*ver anexo 4*).

**Dot Blot 1 (titulación del antisuero):** En primer lugar, se cortaron 6 rectángulos de papel de nitrocelulosa cuyo tamaño se buscó para que entre dentro de las calles de la placa. Luego se colocaron cada uno en una calle de la placa y se sembraron, con micropipeta p20, 2 µl de histoplasmina LOTE2022/2 de concentración 2.34 mg/ml medida por Lowry. Se dejó secar por 20 min y se agregó a cada calle 1ml de PBS-albumina para bloquear durante 1 hora a 37° 60 rpm en estufa con agitador orbital. Transcurrida la hora, se procedió a lavar con PBS con intervalos de 5 minutos por 3 veces. agitador. Se prepararon diluciones seriadas 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640 del antisuero anti-histoplasmina LOTE2022/2 en PBS-albumina y se añadieron en orden en las calles de la placa que contienen la membrana con el antígeno. Se dejó incubar 1 hora a 37° 60 rpm y luego se lavó 3 veces con PBS. Se agregó a cada calle 1 ml de anticuerpo conjugado con peroxidasa diluido 1/2000 en PBS-albumina y se dejó

incubar 1 hora a 37° 60rpm. Por último, se lavó con PBS de igual manera que los pasos anteriores y se añadió a cada calle 1 ml de solución reveladora. Se dejó desarrollar la reacción por 30 min y se cortó con agua destilada.

**Dot Blot 2 (evaluación de reacciones cruzadas):** Se cortaron 6 tiras de membrana de nitrocelulosa de aprox. 10 cm de largo (para que cubra el largo de la placa), con un lápiz se dividió cada tira en 6 partes equivalentes y se colocó cada tira en una calle diferente de la placa (calle 1 a la 6). Se sembraron en el centro de cada parte de la tira 2 µl de antígeno homólogo y heterólogos uno debajo del otro en el siguiente orden: Primero, histoplasmina LOTE 2022/22 de concentración 2.34 mg/ml, segundo antígeno de *Coccidioides Posadasii*, tercero antígeno de *Paracoccidioides sp*, cuarto antígeno de *Aspergillus Fumigatus*, quinto antígeno de *Aspergillus Niger* y sexto antígeno de *Aspergillus Flavus* (se eligieron estos antígenos ya que son morfológicamente y clínicamente similares a *H. capsulatum* por lo que teóricamente podrían dar reacciones cruzadas). Luego de sembrar los antígenos se dejó secar y se bloqueó con PBS-albumina durante 1 h a 37° y 60 rpm en agitador orbital. Se lavó con PBS 3 veces. Para la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron diluciones 1/20 en PBS-albumina de los distintos antisueros y se colocaron 1ml en cada calle en el siguiente orden: en la calle 1, antisuero de *H. capsulatum* LOTE 2022/2, en la calle 2, antisuero de *Coccidioides Posadasii*, en la calle 3, antisuero de *Paracoccidioides sp*, en la calle 4, antisuero de *Aspergillus Fumigatus*, en la calle 5, antisuero de *Aspergillus Niger* y en la calle 6, antisuero de *Aspergillus Flavus*. Se dejó incubar con cada antisuero 1 hora a 37° a 60rpm en agitador orbital. Se lavó 3 veces con PBS y se añadió 1ml de anticuerpo conjugado con peroxidasa diluido 1/2000 en cada calle. Se incubó 1 hora a 37° y 60rpm. Por último, se lavó con PBS de igual manera que los pasos anteriores y se añadió a cada calle 1 ml de solución reveladora. Se dejó desarrollar la reacción por 30 min y se cortó con agua destilada.

### **3.6- Caracterización de la histoplasmina**

Para la caracterización de la histoplasmina y para evaluar la reactividad de las distintas proteínas que la componen, con el antisuero homólogo, se utilizaron las técnicas de SDS-page y Western blot.

### 3.6.1-SDS-page

#### **Materiales:**

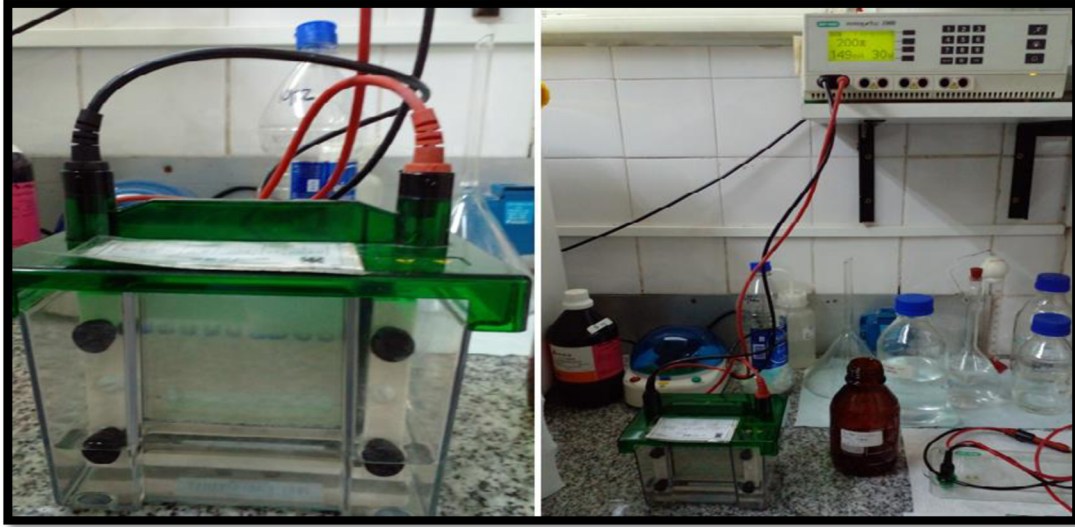
- CUBA DE ELECTROFORESIS Biorad Mini Protean II
- Fuente de poder BIO-RAD PowerPac 1000.
- Buffer muestra para SDS-page. Buffer de corrida para SDS-page (*ver anexo 7*)
- Micropipeta p20. Tips punta fina para sembrar geles

Se prepararon 2 geles en simultaneo, uno para ser teñido y otro para transferirlo a una membrana de nitrocelulosa para realizar el western blot. Para realizar la corrida electroforética de la histoplasmina por SDS-page, primero se prepararon los geles de separación y los geles de apilamiento (stacking). Los geles se prepararon con una concentración de acrilamida de 7.5% para el gel separador y 4% para el gel apilador (*ver anexo 5*). Se colocaron las preparaciones entre 2 vidrios, siguiendo las instrucciones de manejo de CUBA DE ELECTROFORESIS Biorad Mini Protean II, y se dejaron gelificar durante 40min.

**Muestras para el gel a teñir (GEL 1):** Se prepararon 2 muestras, y se sembraron por duplicado cada una. Se utilizó histoplasmina LOTE 2022/2 (concentración=2.34mg/ml), y se sembraron 20  $\mu$ l con  $\beta$ -mercaptoetanol y 20  $\mu$ l sin  $\beta$ -mercaptoetanol (5  $\mu$ l de buffer muestra con o sin  $\beta$ -mercaptoetanol y 15  $\mu$ l de histoplasmina).

**Muestras para el gel destinado al Western Blot (GEL 2):** Se preparó 1 muestra, y se sembró por triplicado. Esta muestra se preparó con histoplasmina LOTE 2022/2 (concentración=2.34mg/ml) sin  $\beta$ -mercaptoetanol (2.5  $\mu$ l de buffer muestra sin  $\beta$ -mercaptoetanol y 7.5  $\mu$ l de histoplasmina). Se sembraron 10ul en cada calle del gel.

Para la siembra de las muestras, se utilizaron tips con punta fina para SDS-page y micropipeta p20. A su vez se sembraron 10  $\mu$ l de patrón de peso molecular (PM) “Blue Plus® IV Protein Marker, 10-150 kDa, Trans, China” para el gel 1 y 5  $\mu$ l para el gel 2. Las calles de los extremos se dejaron vacías y el PM se sembró en las calles del medio. Una vez realizada la siembra de las muestras, se procedió a realizar la corrida electroforética, en buffer de corrida, con ajuste de voltaje constante a 200 voltios (*ver figura 16*) hasta ver el frente de corrida en la parte inferior del gel (aprox.45 min).



*Figura 16: Cuba de electroforesis Biorad Mini Protean II conectada a la fuente de poder BIO-RAD PowerPac 1000 para realizar la corrida electroforética.*

Una vez realizada la corrida electroforética, se procedió a sacar los geles de la cuba, y como había mencionado anteriormente se destinó el gel 1 para ser teñido con Coomassie Blue Coloidal y el gel 2 para el Western Blot.

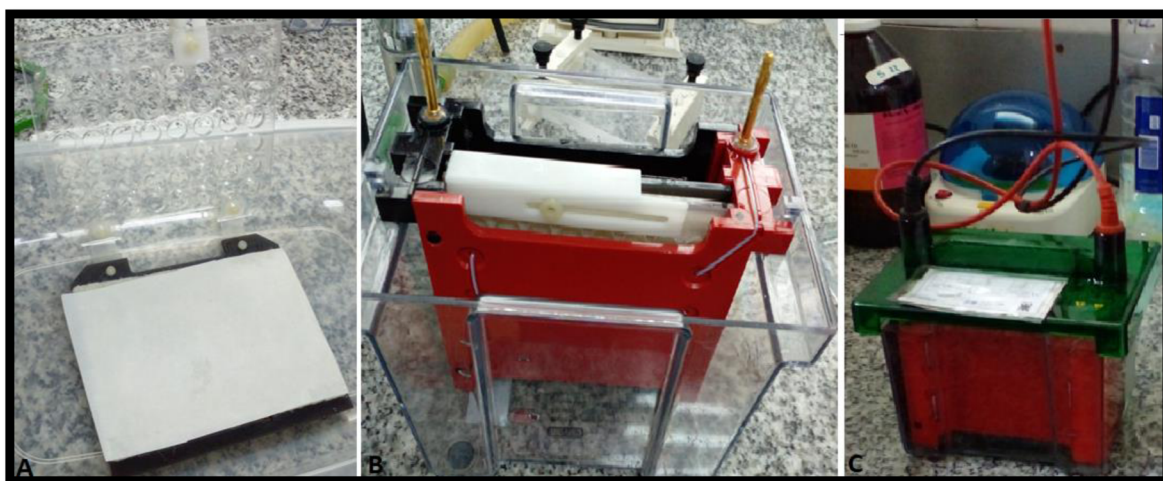
**Tinción con Coomassie Blue Coloidal:** Se prepararon las soluciones de fijación y de tinción (*ver anexo 6*). Luego se colocó el gel 1 en un recipiente adecuado para realizar la tinción, y se agregó la solución fijadora 1, se la dejó actuando overnight. Al día siguiente se lavó 3 veces durante 30 min cada vez, con agua destilada, se agregó 25 ml (cantidad suficiente para que cubra el gel) de la solución de tinción y se dejó en agitación durante 1 hora. Sin lavar, se agregó, 375  $\mu$ l de solución de azul de tinción Coomasie G250 2% p/v. Se dejó en agitación por 1 día, cuyo recipiente se dejó cerrado para evitar la evaporación y la contaminación. Por último, se lavó el gel en agua destilada.

### 3.6.2-Western Blot

#### **Materiales:**

- Mini TransBlot System (Bio-Rad)
- Membrana de nitrocelulosa
- Papeles de filtro

Luego de haber realizado la corrida electroforética del gel 2, se procedió a transferir el mismo a una membrana de nitrocelulosa, mediante una electrotransferencia de las bandas proteicas del gel de poliacrilamida, utilizando el equipo Mini TransBlot System (Bio-Rad), donde primero se remojo el gel con 2 papeles de filtro y con 2 esponjas en el buffer de transferencia frio. Se armó el “sándwich” de: esponja- papel- membrana- gel- papel- esponja, y se puso en el medio del recipiente que provee el equipo. Este se colocó dentro de la cuba del Mini TransBlot System y se añadió el buffer de transferencia frio. Se dejó correr la corriente a 100V durante 1 hora (*ver figura 17*).



**Figura 17:** Recipiente para colocar el gel (A). Equipo Mini TransBlot System (Bio-Rad) (B, C)

Una vez realizada la electrotransferencia, se desarmo el “sándwich” y se remojo la membrana en Rojo Ponceu, que tiñe reversiblemente las proteínas, para chequear la transferencia. Luego, se lavó la membrana con agua destilada para quitar el colorante y se la coloco en una placa. Se bloqueó con PBS-albumina 1 h a 37° a 60rpm en agitador orbital. Se lavó 6 veces con PBS y se incubo con el anticuerpo primario (dilución 1/50 del antisero anti-histoplasmina LOTE 2022/2 en PBS-albumina) por 1 h a 37°. Se lavó 6 veces con PBS y se incubo con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-Ig de conejo conjugado con peroxidasa diluido 1/2000 en PBS-albumina) por 1 h a 37°. Por último, se lavó con PBS y se agregó la solución de revelado de cloronaftol con agua oxigenada. Se dejó desarrollar la reacción de color por 30 min y se cortó con agua destilada.

## 3.7-Desarrollo del reactivo de látex

### 3.7.1-Sensibilización de las partículas de látex

Para producir el reactivo se procedió a la sensibilización de las partículas de látex con la histoplasmina, por adsorción pasiva, donde primero fueron claves los siguientes procedimientos:

1) La histoplasmina LOTE 2022/2 elaborada se colocó en un tubo de ultra centrifugado AMICON MILLIPORE de 30kda junto a PBS y se centrifugó a 3000 rpm durante 45 min. Este procedimiento se realizó 2 veces, con el fin de purificar las proteínas mayores a 30 kda y filtrar proteínas menores a 30kda y el medio de cultivo que contiene asparagina.

2) Se midió la concentración de proteínas de la histoplasmina obtenida en el punto anterior por el método de Lowry. Este paso es muy importante porque es necesario saber la concentración de proteínas que se van a pegar al látex.

3) Se realizó un SDS-page en un gel de acrilamida al 7.5% para el gel de separación y 4% para el gel de apilamiento, sembrando: 20  $\mu$ l (15  $\mu$ l de histoplasmina con 5  $\mu$ l del buffer muestra), con el fin de constatar que en la histoplasmina lavada no se hayan perdido las proteínas de mayor peso molecular. El procedimiento del SDS-PAGE y la tinción de Coomassie Blue Coloidal se realizó como se explicó anteriormente (*ver sección 3.6.1 pág.*)

Una vez realizados estos pasos preliminares, se procedió a preparar 2 buffers, uno con pH 8 y otro con pH 4.8, que son los que van a determinar la condición óptima de adsorción pasiva de la histoplasmina a las partículas de látex de 0.8  $\mu$ m:

1) Buffer Glicina, NaCl, pH 8: Primero se pesaron en un vaso precitado 7.51g de glicina, 0.88g de NaCl, 1g de Azida Sodica y se disolvieron con agua purificada, cantidad suficiente para llegar a 1000ml. Luego se midió el pH y se agregó NaOH 1N (hidróxido de sodio) hasta llegar a pH 8.

2) Buffer Acetato, NaCl 0.15M, pH 4.8: Primero se pesaron 246mg de Acetato de Sodio y 88mg de NaCl 0.15M, luego se añadió 40ml de Ácido Acético 1N y se llevó a 100ml con agua purificada. Se ajustó el pH con acético 1N hasta llegar al pH deseado, 4.8.

Se probaron 3 concentraciones de histoplasmina, 0.05; 0.02; 0.01 mg de histoplasmina/mg de látex. La reacción de adsorción se realizó con una concentración final de partículas de látex (diámetro 0.8  $\mu\text{m}$ ) de 5 mg/ml y teniendo en cuenta la concentración de histoplasmina obtenida (0.53mg/ml) se realizaron los cálculos pertinentes (regla de 3 simples) para la preparación de 1 ml de reactivo de látex para cada condición (*tabla 2*):

	Buffer glicina/Na Cl			Buffer acetato/Na Cl			
	latex1	latex2	latex3	latex4	latex5	latex6	
<b>Valor J</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	mg/ mg
Cantidad de histoplasmina	0,25	0,1	0,05	0,25	0,1	0,05	mg
Cantidad de Latex	5	5	5	5	5	5	mg
Vol. de histoplasmina	470	190	95	470	190	95	$\mu\text{l}$
Vol. Latex (10%)	50	50	50	50	50	50	$\mu\text{l}$
Vol. buffer	480	760	855	480	760	855	$\mu\text{l}$
Vol. final (ml)	1	1	1	1	1	1	ml

**Tabla 2: Composición de cada reactivo de látex (Valor J: mg de antígeno/mg de látex)**

Una vez que se determinaron las cantidades y volúmenes de histoplasmina, buffer y látex, se procedió a preparar los reactivos. Para ello, se tomaron 6 eppendorf, 3 para el buffer glicina (1, 2, 3) y 3 para el buffer acetato (4, 5, 6) y se agregaron los volúmenes de histoplasmina y de buffer correspondientes (*ver tabla 2*), se homogenizo e inmediatamente con vortex, se agregaron los 50  $\mu\text{l}$  de látex. Se colocaron a 37° con agitación durante 2 horas, invirtiendo cada eppendorf cada 30 minutos para evitar que sedimente el látex. Transcurridas las 2 horas se guardaron a 4° durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron a 12000 rpm durante 1 hora. Luego, se retiró el sobrenadante, y nos quedamos con el sedimento, en donde están las partículas de látex. Se agregaron a los eppendorf 1, 2 y 3, 1000  $\mu\text{l}$  de buffer glicina-albumina (980  $\mu\text{l}$  de buffer glicina + 20  $\mu\text{l}$  de albumina 100mg/ml), y a los eppendorf 4, 5 y 6 se les agregó 1000  $\mu\text{l}$  de buffer acetato-albumina (980  $\mu\text{l}$  de buffer acetato + 20  $\mu\text{l}$  de albumina 100mg/ml), con el fin de bloquear los sitios que quedaron libres en las partículas de látex. Por último, se guardaron los reactivos en heladera a 4° durante una noche y hasta su uso.

### 3.7.2-Ensayos de aglutinación

Ya listos los 6 reactivos de látex, se continuo a realizar los primeros ensayos de aglutinación con el antisuero anti-histoplasmina LOTE 2022/2 que elaboramos, para poner a prueba dicho reactivo. En base a estos ensayos, se eligió la condición de pH y concentración a utilizar, y a partir de esto se realizaron los ensayos de titulación y evaluación de reacciones cruzadas.

#### **Materiales:**

- Láminas de fondo oscuro.
- Micropipeta p100
- Palillos o puntas de tips para homogenizar
- Agitador orbital, rango de trabajo: 100 rpm

#### **Procedimiento general de la reacción de aglutinación:**

En cada cuadrado de la lámina de fondo oscuro, con micropipeta, se colocaron 25 µl de antisuero (muestra) y 25 µl de reactivo de látex, y usando palillos o puntas de tips se homogenizo. Se colocó la lámina dentro de un agitador orbital a 100 rpm y se dejó durante 5 min, o hasta ver aglutinación (máximo 15 min). También se pueden hacer los movimientos rotativos de manera manual.

## **4-RESULTADOS Y DISCUSION**

### **4.1-Produccion de histoplasmina**

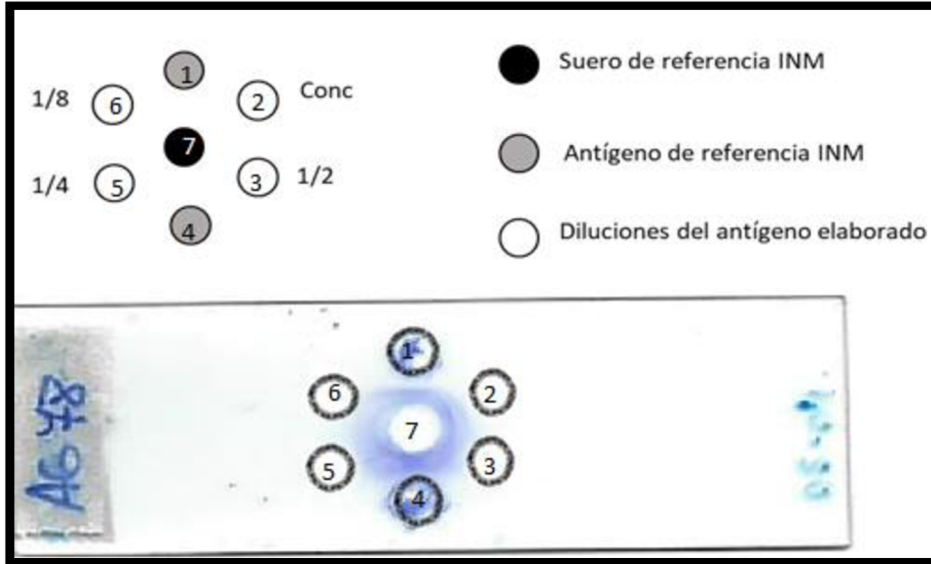
Luego de todos los procedimientos que se llevaron a cabo para la producción de histoplasmina y de su estandarización, se obtuvieron aprox. 60ml de sobrenadante de cultivo liquido proveniente de la cepa antigénica “Dmic206238”, los cuales se distribuyeron equitativamente en tubos falcón indicando nombre del antígeno y número de lote (*ver figura 18*). En todo el trabajo se utilizó siempre el mismo lote de histoplasmina, tanto como para la producción del látex como para las demás técnicas empleadas.



*Figura 18: Antígeno de Histoplasma capsulatum, Histoplasmina, LOTE 2022/2*

#### **4.1.1- Estandarización de histoplasmina por IDR**

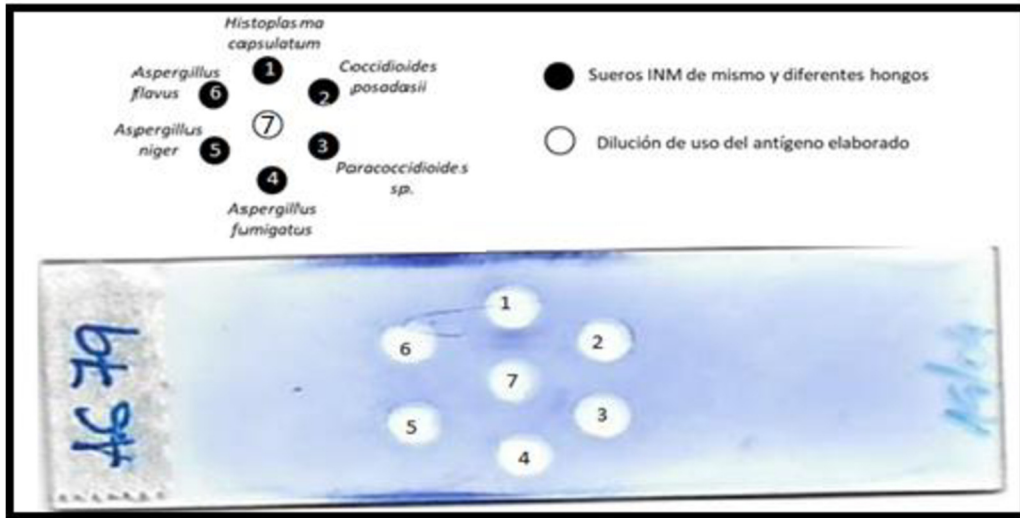
**Titulación:** Se sembraron 20  $\mu$ l de antisuero y/o antígeno en cada uno de los pocillos como se indica en la parte superior de la figura y luego de realizarse la IDR se obtuvieron los siguientes resultados, como se muestran en la parte inferior de la figura:



*Figura 19: En la parte superior se muestra un esquema de lo que se sembró en cada pocillo. En la parte inferior se muestra el vidrio de IDR obtenido para la titulación del antígeno. (INM: antisuero/antígeno elaborado por el servicio de Micología en partidas previas)*

Se puede observar que los antígenos de referencia INM al difundir en el gel agar junto con el antisuero de referencia INM producen una banda azul intensa que representa la unión antígeno-anticuerpo. Para el antígeno (histoplasmina) concentrado también se observa una banda bien marcada y para la dilución 1/2 se puede ver una banda más tenue pero que se puede identificar bien (por cuestiones de calidad de la imagen quizás no se pueden apreciar bien las bandas, pero con la observación real del vidrio se pueden apreciar mejor). Para la dilución 1/4 y 1/8 no se observan bandas azules intensas, por lo que, en base a estos resultados obtenidos, la DU (dilución de uso) determinada hasta donde se observan bandas azules definidas es la dilución 1/2.

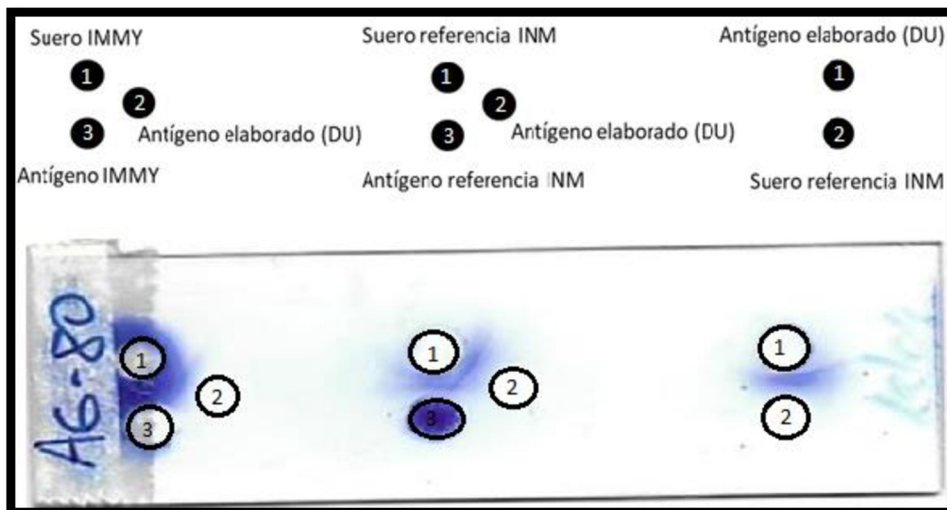
**Especificación analítica:** Para evaluar si el antígeno que elaboramos tiene reactividad cruzada con antisueros de otros hongos se procedió a sembrar 20 µl en cada pocillo como se muestra en la parte superior de la figura, y luego de realizar la IDR se obtuvieron los siguientes resultados, como se muestra en la parte inferior de la figura:



**Figura 20:** En la parte superior se muestra un esquema de lo que se sembró en cada pocillo. En la parte inferior se muestra el vidrio de IDR obtenido para evaluar la especificidad analítica.

Se puede observar en la figura una banda azul entre el antígeno elaborado en la DU y el antisuero homólogo, es decir el antisuero anti-histoplasmina, lo que justifica la unión antígeno-anticuerpo y su reactividad al difundir en el agar. En el caso de los antisueros heterólogos (*Coccidioides Posadassi*, *Paracoccidioides sp.*, *Aspergillus Fumigatus*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Flavus*) al difundir en el agar junto al antígeno, no se observan bandas azules, por lo que con la técnica de IDR no se observan cruzadas.

**Verificación final:** Se sembró 20  $\mu$ l en cada pocillo, como se muestra en la parte superior de la figura, cuyos resultados de la IDR se muestran en la parte inferior de la figura:



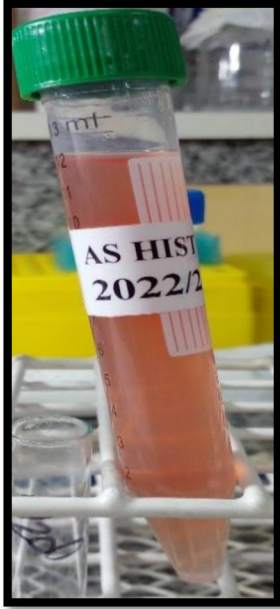
**Figura 21: En la parte superior se muestra un esquema de lo que se sembró en cada pocillo. En la parte inferior se muestra el vidrio de IDR obtenido para la verificación final. (IMMY: antisuero/antígeno comercial)**

En la parte inferior de la figura, a la izquierda, se puede observar que tanto el antígeno IMMY como el antígeno elaborado en la DU, producen banda azul al difundir en el agar junto al antisuero IMMY, lo que verifica que el antisuero comercial IMMY reacciona con el antígeno de *H. capsulatum* elaborado. En el centro de la imagen se puede ver que el antígeno elaborado en la DU y el antígeno INM al difundir en el agar junto con el antisuero INM producen la banda color azul, que nos indica que hay unión antígeno-anticuerpos entre ambos, lo que verifica la reactividad de los mismos. Y, por último, a la derecha de la imagen, se observa una intensa banda azul entre el antígeno elaborado en la DU y el antisuero de referencia INM, probando una vez más, la reactividad de ambos al difundir en el agar. Por lo que la verificación final del lote 2022/2 de histoplasmina fue aprobada.

La estandarización de la histoplasmina elaborada, se realizó por IDR porque es la técnica inmunoquímica utilizada actualmente en la detección de anticuerpos de *H. capsulatum* y porque el servicio de micología del INEI, provee a los hospitales de la red los antisueros y la histoplasmina para realizar la IDR.

#### **4.2-Producción de antisuero anti-histoplasmina**

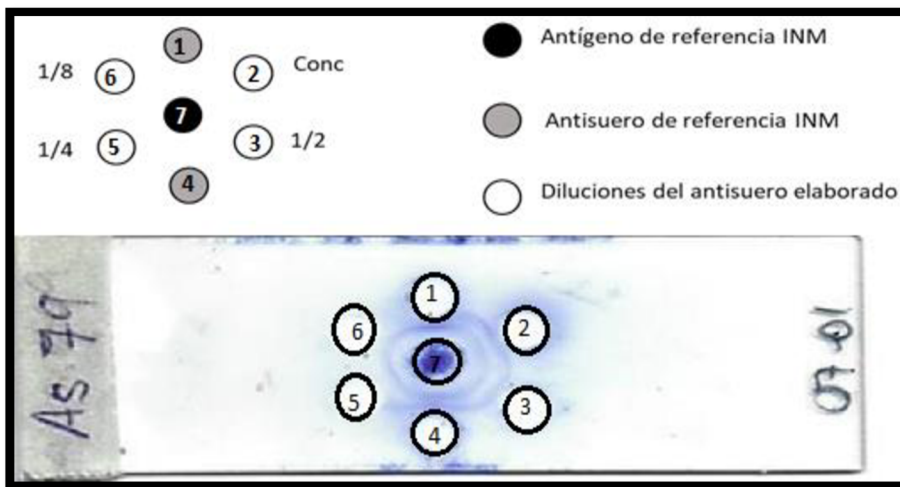
Luego de realizar todo el proceso de obtención de antisuero y de realizar su estandarización, se distribuyeron equitativamente los 40 ml obtenidos de antisuero en tubos falcón. Se rotularon con el nombre del antisuero (As: antisuero de histoplasma) y número de lote (LOTE 2022/2) como se puede ver en la siguiente figura. Es importante mencionar que se usó siempre el antisuero LOTE 2022/2 que fue elaborado, para cada una de las técnicas realizadas, incluyendo la aglutinación.



**Figura 22:** Antisuero anti-histoplasmina, LOTE 2022/2, obtenido a partir de inmunización de conejo

#### 4.2.1-Estandarización del antisuero anti-histoplasmina

**Titulación:** Se sembraron 20 µl de antisuero elaborado y antígeno en cada pocillo siguiendo el esquema de la siguiente figura:

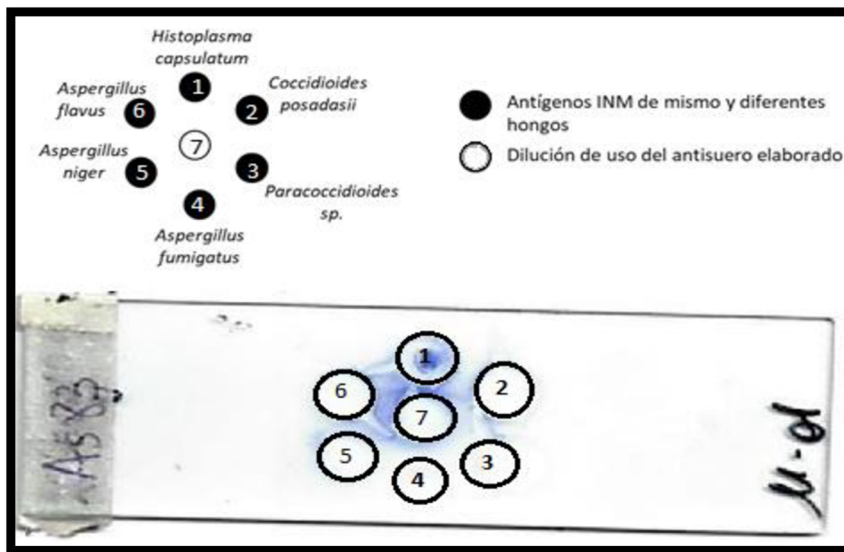


**Figura 23:** En la parte superior se muestra un esquema de lo que se sembró en cada pocillo. En la parte inferior se muestra el vidrio de IDR obtenido para la titulación del antisuero.

En la figura se puede observar que al difundir el antígeno de referencia INM junto a los antisueros de referencia INM se observan 2 bandas azules, teóricamente denominadas H y M que son características de la IDR, ya que por esta técnica se evidencian los anticuerpos anti-

H y anti-M. En el antisuero elaborado sin diluir también se observa la doble banda al igual que en el antisuero elaborado con dilución 1/2. Con respecto a las diluciones del antisuero 1/4 y 1/8 se puede ver una única banda más tenue, por lo que según la intensidad de las bandas y que se deben observar 2 bandas se puede decir que la DU para este antisuero elaborado es 1/2. Además, se pudo comprobar la reactividad del antisuero elaborado con la histoplasmina al observarse cada banda, que indican la unión del antígeno con el anticuerpo presente en el suero.

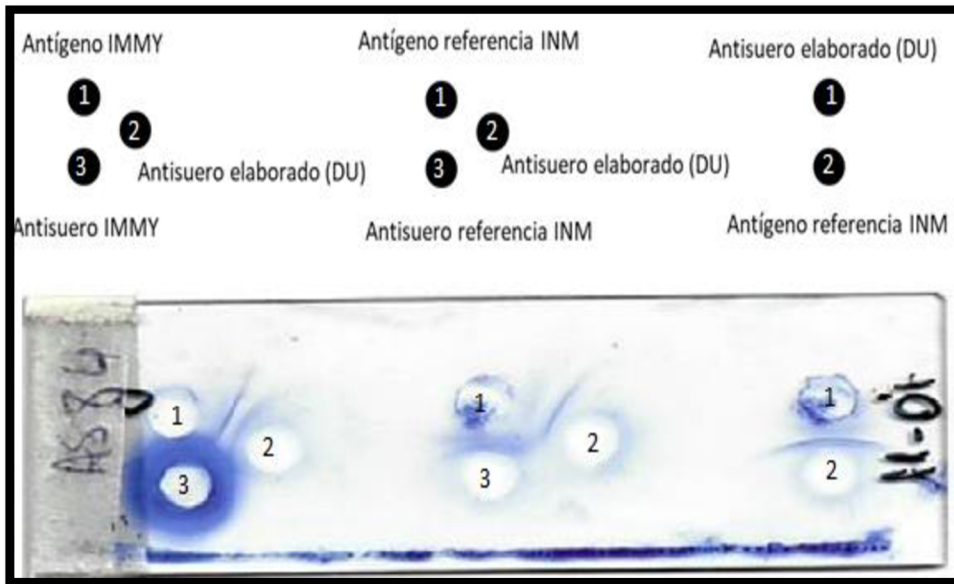
**Especificación analítica:** Para evaluar la reactividad del antisuero contra antígenos de otros hongos se sembraron en los pocillos de IDR 20 µl de antígeno y/o antisuero según el esquema que se muestra en la figura:



**Figura 24:** En la parte superior se muestra un esquema de lo que se sembró en cada pocillo. En la parte inferior se muestra el vidrio de IDR obtenido para evaluar la especificidad analítica del antisuero.

En la figura se puede ver que existe una banda notoria entre el antisuero elaborado en su DU y el antígeno de histoplasma INM lo que una vez más comprueba la reactividad de ambos, por lo contrario, al difundir en el agar los antígenos heterologos junto al antisuero producido no se observan bandas notorias por lo que por IDR se descarta las reacciones cruzadas con antígenos de *Coccidioides posadasii*, *Paracoccidioides sp*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*. Más adelante se evaluarán estas reacciones cruzadas por Dot Blot y también por aglutinación con el reactivo de látex.

**Verificación final:** Utilizando antisueros de referencia (INM) y comerciales (IMMY) se sembraron en cada pocillo 20 µl junto al antisuero elaborado en su DU:



*Figura 25: En la parte superior se muestra un esquema de lo que se sembró en cada pocillo. En la parte inferior se muestra el vidrio de IDR obtenido para la verificación final del antisuero.*

En la parte inferior de la figura, a la izquierda se puede observar que, al difundir en el agar el antisuero elaborado y el antisuero IMMY junto al antígeno IMMY, se ven las bandas color azul que demuestran la reactividad entre el antígeno y el antisuero. En el medio de la figura se puede observar bandas más tenues cuando se enfrenta el antisuero elaborado con el antígeno de referencia INM y una banda más fuerte entre el antígeno INM y el antisuero INM. A la derecha, se puede ver una banda bien marcada cuando difunde en el agar el antisuero elaborado con el antígeno de referencia INM. Estos resultados obtenidos hacen que la verificación final sea aprobada.

Es importante aclarar que las imágenes ilustradas con los resultados de los vidrios de IDR, fueron escaneadas en fondo blanco para que se puedan apreciar mejor los resultados, pero de igual manera con la observación real en vivo de los vidrios se pueden ver mejor las bandas. También es importante mencionar que la observación de las bandas en los vidrios de IDR se realizó con personal con experiencia en la técnica de IDR (Departamento de Micología-INEI), para poder concluir en un resultado final como los mencionados anteriormente, ya que algunas bandas no se veían tan bien.

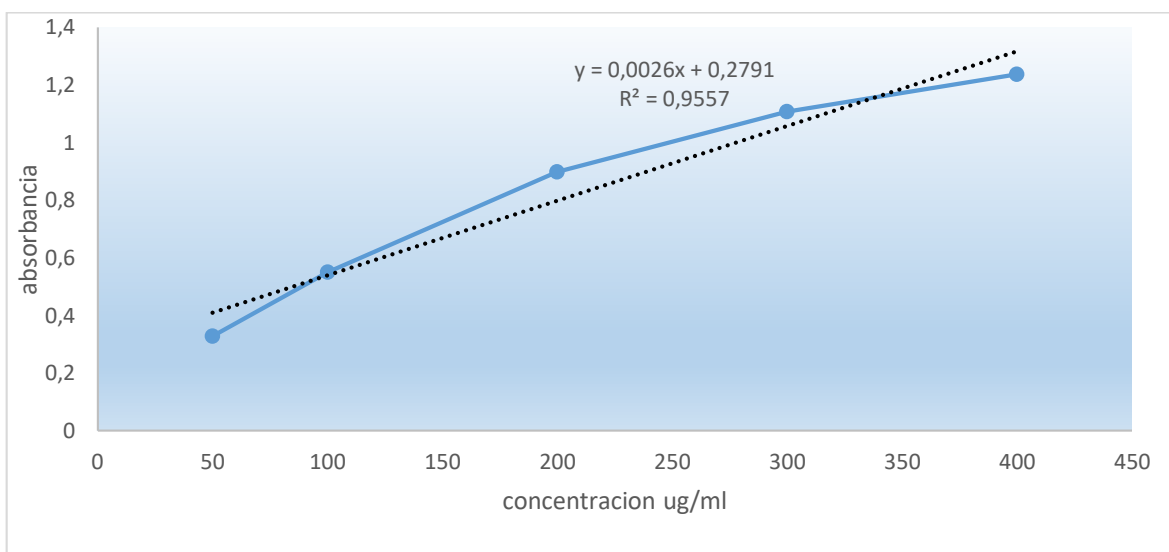
### 4.3-Determinación de proteínas por Lowry

1) Los resultados de absorbancias medidas, para la primera curva de calibración realizada, fueron los siguientes:

	Concentracion ( $\mu\text{g/ml}$ )	absorbancia promedio	absorbancia 1	absorbancia 2
Tubo 1	50	0,328	0,341	0,315
Tubo 2	100	0,549	0,564	0,534
Tubo 3	200	0,898	0,900	0,896
Tubo 4	300	1,106	1,050	1,168
Tubo 5	400	1,236	1,225	1,247

**Tabla 3: Valores de absorbancia medidas de cada uno de los tubos (por duplicado)**

Con estos valores de absorbancia y sabiendo la concentración de cada tubo, se construyó, en Excel, la curva de calibración, se trazó la recta y se calculó la ecuación como se puede ver en el siguiente gráfico:



**Grafico 1: Curva de calibración construida con los valores de absorbancia promedio y concentración que se describen en la tabla anterior**

Con esta curva de calibración se calculó la concentración de proteínas de la muestra 1/10 (histoplasmina concentrada con PEG y estandarizada por IDR). Esta muestra arrojó en el espectrofotómetro los siguientes valores de absorbancia y de concentraciones:

Parámetro	Muestra 1/10
Absorbancia 1	0.837
Absorbancia 2	0.940
Absorbancia promedio	0.888
Concentración arrojada por el espectrofotómetro ( $\mu\text{g/ml}$ )	233.91
Concentración calculada con la ecuación de la recta usando la absorbancia promedio ( $y=0.0026x+0.2791$ ) ( $\mu\text{g/ml}$ )	234.19
Concentración de la muestra (se multiplico por el factor de dilución 10 y se pasó a $\text{mg/ml}$ )	2.34

**Tabla 4: Valores de absorbancias, concentraciones medidas y calculadas de la muestra 1/10**

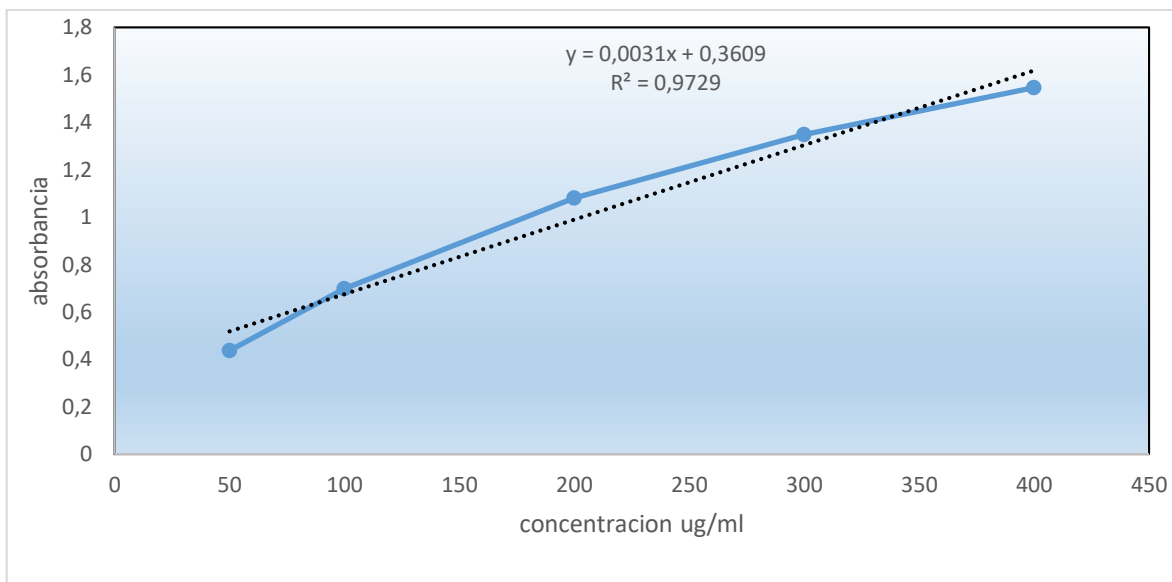
Todos los resultados demuestran que la histoplasmina elaborada para este trabajo, la cual está concentrada con PEG 800 y estandarizada por IDR, tiene una concentración de proteínas de 2.34 $\text{mg/ml}$  por el método de Lowry.

2) Los resultados de absorbancias medidas, para la segunda curva de calibración realizada, fueron los siguientes:

	Concentracion ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancia promedio	Absorbancia 1	Absorbancia 2
Tubo 1	50	0,435	0,459	0,412
Tubo 2	100	0,697	0,747	0,647
Tubo 3	200	1,079	1,091	1,068
Tubo 4	300	1,347	1,343	1,351
Tubo 5	400	1,545	1,517	1,574

**Tabla 5: Valores de absorbancia medidas de cada uno de los tubos (por duplicado)**

Con estos valores de absorbancia y sabiendo la concentración de cada tubo, se construyó en excel la curva de calibración, se trazó la recta y se calculó la ecuación como se puede ver en el siguiente gráfico:



**Gráfico 2:** Curva de calibración construida con los valores de absorbancia promedio y concentración que se describen en la tabla anterior

Con esta curva de calibración se calculó la concentración de proteínas de la muestra 1/5 (histoplasmina lavada con PBS en tubo AMICON MILLIPORE de 30kda). Esta muestra arrojó en el espectrofotómetro los siguientes valores de absorbancia y de concentración:

Parámetro	Muestra 1/5
Absorbancia 1	0.682
Absorbancia 2	0.694
Absorbancia promedio	0.688
Concentración arrojada por el espectrofotómetro (µg/ml)	115.01
Concentración calculada con la ecuación de la recta usando la absorbancia promedio ( $y=0.0031x+0.3609$ ) (µg/ml)	105.51
Concentración de la muestra (se multiplico por el factor de dilución 5 y se pasó a mg/ml)	0.53

**Tabla 6:** Valores de absorbancias, concentraciones medidas y calculadas de la muestra 1/5

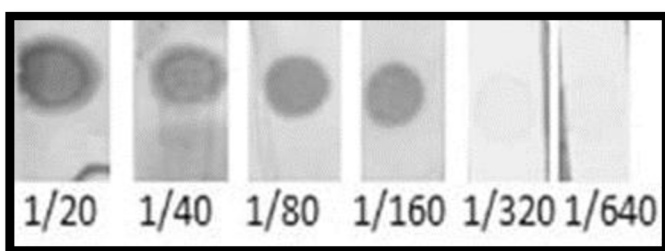
Todos los resultados indican que la histoplasmina lavada con PBS en tubo AMICON MILLIPORE de 30kda tiene una concentración de proteínas de 0.53 mg/ml por el método de Lowry. Este dato es de suma importancia para la producción del látex, ya que con esta concentración se realizaron los cálculos pertinentes para la sensibilización del látex.

La diferencia entre ambas concentraciones de las muestras medidas (2.34 mg/ml y 0.53 mg/ml), se basa en que al ultrafiltrar la histoplasmina con PBS en tubo AMICON MILLIPORE de 30 kda, se pierden todas las proteínas que tienen un peso molecular de 30 kda o menor, eliminando también el resto de medio de cultivo que contiene asparagina, que si bien este procedimiento de ultrafiltrado contribuiría a concentrar las proteína mayores a 30 kda, se puede observar con los resultados obtenidos que la concentración es 4 veces menor que la concentración de histoplasmina sin ultrafiltrar, porque en la muestra original hay asparagina que es detectada por el método y otras proteínas pequeñas, que pueden interferir en el pegado a las partículas.

En cuanto a las 2 curvas de calibración construidas, se puede observar que ambas arrojan absorbancias no muy diferentes. La ecuación de recta no difiere en gran medida y la forma de la curva es bastante similar. Las pequeñas diferencias de valores pueden deberse a que como fueron preparadas en días y situaciones diferentes, los volúmenes medidos de patrón y agua pueden variar, como así también el tiempo que se dejó reposar, entre otras causas.

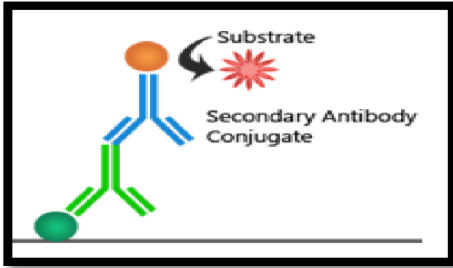
#### 4.4-Dot Blot

**Titulación del antisuero LOTE2022/2:** Luego de haber añadido la solución reveladora y de haber lavado con agua se observaron los siguientes resultados:



*Figura 26: Resultados del dot blot para la titulación del antisuero LOTE 2022/2.*

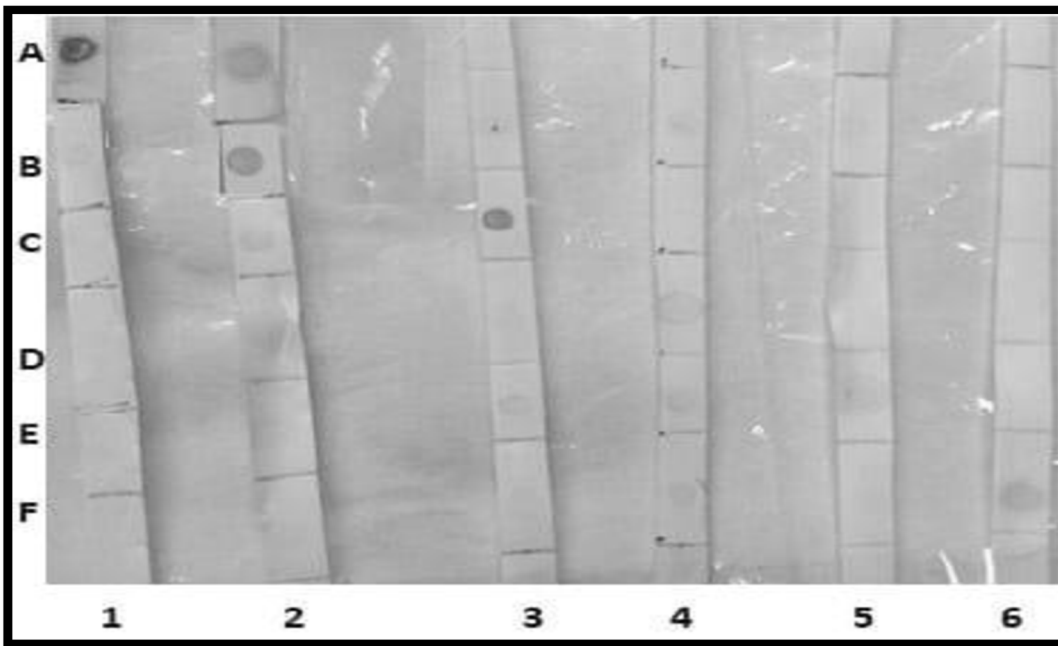
En la imagen se puede observar que en cada dilución del antisuero se ven estos “puntos” coloreados que evidencian la reacción entre la histoplasmina y el anticuerpo de conejo (anticuerpo primario). El anticuerpo primario une al anticuerpo anti conejo (secundario) que tiene conjugada la enzima peroxidasa que genera un precipitado de color oscuro cuando añadimos la solución reveladora, (ver figura 27).



**Figura 27:** Esquema de cómo se produce la reacción de color en el dot blot. (<https://www.abynetek.com/caracteristicas-buscar-kit-elisa>)

Por ende, estos resultados demuestran una vez más la reactividad entre la histoplasmina sembrada directo en la membrana de nitrocelulosa y los anticuerpos presentes en el antisuero de conejo producido. En cuanto a las diluciones se puede ver en la imagen que a medida que aumenta la dilución se ven más tenues los puntos, hasta que a partir de la dilución 1/320 ya no se ve casi nada, definiendo un título de anticuerpos por dot blot es de 1/160, entendiéndose como “título de anticuerpos”, a la última dilución en la que se observó una reacción positiva, en este caso de color.

**Evaluación de reacciones cruzadas:** Luego de haber añadido el revelador y de haber lavado con agua se obtuvieron los siguientes resultados:



**Figura 28:** Reacciones cruzadas con antígenos y antisueros heterólogos y homólogos

En la figura se puede observar, a través de un “punto”, la reacción de color que se produce al añadir la solución reveladora, cuando hay unión antígeno-anticuerpo, lo que indica un resultado de dot blot positivo. En la tira **1A** que contiene histoplasmina lote 2022/2 y su antisuero homólogo lote 2022/2 se ve un resultado positivo, es decir se puede ver un punto bien marcado lo que comprueba una vez la reactividad entre ambos. En la tira **2B**, también se ve un resultado positivo más leve, lo que es de esperar ya que esa parte de la tira contiene antígeno de *Coccidioides posadasii* y su antisuero homólogo. En la tira **3C**, contiene antígeno de *Paracoccidioides sp.*, y su antisuero homólogo, porque lo que también puede verse un punto bien marcado, es decir un resultado positivo. En las tiras **4D**, **5E** y **6F** también se puede ver un resultado positivo, con puntos más leves con respecto a los antes mencionados, que contienen antígeno de *Aspergillus Fumigatus* y su antisuero homólogo, *Aspergillus Niger* y su antisuero homólogo, *Aspergillus Flavus* y su antisuero homólogo, respectivamente. (Antisuero homólogo: antisuero que contiene anticuerpos específicos contra un antígeno con el cual fue inmunizado.)

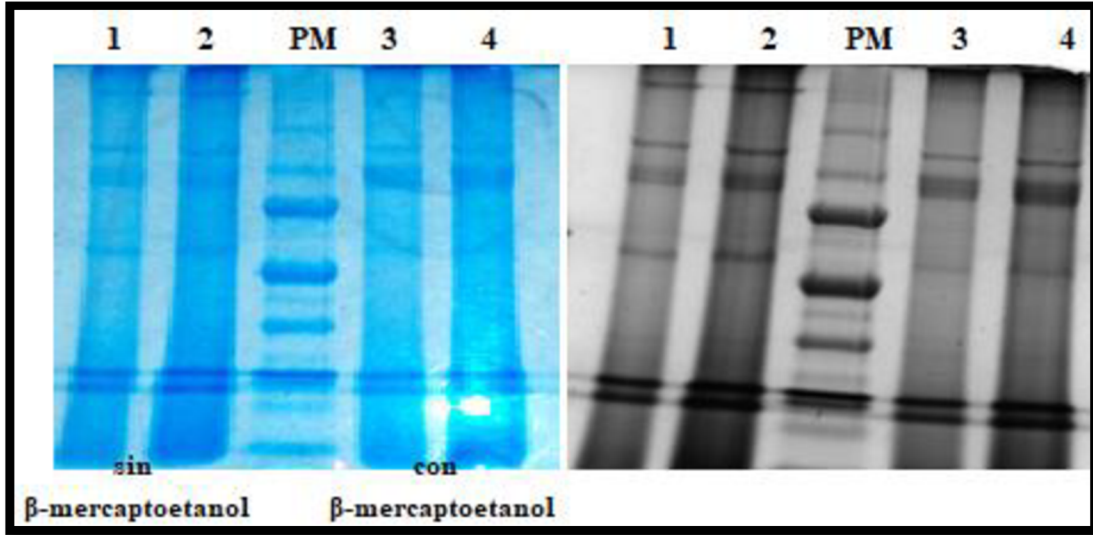
En cuanto a reactividades cruzadas, se puede observar que si hay reacciones cruzadas: en la tira **2A** puede verse una reacción cruzada entre la histoplasmina y el antisuero de *Coccidioides Posadasii*, como así también en la tira **3A** hay reacción cruzada muy leve, que quizás en la imagen no puede apreciarse, entre la histoplasmina y antisuero de *Paracoccidioides sp.*, lo que comprueba que hay antisueros como los recién mencionados, que contienen anticuerpos que reconocen un epítipo en la histoplasmina idéntico o muy similar al antígeno que los genera. También pueden verse otras reacciones cruzadas entre los demás hongos, pero que no vienen al caso para este trabajo ya que las reacciones cruzadas que nos interesan son las que involucran a la histoplasmina LOTE2022/2 que elaboramos.

Tanto los antígenos como los antisueros heterólogos, de otros hongos, fueron producidos por el servicio de micología en partidas anteriores, que amablemente nos dieron para poder evaluar las reacciones cruzadas por IDR, dot blot y aglutinación en látex.

## 4.5- Caracterización de histoplasmina

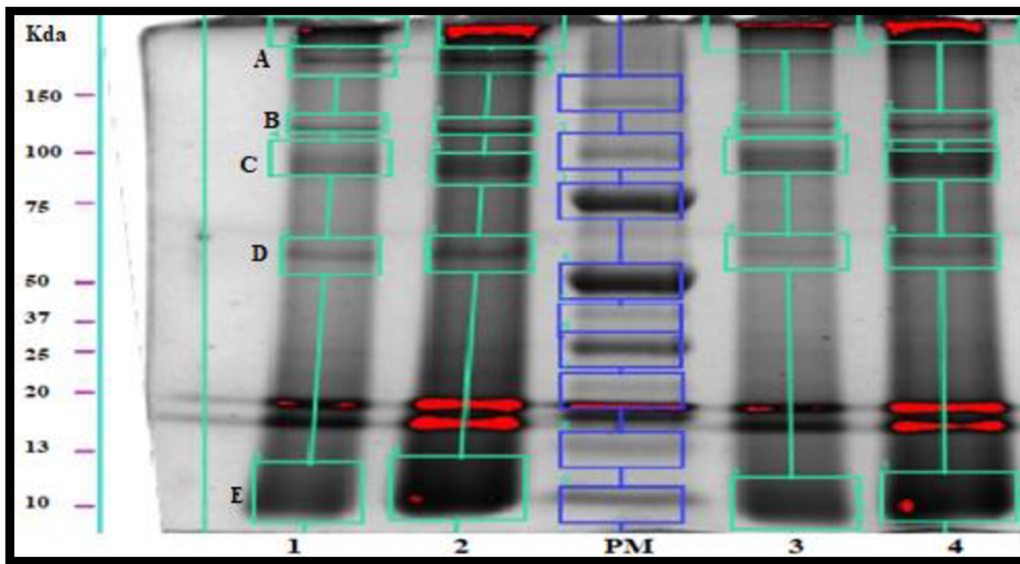
### 4.5.1- SDS-page

Luego de haber realizado la corrida electroforética y la tinción con Coomassie Blue Coloidal del gel 1 se obtuvieron los siguientes resultados:



*Figura 29: A la izquierda SDS-page color real. A la derecha captura del gel en blanco y negro para que se aprecien mejor las bandas. (PM: patrón de peso molecular) (1, 2, 3, 4: n° de cada calle donde se sembró 20ul de histoplasmina LOTE2022/2 diluida 4 en 1 con buffer muestra)*

Para el análisis del gel se utilizó el equipo “iBright CL750 Imaging System”, el cual tomó una foto del gel en blanco y negro y nos arrojó las siguientes bandas de proteínas:



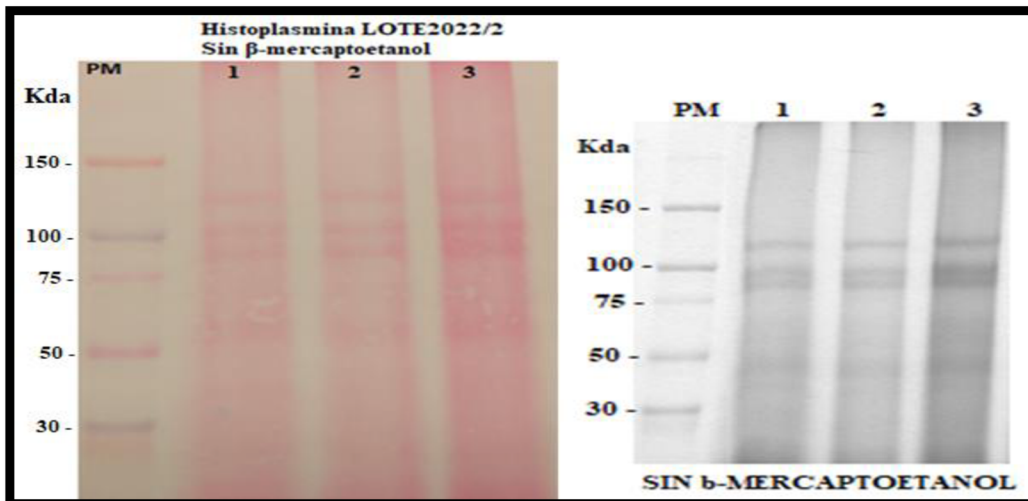
*Figura 30: iBright™ ImageAnalysis Report (análisis del SDS-page con los PM de las bandas)*

Según los resultados que se obtuvieron en la electroforesis del gel 1, y recordando que en la calle 1 y 2 se sembró lo mismo sin  $\beta$ -mercaptoetanol y en las calles 3 y 4 se sembró lo mismo con  $\beta$ -mercaptoetanol, principalmente podemos observar que la histoplasmina es un conjunto de proteínas con diferentes pesos moleculares. En la figura, se puede observar una banda de

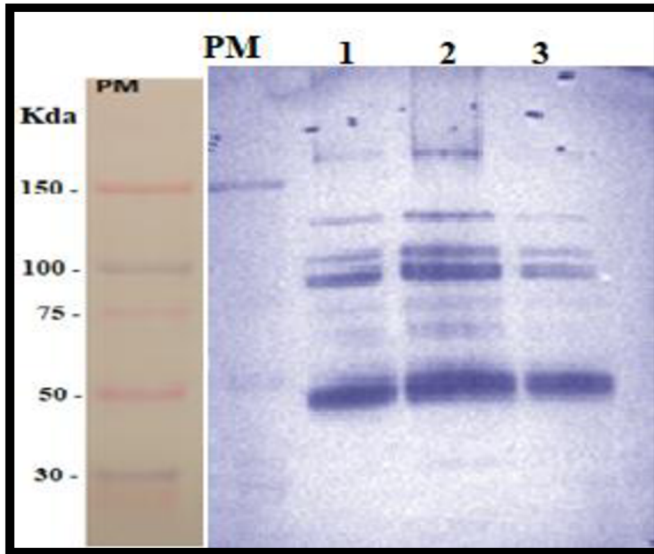
peso molecular mayor a 150 kda (banda A), otra banda de aprox. 120 kda (banda B) y una banda ancha entre 75 y 100 kda (banda C). Teóricamente la banda C corresponde al antígeno M, que es una glicoproteína con una masa molecular de 70 a 94 kda y la banda B, el antígeno H, que es una glicoproteína cuya masa molecular es de 108 a 120 kda, determinado por electroforesis. También se observa en la imagen, otras bandas de menor peso molecular, como la banda D de aprox. 60 kda y la banda E de proteínas muy pequeñas de aprox. 10 kda. Estas mismas bandas se pueden observar en la calle 2 ya que ambas no tienen  $\beta$ -mercaptoetanol. En el caso de las calle 3 y 4 que si tiene  $\beta$ -mercaptoetanol, se puede ver que las bandas B, C, D, E están presentes al igual que en las calles 1 y 2, pero la banda A no aparece, lo que podría explicarse que en esa banda había proteínas que presentan puentes disulfuro, que unen cadenas polipeptídicas y que con la acción del  $\beta$ -mercaptoetanol, que es reducir estos puentes disulfuro y por ende eliminarlos, se produce la liberación de esas cadenas, generando proteínas de menor tamaño, que pueden estar presentes en cualquiera de las otras bandas.

#### 4.5.2-Western Blot

Una vez realizada la corrida electroforética del gel 2, la transferencia a la membrana de nitrocelulosa y luego de haber incubado con los anticuerpos y la solución reveladora se obtuvieron los siguientes resultados:



*Figura 31: A la izquierda, Tinción con Rojo Ponceu de la membrana de nitrocelulosa. (se puede observar que hubo transferencia de proteínas). A la derecha, captura de la tinción en blanco y negro para observar mejor las bandas de proteínas. En cada imagen se marcan los pesos moleculares de las bandas del PM.*



*Figura 32: Western Blot para la histoplasmina LOTE2022/2 y el antisuero anti-histoplasmina LOTE2022/2. A la izquierda, se agregaron los PM de cuando se agregó el Rojo Ponceu, ya que después de realizar las incubaciones con los anticuerpos y los lavados estos se borraron de la membrana de nitrocelulosa.*

En la figura, se pueden ver bandas en ambas calles, que representan, la unión de las proteínas antigénicas de la histoplasmina elaborada con los anticuerpos presentes en el antisuero anti-histoplasmina elaborado, lo que confirma una vez más la reactividad entre ambos. Con esta técnica también podemos decir que la histoplasmina tiene varias proteínas que son inmunogénicas por las que se producen anticuerpos específicos, que según el western realizado estas proteínas tienen un peso molecular entre 50 y 150 kda, ya que no se observan bandas de pesos moleculares menor a 50kda.

En SDS-page del gel 1 que realizamos, se veía una banda muy ancha de proteínas de aprox. 10-15kda, que en el western blot no, por lo que podemos concluir en que estas proteínas pequeñas no son inmunogénicas, por eso no aparecen en el western blot.

También, en el western blot, podemos ver que hay 2 bandas de aprox. 75 y 100kda y otra de aprox. 120 kda que se corresponderían, por el peso aproximado, con las proteínas H y M. Estas proteínas M y H, son consideradas proteínas altamente inmunogénicas, por las que se producen anticuerpos específicos anti-H y anti-M identificados por IDR, lo que no quita que sean las únicas proteínas inmunogénicas por las que se producen anticuerpos, de hecho se ven otras bandas de otros pesos moleculares, por lo que también podemos decir que hay más proteínas que componen la histoplasmina que son inmunogénicas y que en el antisuero

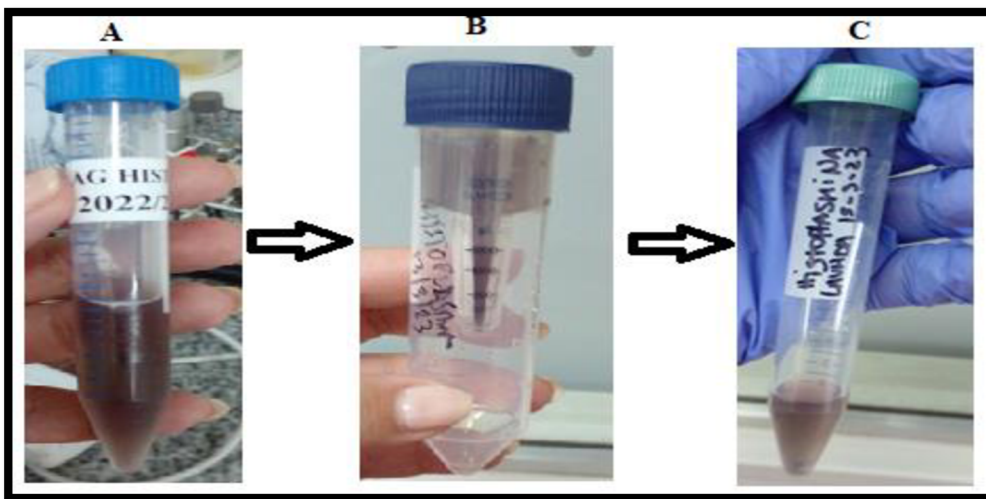
producido, además de anticuerpos anti-H y anti-M ,hay otros anticuerpos que se unen a otras proteínas, por lo que es posible que por el bajo peso molecular no se pueda obtener una inmunoprecipitación visible por IDR ,ya que la IDR es una técnica poco sensible en la que se necesita de altas concentraciones de anticuerpos para que se vean bandas.

## 4.6-Producción del reactivo de látex

### 4.6.1-Sensibilización de partículas de látex

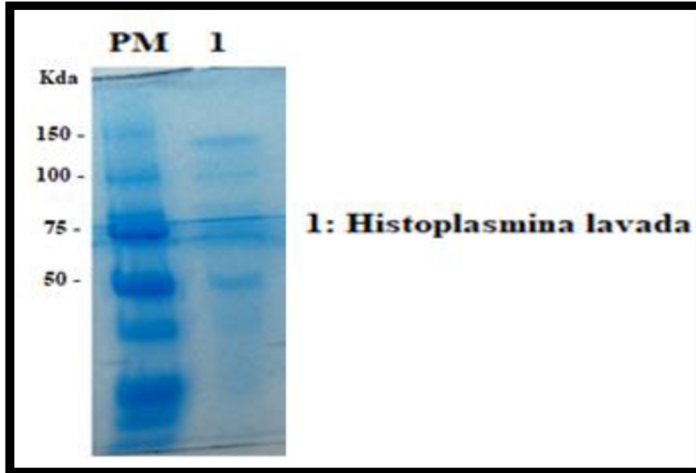
ULTRAFILTRACION: Para obtener las proteínas lo más puras posible se realizó la ultrafiltración con AMICON donde se utilizaron 5.6 ml de histoplasmina LOTE 2022/2 y 5 ml de PBS para el primer lavado. Luego de centrifugar se obtuvieron 9 ml de filtrado (LAVADO 1) y quedo retenido 1.6 ml de histoplasmina. Se agregó 9 ml de PBS a los 1.6 ml de histoplasmina y se obtuvieron 8.65 ml de filtrado (LAVADO 2) y 1.95 ml de histoplasmina concentrada (*ver figura 33*). La histoplasmina obtenida es la que se utilizó para el látex.

LOWRY: Se midió la concentración de proteínas en la muestra de histoplasmina lavada, por el método de Lowry, cuya concentración fue de 0.53mg/ml (*ver sección 4.3, pág.*)



*Figura 33: En la parte A, se ve la histoplasmina elaborada, en la parte B, el tubo Amicon MILLIPORE 30Kda con la histoplasmina y el PBS, en la parte C, histoplasmina lavada.*

SDS-PAGE: Se obtuvieron los siguientes resultados:



*Figura 34: SDS-page para la histoplasmina lavada*

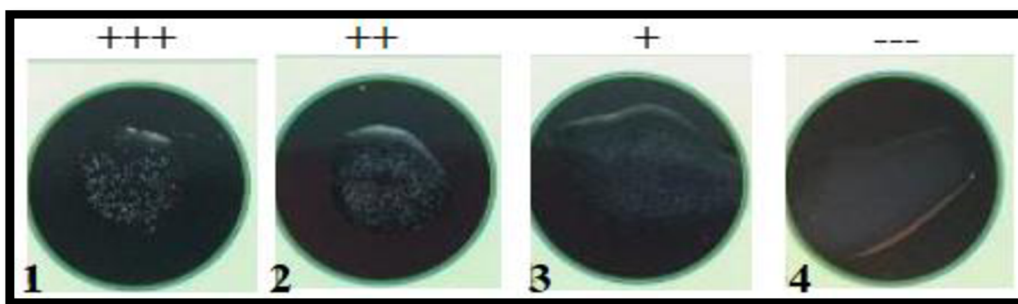
En el gel que se muestra en la figura se puede ver que en la calle 1, que se sembró histoplasmina lavada, se ven bandas de peso molecular entre 50 y 150Kda, que son las proteínas que por el western blot demostraron reactividad con el antisuero, a su vez se puede observar que no se ven bandas de pesos menores, como aparecen en el primer gel que se realizó, porque lo que confirmaría que en los lavados, las proteínas menores a 30 kda, fueron filtradas al igual que todos los componentes y restos del cultivo.

Luego de realizar el procedimiento de sensibilización de las partículas de látex con la histoplasmina y los buffers preparados, se obtuvieron los siguientes reactivos:



*Figura 35: Reactivos de látex producidos. (1, 2, 3 buffer glicina; 4, 5, 6 buffer acetato) (Lx: latex). En la parte superior de la imagen se indican los valores J de cada reactivo (valor J: mg de histoplasmina / mg de látex)*

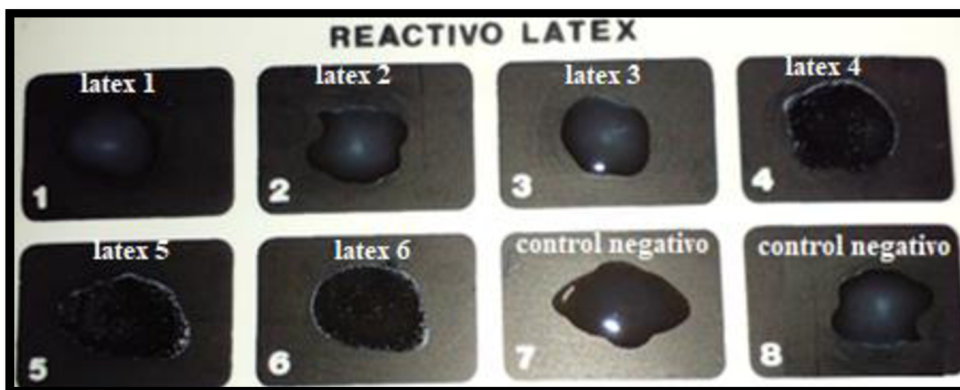
#### 4.6.2-Ensayos de aglutinación



*Figura 36: 1, suspensión con grumos grandes y fondo claro; 2, suspensión con grumos moderados a grandes y fondo claro; 3, suspensión con pequeños y moderados grumos con fondo ligeramente blanquecino; 4, suspensión blanquecina sin aglutinación. Látex de Cryptococco (Trovero y col, 2020)*

Para los ensayos de aglutinación, se utilizaron los reactivos de látex que producimos, diluidos 1/2 en buffer glicina (para el látex 1 ,2 y 3) y en buffer acetato (para el látex 4, 5 y 6).

1) Para el primer ensayo, se realizó una dilución 1/10 del antisuero anti-histoplasmina en buffer glicina (para el látex 1 ,2 y 3) y en buffer acetato (para el látex 4, 5 y 6). Se obtuvieron los siguientes resultados:



*Figura 37: Reacciones de aglutinación para el antisuero anti-histoplasmina en dilución 1/10*

Se puede observar que no hubo aglutinación para los látex 1, 2 y 3, que contiene buffer glicina y si se ve aglutinación en los látex 4, 5 y 6 que contienen buffer acetato. También hay 2 controles negativos, que contienen, látex con buffer glicina (7) y el otro, látex con buffer acetato (8), ambos sin histoplasmina, y que evidentemente no dieron aglutinación.

2) En este segundo ensayo se procedió a probar el antisuero puro, los resultados fueron los siguientes:



**Figura 38: Reacciones de aglutinación para el antisuero puro**

Se puede observar una vez más que los látex 1, 2 y 3 que contiene buffer glicina no dan aglutinaciones. En el caso de los látex 4, 5 y 6 se ve aglutinación en ambos. En la siguiente tabla se muestra la comparación de resultados de los ensayos 1) y 2):

	Latex1	Latex2	Latex3	Latex4	Latex5	Latex6	Latex7	Latex8
As. Anti-histoplasmina 1/10	-	-	-	++	+++	++	-	-
As. Anti-histoplasmina puro	-	-	-	+	+	+	-	-

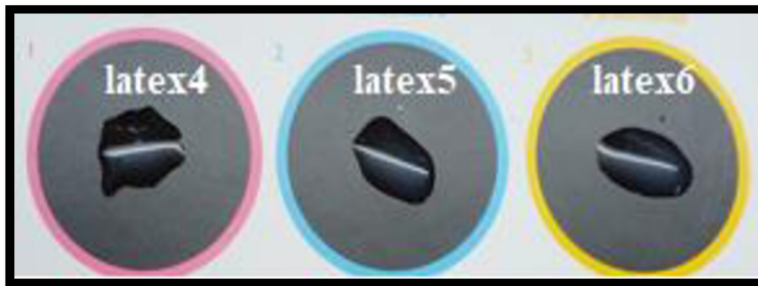
**Tabla 7: Comparación de resultados de los ensayos 1) y 2) según la figura 36**

En base a estos 2 primeros ensayos, pudimos descartar los látex con buffer glicina pH 8 (látex 1, 2 y 3), ya que se probaron con 3 concentraciones diferentes de histoplasmina y con el antisuero puro y 1/10, y no se vieron resultados positivos de aglutinación, en contraposición con los látex 4, 5 y 6 que si se vieron resultados de aglutinación, por lo que podemos decir que la condición óptima de adsorción de la histoplasmina a las partículas de látex, es con un pH ácido 4.8, como el buffer acetato, que se asemeja al punto isoeléctrico de la histoplasmina. También, con las 3 concentraciones que se probaron los látex 4, 5 y 6 se vio aglutinación, pero hubo un látex en el que se vio mejor resultado de aglutinación, que fue el látex 5 que tenía un valor J de 0.02mg histoplasmina/mg de látex.

En cuanto al antisuero puro y diluido, la aglutinación con el antisuero diluido 1/10 da mejor que el antisuero puro, esto puede deberse a dos factores: a la presencia del buffer que se usa para diluir que permite tener las partículas de látex estables o puede deberse al fenómeno

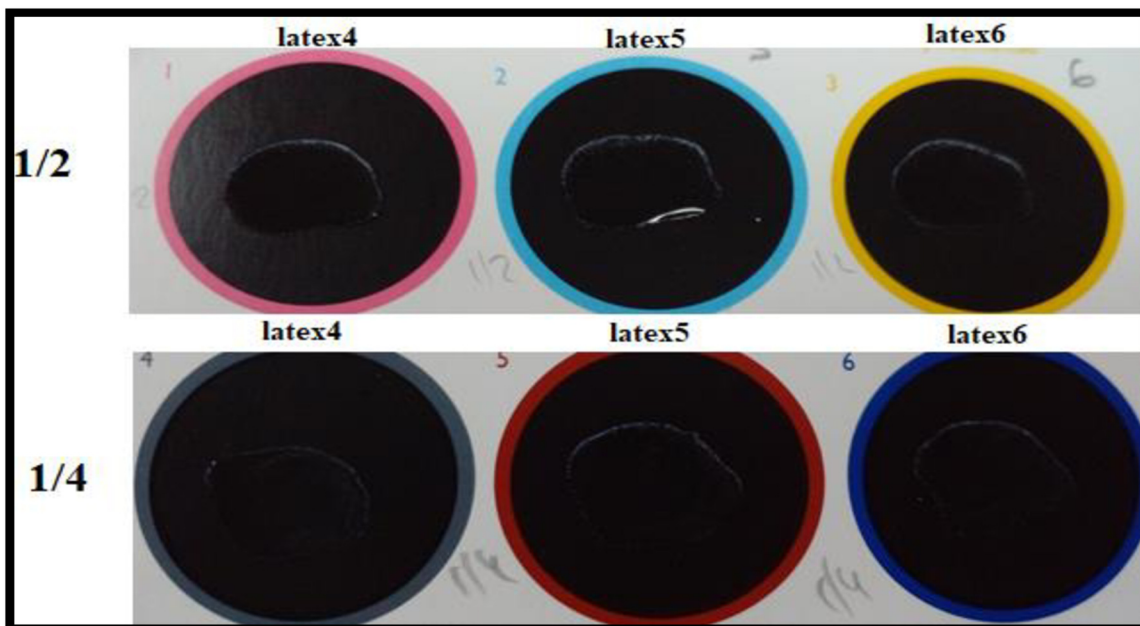
prozona, donde un “exceso” de anticuerpos (antisuero puro) limita el enlace cruzado antígeno-anticuerpo, dando como resultado la formación de complejos inmunes de menor tamaño que hacen que los inmunoensayos, en este caso la aglutinación, sea menor, y hasta, a veces dando un falso negativo.

3) En un tercer ensayo, ya habiendo determinado la condición óptima de adsorción, se procedió a realizar un control de los látex 4, 5 y 6 con suero bovino fetal, cuyos resultados fueron negativos para los tres látex, lo que era de esperar.

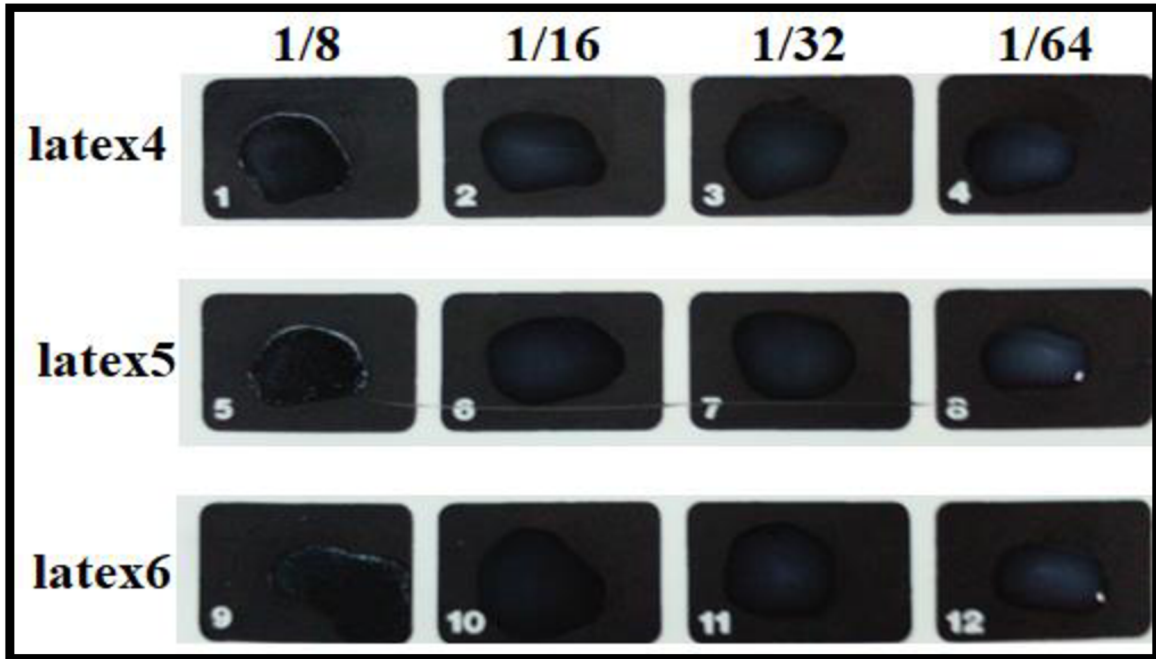


*Figura 39: Reacciones de aglutinación con suero fetal bovino de los látex 4, 5 y 6*

4) Se procedió a realizar la titulación del antisuero con los látex 4, 5 y 6, donde se prepararon diluciones seriadas 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 del antisuero anti-histoplasmina LOTE2022/2, cuyos resultados fueron los siguientes:



*Figura 40: Reacciones de aglutinación para los antisueros 1/2 y 1/4, con los látex 4, 5 y 6*



*Figura 41: Reacciones de aglutinación para los antiseros 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, para los látex 4, 5 y 6.*

Se puede observar que hay aglutinaciones desde la dilución 1/2 hasta 1/8 en ambos látex, ya que a partir de la dilución 1/16 no se observa aglutinación. En la siguiente tabla se muestra la comparación de los grados de aglutinación de los ensayos 3) y 4):

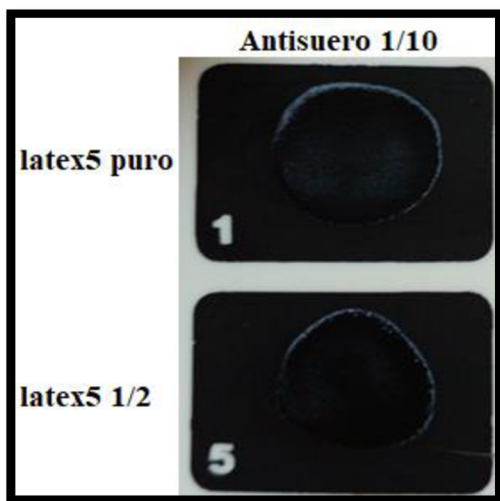
	Suero bovino fetal	Antisero 1/2	Antisero 1/4	Antisero 1/8	Antisero 1/16	Antisero 1/32	Antisero 1/64
Latex4	-	+++	+++	++	-	-	-
Latex5	-	+++	+++	+++	-	-	-
Latex6	-	+++	+++	++	-	-	-

*Tabla 8: Comparación de resultados de los ensayos 3) y 4) según la figura 36*

Con este ensayo, entonces, pudimos determinar el título de anticuerpos, el cual fue de 1/8, pero también en el primer ensayo que se realizó se hizo una dilución 1/10 que también dio positiva, por lo que podemos decir que la última dilución en la que se vio aglutinación, la cual determina el título, es la dilución 1/10.

5) Con el látex 5, que demostró dar mejor aglutinación con respecto al látex 4 y 6, se procedió a evaluar la reacción de aglutinación usando el látex puro sin diluir y usando el látex 1/2

como se usó para los demás ensayos. El antisuero se utilizó en dilución 1/10. Los resultados fueron los siguientes:



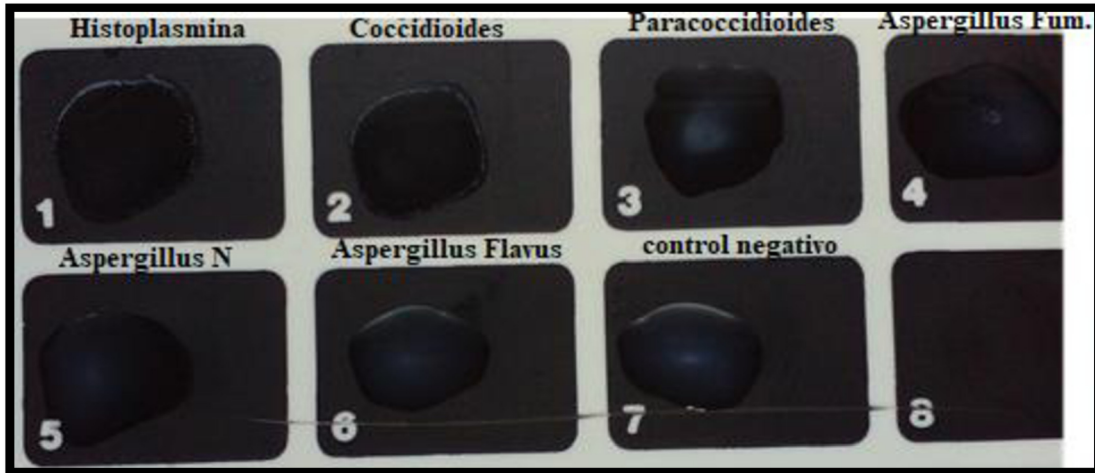
**Figura 42: Reacciones de aglutinación usando el reactivo de látex puro y 1/2, con antisuero 1/10**

Los resultados fueron muy similares, pero con el látex 1/2, según mi criterio, se aprecia mejor la aglutinación, ya que se ven un poco más grandes los “grumos” y un fondo menos blanquecino que con el látex puro, de todas maneras, hay una buena visualización de la aglutinación en ambas condiciones.

6) Se evaluaron reacciones cruzadas utilizando antisueros puros de *Coccidioides Posadassi*, *Paracoccidioides sp.*, *Aspergillus Fumigatus*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Flavus*. Se utilizó antisuero anti-histoplasmina en dilución 1/10 para el control positivo. Se empleó el látex 5 y este se usó en dilución 1/2. Los resultados fueron los siguientes:

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Látex 5	+++	++	+	-	-	-	-

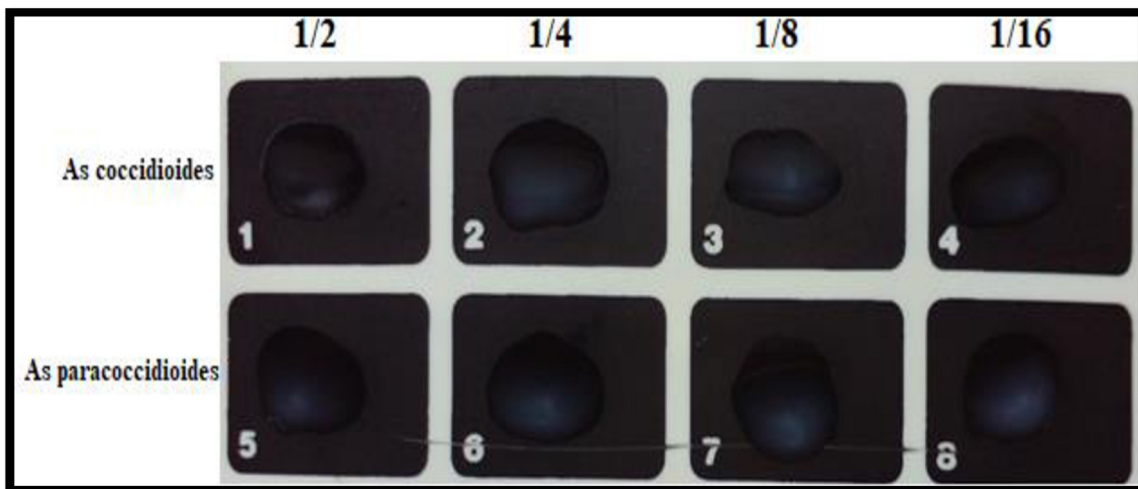
**Tabla 9: Resultados del ensayo 6) según la figura 36. (1: Antisuero de histoplasma; 2: Coccidioides Posadassi; 3: Paracoccidioides sp.; 4: Aspergillus Fumigatus; 5: Aspergillus Niger; 6: Aspergillus Flavus; 7: Control negativo suero fetal bovino.)**



**Figura 43:** Reacciones de aglutinación para antisueros heterologos (puros) y el antisuero anti-histoplasmina (1/10). Control negativo (suero bovino fetal)

Se puede observar en la figura que hay aglutinación entre antisuero anti-histoplasmina 1/10 y el látex 5, demostrando una vez la reactividad entre ellos. En cuanto a los antisueros heterologos, se puede ver aglutinación con el antisuero de *Coccidioides Posadassi*, y una aglutinación más leve con *Paracoccidioides sp.* Con los demás antisueros no se observó aglutinación. Al igual que con el dot blot, con esta técnica de aglutinación con partículas de látex también se detectaron reacciones cruzadas con los mismos hongos.

7) Para saber hasta que título el antisuero de *Coccidioides Posadassi* y *Paracoccidioides sp.* produce aglutinación, se procedió a realizar diluciones 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de ambos en buffer acetato. El reactivo de látex 5 se usó 1/2. Los resultados fueron los siguientes:



**Figura 44:** Reacciones de aglutinación para titular las reacciones cruzadas con los antisueros de *Coccidioides Posadassi* y *Paracoccidioides sp.*

	<b>1/2</b>	<b>1/4</b>	<b>1/8</b>	<b>1/16</b>
<i>Coccidioides Posadassi</i>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<i>Paracoccidioides sp</i>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

**Tabla 10: Resultados de la titulación de las reacciones cruzadas según la figura 36**

Se puede observar que únicamente hay una leve aglutinación en la dilución 1/2 de *Coccidioides Posadassi*, en las demás diluciones no hay aglutinación por lo que podemos decir que únicamente con el antisuero puro y 1/2 se ve reacción cruzada con el reactivo de látex de histoplasmina. Para *Paracoccidioides sp.* no se ven aglutinaciones por lo que la reactividad cruzada es muy leve en el antisuero puro.

## **5-CONCLUSIONES**

Para la producción del látex, primero tuvimos que producir y obtener la histoplasmina a partir del cultivo líquido en fase micelial de *H. capsulatum*, luego se tuvo que inmunizar conejos para obtener el antisuero anti-histoplasmina, evaluando su reactividad por IDR, Dot Blot, Western Blot y su caracterización por SDS-page. Gracias a todos los métodos y procedimientos realizados, mencionados anteriormente, se pudo confirmar que la histoplasmina y el antisuero que producimos son reactivos entre sí. Luego, ya sabiendo que la histoplasmina y el antisuero que producimos son reactivos, a partir de buffer glicina pH 8, buffer acetato pH 4.8 y de 3 concentraciones de histoplasmina 0.05, 0.02 y 0.01 mg/mg Lx, se determinó la condición óptima de adsorción pasiva de la histoplasmina a las partículas de látex, probadas con el antisuero anti-histoplasmina por reacciones de aglutinación. En base a todos los resultados de aglutinación que se obtuvieron, se pudo determinar que el buffer acetato pH 4.8 es la condición óptima para la sensibilización de las partículas de látex de 0.8  $\mu\text{m}$  con la histoplasmina, lo que confirma la teoría, que usando el buffer con este pH similar al punto isoeléctrico de la proteína a adsorber se favorece la adsorción pasiva (Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D, 2001). Con respecto a las 3 concentraciones de histoplasmina probadas, se pudo comprobar que ambas concentraciones generan aglutinación, pero particularmente la concentración 0.02 mg/mg Lx es la condición que mejor aglutinación produjo.

Con este trabajo entonces, pudimos identificar la condición de pH y concentración óptima de adsorción para la producción del reactivo de látex, el cual es un dato muy importante para el proyecto “desarrollo de un reactivo de látex para el diagnóstico serológico de la histoplasmosis” del Servicio Antígenos y Antisueros, INPB ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, ya que, sabiendo estas condiciones, se va a seguir estudiando y avanzando en la mejora continua de este reactivo.

Con respecto al rendimiento del reactivo, los datos que pudimos concluir, en base los ensayos de aglutinación realizados, es que, si se usan las partículas de látex diluidas al 0,25%, este produce aglutinación muy visible e incluso mejor que si se usara al 0,5%, lo que además disminuye el costo de producción. En cuanto a la concentración de histoplasmina, teóricamente, hay un rango de concentración donde se obtiene el reactivo con mayor

sensibilidad, y por encima y debajo de ese rango la sensibilidad del reactivo disminuye, por lo que si bien en las tres concentraciones ensayadas se observó aglutinación, empleando la concentración intermedia 0.02 mg/mg Lx, los resultados de aglutinación fueron mejor, por lo que si se usaría esta última concentración, necesitaría menor cantidad de histoplasmina y esto implica una ventaja en cuanto a los costos ya que como se describió anteriormente es muy engorroso la obtención de la misma.

En cuanto al título de anticuerpos y a la evaluación de reacciones cruzadas, recordamos que por la técnica de IDR no se pudieron identificar reacciones cruzadas y el título de anticuerpos anti-histoplasmina fue de 1/2. A diferencia, que con el dot blot, si se registraron reacciones cruzadas con *Coccidioides Posadasii* y *Paracoccidioides sp.* y el título del antisuero anti-histoplasmina fue de 1/160, y con las aglutinaciones en partículas de látex el título de anticuerpos fue de 1/10 y si se observaron reacciones cruzadas con los antígenos de *Coccidioides Posadasii* y *Paracoccidioides sp* al igual que con el dot blot. En el dot blot el título de las reacciones cruzadas fue de 1/20 y para las aglutinaciones de 1/2 para *Coccidioides Posadasii* y puro para *Paracoccidioides sp.* En base a estos resultados obtenidos podemos concluir en que el dot blot es la técnica más sensible respecto a la IDR y a la aglutinación. En cuanto a la IDR y la aglutinación en partículas de látex, podemos decir que esta última es más sensible analíticamente, ya que el título de anticuerpos fue mayor y si se detectó reacciones cruzadas y en cuanto a especificidad analítica, la IDR es más específica porque al ser menos sensible no alcanzan a visualizarse las reacciones cruzadas. Por otro lado, la IDR solo es positiva cuando vemos las bandas de identidad H y M, si aparecieran otras bandas debido a reacciones cruzadas con otros microorganismos no se informaría positivo, favoreciendo así la especificidad del método. En el reactivo de látex las aglutinaciones por reacciones cruzadas no podrían ser diferenciadas de las reacciones homologas.

Comparando la IDR, que es la técnica utilizada actualmente en el inmunodiagnostico de histoplasmosis, con la aglutinación en partículas de látex, podemos afirmar que la IDR tarda en dar un resultado aprox. en 72-96 hs y requiere de muchos materiales, soluciones y equipos, en cambio la técnica de aglutinación en partículas de látex es mucho más rápida, que aprox. en 5-15 min se obtiene un resultado, y se utilizan muy pocos materiales, por lo que sería una

excelente técnica para el inmunodiagnóstico de la histoplasmosis, ya que debido a la alta tasa de morbi-mortalidad que presenta la histoplasmosis y al difícil manejo terapéutico, se hace necesario desarrollar nuevas herramientas que permitan hacer un diagnóstico más rápido y oportuno. Es importante aclarar que con la implementación de estas nuevas metodologías inmunológicas no se pretende reemplazar los métodos convencionales. Por el contrario, se trata de complementar y ampliar la batería de pruebas existentes para realizar un diagnóstico más preciso y oportuno.


Por último, este reactivo de látex que desarrollamos en este trabajo, demostró dar resultados positivos (aglutinación) cuando se lo enfrenta al antisuero anti-histoplasmina elaborado, es decir que detecto anticuerpos anti-histoplasma, por lo que nuestro objetivo principal se pudo llevar a cabo y está cumplido. Ahora queda mejorar el mismo y evaluar las reacciones cruzadas que se observaron en los ensayos, donde para identificar las proteínas relacionadas con las reacciones cruzadas sería necesario realizar un western blot con los antisueros que dieron aglutinación con el látex elaborado para poder ver que banda es la que cruza con los antisueros heterólogos, y así poder identificarla y más adelante pensar en la purificación de la histoplasmina para eliminar esa reacción cruzada, generando un reactivo mucho más específico. Por otro lado, se continuará trabajando en la puesta a punto del reactivo con el fin de obtener un reactivo que sea altamente sensible y específico para el inmunodiagnóstico de Histoplasmosis. Finalmente se probará este reactivo con sueros humanos para evaluar la sensibilidad y especificidad clínica.


## **6- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- Allendoerfer, R., Biovin, G. P., & Deepe, G. S., Jr (1997). Modulation of immune responses in murine pulmonary histoplasmosis. *The Journal of infectious diseases*, 175(4), 905–914. <https://doi.org/10.1086/513989>.
- Arenas, R. (2014). *Micología Medica Ilustrada*, 5ta edición. Mexico: MC Graw Hill Education. Sección IV, Micosis sistémicas.
- Azuma, I., Kanetsuna, F., Tanaka, Y., Yamamura, Y., & Carbonell, L. M. (1974). Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blasomyces dermatitidis*. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 54(1), 111–125. <https://doi.org/10.1007/BF02055979>.
- Berliner M. D. (1973). *Histoplasma capsulatum*: vital staining for the differentiation of the albino and brown phenotypes in vitro. *Sabouraudia*, 11(3), 271–273. <https://doi.org/10.1080/00362177385190551>.
- Bonifaz, A. (2012). *Micología medica básica*, 4ta edición. México: Mc Graw Hill. Capítulo 20.
- Borjes Enrique Padilla, (1959) *Histoplasmina*. Reporte sobre mil doscientas intradermoreacciones. TESIS PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.
- Braz J Microbiol. (2006) enero; 37(1): 1–13. doi:10.1590/S1517-83822006000100001.
- Couto, M. A., Liu, L., Lehrer, R. I., & Ganz, T. (1994). Inhibition of intracellular *Histoplasma capsulatum* replication by murine macrophages that produce human defensin. *Infection and immunity*, 62(6), 2375–2378. <https://doi.org/10.1128/iai.62.6.2375-2378.1994>.
- Davel G, Canteros C, Refojo N, Borgeat E, Cordoba S, (2007). *MICOLOGÍA MÉDICA, EL LABORATORIO Y EL DIAGNÓSTICO DE LAS MICOSIS*. DEPARTAMENTO MICOLOGÍA. INSTITUTO NACIONAL ENFERMEDADES INFECCIOSAS (INEI). ANLIS."DR. CARLOS G. MALBRÁN “.

- Davies, S. F., Khan, M., & Sarosi, G. A. (1978). Disseminated histoplasmosis in immunologically suppressed patients. Occurrence in a nonendemic area. *The American journal of medicine*, 64(1), 94–100. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(78\)90183-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(78)90183-3).
- EDWARDS, M. R., HAZEN, E. L., & EDWARDS, G. A. (1960). The micromorphology of the tuberculate spores of *Histoplasma capsulatum*. *Canadian journal of microbiology*, 6, 65–70. <https://doi.org/10.1139/m60-009>.
- Fainboim, Leonardo; Geffner, Jorge (2011). *Introducción a la inmunología humana*. 6ta edición, editorial medica Panamericana.
- Fisher KL, Woods JP (2000). Determination of  $\beta$ -glucosidase enzymatic function of the *Histoplasma capsulatum* H antigen using a native expression system. *Gene*. 18 de abril de 2000;247(1):191-7.
- Garrison, R. G., & Boyd, K. S. (1977). The fine structure of microconidial germination and vegetative cells of *Histoplasma capsulatum*. *Annales de microbiologie*, 128(2), 135–149.
- Goodwin, R. A., Loyd, J. E., & Des Prez, R. M. (1981). Histoplasmosis in normal hosts. *Medicine*, 60(4), 231–266. <https://doi.org/10.1097/00005792-198107000-00001>
- Guimarães, A. J., Nosanchuk, J. D., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2006). DIAGNOSIS OF HISTOPLASMOSIS. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 37(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100001>.
- Hamilton, A. J., Bartholomew, M. A., Figueroa, J., Fenelon, L. E., & Hay, R. J. (1990). Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is a catalase which exhibits cross-reactivity with other dimorphic fungi. *Journal of medical and veterinary mycology: bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 28(6), 479–485.
- Janeway's immunobiology (2017). Murphy, Kenneth; Weaver, Casey. 9th edition; New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis.
- Kauffman C. A. (2007). Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 115–132. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-06>.
- Kuby immunobiology (2007). Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne. 6th edition; McGRAW-HILL INTERAMERICANA.

- Muñoz, César O, Cano, Luz E, & González, Angel. (2010). Detección e identificación de *Histoplasma capsulatum* por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. *Infectio*,14(Suppl.2), s145-s158. <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v14s2/v14s2a07.pdf>
- Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D (2001). A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001; 12:379–408.
- Pino L (1960). Características morfológicas y fisiológicas de *Histoplasma capsulatum*. 1960: 40–75.
- Trovero, A. C., Mazza, M., Rogé, A., Rivas, M. C., Bordagorría, X., Bruno, S., & Davel, G. (2020). Production of a latex agglutination reagent for the rapid diagnosis of cryptococcal meningitis. *Revista Argentina de microbiología*, 52(3), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.002>
- Wheat, L. J., & Kauffman, C. A. (2003). Histoplasmosis. *Infectious disease clinics of North America*, 17(1), 1–vii. [https://doi.org/10.1016/s0891-5520\(02\)00039-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5520(02)00039-9).
- Wheat, L. J., Connolly-Stringfield, P. A., Baker, R. L., Curfman, M. F., Eads, M. E., Israel, K. S., Norris, S. A., Webb, D. H., & Zeckel, M. L. (1990). Disseminated histoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome: clinical findings, diagnosis and treatment, and review of the literature. *Medicine*, 69(6), 361–374. <https://doi.org/10.1097/00005792-199011000-00004>



  
 Leguizamón  
 Camilo Jaiara  
 39.117.450

## **7-ANEXOS**

### **Anexo 1: Criterios de aceptación de inactivación de cultivo**

- Cultivo negativo en los tres tubos, cumple la inactivación.
- Cultivo positivo en al menos un tubo, no cumple con la inactivación y se debe volver a repetir el proceso de inactivación con un nuevo lote de Thimerosal 1%. De volver a observar crecimiento se debe descartar todo el material.

### **Anexo 2: Soluciones para la IDR**

- Agarosa al 1% en agua destilada: Se disolvió 250 mg de agarosa EEO (electroendosmosis) en 25 ml de agua destilada calentando a baño maría hasta fusión completa, sin sobrecalentar.
- Agar fenolizado 1% pH= 6,3-6,4: Se colocó 50 ml de agua destilada en un Erlenmeyer de 250 ml con tapón. Se agregó 0,9 g de cloruro de sodio y 0,5 g de citrato de sodio disolviendo completamente ambas sales. Luego se añadió 0,25 ml de fenol y 7,5 g de glicina mezclando bien. Se agregó 1,0 g de bacto agar y se llevó a 100ml con agua destilada. Por último, se calentó a baño maría hasta que se fundió el agar. El pH final del agar-fenolizado debe ser 6,3-6,4.
- Solución decolorante: Metanol 500 ml + Ácido acético 200 ml + Agua destilada 300 ml.
- Solución colorante de coomassie blue R-250: Coomassie blue R-250 0,30 g + Solución decolorante 100 ml.
- Solución fisiológica: Cloruro de sodio 8,5 g + Agua destilada csp (cantidad suficiente para) 1000 ml.
- Solución citratada: Cloruro de sodio 8,5 g + Citrato de sodio 50 g + Agua destilada csp 1000 ml.

### **Anexo 3: Soluciones para la cuantificación de proteínas por Lowry**

- Solución de reactivo de Lowry: Se añadieron 40 ml de agua destilada a una botella de reactivo de Lowry en polvo (código: L 3540) mezclando bien por inversión para

disolver completamente el contenido (No se debe agitar para evitar la formación de espuma).

- Solución de trabajo, reactivo de Folin: Se tomaron 4.5 ml de reactivo fenol de Folin & Ciocalteu y se colocaron en botella de vidrio color caramelo. Luego se agregaron 22.5 ml de agua purificada llevando la solución resultante a una concentración de 20%. Se homogenizo y conservó a temperatura ambiente hasta el momento de utilizarla.

#### **Anexo 4: Soluciones para realizar el Dot Blot**

- PBS (buffer fosfato salino): Es una solución tampón acuosa y salina (PH 7.4) que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio, que para el dot blot y también para el western blot, se utiliza para los lavados ya que lava y elimina todo lo que no se unió al antígeno o al anticuerpo.
- PBS-albumina: Se preparó con 3 g de albumina sérica bovina (BSA) cada 100 ml de PBS. La función de este buffer, es bloquear rellenando los espacios que no han sido ocupados por las proteínas inmovilizados en la membrana, para así prevenir uniones inespecíficas de los anticuerpos y evitar falsos positivos.
- Solución reveladora: Para preparar esta solución de revelado, primero se diluyo el cloronaftol 5.88x en metanol para llevar el metanol a 17%. Luego se agregó Tris 50Mm, 15 ml de Tris cada 2.55 ml de cloronaftol en metanol y por último se añadió agua oxigenada 2%, 2 µl de agua oxigenada en 100 µl final de solución. El 4-cloro-1-naftol en presencia de peroxidasa (presente en el anticuerpo secundario) y de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) produce un precipitado azul-negro (reacción quimiluminescente).

#### **Anexo 5: Geles de separación y de siembra para SDS-page**

Se preparó el gel separación de acrilamida 7.5% de la siguiente manera:

- Agua destilada: 4.85 ml
- Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8): 2.5 ml
- SDS 10% p/v: 100 µl
- Solución de acrilamida 30% p/v / bis acrilamida 0,7% p/v: 2.5ml

- APS 10% p/v: 50  $\mu$ l
- TEMED: 5  $\mu$ l

Se preparó el gel de siembra 4% de la siguiente manera:

- Agua destilada: 6,1 ml
- Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8): 2,5 ml
- SDS 10% p/v: 100  $\mu$ l
- Solución de acrilamida 30% p/v / bisacrilamida 0,7% p/v: 1,33 ml
- APS 10% p/v: 50  $\mu$ l
- TEMED: 10  $\mu$ l

### **Anexo 6: Soluciones para la tinción de Coomassie Blue Coloidal**

- Solución fijadora: Se compone de 30% v/v de etanol, 2% v/v de ácido fosfórico. Se prepararon 100 ml.
- Solución de tinción: Se compone de 18% v/v de metanol, 17% v/v de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (sulfato de amonio) y 2% v/v de ácido fosfórico. Se prepararon 100 ml.

### **Anexo 7: Preparación del buffer muestra, buffer de corrida y buffer de transferencia**

- Buffer muestra: En un tubo de 15 ml se pesó 4 mg de azul de bromofenol. En otro tubo se añadió 1ml de Tris 0.5 M pH 6.8, 1.6ml de solución de SDS 10% p/v, 4.6 ml de agua purificada y 0.8 ml de glicerina. Se homogenizo y luego se agregó esta solución al tubo que contiene el azul de bromofenol. Se mezcló por inversión y se conservó hasta su uso.
- Buffer de corrida: En vaso precipitado de 1 litro se pesó 3 g de Trizma base y 14.42 g de glicina. Se agregó cantidad suficiente de agua purificada para llevar a 1 litro junto con 10 ml de SDS 10% y se homogenizo en agitador magnético hasta la disolución total. Se ajustó el pH a 8.4
- Buffer de transferencia: Se preparó 1 litro de buffer de transferencia, agregando 100 ml de buffer de corrida (sin SDS), 200 ml de metanol y cantidad suficiente de agua purificada para llevar a 1 litro.