

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Evaluación del polisacárido capsular tipo específico de *Cryptococcus neoformans* como inmunógeno y antígeno control positivo

Lic. Gilda T. Toraño Peraza,<sup>1</sup> Lic. Werner Rodríguez Acebo<sup>2</sup> y Dr. Gerardo Martínez Machín<sup>3</sup>

### RESUMEN

Se obtuvo el polisacárido capsular tipo específico de una cepa autóctona de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* con el empleo del método de precipitación selectiva con bromuro de hexadeciltrimetilamonio. El polisacárido capsular se acopló a eritrocitos de carnero y se utilizó como inmunógeno en conejos, se obtuvieron títulos de anticuerpos de hasta 1:32. Fueron evaluadas diluciones dobles seriadas del polisacárido capsular como antígeno control positivo mediante las técnicas de contrainmunolectroforesis, látex y ELISA, y demostraron actividad biológica.

**Descriptores DeCS:** CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/immunología; POLISACARIDOS/immunología; ANTICUERPOS FUNGALES; ANTIGENOS FUNGALES.

Con el rápido incremento de los casos de sida en los últimos años, algunas micosis han aumentado de forma dramática su frecuencia, particularmente aquéllas que son contrarrestadas por mecanismos de defensa mediados por células. Dentro de éstas, la criptococosis posee un lugar destacado.<sup>1,2</sup>

A pesar de que miles de individuos se infectan cada año en todo el mundo, el curso inaparente de la infección imposibilita determinar su incidencia en la población normal. Se conoce que en Estados Unidos se presenta una incidencia del 2 al 9 %, en África del 6 al 13 % y en Haití del 5 al 19 %.

En pacientes con sida se sabe que la enfermedad criptocócica se presenta con alta frecuencia (10 %), emergiendo como una de las principales enfermedades oportunistas.<sup>3</sup> En Cuba, un estudio realizado por el grupo de trabajo del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), demostró que la

incidencia de la criptococosis en pacientes con sida era del 8 % (Martínez GM, observaciones inéditas).

El polisacárido capsular (PSC) de *Cryptococcus neoformans* es el factor de virulencia esencial en el desarrollo de la enfermedad criptocócica, en el transcurso de la cual es liberado a los fluidos corporales.<sup>4</sup> Su detección mediante pruebas serológicas constituye un importante procedimiento para el diagnóstico y pronóstico de la infección.

Tanto en el hombre como en modelos experimentales con animales, el PSC resulta ser un inmunógeno pobre, por lo que la producción de anticuerpos específicos ocurre sólo en algunos casos y los títulos son usualmente bajos.<sup>5</sup>

Con el objetivo de obtener anticuerpos anti-*C. neoformans* útiles para diagnóstico rápido, nos propusimos al inicio la obtención del PSC. Empleando el método de precipitación selectiva con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) logramos recobrar 11 mg

<sup>1</sup> Master en Bacteriología-Micología. Licenciada en Microbiología.

<sup>2</sup> Licenciado en Microbiología.

<sup>3</sup> Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado

de polisacárido por cada litro de cultivo de una cepa autóctona de *C. neoformans* var. *neoformans*.<sup>6</sup> Este valor fue estimado por el método fenol-sulfúrico y por el método de determinación del ácido D-glucurónico.<sup>7,8</sup>

El polisacárido así obtenido fue acoplado a eritrocitos de carnero para aumentar su carácter inmunogénico y se utilizó en un esquema de inmunización desarrollado en conejos albinos de 3 kg de peso.<sup>9</sup> Las dosis se aplicaron por vía endovenosa y en forma descendente, con el propósito de obtener anticuerpos más específicos y de mayor afinidad con intervalos entre dosis de 4 d y por espacio de 1 mes (5 dosis de 4 mL, 1 dosis de 2 mL y otra de 1 mL).<sup>10</sup> Los sueros obtenidos fueron evaluados por contraelectroforesis (CIE) frente al PSC.

El empleo de este método de inmunización, mucho más sencillo que los utilizados hasta el momento en el Laboratorio de Micología del IPK,<sup>11</sup> con la variante introducida por nosotros, que consiste en administrar el inmunógeno en dosis cuyos volúmenes descienden, nos permitió alcanzar títulos de anticuerpos de hasta 1:32 por CIE.

Esta forma novedosa de introducir el inmunógeno se emplea con el objetivo de obtener anticuerpos de mayor afinidad y especificidad. Altas concentraciones del inmunógeno en ausencia de anticuerpos interactúan con células B de una amplia gama de afinidad y sólo aquéllas con receptores de alta afinidad son señalizadas con mayor eficiencia por las células dendríticas foliculares en los centros germinales. En la reintroducción del antígeno los anticuerpos producidos en la respuesta primaria compiten por la unión con los receptores de las células B y sólo aquéllas capaces de unirse suficientemente bien para competir con los anticuerpos existentes, podrán unirse al antígeno y contribuir a la respuesta. En la respuesta terciaria, el mismo mecanismo selecciona los anticuerpos que permanecen con la más alta afinidad.<sup>10</sup>

Al enfrentar los sueros obtenidos a los eritrocitos de carnero no hubo reacción antígeno-anticuerpo, lo que indica que la respuesta inmunológica obtenida fue contra el PSC y no contra el amplificador inmunológico.

Consideramos que un segundo ciclo de inmunizaciones o la prolongación del esquema por algunas semanas, manteniendo la última dosis (1 mL), podría conducirnos a títulos superiores de anticuerpos o a un incremento de su afinidad, lo que redundará en el fortalecimiento de la afinidad de los sistemas de diagnóstico (látex y ELISA) de que dispone el Laboratorio de Micología del IPK.

Las diluciones dobles seriadas del PSC obtenidas, fueron evaluadas por las técnicas de CIE, látex y ELISA, y demostraron actividad biológica por encima de la

dilución 1:1 024 en todos los casos. Podría por tanto, resultar un excelente antígeno control positivo para tales sistemas y permitiría cuantificar los niveles de anticuerpos que son capaces de detectar.

## SUMMARY

The specific type of capsular polysaccharide of an autoctonous strain of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* was obtained by using the method of selective precipitation with hexadimethrine bromide. The capsular polysaccharide was matched to lamb's erythrocytes and it was used as an immunogen in rabbits. Antibody titres of up to 1:32 were attained. Double serial dilutions of the capsular polysaccharide were evaluated as positive control antigen by contraimmunoelectrophoresis, latex and ELISA techniques, showing biological activity.

**Subject headings:** CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS/immunology; POLYSACCHARIDES/immunology; ANTIBODIES, FUNGAL; ANTIGENS, FUNGAL.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diamond RN. The growing problem of mycosis in patients with HIV. *Rev Infect Dis* 1991;13(3):480-6.
2. Stansell JD. Fungal disease in HIV infected persons: Cryptococcosis, Histoplasmosis and Coccidioidomycosis. *J Thorac Imaging* 1991;(4):28-30.
3. Chuck S, Sanse M. Infections by *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med* 1989;321:794-9.
4. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Trinler MJ, Jacobson ES. Regulation of *Cryptococcus* capsular polysaccharide by iron. *J Infect Dis* 1993;167(1):186-8.
5. Kozel TR. Activation of the complement system by the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Curr Trop Med Mycol* 1993;5:1-26.
6. Cherniak R, Morris LC, Anderson BC, Meyer SA. Facilitated isolation, purification and analysis of glucoroxilomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1991;59(1):59-64.
7. Dubois M, Halminton KA, Rebers PA, Smith P. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* 1956;167:350-6.
8. Dishe Z. Color reactions of sugar. En: *Methods of carbohydrates chemistry*. Whistler and Wolfrom. New York: Academic, 1962;vol 1:490-513.
9. Ecker TF, Kozel TR. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infec Immunol* 1987;55(8):1895-9.
10. Janeway CA, Travers P. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. New York: Garland Publishig, 1994: 43-6.
11. Álvarez PL, Martínez GM, Fernández CA, Llop AH. Diagnóstico de criptococosis. Comparación de 2 sistemas de látex para la detección de antígenos. *Rev Cubana Med Trop* 1992;44(1):29-33.

Recibido: 16 de abril de 1997. Aprobado: 12 de diciembre de 1997.  
Lic. *Gilda T. Toraño Peraza*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.