

CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA

## Obtención, caracterización de antígenos y evaluación de la técnica de inmunotransferencia para la detección de candidiasis sistémica

Dra. Elba Álvarez,<sup>1</sup> Lic. Beatriz Rodríguez,<sup>2</sup> Lic. Ileana Rosado<sup>2</sup> y Dra. Marisol González<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se evaluó un medio de cultivo que contenía peptona, glucosa, extracto de levadura y suero para favorecer el desarrollo de la fase micelial en *Candida albicans* y se comparó con el medio comercial TC 199; no se encontró diferencia significativa entre ellos. Se obtuvieron antígenos somáticos de la fase levaduriforme y micelial, que se caracterizaron por PAGE-SDS; en ambos antígenos se expresaron las proteínas reportadas como de alto valor diagnóstico. Mediante inmunotransferencia, se determinó que las proteínas antigénicas predominantes en la fase micelial tenían pesos moleculares de 19, 21, 27 y 58 kDa. Se estandarizó la inmunotransferencia, para la detección de anticuerpos en pacientes con candidiasis sistémica, por esta técnica se evaluaron 24 sueros positivos y fue comparada con la técnica ELISA, que resultó ser más sensible y menos específica. Las proteínas más reconocidas fueron las de 136 y 21 kDa y el complejo de 42 a 45 kDa.

**Descriptores DeCS:** ANTIGENOS; TEST DE ELISA/métodos; CANDIDA ALBICANS; MEDIOS DE CULTIVO.

La candidiasis sistémica ocupa hoy día uno de los primeros lugares en la micología médica y las enfermedades infecciosas.<sup>1</sup> Su frecuencia ha aumentado en la última década, en muchos casos se observan cuadros clínicos de extrema gravedad en los que un diagnóstico tardío puede significar un desenlace fatal.<sup>2,3</sup> El diagnóstico de las candidiasis profundas es extremadamente difícil, por la no existencia de signos clínicos específicos de la enfermedad, además el acceso a focos profundos donde se pueda aislar y evidenciar la levadura es prácticamente imposible por métodos no agresivos.<sup>4</sup>

Por estos motivos en los últimos años se ha trabajado en la búsqueda de métodos diagnósticos rápidos fundamentalmente serológicos, que faciliten el diagnóstico de la enfermedad, y además den una orientación rápida al clínico para poder instaurar el tratamiento adecuado, pues los métodos tradicionales de cultivos demoran como mínimo 7 d.

En el presente trabajo se propusieron los objetivos siguientes: Evaluación de un medio de

cultivo para el desarrollo de la fase micelial de *C. albicans*. Preparación de antígenos somáticos en fase levaduriforme y micelial de *C. albicans*, determinación de las proteínas específicas de cada fase, el montaje y optimización de inmunotransferencia y su comparación con la prueba ELISA para la detección de anticuerpos en pacientes con candidiasis sistémica, con la utilización del antígeno seleccionado.

### MÉTODOS

#### PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTÍGENOS

La masa celular para la preparación de los antígenos somáticos se obtuvo por crecimiento de la cepa de *C. albicans* 3153 procedente del *Mycological Reference Laboratory UK*, en medio que contenía peptona, glucosa y extracto de

<sup>1</sup> Investigadora Agregada.

<sup>2</sup> Licenciada en Bioquímica.

levadura (PGY). Para el desarrollo de la fase micelial se utilizó un medio que contenía estos mismos componentes a concentraciones más bajas, suplementado con suero equino 30 % y el medio comercial TC 199. Para la comparación de estos medios se realizó el conteo de tubo germinativo mediante cámara de Neubauer y la prueba estadística fue una prueba *t* de *Student* no pareado.

De cada una de estas masas celulares se obtuvo antígeno somático mediante disrupción celular en un homogenizador Brown y ultracentrifugación (Álvarez E, González M, Verdecia I, Valladares D. ELISA para la detección de anticuerpos contra *Candida albicans*. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. Octubre 27-29, 1993. La Habana, Cuba). La caracterización cualitativa de los antígenos se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 10 % con SDS (PAGE-SDS).<sup>5</sup> Los antígenos se trabajaron a una concentración de 1 mg/mL de proteína determinada por el método de Lowry 1951.<sup>6</sup> Como marcador de peso molecular se utilizó el patrón comercial de la *Pharmacia* con un rango de 14,4 a 94 kDa. La determinación de los pesos moleculares (PM) se realizó por el método de los mínimos cuadrados con la utilización del sistema automatizado *bandas para el análisis*.<sup>7</sup>

La determinación de las proteínas antigénicas específicas de la fase micelial, mediante inmunotransferencia se realizó con 3 inmunosueros de conejos, antes y después de la adsorción con células levaduriformes según técnica descrita.<sup>4</sup>

## EVALUACIÓN

Los antígenos obtenidos fueron evaluados por las técnicas siguientes:

*Contrainmunolectroforesis*: Con inmunosueros de conejos, diluidos desde 1/2 hasta 1/32, esta técnica se realizó con un sistema discontinuo tris pH 7,2 en las láminas y PBS pH 7,4 en la cámara.

*Inmunotransferencia*: La primera etapa de esta técnica es la electroforesis en geles de poliacrilamida del antígeno somático micelial de *C. albicans*, obtenido en medio PGY suplementado con suero; se evaluaron concentraciones de antígenos de 150, 200, 250 y 300 µg/mL.

La segunda etapa es la transferencia de las proteínas a un papel de nitrocelulosa según la técnica de *Towbin*.<sup>5</sup> Se utilizó una cubeta de transferencia BioRad referencia 170-3910 (California, EE.UU.). La corrida se realizó a una corriente constante de 400 mA y 100 V durante 2 h.

La última etapa es el ensayo de inmunoenzima que se realizó sobre las tiras de nitrocelulosa. Para la selección de la dilución de las muestras se trabajaron 5 sueros humanos positivos confirmados por cultivo microbiológico y 5 sueros negativos en diluciones de 1/10, 1/20, 1/100, 1/200. El conjugado utilizado fue anti-IgG humana marcado con peroxidasa y se probaron diluciones de 1/250 y 1/500, el sustrato utilizado fue diaminobencidina; finalmente se leyó la reacción a simple vista y se registraron el número y la disposición de las bandas, se determinaron los pesos moleculares por comparación con el patrón mediante un programa matemático *Bandas*.<sup>7</sup>

La evaluación de la técnica después de la estandarización se realizó con 24 sueros positivos a candidiasis sistémica, también confirmados por cultivo y 45 sueros negativos, que también se trabajaron por la técnica de ELISA. Los parámetros de calidad de estas 2 técnicas se midieron según fórmula descrita.<sup>8</sup>

## RESULTADOS

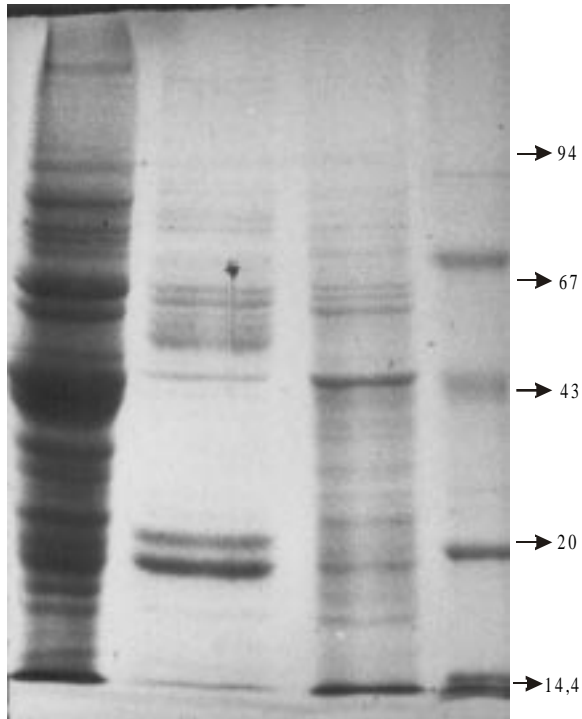
El medio PGY suplementado con suero igualó al medio comercial TC 199 en cuanto a la formación de micelio. Según el análisis estadístico no existió diferencia significativa, como puede verse en la tabla y se detectaron bandas de proteínas de alto peso molecular más de 100 kDa y las de 45 a 48 kDa (fig. 1); la proteína de 47 kDa no se expresó en el antígeno obtenido en el medio TC 199.

El antígeno levaduriforme, obtenido en medio PGY no mostró grandes diferencias en comparación con los antígenos miceliares en cuanto al número de bandas de proteínas y pesos moleculares de estas (fig. 1).

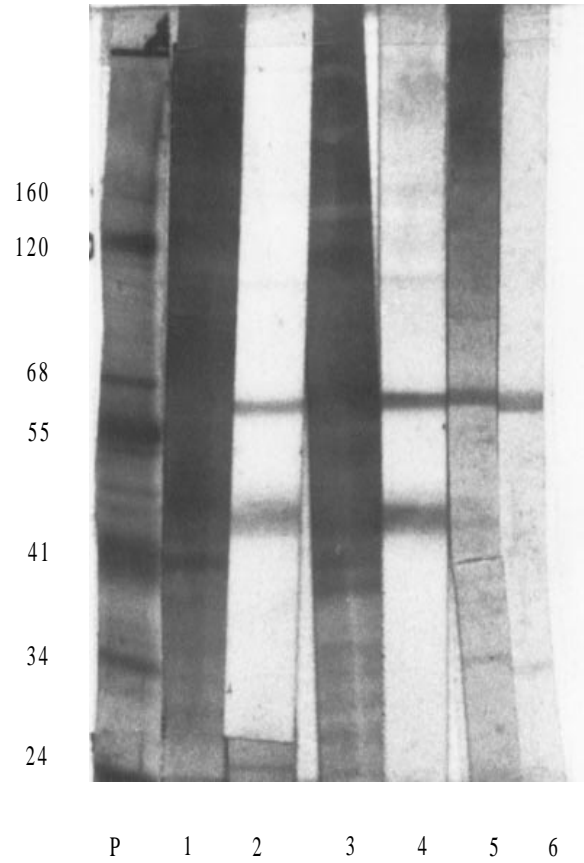
La determinación mediante inmunotransferencia de las bandas proteicas específicas de la fase micelial en los 3 inmunosueros de conejos, demostró que antes de la adsorción en estos inmunosueros se observaron de 5 a 12 bandas y después de la adsorción solo se observaron 2 a 4 líneas que tenían un peso molecular entre 22 y 58 kDa; las bandas de alto peso molecular demostraron ser comunes para ambas fases, pues los anticuerpos contra estas proteínas quedaron adsorbidos a la fase levaduriforme (fig. 2). La concentración óptima del antígeno para realizar la transferencia fue 200 µg, la dilución del suero seleccionada fue 1/100; en diluciones más bajas se observaron falsos positivos y con diluciones mayores se dejaron de observar bandas de valor diagnóstico en sueros positivos. Los pesos moleculares de las bandas reconocidas por los sueros estuvieron entre 21 y 136 kDa (fig. 3). La banda más reconocida fue la de 136 kDa.

**TABLA.** Prueba t de Student no pareado aplicada a los porcentajes de tubos germinativos en la comparación de los medios PGY + suero y TC 199

Medio	N	Media ± error
PGY + suero	4	91,99 ± 0,687 a
TC 199	4	93,02 ± 2,73 a

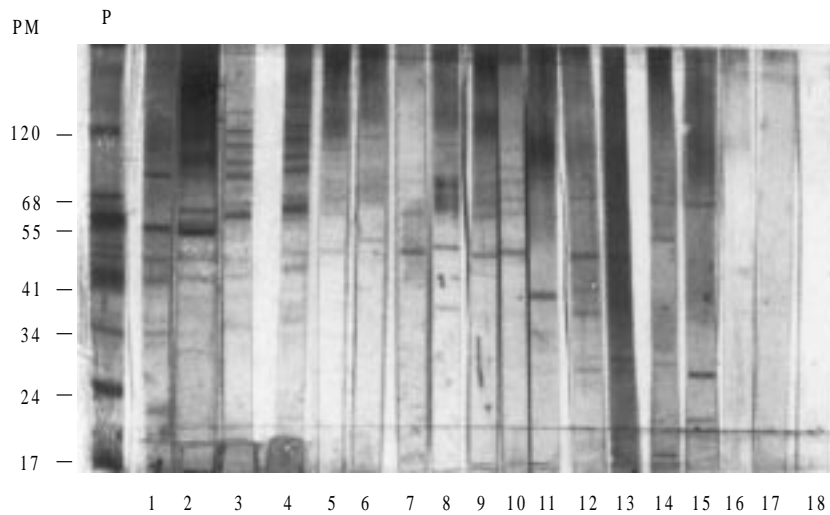


**Fig. 1.** PAGE-SDS del antígeno de *C. albicans* obtenido en diferentes medios de cultivo. De izquierda a derecha: PGY, PGY +suero, TC 199 y patrón de PM.



P = Patrón  
1, 3, 5 = Sueros sin absorber.  
2, 4, 6 = Sueros absorbidos con la fase levaduriforme.

**Fig. 2.** Inmunotransferencia realizada a los inmunosueros de conejos frente a antígeno somático micelial de *C. albicans*.



P= patrón.  
1 al 15 = Sueros positivos a candidiasis sistémica.  
16 al 18 = Sueros negativos.

**Fig. 3.** Inmunotransferencia para la detección de anticuerpos en sueros de pacientes.

## DISCUSIÓN

El trabajo con antígenos estandarizados para la detección de candidiasis es uno de los aspectos más importantes en el desarrollo, elaboración y eficacia de los medios diagnósticos y resulta difícil de lograr por la gran variabilidad que presenta *C. albicans* por causa de factores como cepas, serotipos, estados morfológicos y por la diferencia de métodos y medios de cultivo utilizados para obtener la biomasa. En el presente trabajo se observó que en el medio PGY suplementado con suero se expresaron proteínas reportadas como de alto valor diagnóstico incluida la proteína 47 kDa, mientras que en el medio sintético TC 199 esta proteína no se expresó. Se ha reportado que proteínas de *C. albicans* pueden desaparecer por la siembra en medios sintéticos y esto no ocurre cuando los aminoácidos suministrados al medio provienen de una fuente natural.<sup>9-12</sup>

Mediante inmunotransferencia se evidenció que las proteínas antigénicas de alto peso molecular fueron comunes para la fase micelial y levaduriforme de *C. albicans*, esto coincide con los resultados obtenidos por Regulez y otros,<sup>13</sup> pero no con los de Quindós y otros.<sup>4</sup> En cuanto a este aspecto la mayor diferencia no está en el peso molecular sino en la localización de estas proteínas en el nivel de pared en cada una de estas fases.<sup>13-15</sup>

La banda de 136 kDa no fue indicativa de candidiasis sistémica pues fue reconocida por 2 sueros negativos a candidiasis sistémica y por la mayoría de los sueros procedentes de pacientes con candidiasis vaginal; mientras que las proteínas de 68, 45, 34 y 35 kDa solo se observaron en los sueros de pacientes con candidiasis sistémica. Porsius y otros<sup>16</sup> informaron la presencia de anticuerpos contra estas mismas proteínas en pacientes con candidiasis invasiva. En la evaluación de la inmunotransferencia como técnica diagnóstica se han valorado varios criterios para aumentar su especificidad, por ejemplo el planteado por Alias, en su tesis de doctora en Medicina y Cirugía, que considera los casos positivos cuando reconocen más de 3 bandas independientemente de los pesos moleculares. Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, para aumentar la especificidad de esta técnica se debe adoptar como criterio de positividad la presencia de más de 4 bandas y el

reconocimiento de las proteínas de 68 a 45 kDa como indicadores de candidiasis sistémica.

La prueba ELISA resultó ser comparativamente una técnica más sensible que la inmunotransferencia, pero menos específica. La inmunotransferencia es una prueba más cualitativa que el ELISA pues permite detectar frente a qué fracciones de proteínas reaccionan los anticuerpos séricos, pero es bastante cara y trabajosa por lo que no se recomienda para el diagnóstico de rutina; sin embargo es de gran utilidad como técnica corroborativa en casos complejos que así lo requieran.

## SUMMARY

A culture media containing peptone, glucose, yeast extract and serum was evaluated to promote the development of the mycelium formation in *Candida albicans* and it was compared with the commercial media Tc 199. No significant difference was found between them. Somatic antigens characterized by PAGE-SDS were obtained from yeast and mycelial forms. Proteins reported as having high diagnostic value were expressed in both antigens. It was determined by immunotransference that the antigenic proteins predominating in the mycelium formation had molecular weights of 19, 21, 27 and 57 Kda. The immunotransference was standardized for detecting antibodies in patients with systemic candidiasis. 24 positive sera were evaluated by this technique and it was compared with the ELISA technique, which proved to be more sensitive and less specific. The most recognized proteins were those of 136 and 21 Kda and the complex from 42 to 45 Kda.

**Subject headings:** ANTIGENS; ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY/methods; CANDIDA ALBICANS; CULTURE MEDIA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Soub H, Estinoso W. Hospital acquired candidaemia. J Hosp Infect 1997;35(2):141-7.
2. Tacconelli E, Tumbarello M, Pittiruti M, Leone F. Central venous catheter-related sepsis in a cohort of 366 hospitalised patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997;16(3):203-9.
3. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method J Clin Microbiol 1997;35(6):1454-9.
4. Quindós G, Pontón J, Cisterna R. Detection of antibodies to *C. albicans* germ tube in the diagnosis of systemic candidiasis. Eur J Clin Microbiol 1987;6:142-6.
5. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 1979;76:4350-4.
6. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr KL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.

7. ISACA 1994 Bandas. Grupo de cibernética. Centro de Bioplantas.
8. Argote E, López G. Pautas para evaluar la calidad de los juegos diagnósticos basados en la técnica ELISA. Rev Cubana Cienc Vet 1995;24(2):21-3.
9. Dahle UR, Olsen I. Anaerobiosis and serum promote mycelium formation by *Candida albicans* in colonies on TSBV agar. Acta Odontol Scand 1991;49:41-5.
10. Odds FC, Rinaldi MG, Fotergill A. *Candida* and Toluropsis, a blindided evaluation of use of pseuhypha formation as basis for identification of medically important yeast. J Clin Microbiol 1997;35(1):312-6.
11. Lavallo R, Bromuro C, Ranucci L, Muller HM, Crisanti A, Cassone A. Molecular cloning and expression of a 70-kilodalton heat shock protein of *Candida albicans*. Infect Immunol 1995;63(10):4039-45.
12. Torosantucci A, Gómez MJ, Bromuro C, Casalnuovo I, Cassone A. Biochemical and antigenic characterization of mannoprotein constituents released from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. J Med Vet Mycol 1991; 29(6):161-72.
13. Regulez P, Arilla MC, Bikandi J, Quindos G, Cisterna R, Pontón J, *et al.* Identification of antigens reacting with anti-*Candida albicans* germ tube antibodies. Eur J Epidemiolo 1992;8(3): 356-61.
14. Pontón J, Marot-Leblond A, Ezkurra PA, Barturen B, Robert R, Senet JM. 1993 Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies.
15. Chaturvedi VP, Vanegas R, Chaffin WL. Coordination of germ tube formation and surface antigen expression in *Candida albicans*. Fems Microbiol Lett 1994;124(1):99-105.
16. Porsius JC, Vliet HJ, Zeijl JH, Goessens WH. Detection of antibody response in immunocompetent patients with systemic candidiasis. Eur J Clin Microbiol Infect 1990; 9:352-5.

Recibido: 6 de abril de 1999. Aprobado: 31 de enero del 2000.

Dra. *Elba Álvarez*. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Carretera de Tapaste, San José de Las Lajas, La Habana, Cuba.