

## Obtención de un antígeno metabólico de *Histoplasma capsulatum* para pruebas serodiagnósticas de histoplasmosis

Pérez Sanchidrian, Eliane<sup>1</sup>  
Velar Martínez, Rosario E<sup>2</sup>  
Martínez Machín, Gerardo F<sup>2</sup>  
Falcón Márquez, Rosabel F<sup>2</sup>  
Fernández Andreu, Carlos M<sup>2</sup>  
Almaguer Rodríguez, Tatiana<sup>2</sup>  
Illnait Zaragoza, María T<sup>2</sup>  
Perurena Lancha, Mayda R<sup>2</sup>  
San Juan Galán, Javier L<sup>2</sup>  
Rodríguez Gutiérrez, Iraida<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Finlay/ Departamento de Investigaciones, Habana, Cuba

<sup>2</sup> Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"/Bacteriología-Micología, Habana, Cuba,

velar@ipk.sld.cu  
gerardo@ipk.sld.cu  
rosabel@ipk.sld.cu  
cfandreu@ipk.sld.cu  
talmaro@ipk.sld.cu  
mtilnait@ipk.sld.cu  
mrpl@ipk.sld.cu  
jlsanjuan9@ipk.sld.cu  
iraida@ipk.sld.cu

### **Resumen**

**Introducción:** La histoplasmosis constituye la micosis endémica de más amplia distribución mundial producida por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum* y se considera una enfermedad ocupacional asociada a diferentes actividades laborales. En Cuba existen reportes de casos y microepidemias prácticamente en todas las provincias. Las pruebas serológicas toman notable relevancia en el diagnóstico, no solo por su rapidez sino porque con frecuencia son la única evidencia de la infección.

**Objetivos:** Obtener un antígeno metabólico, a partir de un cultivo autóctono de *H. capsulatum* en fase filamentosa para su empleo en técnicas serodiagnósticas.

**Materiales y métodos:** Se realizó un estudio de desarrollo a partir de un aislado clínico conservado en la colección de hongos patógenos del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Se incluyeron las metodologías de crecimiento en cultivo líquido de manera continua y en agitación. Además se realizó caracterización proteica y la evaluación de la capacidad antigénica mediante inmunodifusión doble.

**Resultados:** Las precipitinas H y M se detectaron en todos los componentes antigénicos obtenidos independientemente de las condiciones de cultivo ensayadas. El cultivo en medio Smith estático aportó un antígeno metabólico funcional, de alto contenido proteico y elevada especificidad en el serodiagnóstico de histoplasmosis.

Conclusiones: Teniendo en cuenta que este diagnóstico se encuentra centralizado a nuestro laboratorio, nos disponemos a garantizar la sostenibilidad de los recursos biológicos para continuar prestando satisfactoriamente este servicio en nuestro país.

**Palabras clave:** *Histoplasma capsulatum*, antígeno metabólico, diagnóstico serológico, inmunodifusión doble.

## INTRODUCCIÓN

La histoplasmosis es una infección sistémica causada por la inhalación de microconidios del hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*; enfermedad cosmopolita considerada la micosis respiratoria más frecuente en el mundo. Se estiman 40 millones de enfermos y se calculan 200 000 casos nuevos al año. Las regiones de mayor endemicidad se reportan en Suramérica, Centroamérica, las Antillas y en el centro-este de Estados Unidos. Este patógeno se desarrolla particularmente en materia orgánica enriquecida con alto contenido de nitrógeno y fósforo; condiciones favorecidas por el guano de pájaros, pollos o murciélagos, así como de algunas aves migratorias como los gansos (1, 2).

Las microepidemias se relacionan generalmente con actividades humanas generadoras de aerosoles en los nichos ecológicos de *H. capsulatum*. Las irrupciones en su hábitat se vinculan con frecuencia a: la espeleología, la limpieza de locales que sirven de refugio a aves o murciélagos, la tala de árboles, las demoliciones, el uso de tierras enriquecidas con abonos orgánicos, maniobras militares, así como la minería y el turismo (3). La mayor parte de las infecciones son asintomáticas o benignas y autorresolutivas, una proporción baja desarrolla las formas clínicas pulmonar progresiva o cutánea crónica (1).

La histoplasmosis es endémica en Cuba, a través de los años se han documentado casos y microepidemias en todas las provincias. Varias limitantes comprometen su diagnóstico, tal es el caso de la biocontención necesaria para manipular cultivos de este microorganismo y su lento crecimiento, que conlleva a la pérdida frecuente de los mismos debido a contaminaciones; esto reafirma la importancia de garantizar el serodiagnóstico de esta micosis. Sin embargo, este pilar de necesidad inestimable padece de la centralización al Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LM-IPK), donde la disponibilidad de los reactivos para este último fluctúa por razones ajenas a nuestro sistema de salud.

Teniendo en cuenta la endemicidad previamente demostrada en nuestro país, así como la diversidad genética de este patógeno en el orbe, resulta de gran relevancia fortalecer el diagnóstico con la obtención y uso de reactivos biológicos autóctonos bien caracterizados y con una calidad adecuada, que garanticen la sostenibilidad y sensibilidad diagnóstica. Por este motivo, se trabajó en la producción a escala de laboratorio de un antígeno metabólico de *H. capsulatum* que posteriormente permitirá la producción de un suero hiperinmune con la finalidad de disponer de un sistema diagnóstico nacional.

## I. MÉTODO

Se realizó un estudio de desarrollo en el LM-IPK en el segundo semestre de 2017. Se empleó un aislado clínico de *H. capsulatum*, conservado en agua destilada estéril, en la colección de hongos patógenos del laboratorio antes mencionado, que fue seleccionado aleatoriamente.

### I.- VERIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PUREZA DEL AISLADO CONSERVADO

Se realizó la siembra en agar dextrosa Sabouraud suplementado con cloranfenicol y cicloheximida para verificar la pureza y viabilidad del aislado en cuatro tubos de rosca. La metodología se realizó según las normativas del LM-IPK para el aislamiento e identificación de hongos patógenos que se basan en lo expuesto por Arenas (1) y De Hoog et al. (4).

## II.- RESIEMBRAS Y OBTENCIÓN DE CULTIVOS EN FASE FILAMENTOSA

La biomasa en fase filamentosa de *H. capsulatum* que se obtuvo se empleó para la producción de componentes antigénicos. Se utilizaron los medios de cultivo líquido medio de Smith (MSm) y caldo Sabouraud glucosado (MSa), en estos se inocularon pequeños fragmentos de micelio. Los erlenmeyer inoculados se distribuyeron para seguir dos metodologías: agitación continua, durante 15 días a 100 rpm y estático por dos a tres meses, ambos a temperatura ambiente como lo describe Alvarado (5)

## III.- PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO METABÓLICO OBTENIDO

Los extractos del cultivo se sometieron a una purificación por técnicas cromatográficas y las fracciones eluidas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección del antígeno. La concentración de proteínas totales se determinó a cada filtrado mediante el ensayo del ácido bicinonínico, siguiendo las recomendaciones del fabricante (BCA™ *Protein Assay Kit* Pearson, EE.UU.).

## IV.- COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE BANDAS M Y H DEL REACTIVO OBTENIDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE (IDD)

La reacción de identidad (parcial o total) entre los reactivos que se obtuvieron se comprobó mediante la técnica de IDD, que se realizó según la metodología establecida en el LM-IPK. Se utilizaron como control positivo las bandas de inmunoprecipitación (M y H) que se observan entre el suero y el antígeno del sistema comercial *Fungal Immunodiffusion Detection System* (ImmunoMycologics Inc., EE.UU.)

Se emplearon 20 sueros de pacientes conservados en la seroteca del LM-IPK. De estos, diez se diagnosticaron como positivos a histoplasmosis con el estuche comercial, dos positivos a aspergilosis mediante un ensayo de ELISA y el resto, negativos a ambas micosis.

## II. RESULTADOS

### I.- VERIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PUREZA DEL AISLADO CONSERVADO

Los cultivos frescos del aislado conservado de *H. capsulatum* exhibieron colonias algodonosas de color blanco sobre la superficie del medio que posteriormente se tornaron de color canela a pardo oscuro a las cuatro semanas de incubación. Microscópicamente se mostraron en las preparaciones en fresco con lactofenol azul de algodón hifas hialinas, delgadas, con macroconidios de aspecto tuberculado en conidióforos cortos y microconidios de forma redonda y piriforme que permitieron verificar la pureza y viabilidad de los tubos inoculados (fig. 1).



Figura 1. Macroscopía (a la izquierda) y microscopía (a la derecha) de cultivos de *H. capsulatum* en los medios agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol y cicloheximida.

## II.- RESIEMBRAS Y OBTENCIÓN DE CULTIVOS EN FASE FILAMENTOSA

Entre los medios de cultivo existieron diferencias en cuanto a la cantidad de biomasa desarrollada y el tiempo que tomó su formación. El crecimiento en el MSa fue mejor en comparación con el MSm. En este se encontró, de un modo acelerado, un número mayor de perlas dispersas por todo el caldo al quinto día de incubación; en tanto, el desarrollo en condiciones estáticas fue paulatino, se notó un crecimiento característico solo después de las dos semanas. Ambos medios de cultivo mostraron, de igual modo, un micelio blanco de aspecto algodonoso por toda su superficie. El color del MSm varió tornándose más oscuro y prevaleció en este la forma semisumergida del crecimiento (fig. 2).



Figura 2. Crecimiento de *H. capsulatum* en caldo Sabouraud glucosado (MSa), a la izquierda y medio de Smith (MSm), a la derecha.

## III.- PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO METABÓLICO OBTENIDO

La medición de las concentraciones de proteínas secretadas en los medios MSm y MSa permitió evaluar la cinética de los extractos proteicos que contienen el antígeno metabólico de *H. capsulatum*. Las concentraciones proteicas fueron mayores con el MSa, en ambas condiciones. La cuantía menor (0,46 mg/mL) se obtuvo en el MSm agitado durante las etapas iniciales del

crecimiento fúngico, sin embargo, este parámetro aumentó cuando se emplearon las condiciones de cultivo estático. El análisis comparativo reveló diferencias estadísticamente significativas entre las variantes de condiciones y medios de cultivo empleados en estudio.

Pocas publicaciones existen hasta la fecha respecto al crecimiento y la producción de antígeno metabólico de *H. capsulatum* en diferentes medios y condiciones de cultivo. No obstante, los estudios reflejan la influencia de factores como la temperatura, tiempo de incubación, pH y cambios en el medio de cultivo y tipo de cepa de *H. capsulatum*.

Los resultados expuestos avalan que las dos condiciones de cultivo que se emplearon incrementan la concentración de proteínas del antígeno metabólico en dependencia del medio de cultivo que se seleccione.

En la tabla 1 se resumen los resultados respecto a volumen, concentración y cantidad de proteínas de la etapa final del proceso de obtención del antígeno metabólico de *H. capsulatum*.

Tabla 1. Parámetros cuantitativos de rendimiento de los antígenos metabólicos de *H. capsulatum* obtenidos en dos medios de cultivo: medio de Smith (MSm) y caldo Sabouraud glucosado (MSa) bajo diferentes condiciones de cultivo: agitación y estático.

Condiciones de cultivo	Medios de cultivo	Volumen final (mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Cantidad de proteínas (mg)
Agitación	MSm	7,3	0,5	3,7
	MSa	8,5	5,0	42,5
Estática	MSm	5,0	2,9	14,5
	MSa	3,5	12,2	42,7

Los datos que se muestran en la tabla confirman que el MSa favorece la producción de antígeno metabólico con respecto al MSm. Las cantidades proteicas presentes en este medio, bajo las dos condiciones de cultivo en estudio, fueron similares; sin embargo, el MSm tuvo un incremento de cinco veces en las condiciones estáticas.

El perfil electroforético del antígeno metabólico reveló múltiples bandas de proteínas, en comparación con los antígenos controles (fig. 3). Los medios de cultivo no interfirieron en la corrida electroforética ni en los resultados de la misma. Las muestras tuvieron un patrón proteico con un promedio de 17 bandas, de ellas sólo seis fueron comunes en los diferentes perfiles correspondientes a las variantes en estudio. Sus tallas moleculares relativas se correspondieron con los tamaños: 119, 107, 74, 35, 32 y 20 kDa. También, se observó la presencia de bandas tenues por encima de 260 kDa.

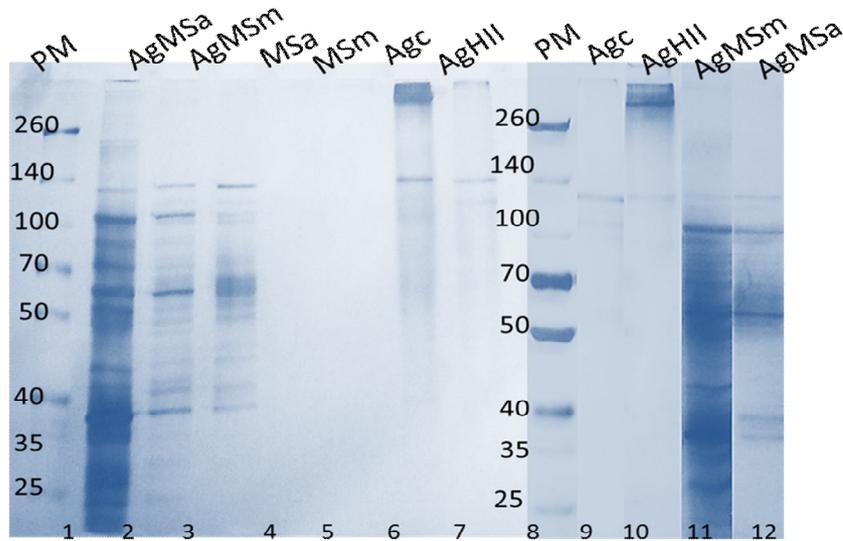


Figura 3. Perfil de expresión del antígeno metabólico (200  $\mu\text{g/ml}$ ) de *H. capsulatum* en medio MSa (medio Sabouraud) y MSm (medio Smith). Carril 1 y 8: Patrón de Peso Molecular. Carril 2: antígeno metabólico obtenido en MSa y agitación. Carril 3: antígeno metabólico obtenido en MSm y agitación. Carril 4: MSa. Carril 5: MSm. Carril 6 y 9: antígeno comercial (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Carril 7 y 10: antígeno HII (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Carril 11: antígeno metabólico obtenido en MSm estático. Carril 12: antígeno metabólico obtenido en MSa estático. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%, condiciones no reductoras, tinción con plata.

Los antígenos H y M de *H. capsulatum* se describen con pesos moleculares relativos que van desde 108-120 kDa y de 70-94 kDa, respectivamente (6). En la electroforesis en gel de poliacrilamida se observaron bandas correspondientes a las tallas moleculares de 117 y 74 kDa. La detección de bandas electroforéticas sugerentes de la presencia de los antígenos H y M apunta a que las condiciones de ensayo, así como los medios de cultivo, favorecieron su expresión en el antígeno metabólico.

Los perfiles de proteínas obtenidos son similares a los reportes bibliográficos a pesar de la variabilidad en la expresión de proteínas, cuyas diferencias existentes pueden deberse a la variación genética que presenta *H. capsulatum* (7).

#### IV.- COMPROBACIÓN DE LA PRESENCIA DE BANDAS M Y H DEL REACTIVO OBTENIDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE (IDD)

La inmunorreactividad del antígeno metabólico frente a los reactivos del estuche comercial se muestran en la figura 4. Todos los antígenos que se produjeron en agitación mostraron en el gel de agarosa un halo próximo al suero control. Estas bandas se corresponden con la reacción de identi-

dad total con el antígeno H. Una segunda banda (M), cercana a los antígenos provenientes del MSm se observó de forma tenue y casi imperceptible en los pocillos correspondientes al MSa.

En la parte izquierda, donde se exponen los antígenos metabólicos en condiciones estáticas, las dos bandas (M y H) se encontraron presentes en todos los evaluados. Los controles evidenciaron la presencia de las dos precipitinas, en cada uno de los casos.

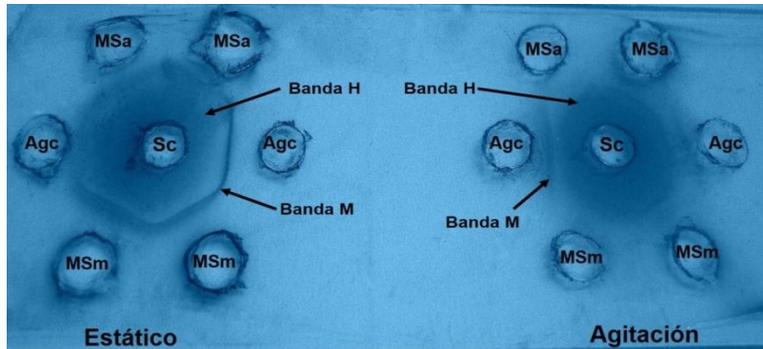


Figura 4. Prueba de inmunodifusión doble con los antígenos metabólicos que se obtuvieron en medio de Smith (MSm) y caldo Sabouraud glucosado (MSa) bajo condiciones de agitación continua y estática. Antígeno control (Agc) y suero control (Sc).

De los cultivos en agitación solo el antígeno metabólico que se obtuvo en el MSm demostró que presentaba los materiales de interés en grandes cantidades, a pesar de que tuvo una medición de proteínas presentes en el medio muy baja. Los provenientes del cultivo estático demostraron que presentaban las proteínas diana en altas concentraciones por la presencia en la lámina de agar de franjas definidas con gran intensidad.

Las precipitinas correspondientes a los antígenos H y M, son la base de las pruebas serológicas de detección de anticuerpos, de ahí la importancia de obtener antígenos metabólicos que presenten estos componentes (8). Esta utilidad se corrobora al enfrentar los antígenos metabólicos producidos a sueros problemáticos. En el estudio, se detectó la presencia de la banda M, al ensayar los diez sueros de pacientes positivos a histoplasmosis. No se observaron reacciones cruzadas con los sueros provenientes de casos clínicos con aspergilosis. Ninguna reacción de identidad se constató con los sueros de pacientes negativos a *H. capsulatum*.

## CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo estático en medio de Smith de la fase filamentosa de *H. capsulatum* favorecen la producción de un antígeno metabólico funcional y de alto contenido proteico. En el perfil proteico del mismo predominan las proteínas glicosiladas de alto peso molecular que se corresponden por su talla con los antígenos H y M de este patógeno fúngico, las cuales son por excelencia marcadores del diagnóstico serológico de la histoplasmosis. No por último menos importante, es de

señalar que la especificidad en el reconocimiento por los sueros de pacientes con esta micosis, demuestra la capacidad antigénica de estas proteínas y su utilidad en su serodiagnóstico.

## REFERENCIAS

1. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada. Histoplasmosis*. 5ta ed: Mc Graw Hill; 2014. p. 209-20.
2. Benedict K, Mody Rajal K. Epidemiology of Histoplasmosis Outbreaks, United States, 1938–2013. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22(3):370-8.
3. Fernández CM, Illnait MT, Martínez GF, Perurena MR, Monroy EX. Una actualización acerca de histoplasmosis. *Rev Cubana Med Trop* 2011;63(3):189-205.
4. DeHoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MG. *Atlas of clinical fungi*. 2nd ed: Baarn/Reus: Centra albure voor Schimmel cultures/ Universitat Rovirai Virgili; 2013.
5. Guimaraes AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of histoplasmosis. *Braz J Microbiol* 37(1). 2006:1–13.
6. Vite-Garin T, Estrada-Barcenas DA, Cifuentes J, Taylor ML. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: an overview. *Rev Iberoam Micol*. 2014 Jan-Mar;31(1):11-5.
7. Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF, Hage C. Histoplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2016;30(1):207-27.