

## Gaceta Médica de México

Volumen  
Volume 137

Número  
Number 1

Enero-Febrero  
January-February 2001

*Artículo:*

### Anticuerpos Anti-*Nocardia brasiliensis* en pacientes con actinomietoma y su utilidad clínica

Derechos reservados, Copyright © 2001:  
Academia Nacional de Medicina de México, A.C.

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

# Anticuerpos Anti-*Nocardia brasiliensis* en pacientes con actinomicetoma y su utilidad clínica

Mario César Salinas-Carmona

Recepción versión modificada 13 de junio del 2000; aceptación 19 de junio del 2000

## Resumen

*El objetivo de este trabajo es determinar la respuesta de anticuerpos anti-Nocardia brasiliensis en pacientes con actinomicetoma y conocer su utilidad clínica. Se preparó un extracto celular de la cepa de N. brasiliensis identificada como Hospital Universitario José Eleuterio González, HUJEG-1 y registrada como ATCC # 700358. Las proteínas del extracto se transfirieron a papel de nitrocelulosa, las tirillas se incubaron con suero de pacientes con micetoma, tuberculosis, lepra o con sueros de personas sanas. Se identificaron los antígenos inmunodominantes y de ellos se decidió escoger a la P24 para una prueba inmunoenzimática en fase sólida (ELISA), también se aisló una proteasa y se utilizó como antígeno. Los valores de absorbancia de los sueros de pacientes con micetoma activo fueron superiores a 0.3 con la P24 como antígeno y variables contra la proteasa. Los pacientes con micetoma curados mostraron valores iguales a los de las personas sanas, se confirma la utilidad clínica de la prueba de ELISA para el diagnóstico serológico y para evaluar la respuesta al tratamiento cuando se usa el antígeno P24 pero no cuando se usa la proteasa. Esta es la única prueba en el mundo que es específica y sensible para uso clínico de rutina.*

**Palabras clave:** Anticuerpos, *Nocardia brasiliensis*, actinomicetoma

## Summary

*Anti-Nocardia brasiliensis antibodies quantification and its clinical utility was confirmed in this study. A protein cellular extract from a N. brasiliensis strain named HUJEG-1 and registered at the ATCC # 700358 was used in a western blot assay to identify the immunodominant antigens. The protein P24 was selected to set up an ELISA test because it exhibit no cross-reaction with sera from tuberculosis and leprosy patients. A purified protease was also used as antigen in the ELISA test to compare its utility. Sera from N. brasiliensis mycetoma persons gave absorbance values above 0.3 when the disease was active using the P24 as antigen, these values decreased after patients completed their medical treatment. Anti-protease antibodies showed great variation and absorbance values similar to the healthy controls. We confirmed the clinical usefulness of the ELISA test both in serodiagnosis and in assessing the response to medical treatment. This is the first sensitive and specific serologic test for routine clinical laboratory.*

**Palabras clave:** Actinomycetoma, *Nocardia brasiliensis*, Antibodies, Clinical Correlation

\* Departamento y Servicio de Inmunología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José E. González". Correspondencia y solicitud de sobretiros: Departamento y Servicio de Inmunología, Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José E. González". Universidad Autónoma de Nuevo León Gonzalitos # 235 Norte Colonia Mitras, Monterrey, N.L. 64460.

## Introducción

El micetoma es una infección crónica que puede ser producida por hongos como *Madurella griseae*, *Madurella mycetomatis*, etc. a estas infecciones se les conoce con el nombre de eumicetomas. También bacterias aerobias pueden producir micetoma como *Actinomaduræ maduræ*, *A. pelletieri*, *Streptomyces somaliensis*, *Nocardia brasiliensis* etc. En este caso hablamos de actinomicetomas.<sup>1,2</sup> Los micetomas se presentan en forma endémica en países no desarrollados como India, Tailandia, Somalia, Venezuela, Sudán, Senegal, Brasil, México etc. Los agentes causales varían de región en región pero en México, cerca del 86% de los casos son producidos por *Nocardia brasiliensis*.<sup>1</sup> A nivel mundial, México tiene el mayor número de casos reportados después de Senegal según un estudio publicado por el doctor Mariat.<sup>3</sup>

El diagnóstico de micetoma se hace en base al cuadro clínico caracterizado por una inflamación crónica, indolora, con abscesos y fístulas por las cuales drena líquido y pequeñas partículas sólidas denominadas "gránulos" que corresponden a colonias del agente causal. El diagnóstico se confirma con el cultivo microbiológico de la secreción pero esto tarda de 2 a 3 semanas por el crecimiento lento de estos microorganismos. Desde hace muchos años varios autores intentaron el diagnóstico inmunológico sin buenos resultados en parte porque las técnicas que utilizaron eran de baja sensibilidad y en parte porque los antígenos que se emplearon eran extractos crudos no purificados y presentaron reacciones cruzadas con los sueros de personas infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>4,5,6</sup> En años más recientes, Salinas-Carmona y colaboradores identificaron varios antígenos inmunodominantes mediante la técnica de electrotransferencia (Western blot), identificándose tres proteínas como inmunodominantes denominadas P61, P26 y P24.<sup>7</sup> Después, con el uso de técnicas simples, se logró el aislamiento y purificación de P61 y P24.<sup>8</sup>

Con el uso de antígenos celulares purificados como la mencionada proteína P24, desarrollamos un método inmunoenzimático en fase sólida; en otros experimentos utilizamos como antígeno una proteasa caseinolítica que no es inmunodominante

para determinar la concentración de anticuerpos circulantes en el suero de pacientes con enfermedad activa, curados y con recaída.

El objetivo de este trabajo es comparar la concentración de anticuerpos anti-P24 y anti-proteasa de *N. brasiliensis* en el suero de personas con micetoma e identificar cuál de estas dos determinaciones es de utilidad clínica en el diagnóstico y en el pronóstico del micetoma.

## Material y métodos

### *Pacientes con micetoma*

En este estudio se incluyeron pacientes con micetoma con cultivos positivos para *N. brasiliensis* que acudieron a control en el Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "Dr. José E. González", el diagnóstico y tratamiento de estos enfermos fue realizado por el Dr. Oliverio Welsh Lozano. Los pacientes tenían infección crónica de 3 a 5 años de evolución con lesiones localizadas en las extremidades. No se incluyeron casos de minimicetomas ni de invasión a órganos. Las muestras de sangre se tomaron sin anticoagulante, el suero se conservó a -70°C hasta su utilización. Se incluyeron sueros de pacientes en diferentes etapas de su padecimiento y suero de pacientes curados de 6 a 12 meses, además de personas con eumicetomas.

### *Pacientes con tuberculosis, lepra y personas sanas*

Se incluyeron 29 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar con cultivos positivos, de ellos los marcadores en TBP1 al TBP20 no habían recibido tratamiento. El resto tenían de 3 a 6 meses de tratamiento antifímico en el Servicio de Neumología del Hospital Universitario, "Dr. José E. González".

Los 15 pacientes con diagnóstico comprobado de lepra lepromatosa y 9 clasificados como lepra tuberculoides recibirán tratamiento médico en el Servicio de Dermatología. En ambos grupos el tratamiento médico fue de 1 mes a 3 años. El suero de

personas sanas se tomó de donadores voluntarios, trabajadores del área de la salud incluidos enfermeras, médicos residentes y estudiantes de medicina.

#### *Cepa de Nocardia brasiliensis*

Para la preparación de los antígenos utilizados en nuestros experimentos, utilizamos una cepa de *N. brasiliensis* aislada de un paciente con micetoma en el tórax. Esta cepa se denomina HUJEG-1, está registrada en La Colección Americana de Células Tipo (ATCC # 700358), y su identificación fue confirmada por June Brown del Laboratorio de Actinomicetos del Centro de Control de Enfermedades infecciosas de Atlanta, Georgia (CDC) en los Estados Unidos de Norteamérica. Esta cepa es mantenida en subcultivos en agar Sabouraud.

#### *Preparación de antígeno P24 y proteasa*

Para obtener masa bacteriana suficiente para el aislamiento de los antígenos, realizamos cultivos en medio líquido de infusión de cerebro corazón (BHI, Difco) en el caso de la proteína P24. En cambio, para obtener la proteasa usamos un medio desarrollado en nuestro laboratorio (patente en trámite). En ambos casos, se usaron 170 ml del medio en matraces Erlenmeyer de 1 litro y se incubaron a 37°C sin agitación. Al final del cultivo, se recuperaron las células bacterianas en un papel filtro y se deslipidizaron con mezcla de etanol-éter etílico como se describió anteriormente.<sup>9</sup> Después de secar las células, se trituraron con polvo de vidrio y se realizaron dos extracciones con un amortiguador de fosfatos y acetato de magnesio al 0.01M con ayuda de un agitador magnético. El extracto se precipitó con sulfato de amonio al 50% de saturación, el sobrenadante fue dializado, tratado con DNAsa 1 (Sigma), y luego se pasó por una columna de filtración en gel de Sephadex G-100 (Farmacia) y se colectaron fracciones de 2 ml. Estas fracciones fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) calor y 2-mercaptoetanol. Para la purificación de la proteasa caseinolítica seguimos la técnica estandarizada en nuestro laboratorio que se describe en forma breve a conti-

nuación: con la misma cepa de *N. brasiliensis*, inoculamos matraces con el medio de cultivo desarrollado en nuestro laboratorio y constituido de glucosa, peptona de colágena, extracto de levadura, NaCl y carbonato de calcio. La masa bacteriana se deslipidizó igual como se describió en el párrafo anterior y el sobrenadante obtenido en la extracción se mezcló con una resina de intercambio iónico (dietil, amino, etil celulosa DEAE), disuelta en amortiguador de Tris-HCL, 0.1 M, pH6.5. El sobrenadante que no se unió a la resina, se concentró y luego se dializó contra agua destilada. El producto con una concentración de 3.5 mg de proteínas totales, se agregó a un gel preparativo de poliacrilamida al 12% en condiciones no desnaturalizantes. Después del corrimiento, las bandas con actividad caseinolítica fueron eluidas mecánicamente con un agitador magnético, para lo cual se utilizó agua destilada. El eluido se dializó y se le determinaron proteínas por el método de Bradford y se liofilizó.

#### *Técnica inmunoenzimática (ELISA) para anticuerpos anti-P24 y anti-proteasa*

Utilizamos placas de poliestireno de fondo plano (Costar) con 96 pozos y básicamente seguimos la metodología originalmente descrita por Engvall y Perlmann<sup>10</sup> con algunas modificaciones adaptadas en nuestro laboratorio y publicadas previamente.<sup>11</sup> La proteína purificada P24 o la proteasa en concentración de 0.5 g por micropozo, disueltas en amortiguador de acetatos pH 5 se dejó en incubación a 4°C durante toda la noche; después se realizaron 5 lavados con una solución de salina y fosfatos pH 7.2 en presencia del detergente Tween 20, diluido 1:1,000. Los pozos se bloquearon luego con una solución de leche descremada al 5% en salina-fosfatos y luego se volvió a lavar con la solución mencionada antes. Los sueros de los pacientes y personas sanas se diluyeron 1:500 y se incubaron a 37°C por una hora. Después se agregaron 200µ de un conjugado comercial de peroxidasa con anti-inmunoglobulina G humana y de nuevo se incubó por una hora a 37°C. Luego de lavar la placa de nuevo, se agregó una mezcla de sustrato cromógeno compuesta de peróxido de hidrógeno y O-fenilendiamina (Sigma). La reacción se terminó con ácido sulfúrico 1N y la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a 492 nanómetros (PMQ3. Zeiss).

## Resultados

### Caracterización de los antígenos de *N. brasiliensis*

En la figura 1 se presenta el resultado de una electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente 8-18% y los marcadores de peso molecular, este gel se tiñó con nitrato de plata y muestra la compleja composición de más de 40 diferentes bandas del extracto celular crudo obtenido de la cepa HJJEG-1 de *Nocardia brasiliensis*. En la figura 2 se muestra un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie R-250 en donde resulta clara la presencia de una sola banda de una proteína de movilidad relativa correspondiente a los 24 kDa que constituye la proteína inmunodominante purificada con la cual se realizaron las pruebas inmunoenzimáticas.

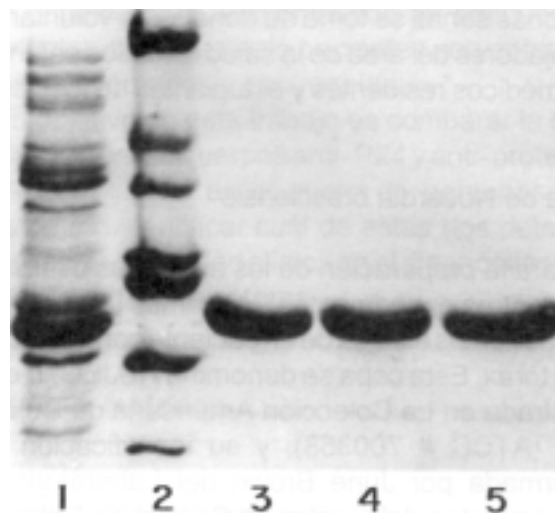


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. Se observan los marcadores de movilidad relativa, un extracto celular crudo de *N. brasiliensis* y en los carriles 3, 4 y 5 se demuestra la P24 purificada.

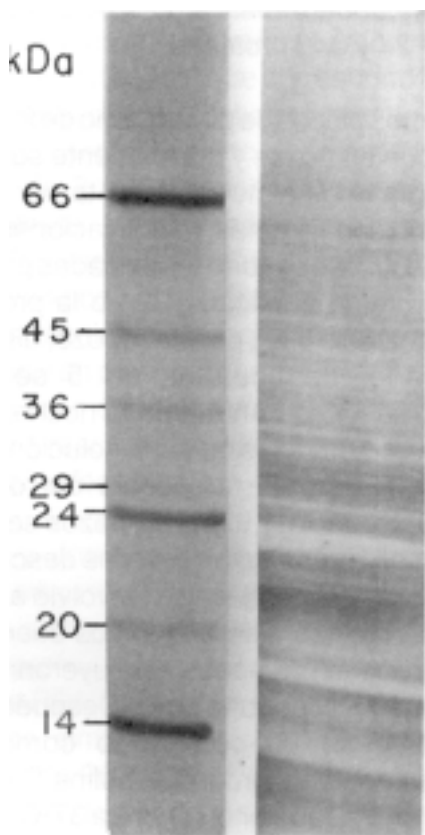


Figura 1. Extracto celular crudo de *Nocardia brasiliensis* analizado en electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, en gradiente 8-18% teñido con nitrato de plata. En el extremo se presentan los marcadores de movilidad relativa.

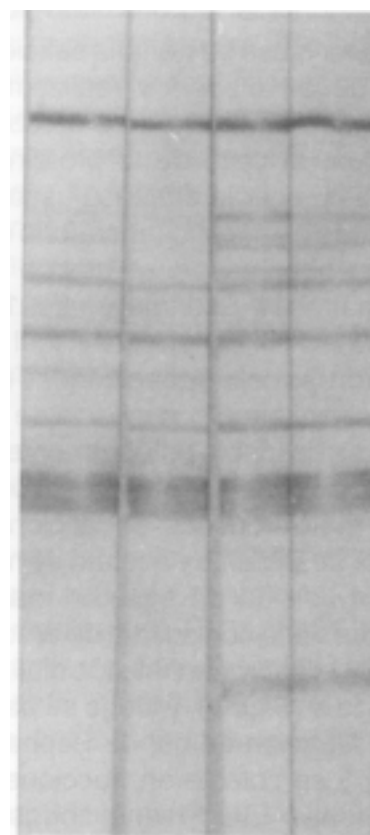


Figura 3. Inmuno-electrotransferencia de antígenos de *N. brasiliensis*, incubados con sueros de pacientes con micetoma activo; se observan los antígenos inmunodominantes.

**Cuadro I. Absorbancias de los sueros analizados con la técnica de Elisa para la detección de anticuerpos humanos anti-P24 de *Nocardia brasiliensis*.**

Personas Sanas		Pacientes con lepra		Pacientes con tuberculosis		Pacientes con micetoma	
Clave	Abs.	Clave	Abs.	Clave	Abs.	Clave	Abs.
SN1	0.109	H1	0.075	TBP1	0.195	M4	0.416
SN2	0.171	H2	0.069	TBP2	0.158	M5	0.814
SN3	0.261	H3	0.047	TBP3	0.021	M7	0.424
SN4	0.052	H4	0.049	TBP4	0.099	M9	0.612
SN5	0.089	H5	0.092	TBP5	0.209	M15	1.479
SN6	0.088	H6	0.086	TBP6	0.080	M17	1.552
SN7	0.160	H7	0.138	TBP7	0.101	M19	0.387
SN8	0.105	H8	0.023	TBP8	0.165	M20	> 2
SN9	0.176	H9	0.188	TBP9	0.175	M21	> 2
SN10	0.088	H10	0.154	TBP10	0.185	M22	> 2
SN11	0.117	H11	0.184	TBP11	0.109	M23	1.439
SN12	0.395	H12	0.055	TBP12	0.162	M24	0.502
SN13	0.018	H13	0.214	TBP13	0.276	M25	0.461
SN14	0.195	H14	0.235	TBP14	0.102	M26	0.353
SN15	0.138	H15	0.096	TBP15	0.190	M27	1.135
SN16	0.227	H16	0.229	TBP16	0.088	M28	0.275
SN17	0.078	H17	0.054	TBP17	0.025	M29	0.858
SN18	0.099	H18	0.310	TBP18	0.045	M30	0.431
SN19	0.070	H19	0.176	TBP19	0.120	M31	0.622
SN20	0.033	H20	0.074	TBP20	0.225	M32	0.967
SN21	0.079	H21	0.080	TBP21	0.109	M33	0.484
SN22	0.042	H22	0.263	TBP22	0.130	M34	0.326
SN23	0.073	H23	0.052	TBP23	0.199	M35	0.341
SN24	0.003	H24	0.085	TBP24	0.094	M36	1.634
SN25	0.005			TBP25	0.281	M37	1.622
SN26	0.090			TBP26	0.130	M38	0.660
SN27	0.028			TBP27	0.108	M39	1.567
SN28	0.046			TBP28	0.151	M40	> 2
SN29	0.043			TBP29	0.034	M41	> 2
SN30	0.048					M42	0.457
SN31	0.122						

#### *Identificación de antígenos inmunodominantes mediante inmunoelectrotransferencia*

En la figura 3 se presentan varias tiras de papel de nitrocelulosa con los antígenos del extracto celular crudo de *N. brasiliensis*, reconocidos por los anticuerpos de los sueros de los pacientes con micetoma. Se muestra que las proteínas de 61, 26 y 24 kilodaltons fueron reconocidas en forma intensa por los sueros de los pacientes con micetoma activo; también otras bandas de 36, 40, 45 etc. reaccionaron, sin embargo estas bandas también fueron reconocidas por los sueros de personas infectadas con *M. tuberculosis* o con *M. leprae*. En otros experimentos no mostrados aquí, también

encontramos que los sueros de ratones infectados con *N. brasiliensis* identifican a la P61, P26 y P24 como antígenos inmunodominantes.<sup>9</sup>

#### *Determinación de anticuerpos anti-N. brasiliensis por la técnica de ELISA*

Con la técnica inmunoenzimática en fase sólida descrita en este artículo, determinamos los anticuerpos en el suero de 30 personas infectadas con el diagnóstico clínico comprobado de micetoma por *N. brasiliensis* en diferente etapa de su enfermedad. En el Cuadro I se muestran los valores de absorbancia de los sueros de los pacientes con

**Cuadro II. Absorbancias de los sueros de pacientes con micetoma en dos etapas de la enfermedad analizados por la técnica de Elisa para la detección de anticuerpos anti-P24 de *Nocardia brasiliensis*.**

Pacientes con micetoma		Pacientes con micetoma curados	
Clave	Abs.	Clave	Abs.
M15	1.479	M1	0.093
M17	1.552	M2	0.106
M20	> 2	M3	0.109
M22	> 2	M6	0.157
M23	1.439	M8	0.091
M25	0.461	M10	0.013
M26	0.353	M11	0.067
M27	1.135	M12	0.062
M28	0.275	M13	0.067
M29	0.858	M14	0.082
M30	0.431	M16	0.179
M31	0.622	M18	0.091
M32	0.967		
M33	0.484		
M34	0.326		
M35	0.341		
M36	1.634		
M37	1.622		
M38	0.660		
M39	1.576		
M40	> 2		
M41	> 2		
M4	0.416		
M5	0.814		
M7	0.424		
M9	0.612		
M19	0.387		
M21	> 2		
M24	0.502		
M42	0.457		

micetoma activo y resulta claro que la absorbancia a 492 nanómetros en todos los casos es superior a 0.3. Los valores de absorbancia de los sueros de las personas sanas, de pacientes con tuberculosis y con lepra también resultaron por abajo de 0.3, por lo cual decidimos que este valor es la línea de corte entre sanos y enfermos.

#### *Determinación de anticuerpos anti-N. brasiliensis en diferentes etapas clínicas de pacientes con micetoma*

En el cuadro II se presentan los valores de absorbancia que reflejan la concentración de anticuerpos en el suero de pacientes con el diagnóstico confirmado de micetoma por *N. brasiliensis* en fase activa. También se demuestra que los

sueros de los pacientes curados dieron valores por debajo de la línea de corte establecida de 0.3. Además en el mismo cuadro se observa que el suero de tres pacientes con recaída de su enfermedad, mostraron un incremento en la concentración de anticuerpos anti-P24.

#### *Variabilidad intra e interensayo de la técnica de ELISA*

Para determinar la reproducibilidad de la técnica de ELISA utilizada para el diagnóstico serológico de infecciones por *N. brasiliensis*, realizamos pruebas de evaluación intraensayo, para lo cual se analizaron por triplicado muestras de suero de pacientes y de personas sanas, se obtuvo el promedio de los tres valores y la desviación estándar. Como se muestra en la primera parte del cuadro III la reproducibilidad dentro del mismo ensayo es buena, al igual que la reproducibilidad entre una prueba y otra analizando los mismos sueros en diferentes días. En la segunda parte del mismo cuadro III se muestran los valores de absorbancia de los mismos sueros analizados en tres días diferentes, los promedios de las tres observaciones y su desviación estándar en el caso de los pacientes con micetoma, así como en el caso de sueros de personas sanas o con tuberculosis nos demuestran una variación mínima en el ensayo.

#### *Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA*

Los resultados de las pruebas para evaluar la sensibilidad se muestran en el cuadro IV; los valores de absorbancia de las diferentes diluciones de los mismos sueros mostraron un coeficiente de correlación arriba de 0.9 en todos los casos. La especificidad se evaluó con el suero de enfermos con tuberculosis, lepra, y micetoma por *N. asteroides*. En los primeros dos grupos de pacientes es decir en los infectados con micobacterias, los resultados siempre fueron por abajo del valor establecido de la línea de corte (Cuadro I). Los tres casos de micetoma por *N. asteroides* dieron resultados similares a los casos de *N. brasiliensis* en cuanto a los valores de absorbancia.

**Cuadro III. Reproducibilidad de la técnica de Elisa para anticuerpos anti P24 de *N. brasiliensis*.**

Suero de pacientes	Absorbancia por triplicado (x + d.e.) intraensayo	Absorbancia por triplicado (x + d.e.) interensayo
Pacientes con micetoma	1.297, 1.326, 1.306 ( 1.309 + 0.012)	1.740, 1.858, 1.866 ( 1.866 + 0.130 )
Pacientes con lepra	0.056, 0.056, 0.050 ( 0.054 + 0.003)	0.127, 0.157, 0.133 ( 0.138 + 0.014 )
Pacientes con tuberculosis	0.056, 0.058, 0.060 ( 0.058 + 0.002)	0.063, 0.059, 0.064 ( 0.062 + 0.002 )
Personas sanas	0.029, 0.031, 0.023 ( 0.027 + 0.004 )	0.031, 0.028, 0.039 ( 0.032 + 0.005 )

**Cuadro IV. Evaluación de la sensibilidad de la técnica de Elisa para anticuerpos anti P24 de *N. brasiliensis*.**

Paciente	Dilución del suero	Absorbancia	Coefficiente de correlación (r)
A	1:500	1.868	0.979491
	1:1,000	1.452	
	1:2,000	1.128	
	1:4,000	0.838	
B	1:500	0.664	0.948651
	1:1,000	0.561	
	1:2,000	0.397	
	1:4,000	0.288	
C	1:500	0.500	0.965748
	1:1,000	0.388	
	1:2,000	0.242	
	1:4,000	0.157	
D	1:500	0.503	0.988406
	1:1,000	0.344	
	1:2,000	0.189	
	1:4,000	0.137	
E	1:500	0.594	0.967448
	1:1,000	0.459	
	1:2,000	0.276	
	1:4,000	0.185	

#### Determinación de anticuerpos antiproteasa de *N. brasiliensis*

La estandarización de la técnica fue exitosa ya que se logró una reproducibilidad semejante a la obtenida cuando se utilizó P24 como antígeno; sin embargo, los valores de absorbancia de los sueros de pacientes con micetoma no son estadísticamente diferentes de los sueros de las personas sanas. Los valores bajos de absorbancia de los sueros de los pacientes reflejaron realmente una cantidad muy baja de anticuerpos anti proteasa (Abs menor de 0.2).

#### Discusión

La respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos contra antígenos de *Nocardia brasiliensis* en el suero de pacientes con micetoma reconocieron más de 7 antígenos presentes en el extracto celular crudo. Sin embargo, varios de ellos también reaccionaron con los sueros de pacientes con infecciones por micobacterias, por lo cual fueron descartados como antígenos de posible utilidad diagnóstica. Las proteínas de peso molecular aproximado de 61, 26 y 24 kilodaltons aunque también son inmunodominantes, no dieron reacciones cruzadas. Con el aislamiento y purificación de uno de esos antígenos (la P24) implementamos una técnica inmunoenzimática que es muy sensible, reproducible y aunque no tiene un 100% de especificidad, resuelve el problema del diagnóstico serológico. Aunque varios autores intentaron el diagnóstico inmunológico rápido, por más de 20 años, sus resultados no fueron buenos ya que utilizaron técnicas poco sensibles y sus preparaciones antigénicas eran mezclas complejas de antígenos proteicos, polisacáridos no definidos ni caracterizados,<sup>4,5</sup> con lo cual las reacciones cruzadas fueron un problema común. Los investigadores mexicanos Zamora, Bojalil y Bastarrachea fueron capaces de obtener antígenos más puros de naturaleza polisacárida que resultaron parcialmente útiles por la presencia de reacciones cruzadas.<sup>6</sup> En el presente trabajo la estrategia utilizada de identificar primero a los antígenos inmunodominantes y segundo luego seleccionar entre ellos a los antígenos que no dan reacciones cruzadas con sueros de pacientes infectados con *M. tuberculosis* o con *M. leprae* nos permitió resol-



ver en gran parte el tradicional problema de la especificidad. Además el uso de una técnica de alta sensibilidad como un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) fue el otro factor determinante en el éxito alcanzado.<sup>7,11</sup> La utilidad clínica de la prueba de ELISA descrita en este artículo además de su uso en el diagnóstico etiológico del micetoma, queda demostrada con la correlación que encontramos entre la alta concentración de anticuerpos anti-P24 y la enfermedad activa; es más, la determinación de anticuerpos también sirve para evaluar la respuesta al tratamiento médico y como un marcador de recaída, antes de que aparezcan signos clínicos macroscópicos del micetoma.

La determinación de anticuerpos anti-proteasa, no parece tener utilidad clínica por un lado porque la cantidad de esos anticuerpos en las personas con enfermedad activa es baja, y porque la cantidad de antígeno que se requiere para la prueba de ELISA es alta y costosa. La presencia de esos anticuerpos en cambio pudiera estar más en relación con protección del huésped, ya que previamente se encontró que cuando los pacientes con micetoma por *N. brasiliensis* están en remisión reconocen o reaccionan con este antígeno.<sup>12</sup>

El papel de los anticuerpos en las infecciones por nocardias no está claro; en trabajos publicados recientemente en modelos experimentales en roedores se encontró que el suero de ratones inmunizados con *N. brasiliensis* muertas por calor confirió protección parcial contra el desarrollo de micetoma cuando fue transferido pasivamente a ratones singénicos. Aunque inicialmente se le atribuyó esta propiedad protectora a los anticuerpos presentes en esos sueros, no se descartó que otros factores solubles como linfocinas pudieran estar involucrados en este efecto.<sup>13</sup>

Se necesitan estudios para identificar los factores de patogenicidad y virulencia en las infecciones por nocardias, con esa información se podrá explorar el papel de la respuesta inmune en la resolución del proceso infeccioso y eventualmente esta información será de gran utilidad para encontrar antígenos que puedan ser útiles en la inmunización activa para la prevención de estas infecciones.

**Agradecimientos:** Al Sr. Antonio Luna por el trabajo de fotografía, a la Srita. Beatriz A. Vega por el trabajo de manuscrito. Este trabajo fue apoyado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología bajo los números M9201/F-123 y 2453-M y Paicyt, UANL.

## Referencias

1. **Welsh O, Salinas MC, Rodríguez MA.** Mycetoma. En : Infectious Diseases A treatise of Infectious Processes. Hoeprich PD, Jordan MC, Ronald AR( Eds.) J.B. Lippincott Company. 5ª. Edición Philadelphia, 1994, pp 1402-1406
2. **Rippon JW.** Mycetoma Medical Mycology: The Pathogenic fungi and actinomycetes 1982; The W.B. Saunders Co Philadelphia pp79-114.
3. **Mariat F., Destombes P. Segreton G.** The mycetomas: Clinical Features, pathology, ethiology and epidemiology. Contrib. Microb. Immunol 1977; 4:1-39
4. **Blumer SO, Kauffman L.** Microimmunodiffusion test for nocardiosis. J. Clin. Microbiol. 1979; 10:308-312.
5. **Humphreys DW, Crowder JG, White A.** Serological reactions to *Nocardia* antigens. Am. J. Med. Sci. 1975; 269:323-336.
6. **Zamora A, Bojalil LF, Bastarrachea F.** Immunologically active polysaccharides from *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. J. Bacteriol. 1963; 85:549-55
7. **Salinas-Carmona MC, Vera L, Welsh O, Rodríguez M.** Antibody response to *Nocardia brasiliensis* antigens in man 1992; 30:390-397
8. **Vera-Cabrera L, Salinas-Carmona MC, Welsh O, Rodríguez M.** Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. Journal of Clinical Microbiology 1992; 30:1183-1187
9. **Salinas-Carmona MC, Castro-Corona MA, Sepúlveda-Saavedra J, Pérez-Rivera L.** Monoclonal antibodies to P24 and P61 immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 1997; 4:133-137
10. **Engvall E, Perlmann P.** Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA 1972; 109:129-135
11. **Salinas-Carmona MC, Welsh O y Casillas SM.** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and Clinical Correlation with Mycetoma Infections. J. Clin. Microbiology 1993; 31:2901-2906
12. **Salinas-Carmona MC, Pérez LI, Welsh O, Rodríguez M, Rinaldi G.** Identification of intracellular proteases from *Nocardia brasiliensis*. J. Mycol. Med. 1992; 2:182-188
13. **Salinas-Carmona MC, Torres-López E.** Role of Passive Humoral Immunity in Experimental Mycetoma by *Nocardia brasiliensis*. Annals of the New York Academy of Sciences 1996; 797:263-265