

Detección de infección por *Coccidioides immitis* en zonas del estado de Coahuila, México

R. MONDRAGÓN-GONZÁLEZ^{1*}, L.J. MÉNDEZ-TOVAR¹, E. BERNAL-VÁZQUEZ², F. HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ³, R. LÓPEZ-MARTÍNEZ³, P. MANZANO-GAYOSSO³, C. RÍOS-ROSAS⁴, C. CONTRERAS-PÉREZ⁴, A.E. ANIDES-FONSECA⁵

¹Unidad de Investigación Médica en Dermatología y Micología "Dr. Macotela Ruiz", Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; ²Coordinación de Salud Comunitaria, División de Información, Evaluación y Desarrollo, IMSS; ³Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM;

⁴Laboratorio de Micología, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA; ⁵Servicio de Dermatología y Micología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México.

*Correspondencia. E-mail: rafmg@yahoo.com; rafmg@hotmail.com

RESUMEN

La coccidioidomicosis es una micosis inicialmente pulmonar causada por *Coccidioides immitis*; puede diseminarse principalmente a sistema nervioso central, huesos y piel. En México se desconoce la frecuencia exacta de esta enfermedad. Nuestro objetivo fue determinar, por intradermorreacción y por serología, los casos de infección por *C. immitis* en 12 comunidades (10 rurales y dos urbanas) atendidas en el Hospital Rural N° 79 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) del estado de Coahuila, México. Se estudiaron 668 individuos adultos de ambos sexos; se les aplicó 0,1 ml de coccidioidina por vía intradérmica; después de 72 hs. se midió el diámetro de induración. Fueron seleccionados 180 individuos y a partir del suero se determinaron los niveles de inmunoglobulinas anti-*C. immitis* por ELISA. Fueron positivos a la coccidioidina 621 sujetos (93%), frecuencia mucho mayor a la reportada previamente en Coahuila. De los 180 sueros estudiados los promedios de densidad óptica (DO) fueron: IgG1, 1,55; IgG2, 0,94; IgG total, 0,33; IgG3, 0,29; IgG4, 0,27; IgM, 0,08. Los valores de IgG1, IgG2 e IgM comparados con las otras inmunoglobulinas fueron estadísticamente significativos. Los valores de IgG1 e IgG2 sugieren contacto frecuente con los antígenos e incluso probables casos de enfermedad no diagnosticada.

Palabras clave: coccidioidomicosis, intradermorreacción (IDR), inmunoglobulinas

SUMMARY

Detection of *Coccidioides immitis* infection in Coahuila, Mexico. Coccidioidomycosis is a mycosis firstly pulmonary caused by *Coccidioides immitis*; it can be disseminated to central nervous system, bones and skin, principally. In Mexico, the real frequency of the disease is unknown. The aim of this work was to determine, by skin test and by serology, the infection cases by *C. immitis* in twelve communities (10 rural and two urban), attended in the Hospital Rural N° 79 at the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) from the Coahuila State, Mexico. Six hundred and sixty eight adult individuals of both sexes were studied, to whom 0.1 ml of coccidioidin by intradermal route was applied; 72 h after, the induration diameter was measured. One hundred eighty individuals were selected and seric anti-*C. immitis* immunoglobulins levels were determined by ELISA. Six hundred twenty one individuals (93%) were positive to coccidioidin, the frequency was much higher than that previously reported in Coahuila. From 180 sera studied, the means of optical density (OD) were: IgG1, 1.55; IgG2, 0.94; total IgG, 0.33; IgG3, 0.29; IgG4, 0.27; IgM, 0.08. The values of IgG1, IgG2 and IgM compared with the other immunoglobulins were statistically significant. The high values of IgG1 and IgG2 suggest frequent contact with the antigen, and probable cases of undiagnosed disease.

Key words: coccidioidomycosis, coccidioidin skin test, immunoglobulins

INTRODUCCIÓN

La coccidioidomicosis es una micosis sistémica, endémica del norte de México y sudoeste de los Estados Unidos de América (EUA). En la mayoría de los casos, el agente *Coccidioides immitis* penetra por vía respiratoria; a partir del foco pulmonar primario y dependiendo del estado inmunológico del paciente, puede diseminarse a diversos órganos (sistema nervioso central, riñón, huesos, piel, etc.); en algunos pacientes desarrolla una enfermedad crónica e incluso causa la muerte (18).

La primera descripción de esta micosis en el mundo fue realizada en Argentina por Posadas (22). En la República Mexicana los primeros casos fueron publicados por Cicero (1) y Perrín (21) en 1932. En base a diversos estudios como los realizados en México por Madrid (13) y González-Ochoa (9) y en EUA por Dickson (2) y Pappagianis (19), quienes analizaron las condiciones ecológicas de las áreas endémicas y establecieron mapas epidemiológicos, mostraron que la frecuencia de esta infección es elevada en los estados del sudoeste de EUA y norte de la República Mexicana. Estas áreas presentan clima semidesértico

con tolvaneras frecuentes y suelos con elevadas concentraciones de sales de boro y sulfato de calcio, propicios para el desarrollo de *C. immitis* (24).

Durante muchos años fue conocido sólo un agente etiológico: *Coccidioides immitis*. Sin embargo, en 2002 Fisher *et al.* (5), basados en estudios de tipificación molecular y descripción fenotípica, demostraron la existencia de dos especies, determinando que el primer agente descrito, *C. Immitis*, se distribuye principalmente en el Valle de California en EUA, mientras que en el resto de EUA, México, Centro y Sudamérica existe otra especie denominada actualmente *C. posadasii*.

En la República Mexicana, la enfermedad no es de reporte obligatorio; por tal motivo, se desconoce el número de casos y no se tienen datos precisos de las características epidemiológicas de la infección. En el estado de Nuevo León, González-Benavides publicó una revisión de 150 casos diagnosticados entre 1978 y 1988; la mayoría de ellos eran formas subclínicas y no se estableció el diagnóstico cuando la micosis se localizaba a nivel pulmonar. Considerando que la frecuencia de diseminación extrapulmonar se presenta entre el 5 y 10% de los individuos infectados, la casuística referida indica una elevada incidencia de infecciones en las zonas endémicas (8).

Diversas investigaciones han demostrado que la coccidioidomicosis pulmonar con frecuencia es confundida con tuberculosis, ocasionando que los pacientes presenten cuadros de muy larga duración por recibir tratamientos inadecuados. Desde hace varios años se sostiene que casos erróneamente diagnosticados como tuberculosis pulmonar y que no respondieron al tratamiento antifímico, eran en realidad enfermos con micosis sistémicas, incluyendo casos de coccidioidomicosis (12).

El objetivo de esta investigación fue conocer la frecuencia de infección asintomática por *C. immitis* en la población adulta de una zona endémica de la enfermedad, representada por 12 comunidades (10 rurales y dos urbanas), que comparten condiciones ecológicas similares a las de las zonas endémicas previamente establecidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Individuos

Se estudiaron 668 personas adultas, aparentemente sanas, provenientes de 10 localidades rurales (Santo Tomás, San Miguel, El Olivo, Vizcaya, Benito Juárez, Corona, El Consuelo, Flor de Mayo, Filipinas, San Felipe) y 2 localidades urbanas (ubicadas en Matamoros), que asisten periódicamente al Hospital Rural N° 79, (HR79) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en Matamoros, estado de Coahuila. El tamaño de muestra mínimo representativo se calculó utilizando el paquete estadístico Epi-Info 6® y dio como resultado 327 sujetos mayores de 18 años. El estudio se realizó entre el 1 de marzo de 2001 y el 30 de junio de 2002. La estimación se realizó tomando como base el "Censo de las Comunidades de Acción Intensiva" donde se tiene registrada una población adulta de 8700 personas.

Intradermoreacción (IDR)

A cada participante se le aplicó por vía intradérmica, en el tercio medio de la cara anterior del antebrazo derecho, 0,1 ml

de una dilución de 1:100 de coccidioidina de la fase micelial estandarizada (Laboratorios BIRMEX®). La IDR se consideró positiva cuando el diámetro de induración después de 72 horas fue \geq 5 mm.

Estudio serológico

De los sujetos incluidos en el estudio de IDR, se seleccionaron al azar 180, a quienes se les tomó una muestra de 10 ml de sangre periférica para determinar los títulos séricos de IgM, IgG (total), IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Sueros control

Como control negativo se utilizó un *pool* formado a partir del suero de 100 personas sanas provenientes de zonas no endémicas, negativos a coccidioidina y sin datos clínicos sugestivos de micosis pulmonar. Como control positivo se empleó un *pool* de cinco sueros de pacientes con coccidioidomicosis pulmonar probada por cultivo y/o estudio histopatológico.

Las concentraciones de inmunoglobulinas se determinaron utilizando la técnica de ELISA (27) de la siguiente manera: se usó como antígeno un extracto crudo de *C. immitis* (Lote InDRE-C-2002) en placas de 96 pozos (Nalge Nunc®). Para determinar la concentración óptima del antígeno y la dilución del suero se utilizó una titulación, partiendo de una concentración de proteína (11) de 1.280 µg/ml hasta 1,25 µg/ml del antígeno y una dilución inicial del *pool* de sueros positivos o negativos de 1:25 hasta 1:1.600; en ambos se realizaron diluciones 1:2. La dilución óptima de trabajo para los sueros y el antígeno se definió como la mayor dilución de suero que presentaba la mayor densidad óptica (DO) con la menor concentración del antígeno, resultando una dilución de 1:100 para los sueros y una concentración proteica de 40 µg/ml del antígeno.

Como conjugado se utilizó un anticuerpo monoclonal murino conjugado con peroxidasa, específico para cada clase y subclases de inmunoglobulina (Lab.Zymed®) a una dilución de 1:1.000. Las placas fueron reveladas con tetrametilbenzidina (Kirkegaard & Perry, Lab.®) durante 30 min a temperatura ambiente y la reacción fue detenida con 50 µl/pozo de H₂SO₄ 2,5N. Las DO se obtuvieron en un lector Multiskan Ascent V1.22® a 450 nm.

Interpretación de resultados

Para cada isotipo y subclase de inmunoglobulina, se estableció una línea de corte utilizando el promedio más una desviación estándar de las densidades ópticas obtenidas por triplicado del *pool* de sueros negativos; se consideró como positivo un suero problema cuando su lectura fuera mayor a este valor.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las clases y subclases de inmunoglobulinas estudiadas, se utilizó el análisis de varianza de ANOVA (SPSS v.12®).

RESULTADOS

Intradermoreacción a la coccidioidina

De los 668 individuos estudiados, 67 fueron hombres y 601 mujeres. Del total de pruebas aplicadas, 621 fueron positivas (93%); el mayor porcentaje de resultados positivos se observó en el grupo de 25 a 44 años, donde el 95,1% presentaron induración, mientras que la menor reactividad se presentó en los sujetos mayores de 65 años, con 82% de respuesta a la aplicación de coccidioidina (Tabla 1). No se presentaron diferencias significativas en reactividad al antígeno intradérmico cuando se comparó la respuesta en habitantes de zona rural y urbana (92 y 88%, respectivamente), ni por género, en donde la positividad fue de 93 % en mujeres y 92,5% en los hombres.

Detección de clases y subclases de inmunoglobulinas

Los valores de corte para cada inmunoglobulina fueron: IgG total: 0,393; IgG1: 0,746; IgG2: 0,825; IgG3: 0,218; IgG4: 0,158 e IgM 0,077.

El promedio de las DO obtenido para los sueros positivos al extracto crudo de *C. immitis* se aprecia en la Figura 1 y en orden decreciente fue: IgG1, 1,55; IgG2, 0,94; IgG total, 0,33; IgG3, 0,29; IgG4, 0,27 e IgM, 0,08. El análisis estadístico demostró que las DO correspondientes a IgG1 e IgG2 fueron significativas cuando se compararon con las otras inmunoglobulinas estudiadas ($p=0,0$). Los valores de DO obtenidos en IgG total, IgG3 e IgG4, no mostraron diferencias estadísticas. Las lecturas obtenidas para IgM fueron muy bajas; sin embargo, comparadas con las otras inmunoglobulinas hubo diferencias significativas ($p<0,002$).

DISCUSIÓN

Después de los trabajos de González-Ochoa, en México se han realizado pocos estudios epidemiológicos que

permitan conocer la frecuencia actual de coccidioidomicosis. Desde los primeros estudios realizados en los Estados de Coahuila y Durango (Comarca Lagunera), en los que se utilizó únicamente la IDR, se observaron variaciones muy grandes de positividad en una zona geográfica limitada, con porcentajes de 5,4 a 59,9% (9, 26).

En datos publicados por Padua *et al.* (17) y Velasco-Rodríguez *et al.* (25) con 1.651 sujetos de Torreón, Coahuila, 665 (40,28%), fueron positivos a la coccidioidina. Los autores establecieron algunos factores de riesgo para sufrir la infección como: tiempo de residencia en el área, falta de pavimento en las calles y la edad entre 18 y 65 años. Es importante mencionar que el área de residencia de estos pacientes se encuentra al suroeste del estado de Coahuila, mientras que los sujetos analizados en el presente estudio habitan prácticamente en la misma latitud (25°32'N), pero a 52 Km. hacia el norte y más cercanos a las zonas desérticas; esta diferencia geográfica probablemente influya en una mayor reactividad a la coccidioidina. Por otro lado, esta área geográfica presenta tolvaneras frecuentes que pueden propiciar epidemias de coccidioidomicosis asintomática.

En este trabajo la reactividad a la coccidioidina se observó en personas, tanto de zonas rurales como de urbanas y fue superior a la de otros trabajos mexicanos, pero similar a la reportada en estudios realizados en el Condado de Kern, California (EUA), donde la frecuencia de IDR positiva fue de 90%, disminuyendo gradualmente hacia las poblaciones del sur del estado (4). En otras regiones endémicas de EUA los porcentajes máximos de IDR a coccidioidina en sujetos con historia clínica de coccidioidomicosis o estudios radiológicos anormales es de 60,7% (3).

Como lo han hecho notar otros investigadores, el tiempo de residencia incrementa la exposición al agente y en consecuencia la positividad a las pruebas inmunológicas; sin embargo, la disminución de intradermorreacciones positivas en personas mayores de 65 años que se detectó en este trabajo, podría deberse a una disminución natural de la respuesta inmune en esta edad (Tabla 1).

A pesar de la utilidad ya demostrada durante décadas de la IDR y de pruebas serológicas como precipitación en tubo capilar y doble inmunodifusión en gel para el diagnóstico, su baja sensibilidad hace necesario investigar la utilización de técnicas que sean capaces de detectar concentraciones bajas de antígeno y que sean suficientemente específicas para evitar falsos positivos o negativos. Galgiani *et al.* (6, 7) utilizando un antígeno de *C. immitis* de 33 kDa y el suero de pacientes con meningitis, demostraron que la técnica de ELISA es un procedimiento altamente sensible y específico para el diagnóstico y permite el reconocimiento de las subclases de inmunoglobulinas; además, es una de las pocas técnicas inmunológicas que no presenta reactividad cruzada con otras infecciones fúngicas (14).

Tabla 1. Porcentaje de intradermorreacción positiva a coccidioidina por grupos etarios

Grupo etario (años) (IDR)	Inoculados	Coccidioidina Positivos	(%)
18 – 24	123	113	91,9
25 – 44	346	329	95,1
45 – 64	154	142	92,2
> 65	45	37	82,2
Total	668	621	93,0

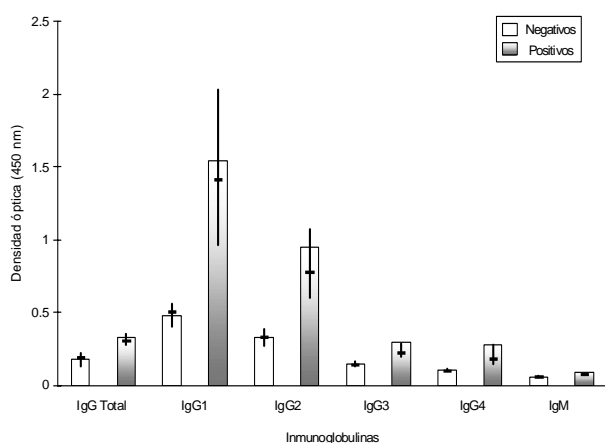


Figura 1. Niveles de inmunoglobulinas anti-*Coccidioides immitis* detectados en plasma de 180 individuos provenientes de zonas endémicas.

* Nota: las barras corresponden al promedio de las muestras hechas por triplicado; los extremos de las líneas verticales representan los percentiles 25 y 75, mientras que las líneas horizontales indican la mediana.

En el caso de sujetos infectados con *C. immitis*, no se ha establecido el perfil de subclases de IgG y en consecuencia se desconoce su importancia en la evolución de la enfermedad, ya que en otras infecciones existe variabilidad en sus concentraciones. En la lepra, la subclase IgG1 se presenta desde los estadios paucibacilares y decrece en los estadios multibacilares (23). En modelos murinos de criptococosis, la presencia de elevadas concentraciones de IgG3 se asocia a infecciones diseminadas (16). Recientemente se demostró que en pacientes con actinomicetoma de larga evolución existen elevadas cantidades de IgG3 e IgG4 (15). En el presente estudio las densidades ópticas elevadas de IgG1 e IgG2 en personas aparentemente sanas, sugieren un contacto frecuente con antígenos de *C. immitis* y posibles infecciones subclínicas o enfermedades no diagnosticadas. Finalmente, los bajos niveles de IgM indican que los individuos estudiados no presentaban infección reciente, ya que esta inmunoglobulina sólo se secreta en gran cantidad entre la segunda y tercera semana de la enfermedad, disminuyendo las concentraciones conforme se hace un cambio de isotipo hacia IgG (20).

El presente estudio ha permitido corroborar que la infección por *C. immitis* y/o *C. posadasii* es muy elevada en una zona del estado de Coahuila, considerada endémica de coccidioidomicosis. En futuros estudios epidemiológicos, además de la IDR sería recomendable determinar los niveles de subclases de IgG (en especial IgG1) y así establecer la importancia de estas inmunoglobulinas en la evolución de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Cicero RE (1932) El granuloma coccidioidal. Gac. Med. Méx. 63: 139.
- Dickson EC (1938) Primary coccidioidomycosis, the initial acute infection which results in coccidioidal granuloma. Amer. Rev. Tuberc. 38: 722.
- Dodge RR, Lebowitz MD, Barbie R, Burrows B (1985) Estimates of *Coccidioides immitis* infection by skin test reactivity in an endemic community. Am. J. Public. Health. 75: 863-865.
- Edwards LB, Palmer C (1957) Prevalence of sensitivity to coccidioidin, with special reference to specific and nonspecific reactions to coccidioidin and histoplasmin. Dis. Chest. 31: 35-60.
- Fisher MC, Koenig GL, White T J, Tay JW (2002) Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. Mycologia 94: 73-84.
- Galgiani JN, Grace GM, Ludergan LL (1991) New serologic test for early detection of coccidioidomycoses. J. Infect. Dis. 163: 671-674.
- Galgiani JN, Peng T, Lewis ML, Could GA, Pappagianis D (1996) Cerebrospinal fluid antibodies detected by ELISA against a 33-kDa antigen from spherules of *Coccidioides immitis* in patients with coccidioidal meningitis. J. Infect. Dis. 173: 499-502.
- González-Benavides J (1991) Panorama de la coccidioidomycosis en Nuevo León de 1978 a 1988. Gac. Med. Mex. 127: 427-433.
- González-Ochoa A (1967) Coccidioidomycosis in México. En: Ajello L (Ed) Coccidioidomycosis. University of Arizona Press, Tucson, p. 293-299.
- Laborin RL, Cárdenas RP, Álvarez MC (1991) Tijuana: zona endémica de infección por *Coccidioides immitis*. Salud Púb. Méx. 33: 235-239.
- Lowry OH, Rosenbroug NJ, Farr AC, Randall RC (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Maddy KT (1957) Ecological factors possibly relating to the geographic distribution of *Coccidioides immitis*. En: Proceedings of a Symposium on Coccidioidomycosis. Public Health Service Publication 575. Center for Disease Control, Atlanta, p. 144-157.
- Madrid G (1948) Las micosis pulmonares. Rev. Méx. Tuber. Ap. Resp. 9: 32.
- Martins TB, Jakowski TD, Mouritsen LC, Hill HR (1995) Comparison of commercially available enzyme immunoassay with traditional serological tests for detection of antibodies to *Coccidioides immitis*. J. Clin. Microbiol. 33: 940-943.
- Méndez-Tovar LJ, Mondragón-González R, Manzano-Gayosso P, López-Martínez R, Hernández-Hernández F, Bonifaz A, et al. (2004) Inmunoglobulinas en pacientes con actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*. Rev. Arg. Microbiol. 36: 174-178.
- Nussbaum G, Yuan R, Casadevall (1996) Immunoglobulin G3 blocking antibodies to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. J. Exp. Med. 183: 1905-1909.
- Padua GA, Martínez-Ordaz VA, Velasco-Rodríguez VA, Lazo-Sáenz JG, Cicero R (1999) Prevalence of skin reactivity to coccidioidin and associated risks in subjects living in a northern city of Mexico. Arch. Med. Res. 30: 388-392.
- Pappagianis D (1998) *Coccidioides immitis*. En: Ajello L, Hay Arnold R (Eds). Microbiology and Microbial Infections, Topley & Wilson's, London, p. 357-371.
- Pappagianis D (1980) Epidemiology of coccidioidomycosis. En: Stevens DA (Ed), Coccidioidomycosis, Plenum Press, New York, p. 36-40.
- Pappagianis D, Zimmer BL (1990) Serology of coccidioidomycosis. Clin. Microbiol. Rev. 3: 247-268.
- Perrín TG (1932) Un caso de granulomatosis coccidioidal. Demostración de *Coccidioides immitis*. Gac. Med. Méx. 63: 158.
- Posadas A (1892) Un nuevo caso de micosis fungoidea con psorospermias. An. Círc. Med. Argent. 15: 585-597.
- Sathish M, Esser ER, Thole RE J, Clark-Curtiss EJ (1990) Identification and characterization of antigenic determinants of *Mycobacterium leprae* that react with antibodies in sera of leprosy patients. Infect. Immun. 58: 1327-1336.
- Toriello C, Arjona-Rosado C, Días-Gómez ML, Taylor ML (1991) Efficiency of crude and purified fungal antigens in serodiagnosis to discriminate mycotic from other respiratory diseases. Mycoses 34: 133-140.
- Velasco-Rodríguez VM, Martínez-Ordaz VA, Padua y Gabriel A, Lazo-Saenz JG, Cicero-Sabido R (2001) Usefulness of the coccidioidin skin test in patients with type diabetes mellitus in an endemic zone. Rev. Invest. Clín. 53: 223-227.
- Verduzco E, Portales A, Mojardín S, García SR (1965) Características clínicas y epidemiológicas de la coccidioidomycosis en la Comarca Lagunera. Salud Púb. Méx. 7: 397-402.
- Voller A, Bidwell D, Bartlett A (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay. En: Rose N R, Friedman H (Eds) Manual of Clinical Immunology, ASM Press, Washington, DC, p. 359-371.